

| | |
|------|-------------|
| 報告番号 | 甲 第 11452 号 |
|------|-------------|

主 論 文 の 要 旨

論文題目 **Study on *in vitro* culture model of cancer cells using magnetite nanoparticles and its applications for cancer research**
(磁性ナノ粒子を用いたがん細胞の *in vitro* 培養モデルとその応用研究)

氏 名 山本 修平

論 文 内 容 の 要 旨

がんとは、体を構成する細胞の遺伝子の異常から正常な制御が効かなくなることで発生し、浸潤転移によって多数の臓器が機能不全になることで死に至る疾患である。がんの罹患率は世界的に増加し続けており、日本でも1981年以降死亡原因の第1位であり続けている。しかし、がんは極めて複雑性に富んでおり、その全容の解明には至っていない。従って、がんの基礎研究や治療法の確立は生命科学領域の重要な研究目標である。

その治療法としては外科手術や投薬、放射線が挙げられるが、未だにがんを完全に治せてはいない。その大きな要因として、浸潤転移能の高さがある。がん細胞は原発巣で浸潤能や薬剤耐性等の悪性変化を蓄積し、血管内に浸潤して血中循環腫瘍細胞(CTC)となり、離れた部位に接着して転移巣を形成していく。大きな腫瘍であれば外科治療や放射線治療で除去するのが一般的だが、転移巣のような小さな腫瘍は発見が遅れがちである。更に、大きな腫瘍の多くは転移を伴うため、小さな腫瘍には抗がん剤による網羅的治療が唯一の対抗手段となっている。こうした背景から、浸潤転移の機構解明や、より抗浸潤効果の高い薬剤の開発が急務である。

がんの基礎研究や薬剤開発には、体外で培養したがん細胞や、がん細胞を移植した動物モデルがよく利用される。がん細胞の培養は、低コストと簡便さで大きな利点を持つ二次元(2D)培養法で一般的に行われている。しかし、生体内でがん細胞は塊状の三次元(3D)構造を取っており、血管内皮細胞や繊維芽細胞に代表される周辺細胞と相互作用しながら微小環境を形成している。これに対し、2D培養法は他の環境要因が除かれた特殊な環境である

ため、がん本来の悪性形質が消失し、薬剤の作用が生体内と大きく異なる点が問題である。一方で、動物モデルは生体内に近い環境が利点であるが、個体差による再現性の低さと共に、種別による副作用の見落としが大きな問題である。以上より、これらのモデルはがんの基礎研究や薬剤開発における遅延の原因になっており、更なる評価モデルの開発が求められている。

これに対し、がん細胞を3D環境で培養する3D培養法が開発されている。その最大の特徴は、がん細胞の生体内での形態である細胞凝集体（細胞塊）を形成できる点であり、近接細胞間の相互作用や、酸素の濃度勾配といった生体内に近い環境を提供できる。近年では、基底膜(ECM)ゲル中で細胞塊を形成させる混釈培養法や、液体培地中で旋回培養しながら細胞塊を形成させるスピナーフラスコ法等の様々な手法が開発されており、細胞塊形成に伴うがん細胞のアメーバ状浸潤という現象の発見や、正常細胞との接着分子を標的とした抗がん剤開発等にも応用されている。しかし、3D環境下でランダムに存在する細胞挙動の正確な把握が難しいため、直接的な細胞観察が大変困難である。更に、2D培養法より培養工程が煩雑で、播種した細胞の空間分布の再現性が低いため、評価効率が低い。そのため、3D培養法はがんの基礎研究や薬剤探索に広く利用されていないのが現状である。

こうした旧来の3D培養の問題点を改善した手法として、最近では3D細胞パターンニング法が開発されてきている。マイクロ流路や接着面の制限を用いて細胞を配置する方法が主に研究されており、がん微小環境を模倣した構造の構築や配置の再現性、挙動観察が容易になってきている。しかし、流路設備のコスト面や、特に浸潤評価において、流路のような「閉じた」空間内で標的とした細胞だけ発現を評価することができない点が問題である。従って、がん研究における3D細胞パターンニング技術は未だ発展途上だと言える。

そこで本研究室ではより有用な3D細胞パターンニング法を開発を目指し、磁性微粒子をリポソームで包埋したMagnetite Cationic Liposome (MCL)と剣山状鉄製デバイスを用いて、磁気ラベルした細胞をECMゲル中に三次元的に配置する磁気細胞パターンニング法を開発した。この手法により、細胞を生体に近い3D環境を提供でき、観察や評価、がん細胞へのアクセスが容易な「開いた」空間で培養できるモデルの構築が可能となった。しかし、がん細胞における応用は十分でなく、i)培養環境の構築、ii)薬剤等の抗がん処理の作用評価、iii)正常細胞との相互作用評価、iv)評価の効率化が未達成であった。

以上の理由から、本論文では磁気細胞パターンニング法を用いて、がん細胞の悪性挙動を生体模倣環境で評価できる培養モデルの構築を目指した。本論文では、背景を記述した第1章に引き続き、培養環境の構築と抗がん処理の作用評価（第2章）、正常細胞との相互作用モデルと悪性挙動の自動測定法の構築（第3,4章）、また悪性変異が起こる血中循環腫瘍細胞(CTC)を標的とした*ex vivo*培養法の構築及び機能解析を行った（第5,6章）。以下に各章の具体的な内容を述べる。

第 2 章では、磁気細胞パターンニング法を用いたがん細胞培養のための環境構築を目的とし、がん細胞の挙動観察、及びがん治療で用いられる薬剤と温熱処理による殺細胞作用を評価した。がん細胞の例として黒色腫細胞 B16F1 を用いて、ECM である type-I collagen 中に磁気細胞パターンニング法によって B16F1 を三次元的に配置した。すると、一般的な平面培養では見られない挙動として、生体内での形態である細胞塊の形成と、黒色腫の特徴であるメラニン生産量の増加が見られた。次に、この培養法を用いて黒色腫標的薬である NPrCAP と温熱処理の競合作用を細胞塊の大きさから評価したところ、両処理は相加的に作用することが示された。従って、本章で構築した培養法及び増殖評価法は、生体内に近い環境でがん細胞への抗がん作用を評価でき、抗がん処理の探索に重要である。

第 3 章と第 4 章では、第 2 章で構築した培養法を用いて、がんの悪性化に重要な正常細胞との相互作用を評価できる手法と、悪性相互作用の自動測定法を構築した。

第 3 章では、原発巣で相互作用する線維芽細胞の NIH-3T3 と黒色腫細胞 M1 との相互作用を評価した。相互作用は、両細胞が直接接触する直接接触、NIH-3T3 の可溶性因子だけが M1 に届く間接触、シート状に培養した NIH-3T3 の上に M1 を配置するシート状接触の三様式で評価した。その結果、どの様式においても NIH-3T3 によって悪性化の指標である接着浸潤性が増加したが、シート状接触が M1 の接着浸潤性を最も増加させた。本様式においては、浸潤関連遺伝子である MMP-2 と IL-8 の発現がそれぞれ 2、24 倍増加した。従って、本章で構築した共培養法は、がん細胞と線維芽細胞との悪性相互作用を評価できた。

第 4 章では、がんの血管内浸潤に関与する血管内皮細胞で毛細血管様の構造体を作製し、その中で様々ながん細胞と共培養することで悪性相互作用を評価した。血管内皮細胞の例として HUVEC を、がん細胞の例として B16F1 をそれぞれ用いた。その結果、HUVEC から近いがん細胞塊は、HUVEC に向かって活発に浸潤していたのに対し、HUVEC から遠いがん細胞塊は、がん細胞の単独培養時と同じ低浸潤性の挙動を示した。また、浸潤に伴ってがん細胞塊が伸展することに着目し、細胞塊を撮影した位相差画像における「細胞塊の長さ」を自動測定するプログラムを作成することで、浸潤挙動の評価を効率化できた。

次に、HUVEC からの距離ごとに B16F1 を回収し、その遺伝子発現を評価すると、悪性化関連遺伝子である IL-6 や MDR-1、MMP-9 が HUVEC に近づくに従って増加していた。この結果は、「毛細血管に近づくほどがん細胞が悪性化する」という空間的な新規相互作用を発見したことを表すものである。更に、がん細胞の遺伝子発現における HUVEC との相互作用は、第 3 章の線維芽細胞より大きいことから、血管内皮は繊維芽よりもがんの悪性化に寄与することが判明した。従って、本章で構築した共培養法は、がんの浸潤転移を促す正常細胞との相互作用の迅速・非破壊的な解明に重要である。

第 5 章と第 6 章では前臨床検体への応用を目的とし、第 3 章で構築した線維芽細胞シー

トとの共培養手法を用いて、がんの悪性変異が起こる血中循環腫瘍細胞(CTC)を標的とした *ex vivo* 培養法の構築及び機能解析を行った。

第5章では、第2章から第4章で使用したMCLを用いて、磁気誘導とサイズ選択的捕捉を併用し、CTCの効率的な捕捉手法を構築した。がん細胞の例としてCOLM5-EGFPを播種したヒト血液から、本手法でCOLM5-EGFPを捕捉し、その捕捉率を従来法の例であるサイズ選択の単独使用時と比較した。その結果、サイズ選択単独での捕捉率64.7%と比べ、本手法では80.7%という高い効率で捕捉でき、捕捉時間も90%削減できた。マウス転移モデルの血液においても、サイズ選択の単独使用時より2.3倍多くのCTCを捕捉できた。従って、本章で構築した捕捉法は、従来法よりCTCを迅速で効率的に捕捉できた。

第6章では、第5章で捕捉したCTCの効率的な培養手法の構築と、その表現型の解析を目的とした。一般的にCTCは循環中に接着性や生存能が低下しているため、NIH-3T3のシート上で共培養することで、CTCの接着増殖を促した。その結果、一般的な培養皿ではCTCは全く接着増殖しなかったが、NIH-3T3シートでは複数のCTCで接着増殖が見られた。この増殖培養を続け、3株のCTC由来細胞を得た。次に、この3株の悪性表現型を解析したところ、浸潤能と薬剤耐性がそれぞれ1.2-1.4倍、1.3-1.6倍増加していた。従って、本章で構築した共培養法はCTCの効率的な培養と機能解析を達成し、がんの悪性化の理解に重要である。

以上より、本論文では磁気細胞パターンニング法を用いたがん細胞の培養モデルを構築し、抗がん剤の作用評価法(第2章)、がん微小環境における周辺細胞との悪性相互作用の評価法(第3,4章)、およびCTCの機能解析のための *ex vivo* 培養法(第5,6章)に応用した。本論文で開発した培養法はこれまでにない利便性があり、従来の問題点を克服する十分な可能性を秘めている。今後、これらの手法ががんの悪性化機構の理解や新規薬剤探索に応用され、新たな治療標的の探索ツールや、薬剤開発コストの低減に繋がることを期待している。