

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03831

研究課題名(和文) 上皮間葉遷移現象の定量的・生理適合的評価を実現する革新的培養系の開発と展開

研究課題名(英文) Development and applications of novel cell culture systems for quantitative and physiologically relevant evaluation of epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

中西 淳(Nakanishi, Jun)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・グループリーダー

研究者番号：60360608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換(EMT)は細胞移動形態の変化であるが、がん治療の新しい標的として注目されている。ただ、その定量的・且つ生理適合的な評価系が未開拓であった。本研究では、研究代表者が独自に開発してきた光応答性材料において、生理的力学環境の制御および光反応の高感度化を実現することで、EMT評価系としての用途を見出した。また、数理解析に基づく新しいEMT定量化法の開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a change in migration phenotype. It is thought as a promising target for cancer therapy. However, there was no convenient methods for the quantitative evaluation of EMT in physiologically relevant conditions. In the project, we revised our original photoactivatable substrates from the viewpoint of manipulating cellular mechanical environments and improving the responsivity of the photochemical reactions to make the platforms more suitable for the EMT assay. We have also succeeded in developing a mathematical method for the EMT quantification.

研究分野：分析化学

キーワード：細胞移動 上皮間葉転換 がん メカノバイオロジー ケージド化合物

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉遷移 (EMT) は、上皮細胞が周囲の細胞との接着性を失い、間葉系細胞のように離れ離れになる現象である。この現象は、がん細胞が原発組織から浸潤・転移する際のキーステップと考えられており、そのため EMT 阻害剤が超早期がん治療の有効な候補として期待されている。ただ EMT には複数の遺伝子が関わっているため特定の蛍光試薬による判定は困難である。しかも細胞の移動挙動が「質的に」変化する現象であるため定量化も難しい。これらがハイスループットな評価系の開発の妨げとなっていた。

2. 研究の目的

本研究では申請者が進めてきた光応答基板による細胞集団の規格化とスイッチング特性を活かすことで、EMT 現象の定量的・ハイスループット評価系を開発する。さらに生体組織の力学特性やがん浸潤初期の環境変化を再現した生理適合的な EMT 評価系を開発する。これら開発研究により EMT 阻害剤のスクリーニングへの道筋が築かれ、さらには EMT 現象の環境依存性や遺伝子動態など発生メカニズムが明らかになる。これらはがん治療戦略に大きなインパクトを与えると期待される。

3. 研究の方法

(1) 生理適合的な力学特性を有する光応答基板の開発

カバーガラスの表面に混合比を調節したアクリルアミドとビスアクリルアミドの水溶液を添加し、ポリアクリルアミドゲル基板を作製した。このゲルの表面に、光活性化架橋剤 (Sulfo-SANPAH) を紫外光照射によって固定し、Sulfo-SANPAH の活性エステル基と PDL のアミノ基を反応させることで PDL 修飾表面を作製した。最後に PDL のアミノ基と末端に活性エステル基を有する PEG を反応させることで、生理的な力学特性を有する光応答基板を作製した。このゲル基板表面を任意のパターンで UV 照射し、そのパターンにしたがってイヌ腎臓尿管上皮由来 MDCK 細胞を附着させ、その後の 2 次照射で細胞接着領域を拡張することで細胞移動を誘導し、細胞集団移動挙動の観察から EMT の評価を行った。

(2) ハイスループット化のための高感度光応答基板の開発

2-ニトロベンジル基を有するバイオ界面材料は光照射に応じて界面の状態を動的に制御することができるため、さまざまな応用展開が示されていた。ただ、そのほぼ全ては、ベンジル位がメチル基や無置換体の化合物が使われてきた。本研究では、ハイスループット化を志向して、この構造から見つめなおした新たな材料開発を行った。具体的には、ベンジル位に tert-butyl 基を有するシラン

カップリング剤を開発し、そこにポリエチレングリコールアミンを修飾することによって、光応答的に細胞接着性が制御可能な基板を作製した。この基板を従来型の置換基がメチルの材料と比較することで、その光応答性並びに光毒性の影響を調べた。

(3) EMT の定量化法の開発

EMT は細胞間の接着性の質的な変化であるため、その定量化が容易でない。本研究では、コンフルエントの細胞群を対象に、その細胞の位相差画像を MATLAB 上に作成した粒子画像流速 (PIV) 法で解析することで、細胞の移動挙動を流れ場としてとらえ、その空間相関関数の係数を指標に EMT の進行度の指標とした。実験試料としては MDCK 細胞を用い、TGF- 刺激による EMT に伴う動きの変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 生理適合的な力学特性を有する光応答基板の開発

最初に基板の弾性率の細胞集団移動挙動への影響を調べるために、長方形の一次細胞パターンを作製し、その領域に接するように二次光照射を行ったところ、ヤング率が高い基板の方が速い移動速度を示すことが明らかとなった。次に、等方的な円形の一次細胞パターンを弾性基板上に作製し、その後全領域に二次光照射を行うことで、細胞移動を誘導したところ、ヤング率が 55 kPa の硬い基板上では、細胞が波のような特有の動き方をしながら集団移動するのに対して、ヤング率が 5 kPa の基板では、少し遅れてから細胞が一方方向にのみ大きく集団移動する特徴的な動き方が観察された。これらの結果から、基質の弾性率を変化させることで、全く異なる細胞集団移動の挙動が見られることが明らかとなった (図 1)。特に 55kPa の基板では、集団の周囲に EMT の初期に見られるリーダー細胞がより高頻度で観察された。以上より、本基板が生理適合的な各種力学特性を調節できることに加え、その力学特性が EMT に与える影響を調べられることが明らかになった。これらの知見は、細胞の動きのメカニ

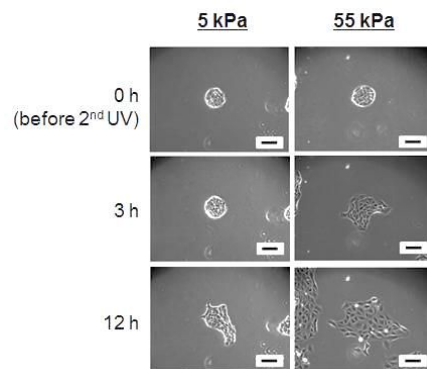
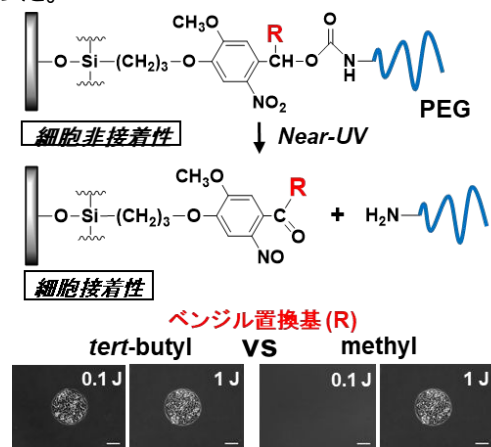


図 1. 光応答弾性基板での細胞集団移動挙動と力学特性の EMT への影響の評価

ズムの解明やガン研究などへの展開が期待される。

### (2) ハイスループット化のための高感度光応答基板の開発 (図2)

基板の光応答性を接触角変化および蛍光標識 BSA の吸着試験で調べたところ、新規に開発したベンジル位が tert-butyl の材料は、従来品よりも光分解速度が5倍速くなり、わずか 1J の光量で細胞の動的パターンニングが可能になったことが分かった。さらにこの照射量を暴露した細胞では、従来型で要する照射量(5J)とは異なり、細胞内の活性酸素種の増加量がほぼ無視できる程度に抑えることができた。以上の結果から、ベンジル位の置換基を変えることで、光応答基板の高感度・低光毒性化が達成された。以上より、新たに開発した基板では、細胞に直接 UV 光を暴露してもほぼ細胞毒性が無視できることが明らかになったために、マルチウェルプレートなどの基材上で細胞集団移動や EMT 解析をハイスループットに分析できる可能性が広がった。



### (3) EMT の定量化

MDCK 細胞に添加する TGF- $\beta$  濃度を変化させると、濃度上昇に伴い 値が大きくなることが分かった。また、TGF- $\beta$  阻害剤共存下で同様の実験を行うと、 値の増大は抑えられた。また、この際の EMT マーカーである ZEB-1 の発現をウェスタンブロッティングで解析したところ、 値と良い相関を示した。この結果は、 値は EMT の指標として有用であることを意味しており、数理的な解析で簡単に EMT の定量化が行えることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9件)

S. A. Abdellatef and J. Nakanishi, "Photoactivatable substrates for systematic study of the impact of an extracellular matrix ligand on

appearance of leader cells in collective cell migration", *Biomaterials*, 査読有, 169: 72-84 (2018).

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.03.045

K. Minami, T. Mori, W. Nakanishi, N. Shigi, J. Nakanishi, J. P. Hill, M. Komiyama, K. Ariga, "Suppression of Myogenic Differentiation of Mammalian Cells Caused by Fluidity of a Liquid-Liquid Interface", *ACS Applied Materials and Interfaces*, 査読有, 9: 30553-30560 (2017).

DOI: 10.1021/acsami.7b11445

J. Nakanishi, "Photoactivatable Substrates: A Material-based Approach for Dissecting Cell Migration", *The Chemical Records*, 査読有, 17: 611-621 (2017).

DOI: 10.1002/tcr.201600090

Y. Shimizu, M. Kamimura, S. Yamamoto, S. A. Abdellatef, K. Yamaguchi, J. Nakanishi, "Facile Preparation of Photoactivatable Surfaces with Tuned Substrate Adhesiveness", *Analytical Sciences*, 査読有, 32: 1183-1188 (2016).

DOI: 10.2116/analsci.32.1183

S. Marlar, S. A. Abdellatef, J. Nakanishi, "Reduced adhesive ligand density in engineered extracellular matrices induces an epithelial-mesenchymal-like transition", *Acta Biomaterialia*, 査読有, 39: 106-113 (2016).

DOI: 10.1016/j.actbio.2016.05.006

M. Kamimura, M. Sugawara, S. Yamamoto, K. Yamaguchi, J. Nakanishi, "Dynamic control of cell adhesion on a stiffness-tunable substrate for analyzing the mechanobiology of collective cell migration", *Biomaterials Science*, 査読有, 4: 933-937 (2016).

DOI: 10.1039/C6BM00100A

中西淳, "細胞メカノバイオロジーにおける力の計測方法", *ぶんせき*, 査読無, 493: 25-26 (2016).

K. Ariga, K. Minami, M. Ebara, J. Nakanishi, "What are the emerging concepts and challenges in NANO? Nanoarchitectonics, hand-operating nanotechnology and mechanobiology", 査読有, *Polymer Journal*, 48: 371-389 (2016).

DOI: 10.1038/pj.2016.8

M. Kamimura, O. Scheideler, Y. Shimizu, S. Yamamoto, K. Yamaguchi, J. Nakanishi, "Facile preparation of a photoactivatable surface on a 96-well plate: a versatile and multiplex cell migration assay platform", *Physical Chemistry Chemical Physics*, 査読有, 17: 14159-14167 (2015).

DOI: 10.1039/C5CP01499A

[学会発表](計10件)

中西淳, "細胞集団移動を探究するための光応答基板", 細胞を創る会 10.0, 2017年10月20日, 京都

中西淳, "材料を用いる細胞メカノバイオロジーのアクティブウオッチング", 分析化

学会第 66 年会, 2017 年 9 月 10 日, 東京

深山達也, 菅原路子, 野々村真規子, 中西淳, “上皮間葉転換の阻害剤のスクリーニングに向けた数理解析に基づく細胞集団性の定量化法”, 分析化学第 66 年会, 2017 年 9 月 11 日, 東京

中西淳, “光応答材料を用いる細胞集団移動現象の構成的分析”, 日本化学会第 97 春季年会, 2017 年 3 月 16 日, 横浜

J. Nakanishi, M. Kamimura, and K. Yamaguchi, “Photoactivatable compliant substrates for precise analysis of mechanobiological regulation in collective cell migration” WBC2016, 2016 年 5 月 17 日, モントリオール

J. Nakanishi, “Development of photoactivatable substrates and their applications to collective migration studies”, ICBS2016, 2016 年 11 月 28 日, 東京

中西淳, S. Marlar, “細胞外マトリクスリガンドの密度低下によって誘導される上皮間葉転換”, 第 37 回日本バイオマテリアル学会, 2015 年 11 月 9 日, 京都

中西淳, “材料を用いる細胞集団移動の解析”, 第 8 回 ChemBio ハイブリッドレクチャー, 2015 年 10 月 3 日, 東京

中西淳, 山口和夫 “細胞移動研究のためのマテリアルバイオロジー的研究ツール”, 第 35 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 13 日, 金沢

J. Nakanishi, “Photoactivatable substrates for dissecting biology and mechanics in collective cell migration”, International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 2015 年 7 月 29 日, 筑波

〔図書〕(計 1 件)

J. Nakanishi, "Mechanobiology", in *Materials Nanoarchitectonics*, K. Ariga and M. Ebara Ed. Wiley, 2018, 12 pages of total 336 pages.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 上皮間葉転換誘導細胞阻害剤  
発明者: 大村智, 高橋洋子, 中島琢自, 松本厚子, 中西淳

権利者: 北里大学, 物材機構

種類: 特許

番号: P2016-18690

出願年月日: 2016 年 9 月 26 日

国内外の別: 国内

名称: シャーレ型細胞培養容器

発明者: 山口和夫, 伊藤倫子, 山本翔太, 中西淳, 山本浩司

権利者: 神奈川大学, 物材機構, 株ニイガタ

種類: 特許

番号: P2015-167060

出願年月日: 2015 年 8 月 26 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 淳 (NAKANISHI, Jun)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・グループリーダー

研究者番号: 60360608

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山口 和夫 (YAMAGUCHI, Kazuo)

神奈川大学・理学部化学科・教授

研究者番号: 20114902

菅原 路子 (SUGAWARA, Michiko)

千葉大学・工学部機械工学科・准教授

研究者番号: 30323041