

Numerical Simulation on Tumor Invasion Model Affected by Heat Shock Protein

近畿大学大学院システム工学科 柳 雄一 (Yuichi Yanagi)
Graduate School, Kinki University

近畿大学工学部 伊藤 昭夫 (Akio Ito)
School of Engineering, Kinki University

1 Takayaumenobe, Higashihiroshima, Hiroshima, 739-2116, JAPAN

1. はじめに

癌細胞の転移に至る過程で癌浸潤現象は極めて重要な段階である。癌浸潤現象とは、器官の上皮組織上で発生した癌細胞が上皮組織下に存在する皮膜を破壊し、その下のストロマ細胞層へと侵入する現象である。浸潤に成功した癌細胞は、血管誘導物質を分泌することによって、血管を癌細胞組織内へと誘導する。これが癌腫瘍内の血管新生現象である。この血管新生プロセスに成功すると、癌細胞は血管内への侵入を試みる。そして、外側から血管壁を破壊し血管内に侵入した癌細胞は血液に乗って構造的に離れた場所（組織や器官）へと運ばれる。最後に、運よく血管壁に付着した癌細胞は今度は血管壁を内側から破壊し、他の組織や器官への移動を完了する。これによって、人の命を脅かす癌転移が引き起こされる。従って、癌細胞の増殖を浸潤プロセスの段階で制御すること、言い換えれば、癌細胞の増殖を浸潤プロセスの途中段階で食い止めることが極めて重要である。しかし、癌細胞がどのようなメカニズムに従って浸潤プロセスを実行するのかは未だ解明されていない。

しかし、[2]により癌の治療法の一つとしてハイパーサーミア（癌の温熱療法）が注目されている。これは、癌腫瘍に熱刺激を加えることによって癌腫瘍の縮小を目的とした治療法である。詳しく述べると、ハイパーサーミアは熱刺激に反応して大量に合成される熱刺激応答タンパク質（Heat Shock Protein, 以後、Hsp と略記する）の性質を利用した癌治療法である。ところが、ハイパーサーミアの治療効果については疑問を投げかける医者も多い。その主たる要因として、熱刺激と癌腫瘍の縮小という現象の間に存在する因果関係が解明されていないということが挙げられる。実際、熱刺激を与えることによって、細胞内では複雑なプロセスを持った生体化学反応が引き起こされると言われているが、そのプロセスそのものが未だ解明されていない。更には、その反応によって生じた物質が癌腫瘍を小さくする、言い換えれば、癌腫瘍細胞を死滅させるメカニズムも解明されていない。しかし、このような複雑なプロセスとメカニズムが数学と分子生物工学との連携により解明されれば、ハイパーサーミアに対してより高い治療効果を得る方法を提案することができる。

本論文では、温度変化による細胞内の Hsp の濃度変化を考慮した癌浸潤現象の数値シミュレーションを実施し、その結果に対して検討する。つまり、Hsp の効果を考慮することによって癌浸潤現象がどのように制御されるかを確認する。

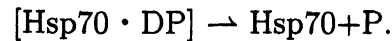
最後に、我々が Hsp に着目した背景について述べる。細胞内のタンパク質は様々な刺激（本論文では、熱刺激）によってその立体構造が破壊され、変性する。その変性したタンパク質をフォールディングし、正常なタンパク質へと戻したり、場合によっては、細胞外へと排出したりする役割を担っているのが Hsp であると言われている。この Hsp の働きにより、細胞は様々な刺激に対して死なずに守られている。従って、ハイパーサーミアの治療効果を解明するためには、Hsp 合成プロセスをまず解明する必要があると考える。このような視点から、癌浸潤現象と Hsp 合成プロセスを同時に考慮することは、今後の癌治療を支える基礎研究となる。

2. Hsp70 合成プロセスの数理モデル

本節では、まず [3, 4, 5] を参考に Hsp の役割について述べる。Hsp は熱刺激などのストレスがかけられている状態で細胞内に多く誘導されるタンパク質の総称である。もちろん、Hsp は非ストレス下でも通常の細胞内で常時分泌されるタンパク質であり、新しく合成されたタンパク質が正常な立体構造を保持するよう手助けする、言い換えれば、他のタンパク質が正常な立体構造を形成するための手助けをするシャペロンの役割を担っている。ところが、正常な細胞にストレスを与えると、細胞内の多くのタンパク質が立体構造を崩されることによって変性する。すると、Hsp が大量に分泌され、ストレスによって変性したタンパク質の立体構造を正常に戻すためにフォールディングしたり、ときには、変性したタンパク質を細胞外へと誘導したりする。結果として、Hsp は正常な細胞が死滅することを防いでいる。その一方で、癌細胞中で分泌された Hsp は癌細胞を死滅させようとする働きを持つ可能性があるとも言われている。従って、熱刺激を与えることによって細胞内の Hsp がどのように変化するかを数理モデル化し、それを基に解析することは癌腫瘍細胞の制御という視点からも非常に重要な基礎的研究となる。Hsp は分子量により Hsp70, Hsp90, sHsp 等と分けられている。本研究では、Hsp70 に着目し、[4] で提唱された数理モデルに熱刺激を考慮した修正数理モデルを提案する。そこで、細胞内での Hsp70 と他の物質との各化学反応の説明、及び、化学反応式を以下に示す。

- (1) 通常、Hsp70 は熱刺激転写因子 (Heat Shock Transcription Factor, 以後、Hsf と略記する) の単量体と結合した化合物の状態が存在している。Hsf は Hsp70 の合成を調整する重要な役割を果たしている物質である。細胞に熱刺激を与えると細胞内の多くのタンパク質の立体構造が崩れ変性する。変性したタンパク質 (Denatured Protein, 以後、DP と略記する) が [Hsp70 · Hsf] の化合物と接触すると、Hsp70 は Hsf の単量体を解き放ち、DP をフォールディングする。また、Hsp70 が DP をフォールディングし (以後、この状態を [Hsp70 · DP] と略記する)、その立体構造を修復し通常の性質を持ったタンパク質 (以後、P と略記する) とすると P を解き放つ。これらの反応を化学反応式で表すと次のようになる。





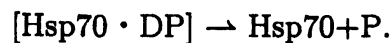
- (2) (1)における化学反応によって、Hsp70 から解き放たれた Hsf の単量体は不活性な状態で保たれている。しかし、Hsf の単量体が3つ集まると、Hsf の三量体 [Hsf₃] を形成して活性化される。この反応を化学反応式で表すと次のようになる。



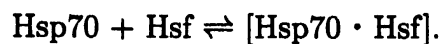
- (3) [Hsf₃] は、Hsp70 遺伝子のプロモーターである熱刺激エレメント (Heat Shock Elements, 以後、Hse と略記する) と接触することによって、DNA 情報の転写を開始し、Hsp70 を合成する。
- (4) [Hsf₃] は Hsp70 の単体と接触すると [Hsp70 · Hsf] を合成し、Hsf の単量体を2つ解き放つ。非ストレス下では、DP の量が少ないため、この反応が多く起こる。結果として、[Hsf₃] が分解されることによって非活性化が起こり、Hsp70 の過剰な生成が抑えられる。この反応を化学反応式で表すと次のようになる。



- (5) 主に (3) で合成された Hsp70 は DP をフォールディングする。また、(1) と同様に、Hsp70 が DP の立体構造を修復し通常の性質を持った P への変換を終了すると P を解き放つ。これらの反応を化学反応式で表すと次のようになる。



- (6) 主に (3) で合成された Hsp70 の単量体は Hsf の単量体と結合する。これも過剰な Hsp70 の合成を抑える反応である。この反応を化学反応式で表すと次のようになる。



以上の化学反応をフローチャート化すると図1のようになる。

しかし、フローチャートからもわかるように本モデルでの問題点は、DP がストレスによって突然発生するという点と Hsp70 によって修復された DP (つまり、P) は Hsp70 から解放されるにも関わらずその後の反応には組み込まれないという点である。言い換えれば、P が DP へと変性するプロセスや細胞内の P の総量を全く考慮していないという点である。今後、P と DP との関連を含めることによって、1つのサイクルを持ったフローチャートを考え、それを基にした数理モデルを提案する必要がある。

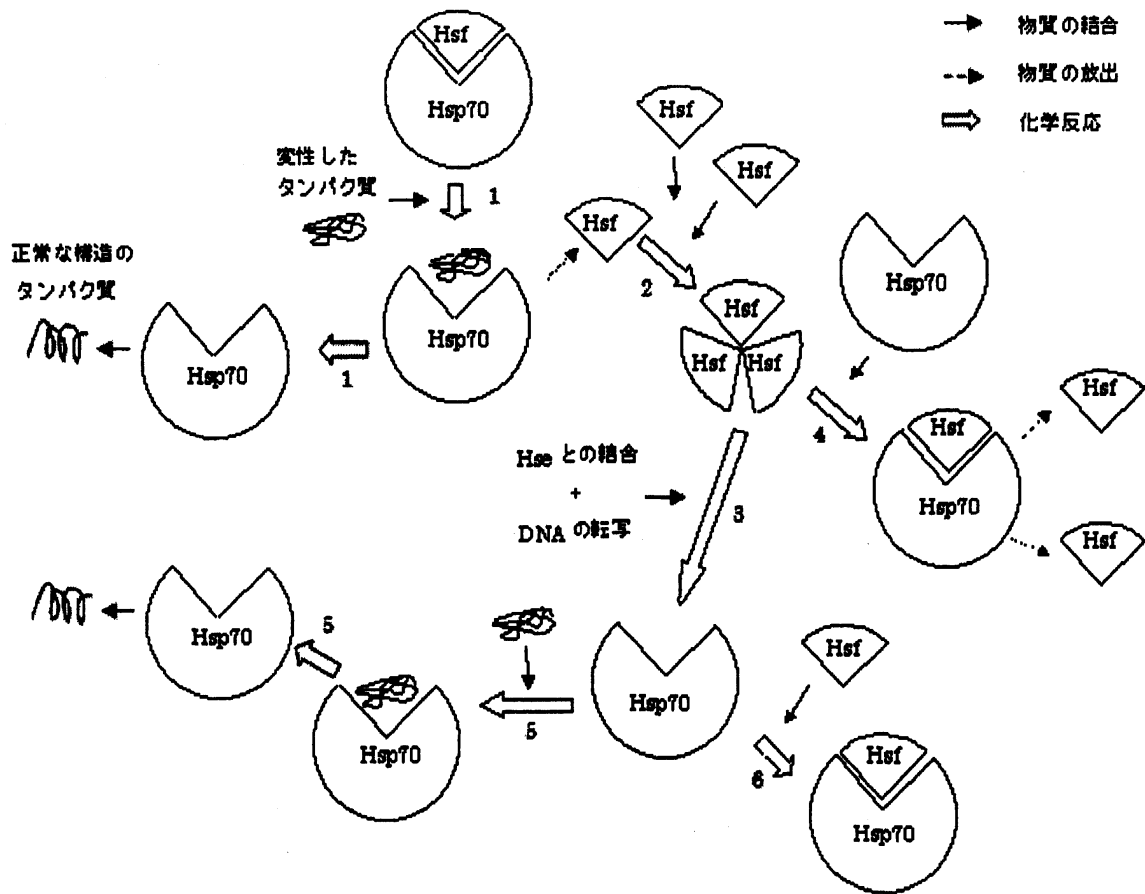


図 1: Hsp70 合成プロセス

図 1 のフローチャートに従って、各段階における化学反応を化学反応速度論により数理モデル化すると、次の連立常微分方程式系が得られる。

$$\text{(Hsp)} \left\{ \begin{array}{l} \frac{da_1}{dt} = -k_1 a_1 a_2 + l_1 a_4 - k_2 a_1 a_3 - l_3 a_1 a_6 + k_4(\theta) a_6 + 2l_6 a_5 \\ \frac{da_2}{dt} = -k_1 a_1 a_2 + l_1 a_4 - k_3 a_2^3 + 2l_3 a_1 a_6 + k_6 a_3 a_4 \\ \frac{da_3}{dt} = -k_2 a_1 a_3 - k_6 a_3 a_4 + C(\theta) \\ \frac{da_4}{dt} = k_1 a_1 a_2 - l_1 a_4 - k_6 a_3 a_4 + l_3 a_1 a_6 \\ \frac{da_5}{dt} = k_2 a_1 a_3 + k_6 a_3 a_4 - 2l_6 a_5 \\ \frac{da_6}{dt} = k_3 a_2^3 - l_3 a_1 a_6 \end{array} \right. \quad (1)$$

ここで, $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, a_6$ は未知関数で Hsp70, Hsf, DP, [Hsp · Hsf], [Hsp · DP], [Hsf3] の濃度をそれぞれ表す. また, $k_i > 0, l_i > 0$ ($1 \leq i \leq 6$) は化学反応速度を表し, θ は相対温度を表す与えられた関数である. 特に, $k_4(\theta)$ は θ に依存する正值関数, つまり, 化学反応速度が相対温度に依存していることに注意する.

本節では, 以下のような設定で1次元数値シミュレーションを実行する.

まず, 温度場 θ は次の線形熱方程式の解で与える.

$$(Tem) \begin{cases} \frac{\partial \theta}{\partial t}(x, t) = 0.15 \frac{\partial^2 \theta}{\partial x^2}(x, t) & \text{a.e. } (x, t) \in (0, 10) \times (0, 5000), \\ \theta(0, t) = 37 & \text{a.e. } t \in (0, 5000), \\ \theta(10, t) = 45 & \text{a.e. } t \in (0, 5000), \\ \theta(x, 0) = 37 & \text{a.e. } x \in (0, 10). \end{cases}$$

次に, (Tem) の一意解 θ を利用して, (Hsp) を空間 $(0, 10)$ における各点 x において解く. 数値計算を実行する際の実際のデータの通りである.

$$(a_1(x, 0), a_2(x, 0), a_3(x, 0), a_4(x, 0), a_5(x, 0), a_6(x, 0)) = (0.3, 0.01, 0.1, 0.01, 0.1, 0.5),$$

$$\forall x \in (0, 10),$$

$$(k_1, k_2, k_3, k_6, l_1, l_2, l_3, l_6) = (0.1, 0.15, 0.4, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00095, 0.001),$$

$$k_4(\theta) = A e^{-\frac{E}{R(\theta - 36.999)}} \quad (2)$$

$$C(\theta) = \left\{ \left(1 - \frac{0.4}{e^{\theta - 37}} \right) \cdot 0.03 \cdot 1.4^{\theta - 37} \right\}.$$

特に, (2) はアレニウス式と呼ばれ, 化学反応速度と温度の関係を表す代表的な数理モデルの1つであり, A は定数, E は活性化エネルギー, R は気体定数を表し, 数値シミュレーションにおいては

$$(A, E, R) = (0.5, 0.1, 1.986973)$$

とする. 更に, $C(\theta)$ は, 熱刺激による DP の生成速度を表す.

以上の設定の下で実施した数値シミュレーション結果を以下に示す. 実際, 図 2, 3, 4, 5, 6, 7 はそれぞれ Hsp70, Hsf, DP, [Hsp70 · Hsf], [Hsp70 · DP], [Hsf3] の $t = 0$ (左上), 1000 (右上), 2000 (左中央), 3000 (右中央), 4000 (左下), 5000 (右下) での濃度分布を示す. また, 図 8 は $x = 5$ における Hsp70 (左上), Hsf (右上), DP (左中央), [Hsp70 · Hsf] (右中央), [Hsp70 · DP] (左下), [Hsf3] (右下) の濃度の時間変化を示す.

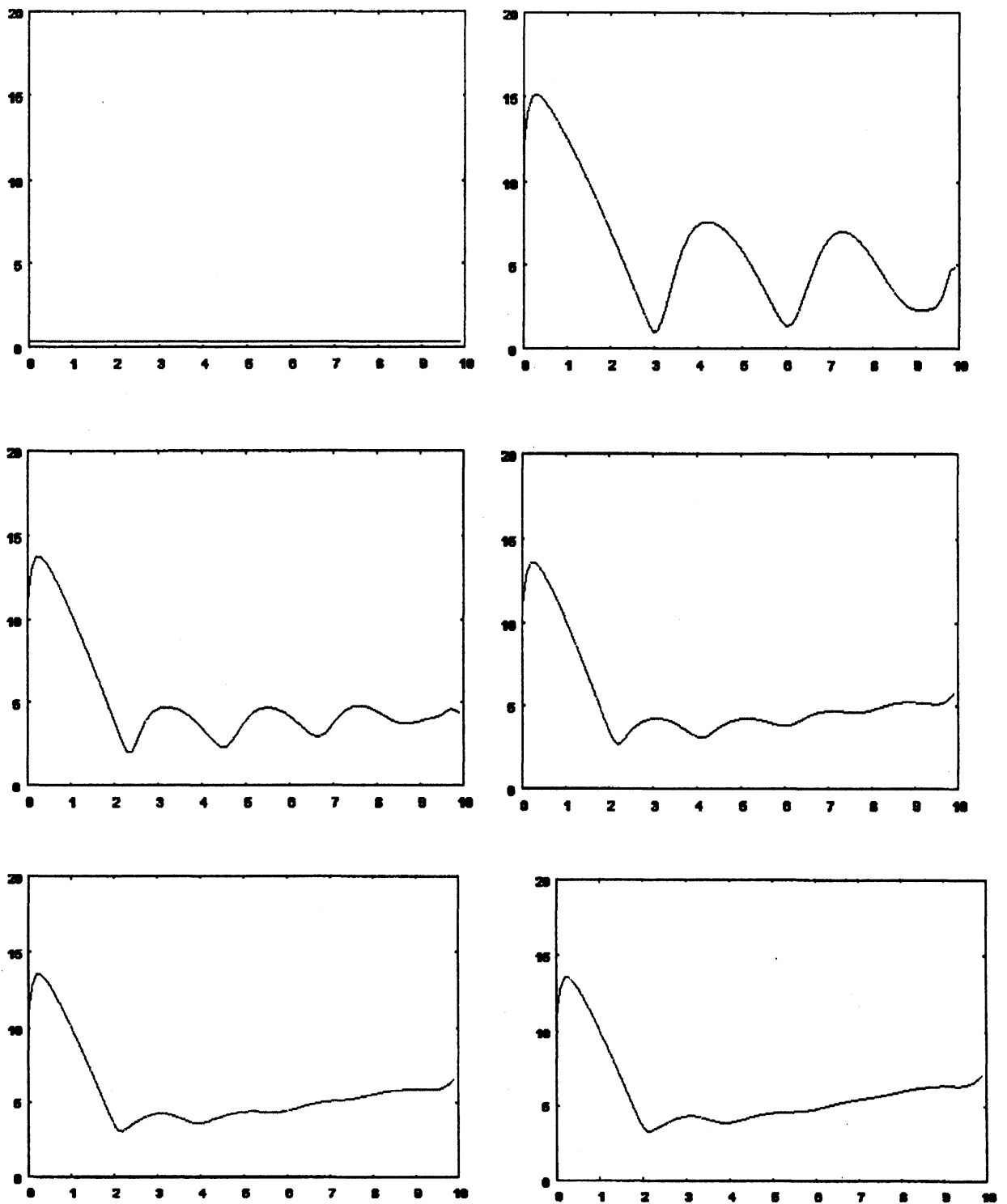


図 2: Hsp70 の挙動

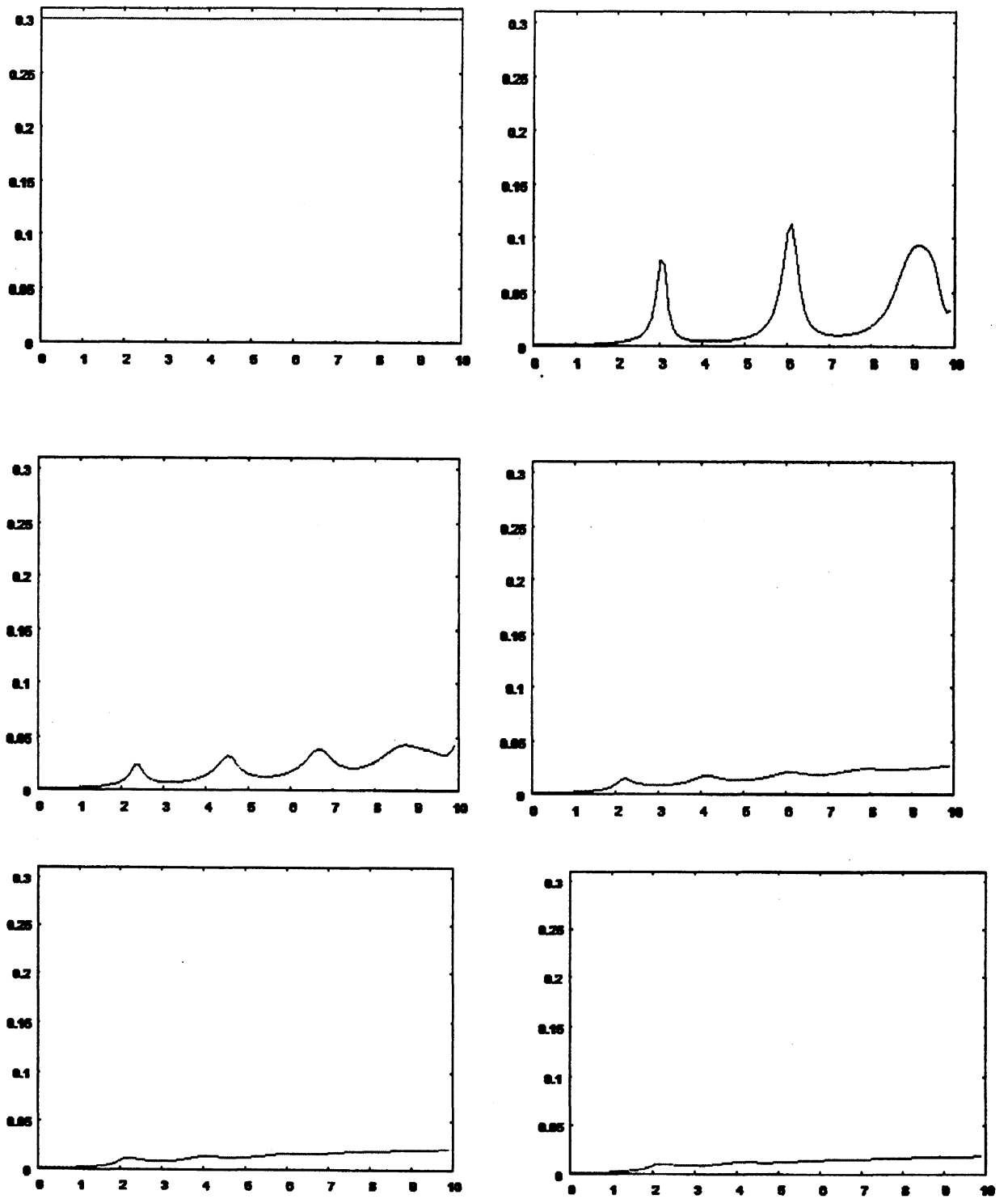


図 3: Hsf の挙動

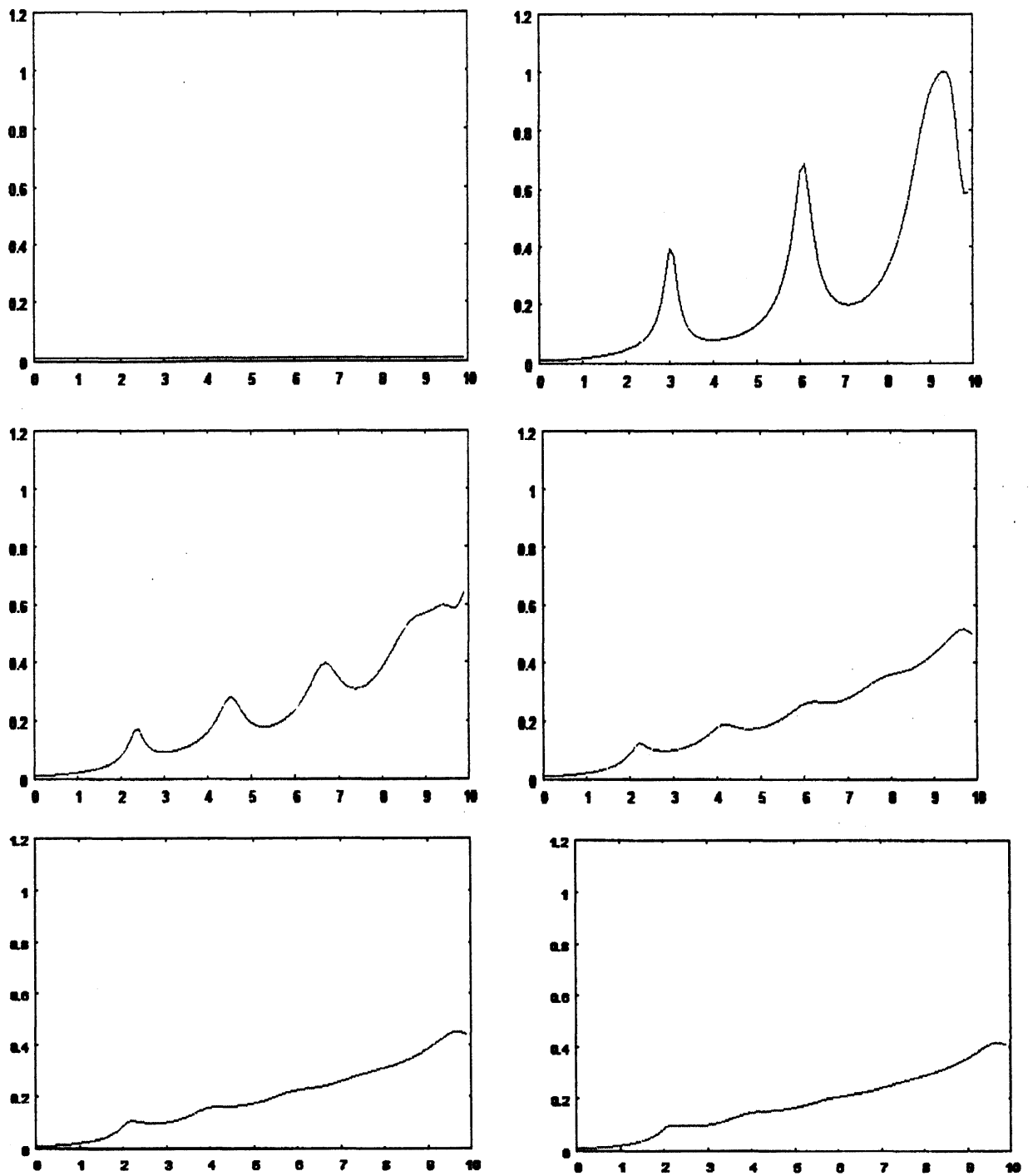


図 4: DP の挙動

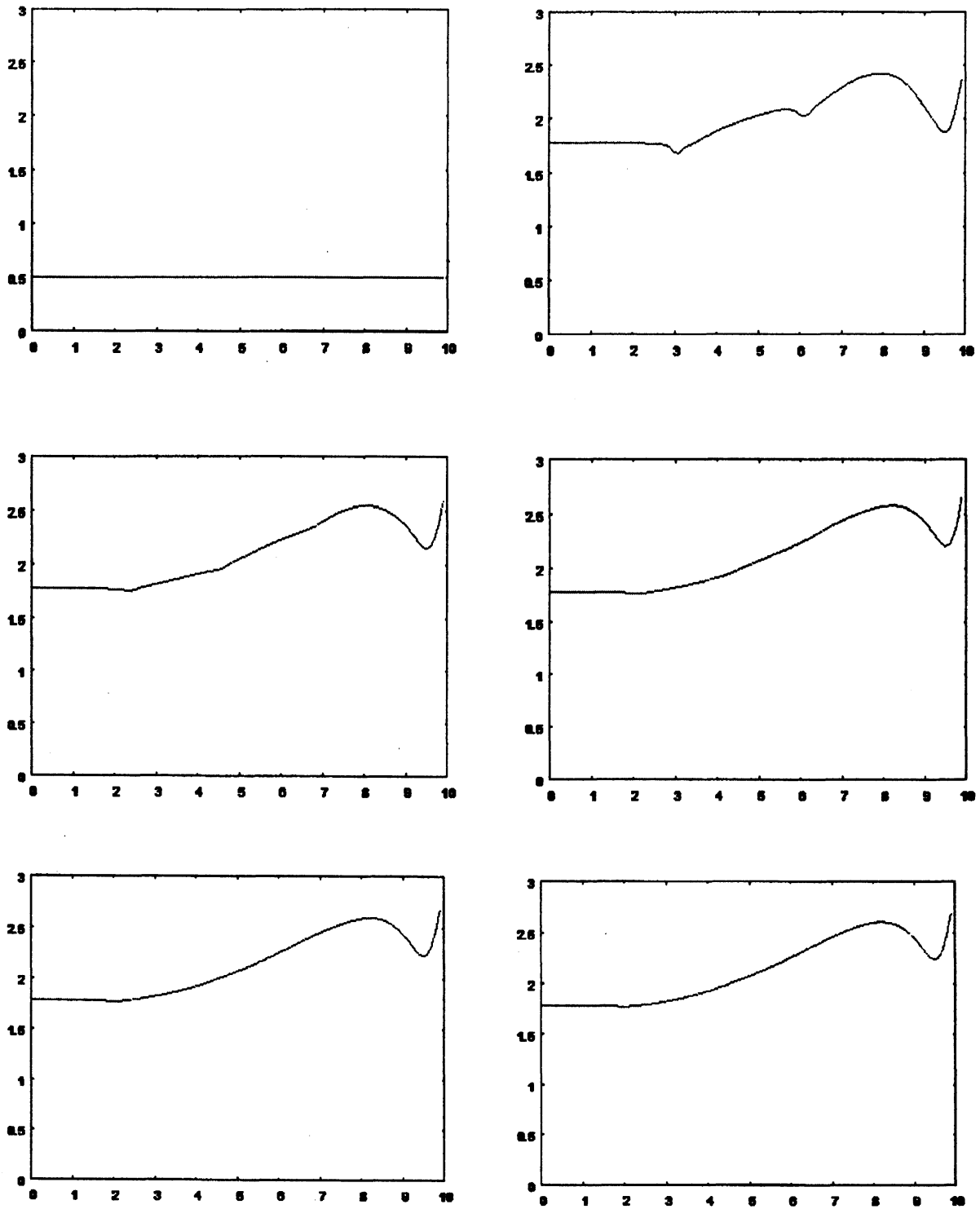


図 5: [Hsp70 · Hsf] の挙動

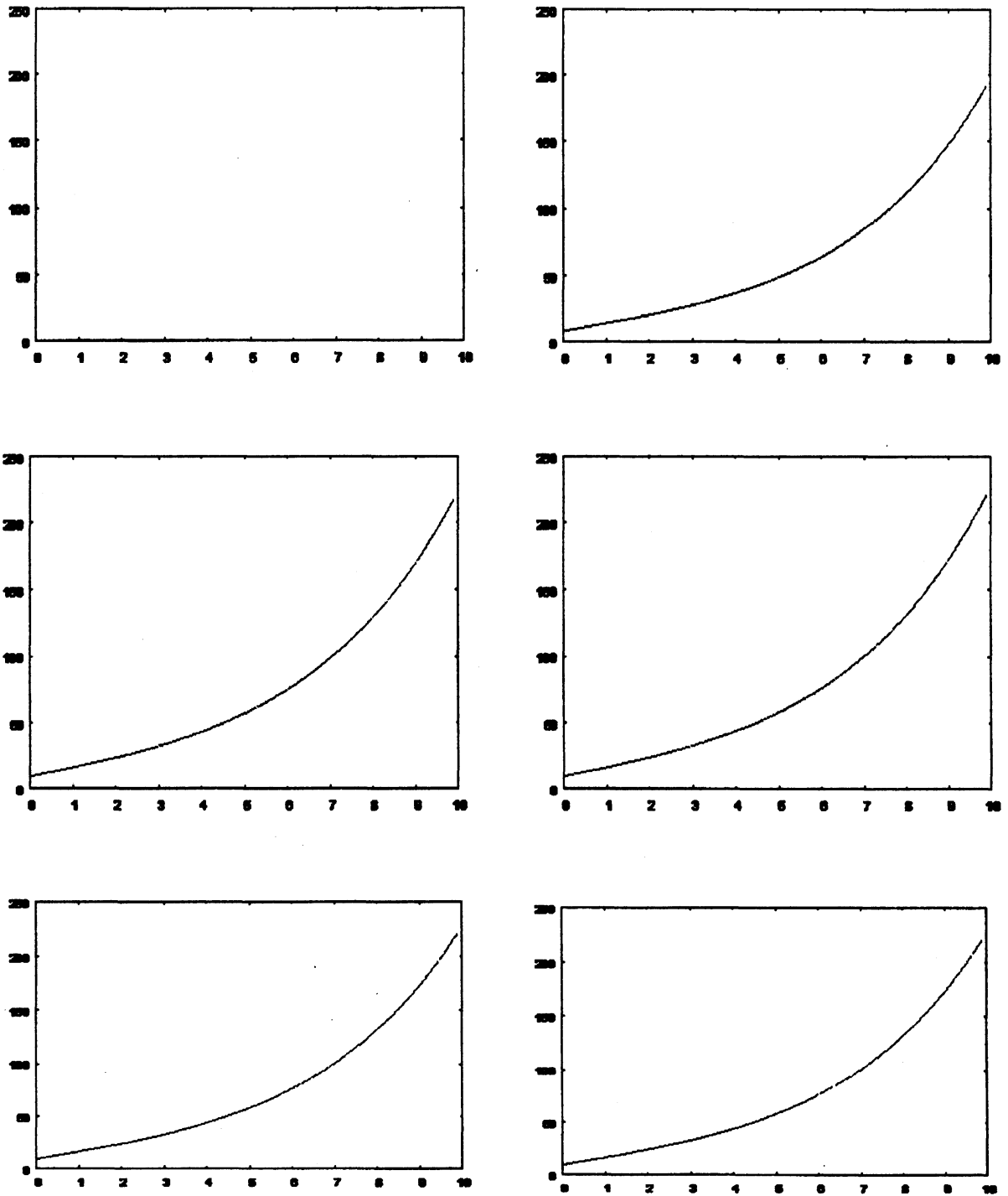


図 6: [Hsp70 · DP] の挙動

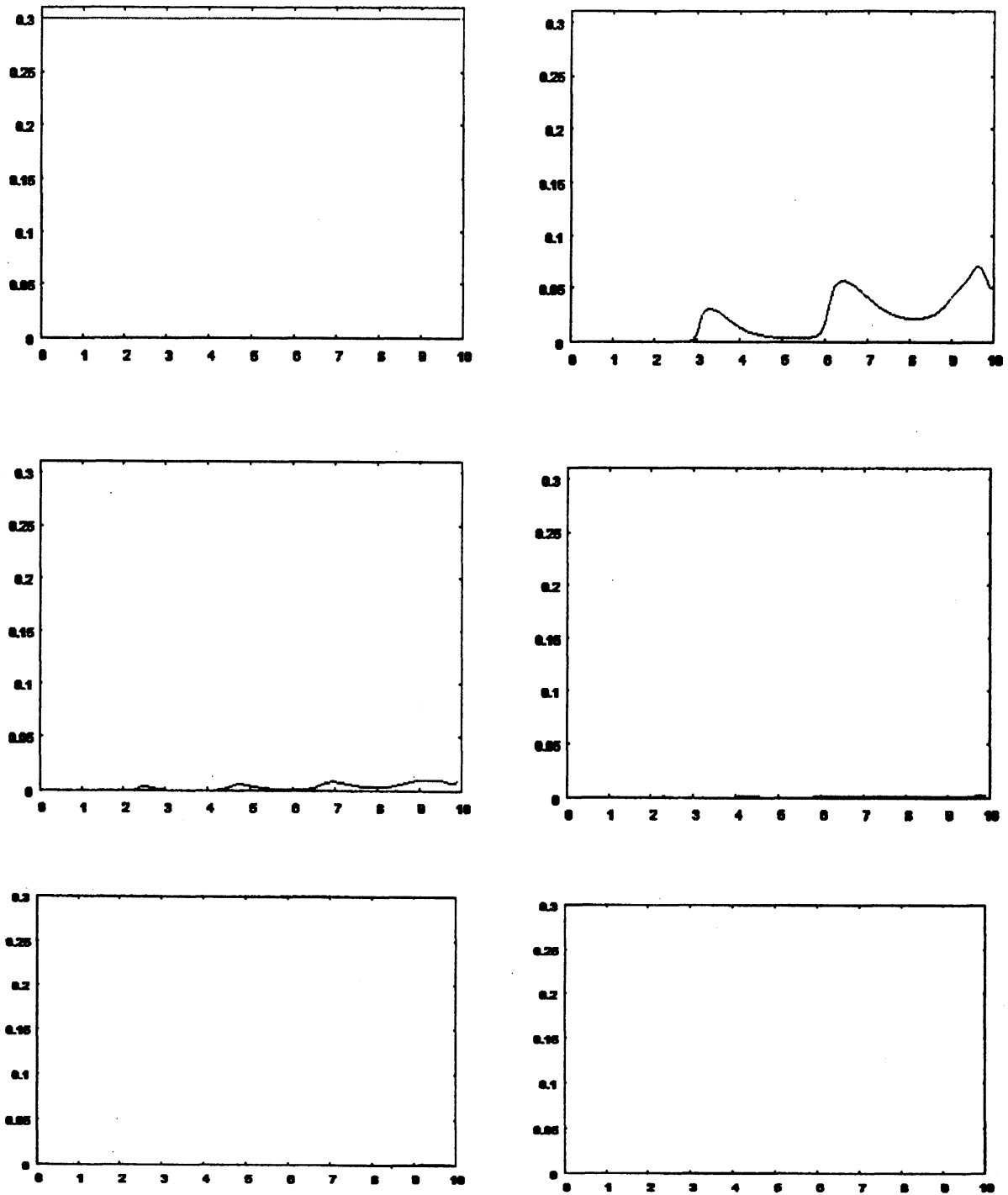


図 7: [Hsf3] の挙動

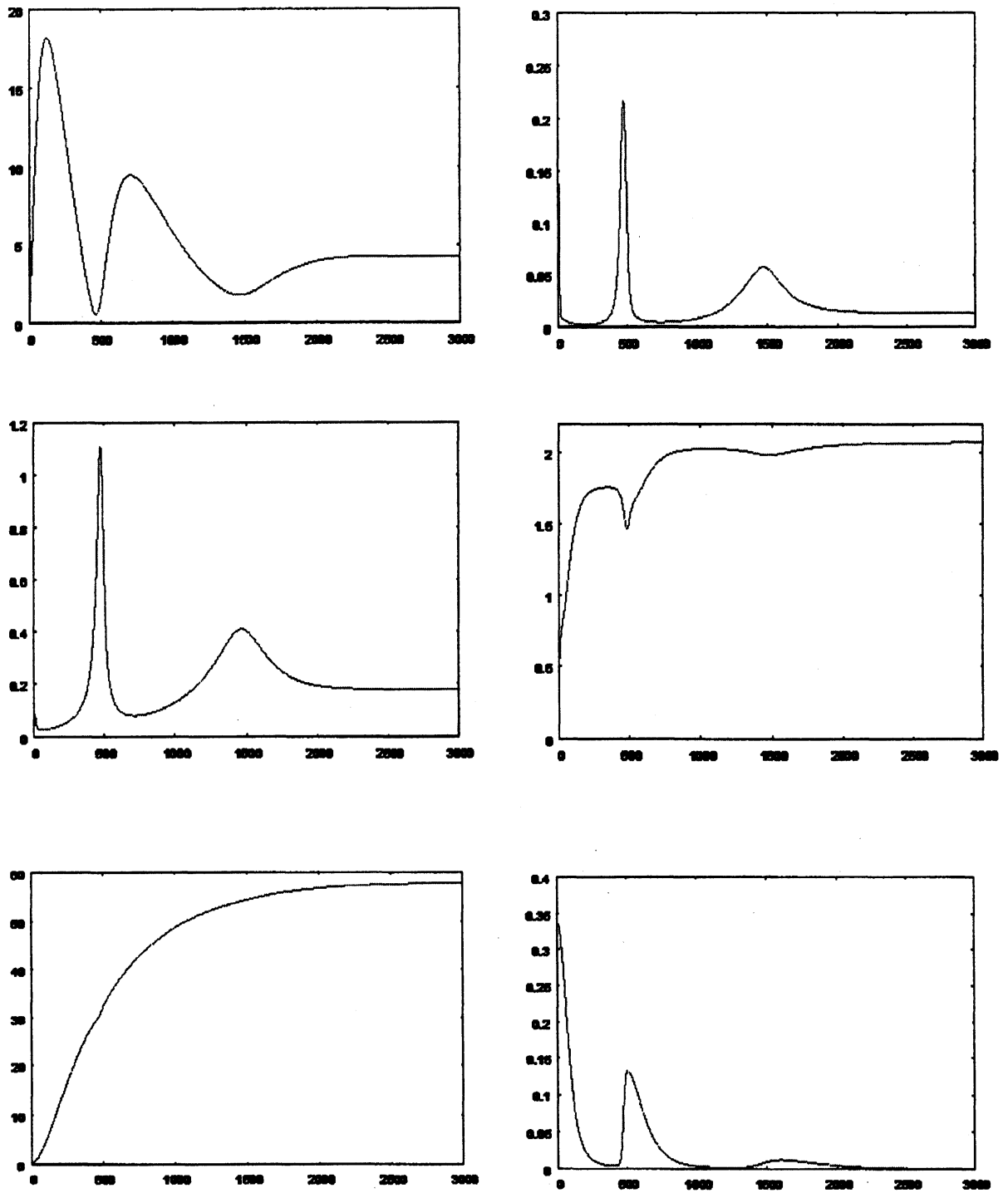


図 8: $x = 5.0$ での各物質の挙動

3. 癌浸潤モデル

癌浸潤現象とは、器官の上皮細胞組織上で発生した癌腫瘍細胞が上皮細胞組織下に存在する皮膜を破壊し、その下のストロマ細胞組織内へと侵入する現象である。そのプロセスを解明するためには、細胞外基質 (Extracellular Matrix, 以後, ECM と略記する) で構成される皮膜内での癌腫瘍細胞の動きを解析する必要がある。つまり、皮膜内での癌腫瘍細胞・ECM・癌腫瘍細胞が分泌する Matrix Degrading Enzymes (以後, MDE と略記する) と呼ばれる酵素の間に存在する関係を数理科学的な視点から解明することが非常に重要である。ECM は超高分子構造体で細胞外と細胞内の空間を遮断 (つまり、外部と人体を明確に区別) したり、上皮細胞組織の足場となったりする等の役割を担う。MDE は癌腫瘍細胞周辺の正常細胞や ECM を退化、或いは、破壊する役割を担う。そして、癌腫瘍細胞は MDE を放出し、癌腫瘍細胞周辺の正常細胞や ECM を破壊することによって僅かな空間を作り、その空間に増殖しながら侵入していく。言い換えれば、皮膜は ECM で構成されているので、癌腫瘍細胞が分泌する MDE によって皮膜が破壊され、それによって癌腫瘍細胞の転移の足がかりをつくる現象が癌浸潤現象である。このプロセスを図 9 に示す。

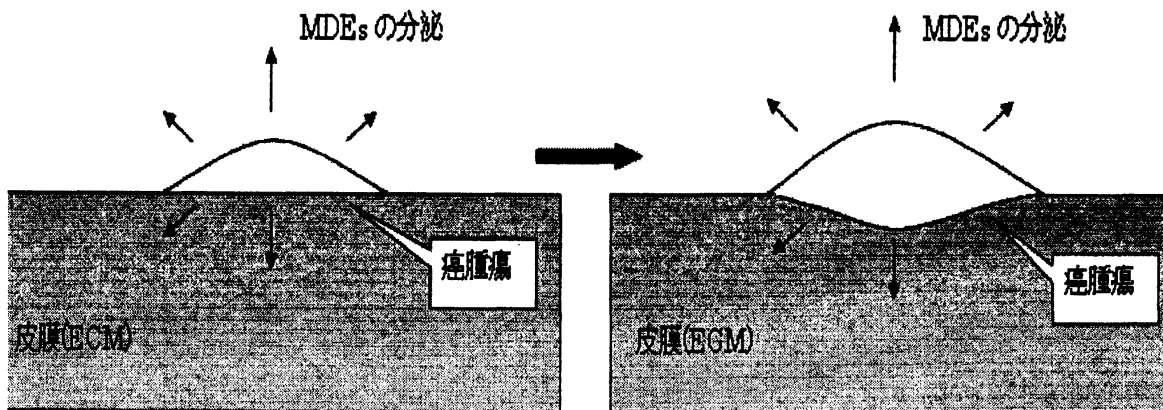


図 9: 癌腫瘍細胞の浸潤

[1]において、以下の数理モデルが癌腫瘍細胞の癌浸潤現象における癌腫瘍細胞・ECM・MDEの挙動を記述するモデルとして提案されている。

- (1) 癌腫瘍細胞の挙動：癌腫瘍細胞の集中度変化は、拡散・ハプトタキシス (走触性)・癌腫瘍細胞自身の増殖およびアポトーシス (細胞自滅) の影響により引き起こされる。特に、ハプトタキシスとは細胞が接着している物質 (癌浸潤現象では ECM) の勾配が大きいほうへ移動する性質のことである。これらの癌腫瘍細胞の挙動を数理モデル化すると、癌腫瘍細胞集中度のダイナミクスは (3) で支配される。

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \overbrace{D_n \Delta n}^{\text{自動性}} - \overbrace{c \nabla \cdot (n \nabla f)}^{\text{ハプトタキシス}} + \overbrace{F}^{\text{自己増殖}} - \overbrace{G}^{\text{アポトーシス}} \quad (3)$$

ここで、 n は癌腫瘍細胞集中度、 $D_n > 0$ は癌腫瘍細胞のランダムな自動性を表す定数、 $c > 0$ はハプトタキシスの強さを表す定数、 f はECM濃度を表す。また、 F と G はそれぞれ癌腫瘍細胞の自己増殖の速度とアポトーシスの速度を表す関数である。数値シミュレーションにおいては、 F として次の関数を与えている。

$$F(n) = n(1 - n)$$

これは、ヴェアフルストによって提案された人口予測モデルで用いられる関数であり、ロジスティック法則と一般に呼ばれている。

- (2) ECMの挙動：ECMはMDEと化学反応を起こすことによって破壊される。言い換えれば、ECMはMDEとの化学反応によって減少する。従って、ECM濃度の変化はMDE集中度とECM濃度自身の影響を受ける。また、皮膜はしっかりと固定された膜なので拡散を考慮する必要はない。従って、ECM濃度のダイナミクスは(4)で支配される。

$$\frac{df}{dt} = -\alpha m f \quad (4)$$

ここで、 $\alpha > 0$ と m はそれぞれECMとMDEによる化学反応によってECMが破壊される速度とMDE集中度を表す。

- (3) MDEの挙動：癌腫瘍細胞によって分泌されるMDE集中度の変化は、拡散・自然消滅・癌腫瘍細胞によるMDEの生成速度の影響を受ける。よって、MDE集中度のダイナミクスは(5)で支配される。

$$\frac{\partial m}{\partial t} = \overbrace{D_m \Delta m}^{\text{拡散}} - \overbrace{\lambda m}^{\text{自然消滅}} + \overbrace{H}^{\text{生成}} \quad (5)$$

ここで、 $D_m > 0$ と $\lambda > 0$ はそれぞれMDEの拡散とMDEの自己崩壊率を表す。また、 H は癌腫瘍細胞によって分泌されるMDEの生成速度を表す関数である。数値シミュレーションにおいては、 H として次の関数を与えている。

$$H(n) = \eta n$$

実際、癌腫瘍細胞がMDEを分泌することから、 H は癌腫瘍細胞集中度に比例すると仮定することによって上式は得られる。つまり、 $\eta > 0$ は1つの癌細胞が分泌するMDEの量を表す比例定数である。

以上より、次の非線形微分方程式系が得られる。

$$(TIM) \begin{cases} \frac{\partial n}{\partial t} = D_n \Delta n - c \nabla \cdot (n \nabla f) + n(1 - n) - G, \\ \frac{df}{dt} = -\alpha m f, \\ \frac{\partial m}{\partial t} = D_m \Delta m - \lambda m + \eta n. \end{cases} \quad (6)$$

本節では、(TIM) の $(x, t) \in (0, 10) \times (0, 500)$ 領域での1次元シミュレーションを行う。ただし、初期条件、境界条件、及び、パラメータを以下で与える。

$$n(x, 0) = e^{-(x-5.0)^2}, \quad f(x, 0) = 1, \quad m(x, 0) = 0, \quad \text{a.e. } x \in (0, 10),$$

$$n(0, t) = n(10, t) = m(0, t) = m(10, t) = 0, \quad \text{a.e. } t \in (0, 500),$$

$$(D_n, c, \alpha, D_m, \lambda, \eta) = (0.01, 0.01, 0.1, 0.01, 0.1, 0.01).$$

また、アポトーシス G は次式で与える：

$$G(n) = 0.1n$$

つまり、本節で示す数値シミュレーションは「癌腫瘍細胞のアポトーシスは癌腫瘍細胞集中度に比例する」という設定の下で実行されている。図10, 11, 12においてそれぞれ癌腫瘍細胞集中度, ECM濃度, MDE集中度の $t = 0$ (左上), 250 (右上), 500 (下) での空間分布を示す。

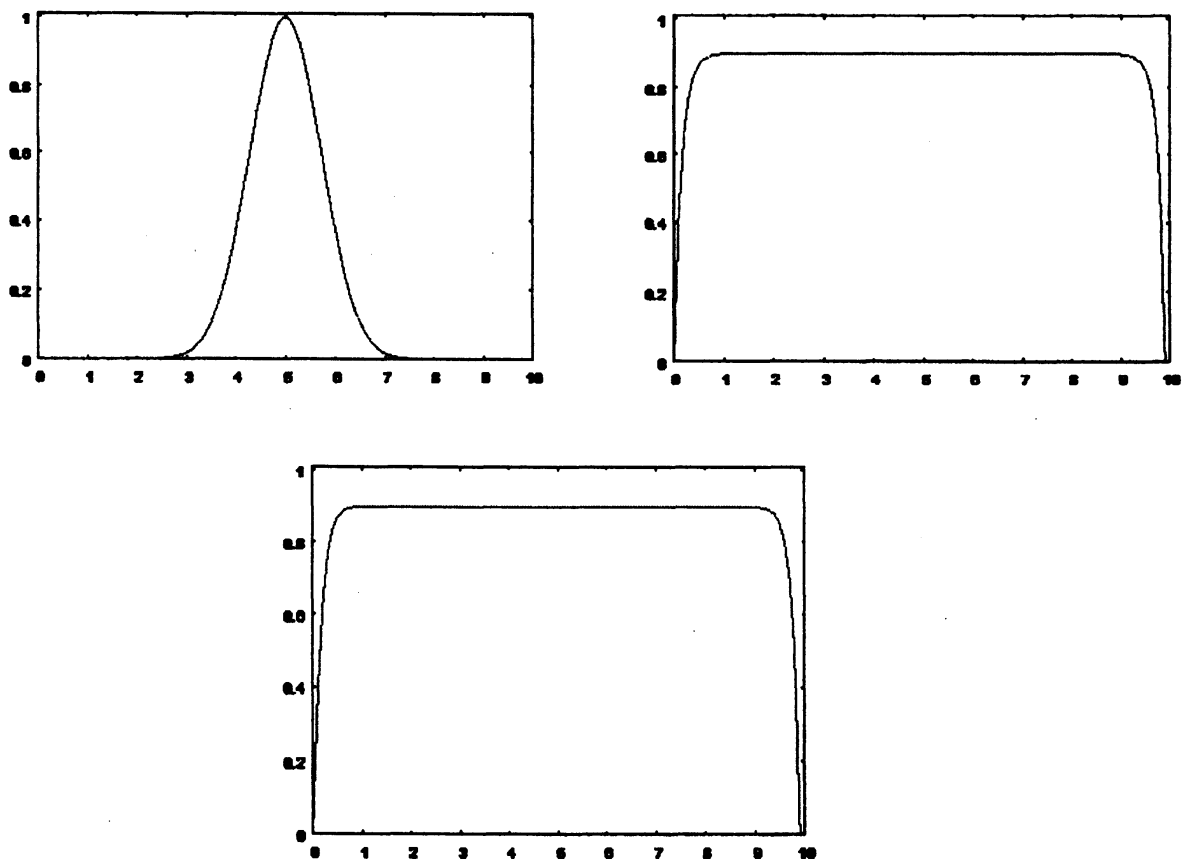


図10: 癌腫瘍細胞集中度 n の挙動

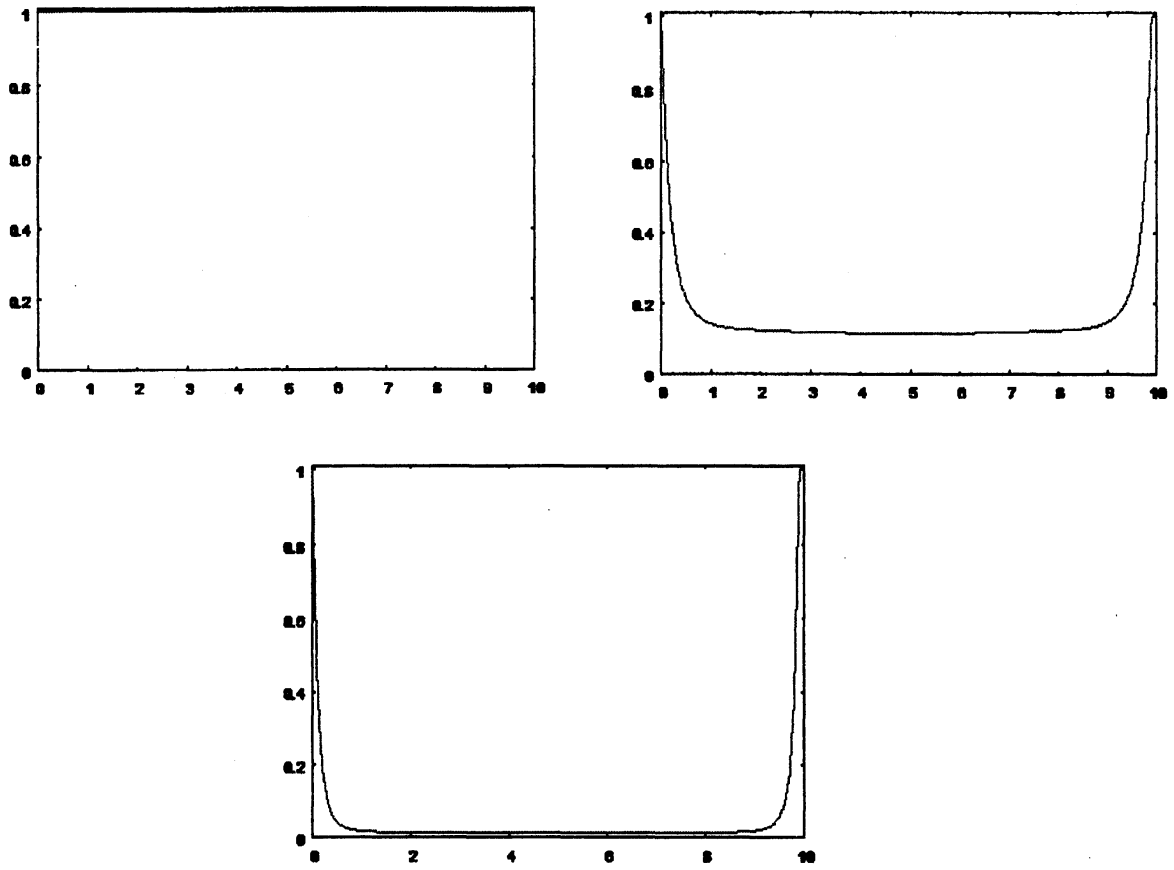
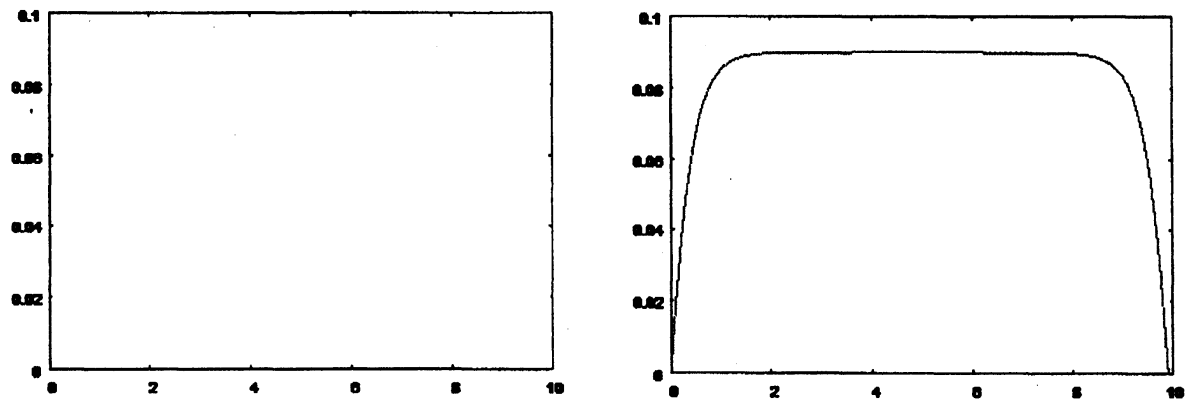


図 11: ECM 濃度 f の挙動



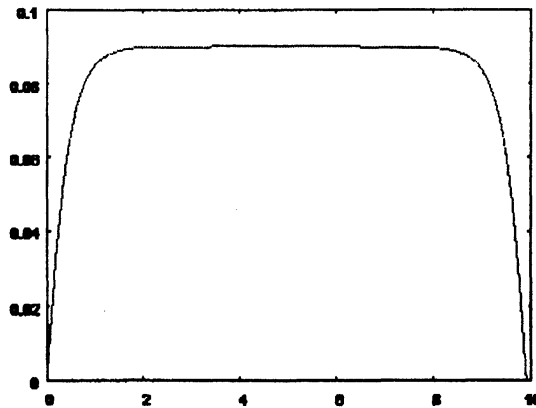


図 12: MDE 集中度 m の挙動

4. Hsp70 を考慮した癌浸潤モデル

本論文では, Hsp70 が癌腫瘍細胞のアポトーシスに影響を与えることを考慮し, Hsp70 の数値計算結果を癌浸潤モデルに組み込むモデルを提案する. 実際, Hsp70 の癌腫瘍細胞のアポトーシスに与える影響を以下の関数で表現する:

$$G(a_1, n) = \frac{0.9}{\pi} \left\{ (\tan^{-1} a_1 - 10) + \frac{\pi}{2} \right\} n.$$

実際, 上式では「癌腫瘍細胞のアポトーシスは癌腫瘍細胞集中度に比例する」という仮説を採用しているが, その比例定数 (以後, アポトーシス率と呼ぶ) は Hsp70 の量に影響を受けることを意味している. 実際, アポトーシス率を意味する関数の形状からもわかるように, 癌腫瘍細胞内の Hsp70 の量が多ければ多いほど癌腫瘍細胞のアポトーシス率も大きくなることがわかる. 更に, アポトーシス率は際限なく大きくなることはできず, ある値 (閾値) より小さいこともわかる. 我々が与えた関数ではその閾値は 0.9 に設定されている.

本節では, 第 2 節で得られた Hsp70 の数値シミュレーション結果とアポトーシス G を第 3 節で与えた癌浸潤モデルに組み込むことによって, 癌腫瘍細胞集中度の挙動がどのように変化するかを提示する. つまり, 本節で示す数値シミュレーションにおけるデータはアポトーシス G を除いて, すべて第 2 節及び第 3 節で与えたデータと同じである. 図 13, 14, 15 においてそれぞれ癌腫瘍細胞集中度, ECM 濃度, MDE 集中度の $t=0$ (左上), 400 (右上), 800 (左中央), 1200 (右中央), 1600 (左下), 2000 (右下) での空間分布を示す. また, 図 16 では $x=5$ における癌腫瘍細胞集中度 (上), ECM 濃度 (中), MDE 集中度 (下) の時間変化をそれぞれ示す.

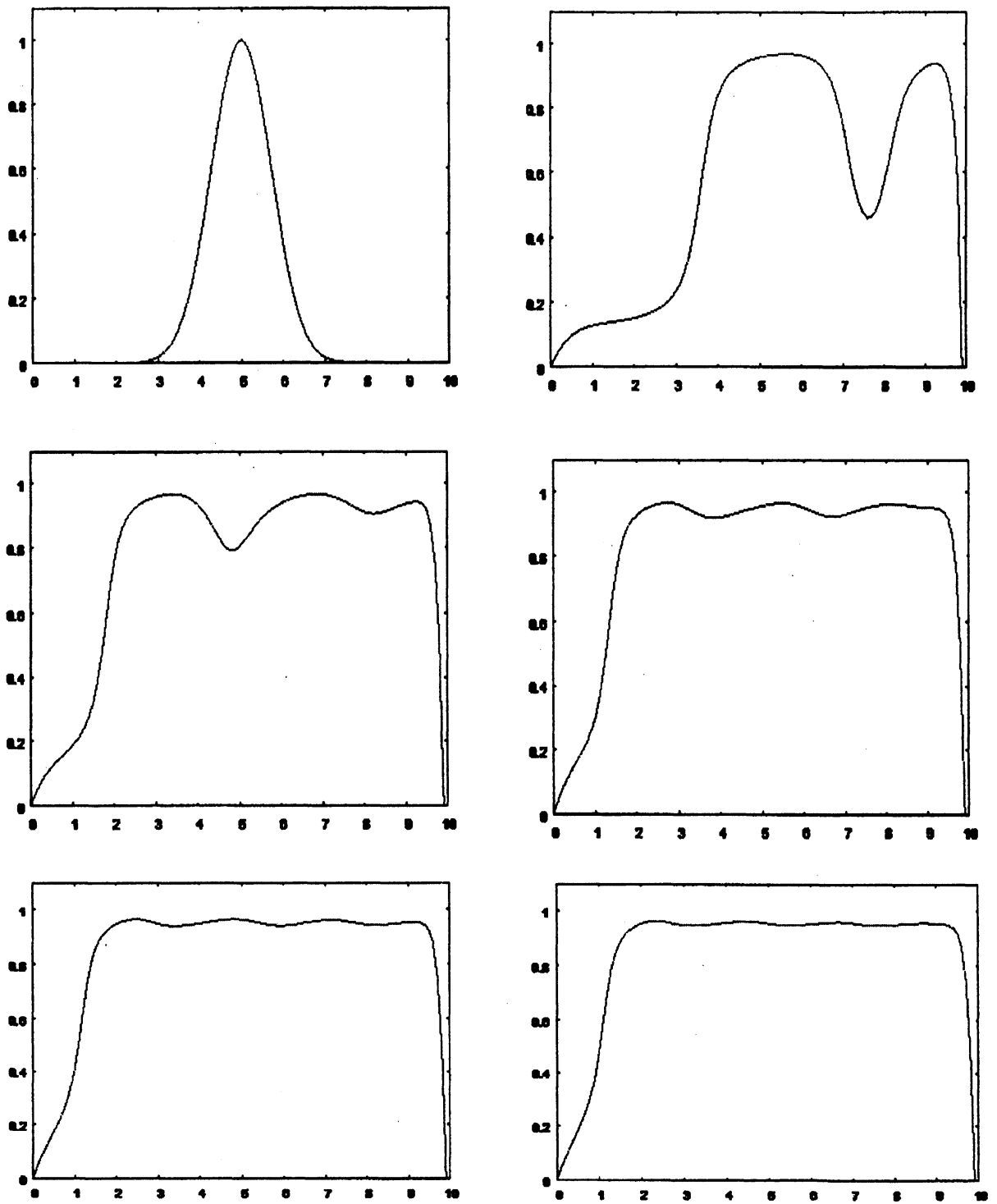


図 13: 癌腫瘍細胞集中度 n の挙動

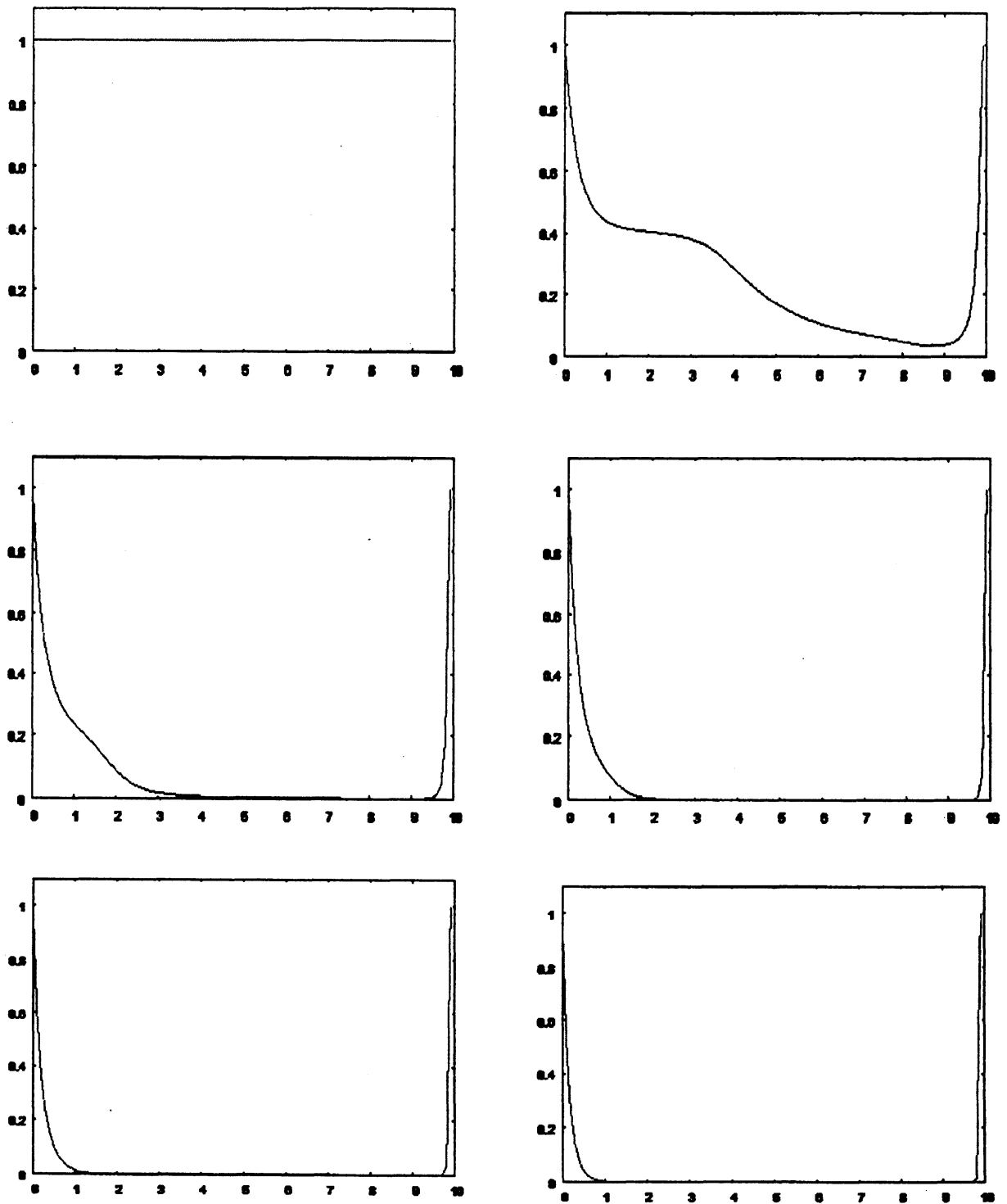


図 14: ECM 濃度 f の挙動

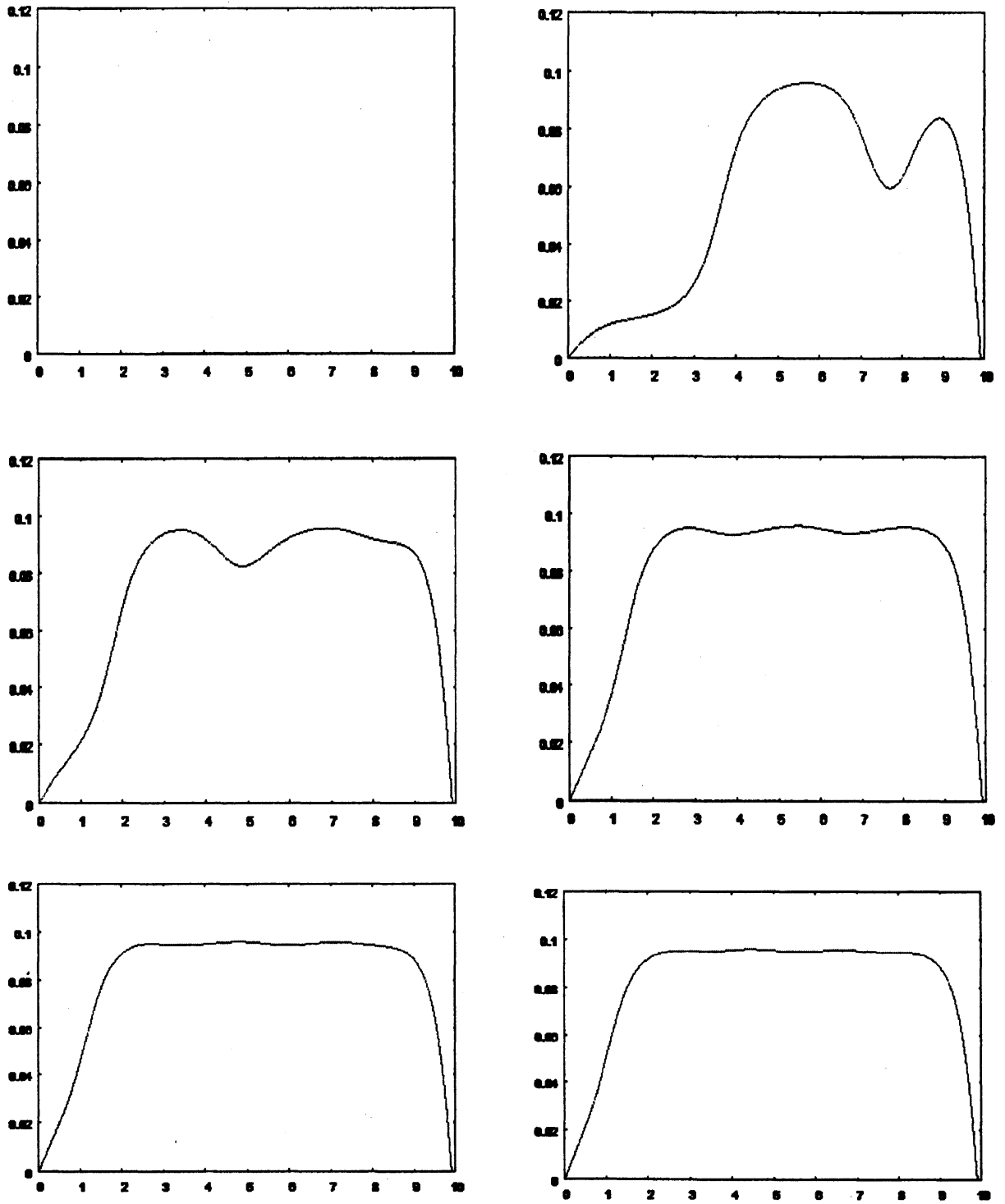


図 15: MDE 集中度 m の挙動

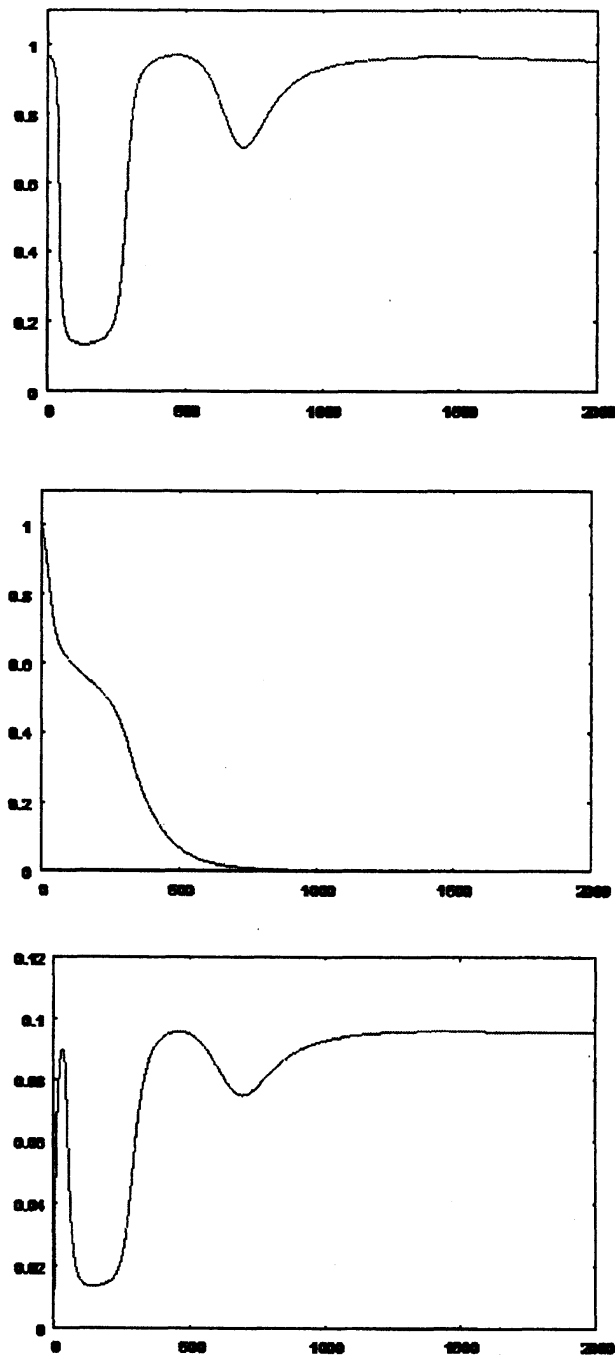


図 16: $x = 5.0$ での時間に関する挙動

5. 結言

現段階に至るまでに、様々な関数やパラメータを与えて Hsp70 を考慮した癌浸潤モデルの 1 次元シミュレーションを行った。その結果、与える関数やパラメータによって数値シミュレーション結果が大きく異なることが観測された。これは、我々の提案する数理モデルにおける関数やパラメータを適切な値に定めることができれば、実際の Hsp70 の影響を受けた癌浸潤現象を再現できる、つまり、現象のメカニズムを解明できる可能性を示唆している。

今後の課題としては、癌腫瘍細胞内の Hsp70 の量に関する実験データを入手することによって、Hsp70 合成プロセスを記述する数理モデルの妥当性を検証するとともに、その背後に存在するメカニズムを数理科学的な視点から解明することである。そのためには、数理モデルにおける関数やパラメータを如何に適切に定めるか、また、今回はあまり深く考慮していなかった境界条件や Hsp70 合成プロセスと癌浸潤現象のタイム・スケールの設定などを細かく検証する必要がある。更に、2 次元・3 次元シミュレーションを用いた癌浸潤現象の可視化へと発展させる必要がある。

References

1. M.A.J. Chaplain and A.R.A. Anderson, Mathematical modelling of tissue invasion, in L. Preziosi (Eds.), *Cancer Modelling and Simulation*, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, 2003, pp. 269-297.
2. 近藤元治, 新・第 4 の対ガン戦略ハイパーサーミア (癌の温熱療法), いわはし書店・真田堂, 2003.
3. 永田和宏, 森正敬, 分子シャペロンによる細胞機能制御, シュプリンガーフェアラーク株式会社, 2001.
4. Z. Szymańska, Mathematical modelling of heat shock protein syntheses in response to temperature change, personal note.
5. 内藤久士, 小林裕幸, 骨格筋におけるストレスタンパク質の発現とその役割, in 柳原大, 内藤久士編著, *運動とタンパク質・遺伝子*, NAP Limited, 2004, pp. 166-181.