

## ナノファイバー上の細胞遊走モデルを用いた グリオーマ細胞浸潤現象の解析

研究代表者： 藤田 聡（工学系部門・准教授），橋本 智哉（医学部・医員）  
共同研究者： 菊田 健一郎（医学系部門・教授），北井 隆平（医学系部門・准教授）

概要	膠芽腫の局所制御は、手術・放射線療法そして化学療法で一定の効果が得られている。しかしながら全生存期間は平均約1年半と短い。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。本研究では、神経線維を類似化したナノファイバーを作成し、このファイバー上の細胞の運動性を single cell 状態で測定することで、膠芽腫の浸潤遊走機構の解明と抑制を目指した。他臓器の腫瘍細胞と膠芽腫細胞で運動能を比較した。次に作用点の異なる微小管阻害剤における細胞骨格の変化パターンを解析した。これらの知見をもとにナノファイバーモデルを用いて微小管とアクチンのクロストークに関与している微量蛋白質の解析を進めている。これにより、微小管が細胞遊走に与える影響を解明し、微小管阻害剤の浸潤抑制への応用に向けた知見を集積する。
関連キーワード	膠芽腫，ナノファイバー，遊走，細胞骨格，微小管阻害剤

### 研究の背景および目的

膠芽腫の生物学的特徴は、増殖・血管新生と浸潤である。外科手術、化学療法と放射線治療等の集学的治療を行っても予後は不良である。膠芽腫の増殖と血管新生に対しては、テモダール等の抗癌剤の有効性が示され使用されているが、浸潤については依然十分理解されていない。効果的な治療薬も開発されてはいない。外科手術で除去しきれなかった周囲脳から腫瘍細胞が遊走・浸潤して転移巣が出現し、腫瘍が増大した結果、死に至る。

腫瘍の転移を抑制するような効果的な治療薬の開発に向けては、細胞の遊走・浸潤挙動についての理解が不可欠である。細胞遊走が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ことが示されてきた。Paclitaxel は微小管の脱重合を阻害することで細胞増殖を抑制する。肺癌や乳癌に使用されている。Vincristine は微小管の重合を阻害し、細胞増殖を抑制する。血液腫瘍や軟部腫瘍に使用されている。新規の微小管阻害薬 Eribulin は、乳癌細胞の微小管の動的不安定を引き起こすことで細胞増殖を阻害する(Chanez et al., *Oncotarget*, 2015)。微小管阻害剤は、細胞遊走にも大きく関与する細胞骨格の阻害が作用機序である。腫瘍細胞の遊走挙動にも影響を与えると考えられ、転移の抑制にも効果を示すものと考えられる。しかしながら、膠芽腫細胞をはじめとする腫瘍細胞の遊走機序の検討は未だ充分に

なされていない。これは、腫瘍細胞の浸潤過程をうまく再現できる適切な実験モデルが存在しないためである。

3次元的な環境に置かれた細胞の挙動は、平面ディッシュ上で培養された細胞のそれとは異なることがすでに多く報告されている。最近では、ポリスチレン多孔体中で培養した膠芽腫細胞をマウスに移植し、抗癌剤や放射線の効果を、平面上で培養された細胞と比較検討した報告がなされた(Gomez-Roman et al., *Neuro Oncol.*, 2017)。

こうした現象のメカニズムを解明することが、浸潤を効果的に抑制可能な治療薬の開発につながると期待される。脳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が、3次元空間的な細胞の遊走挙動を定量的に評価することは難しい。本研究では腫瘍細胞周辺の線維束から成る細胞微小環境を模した培養系を用いて、腫瘍細胞の遊走のメカニズムの理解に向けた知見を得ることを目標とした。

これまでに研究代表者はナノファイバーを用いて生体中の腫瘍環境に類似した遊走形態等の細胞挙動を可視化し動的に評価できる実験系を確立している。今回はこの実験系を利用して、腫瘍細胞の遊走時における微小管の影響を解析し、ここでクロストークしているタンパク質について解析した。

## 研究の内容および成果

### ① 腫瘍細胞の遊走能の定量化

ナノファイバーをエレクトロスピニング法により作製し、1本の繊維に沿って細胞が移動する様子をタイムラプス顕微鏡で観察することにより、細胞の遊走能を定量的に評価した。ここでは、大腸癌、胃癌、乳癌、膠芽腫由来の種々のヒト細胞株を用いて運動能を定量化した (Fig. 1)。この測定により、膠芽腫由来細胞の移動速度が大きく、高い遊走性を有することが分かった。また、今回用いた胃癌および大腸癌由来細胞の遊走性は低かったが、乳癌の転移モデル実験や浸潤性評価等に利用されることの多いMDA-MB-231細胞株は高い遊走性を有していた。

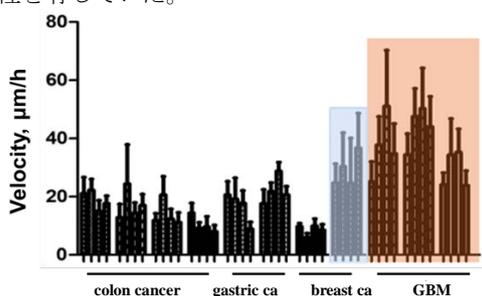


Fig. 1 Cell migration along with a single fiber

### ② 微小管阻害薬の細胞骨格への影響

細胞骨格を構成する微小管阻害薬の抗がん剤が、腫瘍細胞の転移に与える影響を評価した。用いた阻害薬は、Paclitaxel, Vincristine, Eribulinである。これらの阻害薬が細胞骨格の形成や細胞内局在にどのような影響を与えるかを、蛍光標識した細胞骨格タンパク質を導入した細胞を用い、阻害剤投与 (IC<sub>10</sub>阻害濃度 10%) 後の変化をタイムラプス顕微鏡にてライブ観察をおこなうことで評価した。細胞修飾のない状態での End point の細胞骨格の変化のみの評価として4時間後にパラホルムアルデヒド固定した細胞を actin, tubulin, 細胞核を染色

し観察した (Fig. 2)。Paclitaxel 投与後は, tubulin の過度の重合が観察されたのに対し, Vincristine 投与後は発現量が減少し, 細胞極性も消失していた。また興味深いことに, Eribulin 投与後は tubulin は, 重合も脱重合もせず安定していた。またアクチン発現にもとづく Cell cortex の変化に着目したところ, Vincristine 投与後はとくに顕著な blebbing が観察された。

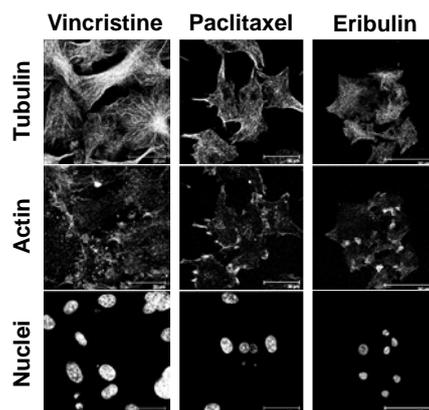


Fig. 2 Cytoskeleton change after treatment with inhibitors

平面上での細胞培養では、細胞の移動方向および細胞極性との相関を定量的に表現することは難しい。そこでファイバー上に播種した細胞について同様の解析を引き続きおこなった。これらの結果により現時点では、微小管とアクチンのクロストークに関するタンパク質に関する新しい知見を得ており、微小管阻害が細胞遊走に影響するメカニズムについて、解析をとりまとめている。

本解析をさらに推し進めることで、細胞遊走を効果的に阻害する新しいタイプの抗癌剤の開発等にもつながり、膠芽腫などの悪性脳腫瘍への貢献も大いに期待される。

## 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・研究助成への申請・獲得状況

### 「主な発表論文等」

ナノファイバーを用いたグリオーマ遊走能の検討, 橋本智哉, 藤田聡, 北井隆平, 菊田健一郎, 第5回 Neuro-Oncology WEST, 2016

Fc-カドヘリン固定化ファイバー上での細胞遊走挙動の解析, 早水亮貴, 末信一郎, 赤池敏宏, 藤田聡, 第65回高分子学会年次大会, 2016

Fc-カドヘリン固定化ファイバー上での細胞遊走挙動の解析, 早水亮貴, 末信一郎, 赤池敏宏, 藤田聡, 平成28年度高分子学会北陸地区若手研究会, 2016

カドヘリンの勾配を表面に有するファイバー上での細胞遊走解析, 早水亮貴, 赤池敏宏, 末信一郎,

藤田聡, 日本バイオマテリアル学会第5回北陸信越若手研究発表会, 2016

Enhanced protein internalization and efficient endosomal escape using polyampholyte-modified liposomes and freeze concentration. S. Ahmed, S. Fujita, K. Matsumura, *Nanoscale*, 8, 15888-15901, 2016

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

藤田聡, 科研費・基盤研究(C), 2016年度, 凍結保存材料への応用を目指した生体吸収性ナノファイバーの物性解析と生体適合性評価 (代表), 採択, 200万円