

# がん細胞の浸潤能を左右する細胞の個性に関する研究

中田 宗宏\*<sup>1</sup>

## Individuality of Breast Cancer Cells Affecting Invasive Ability into Type I Collagen Gel

by

Munehiro NAKATA\*<sup>1</sup>

### Abstract

Cancer cell invasion is a critical process causing metastasis. The present study established a novel observation method for cancer cell invasion and observed each cell during the invasion into a reconstituted type I collagen gel, an interstitial tissue model. Breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7 were incubated on reconstituted type I collagen gels followed by freeze sectioning and microscopic observation. Most of MDA-MB-231 cells were found to invade into the gel. In contrast, MCF-7 cells could be divided into the following two cell populations: cells invading into the gel and those staying on the gel surface without invasion. These results suggest that each cancer cell, even in the same cell line, possesses individuality for invasive ability.

**Keywords:** Cell invasion, Cytohistochemistry, Type I collagen, Freeze sectioning, Breast cancer

### 1. まえがき

がんの転移性増殖はがん病態の特徴であり、がん患者の予後に深く関わっている。上皮組織において腫瘍化した細胞が悪性化すると細胞間相互作用が弱くなり、その局所から細胞が基底膜を破壊してI型コラーゲンを主成分とする間質へ侵入する。この過程は浸潤と呼ばれ、がん転移の前段階として重要なプロセスであるが、その詳細に関してはまだ不明な点が多い。

我々はこれまで、各種消化器がん組織における複合糖質の発現を解析し、がん組織中のがん細胞の一部に特殊なシアル化複合糖質が発現しており、しかも、その複合糖質の発現が、がんの浸潤や転移、患者の予後と深く関係していることを明らかにしてきた<sup>1,2)</sup>。また、がん細胞の浸潤機構を解析する新規手法を種々検討し、I型コラーゲンを含む再構成ゲル上で培養したがん細胞をタイムラプス顕微鏡下で観察することで、がん細胞浸潤のリアルタイムな観察を可能にした(論文執筆中)。これらの研究において、同じ細胞集団の中でも個々の細胞で浸潤の開始時期に違いがあり、浸潤には細胞の個性があることが示唆されてきた。

一方、タイムラプス顕微鏡やボイデン・チャンパー法のような従来法によるがん浸潤観察は、浸潤の始めと終わりを見ているに過ぎず(Fig. 1, right), 浸潤途中のがん細胞を観察するには適さない。そこで本研究では、間質モデルである再構成I型コラーゲンゲル内に乳がん細胞を浸潤させ、Fig. 1左に示すような浸潤方向の凍結切片を作製し、浸潤中のがん細胞を観察した。

### 2. 実験の概要

乳がん細胞MDA-MB-231およびMCF-7は、ウシ胎児血清(FCS; Hyclone)含有DMEM(Gibco)培地を用いて継代培養した。再構成コラーゲンゲルは、0.1% I型コラーゲン溶液と10×DMEM再構成緩衝液(2.2% NaHCO<sub>3</sub>を含む200 mM HEPES-NaOH)を8:1:1の割合で混合して作製した。このゲル上に2~4×10<sup>5</sup> cells/mlに調製した細胞懸濁液を添加し、37°Cで3時間保温した。ゲル表面を洗浄後、さらに37°Cで18時間保温した。がん細胞を浸潤させた再構成コラーゲンゲルを-80°Cで凍結させ、浸潤方向に沿って厚さ20 μmの凍結超薄切片を作製した。この切片組織をヘマトキシリンとエオシンで核および細胞質染色し、光学顕微鏡下でゲル表面からの細胞浸潤距離を計測した。

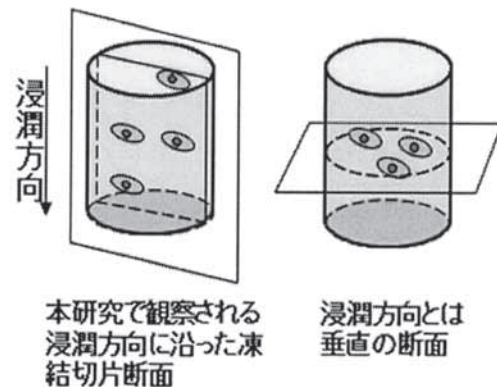


Fig. 1 Cross section for observation of cancer cell invasion

\*1 工学部生命化学科教授

### 3. 結果

Fig. 2 は、再構成 I 型コラーゲンゲル内に乳がん細胞 MDA-MB-231 および MCF-7 を浸潤させた凍結切片写真である。MDA-MB-231 細胞では、ゲル表面に留まっている細胞は少なく、多くの細胞が浸潤している様子が観察された (Fig. 2A)。一方、MCF-7 細胞では、MDA-MB-231 同様にゲル内に浸潤している細胞が観察されたものの、浸潤しないでゲル表面に留まっている細胞も多く観察された (Fig. 2B)。

次に、この顕微鏡観察をもとにして個々の細胞の浸潤距離を計測し、その分布を解析した (Fig. 3)。MDA-MB-231 細胞では、0~100  $\mu\text{m}$  の広い範囲に浸潤細胞の分布が認められた (Fig. 3A)。一方、MCF-7 細胞では、MDA-MB-231 細胞と異なる浸潤距離の分布を示し、浸潤せずにゲル表面に留まっている細胞グループと、約 50  $\mu\text{m}$  の距離を浸潤している細胞グループが認められた (Fig. 3B)。また、浸潤した細胞の割合を計算すると、MDA-MB-231 細胞では 93% (199/214) であり、MCF-7 細胞では 60% (45/75) であった。

### 4. 考察

本研究では、間質モデルである再構成 I 型コラーゲンゲル内と凍結切片法を組み合わせたがん細胞浸潤解析法を確立し、乳がん細胞 MDA-MB-231 および MCF-7 では、同じがん細胞集団においても個々のがん細胞に浸潤能の差異があることを認めた。

本研究で用いた MDA-MB-231 は悪性度が強く、MCF-7 細胞は悪性度が比較的弱い細胞株とされている。本法では、前者が 93% 浸潤し、後者が 60% 浸潤しており、これは各細胞株における浸潤能の違いを反映していると考えられる。また、MDA-MB-231 細胞の浸潤距離は広い範囲の分布を示し、MCF-7 細胞においては、浸潤せずにゲル表面に留まる細胞集団と、よく浸潤する細胞集団の 2 集団があることが示唆された。これらの結果は、同一の細胞株においても、その細胞集団の中の個々の細胞には、浸潤能から見た個性があることを強く示唆している。

がん細胞が間質組織内を浸潤する際には、間質成分を分解して浸潤ルートを作り出さなければならない。これには、各種細胞接着分子や細胞外マトリクス分解酵素が関与していることが知られている。しかし、がん細胞の浸潤に関するこれまでの多くの研究では、がん細胞集団全体として評価しているため、同じ細胞集団の中でも浸潤の程度に違いのある細胞の個性については未知な部分が多い。一方、本研究で確立した再構成 I 型コラーゲンゲル凍結切片法は、モデル間質組織を浸潤する細胞個々を観察できるため、これに生化学的および免疫学的手法を組み合わせれば、細胞の個性を分子レベルで解析することが可能になると考えられる。今後、モデル間質組織中を浸潤する細胞動態を解析し、がん細胞の浸潤における各種接着分子や分解酵素の役割を評価するとともに、どのような個性が浸潤に重要なのかを明らかにすることが必要であろう。

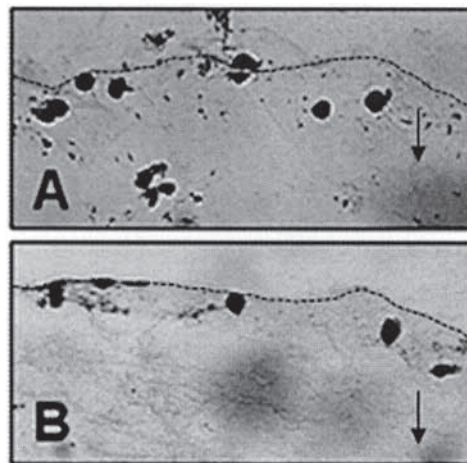


Fig. 2 Typical photographs of reconstituted type I collagen gel after incubation with MDA-MB-231 (A) and MCF-7 (B) cells. Dotted line, gel surface; arrow, direction of invasion.

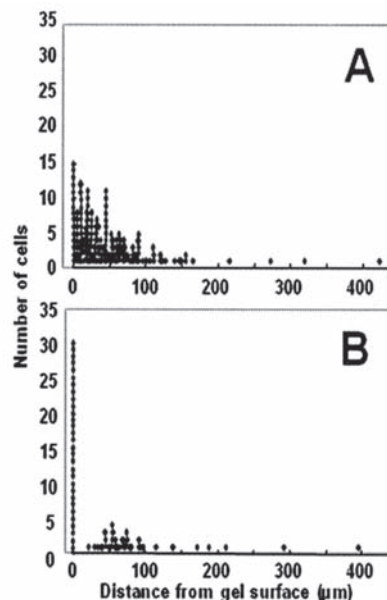


Fig. 3 Distributions of MDA-MB-231 (A) and MCF-7 (B) cell invasion distance into reconstituted type I collagen gels

### 5. あとがき

本研究では、がん組織中の細胞集団には浸潤に関して個性的な細胞が存在しており、その個性ががんの浸潤能に関わっていることを示した。がん細胞の「個性」の本質をとらえることは、浸潤メカニズムの理解を深め、それを抑制するターゲットの開拓に応用可能と考えられる。

#### 謝辞

本研究は、2007年度工学部研究教育補助金の助成を受けて実施されたものであり、ここに謝意を表します。また、本研究にご協力いただいた工学部生命化学科 山口陽子教授に感謝いたします。