

## 論文審査の結果の要旨および担当者

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

氏 名 山本 修平

### 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)

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学	教授	本多 裕之
委員	名古屋大学	教授	飯島 信司
委員	名古屋大学	教授	中野 秀雄
委員	名古屋大学	准教授	清水 一憲

## 論文審査の結果の要旨

山本修平君提出の論文、「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)」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を構築したものである。本論文は、培養環境の構築と抗がん処理の作用評価を行った第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を行った第3~4章、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、そして序章と結言を加えた合計7章から構成されている。

第1章では、本論文の研究背景を述べており、がん研究に用いられる細胞培養モデルの現状と問題点を概説し、本研究の着想にいたった経緯と本論文の目的を示した。

第2章では、がん細胞のための培養環境の構築を目的とし、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。生体内に近い培養環境とするために、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。その結果、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。更に、この培養法を用いて黒色腫標的薬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を示した。これらの結果から、本章で構築した培養モデル及び増殖評価法が、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有用であることを示した。

第3章と第4章では、がん細胞本来の悪性浸潤挙動を評価できるモデルを構築することを目的とし、第2章で構築した培養法モデルを用いて、がんの悪性化に重要な正常細胞との浸潤性相互作用を評価した。第3章では、原発巣で相互作用する線維芽細胞とがん細胞との相互作用を評価した。その結果、線維芽細胞によって悪性化の指標である接着浸潤性が増加した。更に、複数の浸潤関連遺伝子の発現が癌細胞において増加した。これらの結果から、本章で構築した共培養法は、がん細胞における線維芽細胞との悪性相互作用の評価に有用であることを示した。

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。その結果、毛細血管様構造から近いがん細胞塊は、毛細血管様構造に向かって活発に浸潤していたのに対し、毛細血管様構造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。更に、毛細血管様構造からの距離ごとにごがん細胞塊を回収し、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が毛細血管様構造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った。更に、がん細胞の遺伝子発現における毛細血管様構造との相互作用は、第3章の線維芽細胞より大きいことから、血管内皮は線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ことを示した。

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、CTCの効率的な捕捉手法の開発を目的とし、第2章から第4章で使用した磁気による細胞の誘導技術を用いて、磁気誘導とサイズ選択的捕捉を併用したCTCの捕捉手法を構築した。本手法でヒト血液に播種した培養がん細胞を捕捉し、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、かつ、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、本捕捉法は、従来法よりCTCを迅速で効率的に捕捉できることを示した。

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、シートに培養した線維芽細胞の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、線維芽シートでは複数の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ことを示した。

このように、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

## 論文審査の結果の要旨

きる培養モデルを構築した。構築した培養モデルにはこれまでにない利便性があり、従来の課題を克服することができる。特に、位相差画像を利用したがん細胞の増殖能や浸潤能の評価法は、これまで難しかった三次元培養における迅速で高効率な挙動評価を可能にする評価手法で、今後の基礎研究・薬剤探索ツールとして大いに期待できるものである。本研究成果は、ペプチド応用の有用性とその可能性を明らかにし、今後のがん研究に影響を与える学術上、工業上非常に価値のあるものである。よって、本論文提出者、山本修平君は博士（工学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと判定する。