

生命科学複合研究教育センター
「平成27年度学内共同研究等プロジェクト研究費助成」

ナノファイバー上の細胞遊走モデルを用いた 悪性脳腫瘍遊走能抑制の検討

研究代表者：橋本 智哉（医学部・助教）、藤田 聡（工学部・准教授）
共同研究者：北井 隆平（医学部・准教授）、菊田 健一郎（医学部・教授）

概要
本研究の目的は膠芽腫の浸潤遊走機構の抑制である。膠芽腫は集学的治療がなされても、全生存期間は約1年半である。局所制御は手術、放射線療法そして化学療法で一定の効果が得られたが、脳内転移巣や周囲脳への浸潤抑制が課題である。膠芽腫細胞は神経線維を介した遊走が知られている。神経線維を擬似したナノファイバーを用いて、細胞を single cell 状態で運動能を測定可能にした。具体的な研究項目は①微小管阻害剤に対する3種類の遊走モデルの遊走抑制効果の比較、②ナノファイバー上の生細胞において薬剤投与下での動態観察を行った。今後はこのモデルを用いた薬剤スクリーニングを遊走浸潤の抑制という視点で行うと考えている。
関連キーワード
膠芽腫、ナノファイバー、遊走能、細胞骨格、微小管阻害剤

研究の背景および目的

（研究の背景）

膠芽腫は、手術と化学療法、放射線治療等の集学的治療を行っても予後不良である。

その生物学的特徴は増殖、血管新生そして浸潤である。既に増殖、血管新生に対し、抗がん剤が使用されている。浸潤についての研究は、遅れている。膠芽腫は外科手術で除去しきれない周囲の脳から腫瘍細胞が浸潤遊走して転移巣が出現し、腫瘍増大し、死に至る。

腫瘍細胞は脳内で神経線維束に沿って遊走することが知られている。細胞遊走は細胞骨格の動態変化によって制御されており、アクチン重合に始まりそれに連動した微小管の動的不安定が細胞遊走に大きく関わっている。乳癌で新規の微小管阻害薬により微小管の動的不安定の機序も解明されつつある（Brice, Oncotarget 2015）。

しかしながら、悪性脳腫瘍細胞での遊走機序の検討は未だ充分になされていない。悪性脳腫瘍領域でもナノファイバーを用いて新しい治療が報告されている（Jain A, Nature materials 2014）。

本研究は細胞周辺の微小環境を模した培養系としてナノファイバーを用いる。これにより、生体中の腫瘍環境に類似した遊走形態を可視化し動的に観察し得ると考えた。

（材料と方法）

藤田は、ナノファイバーに沿って遊走する細胞の挙動をタイムラプス顕微鏡で観察することで1細胞の遊走挙動を定量的に評価する技術を確立している。本研究ではこの手法を用いた。

ナノファイバー上に腫瘍細胞を培養する本モデルの最大の利点は微小管阻害剤の効果を細胞の前後軸を明らかにしたうえで単純な1次元の運動として、細胞の動きを動的に観察しうることである。その点から次の実験を進めた。

1) 作用機序の異なる微小管阻害剤を IC₁₀ と IC₁₀ の半分の濃度で遊走阻害の効果を定量化した。具体的には細胞の速度、大きさ、方向性を測定した。

2) 生細胞状態で細胞骨格を免疫蛍光染色し、薬剤投与下でそれらの動的変化のパターンを解析した。35mmのガラスデッシュで微小管の構成成分であるチューブリンの動的不安定さを細胞皮質領域で観察した。さらに電界紡糸法で作製した1本のナノファイバー上で細胞骨格の動的変化を捉え、比較検討した。ナノファイバー上の細胞の極性と動的パターンに相関があるか検討する。

研究の内容および成果

1. ヒトグリオーマ細胞株 U87 において微小管阻害剤の遊走抑制効果

従来の遊走モデル wound healing assay と 3 次元に運動を示すトランスウェル膜を利用した cell migration assay を行った。ヒトグリオーマ細胞株 U87 に対する微小管阻害剤(Eribulin, Paclitaxel, Vincristine)の細胞毒性を MMT assay を用いて、 IC_{10} を求めた。 IC_{10} と IC_{10} の半分の濃度で従来の遊走モデルでの遊走抑制効果を検討した。Vincristine や Paclitaxel では遊走抑制効果があるが、Eribulin は wound healing assay で IC_{10} で遊走抑制効果は得られなかった。(図 1)

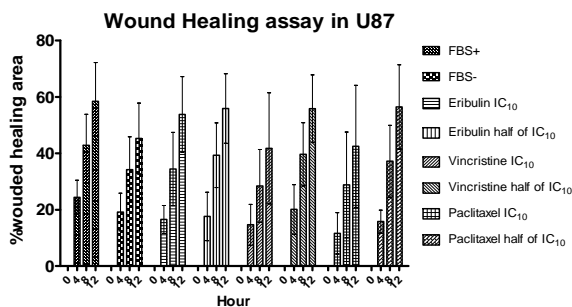


図 1 U87 の wound healing assay

3 種類の微小管阻害剤 IC_{10} の抑制効果

3 次元の cell migration assay では IC_{10} で遊走抑制効果は得られたが、3 つの作用機序の異なる薬剤間での遊走抑制効果に差は得られなかった (図 2)

Migration assay by inhibitors of microtubule in U87

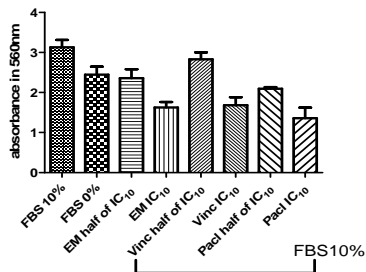


図 2 U87 の cell migration assay

3 種類の微小管阻害剤の遊走抑制効果

2. 生細胞状態で conventional dish 或いはナノファイバー上に培養した場合での細胞骨格の動的変化を観察し、パターン化

Conventional dish 上に腫瘍細胞を培養し、共焦点顕微鏡下で細胞骨格を二重染色させ、3 種類の微小管阻害剤 IC_{10} を各々投与した。それぞれの薬剤で微小管のチューブリンの動的形態変化をパターン化することができた。そこでナノファイバー上での培養細胞と同様に、single cell の状態で細胞骨格の動的変化を観察する予定である。(図 3)

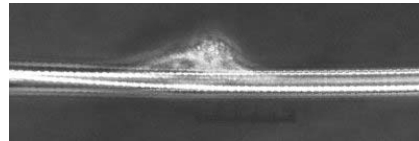


図 3 ナノファイバー上 U87 bar 30 μ m

二重染色 (チューブリン緑色、アクチン赤色)

3. ナノファイバー上での腫瘍細胞の遊走能評価

ナノファイバー上に遊走し single cell の状態で腫瘍細胞の速度や大きさや移動の方向性を計測した。各種の微小管阻害剤下で single cell でのバイオアッセイを行い、遊走抑制効果を定量化している。 IC_{10} Eribulin は遊走抑制効果があった。

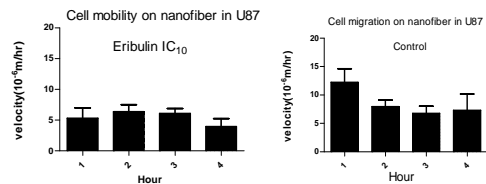


図 4 U87 のナノファイバーモデルの運動評価

左図 Eribulin IC_{10} 右図 control

今後の発展

ヒトグリオーマ細胞の遊走の機序解明

異なる作用機序の微小管阻害剤を用いて、細胞極性の変化のトリガーとなるとと思われる蛋白やチューブリン結合蛋白の発現量を定量化し、ナノファイバー上での遊走能との関連性の有無を検討する

今後は遺伝子発現を制御した細胞で遊走能及び薬剤の効果の浸潤にかかわる実験を行っていく予定である。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成

「主な発表論文等」

1. O. Batnyam, H. Uematsu, C.W. Chou, S. Suye, S. Fujita, Taiwanin A incorporated polyurethane fiber sheets for prevention of postoperative cancer recurrence. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 26 558-571 (2015)
2. 藤田 聡, 微細ファイバーを用いた細胞遊走挙動の解析と制御, *数学協働プログラムワークショップ* (2015)
3. 金森 啓一郎, 末 信一郎, 藤田 聡, シングルナノファイバーを用いた癌細胞浸潤現象の解析, *第 33 回日本バイオマテリアル学会大会* (2015)

4. 藤田 聡, 荻原 裕佑, 金森 啓一郎, 鳥本 雄太, 末 信一郎, 微細ファイバーを用いた癌細胞浸潤の解析と制御, *第 64 回高分子討論会* (2015)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

1. 藤田 聡, 科研費・基盤研究(A), 2015 年度, 次世代器官再生医療のための基盤技術の開発 (分担), 採択, 156 万円