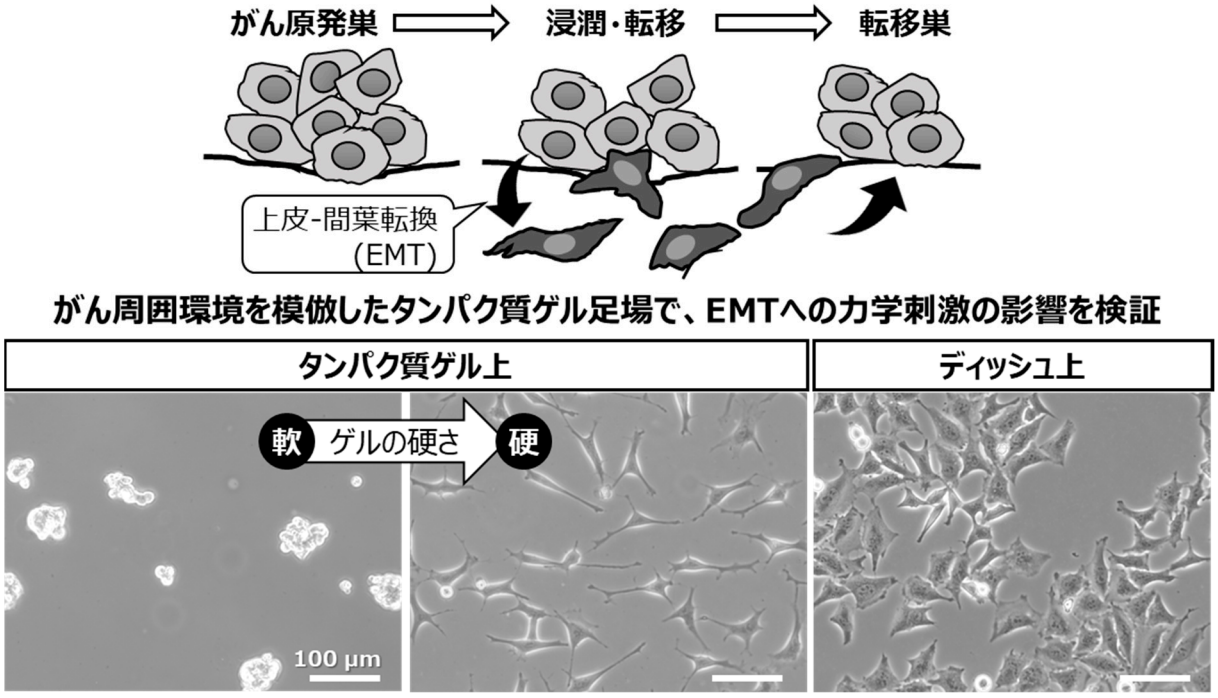
193　がんの浸潤・転移を引き起こす生体内力学刺激の解明	大山　智子

【目的】転移の有無は、がん治療の難易度を左右する重要な要素である。転移には、がん細胞間の接着性が失われ、個々の細胞が可動性を獲得する「上皮－間葉転換（EMT）」が関わっているとされる。しかし、EMT が起こるきっかけを含め、そのメカニズムの詳細は未だ解明されていない。本研究において着目したのは、生体内におけるがんの周囲環境（細胞外マトリックス）である。がん周囲の細胞外マトリックスはⅠ型コラーゲンが豊富に存在するため正常部位より硬いことが知られている。そこで本研究では、周囲環境からの力学的な刺激ががんの EMT に関わっているのではないかとの仮説を立て、がん周囲の細胞外マトリックスを模倣できるタンパク質ゲル足場を開発して、仮説を *in vitro* で検証することを目的とした。

【方法】量子ビーム（高度に制御した放射線）誘起反応を駆使した独自技術によって、タンパク質を架橋・ゲル化してタンパク質ゲル足場を作製した。さらに、架橋密度を調整することによって硬さの異なるゲル足場を作製し、がん細胞を培養して、特に細胞形態と EMT に関わる転写因子として TWIST の局在を解析した。

【結果】医療器具の滅菌処理に用いられるガンマ線を用い、架橋剤等の薬剤を一切用いずにタンパク質水溶液をゲル化させた。Ⅰ型コラーゲンの分解・精製物であるゼラチンを原料に用いた場合、得られたゲル足場は透明度が高く、水溶液の濃度やガンマ線の照射条件によって、生体軟組織の硬さ範囲のほぼ全域をカバーする圧縮弾性率（約 3～460 kPa）に自在に調整することができた。硬さの異なるゲル足場にがん細胞を播種して応答を解析したところ、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞の場合、軟らかいゲル上では 3 次元的な細胞塊を形成し、ゲルが硬くなるにつれ徐々に 2 次元的に伸展して、長細い突起を有する特徴的な形をとることが分かった。また、ゲルよりもはるかに硬いディッシュ上で 3 日間培養した細胞の場合、TWIST は核内に集積していたが、軟らかいゲル上で培養した場合は細胞質側に集積するなど、周囲環境の硬さががん細胞の EMT に関わることを示唆する結果が得られた。

本研究の目的と、タンパク質ゲルとディッシュ上でのがん細胞の様子



193. がんの浸潤・転移を引き起こす生体内力学刺激の解明

大山　智子

量子科学技術研究開発機構 量子ビーム科学部門 高崎量子応用研究所 先端機能材料研究部

Key words：細胞外マトリックス，足場，がん，上皮間葉転換

緒　言

がんは日本人の死因の１位であり、２人に１人は必ずがんにかかると言われている。がん治療の難易度を左右するのが、転移の有無である。がんは増殖して塊（原発巣）を形成したのち、一部の細胞が塊から離脱して活発に動き回り（浸潤・転移）、辿り着いた先で次の塊（転移巣）を形成する。一連の現象は、がん細胞間の接着性が失われ、個々の細胞が可動性を獲得する劇的な変化、「上皮－間葉転換（EMT）」に起因している［1］。がん細胞の EMT を制御できれば、浸潤・転移を抑制することができると考えられるが、EMT が起こるきっかけを含め、そのメカニズムの詳細は未だ解明されていない。

本研究において着目したのは、生体内におけるがん細胞の周囲環境（細胞外マトリックス）である。細胞外マトリックスはタンパク質・糖と水から成るゲル状の物質で、細胞に物理的な足場を与えるのみならず、その成分や弾性率等により細胞に刺激を与えることで、機能調整に深く関わっている。がん周囲の細胞外マトリックスには、Ⅰ型コラーゲンが豊富に存在する。また、がんは“しこり”として感じられるように、正常部位より硬いことが知られているが、この硬さを生み出しているのもⅠ型コラーゲンの繊維構造であると考えられる。がん周囲の特殊な環境、つまりⅠ型コラーゲンからの生化学的な刺激、もしくは硬さや繊維形状による力学的な刺激が、がんの浸潤・転移に関わっている可能性は大いにある。

しかし、従来細胞培養に用いられているディッシュはプラスチック製で、生体軟組織に比べはるかに硬い。化学的にも力学的にも細胞外マトリックスとかけ離れており、この仮説を *in vitro* で検証することは困難である［2］。生体から抽出したコラーゲンから繊維を再構成させて得られるⅠ型コラーゲンゲルを培養基材（足場）とする手法はあるが、低濃度の極めて軟らかいゲルしか得られないため［2］、生体内における高濃度で硬いがん周囲の細胞外マトリックスを再現することは難しい。なお、硬さ刺激が EMT を引き起こす要因の一つであることを示すデータはあるが［3］、報告者は硬さを調整するためにポリアクリルアミドゲルを基材として用い、表面にⅠ型コラーゲンをコーティングして細胞を接着させる手法を採っている。ポリアクリルアミドゲルは硬さや形状調整が容易で、主にメカノバイオロジー分野において広く用いられている有用な基材であるが、細胞接着にはタンパク質の塗布が必要であり、その塗布の仕方によって細胞応答が影響されてしまうため、硬さや形状の効果を正確に評価できないことも指摘されている［4］。がんの EMT に関わる周囲環境のパラメータを明らかにするには、より細胞外マトリックスに近い化学的・物理的特性を有した培養材料が必要である。

そこで本研究では、量子ビーム（高度に制御した放射線）技術を駆使した独自技術によってタンパク質を架橋・ゲル化し、細胞外マトリックスを模倣することができるタンパク質ゲル足場を作製した。タンパク質ゲル足場は既知のタンパク質と水のみで構成され、試料調製や量子ビームの照射の方法によって硬さを自在に調整することができる。このゲル足場を用いることで、周囲環境からの力学的な刺激ががんの EMT に関わっているのではないかとの仮説を検証することを目的とした。具体的には、Ⅰ型コラーゲンの分解・精製物であるゼラチンを、医療器具の滅菌処理にも用いられるガンマ線を用いて架橋・ゲル化した。さらに架橋密度を調整することによって硬さを調整したゲルを足場として用い、がん細胞の応答を解析した。

方　法

1. タンパク質ゲル足場の作製

豚皮の酸処理により抽出されたゼラチンを 50℃で超純水に溶かし、ゼラチン水溶液を調製した。この水溶液をポリスチレン製の組織培養用ディッシュに注ぎ、冷却してゼラチンを物理ゲル化してから、量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所のコバルト 60 照射施設においてガンマ線を照射した。照射後のサンプルは、架橋成分と未架橋成分を含んでいる。ディッシュにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を入れて 50℃で加熱・洗浄することで未架橋成分を除去し、タンパク質ゲル足場を得た。

2. タンパク質ゲル足場の硬さ評価

PBS 中で 37℃に加温したタンパク質ゲルの硬さを、荷重 2N のクリープメーターを用いて評価した。直径 3 mm の円柱を使ってゲルを圧縮し、応力ーひずみ曲線を得た。ゲルの最表面から約 100 μm の深さまでの曲線の傾きから圧縮弾性率を算出した。

3. 細胞培養

タンパク質ゲル足場を用い、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞等の各種がん細胞を培養した。10% FBS、100 U/mL ペニシリン、100 μg/mL ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを加えた MEM を培地として用いた。タンパク質ゲル足場はガンマ線照射による架橋工程（上記 1）が滅菌工程を兼ねるため、追加の滅菌処理を要さずに細胞培養に使用することができた。ディッシュに培地を入れ、37℃で 1 時間インキュベートすることでゲル内の PBS を培地に置換してから、細胞を播種した。ポリスチレン製の組織培養ディッシュにも直接細胞を播種し、タンパク質ゲル足場との比較実験に用いた。

4. 染色と観察

培養 3 日目に細胞の形態を倒立顕微鏡で撮影すると共に、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、核・アクチンと、EMT に関与する転写因子 TWIST をそれぞれ染色した。染色後のサンプルを、正立顕微鏡を用いて蛍光観察し、細胞の形態と TWIST の局在を解析した。

結果および考察

1. タンパク質ゲル足場の作製と硬さ調整

量子ビームを用いたタンパク質の架橋・ゲル化のメカニズムを簡単に記す。ガンマ線は医療器具の滅菌処理にも使われる、極めて高い透過力をもった電離放射線である。電離放射線を直接照射するとゼラチン等のタンパク質は容易に分解する。しかし、水溶液に対して照射すると、電離放射線は大部分を占める水と反応する。ゼラチン物理ゲルにガンマ線を照射した場合も、ガンマ線は主に水に作用し、水を分解してヒドロキシルラジカル等の活性種を発生させる。活性種はゼラチンの分子鎖中に活性点を導入し、それらが再結合することで、ゼラチンは共有結合で架橋された化学ゲルに変化する。このゲルは物理ゲルと違って、50℃で加熱・洗浄しても溶けることはない。

得られたゲルは図 1a、b に示すように透明度が高く、水溶液の濃度やガンマ線の照射条件によって、軟らかな蜂蜜状から弾力のあるフィルム状にまで幅広く変化した。ゼラチン水溶液にガンマ線を 10、15、30、60 kGy（＝J/g）照射して得られたゲルの圧縮弾性率を図 1c に示す。ガンマ線の照射量が増えると架橋密度が増し、結果としてゲルは硬くなった。生体軟組織の硬さは約 0.5～500 kPa と言われており［5］、本研究で作製したゲルは約 3～460 kPa と、そのほとんどの範囲をカバーできていることが分かる。

なお、得られたゲルの硬さは、ゲルを構成するゼラチンの濃度と正の相関がある。軟らかいゲルは含水率が高く、ゼラチンの濃度は数%～10%程度だが、硬いゲルほど含水率が低下し、代わりにゼラチンの濃度は 20%程度まで上昇する。生体内においてもタンパク質の濃度と組織の硬さには正の相関があることが報告されており［6］、本ゲルは、生体内環境の主要な特性を模倣し、細胞への影響を調査するのに適した足場材料であると考えられる。

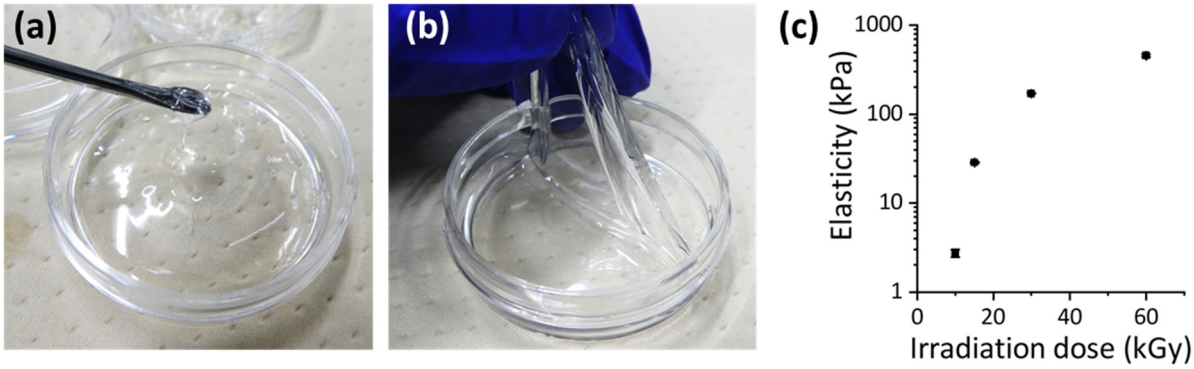


図 1. タンパク質ゲルの外観写真と圧縮弾性率の制御

a、b）ゼラチン水溶液にガンマ線を照射後、50℃のPBSで洗浄すると、蜂蜜状の軟らかいゲル（a）や、弾力のあるフィルム状のゲル（b）が得られた。

c） ガンマ線照射量によってゼラチンゲルの硬さを制御した（n=3）。

2. タンパク質ゲル足場上でのがん細胞の応答

ポリスチレン製の組織培養ディッシュと、3～460 kPa の各種硬さを有するタンパク質ゲル足場上で HeLa 細胞を培養し、細胞の形態を観察した。図 2 に、培養 3 日目に細胞を固定し、細胞核・アクチン骨格・TWIST を染色した画像を示す。TWIST は EMT に関連が深い転写因子の一つである。

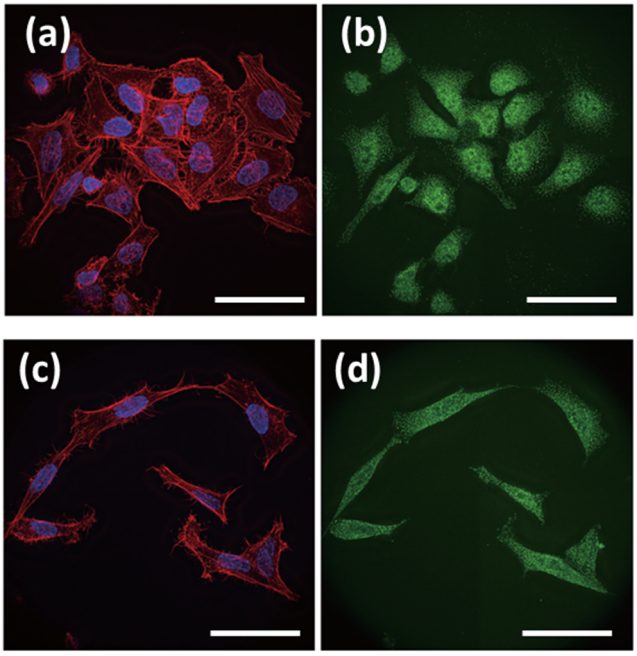


図 2. ディッシュ上とタンパク質ゲル上で 3 日間培養した HeLa 細胞の染色像

a） ディッシュ上で培養したHeLa細胞の核（青）、アクチン骨格（赤）。

b） 同TWISTの染色像（緑）。

c） タンパク質ゲル上で培養したHeLa細胞の核（青）、アクチン骨格（赤）。

d） 同TWISTの染色像（緑）。

スケールバーは50 μm。

ディッシュ上の HeLa 細胞は平面敷石状の形態をとったが、ゲル上では細胞の形態が大きく変化した。特に軟らかいゲル上では細胞間接着が強固な 3 次元的な細胞塊を形成したが、ゲルが硬くなるにつれ徐々に 2 次元的に伸展し、細胞間の接着性が弱まって個々に運動する様子が見られた。また、ゲル上で伸展した細胞は、ディッシュ上とは異なり、長細い突起を有する形をとった。ゲルに比べはるかに硬いディッシュ上の細胞の場合、TWIST は核内に集積していたが、軟らかいゲル上の細胞の場合は核から抜け、細胞質側に集積していた。これらの結果は、ゲルの硬さが細胞形態や TWIST の局在に影響を与えることを示しており、周囲環境の硬さががん細胞の EMT に関わることを示唆している。

タンパク質ゲル足場の開発により、がん周囲の力学刺激を模擬する培養実験が可能になった。未だ不明点が多いがん細胞の EMT のきっかけを明らかにすることで、がん浸潤・転移の予防や治療に役立つ情報が得られると期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、量子科学技術研究開発機構の大山廣太郎、田口光正である。

文　献

1) Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2002 Jun;2(6):442-54. doi: 10.1038/nrc822. PMID: 12189386.
2) Caliari SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. Nat Methods. 2016 Apr 28;13(5):405-14. doi: 10.1038/nmeth.3839. PMID: 27123816; PMCID: PMC5800304.
3) Wei SC, Fattet L, Tsai JH, Guo Y, Pai VH, Majeski HE, Chen AC, Sah RL, Taylor SS, Engler AJ, Yang J. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. Nat Cell Biol. 2015 May;17(5):678-88. doi: 10.1038/ncb3157. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25893917; PMCID: PMC4452027.
4) Lee S, Stanton AE, Tong X, Yang F. Hydrogels with enhanced protein conjugation efficiency reveal stiffness-induced YAP localization in stem cells depends on biochemical cues. Biomaterials. 2019 May;202:26-34. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.02.021. Epub 2019 Feb 23. PMID: 30826537; PMCID: PMC6447317.
5) Guimarães CF, Gasperini L, Marques AP, Reis RL. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. Nature Reviews Materials. 2020 Feb;5:351-370. 351-370. doi:10.1038/s41578-019-0169-1
6) Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PC, Pinter J, Pajerowski JD, Spinler KR, Shin JW, Tewari M, Rehfeldt F, Speicher DW, Discher DE. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. Science. 2013 Aug 30;341(6149):1240104. doi: 10.1126/science.1240104. PMID: 23990565; PMCID: PMC3976548.