



Double-Layered Collagen Gel Hemisphere for Cell Invasion Assay: Successful Visualization and Quantification of Cell Invasion Activity

高田, 昌彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-01-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2970

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002970>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	高田 昌彦
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 2022 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 1 月 9 日

【 学位論文題目 】

Double-Layered Collagen Gel Hemisphere for Cell Invasion Assay:Successful Visualization and Quantification of Cell Invasion Activity（2 層化コラーゲンゲル半球法による細胞浸潤能の測定－細胞浸潤能の視覚化と定量化）

審 査 委 員

主 査	教 授	横野 浩一
	教 授	南 博信
	教 授	横崎 宏

要旨

コラーゲンをういた細胞浸潤能の測定方法は、様々なものが報告されているが、より簡単で、客観的に評価できる測定方法の開発が求められている。我々は、細胞の浸潤能を、客観的かつ正確に評価できる簡便な測定方法「2層化コラーゲン半球法(DL-CGH)」を開発した。さらに、この方法により、細胞の浸潤における動きを視覚化することに成功した。

DL-CGH はコラーゲンでできた中心核と、それを包む、同じくコラーゲンでできた外層からなる。対象とする細胞を封入したコラーゲンのドロップをカルチャーディッシュに滴下すると、自然に半球を形成する。これを中心核とし、これを完全に覆うように別のコラーゲンドロップを滴下する。この2層の半球を培養することで、中心核から外層へ浸潤する細胞の動きを観察し、その浸潤能を評価することが可能となる。この方法を用いて、癌細胞の浸潤における E-cadherin の浸潤抑制効果を検討した。また、DL-CGH は癌細胞と間質細胞間の相互作用を観察することにも有用であった。コラーゲンでできている細胞外基質に直接浸潤するためのプロテアーゼを有さない癌細胞が、線維芽細胞の蛋白融解作用でできた基質間の間隙を通して、アメーバの様にすり抜けていく様子が観察することができた。

はじめに

癌細胞の浸潤能はその癌の悪性度と相関する。癌細胞の浸潤のメカニズムを理解し、それをコントロールすることにより、新しい癌の治療戦略が開発できる。

生きている組織の中で、動いている細胞を観察することは、細胞浸潤を研究する上で必要不可欠であるが、生体内で、ある特定の細胞の動きを観察することは困難である。そのため、細胞の運動を研究する中で、様々な *in vitro* の方法が採用されてきた。多くの実験系はその簡便さのため単層培養を採用してきたが、3次元培養のほうが生体の環境を再現するのにふさわしいと考えられる。このため最近では3次元培養モデルを採用した報告が増えてきている。

コラーゲン半球は浸潤能を測定する実験系として最も一般的に使われている。コラーゲンをういた浸潤能の検査方法として様々なものが報告されているが、より簡潔で、客観的に評価できる方法が望まれてきた。我々はこれらの条件を満たした、より簡便な方法を考案した。ここでは細胞の浸潤における運動を視覚化、定量化できる新しい実験系を報告する。

対象と方法

培養細胞：

肺癌細胞として PC3 (肺 中分化腺癌) と A549 (細気管支肺胞上皮癌：BAC)、間質との相互作用を観察するため WI-38 (線維芽細胞) を使用した。

2層コラーゲン半球 (DL-CGH) の作成：

酸可溶性コラーゲン I、10% ham's F12 培養液、再構成用バッファーを 8:1:1 の比率で混合し、さらに培養細胞を 1ml 中 3.0×10^6 個となるよう調整して加えた。こうしてできた細胞を含有したコラーゲン液 5 μ L (細胞 15,000 個含有) をプラスチックディッシュ上に滴下し、ゲル化したものを中心核とした。この中心核を完全に覆うように、細胞を含有していないコラーゲン液 30 μ L を滴下する。そうしてできた 2 層の半球を、培養液中で、培養した。2 種類の細胞の相互作用を観察する場合、それぞれの細胞を 7,500 個ずつ混合し、中心核とした。細胞をニュートラルレッドで染色の後、風乾を行った。

細胞の浸潤能の測定と数値化：

細胞浸潤能は、染色された 2 層化コラーゲンゲル半球(DL-CGH)の、赤く染色された細胞の広がり測定し、定量化を行った。染色、風乾された標本をデジタルカメラで撮影し、コンピュータに取り込む。染色された細胞が浸潤した領域は、画像解析ソフト上で自動的に選別され、その領域のピクセル数が計示される。これを浸潤能の測定値とした。

経時的動画撮影：

Motioncam 2000 デジタル顕微鏡システムを用いて細胞浸潤の動画撮影を行った。カメラヘッドを倒立顕微鏡の接眼レンズ部に装着し、顕微鏡ごと 37℃、5%炭酸ガス培養機の中に入れて培養を行った。細胞を 10 倍の対物レンズを用いて顕微鏡下に観察した。カメラコンピュータで制御され、D-L CGH 作成後 24 時間経過してから 96 時間まで、20 分ごとに撮影を行った。計 288 枚の画像が撮影され、これらを 30 秒間の動画に構成した。

Matrix Metalloproteinase(MMP)の抑制：

MMP を抑制する阻害剤(MMPi)として N- [(2R)- 2- (hydroxamido carbonylmethyl)-4-methylpentanoyl]-L-tryptophan methlamide (Cal-biochem, Merck Bioscience)を使用した。これをそれぞれ 0.5 μ M から 5 μ M の濃度で、PC-3 を封入した DL-CGH の培養液に添加し、その効果を比較した。ネガティブコントロールとして N-t-butoxycarbonyl- L-leucil-L-tryptophan methlamide (Cal-biochem)を使用した。2 種類とも 7 日間の培養の後、ニュートラルレッドで染色した。

PC-3 における細胞間接着因子 (CD44、E-Cadherin) の影響：

細胞間接着因子に対する RNA 干渉実験(RNAi)を、CD44 と E-cadherin に対する siRNA と、非特異的 siRNA を用いて行った。それぞれの siRNA で PC3 にトランスフェクションを行い、培養の後、それぞれの DL-CGH を作成した。

A549 の緑色蛍光色素蛋白質 (GFP) による標識：

A549 を pAcGFP1-Actin を用いてトランスフェクションし、GFP による標識を行った。この標識された細胞を用いて DL-CGH を作成した。

経時的動画撮影・通常光撮影と蛍光撮影の合成：

炭酸ガス培養室をもった蛍光顕微鏡 AZ8000 を用いて、上記の標識された A549 に対し、通常撮影と蛍光撮影を行った。培養開始後 24 時間から撮影を開始し、96 時間まで撮影を行った。通常光撮影と蛍光撮影は同時に 20 分ごとに行い、上記と同様に 30 秒間の動画を作成した。

統計解析：

統計的有意差は unpaired Student's t-test で検討した。全ての検定は SPSS 14.0 統計解析ソフト (SPSS Japan) を用いた。

結果

2 層化コラーゲンゲル半球 (DL-CGH) を用いた細胞浸潤能測定：

前述の対象と方法の項で述べたように、中心核に PC-3 と A549 を封入した、2 種類の 2 層化コラーゲンゲル半球(DL-CGH)を作成した(Fig.1)。それぞれ 7 日間の培養を行い、ニュートラルレッドを用いて染色した。細胞の浸潤能を、染色された細胞の、コラーゲンゲル外層への広がりを測定する事で評価した(Fig.2)。PC-3 は外層へ広く広がっていった(染色領域 94,457pixels)。一方 A549 は、ほとんど外層への浸潤を示さなかった(5,273pixels)。外層への染色領域の広がりが細胞浸潤によるものかどうか、MMPi とネガティブコントロールを用いて確認した。PC3 の単層培養において、MMPi が細胞の分裂能に影響を与えないことを確認している。MMPi の濃度を上げていくにしたがって、外層への染色された領域の広がりは減少していった(Fig.3)。

癌細胞の浸潤能における、ノックダウンされた細胞間接着因子の影響：

癌細胞において細胞間接着因子の機能不全をしばしば認めることができる。E-cadherin の発現抑制が癌の悪性度(浸潤や転移)と強く相関していることが報告されている。また腫瘍の転移に必要なとされる細胞膜表面レセプター CD44 の発現が細胞間の接着や浸潤に重要な働きを持っていることも報告されている。

我々はこれらの細胞間接着分子の細胞浸潤における働きについて in vitro で調べるため、DL-CGH 法を使用した。E-cadherin と CD44 の発現を特異

的に抑制する siRNA を用いて PC3 にトランスフェクションを行った。E-cadherin と CD44 の発現はウェスタンブロッティングで確認し、発現量が非接触群やコントロール siRNA で処理した群と比較して、50%未満に抑制されていた。

このように、トランスフェクションされた細胞を DL-CGH の中核へ封入し、4 日間培養の後、浸潤能を検討した(Fig.4A(a-f))。それぞれの DL-CGH を 6 サンプルずつ作り、染色領域のピクセル数を測定、それらの平均と標準偏差を計算した。コントロール群、CD44 RNAi 群と比較し、E-cadherin RNAi 群の浸潤範囲は有意に増大していた(Fig.4B)。このように E-cadherin も CD44 も siRNA で発現を抑えられたが、E-cadherin の発現が抑えられた群だけ浸潤能の活性化を示した。このことは癌細胞において、E-cadherin の発現抑制が、癌の浸潤と相関しているという臨床報告と一致している。

浸潤における癌細胞と間質細胞の相互作用：

A549 と WI-38 を混合し、DL-CGH の中核に封入し、通常通り培養を行い、倒立顕微鏡下で観察を行った。線維芽細胞がまず外層へ侵入し、癌細胞はその線維芽細胞が作った道の上を追いかけて進んでいくように見えた(Fig. 5(a-c))。

一方 A549 を中核に、WI-38 細胞を外層へ封入した DL-CGH を作成し、培養を行った。A549 が、外層にある線維芽細胞のネットワークに導かれるよう、突き進んでいく様子が観察された(Fig. 5 (d-f))。これらの A549 の動きは GFP で標識された画像でより鮮明に確認することができた。通常撮影と蛍光撮影を合成した動画において、蛍光標識された A549 がアメーバのように姿を変えつつ、素早く線維芽細胞の表面を伝っていく様子が見て取れた。12 時間にわたり、標識された細胞が、線維芽細胞の表面上の約 50 μ m の距離を動いている(Fig. 8)。これらの映像から、単独では外層へ侵入できない BAC 細胞が、先に侵入していた線維芽細胞に導かれるように、広がっていく様子がはっきりと見て取れる(Fig.2(c-d))。

考察

細胞浸潤能の研究として多くの独創的な方法が報告されている。中でもマトリジェルを用いたボイデンチャンパーが、細胞浸潤能の評価において多く使われている。その他にも、多層のコラーゲンゲルを、プレート上で水平に並べる培養方法が、皮膚がんの浸潤モデルとして報告されている。しかしこの方法では、浸潤能を客観的に評価することはできても、浸潤していく様子

を観察することは困難であった。3 次元培養における細胞の動画は、その浸潤に関してより詳細な情報を与えてくれる。Demou と McIntire は 3 次元培養下に細胞の動きを追跡できるシステムを発表し、細胞浸潤のプロセスを報告している。また Del Werbowetski らは 2004 年に培養器の天井に付着したコラーゲンの滴の中で培養された細胞塊を、さらにコラーゲンゲルの中に移植する培養方法を用いて、細胞浸潤の様子を動画に撮影することに成功した。一方、顕微鏡で直接観察する方法としては、2005 年 Duong らが 2 枚のガラスに挟まれた厚さ 2mm のコラーゲンゲルの中で細胞を培養する、3 次元培養における細胞浸潤モデルを報告している。

DL-CGH は上に述べた様々な方法のコンセプトをさらに発展させたものである。その特徴の一つとして、手法の簡潔さが挙げられる。2 種類のコラーゲンゲルを普通の培養ディッシュ上に滴下するだけである。次に普通の倒立顕微鏡を用いて 3 次元培養における細胞浸潤の様子を、明瞭に観察できることが挙げられる。最後に浸潤能の評価を、染色された細胞の広がり測定することで、容易に行うことができる点である。

DL-CGH は細胞浸潤能検査として、その簡潔さから、さらなる臨床応用に発展させることが可能であると考えられる。ある特定の培養細胞を封入した中心核を複数作ること、まったく同じ条件の DL-CGH を複数作ることができる。これにより、複数の薬剤の細胞浸潤に与える影響について、比較、検討することが可能である。また多数の RNAi を用いることで、癌の浸潤に対する分子標的学的なスクリーニングを行うことが可能となる。

臨床的に、非小細胞肺癌の一つ、細気管支肺上皮癌(BAC)において、癌細胞が肺胞内皮のみに広がり、間質へは浸潤しないタイプの予後は良好で、一方、線維芽細胞が活発に増殖しているタイプの予後は不良であることが報告されている。後者の場合、しばしば癌細胞が微小血管へ浸潤していることが認められる。Tokumou らは 2001 年に、BAC の浸潤様式において癌と間質の相互作用が関与していると報告している。Kanomata らは 2005 年に BAC の浸潤の初期において、間質中の線維芽細胞が、MMP の供給源であることを報告している。我々の実験でも、A549 の浸潤には、線維芽細胞が必要であったが、これは上記の BAC に関する臨床的な報告と一致する。

この様に、ある種の癌細胞は、浸潤する際、間質の細胞を必要とすると考えられる。Wolf らは 2003 年にプロテアーゼを必要とする細胞の移動について報告している。A549 はプロテアーゼを産生することができないが、線維芽細胞が産生するプロテアーゼを利用して、移動できるようになる。我々の実験では GFP で標識された A549 が、線維芽細胞の上を、アメーバのようにその形を変えながら動いていく様子が明瞭に観察できた。

結語

DL-CGH は、癌の浸潤を研究する上で、簡便かつ客観的な評価が可能な、3 次元培養方法である。さらにこの方法は、新しい抗がん剤の開発に応用することが可能と考えた。DL-CGH を使うことで、腫瘍細胞をとりまく、微小な環境を正確に再現し、間質における癌細胞のアメーバ状運動を撮影することができた。われわれは DL-CGH が、細胞間の相互作用における研究に有用な方法であると考えている。

図表解説

Figure 1 2 層化コラーゲンゲル半球(DL-CGH)の構造

Figure 2 DL-CGH における 7 日間培養後の細胞の分布状態

- (a)(d) 染色前の DL-CGH の底面、倒立顕微鏡像 (倍率 5 倍)
- (b)(e) 染色後,DL-CGH は倍率 1.5 倍の拡大鏡下に 800×600pixel の JPEG ファイルとして、撮影される。
- (c) (f) 染色された細胞が浸潤した領域は、画像解析ソフト上で自動的に選別され、
(青い線で) 縁取られる。この領域内の pixel 数を計測する。黄色の円で示してある内層 (中核) は 4.5×10^4 pixel で、外層への浸潤量を計測するとき、これを除外する。つまり(c); PC3 の外層への浸潤量は 94,957 pixels であるのに対し、(d); A549 の浸潤量は 5,273 pixels に過ぎなかった。

Figure 3 MMP inhibitor (MMPi)との接触:

N- [(2R) - 2- (hydroxamido carbonylmethyl) - 4-methylpentanoyl] - L - tryptophan methylamide と接触させた PC3 細胞は、その濃度依存性に浸潤能が抑制されていく。
(MMPi 5-nM ではコントロールに比較し、染色範囲が 16.9%減少し、5 μ M では 92.7%減少した。) 一方コントロール群は浸潤能が抑制されなかった。

Figure 4 がん細胞の浸潤能における、細胞間接着因子のダウンレギュレーションによる効果

siRNA で 24 時間トランスフェクションされた細胞を DL-CGH の中核に入れる。
浸潤能は赤く染色された領域の広がり を計測する事で、定量化される。

- (A); (a)(b)非特異的 siRNA で処理された群、
- (c)(d)CD44 に対する siRNA で処理された群、
- (e)(f)E-cadherin に対する siRNA で処理された群

- (b)(d)(f); 赤く染色された領域の外周を、画像解析ソフトを用いて青い線で示す。中核の領域 (4.5×10^4 pixels; 黄色い円) は、外層へ広がって行った領域を計測するとき、除外する。それぞれの領域の pixel 数を測定する。

(B);浸潤領域の pixel 数; ヒストグラム

(それぞれの群を 6 サンプルずつ作成し、それらの浸潤領域の pixel 数の平均と標準偏差)

コントロール : 13,625 \pm 2,826

CD44-RNAi : 13,113 \pm 3,186

E-cadherin-RNAi : 26,593 \pm 4,076

コントロール群と E-cadherin-RNAi 群との間には、CD44RNAi 群との間との様に有意差を認めた。(p<0.001; student's t-test)

Figure 5

- (a)(b) ; A549 (癌細胞) と WI-38 (線維芽細胞) との混合培養: WI-38 は DL-CGH の外層に広く広がって行き、A549 はその跡をついていく。
- (c)(d) ; A549 と WI-38 を中核と外層に分けて培養した。A549 細胞は、外層の WI-38 が作ったネットワークの中に分散して行った。
- (a)(c) ; DL-CGH の底部の映像: 風乾前に倒立顕微鏡下で撮影 (倍率 5 倍)
- (b)(d) ; 風乾後、1.5 倍に拡大した映像: 外層への細胞浸潤を評価できる。

Figure 6 中核に 7,500 個の A549 細胞 (GFP で標識;20%発現) と外層に 7,500 個の WI-38 細胞を入れた DL-CGH の映像 通常撮影と、蛍光撮影を別々に行い、合成した。12 時間で標識された細胞 (矢印) は線維芽細胞 (WI-38 細胞) の表面を約 50 μ m 移動した。(a)培養開始 80 時間後、(b)92 時間後。経時的に撮影した動画では、A549 細胞は線維芽細胞 (WI-38 細胞) の表面に沿って移動していく様子が見て取れる。

Figure 1

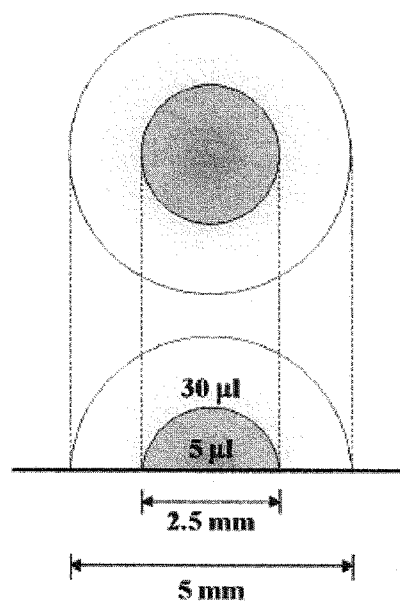


Figure 2

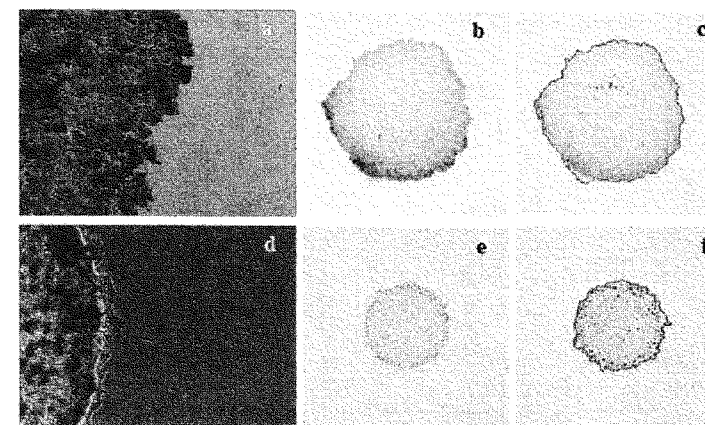


Figure 3

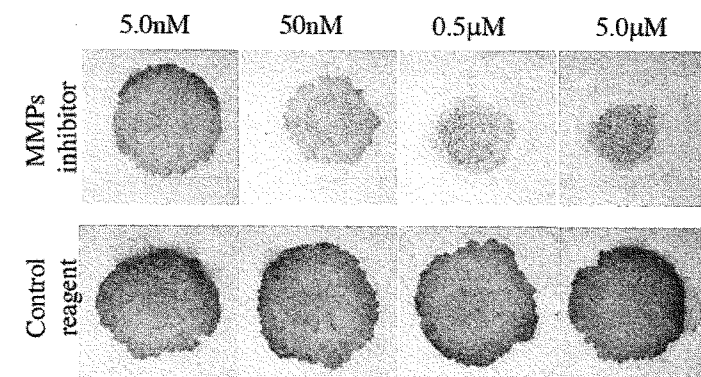


Figure 4

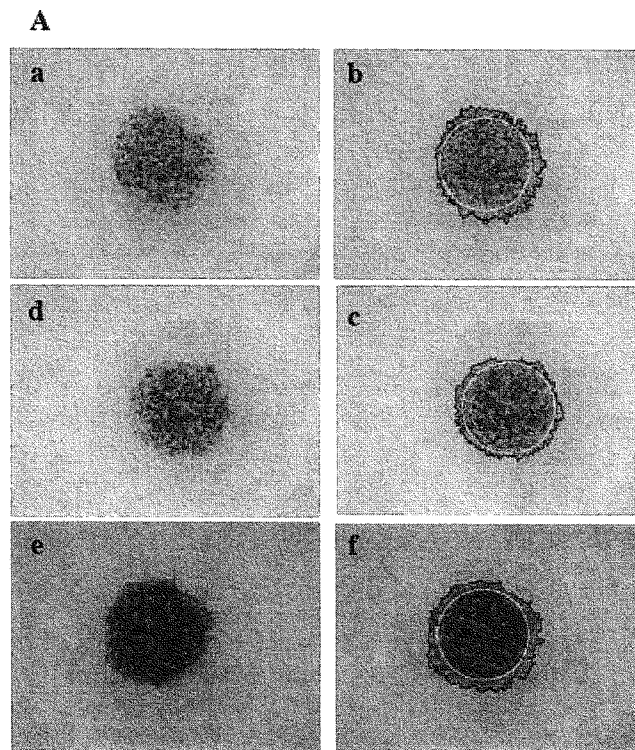


Figure 4

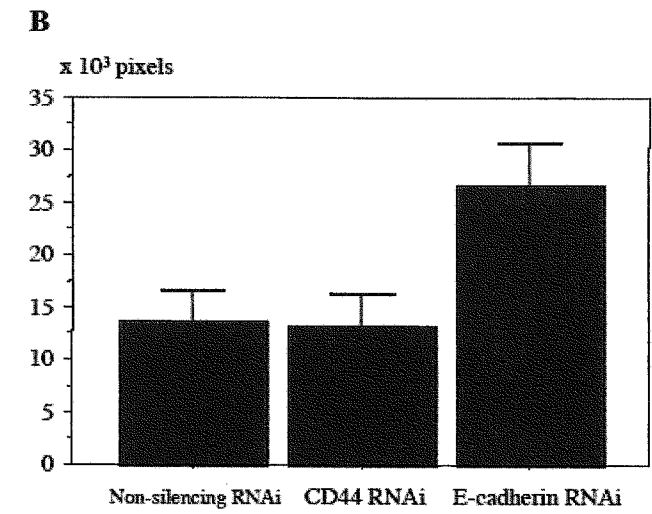


Figure 5

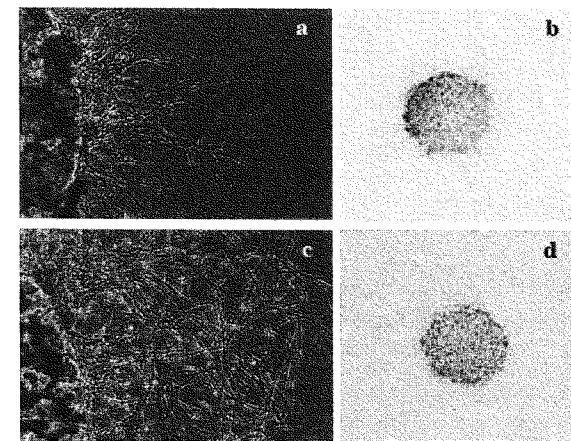
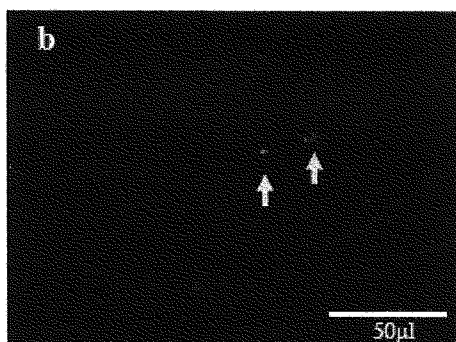
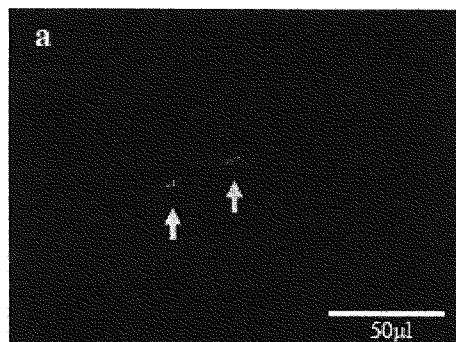


Figure 6



論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第2024号	氏 名	高田 昌彦
論文題目 Title of Dissertation	Double-Layered Collagen Gel Hemisphere for Cell Invasion Assay: Successful Visualization and Quantification of Cell Invasion Activity 2層化コラーゲンゲル半球法による細胞浸潤能の測定 -細胞浸潤能の視覚化と定量化		
審査委員 Examiner	主 査 横野 浩一 Chief Examiner 副 査 南 博信 Vice-examiner 副 査 横 崎 亮 Vice-examiner		
審査修了日	平成 19 年 12 月 19 日		

（要旨は 1,000 字～2,000 字程度）

癌細胞の浸潤能はその癌の悪性度と相関する。癌細胞の浸潤のメカニズムを理解しそれをコントロールすることにより、新しい癌の治療戦略が開発できる。生きている組織の中で、動いている細胞を観察することは、細胞浸潤を研究する上で必要不可欠であるが、生体内である特定の細胞の動きを観察することは困難である。そのため細胞の運動を研究する中で、様々な in vitro の方法が採用されてきた。多くの実験系はその簡便さのため単層培養を採用してきたが、3次元培養のほうが生体の環境を再現するのにふさわしいと考えられる。このため最近では3次元培養モデルを採用した報告が増えてきている。
コラーゲングルは浸潤能を測定する実験系として最も一般的に使われている。コラーゲングルを用いた浸潤能の検査方法として様々なものが報告されている、より簡潔で、客観的に評価できる方法が望まれてきた。今回、研究者はこれらの条件を満たしたより簡便な方法を考案した。ここでは細胞の浸潤における運動を視覚化、定量化できる新しい実験系を報告している。
その方法として培養細胞に肺癌細胞として PC3（肺中分化腺癌）と A549（細気管支肺胞上皮癌：BAC）、間質との相互作用を観察するため WI-38（線維芽細胞）を使用した。2層コラーゲングル半球（DL-CGH）の作成のため酸可溶性コラーゲン I、10%ham's F12 培養液、再構成用バッファーを 8:1:1 の比率で混合し、らに培養細胞を 1ml 中 3.0×10^6 個となるよう調整して加えた。こうしてできた細胞を含有したコラーゲン液 $5\mu\text{L}$ （細胞 15,000 個含有）をプラスチックデッシュ上に滴下し、ゲル化したものを中心核とした。この中心核を完全に覆うように、細胞を含有していないコラーゲン液 $30\mu\text{L}$ を滴下する。そうしてできた 2 層の半球を、培養液中で、培養した。2 種類の細胞の相互作用を観察する場合、それぞれの細胞を 7,500 個ずつ混合し、中心核とした。細胞をニュートラルレッドで染色の後、風乾を行った。細胞浸潤能は、染色された 2 層化コラーゲングル半球(DL-CGH)の、赤く染色された細胞の広がりを目視し、定量化を行った。染色、

風乾された標本をデジタルカメラで撮影しコンピュータに取り込むと、染色された細胞が浸潤した領域は画像解析ソフト上で自動的に選別され、その領域のピクセル数が計測される。これを浸潤能の測定値とした。また経時的動画撮影のための工夫も行った。
結果として、中心核に PC-3 と A549 を封入した 2 種類の 2 層化コラーゲングル半球(DL-CGH)を作成し、それぞれ 7 日間の培養を行いニュートラルレッドを用いて染色した。細胞の浸潤能を、染色された細胞の、コラーゲングル外層への広がりを目視し、定量化した。PC-3 は外層へ広く広がっていたが、A549 はほとんど外層への浸潤を示さなかった。外層への染色領域の広がりには Matrix metalloproteinase(MMP)阻害剤の濃度を上げていくにしたがって減少していった。癌細胞において細胞間接着因子の機能不全をしばしば認めることができる。
E-cadherin の発現抑制が癌の悪性度（浸潤や転移）と強く相関していることが報告されている。また腫瘍の転移に必要なとされる細胞膜表面レセプター CD44 の発現が細胞間の接着や浸潤に重要な働きを持っていることも報告されている。研究者はこれらの細胞間接着分子の細胞浸潤における働きについて in vitro で調べるため、DL-CGH 法を使用した。E-cadherin と CD44 の発現を特異的に抑制する siRNA を用いて PC3 にトランスフェクションを行った。その結果、コントロール群、CD44 RNAi 群と比較し、E-cadherin RNAi 群の浸潤範囲は有意に増大していた。このことは癌細胞において、E-cadherin の発現抑制が、癌の浸潤と相関しているという臨床報告と一致している。
最後に浸潤における癌細胞と間質細胞の相互作用を検索するため、A549 と WI-38 を混合し DL-CGH の中核に封入し、通常通り培養を行い倒立顕微鏡下で観察を行った。線維芽細胞がまず外層へ侵入し、癌細胞はその線維芽細胞が作った道の上を追いかけて進んでいくように見えた。さらに通常撮影と蛍光撮影を合成した動画において、蛍光標識された A549 がアメーバのように姿を変えつつ、素

早く線維芽細胞の表面を伝っていく様子が見て取れた。

以上のように、本研究は癌細胞が浸潤する過程において、癌細胞の特性や細胞間接着分子機能の重要性について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった癌細胞の浸潤能を DL-CGH 法を用いて視覚化かつ定量化したものであり、癌の浸潤を研究する上で、簡便かつ客観的な評価法を確立したものであると評価ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。

早く線維芽細胞の表面を伝っていく様子が見て取れた。

以上のように、本研究は癌細胞が浸潤する過程において、癌細胞の特性や細胞間接着分子機能の重要性について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった癌細胞の浸潤能を DL-CGH 法を用いて視覚化かつ定量化したものであり、癌の浸潤を研究する上で、簡便かつ客観的な評価法を確立したものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。