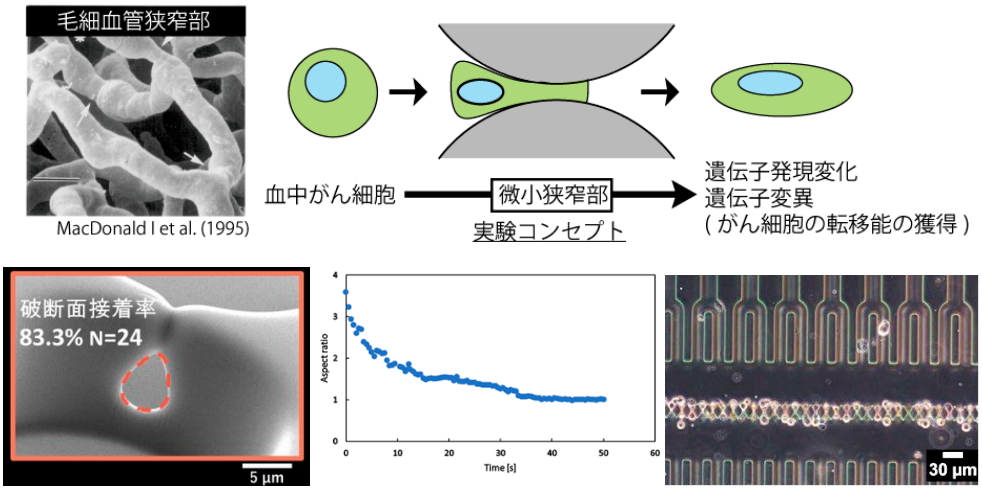
89　1細胞進化動力学を目指したがん細胞微小循環モデル	寺尾　京平

【目的】本研究は、血中がん細胞が血管狭窄部を通過した際に生じる遺伝子発現の変化と遺伝子変異の蓄積を解析する方法論を実現する。それにより、血中がん細胞が如何にして血液循環中に「進化」し、他臓器への転移能を獲得する（あるいは抑制される）に至るのか、という疑問にアプローチする。そのために、毛細血管の狭窄部を再現した 3 次元微細構造を半導体微細加工技術によって作製し、ライブイメージングによる狭窄部通過前後の 1 細胞毎の計測を通じて、がん細胞と細胞核の物理的挙動について可視化するとともに、狭窄部通過後のがん細胞を回収し、遺伝子発現・変異を評価することで細胞機能の変化を解析する。

【方法】以下の三つの要素に関して、マイクロナノテクノロジーを用いて、装置及び手法の開発と評価を行い、血中がん細胞進化解析に関する新たな方法論を確立した。1. 血管狭窄部の 3 次元モデル形成：ヒトの血管最小狭窄部は直径約 6μm の円形に近い断面を持っている。これを生体外で再現するため、半導体加工技術とポリマーの自己組織化を利用したマイクロブリッジ鋳型形成手法を開発した。2. 1 細胞観察デバイス：蛍光顕微鏡下に *in vitro* 血管モデルとなる 1 の狭窄部構造を有したマイクロ流体デバイスを設置し、がん由来の細胞株をサンプルとして、狭窄部通過前後のがん細胞および細胞核の変形と形状回復に関するデータを物理刺激の履歴として取得するとともに、細胞内動態を蛍光ライブイメージングにより可視化し、進化の駆動因子として評価する。そのために、狭窄部通過後の細胞を微細構造でトラップするデバイスを開発した。3. 多細胞回収デバイス：狭窄部を通過した細胞群をマイクロ流体デバイスから回収し、特にがんの転移に関わる機能の評価を行う。回収細胞群の遺伝子発現解析を行うために、解析に十分な細胞数を回収することが必要なことから、*in vitro* 血管狭窄部モデルをマイクロ流体デバイス内で多数並列化することで単位時間当たりの回収細胞数を向上させること取り組んだ。また、それを実現するために、細胞をアレイ化した狭窄部構造に均等に分配する分岐型流路の設計と評価を行った。

【結果】三つの技術要素について、研究開発に取り組み、細胞計測に用いるための技術を確立した。1. 血管狭窄部の 3 次元モデル形成：微細加工時の様々なパラメータを検討することで、メニスカスを用いたマイクロブリッジ鋳型により 6μm 径の円形断面を有した微小狭窄構造の形成に成功した。2. 1 胞観察デバイス：がん由来細胞株 MDA-MB-231 を用いて狭窄部通過実験を行い、細胞の狭窄部通過による変形と、通過後の細胞の変形からの回復挙動を顕微鏡によりイメージングした。変形回復挙動から、線形粘弾性モデルにより形状回復の時定数が 8 秒程度であることが見積もられた。3. 多細胞回収デバイス：細胞を均等分配する分岐型流路と 512 個の狭窄部アレイを有したマイクロ流体デバイスを作製した。熱交換器設計を参考に、数値流体解析と細胞を用いた実験を行い、細胞を効率よく狭窄部に誘導・分配するマイクロ流路設計の最適化を行った。

in vitro 微小血管狭窄部 3 次元モデルと細胞計測



89. 1細胞進化動力学を目指したがん細胞微小循環モデル

寺尾　京平

香川大学 創造工学部 機械システム工学領域

Key words：Circulating tumor cells（CTCs），マイクロ流体デバイス，がん転移，微小血管構造

緒　言

がん転移は、原発巣での増殖、原発巣からのがん細胞の離脱と血管やリンパ管への浸潤、血管やリンパ管内での循環移動、転移臓器の血管内皮への接着、転移臓器への浸潤、転移臓器内での増殖のプロセスからなる。本研究は、毛細血管内を循環する循環腫瘍細胞（CTC：Circulating Tumor Cell）に着目した。がん細胞の血液循環について、どのように毛細血管の微小狭窄部をがん細胞が変形して通過するかという観点の研究が国内外で行われている。しかし、循環によってがん細胞の機能がどのように変化するのか、特に転移能への影響については明らかになっていない［1］。最近では、狭窄部を通過後の細胞では遺伝子発現状態が変化し、特にがん転移に関わる遺伝子群の発現が変化することが報告されている［2］。本研究では予備検討を行い、狭窄部通過によって、細胞核が大きく変形し、核内DNAの二本鎖切断が生じているという知見を得た。したがって、物理的な変形が刺激となって、がん細胞の機能が変化することが示唆される。本課題においては、狭窄部通過の動的過程における1細胞への物理刺激が遺伝子変異をもたらし、がん細胞の進化を促進するという仮説を立て、それを立証することを目標とする。本研究を1細胞進化動力学と位置づけ、期間内に必要な方法論の確立に取り組んだ。具体的には、以下の3つの要素に関して、マイクロナノテクノロジーを用いて、装置及び手法の開発と評価を行い、血中がん細胞進化解析に関する新たな方法論を確立することを目的とした。

血管狭窄部の3次元モデル形成：これまで微細加工技術を使って作製された血管狭窄モデルは長方形断面の狭窄部に限られ、生体内同様に円形断面を持った3次元微小狭窄部モデルは未だ報告されていない（図1）。長方形断面では図中x軸方向の細胞への締め付けであり、細胞は扁平に変形する。一方で、円形断面を持った狭窄部であれば、xz面の半径方向から細胞への締め付けが行われ、細胞はくびれを持った形で変形し、通過する。また、内部の細胞核の変形も同様に生じ、DNAへの損傷や遺伝子発現状態への影響も2つのモデルで異なることが考えられる。そこで、本研究では、正確に生体内の円形断面を再現する3次元微小血管狭窄部モデルの開発に取り組んだ。将来的には血管狭窄の標準的な実験モデルとして、生体内では解析が困難な細胞の様々な挙動解析に利用できるようになると考えられる。

1細胞観察デバイス：毛細血管の狭窄部を再現した3次元微細構造をマイクロ流体デバイス内に構築し、狭窄部を通過した細胞の計測を行う。そのため、狭窄部通過後の1細胞をイメージングにより動態解析することを目的としたマイクロ流体デバイスの開発に取り組んだ。ライブイメージングによる狭窄部通過前後の1細胞毎の計測を通じて、がん細胞と細胞核の物理的挙動について可視化するとともに、蛍光ラベルされた細胞内の生体分子の動態観察を通じて、詳細な変化を追跡する。これらの観察を実現するためには、細胞を狭窄部通過直後に安定に捕捉し、顕微鏡観察面内で細胞の狭窄部通過動態と通過後の動態の両方を可視化するデバイスが求められる。

多細胞回収デバイス：狭窄部通過前後の細胞機能の解析を、遺伝子発現解析等のバルク細胞集団を対象にした手法によって行うためには、狭窄部を通過した多数の細胞をデバイス外に回収することが必要になる。必要な細胞数を回収するには、数個の狭窄部を有したデバイスでは効率が低く、回収が長時間化し、その時間経過による細胞の性質変化を引き起こす可能性がある。また、細胞の通過時間は1秒以下から1時間程度要するものまでばらつきが大きく、通過に長時間かかる細胞が一度狭窄部を専有すると目詰まりを発生させる。そこで、通過させた細胞を効率よく回収するための回収マイクロ流体デバイスを開発した。

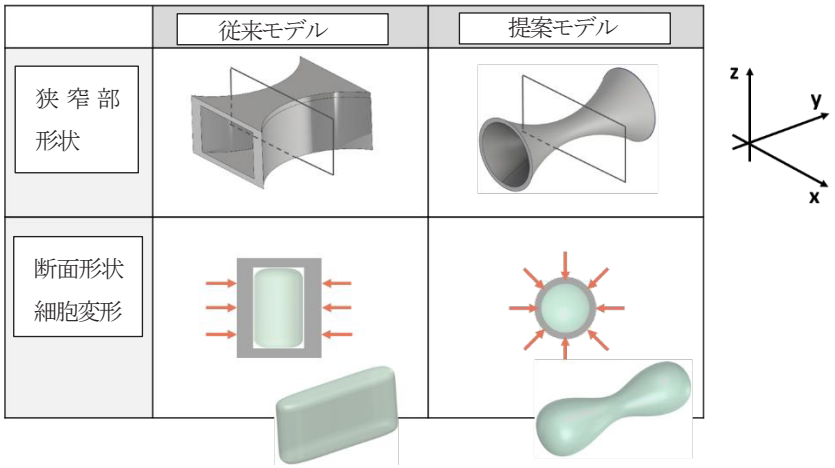


図 1. 従来の 2 次元狭窄部モデルと提案 3 次元モデルの比較
従来モデルでは細胞が図中 x 軸方向の締め付けを受けるのに対して、生体内を再現した提案モデルでは xz 面内で半径方向からの締め付けを受け、異なる細胞・核の変形様式となる。

方　法

1. 狭窄部構造の 3 次元化

ヒトの血管最小狭窄部は直径約 6 μ m の円形に近い断面を持っている。これを生体外で再現するため、ポリマーを利用した微小円形開口部形成手法［3］を応用した。フォトリソグラフィによりレジストで微小な垂直面をパターニングし、アクリルポリマー溶液を塗布後、スピンコートすることで微小垂直面間を繋ぐ形で自己組織的にメニスカスによるマイクロブリッジを形成した。その後、PDMS（Polydimethyl siloxane）を塗布し硬化、剥離することで、アクリルポリマー溶液によるマイクロブリッジ部分を鋳型として PDMS に微小狭窄構造を転写した。メニスカスによって得られる形状は表面張力に起因する曲面が得られ、最小狭窄部では円形断面となる。

2. 1 細胞観察デバイス

蛍光顕微鏡下に *in vitro* 血管モデルとなるマイクロ流体デバイスを設置し、がん由来の細胞株をサンプルとして、狭窄部通過前後のがん細胞および細胞核の変形と形状回復に関するデータを物理刺激の履歴として取得するとともに、細胞内のクロマチン領域変化（Hoechst）・DNA 二本鎖切断（53BP-GFP）を蛍光ライブイメージングにより可視化し、進化の駆動因子として評価する。本研究では、まず細胞（MDA-MB-231）の形状回復について観察を行った。

1 細胞観察デバイスでは、狭窄部下流に 1 細胞トラップ構造をアレイ状に形成することで、狭窄部通過後の細胞を、デバイス内流れによりトラップし、顕微鏡による狭窄部通過細胞と通過後細胞の安定した同時ライブイメージングを可能にした。

3. 多細胞回収デバイス

細胞を狭窄部に通過させる際、通過時間は細胞により変化する。1 秒以下から 1 時間程度要するものもあり狭窄部が細胞で占有されている状態が発生する。そこで、スループットを高めるため、1 細胞観察デバイスでは 3 個であった狭窄部構造を 512 個並列に配列した多細胞回収デバイスを設計・製作した。高スループットを達成するには、この多数の狭窄部デバイスに均等に細胞を流入口から分配することが求められる。そこで、細胞を均等に分配するための分岐型流路デバイスを開発した。細胞を用いた実証実験では、Calcein-AM で染色した MDA-MB-231 細胞を用い、圧力駆動ポンプにより差圧 10 mbar の条件で細胞集団を狭窄部に通過させ、蛍光観察した。

結果および考察

1. 狭窄部構造の 3 次元化

微小狭窄の形状決定のため、製作時の様々なパラメータについて最適な条件を模索・検討した。垂直面間の形状、垂直面間のギャップサイズ、ポリマー溶液の濃度、硬化温度の 4 つの観点から狭窄形成に最適な条件を決定した（図 2）。結果として、8 割以上の歩留まりで円形断面を有し、6μm 径の 3 次元的な狭窄部構造を作製することに成功した。本デバイスを用いることで、これまで再現できなかった生体内に類似した細胞・細胞核変形挙動を再現できるようになり、それに伴う様々な細胞挙動の計測に適用できると考えられる。

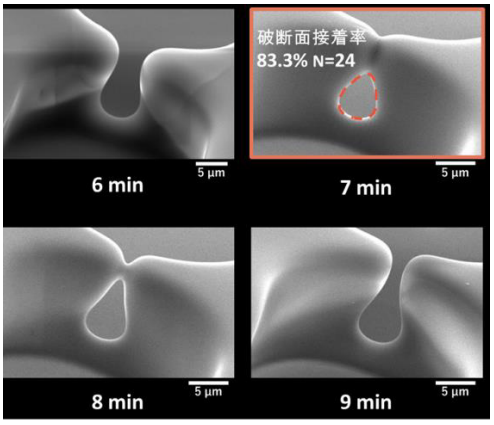


図 2. 樹脂硬化時間による狭窄部断面形状の変化
製作過程における狭窄部流路材料の硬化時間（7～9分間）と狭窄部形状の関係を示す。

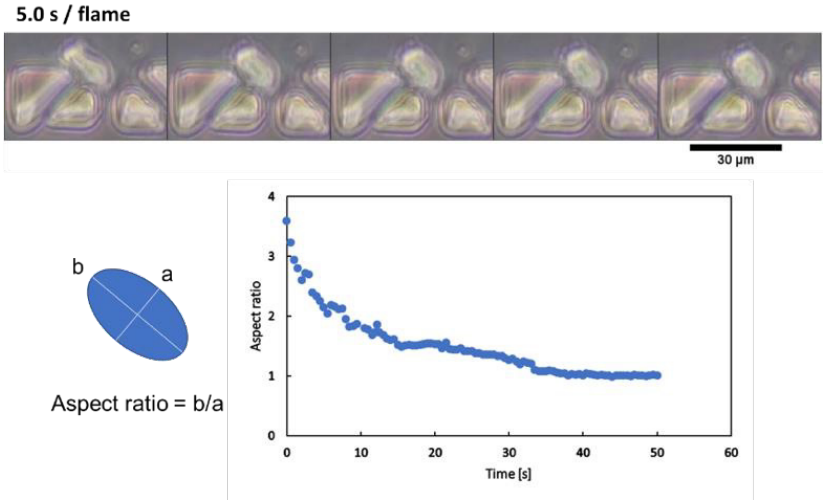


図 3. 狭窄部通過後の細胞の形状回復過程の観察
3次元狭窄部モデル通過直後の細胞（MDA-MB-231）の形状について、5秒毎の連続写真（図上）とアスペクト比の時間変化（図下）を示す。

2. 多細胞回収デバイス

燃料電池システムなど工業用熱交換器に使用されるフロー分配器［4］を参考にしたトーナメント型の流路を設計した（図 4a）。流路長さと分岐点での条件を変更した 3 種類の流路を設計し、数値流体解析により流れ場と粒子運動について評価を行い、512 個の狭窄部構造に細胞を等分配するマイクロ流体設計の最適化を行った。

細胞を用いた実証実験では、蛍光染色した MDA-MB-231 細胞により、デバイス内での細胞の移動を計測した（図 4b）。細胞は狭窄部構造に到達し、通過することが確認された。また、流路を流れる細胞軌跡と最終分岐後の細胞をカウントすることで分配状況を評価した。実験結果について、数値解析と同様の傾向が得られた。今後、最適化された本流路デバイスを使用することで、効率的に狭窄部通過細胞の回収と解析が可能になると考えられる。

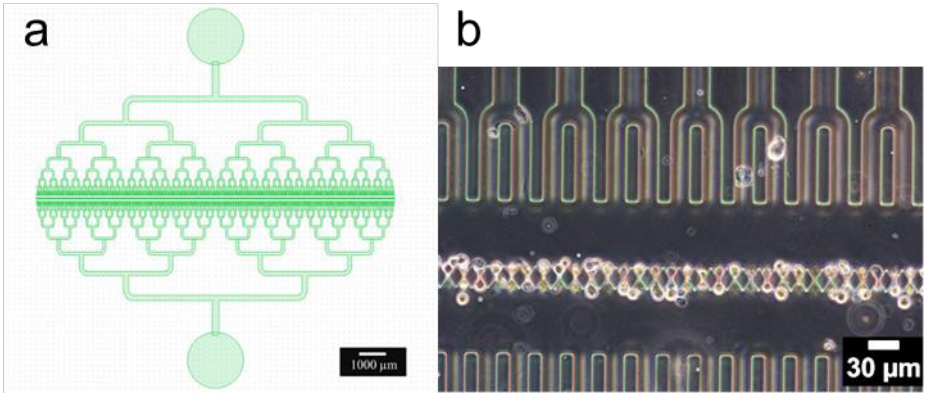


図 4. 多細胞回収デバイス

a）多分岐型の流路とアレイ化された狭窄部構造を有したデバイス設計。

b）MDA-MB-231 細胞を使った狭窄部通過実験写真。

共同研究者

本研究の共同研究者は、Institute Curie, Jean Louis Viovy 博士、Catherine Villard 博士である。

文　献

1） Perea Paizal J, Au SH, Bakal C. Squeezing through the microcirculation: survival adaptations of circulating tumour cells to seed metastasis. Br J Cancer. 2021 Jan;124(1):58-65. doi: 10.1038/s41416-020-01176-x. Epub 2020 Dec 1. PMID: 33257836; PMCID: PMC7782506.

2） Cognart HA, Viovy JL, Villard C. Fluid shear stress coupled with narrow constrictions induce cell type-dependent morphological and molecular changes in SK-BR-3 and MDA-MB-231 cells. Sci Rep. 2020 Apr 14;10(1):6386. doi: 10.1038/s41598-020-63316-w. PMID: 32286431; PMCID: PMC7156718.

3） Terao K, Gel M, Okonogi A, Fuke A, Okitsu T, Tada T, Suzuki T, Nagamatsu S, Washizu M, Kotera H. Subcellular glucose exposure biases the spatial distribution of insulin granules in single pancreatic beta cells. Sci Rep. 2014 Feb 18;4:4123. doi: 10.1038/srep04123. PMID: 24535122; PMCID: PMC3927211.

4） Hong L, Peiwen L, Jon L. CFD study on flow distribution uniformity in fuel distributors having multiple structural bifurcations of flow channels. Int J Hydrog Energy. 2010; 35(17):9186-9198. doi: 10.1016/j.ijhydene.2010.06.043.