

## 脱細胞化ゲルによる新規培養系の確立

◎小野拓也、野口玲、吉松有紀、申育實、清茜、土屋流人、近藤格  
国立がん研究センター研究所 希少がん研究分野

がんを取り巻く微小環境が過剰な増殖、周辺組織への浸潤、遠隔転移などがんの悪性化に深く関与していることは以前から指摘されてきた(1)。がん種により転移先臓器はある一定の傾向を示すが、これは転移先臓器のがん微小環境ががんの増殖を制御していることを示唆している。近年では、がん微小環境の多様性が、がんの治療抵抗性に関与していることが報告されている(2)。つまり、がん細胞のメカニズムを十分に理解するためには、がん微小環境に着目することが重要である。

がん微小環境は、様々な増殖因子やサイトカイン、および細胞外マトリックス (ECM ; Extracellular Matrix) を含んでいる。ECM は主に繊維状タンパク質とプロテオグリカンの二種類の高分子で構成されており、主な繊維状タンパク質として、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニンなどがあげられる。この ECM によって複数の細胞内シグナル伝達経路が活性化され、活性化された細胞内シグナルは、細胞内で調整され、特定の細胞行動を示す。

ECM は細胞培養に活用されているほか、種々のアッセイ、例えば浸潤アッセイや遊走アッセイを行う際に用いられている。しかし現行のがんアッセイではコラーゲンなど単一もしくは特定の ECM 成分しか用いられておらず、がん細胞の行動特性を評価するアッセイとしては改良の余地がある。また、ECM は組織ごとに成分が異なるため、がん微小環境を培養条件下で再現するためには、がん細胞が由来する組織を考慮する必要がある。

脱細胞化組織は、がん細胞の機能を調べるための新しいプラットフォームとして注目されている。脱細胞化組織は、酵素処理によりゲル化させることで細胞培養に応用可能である。脱細胞化ゲルは細胞接着、細胞増殖および遊走のための微小環境の構築に用いられてきた(3)。脱細胞化ゲルを作成する際に、目的によって使用する組織を選択することで、実験条件を最適化することができる。脱細胞化ゲルを用いることで、より生体に近い条件でがん細胞のアッセイを行うことができると考えられる。

本研究では、「脱細胞化ゲル中に組織内の微小環境成分が含有されており、かつその成分ががん細胞の挙動に影響を与える成分であること」を示すことを目的として実験を行った。脱細胞化ゲルを作製するために、本研究では (i) 組織採取および洗浄、(ii) 凍結融

解、(iii) 凍結乾燥および粉末化、(iv) 酵素処理、(v) 中和の 5 つのステップからなるプロトコルを作成した。そして、がん細胞に与える影響を調べるために、細胞増殖、細胞遊走、コロニー形成という 3 つの性格が脱細胞化ゲルにより変動するかどうかを観察した。また、作成した脱細胞化ゲルを、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離し、続いて銀染色により染色を行うことでゲル中に含まれているタンパク質を調べた。

本研究では、脱細胞処理に凍結融解を用いた。その結果、界面活性剤洗浄の工程の省略が可能であり、2 日間という従来に比べ短期間で細胞毒性の少ないゲルを調製できることがわかった。この脱細胞化ゲルを用いてがん細胞の培養を行ったところ、がん細胞の細胞増殖、細胞移動、コロニー形成に大きな変化が見られた。脱細胞化ゲルに含まれるタンパク質を SDS-PAGE で分離し、分離されたタンパク質を銀染色で可視化したところ、複数のバンドが認められた。そのため本研究で得られた脱細胞ゲルを細胞培養に用いることで、組織内のように種々の分子が混在した微小環境の構築が期待できる。

これらの結果から、がん細胞の挙動に影響を与える組織成分を脱細胞化ゲルとして抽出可能であることが明らかになった。今後は SDS-PAGE で観察されたタンパク質の質量分析による脱細胞化ゲルの分子的評価と、脱細胞化ゲルが細胞に与える影響の評価を併せて行うことで、がん細胞の成長に不可欠な微小環境分子を突き止めていきたい。また、細胞株の樹立に脱細胞ゲルが有用かどうかを検討する計画である。

### 文献

- 1) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013. PMID:24202395
- 2) The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer. *Int J Mol Sci.* 2017. PMID:28754000
- 3) Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Sci Rep.* 2018. PMID: 29993013