

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700489

研究課題名(和文) 抗癌剤の薬効評価のための癌微小環境を模倣した疑似癌組織の構築

研究課題名(英文) Fabrication of novel culture system composed of cancer cells and cancer stromal cells for in vitro evaluation of anticancer drugs

研究代表者

山添 泰宗 (YAMAZOE, HIRONORI)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：00402793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)： 個々の癌患者に適した抗癌剤を高い精度で判別できる試験法の開発を目指し、癌細胞と間質細胞(癌間質線維芽細胞と単球)を用いて癌微小環境を模倣した疑似癌組織を構築した。同疑似組織を用いた検討により、間質細胞の存在によって癌細胞の抗癌剤に対する感受性が著しく変化することが分かった。また、基板上に固定化した単球と癌細胞から成る培養系を確立し、単球の影響により抗癌剤の薬効が促進されること、および、単球近傍に存在している癌細胞のみがその影響を受けることを明らかにした。これら、間質細胞の影響を考慮した本培養システムは、抗癌剤試験の精度向上に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)： In order to develop the methods for the selection of effective drugs for different patients with high accuracy, we fabricated a multi-component co-culture system, in which cancer cells were co-cultured with two types of stromal cells, stromal fibroblasts and monocytes, recreating the in vivo cancer microenvironment. It was found that the sensitivity of cancer cells to anticancer drugs was significantly changed by the presence of stromal cells. We also fabricated the co-culture system composed of immobilized monocytes and cancer cells, and it was found that monocytes enhanced the cancer drug sensitivity and cancer cells located near monocytes were only affected by monocytes. Our culture system which takes account of cancer stromal cells is thought to contribute to improve the accuracy of in vitro drug evaluation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：疑似癌組織 薬効評価 パターニング 組織工学

1. 研究開始当初の背景

癌治療において、抗癌剤が広く用いられているが、癌の性質は患者ごとに異なるため、同じ抗癌剤であってもその効果は個人差が非常に大きい。そこで、投与前に効果が有るのか、無いのかを個々の患者ごとに判別し、効果があると期待される抗癌剤のみを投与することが求められている。抗癌剤の判別は、患者の癌の一部を採取して体外で培養を行い、様々な種類の抗癌剤に暴露した後、癌細胞の生存状態を調べる、という手順で行われる。癌細胞が死滅した場合、その抗癌剤は患者の癌に対して有効であり、癌細胞が生存している場合は、無効であると判断される。このような患者の癌細胞を用いた抗癌剤の判別試験法は、抗癌剤感受性試験と呼ばれ、現在実施されている代表的なものとしては、I) 平面で培養(2次元)した癌細胞を使用するSDI法、II) コラーゲンゲルで包埋し3次元で増殖できる環境下で培養した癌細胞を使用するCD-DST法、III) 癌の組織切片を使用するHDRA法がある。しかし、これら従来の方法においては、的中率が低いという問題があり広く普及していない。

癌組織には癌細胞に加えて、間質細胞、血管系、細胞外マトリックスなどが存在し、癌の微小環境を形成している。生体内において、癌細胞はこれら微小環境と相互作用しており、抗癌剤の効き方に関しても癌微小環境が大きな影響を及ぼすことが多数の報告により指摘されている。従来の試験法において的中率が低い大きな要因の一つは、このような微小環境が十分に考慮されていない培養系で抗癌剤の判別試験を実施している点にある。よって、試験精度の向上のためには、生体内において癌細胞がおかれている環境、すなわち、3次元的に癌細胞が増殖できる状態や間質細胞の存在、を考慮した培養系を構築することが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、個々の癌患者に適した抗癌剤を高い精度で判別できる新規の薬剤評価法の開発を目指し、癌微小環境を模倣した擬似癌組織を構築すること、ならびに、癌細胞の周囲に存在する間質細胞が抗癌剤の薬効に及ぼす影響を検証することを目的に研究を行った。具体的には以下の3項目を計画した。

(1) 癌細胞と二種類の間質細胞(癌間質線維芽細胞と単球)から成る擬似癌組織を構築する。また、同擬似組織を用いて、線維芽細胞や単球が、抗癌剤の薬効に及ぼす影響を検証する。

(2) 基板上に接着しない浮遊細胞である単球(免疫細胞)を人為的に操作して基板上の望みの位置に固定化する方法を確立する。

(3) 固定化した単球と癌細胞から成る共培養系を構築し、単球による影響がどの程度離れた癌細胞にまで作用し、抗癌剤の薬効を変化させるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 擬似癌組織を用いた抗癌剤の薬効評価
癌細胞と一種類の間質細胞の組み合わせ：肺小細胞癌細胞株(WA-h1)をコラーゲンゲルで包埋し、このゲル上に癌間質線維芽細胞株(WA-mFib)を接着させたプレートを配置することで共培養系を構築した(図1)。抗癌剤シスプラチンを添加し、72時間培養後、AlamarBlue®試薬を用いて生細胞数を求めた。共培養有り、または、無しの状態においてそれぞれ癌細胞の生存率を算出し、共培養の有無における抗癌剤の薬効の違いを比較した。また、コラーゲンゲルに包埋した癌細胞の上に単球(THP-1)を付着させたプレートを配置することで別の共培養系を構築した。抗癌剤のプロドラッグであるドキシフルリジンを添加し、上記と同様の手順により、共培養による薬効の変化を検証した。また、リアルタイムPCRを用いて、遺伝子発現解析を行い、単球との共培養によって引き起こされる癌細胞内のピリミジンヌクレオシドホスホリラーゼ(PyNPase)の発現量の変化を調べた。

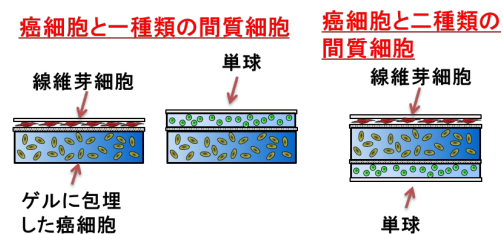


図1 擬似癌組織の構築

癌細胞と二種類の間質細胞の組み合わせ：コラーゲンゲルで包埋した癌細胞の上部に線維芽細胞を、また、下部に単球を配置することで擬似癌組織を構築した(図1)。同擬似組織を用い、上記と同様の手順により、シスプラチンやドキシフルリジンの薬効の評価を行った。

(2) 浮遊細胞の基板上への固定化法の確立
 ウシ血清アルブミンをエチレンジグリコールジグリシジルエーテル(EGDE)で架橋後、反応液をキャストし、一晚風乾することで架橋アルブミンフィルムを基板上に形成させコーティングを行った。また、細胞膜への親和性を有する Biocompatible Anchor for Membrane(BAM) 試薬とアルブミンを結合し、BAM-アルブミン複合体を作製した(図2)。反応は中性条件下で両者を1時間混合することで行った。BAM 試薬の反応率はアミノ基定量法である TNBS 法により算出した。

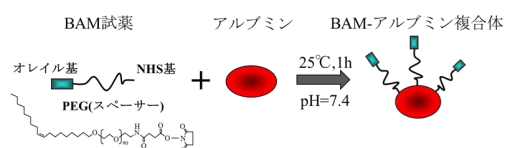


図2 BAM-アルブミン複合体の作製

架橋アルブミンフィルムを正電荷ポリマ

ーであるポリエチレンイミン(PEI)溶液に暴露することでタンパク質が吸着する表面を作り出し、BAM-アルブミン複合体をフィルム上に吸着させた。アルブミンフィルム上へのBAM-アルブミン複合体の吸着挙動は、水晶共振子マイクロバランス(QCM)を用いて調べた。図3に示すように、BAM-アルブミン複合体を吸着させたアルブミンフィルム上に種々の浮遊細胞(32D細胞、Jurkat細胞、THP-1細胞)を播種し、BAM試薬の細胞膜へのアンカーリングを介して浮遊細胞の基板上への固定化を行った。また、インクジェットプリンターを利用して、アルブミンフィルム上の特定の領域にPEI溶液を打ち込み、その領域にのみ浮遊細胞を固定化することで、細胞のパターニングを行った。

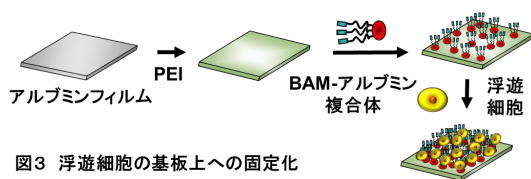


図3 浮遊細胞の基板上への固定化

(3) 固定化単球と癌細胞の共培養

浮遊細胞である単球を(2)で確立した方法により、基板上に固定化した。図4に示すように、単球を固定化した基板とヒト大腸癌Caco-2細胞を接着させた基板を合体し、全体をコラーゲンゲルで包埋することで共培養系を構築した。

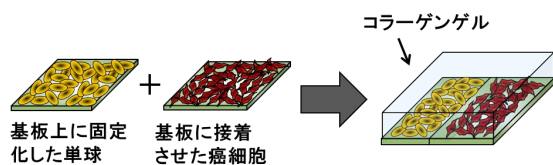


図4 固定化単球と癌細胞の共培養

同共培養系の癌細胞をドキシフルリジンに暴露後、生細胞染色試薬(Calcein-AM)と死細胞染色試薬(Propidium Iodide)を用いて、癌細胞の生死染色を行い、単球の影響により死滅した癌細胞を可視化し、死滅した癌細胞の位置と単球からの距離を比較した。

4. 研究成果

(1) 擬似癌組織を用いた抗癌剤の薬効評価

本研究では、間質細胞として、癌間質線維芽細胞と単球を用いた。線維芽細胞は、転移や抗癌剤に対する感受性など、癌細胞の種々の挙動に影響することが知られている。また、癌細胞からの走化性因子により、免疫細胞(単球、マクロファージ、リンパ球)が癌組織に積極的に誘引されていること、ならびに、末梢血単核球との共培養によって癌細胞の抗癌剤に対する感受性が大きく変化することに着目し、免疫細胞の一種である単球を研究に用いた。本研究では、抗癌剤の薬効評価に特化した擬似癌組織を構築することを考えており、癌組織の完全な模倣を目指す他の研究とは異なる。このため、本擬似組織では、

抗癌剤の効き方が容易に判断できるように癌細胞をコラーゲンゲルで包埋し、増殖するためのスペースを十分に確保している。ゲルで包埋することで癌細胞が3次的に増殖できるというメリットもある。また、培地中で培養するため、 O_2 や栄養の供給、 CO_2 や老廃物の除去などの血管の役割は必要としない。しかし、血管内や癌細胞周囲に存在する血液細胞から分泌される種々の生理活性物質は、抗癌剤の薬効に影響を及ぼすと考えられるので、血液細胞(本研究においては単球)を癌細胞の周囲に固定することでこれらの環境を模倣することにした。

まずは癌細胞と一種類の間質細胞との共培養を行い、その影響を検証した。癌細胞と線維芽細胞の組み合わせで共培養を行った場合、共培養無しの場合と比較して1.5倍癌細胞が増殖することが分かった。線維芽細胞から分泌される血管内皮細胞増殖因子(VEGF)や肝細胞増殖因子(HGF)など種々の増殖因子が癌細胞の増殖に寄与したと考えられる。また、線維芽細胞の存在により、シスプラチンの殺細胞効果が弱まることが分かった。塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)による抗癌剤耐性効果について幾つか報告があることから、bFGFを添加した培養液中で癌細胞を培養し、同様の薬剤試験を行ったが、顕著な耐性効果は見られなかった。線維芽細胞との共培養による薬剤耐性のメカニズムは不明であるが、線維芽細胞より分泌されたbFGF単独の作用では無いと考えられる。

癌細胞と単球を共培養した場合、共培養無しの場合と比較して癌細胞の増殖は減少した。また、単球の存在により、ドキシフルリジンの殺細胞効果が非常に強められることが分かった。抗癌剤のプロドラッグであるドキシフルリジンは、癌細胞内の酵素PyNPaseにより、抗癌作用を示す活性型のフルオロウラシル(5-FU)に変換される。リアルタイムPCRを用いた検証により、単球との共培養によってPyNPaseの遺伝子発現が10倍上昇するという結果が得られた。ELISA法により単球からTNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカインが分泌されていることを突き止めており、これら炎症性サイトカインが癌細胞のPyNPaseを活性化されるとの報告も多数ある。これらを考え合わせると、単球から分泌された炎症性サイトカインにより、癌細胞内のPyNPaseが活性化され、より多くのドキシフルリジンが5-FUに変換されたためにドキシフルリジンの殺細胞効果が増強されたと考えられる。

In vitroにおける培養系の利点の一つは、共培養を行う細胞や暴露する抗癌剤の組み合わせを自在に変えて実験系を組むことができることであり、様々な間質細胞や多種の抗癌剤など複数の要因がどのように絡み合うのか検証することができる。図1に示した培養デザインで、癌細胞と二種類の間質細胞(線維芽細胞と単球)との共培養を行い、複

数の間質細胞が存在する場合における抗癌剤の薬効を検証した。結果としては、主に線維芽細胞の作用によりシスプラチンの殺細胞効果が抑制され、また、主に単球の作用により、ドキシフルリジンの殺細胞効果が促進された。二種類の間質細胞が存在することによる相乗的な薬効促進や抑制などの効果は見られなかった。臨床現場では、通常複数の薬剤を同時に投与して癌治療が行われるので、シスプラチンとドキシフルリジンの二種類の抗癌剤に同時に暴露する実験を行った。その結果、二種の抗癌剤の相乗効果によって、単独の薬剤に暴露した場合と比べてより多くの癌細胞が死滅することが分かった。

以上のように、線維芽細胞や単球の存在が、抗癌剤の薬効に大きく影響を及ぼすことが分かった。生体内においては、癌細胞が種々の間質細胞に取り囲まれて存在していることや血液中の細胞から分泌されたサイトカインに暴露されていることを考慮し、より生体の環境に近い擬似癌組織を構築して抗癌剤試験を行うことが重要であることを示唆している。

(2) 浮遊細胞の基板上への固定化法の確立

BAM 試薬は、細胞膜に親和性を有する疎水性のオレイル基、スペーサーのポリエチレングリコール(PEG)鎖、アミノ基と反応する NHS 基から成る試薬である。この BAM 試薬とアルブミンを様々な濃度で反応させることで、沈殿を生じることなく BAM-アルブミン複合体を作製する条件を見出した。BAM 試薬はアルブミン分子内のアミノ基と反応することから、TNBS 法を用いて反応率を算出した結果、アルブミン 1 分子に対して BAM 試薬が約 3.2 個結合していることが分かった。天然のアルブミンと BAM-アルブミン複合体の円偏光二色性(CD)測定を行った結果、両者の CD スペクトルにおいて、差が見られなかった。このことから、BAM 試薬との反応に伴う、アルブミンの大きな高次構造変化は起こっていないと考えている。また、蛍光物質によりラベル化した BAM-アルブミン複合体と浮遊細胞を混合して 10 分間静置後、共焦点顕微鏡を用いて観察を行ったところ、細胞膜の位置においてのみ BAM-アルブミン複合体に由来する蛍光信号を観察することができた。この結果は、作製した BAM-アルブミン複合体が細胞膜に良好にアンカーリングされていることを示している。一方、架橋したアルブミンの溶液をキャストすることで、タンパク質吸着を抑制する性質を有する水に不溶性のフィルムを基板上作製した。このフィルムは、PEI 溶液に暴露するだけで容易にタンパク質の吸着を促進する性質に変換することができる。QCM 測定により、PEI 溶液に暴露したフィルム上への BAM-アルブミン複合体の吸着挙動を調べた結果、30 分以内に BAM-アルブミン複合体がフィルム上に著しく吸着することが分かった。

次に、アルブミンフィルムと BAM-アルブミン複合体を用いて浮遊細胞を基板上へ固定化する方法や基板上の望みの位置に配列させる方法を確立した。図 3 に示すように、アルブミンフィルムを PEI で処理した後、BAM-アルブミン複合体を吸着させ、多種の浮遊細胞(32D 細胞、Jurkat 細胞、THP-1 細胞)を播種したところ 15 分以内に播種した全ての細胞が基板上に良好に固定化されることが分かった。8 日間培養を行ったところ、固定化された浮遊細胞が固定化状態を維持しながらコンフルエントになるまで増殖することが分かった。ただし、培養期間中、一部の細胞がフィルム表面から脱離する現象が観察された。次に、基板上の望みの位置に浮遊細胞を配列させることを試みた。フィルム上の所望の領域にのみ PEI 溶液を滴下するために、市販のインクジェットプリンターを改造し、インクの代わりに PEI 溶液をインクタンクに充填した。このプリンターを用いてフィルム上の所望の領域に PEI 溶液を打ち込み、BAM-アルブミン複合体を吸着させることで、浮遊細胞のパターンニングを行うことに成功した(図 5)。



図5 インクジェットプリンターを用いた浮遊細胞のパターンニング

アルブミンフィルムは UV 光を照射することでも PEI 溶液を用いた場合と同様にタンパク質の吸着を促進する性質に変換することができる。しかし、フィルム上の特定の領域に BAM-アルブミン複合体を吸着させるためには、フォトマスクを利用して特定の領域にのみ UV 光を照射する必要がある。この方法では、パターンの変更をするたびにフォトマスクを新規に作製することになり煩雑である。一方、インクジェットプリンターを用いた本方法においては、コンピューター上でデザインの変更を行うだけで容易にパターンの変更を行うことができるというメリットがあり、本研究では、インクジェットプリンターを利用してパターンを作製を行った。

以上のように、アルブミンフィルムと BAM-アルブミン複合体を利用することで、浮遊細胞を人為的に操作し、基板上の望みの位置に配置させることができた。

(3) 固定化単球と癌細胞の共培養

単球により、ドキシフルリジンの殺細胞効果が非常に強められることが(1)の研究により明らかになった。次に、単球の影響がどの程度離れた癌細胞にまで作用し、抗癌剤の薬効を変化させるかを明らかにするために本項の研究を行った。方法としては、(2)

で確立した手法により単球（浮遊細胞）を固定化した基板と癌細胞を接着させた基板を並べて配置し、共培養系を確立した（図4）。このような培養系を用いて実験を行うことで、単球が影響を及ぼす距離を正確に検証することができる。単球と共培養を行わず癌細胞単独で培養したサンプルでは、ドキシフルリジンに暴露後においても癌細胞は全て生存していた。一方、共培養を行ったサンプルでは、癌細胞の死滅が観察され、死滅した癌細胞は、多少のばらつきはあるものの主に単球近傍の1mm以内に集中していた。（1）の項において考察したように、単球から分泌された炎症性サイトカインによりドキシフルリジンの殺細胞効果が促進され癌細胞が死滅したと考えている。培地中における炎症性サイトカインの半減期は30分から数時間程度との報告があり、サイトカインの生理活性が一定時間で失われるために単球近傍の癌細胞のみが死滅したと考えられる。以上のように、単球が影響を及ぼす距離に関して有用な情報を得ることができた。本研究結果は、擬似癌組織を構築する場合、癌細胞と間質細胞の間の距離が抗癌剤の薬効を左右する重要な因子であることを示唆しており、培養デザインを決定するうえで貴重な指針となる。

本研究では、多様な細胞や多種の抗癌剤を自由に組み合わせることができる *in vitro* 系の利点、ならびに、人為的に細胞を操作し、複雑な培養系を構築する組織工学の手法により、「組み立てながら理解する」というアプローチを通して、間質細胞の存在により癌細胞の抗癌剤に対する感受性が著しく変化することを明確に示したデータを得ることができた。本結果は、より生体の環境に近い擬似癌組織を用いて抗癌剤の薬効評価を行うことの重要性を示唆する貴重な知見であり、個々の患者の癌に対して最も効果を発揮する抗癌剤を正確に判別できる新規の抗癌剤感受性試験法の開発において重要である。抗癌剤感受性試験の的中率の向上やその普及は、効果が無い無駄な抗癌剤の投与やそれに伴う副作用を避けることができ、医療費削減や癌患者のQOL向上に大きく貢献する。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

Yamazoe H, Sugiyama Y, Abdelfatteh E0, Hagihara Y, Okada T. Facile immunostaining and labeling of nonadherent cells using a microfluidic device to entrap the cells. *J. Biosci. Bioeng.*, Vol.117, 375-378, 2014.（査読有）
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.08.008.

〔学会発表〕（計13件）

市川貴士、萩原義久、岩崎泰彦、山添泰宗、浮遊細胞の固定化技術の開発とパターンニングへの応用、第18回関西大学先端科学技術シンポジウム、2014年1月23日、関西大学（大阪）

山添泰宗、萩原義久、擬似癌組織を用いた抗癌剤の薬効評価、第35回日本バイオマテリアル学会大会、2013年11月26日、タワーホール船堀（東京）

中西久嗣、山添泰宗、萩原義久、柏木行康、高橋雅也、松川公洋、立花亮、田辺利住、アルブミンフィルムの細胞接着性変換機構の解析、第65回日本生物工学会大会、2013年9月20日、広島国際会議場（広島）市川貴士、萩原義久、岩崎泰彦、山添泰宗、細胞膜修飾による浮遊細胞の基板上への固定化、第七回日本分析化学会近畿支部夏季セミナー、2013年8月2日、花王株式会社有田研修所（和歌山）

山添泰宗、機能性フィルムを用いた細胞パターンニング、日本動物細胞工学会2013年度大会、2013年7月19日、ホテルフジタ福井（福井）（招待講演）

Hironori Yamazoe、Fabrication of cellular micropatterns using a functional substrate with convertible cell-adhesive surface properties、Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique (LMGP) Seminar、2013年2月19日、Centre national de la recherche scientifique (CNRS)、(Grenoble, France) 市川貴士、萩原義久、岩崎泰彦、山添泰宗、アルブミンフィルムを利用した浮遊細胞を含む複数種の細胞のパターンニング法の確立、日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、2012年11月27日、仙台国際センター（仙台）

中西久嗣、山添泰宗、萩原義久、立花亮、田辺利住、アルブミンフィルムの細胞接着性変換機構の解析、第64回日本生物工学会大会、2012年10月26日、神戸国際会議場（神戸）

Takashi Ichikawa, Yoshihisa Hagihara, Yasuhiko Iwasaki, Hironori Yamazoe、Immobilization of nonadherent cells with desired pattern using albumin-based substrate、7th International Symposium in Science and Technology、2012年8月30日、University Sains Malaysia (Pulau Pinang, Malaysia) 市川貴士、萩原義久、岩崎泰彦、山添泰宗、細胞膜アンカーリング試薬を利用した浮遊細胞の操作技術の確立、日本分析化学会近畿支部第6回夏期セミナー、2012年8月3日、グリーンビレッジ交野（大阪）市川貴士、萩原義久、岩崎泰彦、山添泰宗、アルブミンフィルムを利用した浮遊細胞の配列技術の確立、日本バイオマテリアル学会第7回関西若手研究発表会、2012年8月2日、甲南大学（神戸）

市川貴土、萩原義久、岩崎泰彦、山添泰宗、
架橋アルブミンフィルムを利用した浮遊
細胞の固定化とパターンニング、第 58 回高
分子研究発表会、2012 年 7 月 13 日、兵庫
県民会館（神戸）

山添泰宗、架橋アルブミンフィルムを用い
た細胞パターンニング、第 41 回医用高分子
シンポジウム、2012 年 6 月 26 日、東京大
学先端科学技術研究センター（東京）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.aist.go.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山添 泰宗 （HIRONORI, Yamazoe）

（独）産業技術総合研究所・健康工学研究
部門・主任研究員

研究者番号：402793