

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07384

研究課題名(和文) がん浸潤時における細胞骨格パターン形成機構の3次元多重染色超解像顕微鏡による解析

研究課題名(英文) The spatial patterning mechanisms of cytoskeletons during cancer cell invasion analyzed by 3D multitarget super-resolution imaging

研究代表者

木内 泰 (Kiuchi, Tai)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70443984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞は、周囲の相互作用し、細胞骨格と接着斑を3次元的に適切なパターンで再配置して、浸潤転移を行う。この細胞骨格の3次元的な再構成機構を研究するために多重染色超解像顕微鏡法IRISを3次元イメージングへと発展させた。そのためにHILO照明と補償光学系を光路に組み込み、背景光の抑制やZ分解能の改善、Zドリフトの補正方法の詳細な検討を行った。そして細胞頭頂部でアクチン線維や微小管が3次元的に絡み合っている様子が可視化できた。さらに細胞骨格の再構成を引き起こすEGF受容体が、EGF刺激に依存してアクチンストレスファイバー間の隙間に集積し、エンドサイトーシスされることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで超解像顕微鏡法を3次元化するために様々な取り組みが行われてきた。しかし、蛍光退色や背景光、Z分解能、測定中のZドリフトなど励起条件や測定条件で検討する課題が多い。さらに多重染色超解像イメージングは、標的の標識率や複数の蛍光色素を用いることによる色収差や球面収差の問題が追加される。IRISは、結合解離プローブを用いることで、標識率の上限を突破し、さらに同一の蛍光色素を結合解離プローブに接合することで、この色収差や球面収差の問題を回避している。IRISを3次元イメージングへと発展させることで、今後、細胞や組織の3次元的な構造の詳細が明らかになることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells rearrange the cytoskeletons and focal adhesions in appropriate 3D patterns through interactions with the surroundings for cancer invasion. To study the 3D rearrangement mechanism of the cytoskeletons, multitargets super-resolution imaging IRIS was developed into 3D imaging. For the 3D imaging, HILO illumination and adaptive optics were inserted into the optical path of the microscope. To reduce the background light, the Z resolution and Z drift, the excitation conditions were examined in detail. Then, the 3D networks of actin filaments and microtubules in the apical region of cells were visualized. Furthermore, it was found that EGF receptors, which induce the rearrangement of cytoskeletons, are accumulated in the interspace between actin stress fibers by EGF stimulation and then are endocytosed.

研究分野：細胞生物学

キーワード：超解像顕微鏡法 アクチン 細胞骨格

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞が浸潤するためには、アクチン線維や微小管、接着斑が細胞内で3次元的に適切なパターンで配置される必要がある。細胞内ではアクチン線維は重合と脱重合を繰り返し、微小管も伸長と退縮を繰り返すため、これらの線維の配置パターンは極めて動的である。さらに細胞外基質や周囲の細胞によって接着斑の配置パターンも影響を受ける。このことから細胞は、周囲の環境によって細胞骨格や接着斑を適切なパターンで配置し、方向性のある移動という高度な機能を実現していると予想される。この協調的なシステムを理解するためには、光学顕微鏡では一見すると細胞内を縦横無尽に走っているように見える細胞骨格と接着斑の3次元的な位置関係の詳細な解析は重要である。このような解析には、近年開発された光学顕微鏡の分解能(約200 nm)を超えた超解像顕微鏡(分解能:20-100 nm)が有効である。しかし、分解能がタンパク質のサイズに近づいたため、抗体などによる標識の不均一さが目立ち、タンパク質の分布の正確な可視化が難しいことが問題となっていた。さらに蛍光色素を用いるために多種類のタンパク質を染め分け、同一の細胞で観察することも難しかった。このため3種類の細胞骨格と接着斑及びそれらを制御する多種のタンパク質群によって引き起こされるがん細胞の移動・浸潤の超解像解析には困難が付きまとっていた。

### 2. 研究の目的

転移性のがん細胞は、生体組織中の細胞外基質や周囲の細胞と相互作用し、細胞骨格と接着斑を3次元的に適切なパターンで再配置する。この細胞骨格の3次元的な再構成機構は、がん細胞の浸潤メカニズムを理解する上で重要である。研究代表者は、可視化できるタンパク質の種類に理論上の制限のない高密度・多重染色超解像顕微鏡法 IRIS を開発し、同一の細胞でアクチン線維と微小管、中間径フィラメント、接着斑の超解像イメージングを可能にしている(Kiuchi et al., Nat. Methods, v12: 743-746, 2015)。本研究では、IRIS とライトシート状のレーザーで照明する HILO 照明と補償光学系を組み合わせることで3次元多重染色超解像顕微鏡法を構築する。そして光学顕微鏡では一見無秩序に見える細胞骨格や接着斑の分布に秩序と法則性を見出し、がん浸潤の分子機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

高密度・多重染色超解像顕微鏡法 IRIS は、蛍光1分子の高精度な位置決めに基づく超解像顕微鏡法 PALM/STORM の原理を応用している。IRIS では標的タンパク質を標識するため、標的に結合して離れない蛍光タンパク質や蛍光抗体に代わり、標的に結合解離する蛍光プローブを用いる。標的に結合した時の蛍光プローブを蛍光1分子画像として捉え、プローブの中心位置を光の回折限界以下の精度で決定する。多数の蛍光プローブの中心点を積算することで高分解能画像を再構築する(図1)。従来の超解像顕微鏡法では、標的に結合させた蛍光タンパク質や蛍光抗体を標識に用いる。このため標的分子の標識率は、内在性の標的分子の発現量に対する蛍光タンパク質融合標的分子の発現量比や蛍光抗体のサイズ(10 nm 以上)によって制限を受ける。例えば、20 nm の分解能の超解像顕微鏡法で、20 nm に1個の密度で蛍光標識されたアクチン線維を可視化した場合、アクチン線維は、20 nm 毎に隙間のある物体として画像化されてしまう。20 nm の分解能の顕微鏡ならば、標識密度は少なくとも10 nm に1個でなければ、アクチン線維を連続的な物体として画像化できない。つまり分解能が高くなればなるほど、標的分子の分布を忠実に可視化するためには高い標識率が必要となる。IRIS では結合解離プローブを用いるために、多数のプローブの結合を捕捉することで標的の標識率を上限なく高めることができる。このため高密度標識によって、標的分子の分布を忠実に画像化できる。さらに結合解離プローブは、絶えず入れ替わっているため、標的に強く結合する蛍光抗体や蛍光タンパク質による標識と比べて、蛍光退色によるシグナルの消失がない。このため IRIS は、多数枚の蛍光画像が必要になる3次元超解像イメージングに適している。

標的に結合していない蛍光プローブは、溶液中を拡散しているために蛍光1分子として捉えられず、背景光となる。しかし、蛍光プローブの濃度が十分低く、さらに TIRF やライトシート状のレーザーで励起範囲を狭くすることで、この背景光を抑え、蛍光1分子可視化を可能にする。さらにプローブは標的に結合解離しているので簡単に洗い流して、別の標的に対するプローブを加えることができ、多重染色超解像を取得することができる。すでに研究代表者は、細胞骨格や接着斑に局在するタンパク質のフラグメントから結合解離プローブを作成し、それらの細胞内構造の多重染色超解像を報告している(Kiuchi et al., Nat. Methods, 2015)。

本研究では、ライトシート状のレーザーを斜めに照射する HILO 照明と IRIS を組み合わせることで、Z スライス超解像画像を得ることを可能にした。さらに顕微鏡とカメラの間に補償光学系を導入することで、astigmatism を利用して蛍光1分子の Z 方向の位置を高精度に決定し、IRIS を3次元超解像イメージングへと発展させた。

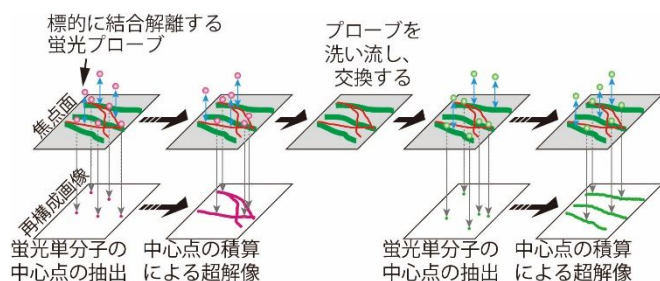


図1: 超解像顕微鏡法 IRIS の原理

#### 4. 研究成果

IRIS を 3次元超解像イメージングへと発展させるため、照明方法や Z 方向の分解能の改良、測定中の Z ドリフトの補正方法の詳細な検討を行った。IRIS では、標的タンパク質に結合解離する蛍光プローブを用いて標的を標識する。このため、標的と結合していないプローブが溶液中を拡散し、背景光を増大させる。この高い背景光は、蛍光 1 分子の中心点を決定する精度を落とし、中心点を積算して再構築される超解像画像の分解能を低下させてしまう。これまでこの背景光を抑えるために主に TIRF 照明で IRIS 超解像イメージングを行ってきた。しかし、この方法では、カバーガラス近傍の超解像画像しか得ることができない。そこで、本研究では、励起レーザーをシート状にしてサンプルに斜めに照射する HILO 照明を導入して背景光を抑え、さらにカバーガラスから数十  $\mu\text{m}$  離れた高さの超解像画像を得られるようにした。適切な励起条件を検討するためにシートの厚さや入射の位置、角度、方向を可変にした光学系を確立した。そして直径 100 nm の蛍光ビーズをアガロースゲルに埋め込み、そのビーズの蛍光画像を用いて励起の XY 範囲や Z 範囲、観察するサンプルの高さに応じた適切な光路の条件を調べた (図 2)。

また補償光学系 MicAO (Imagine Optic 社) を光路に導入し、Astigmatism によって Z 方向の分解能を光の回折限界以下にした。そして Z 方向の分解能の精度や観察視野内での範囲など、MicAO の実用的な測定条件を検討した。IRIS は、多数の蛍光プローブの結合イベントを捉えて高精細な超解像画像を再構築するため、測定時間が数十分から数時間と長くなる。このため測定中の Z ドリフトは、Z 方向の分解能に大きな影響を及ぼす。そこで、Z ドリフトを抑えるための様々な測定条件や機器の検討を行った。これらの測定方法及び条件の改良によって、Z 分解能が 150 ~ 200 nm 程度の細胞頭頂部のアクチン細胞骨格や微小管の 3次元超解像画像を得ることができた (図 3)。

さらに EGF 受容体からのシグナル伝達による細胞骨格や接着斑の空間パターンの形成メカニズムを調べるために EGF 受容体と細胞骨格や接着斑の空間的位置関係を調べた。EGF 受容体は、EGF と結合すると 2 量体を形成し、細胞内にシグナルを伝えるとともにエンドサイトーシスされ、細胞内に取り込まれる。HeLa 細胞を EGF 刺激した結果、EGF 受容体は細胞底面の Clathrin の集積した Clathrin coated pit に集積した。その後、細胞を固定し、アクチン線維と接着斑の IRIS 超解像イメージングを行った。その結果、EGF 受容体が集積するエンドサイトーシス部位は、アクチンストレスファイバー間の隙間に位置し、接着斑とは重なっていなかった。この結果は、EGF 受容体のエンドサイトーシス部位とアクチン線維、接着斑の位置関係を規定するメカニズムの存在を示唆している。

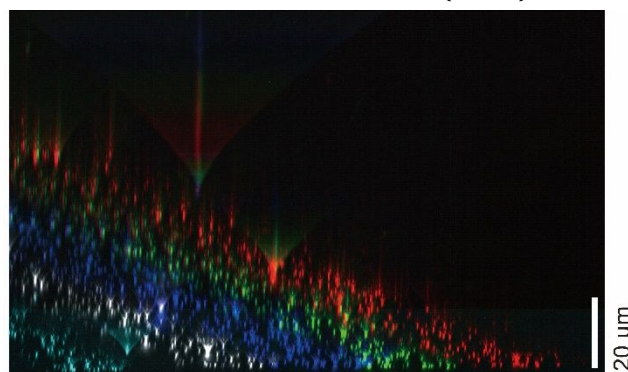


図 2 HILO 照明のライトシート状のレーザーの入射位置を変えた場合の励起範囲。アガロースゲルに蛍光ビーズ (直径 100 nm) を埋め込み、Z スタック蛍光画像を取得し、3次元画像を作製した。上記の画像は、蛍光ビーズの 3次元画像を X-Z 方向から見ている。レーザーの入射位置を変えた X-Z 画像を重ね合わせている。それぞれの色は、ある入射位置の場合の励起される蛍光ビーズを示している。

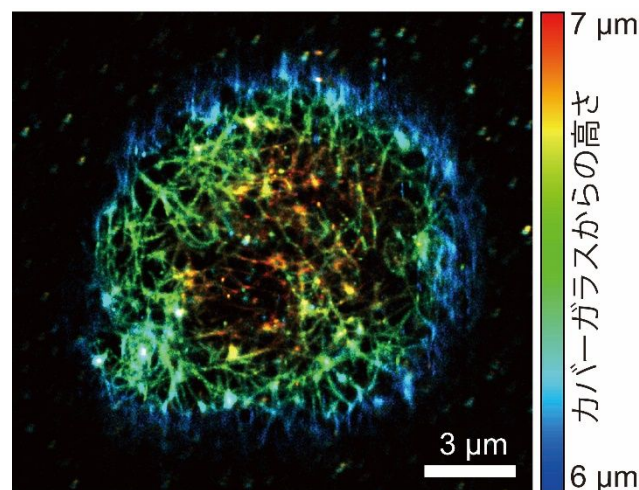


図 3 XTC 細胞の細胞頭頂部のアクチン線維の 3次元 IRIS 超解像画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamashiro S, Taniguchi D, Tanaka S, Kiuchi T, Vavylonis D, Watanabe N.	4. 巻 116(1)
2. 論文標題 Convection-Induced Biased Distribution of Actin Probes in Live Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 142-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2018.11.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tai Kiuchi, Naoki Watanabe
2. 発表標題 IRIS super-resolution microscopy enables to image multiple protein distributions in a single cell
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tai Kiuchi, Sawako Tamashiro, Naoki Watanabe
2. 発表標題 The 3D imaging of cytoskeletons by IRIS, multi-target super-resolution microscopy with high density labeling
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木内 泰、渡邊 直樹
2. 発表標題 高密度・多重染色超解像顕微鏡法IRIS の3次元イメージングへの発展
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木内 泰
2. 発表標題 高密度・多重染色超解像顕微鏡法IRIS - 多種のタンパク質を同一細胞で可視化する技術 -
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 10.0 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木内 泰
2. 発表標題 多種のタンパク質の高密度・連続多重染色を実現した超解像顕微鏡法IRISの原理と実践
3. 学会等名 第50回バイオサロン (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 OBSERVATION METHOD USING BINDING AND DISSOCIATION PROBE	発明者 木内 泰、渡邊 直 樹、三好 拓志、 佐々木 瞭	権利者 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、15/696,089	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 OBSERVATION METHOD USING BOND DISSOCIATION PROBE	発明者 木内 泰、渡邊 直 樹、三好 拓志、 佐々木 瞭	権利者 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、16761865.1	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 結合解離プローブを用いた観察方法	発明者 木内 泰、渡邊 直 樹、三好 拓志、 佐々木 瞭	権利者 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、6422172	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----