

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）

共同研究者： 北井 隆平（医学系部門・准教授）

概 要	
	エレクトロスピンニング法によるハイドロゲルのナノファイバー化技術と、3次元培養デバイス技術を組み合わせることで、異方性のある3次的ハイドロゲルナノファイバーから、がん細胞周辺の微小環境を精密に模倣した人工細胞外マトリクスを作成する。この材料を用いて、細胞の空間的な位置に加えて、細胞形状・変形・運動様式等を定量的に解析し、これらのパラメータを用いて腫瘍細胞の移動（浸潤）の様子を統合的に記述する多次元的解析を提案する。本報告では、芯鞘エレクトロスピンニング技術を用い、従来作製が困難であった異方性のあるコラーゲンハイドロゲルを架橋剤なしに作製する手法を確立したことを報告する。この技術を用いて作成した異方性ハイドロゲルは腫瘍細胞の浸潤プロセスを理解するための有効なツールとなりうると期待される。
関連キーワード	ナノファイバー、エレクトロスピンニング、異方性材料、グリオーマ、細胞遊走

研究の背景および目的

グリオーマは、増殖・血管新生と浸潤を特徴とし、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。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・浸潤して再発巣が早晩出現し、死に至る。浸潤については依然十分理解されていないため、これをターゲットにした治療薬も開発されてはいない。

腫瘍の浸潤を抑制する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。しかしながら、グリオーマ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。グリオーマでは脳組織の神経線維に沿って腫瘍細胞が浸潤するケースが知られている。こうした腫瘍細胞の遊走・浸潤プロセスをうまく再現できる適切な実験モデルが存在しない。

そこで本研究では、腫瘍細胞の浸潤過程を解析するためのプラットフォームとして、コラーゲンを3次的に配向させる技術の開発をした。作成した基材を用いて、異方性構造に沿ったグリオーマ細胞の遊走・浸潤の解析と理解を目指した。

コラーゲンは、皮膚、血管、腱など細胞外マトリクス(ECM)に広く存在する繊維状の構造タンパク質である。生体中のコラーゲンは3本のコラーゲン分子鎖から成る剛直な三重らせん構造が会合してコラーゲンフィブリルを構成し、さらにこれらが階層的に秩序化された高次構造を形成している。この頑丈な構造により、ECMは高い力学的強

度を示す。生体から抽出されたコラーゲンから得られたハイドロゲルも、細胞培養や再生医療でも細胞接着の基質として広く用いられてきた。しかし等方的で均質であり、生体組織が本来有する異方性のある構造とは異なった構造を有する。ここでコラーゲンハイドロゲルを繊維状に加工できれば、生体中のECMの異方性構造をよく模倣した細胞の足場として適切な材料となると期待される。

異方性を有するコラーゲンハイドロゲルの作成方法として本研究ではエレクトロスピンニング法を用いた。本手法を用いたコラーゲンのナノファイバー化は異方性コラーゲンを得る手法としてこれまでも報告がある。しかし、高極性の有機溶媒が用いられてきたため、コラーゲンは、三重らせん構造を失い、ゼラチン化していた。ゼラチン化したコラーゲンは水に可溶であり、化学的架橋による不溶化処理なしには培養には用いられなかった。エレクトロスピンニング法により架橋剤なしでコラーゲンハイドロゲルファイバーを得る手法はこれまで成功例が報告されていない。

本研究では、コラーゲンを芯、ポリビニルピロリドン(PVP)を鞘としたコラーゲン/PVPの二層構造のナノファイバーを、回転式コレクタを備えた芯鞘エレクトロスピンニングにより紡糸し、異方性のファイバースートを得た。これをゲル化および洗浄することでPVPを除去し、異方性コラーゲンファイバーのみを得る。

研究の内容および成果

酸性コラーゲン(新田ゼラチン)、およびPVPを水に溶解させてから、それぞれ芯、鞘のノズルに射出してエレクトロスピンニングをおこなうことで、コラーゲン/PVPの二層構造のナノファイバーを得た。紡糸時には、コレクタ部を高速で回転させることで一方向に揃え、シート状の異方性のファイバーを回収した。作製したコラーゲン/PVPナノファイバーを顕微鏡観察したところ、コラーゲンとPVPの両方が同一のナノファイバーに局在しコラーゲン層は途切れずに繊維化していた。

次に、得られた芯鞘ナノファイバーを塩基性エタノール水溶液に浸漬し、1時間37°Cでインキュベートすることでコラーゲンをゲル化させた。さらにその後、水で洗浄して鞘材を完全に除去することで、コラーゲンゲルファイバーのみを得た。その化学的組成をATR(全反射)法FTIR測定により分析したところ、洗浄操作ではPVPがほぼ表面から完全に除去されていた。比較のために、コラーゲン溶液を中性化させて作製したコラーゲンハイドロゲルについても同様に観察したところ、その繊維径は今回エレクトロスピンニング法で作製したコラーゲンファイブリルとほぼ同程度の約300nmであり、異方性のない均質な構造であった。

従来式の通常のエレクトロスピンニング法では、紡糸に適した高粘度のコラーゲン溶液を得るために、ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)やトリフルオロエタノール(TFE)などの非プロトン性の高極性有機溶媒が使用されてきた。これらの溶媒を用いることで、うまく紡糸されるものの三重らせん構造等のコラーゲン特有の秩序ある高次構造が破壊されてしまい、アモルファスであるゼラチンファイバーとなってしまうことが知られていた。実際、この手法で得られるナノファイバーは、化学的架橋や熱架橋無しでは水に溶解してしまった。ネイティブのコラーゲンの高次構造を保持したまま、エ

レクトロスピンニング法でナノファイバーを作製し、架橋剤を使用せずに細胞培養の足場材料とする技術は、知る限りこれまで報告されていなかった。

今回、得られたコラーゲンゲルファイバー中のタンパク質高次構造をCDスペクトル測定により評価した。コラーゲン特有の三重らせん構造の残存率を222nmの正のコットン効果のモル楕円率の値より算出したところ、ゼラチン溶液の三重らせん残存率は約25%であったのに対し、20%エタノールを含むPBSで洗浄したゲルファイバーは、約77%と高い値が得られた。これらにより、コラーゲン特有の三重らせん構造が保持された異方性ハイドロゲルが得られたことが示された。

作製したコラーゲンゲルファイバー上に細胞を播種し、伸展を観察した。播種翌日の観察を行った。その結果、通常のコラーゲンハイドロゲルでは、異方性なく細胞が伸展しているのに対し、コラーゲンゲルファイバー状では細胞は繊維方向に沿って伸展することが示された。この傾向は培養を継続しても維持された。このようにコラーゲンゲルファイバーで、細胞の配向方向を一定方向に制御することが可能となった。またその細胞遊走に異方性が見られた。

今回開発した異方性ハイドロゲルはコラーゲンのみならず種々のハイドロゲルに応用可能である。作成されたファイバーを用いることでがん細胞の浸潤現象に関する分子メカニズムの理解につながると期待される。さらに基礎医学的な知見の集積のみならず、がんの浸潤を抑制する治療手法や抗がん剤の開発など、浸潤・転移の抑制につながる臨床的に重要な成果が得られる。今後、異方性のあるハイドロゲル材料を用いて、3次元的な組織モデルを構築し、グリオーマの細胞遊走に関する細胞生物学的な解析をおこない、病態に関連づけた理解につなげる。

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

「発表論文」

Y. Wakuda, S. Nishimoto, S. Suye, S. Fujita, Native collagen hydrogel nanofibres with anisotropic structure using core-shell electrospinning, *Sci. Rep.* (in press)

「書籍」

藤田 聡, 細胞外マトリクスの代替としてのハイドロゲルナノファイバーの開発, *ゲル化・増粘剤の使い方, 選り方事例集*, 493-502, 技術情報協会, 2018.

「学会発表」

S. Fujita, Y. Wakuda, S. Nishimoto, S. Suye, Fabrication of anisotropic hydrogel nanofiber scaffold by using core-shell electrospinning, *Pacific Rim Nano Medicine Symposium 2018, The 9th Japan-Taiwan Symposium on Nanomedicine*, Kobe, 2018. *Invited

R. Hayamizu, T. Akaike, S. Suye, S. Fujita, Timelapse analysis of cadherin-dependent cell migration, *1st International Forum on Textiles for Graduate Students*, Tianjin, China, 2017. *The First Prize

橋本 智哉, 北井 隆平, 菊田 健一郎, 藤田 聡, 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, *第12回脳腫瘍の基礎シンポジウム*, 2017.

橋本 智哉, 北井 隆平, 菊田 健一郎, 藤田 聡, 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, *日本脳神経外科学会総会*, 2017.

和久田 弓加, 末 信一郎, 藤田 聡, 異方性組織構築への応用を目指した芯鞘エレクトロスピンニング法によるコラーゲンゲルファイバーの創製, *第66回高分子学会北陸支部研究発表会*, 2017.

藤田 聡, 和久田 弓加, 末 信一郎, エレクトロスピンニング法を利用した異方性ハイドロゲルの創製, *平成29年度繊維学会秋季研究発表会*, 2017.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科研費基盤C, H28~H30, 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, 藤田聡(代表), 採択, 494万円