

[研究助成 (C)]

荷重制御した周期的圧縮刺激を印加可能な 骨-癌共培養装置の開発

2247016



研究代表者

京都大学 医生物学研究所/
京都大学 大学院生命科学研究所 博士後期課程

吉 本 昂 希

[研究の目的]

日常生活において、歩行などの運動などにより、健康な人々の骨は周期的に圧縮刺激を受けている。このような刺激により骨は骨密度を調節しているだけではなく、他臓器の健康状態にも影響を及ぼすことが明らかになっている。その中で近年、運動により周期的圧縮刺激が負荷された骨組織では、人々の生活の質を著しく低下させるがんの骨転移が抑制されることが医学的経験則から着目されている。しかし、そのメカニズムは明らかになっておらず、骨転移が悪化した骨肉腫を治療する有効な方法がない。

そこで本研究では、生体内において生じる骨転移の抑制メカニズムを解明するために、3Dプリンター技術やマイクロ流体デバイス技術などの機械技術を用いて、骨組織と上皮間葉転換後のがん細胞を周期的圧縮刺激条件下共培養かつライブイメージングできる装置とその共培養法を開発する。

将来的に開発した装置を用いて、周期的圧縮刺激条件下で骨組織と共培養したがん細胞の遺伝子・タンパク質を網羅的に解析する。そして骨転移抑制因子の解明、抑制因子の機能的な実証を経て、医薬品開発による骨転移治療法を確立する(図1)。

本研究では、以下の2つの研究項目を実施した。

周期的圧縮刺激の条件検討

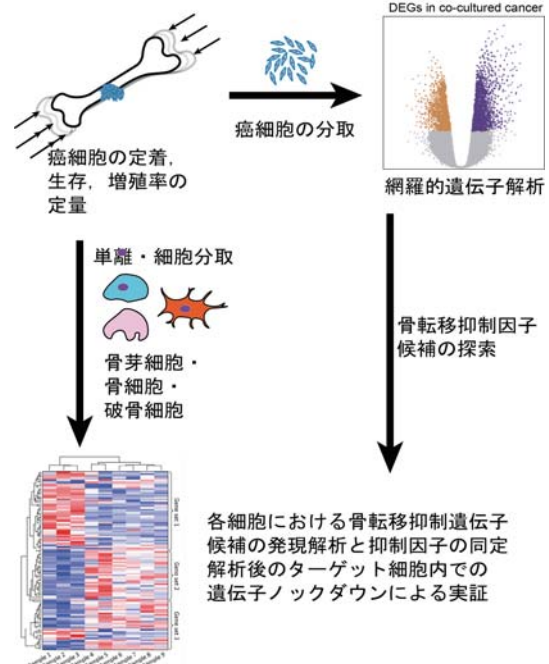


図1 開発した骨組織に周期的圧縮刺激を印加可能な装置

研究項目1：エアシリンダの原理を用いた圧縮刺激の動力システムの開発(図2)

従来のモーター駆動型の動力を用いて骨組織に周期的圧縮刺激を印加するシステムでは、モーターの発熱により、骨転移に必要な1週間以上の培養の間、適切な培養室の温度を保つことができない。また、リアルタイムで観察しながら骨に刺激を与えるために顕微鏡一体型培養室サイズに設計する必要があった。

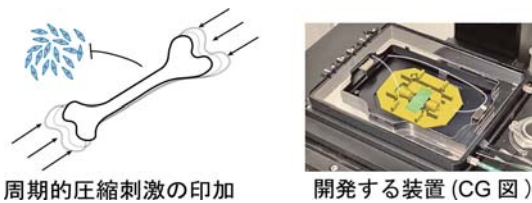


図2 骨転移抑制因子候補探索・生成細胞同定から抑制因子の同定までの研究

研究項目2：生体由来の骨組織とがん細胞の共培養チップの開発（図3）

生体外で骨と転移能を持つがん細胞を圧縮刺激条件下で共培養した事例は確認されていない。そこで、3次元組織中の骨構成細胞と上皮間葉転換後の細胞の機能を保つことができる培養条件を構築する必要がある。そのために圧縮刺激の動力システムに設置可能で、適切な培地条件や灌流条件を検討できるように共培養チップを設計する。

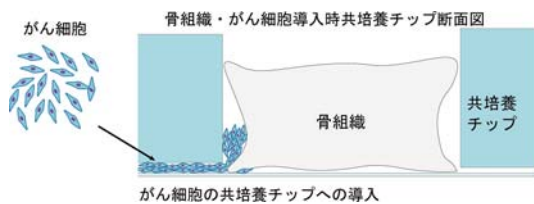


図3 骨組織・がん細胞共培養のための戦略

〔研究の内容、成果〕

研究項目1

まず、本研究ではエアシリンダによる圧縮刺激動力システムを開発するために、CADソフトであるOpenSCADを用いて必要となる部品（押し子、キャップ、基盤）を設計した。設計したモデルをstlファイルに変換し、高精度3Dプリンター（AGILISTA 3000）で印刷した。印刷した部品の表面は99.5%エタノールにより処理し、細胞培養に使用可能にした。さらに市販のバネとシリンジを購入し、シリンジを適切な長さに切断した。

これらの部品を組み合わせることで、圧縮刺激動力システムを作製した（図4）。

次に、圧縮刺激動力システムに搭載するため

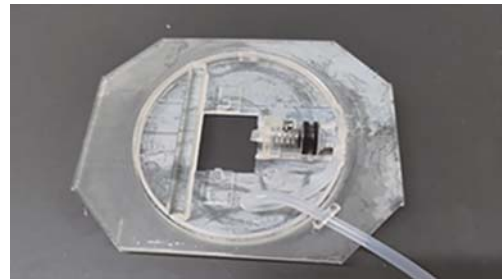


図4 作製した圧縮刺激動力システム

の骨組織とがん細胞を共培養するためのチップを開発した。本研究では、チップ作製のために3Dプリンターにより作製したモールドへPolydimethylsiloxane（PDMS）を流し込み固めるリソグラフィ法を用いた。圧縮刺激動力システム作製時と同様にOpenSCADを用いて2種類のモールドをデザインし、3Dプリンターにより印刷した（図5）。

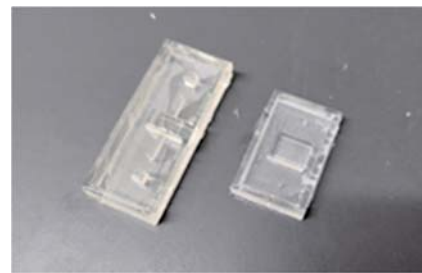


図5 チップ作製用のモールド

チップにPDMSを流し込み、80℃のオーブンで4時間以上固めた。固めたPDMSをモールドから剥がした後、PDMS表面をプラズマ処理し、それぞれのパーツを組み合わせ貼り付け、80℃で24時間処理した。さらに、親水化したシリコンウェハー上にPDMSを垂らし、500 rpmで30秒間スピコートし、PDMS薄膜を作製した。このPDMS薄膜をシリコンウェハーから切り出し、PDMSパーツに貼り付けることで、骨組織に圧縮刺激を与えながら培養し、がん細胞も培養可能な構造に仕上げた（図6）。

作製した圧縮刺激動力システムに骨組織とがん細胞共培養チップを搭載した（図7）。

作製した本装置へ圧力を加え、変位テストを行った（図8）。

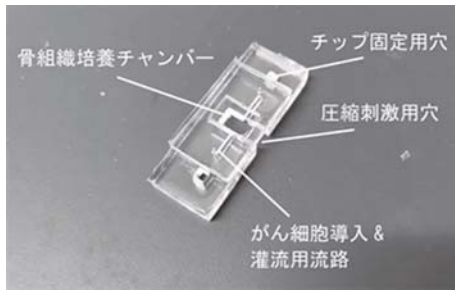


図6 骨組織とがん細胞共培養チップ

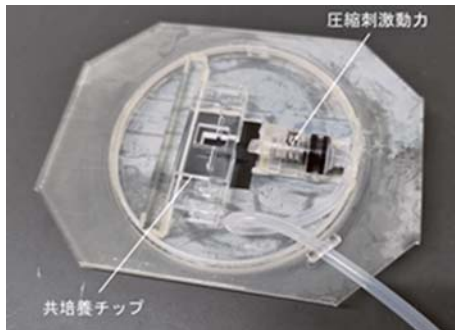


図7 動力システムに搭載した共培養チップ

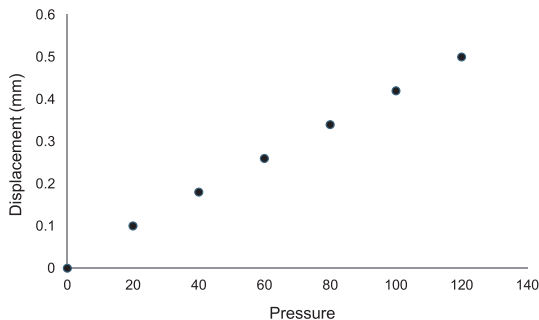


図8 動力システムにおける変位

研究項目 2

本項目では、チップでのがん細胞の培養条件を検討した。将来的に骨組織への圧縮刺激を付与した際に放出される因子ががん細胞へ与える影響を明らかにする。そのため、がん細胞培養に通常使用される Fetal Bovine Serum (FBS) には、ウシ胎児由来の骨に圧縮刺激が加わった際に放出された様々な因子が含まれており、FBS の使用は本研究には適さない。

そこで、本研究では FBS を用いない培養条件を検討した。培養にはマウス由来の上皮系乳がん細胞の EO771 を用いた。

まず、EO771 をチップ上で接着培養させる

ために、FBS 入りの培地を用いて培養した。チップ表面を細胞培養のための足場でコーティングしていない状態では、EO771 は接着しなかった。そこで、マウス肉腫細胞から抽出した細胞外基質マトリゲルによりチップ表面をコーティングした。その結果、EO771 はチップに底面に接着した。

次に、FBS を用いない培地条件を検討した。FBS を用いない iPS 細胞などの幹細胞の培地組成を参考とし、培地を作製した。本培地は Iscove's Modified Dulbecco's Medium を基礎培地として MEM 非必須アミノ酸溶液、グルタミン酸、Pipericolic Acid, Bovine serum albumin, monothioglycerol solution, Ascorbic acid, Dexamethasone, Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamine (ITS-X) をそれぞれ加えて調整した。EO771 培養当初は FBS 入り DMEM 培地で培養し、徐々に FBS 非含有培地に毎日置き換えていった。最終的に、FBS 非含有培地で完全に培養することができた。また、EO771 の継代についても、Trypsin/EDTA を用いて細胞剥がした後、Trypsin inhibitor と FBS 非含有培地で回収し、マトリゲルコーティングしたディッシュ/デバイスに播種することで接着培養を引き続き達成することができた。

用いた EO771 細胞は上皮系のがん細胞であるため、骨組織へ転移させるために上皮間葉転換を誘導し、間葉系のがん細胞にする必要がある。そこで、先行研究に従いマウスリコンビナントの上皮細胞成長因子 (EGF) を用いたデバイス上で上皮間葉転換の誘導を実証した。上皮間葉転換を誘導した指標として細胞の遊走能を評価した。評価手法としてスクラッチによって作られたギャップを横切る細胞の遊走を観察するスクラッチアッセイを行った。細胞をそれぞれの条件で 24 時間培養した結果、EGF を加えた細胞では、明らかに遊走した距離が長くギャップの面積が小さくなっていた (図 9)。これにより、EGF を加えた本培養条件により

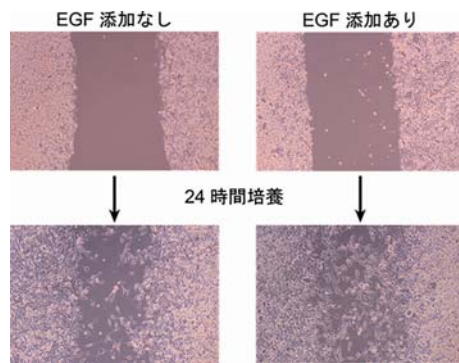


図9 本研究で行ったスクラッチアッセイ

上皮間葉転換を引き起こした状態に近い細胞を誘導できたと考えられる。今後はさらに遺伝子発現解析などを用いて詳細に解析する。

[今後の研究計画]

今年度までに開発したチップでがん細胞を培養し、上皮間葉転換に近い状態を誘導することが可能になった。次のステップとして、マウスから取り出した骨組織を取り出し、実際にチップ上で培養可能であることを実証する。そのために、チップ上で灌流を行い、細胞の生死染色や TRACP & ALP Assay Kit を用いて酸性ホスファターゼ（ACP）およびアルカリ性ホスファターゼ（ALP）の活性を調べ、骨細胞の機能を調べる。その後、実際にかん細胞と骨組織を共培養し、がん細胞が骨組織へ浸潤することを実証する。さらに、圧縮刺激を加えることで、刺激を付与した骨組織から放出された因子がかん細胞の浸潤に与える影響やそのメカニズムを解析する。