

# 異種細胞間作用評価インターフェイスとしての細胞アレイ

本多 裕之

## はじめに

生体組織の構造を模倣して、再構築し、生体機能を発現させることは、生命の理解に重要である。細胞は、生体内で単独で存在しているわけではなく、周辺細胞との情報交換を通して自己を確立し、精密に制御された状況下で機能発現し、生体の恒常性の維持に関与していると信じられている。そうであるなら、培養器の表面で、生体組織に近い構造を構築し、細胞を配置して評価するプラットフォームの確立はきわめて重要であろう。

磁気および磁性粒子は、近年の医療や細胞組織工学の分野で広く応用されている<sup>1-4)</sup>。しかし、生体内組織を模倣した*in vitro*培養モデルや、がんなどの重大な疾病における疾患組織モデルの開発<sup>5)</sup>は十分でなく、生体内をまったく模倣できていないプラスチック製容器で細胞培養が試みられている<sup>6)</sup>。

そこで筆者らは、マグネタイト磁性ナノ粒子であるマグネタイトをリポソームで包埋したmagnetite cationic liposome (MCL)<sup>2)</sup>と剣山状鉄製デバイス<sup>4)</sup>を使用し、磁性ラベル化した細胞を外部磁場にてコラーゲンゲル中に3次元的に任意の形状にパターンニングする磁気細胞パターンニング法を開発した<sup>7)</sup>。MCLの物性は細胞に対する親和性が非常に高く、細胞当たり100万個もの粒子が取り込まれ、外部磁界で容易に磁気誘導でき、細胞をアレイ上に配置できる。本稿では、筆者らが進めている細胞アレイによる3次元組織培養と異種細胞との共培養に

よる細胞機能評価法について、最新のデータも含めて紹介する。

## 実験方法

磁気細胞パターンニングのための磁性微粒子は、平均粒子径が10 nmのマグネタイト ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) 微粒子 (戸田工業製水分散マグネタイト) を用いた。この磁性微粒子溶液を脱イオン水で10 mg/mlに調整し、リン脂質を加えてボルテックス攪拌および超音波処理することで、磁性微粒子がリポソームに包み込まれたMCLを作製した。リン脂質として中性脂質であるDLPC (dilauroyl phosphatidylcholine), DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine), および正電荷脂質であるTMAG (*N*-( $\alpha$ -trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride) を用いた (図1A)。

モデルがん細胞としてマウスのメラノーマであるB16F1細胞、モデル血管内皮細胞として正常ヒト臍帯静脈内皮細胞であるHUVECを用いた。上記MCLをマグネタイト重量換算で終濃度100 pg-magnetite/cellにて細胞培養液に添加し、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーターにて2時間置くことで、細胞に磁性微粒子を取り込ませた (磁気ラベル化)。次いで、各細胞を追跡するためにB16F1細胞を蛍光染色試薬CellTracker Greenにて緑色、HUVECをCellTracker Orangeにて橙色に蛍光標識した<sup>9)</sup>。

共培養環境の構築として、生体基底膜成分であるマトリゲルをコートした培養容器に、上記の橙色蛍光標識し

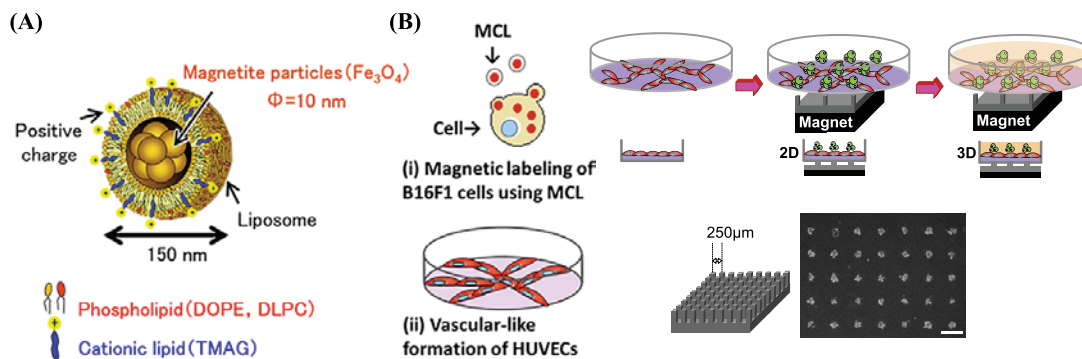


図1. 磁気ラベルと剣山デバイスを用いた細胞アレイ作製法. (A) MCLの構造, (B) HUVECネットワーク上への磁気ラベル細胞の配置法.

著者紹介 名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻 (教授) E-mail: honda@nubio.nagoya-u.ac.jp

たHUVECを播種して血管様ネットワークを形成させた(図1B)。次いで、ネオジム磁石(表面磁束密度400 mT)と自作の鉄製剣山状デバイス(電磁軟磁性、表面をワイヤー放電加工で切削し100 μm × 100 μm × 300 μmの四角柱のピラーを1 cm角に1600本作製)を用いた磁気細胞パターンニング技術を利用して、緑色蛍光標識したB16F1細胞をネットワーク層の上にアレイ状に配置した。30分磁気誘導した後に磁石と鉄製剣山状デバイスを外し、細胞アレイにI型コラーゲンゲルを加え、細胞をゲル内に埋包するとともに、生体内に近い3次元的な培養を行った。

### 実験結果および考察

#### 磁気細胞パターンニングによるスフェロイド培養

まず、MCLを用いた磁気ラベル化による細胞への影響を評価した。B16F1細胞、HUVEC細胞、MDA-MB-231(ヒト乳がん細胞)、GCIY(ヒト胃がん細胞)に対して100 pg-magnetite/cellのMCLで磁気ラベル化を行い、各磁気ラベル化細胞の増殖を未処理の細胞の増殖と比較した。MCLの取込み量を評価したところ、HUVECは9 pg/cellであったが、B16F1細胞とMDA-MB-231細胞は15 pg/cell、GCIY細胞は22 pg/cellを示し、100万~200万粒子程度のMCLの取込みを確認した。MCLの取込みに伴う細胞増殖の変化は見られず、磁気ラベル化による細胞への影響は小さいことがわかった。

磁気細胞パターンニング法を用いて、B16F1細胞を磁気誘導にてアレイ状配置して培養した。B16F1細胞の播種細胞数や鉄製剣山状デバイスのピンの幅をデザインすることで、任意の細胞数や間隔のアレイを作製することができた。また、一般的なプラスチック製容器で培養したB16F1細胞は、生体内と異なる平面的な形態を示したが、本手法を用いた3次元アレイ化環境ではB16F1細胞は生体内でみられるスフェロイド形態を示した(図2)。それに加えて、本手法ではメラノーマ細胞の特徴であるメラニン生産による細胞の黒化が観察されたが、プラスチック製容器での培養では観察されなかった。

#### がん細胞の血管内皮ネットワークへの浸潤能評価

次に、血管様ネットワークを形成させたHUVECの上へB16F1細胞をパターンニングし、B16F1細胞の浸潤能を評価した。B16F1細胞を緑、HUVECは橙と、別の色の蛍光試薬で染色しておき、B16F1細胞を継続的に蛍光観察することで動的な浸潤性挙動を観察し続けた。

B16F1細胞の単独培養では、丸いスフェロイドを形成しながら拡大増殖するだけで、大きな伸展や浸潤性挙

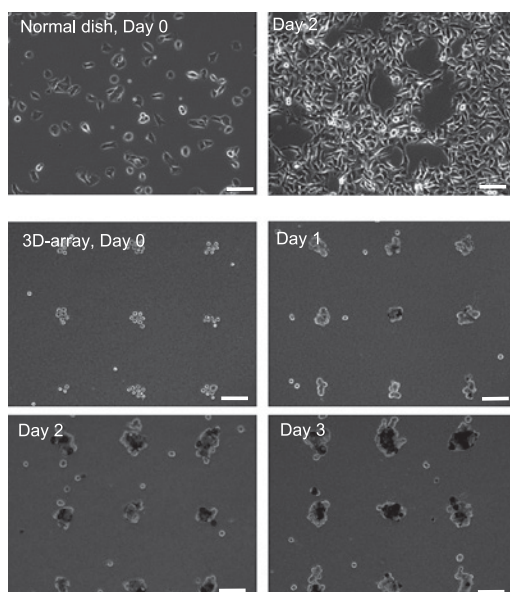


図2. 通常培養と3D培養におけるB16F1細胞の細胞形態. スケールバー: 100 μm.

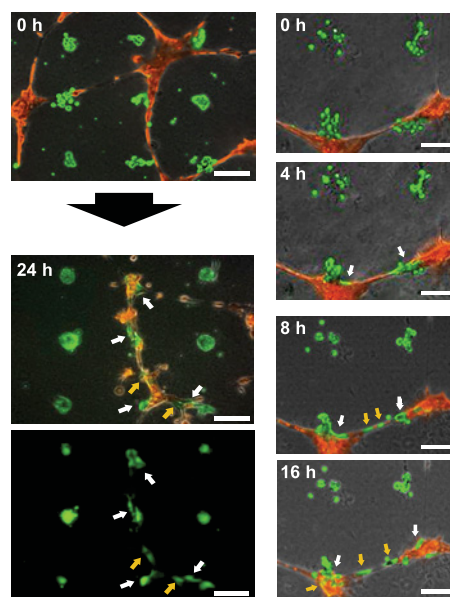


図3. HUVECとの共培養におけるB16F1細胞の血管様構造への浸潤. スケールバー: 100 μm.

動は見られなかった。一方HUVECネットワークとの共培養では、ネットワークに沿ってB16F1細胞が大きく伸展し、悪性度のもととなる浸潤性挙動が明らかに活性化した(図3)。また、B16F1細胞を連続的に観察したところ、HUVECから遠いものは固まって丸いままだが、HUVEC近傍にいたものは大きく伸展しており、細胞間の距離によって浸潤能が変化することが判明した。

この挙動変化を定量的に表現するために、細胞の浸潤性を表す各スフェロイドの長さをHUVECからの距離ご

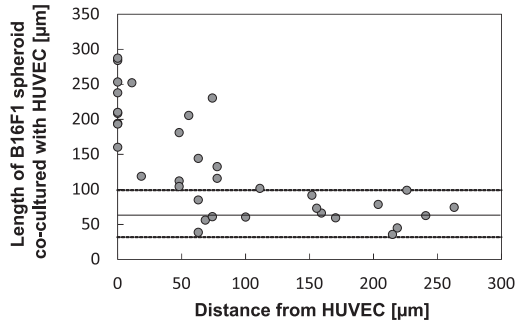


図4. HUVECとの共培養におけるB16F1スフェロイドの伸長

とに比較した。スフェロイドが長く伸展するほど、浸潤度も高くなる。スフェロイドの長さやHUVECからの距離は、B16F1細胞の蛍光写真から画像解析にて測定した。その結果、B16F1細胞はHUVECとある一定の距離(約80 μm)以上接近すると、浸潤度が急激に増加することが判明した(図4)。

また、上記の挙動変化がB16F1細胞とHUVECの共培養に特異的な現象でないことを確認するため、他の正常細胞との共培養した際の挙動解析も行った。正常細胞には、血管内皮細胞と同様にがん細胞の浸潤転移を促進すると報告されている線維芽細胞(NHDF)を用いた。NHDF細胞は、HUVECのように自発的にネットワークを形成しないので、共培養の条件を揃えるために、磁気細胞パターンング法を用いてNHDF細胞をライン状に配置した後にB16F1細胞と共培養した。その結果、B16F1細胞はHUVECとの共培養時と同じく、NHDF細胞のラインに向かって浸潤した。しかし、HUVECとの共培養時ほど活発な浸潤を示さなかった。

#### 遺伝子発現によるがん細胞の悪性度評価

さらに、浸潤性挙動に伴うB16F1細胞の悪性度の変化を、遺伝子発現の側面からも評価した。浸潤度が変化したB16F1スフェロイドをマイクロマニピレーターで直接捕捉回収し、細胞を溶解後、悪性度に関連する3種の遺伝子発現量をRT-PCR法にて評価した。測定した遺伝子は、炎症を起こして浸潤転移を促進するIL-6、基底膜を分解して転移のための細胞の通り道を作るMMP-9、薬剤耐性を上げるMDR-1である。

マイクロマニピレーターを用いて標的としたスフェロイドのみを直接回収し、回収したB16F1スフェロイドの遺伝子発現量を解析したところ、HUVECとの共培養によって、各発現が増加するだけでなく、B16F1が

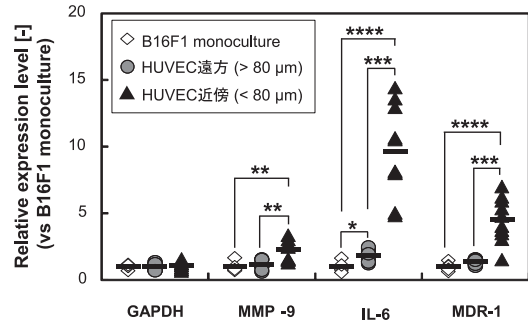


図5. HUVEC近傍および遠方のB16F1スフェロイドの遺伝子発現

HUVECへ接近するほど増加することを発見した(図5)。また、これらの遺伝子発現が増加し始める距離は、上記の浸潤性挙動が活発化する距離80 μmと非常に近かった。したがって、悪性化遺伝子の発現と浸潤性挙動は、関連し合いながら血管に接近するとともにがん細胞を悪化させていく可能性が垣間見えた。このようながん細胞と異種細胞との相互作用に伴う空間的な遺伝子発現の変化はあまり知られておらず、がんの治療や、悪性化のメカニズム解明、浸潤転移を標的とする抗癌剤の開発において、本手法が重要なツールとなるだろうと筆者らは期待している。

#### おわりに

がん細胞と血管内皮細胞の相互作用は深く研究されている。一方で、その細胞間距離に関しては定量的な評価技術は確立されていない。筆者らの細胞アレイ技術で初めて80 μmという距離で細胞の機能が大きく変化することがわかった。細胞接着という表面現象だけにとどまらず細胞間距離の議論に一石を投じることができれば幸いである。

#### 文 献

- 1) van der Zee, J.: *Ann. Oncol.*, **13**, 1173 (2002).
- 2) Ito, A. *et al.*: *Nanomedicine (Lond.)*, **8**, 891 (2013).
- 3) Chorny, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8346 (2010).
- 4) Okochi, M. *et al.*: *Biotechnol. Prog.*, **29**, 135 (2013).
- 5) Fennema, E. *et al.*: *Trends Biotechnol.*, **31**: 108 (2013).
- 6) Zervantonakis, I. K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13515 (2012).
- 7) Yamamoto, S. *et al.*: *PLoS One*, **9**, e103502 (2014).