

## 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）北井 隆平（医学系部門・准教授）  
共同研究者： 菊田 健一郎（医学系部門・教授）、橋本 智哉（福井総合病院）

概 要
正常細胞では好氣的な条件ではミトコンドリアで酸化的リン酸化によって、高効率に ATP が生成されるのに対し、腫瘍細胞では解糖系が充進し ATP が生成される。これは Warburg 効果としてよく知られているが、高浸潤性の腫瘍細胞の高い運動性は、解糖系にもとづく効率の悪い ATP 産生では説明が難しい。そこで本研究では、腫瘍細胞は不均一な細胞集団でありその中には酸化的リン酸化の活性が高く、効率的に ATP を生成する運動性が高い細胞が存在するという可能性を検証した。Warburg 効果を示す細胞が 5-ALA で染色されることを利用し、浸潤性の高いグリオーマ細胞を対象に、5-ALA の応答性と細胞の移動性をナノファイバーを用いた培養基材で定量的に解析した。腫瘍組織の不均一性を代謝レベルで明らかにすることで浸潤現象の解明へとつながり、腫瘍の治療の向上につながると期待される。
関連キーワード
酸化的リン酸化, Warburg 効果, 5-ALA, 細胞遊走, ナノファイバー

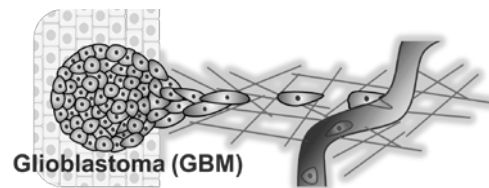
### 研究の背景および目的

近年、悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマ (GBM) の診断および治療において、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を用いた光診断や光治療が注目されている。5-ALA は正常細胞では酸化的リン酸化により、ヘムタンパク質へと代謝される。しかし腫瘍細胞では、ATP 産生は Warburg 効果により酸化的リン酸化ではなく、解糖系ドミナントにおこなわれるため、投与された 5-ALA は、代謝経路途中のプロトポルフィリン IX (PPIX) として蓄積される。腫瘍細胞に選択的に蓄積された PPIX を UV で励起させてマーカーや活性酸素の生成に利用するのが 5-ALA を用いた光診断や光治療である。この手法によると腫瘍細胞のみを選択的に識別・治療できるため GBM の新しい治療戦略として大いに期待されている。

しかし最近、5-ALA が投与された腫瘍細胞の PPIX 蛍光強度には細胞間の不均一性があることが報告されている。さらに、転移した GBM には 5-ALA 陽性の症例と陰性の症例があり、陰性の症例の方が癌の進行度が高いことも報告されている。これらのことから考えると、腫瘍細胞の 5-ALA に対する応答の不均一性は細胞の移動性と関係があることが示唆される。すなわち 5-ALA 投与で陰性

を示す細胞は、腫瘍細胞の中でも Warburg 効果の影響が小さく、酸化的リン酸化の活性が高い細胞であり、効率的に ATP が生産されているために、移動性が高いという可能性が考えられる。

そこで、本研究では、グリオーマ細胞をモデルに、5-ALA 陽性細胞と陰性細胞との移動性および蛍光強度を単一細胞で定量的に解析した。ここでは、脳組織中での細胞の移動性を定量的に評価するために、脳組織の繊維状の構造における細胞遊走 (Scheme 1) を模倣したナノファイバー基材を培養基材として用いた。



Scheme 1 Cell migration in the fibrous microenvironment

### 研究の内容および成果

GBM 細胞株の U-251 細胞の 5-ALA に対する応答性を比較するために、平面 dish 上に  $1.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、これにより細胞の蛍光強度と遊走速度を定量化した。その結果、5-ALA

投与後の U-251 細胞には染色の不均一性が見られ、PPIX の蓄積が多い細胞 (5-ALA 陽性細胞) と PPIX の蓄積が少ない細胞 (5-ALA 陰性細胞) に区別された。平面培養での解析の結果、両者の移動性も

異なっており、5-ALA 陰性細胞は 5-ALA 陽性細胞よりも移動性が高かった(Fig. 1)。

次に個々の細胞の移動性を、生体環境を模したナノファイバー基材上で解析した。培養基材となるナノファイバーはエレクトロスピン法により、ポリ 3-ヒドロキシ酪酸-3-ヒドロキシヘキサ酸共重合体(PHBH)から作成した。得られたナノファイバーの平均直径は 1.37  $\mu\text{m}$  であった。PHBH ナノファイバー基材は細胞接着性を向上させるため、あらかじめ酸素プラズマ処理しておいた。この基材上に GBM 細胞株の U-251 細胞を 5-ALA 存在下で播種し、同様に単一細胞のタイムラプス観察を行った(Scheme 1)。その結果、生体環境を模倣した培養環境下においても、先の平面培養の結果と同様に、5-ALA 陰性細胞の方が遊走速度が大きかった(Fig. 2)。

この結果について、5-ALA 陽性細胞は、Warburg 効果が強く働いているため、移動に必要なエネルギーである ATP の生産量が少ないために移動速度が小さいのに対し、5-ALA 陰性細胞は、酸化リン酸化により ATP が十分供給される細胞であり、このために移動性が高くなっているのではないかと考えた。そこで、酸化リン酸化阻害剤の Oligomycin および Rotenon 存在下で、同様にタイムラプス観察を行い、ミトコンドリア活性阻害下での細胞の移動性の解析をおこなった。その結果、5-ALA 陰性細胞の移動性は阻害剤存在下で顕著に低下した。この結果は、細胞が大きく移動する際に、酸化リン酸化の ATP を用いている可能性を強く示唆する。

腫瘍細胞は悪性度が進行するにつれ、周囲との細胞間接着を緩め、高い運動能を獲得する細胞へと変化する。変化した細胞は基底膜を破り、周囲の組織へ移動することで癌の浸潤・転移が開始する。癌の悪性度と移動性の関係については十分な理解がなされておらず、5-ALA 応答性と移動性についての知見が得られれば、GBM の治療戦略への利用も期待される。本結果は 5-ALA の治療有効性にも直結する結果であるため、さらなる慎重な検討をおこなう必要がある。さらにこうした現象は、他の腫瘍細胞でもありうる現象かどうかという点についても検討が必要である。

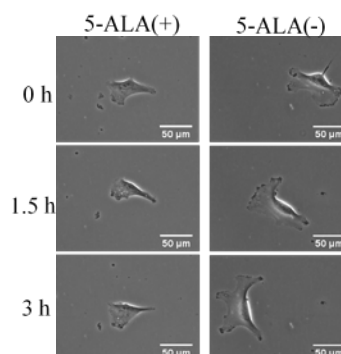
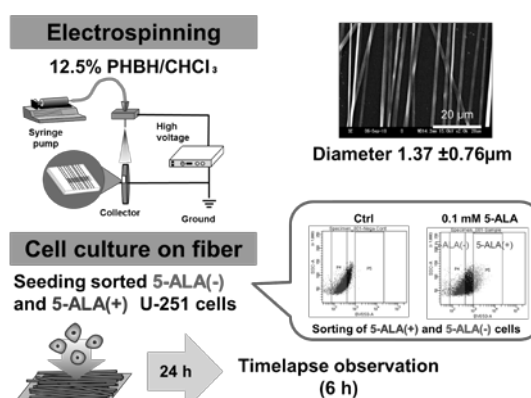


Fig.1 Cell dynamics of 5-ALA(+) cells and 5-ALA(-) cells



Scheme 2 Experimental setup

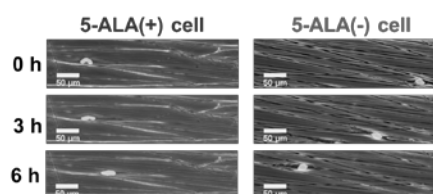


Fig. 2 Cell migration on nanofiber scaffold

## 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

### 「学会発表」

Analysis of Heterogeneity of Glioblastoma Cells with 5-Aminolevulinic Acid, K. Yoneda, S. Suye, S. Fujita, Textile Summit 2018 (2018)

ナノファイバーを用いたグリオブラストーマ細胞の遊走挙動に関する検討, 米田滉平, 末信一朗, 藤田聡, 平成 30 年度北陸地区高分子若手研究会 (2018)

グリオブラストーマ細胞における 5-ALA 応答不均一性に関する検討, 米田滉平, 末信一朗, 藤田聡,

第 40 回日本バイオマテリアル学会大会 (2018)

### 「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

JST・A-STEP 試験研究タイプ・2018-2019 年度・タンパク質提示ナノファイバー膜のワンステップ製造技術の開発・代表・採択

JSPS・科研費基盤(C)・2016-2018 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