

研 究 報 告 書

「がん幹細胞の生物学的機能を解明する1細胞解析技術の創製」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 27 年 10 月～平成 31 年 3 月

研 究 者: 松崎 典弥

1. 研究のねらい

がんは過去 30 年間日本人の死因の第一位であり、未だに完治が困難な疾患の代表である。がん治療が困難な理由の一つとして、「ヘテロな集合体」であることがあげられる。固形腫瘍の場合、分化度(成熟度)の異なるがん細胞の集合体が線維芽細胞やコラーゲンで構成される間質に埋もれて存在し、毛細血管や毛細リンパ管網が間質に存在している。また、がん幹細胞と呼ばれる腫瘍形成を司る最も重要な細胞が内部に存在し、通常は増殖しない(静止期)が、抗がん剤処理後に生き延びて増殖と分化を開始し、腫瘍を再形成することが知られている。さらに、患者によって腫瘍内部のがん細胞の分化度や間質量、血管形成、がん幹細胞の有無などが異なるため、一つの抗がん剤がすべてのがんに効果を示すことは無く、化学療法と分子標的薬、放射線療法など様々な治療法を組み合わせることが一般的に必要である。そこで近年、「個別化医療(Personalized medicine)」が注目されている。患者一人一人の腫瘍の構成と程度に最適な治療法を提供するという内容であるが、そのためには患者の腫瘍を検査し、遺伝情報や細胞構成などを一人一人明らかにする必要がある。現在、患者のがんを超免疫不全マウスに移植した PDX が用いられているが、高額であるだけでなく、低い腫瘍定着率、低い生存率、マウス細胞の混入など課題も多い。そこで、患者由来がん細胞を効率よく培養でき、腫瘍を形成可能な *in vitro* モデルを構築できれば、PDX マウスに代わり個別化医療を実現する有力なシステムになると期待される。

そこで、本研究提案では、生体外で腫瘍の三次元微小環境を再現した革新的な *in vitro* 腫瘍モデルの構築を目標とした。既存のがんスフェロイドとは異なり毛細血管だけでなく間質組織も導入することで、より実際の固形腫瘍に近い構造と機能を再現できると期待される。また、腫瘍内部のがん細胞の性質をがん幹細胞マーカーにより解析することで、分化度を明らかにする。さらに、*in vivo* で形成した腫瘍と RNA シーケンスで比較することで、*in vitro* 腫瘍モデルとしての可能性を見出す。また、腫瘍モデル内部のがん細胞の配置を精密に制御可能な新規技術を考案し、がん細胞と血管の距離が遊走にどのように影響するか明らかにする。

本研究提案の腫瘍モデルの実現により PDX マウスの代替が可能となれば、個別化医療への多大なる貢献が期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、まず、*in vivo* 腫瘍の微小環境を再現した腫瘍モデルの構築に取り組んだ。*In vivo* 腫瘍は、高濃度の間質(コラーゲン)を有しており、既存の方法では同量のコラーゲンを含む腫瘍モデルを構築することは困難であった。そこで、コラーゲン濃度を自在に制御して均一な 3 次元組織体を形成可能な「沈殿培養法」を新たに考案した。本手法により、*in vivo* 腫瘍

と同様の高濃度コラーゲンと線維芽細胞、がん細胞、毛細血管網を有する *in vitro* 腫瘍モデルの構築に初めて成功した。

作製した腫瘍モデルのがん細胞の機能を評価するため、がん幹細胞の表面マーカーの発現量を解析した。その結果、腫瘍モデルではマーカー陽性細胞が 2 次元の平面培養と比較して 2 倍以上増加することを見出した。また、*in vivo* 腫瘍と比較した結果、腫瘍モデルと同様の傾向を示した。これは、*in vitro* 腫瘍モデルが *in vivo* 腫瘍に類似のがん微小環境を有しているため、*in vivo* と同様のがん細胞機能を示したと考えられる。現在、RNA シーケンス解析により、遺伝子発現レベルで機能を比較している。

また、腫瘍モデルの抗がん剤抵抗性を検討した結果、平面培養より高い抵抗性を示した。本結果も、腫瘍モデルが *in vivo* 腫瘍類似のがん微小環境を有することを示唆したと考えている。

腫瘍モデル内の細胞間相互作用を詳細に理解するためには、細胞間距離を 1 細胞レベルで配置制御可能な新規技術の開発が重要となる。そこで、細胞間をつなぎとめる「細胞アンカ一分子」を新規合成することで、バイオプリンターを用いて百個レベルの細胞クラスターを数百・m 間隔でプリント制御可能であった。これにより、がん細胞と血管内皮細胞が遊走する距離を初めて見出した。

(2) 詳細

研究テーマ①「3 次元がん微小環境を再現した腫瘍モデルの構築」

In vivo 腫瘍の間質(コラーゲン)量の定量は、これまで報告例が無かった。そこで、ヒト大腸がん細胞株 HT29 をマウス皮下に移植し、1 ヶ月かけて成熟させた腫瘍を回収し、ヒドロキシプロリンの定量法によりコラーゲン量を定量した。その結果、17-23 wt% と非常に高濃度であることが分かった。コラーゲンの水溶液への溶解性は乏しく、酸性溶液にも 1-2 wt% しか溶解しない。従って、既存の方法では同量のコラーゲンを含む三次元組織体を構築することは困難と考えられた。

そこで、細胞とコラーゲンを一緒に沈殿して培養する「沈殿培養法」を考案した。具体的には、コラーゲンを溶解させるのではなく、細胞と同レベルのマイクロメートルレベルに解繊して細胞と一緒に分散・沈殿して培養することで、高濃度化と均一な間質構造を同時に実現可能であった(Fig. 1)。本手法により、20-30 wt% のコラーゲンと線維芽細胞で構成される間質を有し、がん細胞と毛細血管網を有する *in vitro* 腫瘍モデルの構築に初めて成功した。

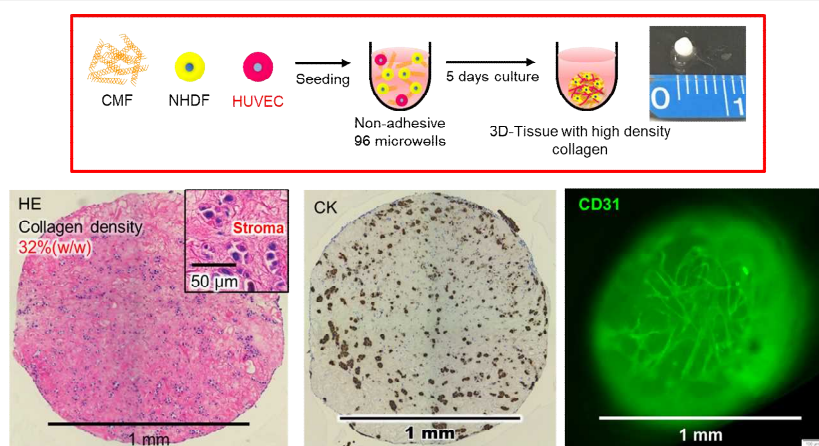


Fig. 1. 沈殿培養法のイメージ図(上)と作製した *in vitro* 腫瘍モデルのヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色像(左)、サイトケラチン免疫染色像(中央)、CD31 免疫染色像(右)。

研究テーマ②「腫瘍モデルがん細胞の機能評価」

作製した高濃度コラーゲンを有する *in vitro* 腫瘍モデル内部のがん細胞がどのような性質を有しているか明らかにするため、がん幹細胞の表面マーカーとして知られる CD44 および CD44v9 の発現量をフローサイトメトリーで解析した。その結果、腫瘍モデルでは両マーカー陽性細胞の割合が 2 次元の平面培養と比較して 2 倍以上に増加していた。この結果が *in vivo* 腫瘍と同じであるか確認するため、同じ HT29 がん細胞をヌードマウス皮下に移植し、同じ期間後に回収して同様の解析を行った。その結果、腫瘍モデルと同様に両マーカー陽性細胞が増加していた (Fig. 2)。これは、間質を定量的に *in vivo* 腫瘍に近づけることで、腫瘍モデルが生体に近いがん微小環境を再現できたためと推察される。現在、RNA シーケンス解析による遺伝子発現でこれら 3 者を比較している。

In vivo 腫瘍には、抗がん剤に対する耐性を有するがん細胞が存在することが知られている。そこで、腫瘍モデルの抗がん剤耐性を平面培養と比較して検討した。抗がん剤としてドキソルビシンやスタウロスポリンを用い、1 週間暴露後の細胞生存率を評価した。腫瘍モデルも平面培養も濃度依存的に生存率は減少をしたが、腫瘍モデルが全般的に高い生存率を示した。また、最も高濃度で抵抗性を示した細胞の中で CD44 陽性細胞の割合を解析した結果、腫瘍モデルは平面培養より 6-7 倍高い割合を示した。本結果も、腫瘍モデルが *in vivo* 腫瘍類似のがん微小環境を有することに起因すると考えられる。

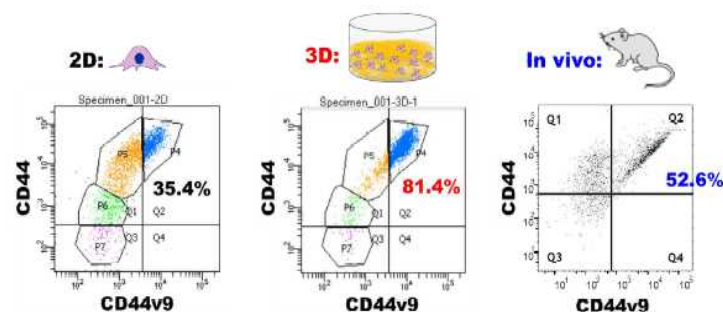


Fig. 2. フローサイトメトリーによる表面マーカーの発現解析。

研究テーマ③「1 細胞レベルでの細胞配置制御技術の開発」

腫瘍モデル内のがん細胞と血管、がん細胞と線維芽細胞など、細胞－細胞間の相互作用を理解するためには、3 次元組織内部の細胞－細胞間距離を 1 細胞レベルで配置制御可能な新規技術の開発が重要となる。距離を制御するためにはバイオプリント技術必要となるが、3 次元を実現するためには、細胞表面で細胞をパターンニングする必要がある。これまで、細胞表面での細胞パターンニングに関する報告はほとんどない。そこで、細胞間をつなぎとめるアンカー分子の新規合成を試みた。細胞膜侵入効果が知られている脂肪酸の中で最も侵入効果が高い分子をスクリーニングした結果、エイコサペンタエン酸(EPA)が最も優れた侵入効果を示すことを見出した。そこで、EPA を末端に修飾した多分岐ポリエチレングリコール(PEG)をアンカー分子として合成した。分岐数や分子量を最適化した結果、4 分岐 PEG-EPA が最も高いアンカー効果を示した。本分子を表面に吸着させた細胞をディスペンサーでプリントすることで、残念ながら 1 細胞レベルには至っていないが、百個レベルの細胞クラスターを数百・μm 間隔で細胞表面にプリント制御可能であった(Fig. 3)。また、本技術を応用してがん細胞と血管内皮細胞クラスター間の距離を変えて培養した結果、ある特定の距離以下で高い遊走効果を示すことを見出した。

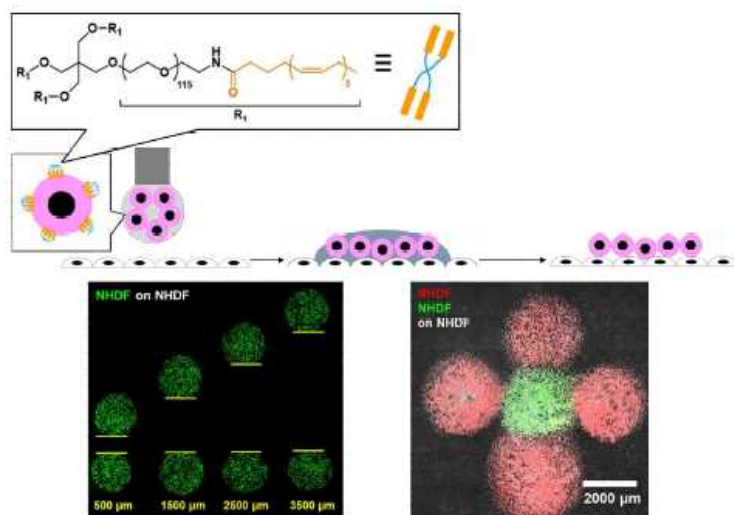


Fig. 3. 細胞間アンカー分子の構造(上)と、バイオプリントを用いて細胞クラスター間の距離制御した蛍光顕微鏡写真(下)。

以上より、本研究では、独創的な沈殿培養法を考案することで、*in vivo* 腫瘍に類似した間質構造とがん細胞機能を有する *in vitro* 腫瘍モデルを構築した。また、細胞間アンカー分子を合成することで、細胞表面で細胞の配置を制御することが可能であった。本研究で見出された腫瘍モデルは、PDX マウスの代替として応用が期待される。

3. 今後の展開

本さがけ研究で考案した沈殿培養法で構築した *in vitro* 腫瘍モデルは、間質構造や毛細血管など *in vivo* 腫瘍と類似の構造と機能を有することが確認された。また、がん細胞の性質

も、2次元の平面培養より *in vivo* 腫瘍に近いことが確認された。現在、RNAシーケンス解析により遺伝子発現レベルで *in vivo* 腫瘍との相関性を明らかにする。これにより、本腫瘍モデルの有用性が明らかとなり、社会実装につながる可能性を示すことができると考えられる。その後は、製薬企業と共同で検討を進める必要がある。

また、本沈殿培養法は、腫瘍モデル以外の組織・臓器モデルの構築に有用である。本さがけ事業の国際強化支援を受けて行った、National University of Singapore (現:POSTECH) の Prof. Young-Tae Chang との共同研究では、平滑筋細胞の3次元モデルへ応用し、研究成果を得ることができた (Y.-T. Chang and M. Matsusaki et al., *Chem*, **4** (5), 1128-1138 (2018))。さらに、成熟脂肪細胞の3次元組織の構築と長期間培養が可能であり、*in vitro* 脂肪モデルにも展開している (M. Matsusaki et al., *Acta Biomaterialia*, *in press*)。従って、今後は、本手法を他の組織・臓器構造の作製に応用展開する予定である。さらに、本さがけ研究で見出したバイオプリンターを用いた細胞クラスター配置制御技術と複合化することで、より複雑な組織体の構築に取り組みたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

本さがけ研究は予定通り研究を達成できただけでなく、様々な予想を超えた研究成果を得ることができた。さらに、様々な大学・企業と共同研究を開始することができた。

研究開始当初はがん株化細胞を用いた検討までを見込んでいたが、共同研究により臨床がん細胞を用いた評価まで展開できたことは予想を超えた内容であり、それに伴う研究成果が得られたことは非常に大きな研究成果であった。これにより、社会実装の実現がより具体性を増したことは間違いない事実である。

また、シンガポールでの NUS-JST シンポジウムに参加することで国際共同研究がスタートしたことも予想を超えた展開であり、共著論文を発表することができたのは大きな成果であった。さらに、本事業で考案した沈殿培養法が腫瘍モデル以外の様々な組織体の構築に有用であり、それに伴う研究成果・共同研究が得られたことも予想外の成果であった。

以上より、本さがけ研究で得られた研究成果は、社会実装が期待される内容であるため、社会・経済への多大なる波及効果が期待される。また、研究実施体制および研究費執行は当初の計画通り進めることができたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

従来のコラーゲンを用いるのではなく、均一に分散できるようにマイクロ化したコラーゲンを用いることで、ヌードマウスに移植したがん組織と同等の高い濃度の細胞外マトリックス (ECM) を有するがん組織モデルの作成を可能にし、この方法で、実際のがん組織と同等の ECM 密度やがん細胞、血管網を持つ生体外がん組織の3Dモデルの生体外再構築に成功しました。生体外3Dがん組織モデルは、普通の培養皿で培養した時と比べ、腫瘍幹細胞もマーカーCD44、CD44wの発現や、抗がん剤への抵抗性が高くなるなど、ヌードマウスに移植したがん組織によく似た性質を持っていることを実証するなど、着実な研究成果をあげており、そ

の論文も着々と進んでいます。将来的には、このような手法を利用したヒトがん組織モデルが抗がん剤等の開発に使われることによって、動物実験を無くすだけでなく、実際のがん組織に近いモデルでの薬剤評価をすることによって、より有効な薬剤の開発につながる事が期待されます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Fiona Louis, Shiro Kitano, Joao F. Mano, Michiya Matsusaki* , 3D Collagen Microfiber-Tissues Stimulate The Functionality of Both Pre and Mature Adipocytes in Long-Term Culture, <i>Acta Biomaterialia</i> , accepted (Nov. 28, 2018).
2. Akihiro Nishiguchi, Michiya Matsusaki , Mitsunobu R. Kano, Hiroshi Nishihara, Daisuke Okano, Yoshiya Asano, Hiroshi Shimoda, Satoko Kishimoto, Soichi Iwai, Mitsuru Akashi, <i>In vitro</i> 3D blood/lymph-vascularized human stromal tissues for preclinical assays of cancer metastasis, <i>Biomaterials</i> 179 , 144–155 (2018).
3. Dongdong Su, Chai Lean Teoh, Sung-Jin Park, Jong-Jin Kim, Animesh Samanta, Renzhe Bi, U. S. Dinish Malini Olivo, Marie Piantino, Fiona Louis, Michiya Matsusaki , Seong Soon Kim, Young-Tae Chang, Seeing Elastin: A Near-Infrared Zwitterionic Fluorescent Probe for <i>In vivo</i> Elastin Imaging, <i>Chem</i> , 4 (5), 1128–1138 (2018). Impact Factor 2017: 14.104
4. Sarah Bertlein, Daichi Hikimoto, Gernot Hochleitner, Julia Hueimmer, Tomasz Juengst, Michiya Matsusaki , Mitsuru Akashi, Juergen Groll, Development of Endothelial Cell Networks in 3D-Tissues by Combination of Melt Electrospinning Writing with Cell-accumulation Technology, <i>Small</i> , 14 (2), (2018). Elected as a back cover image
5. Michiya Matsusaki , Misaki Komeda, Simona Mura, Hiroyoshi Tanaka, Mitsunobu R. Kano, Patrick Couvreur, and Mitsuru Akashi, Desmoplastic Reaction in 3D-Pancreatic Cancer Tissues Suppresses Molecular Permeability, <i>Adv. Healthcare Mater.</i> 6 (15), 1700057 (2017). Highlighted in Advanced Science News.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 16 件(非公開 9 件)

国内特許 1.

発 明 者: 塚本 圭・入江新司・松崎典弥

発明の名称: スフェロイド形成促進方法

出 願 人: 国立大学法人大阪大学・凸版印刷株式会社

出 願 日: 2016 年 2 月 22 日

出 願 番 号: 特願2016-031159

外国出願1

発 明 者: 塚本 圭・入江新司・松崎典弥

発明の名称: スフェロイド形成促進方法

出 願 人: 国立大学法人大阪大学・凸版印刷株式会社

出 願 日: 2016 年 2 月 22 日

出 願 番 号: 特願2016-031159

国内出願2

発明者： 松崎典弥・入江新司・北野史朗
発明の名称： 立体的細胞組織の製造方法
出願人： 国立大学法人大阪大学
出願日： 2016 年 2 月 22 日
出願番号： 特願2016-030916

外国出願2

発明者： 松崎典弥・入江新司・北野史朗
発明の名称： 立体的細胞組織の製造方法
出願人： 国立大学法人大阪大学
出願日： 2017 年 2 月 22 日
出願番号： PCT/JP2017/006691

国内出願3

発明者： 松崎典弥
発明の名称： 脈管系構造を有する三次元組織の製造方法、および脈管系構造のゲルを含む三次元組織
出願人： 国立大学法人大阪大学
出願日： 2016 年 2 月 16 日
出願番号： 特願2016-030916

外国出願3

発明者： 松崎典弥・入江新司・北野史朗
発明の名称： 脈管系構造を有する三次元組織の製造方法、および脈管系構造のゲルを含む三次元組織
出願人： 国立大学法人大阪大学
出願日： PCT/JP2017/003368
出願番号： 特願2016-030916

国内出願4

発明者： 松崎典弥・入江新司・北野史朗
発明の名称： 三次元組織体及びその製造方法、並びに、三次元組織体の形成剤
出願人： 国立大学法人大阪大学・凸版印刷株式会社
出願日： 2017 年 1 月 31 日
出願番号： 特願 2017-15958

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 平成 30 年 5 月 高分子学会広報委員会パブリシティ賞 受賞



2. 平成 28 年 5 月 The Award for Young Investigator of Japanese Society for Biomaterials
3. 平成 27 年 12 月 「3D プリンター 人工臓器の製造・開発の支援に有効」, Medical Tribune24-25 面
4. 平成 27 年 11 月 Best Paper Award in 2015 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2015)
5. 平成 27 年 11 月 平成 27 年度日本バイオマテリアル学会科学奨励賞 受賞