



新規3次元培養法の確立

—がん創薬研究の発展に期待—

がんの研究は多くの研究者が取り組んでいるところです。

がんを研究する方法として細胞培養がありますが、従来からの2次元培養（細胞は平面的に増殖）では、実験に用いた細胞が生体とは違った構造や機能を示すと報告されています。そこで、より生体に近く、立体的に（3次元で）増殖するような3次元培養の開発が行われてきました。

今回、この3次元培養の開発に関して、滋賀医科大学医学・看護学教育センター向所賢一教授らと日本バイリン株式会社との共同研究で、“Tissueoid cell culture system”（組織模倣型細胞培養システム）を確立しました。

本研究に関連して、国内特許1件、米国特許1件を取得し、英文論文4編が採択されています。

POINT

- ・組織模倣型細胞培養システムでは、がん細胞が Cellbed™ 内の空隙を通り自由に移動でき、生体がん組織に近い立体構造を呈します。
- ・これまで食道がん、胃がん、大腸がん、肝がん、前立腺がん、膀胱がん由来のがん細胞を用いた3次元培養に成功し、生体のがん組織に類似した構造を確認しました。
- ・組織模倣型細胞培養システムで培養したがん細胞の代謝物の多くは、免疫不全のマウスに移植し作製した移植片（xenograft）の代謝物と値が類似しており、機能的にもより生体のがん組織に近いと判断されます。
- ・より生体に近い培養法が活用されることで、様々ながんの病態解明やがん創薬研究の発展に寄与することが期待できます。

【詳細は2ページ目以降】

本件発信元

滋賀医科大学総務企画課 叶、岸

TEL：077-548-2012

e-mail：hqqouhou@belle.shiga-med.ac.jp

背景

私たちの体は多くの細胞からできていますが、あらゆる細胞からがんは発生します。本邦では、がんは死因の第一位になっています。近い将来、2人に1人はがんになり、3人に1人はがんで亡くなる時代になるといわれています。

がんについて研究する方法は、いろいろありますが、その一つにがん細胞を用いて行う研究があります。がん細胞は、その特性から、栄養(培地)を与えて適切な条件下で育てれば、フラスコやシャーレといった実験器具の中で、数を増やしながらか生き続ける(増殖する)ことができ、適切に扱えば、凍らせて保存したり、それを解凍して再度育てることもできます。このようながん細胞を用いて行う実験方法を細胞培養といいます。実験器具の中でがん細胞が増殖する様式としては、培地の中で浮かびながら増殖するものと、実験器具の底にはりついて、2次元、つまり平面的に増殖するものがあります。しかし、生体内でのがん細胞の増殖の仕方は実験器具の中とは異なります。がん細胞が、胸やお腹の中に貯留した水の中や、血管の中にいる場合は、液体中に浮かんで存在することも多いのですが、その他の場所では、多くのがん細胞は立体的に増殖しています。近年、がん細胞が立体的に(3次元で)増殖するような実験系が重要であると考えられるようになり、3次元培養の開発が盛んに行われてきました。

今回、ご紹介する新規3次元培養は、我々が、2014年2月より、日本バイリン株式会社(本社:東京都中央区 代表取締役社長執行役員、CEO:川村 智)と共同研究にて確立した”Tissueoid cell culture system”(組織模倣型細胞培養システム)です。本システムを開発するにあたり、国内特許(特許第 6671681 号「検鏡標本の作製方法」)と米国特許(US10890513)(いずれも日本バイリン株式会社と共同出願)を得ています。ここでいう組織とは、細胞が集まって作る生体の構造のことです。我々の体は、一つ一つの細胞が集まって組織という構造をつくり、さらに様々な組織が集まって心臓や胃、腸といった体の一部を構成しています。今回の培養システムの“組織模倣型”というのは、我々のシステムを用いて育てたがん細胞が生体のがん組織でみられる3次元構造に似ているということを表したものです。これから、組織模倣型細胞培養システムについてご紹介させていただきます。

がん細胞が育つ環境をつくる Cellbed(セルベッド)の構造

我々の3次元培養システムでは、がん細胞が育つ環境を整えるために高純度シリカファイバーでできた Cellbed(セルベッド)というシートを使用しています。このセルベッドの上にごがん細胞をまいて培養を開始します(図1)。セルベッドは、肉眼的には真っ白なシートですが(図2左)、培養後に増殖したがん細胞とともにセルベッドをスライドガラスの上にごのせ、屈折率をシリカファイバーに合わせた封入剤(スライドガラスと顕微鏡で見たいものをカバーするガラスをくっつけるための糊のようなもの)を塗ることにより、ファイバーが透明になり見えなくなります(図2右)。これにより、セルベッド内で増殖するがん細胞を顕微鏡で観察できるようになります。

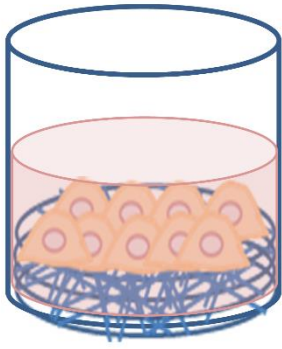


図1 セルベッド上に細胞

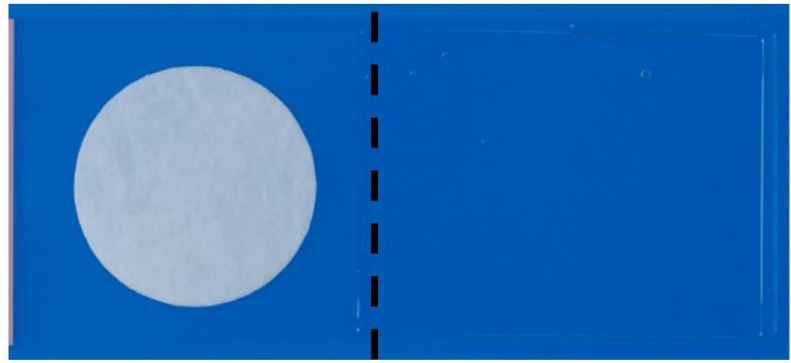


図2 セルベッド:左がガラスでカバー前、右がカバー後

生体の多くの場所には、表面をおおう細胞(上皮細胞)の下に疎性結合組織という構造物があります(図3左)。セルベッドを拡大してみると、その構造は、多くの線維からなる疎性結合組織に非常に似ていることがわかりました(図3右)。セルベッドは、厚さが約200 μm で、平均巾約1 μm のシリカファイバーからできています。ファイバーで構築される隙間の孔径は約7~8 μm (バブルポイント法による)でした。このシステムを用いると、がん細胞はシート内の空隙を通過して、自由に移動できるために、立体的な構造になります。

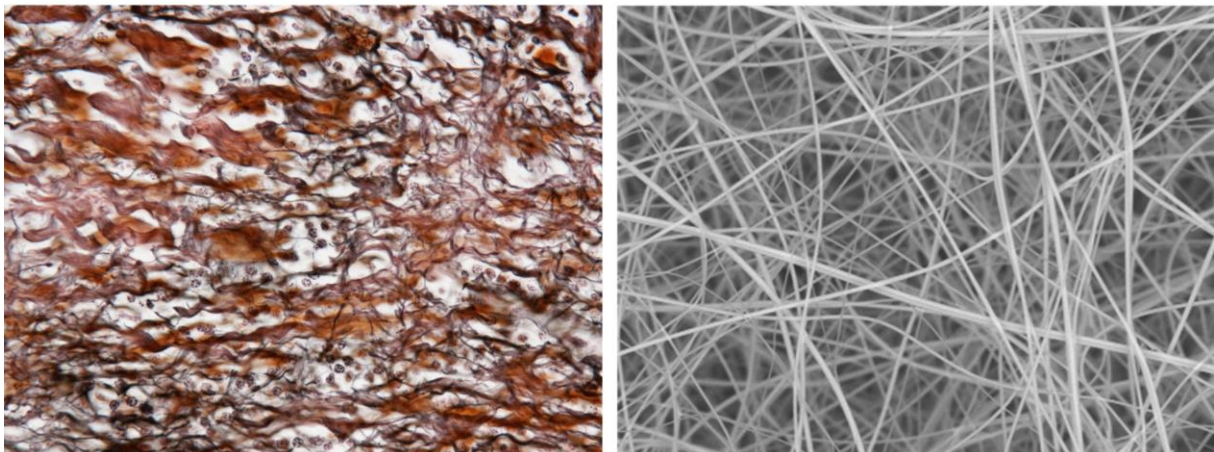


図3 左:疎性結合組織(鍍銀染色)、右:セルベッドの走査電子顕微鏡像
(黒バーの長さ 100 μm)

疎性結合組織は多くの線維からできているために線維と線維との間にできた隙間があります。その隙間には、炎症があれば炎症細胞が、がんであればがん細胞が入っていきます。セルベッドの構造は、疎性結合組織に類似しています。

舌がん組織と3次元培養したがん細胞との比較

がん細胞の特徴に、正常の構造を破壊しながら広がる浸潤(しんじゅん)があります。例として、舌がん組織の顕微鏡画像(図4左)とセルベッド内に増殖した舌がん細胞の顕微鏡画像(図4右)を提示します。生体のがん組織では、表面をおおう上皮直下の疎性結合組織に、ピンク色の細胞集団が浸潤性に増殖していることが分かります(図4左)。これと同じように、セルベッド内で増殖したがん細胞もセルベッド内で、表面から深部に向けて浸潤する様に増殖していることが確認出来ます。

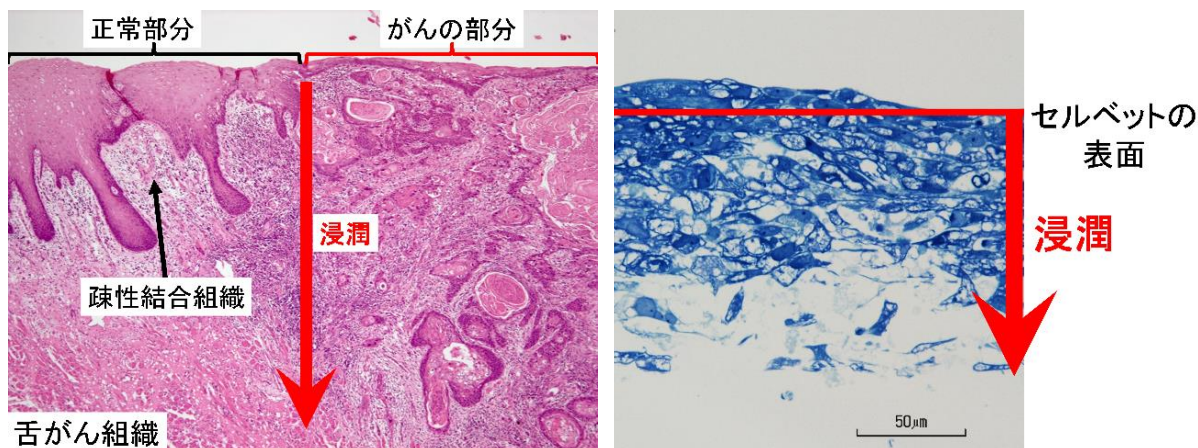


図4 顕微鏡像 左:ヒトの舌がん組織(ヘマトキシリン・エオジン染色)、右:3次元培養後4週間における舌がん細胞(トルイジンブルー染色)

いずれも表面から深部に向け、がん細胞が浸潤性に増殖している像が確認出来ます。

多くのがん細胞で生体がん組織の形態を再現

我々が開発した3次元培養は、セルベッドを用いる以外は、従来からの2次元培養と同じ培地を用いて、簡便に行うことができます。また、これまで食道がん、胃がん、大腸がん、肝がん、前立腺がん、膀胱がん由来のがん細胞を用いて3次元培養に成功しており、生体のがん組織に類似した構造になることを確認しています(図5)。

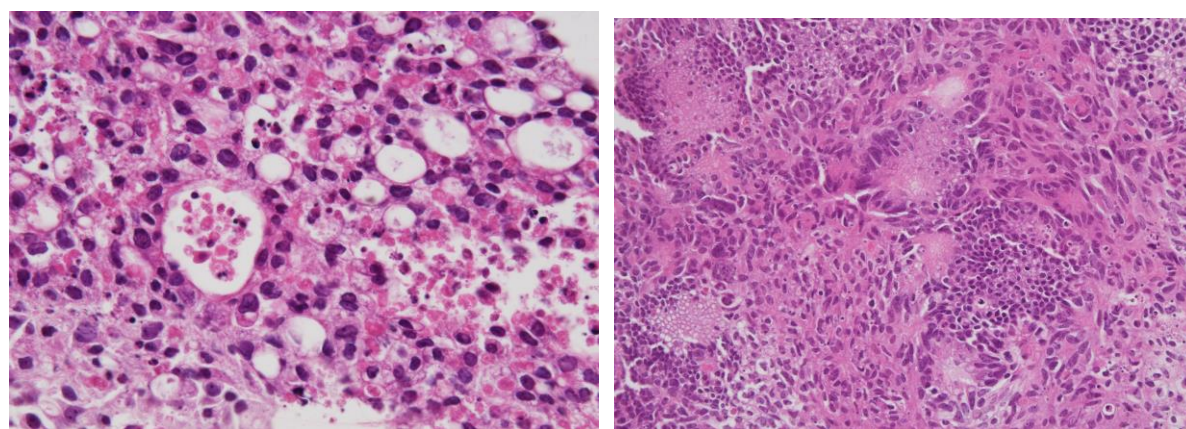


図5 3次元培養後の顕微鏡像(セルベッドの水平断面) 左:胃がん、右:大腸がん
生体の胃がんや大腸がんの特徴である腺腔(丸い穴のように見える)が確認できます。

形態だけでなく機能的にもがん組織に近い実験系であることの証明

1) 舌がん細胞を用いたメタボローム解析(代謝物の網羅的解析)

私たちの体を構成するすべての細胞は、生きるために必要なエネルギーや栄養のバランスを代謝という過程を通じて調節しています。正常細胞は、主にエネルギー産生{ATP(アデノシン三リン酸)を産生}をミトコンドリアの酸化的リン酸化に依存しています。しかし、増殖の盛んながん細胞では、ATPを産生するとともに、栄養素から自らの分身を作るために細胞の材料を生成する必要があり、代謝のリプログラミングが起こっていることが知られています。代謝のリプログラミングとは、がん細胞が過剰な栄養素を必要とし、それらに対し

て、適切かつ驚異的な適応を発揮するものです。我々は、4種類の舌がん細胞を用いて、従来からの2次元培養、新規3次元培養、免疫不全のマウスに移植し作製した移植片の3群で、網羅的な中心エネルギー代謝解析を行い、比較検討しました。尚、代謝解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社に委託しました。その結果、2次元培養と3次元培養では代謝物の値は大きく異なっており、3次元培養の代謝物の値の多くは移植片の代謝物の値と類似していました(図6～図8)。以上の結果から、2次元培養では生体とは異なる条件下で生き抜くために、単層培養特有の特殊な代謝が行われていることが示唆されました。また、3次元培養の代謝解析では、これまで報告されてきたがん代謝の理論に合った結果が得られました。

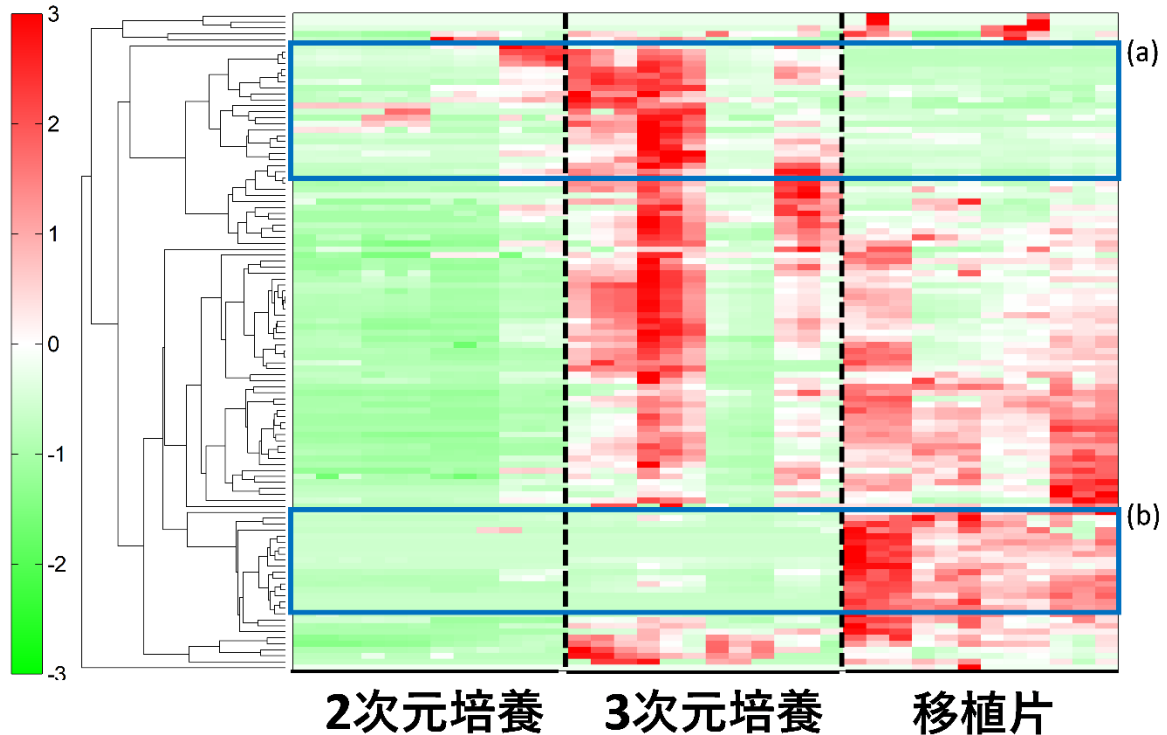


図6 舌がん細胞の培養条件による代謝物の比較

赤色が強い程、がん細胞内の代謝物の値が高く、緑色が強いほど代謝物の値が低いことを表しています。2次元培養では、全体として緑色となっており、代謝物の値が低いのに対して、(a)と(b)の部分で、3次元培養と移植片に違いはあるものの、それ以外では、3次元培養と移植片はともに代謝物の値が高く、少なくとも2次元培養と比較して、3次元培養にて増殖したがん細胞の方が生体に近いことが示唆されました。

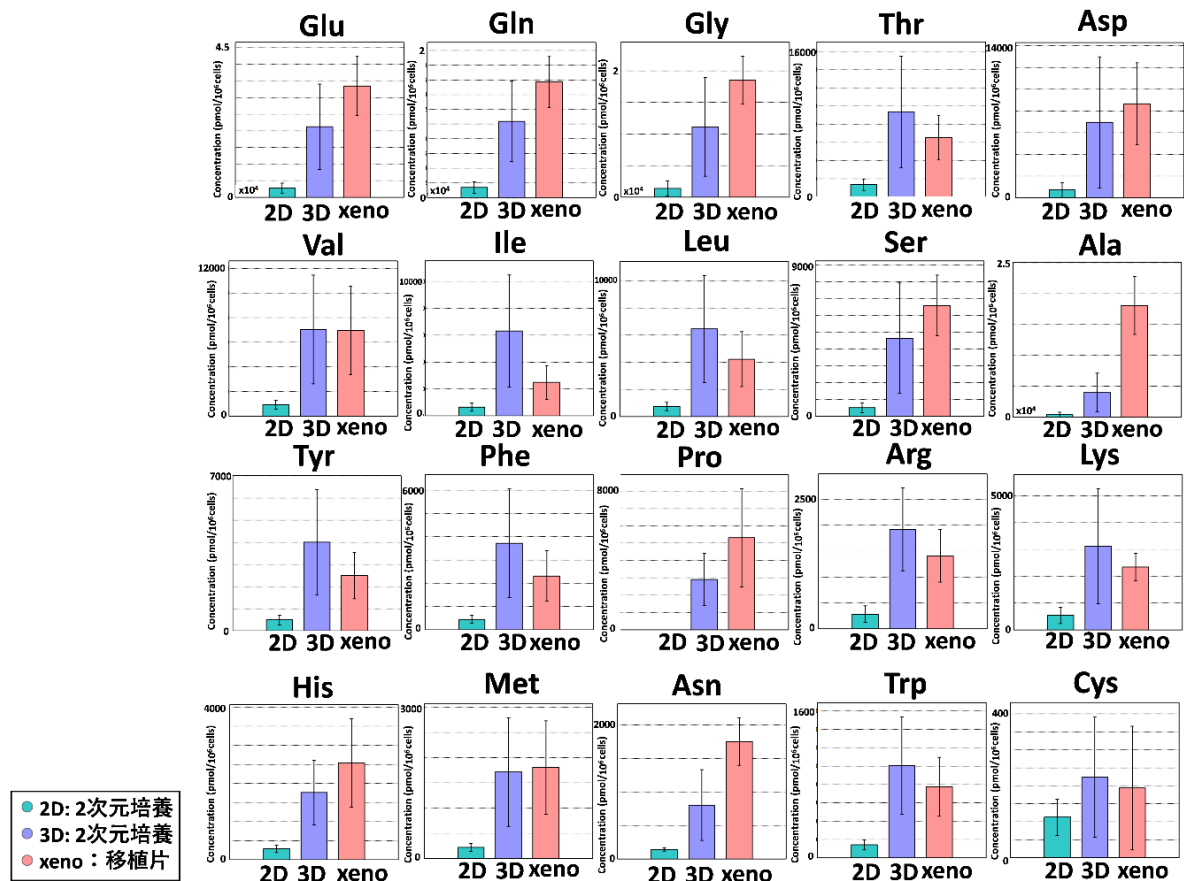


図7 舌がん細胞の培養条件による代謝物(必須アミノ酸)の比較

タンパク質を構成するアミノ酸は、3次元培養と移植片の値がともに高く、近い値を示しているのに対して、2次元培養では、他のグループと比較して非常に低い値になっていました。

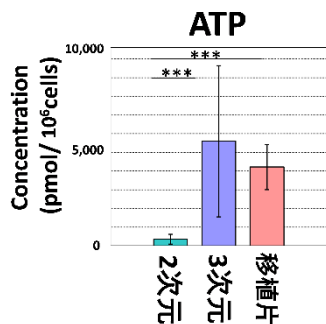


図8 舌がん細胞の培養条件によるATP値の比較

ATP(アデノシン三リン酸)は生命活動で利用されるエネルギーの貯蔵・利用にかかわります。「生体のエネルギー通貨」とも呼ばれています。ATPは、3次元培養と移植片の値がともに高く、2次元培養では、他のグループと比較して非常に低い値になっています。(***:p値<0.001)

II) 前立腺がんと膀胱がん細胞を用いたメタボローム解析

舌がん細胞だけでなく、前立腺がんと膀胱がん細胞を用いてメタボローム解析を行いました。その結果、舌がん細胞を用いた研究結果と同様に、2次元培養と比較して、3次元培養の方が非常に高い代謝活性を示しました(図9)。

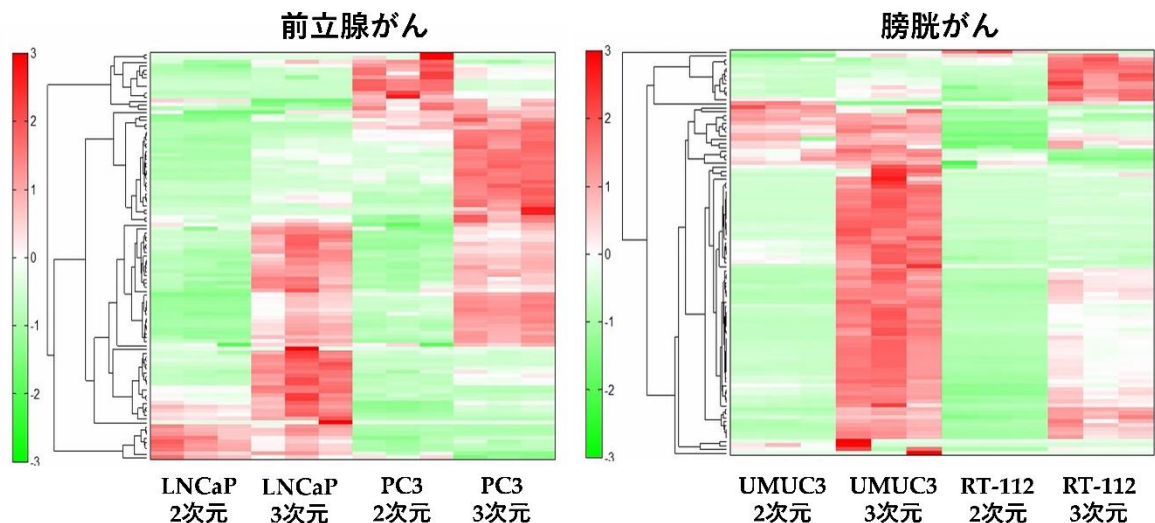


図9 前立腺がん細胞および膀胱がん細胞の培養条件による代謝物の比較

前立腺がん細胞2種類(LNCaPとPC3)および膀胱がん細胞2種類(UMUC3とRT-112)のメタボローム解析。赤色が強い程がん細胞内の代謝物の値が高く、緑色が強いほど代謝物の値が低い。2次元培養では、全体として緑色となっており、代謝物の値が低いのにに対して、3次元培養では代謝物の値が高いことが分かります。

今後の展望

抗がん剤開発などのがん研究を行うためには、簡便で対費用効果が高く、生体に近い実用的な実験モデルの開発が必要です。動物実験の前段階の実験モデルとして、従来からの2次元培養系があり、これには簡便で容易に使うことができるという利点がありますが、この実験系で得られた研究結果の多くは、前臨床段階で、十分な安全性や有効性を実証するのに失敗していると報告されています。2次元で薬剤耐性の実験を行い、生体で用いられる最終段階まで到達し、十分な有効性や安全性を実証できるのは、全ての臨床治療領域では約11%であり、特に腫瘍学領域ではわずか5%以下であるとの報告がなされています。我々のメタボローム解析の結果からも2次元培養と生体内のがん組織では、代謝が大きく異なることが明らかとなりました。この代謝の違いが、創薬研究において、薬剤の感受性に影響を与えている可能性があると考えています。

まとめ

生体のがん組織を形態的だけでなく、機能的にも再現している新規3次元培養法を確立しました。今後、我々が開発して新規3次元培養法である“Tissueoid cell culture system”(組織模倣型細胞培養システム)が活用され、様々ながんの病態解明や創薬をはじめとするがん研究の発展に寄与することが期待されます。

参考文献

Noi M, Mukaiho KI, Yoshida S, Murakami S, Koshinuma S, Adachi T, Machida Y, Yamori M, Nakayama T, Yamamoto G, Sugihara H. ERK phosphorylation functions in invadopodia formation in tongue cancer cells in a novel silicate fibre-based 3D cell culture system. *Int J Oral Sci.* 2018;10:30. doi: 10.1038/s41368-018-0033-y. PMID: 30344309

Murakami S, Mukaisho KI, Iwasa T, Kawabe M, Yoshida S, Taniura N, Nakayama T, Noi M, Yamamoto G, Sugihara H. Application of "Tissueoid Cell Culture System" Using a Silicate Fiber Scaffold for Cancer Research. *Pathobiology*. 2020;87:291–301. doi: 10.1159/000509133. Epub 2020 Sep 23. PMID: 32966983

Murakami S, Tanaka H, Nakayama T, Taniura N, Miyake T, Tani M, Kushima R, Yamamoto G, Sugihara H, Mukaisho KI. Similarities and differences in metabolites of tongue cancer cells among two- and three-dimensional cultures and xenografts. *Cancer Sci*. 2020 Nov 27. doi: 10.1111/cas.14749. Online ahead of print. PMID: 33244783

Ikari R, Mukaisho K, Kageyama S, Nagasawa M, Kubota S, Nakayama T, Murakami S, Taniura N, Tanaka H, Kushima R, Kawauchi A. Differences in the central energy metabolism of cancer cells between conventional 2D and novel 3D culture systems. *International Journal of Molecular Sciences* (in press)

研究資金情報

- ・日本学術振興会 科学研究費補助金(研究課題:20K16329, 研究代表者:村上翔子)
- ・滋賀医科大学 学長裁量経費研究助成(若手萌芽研究)(研究代表者:村上翔子)