

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12775

研究課題名(和文) 運動界面によるがん細胞の転移性評価指標の導出

研究課題名(英文) Development of novel index for metastatic cancer cell evaluation giving mechanical stimuli by kinesin-driven active matrix

研究代表者

川村 隆三 (Kawamura, Ryuzo)

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：50534591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：架橋した微小管のネットワークとキネシンでマイクロメートルの揺らぎを発生する材料「運動界面」を基板上に構築し、細胞の動的力学環境としてがん細胞の転移性を調べるツールの実現を目指した。運動界面の発生する揺らぎ運動の動態追跡や出力の直接計測によって力学的な解析を進めた結果、攪拌効果の方向特性や出力の定量的な解明に成功した。運動界面の微小な揺らぎの力学場に加えて、プログラム運転可能な流路系を構築して組み合わせることで、動的力学環境下での挙動に応じて細胞を分画する技術を確立した。今後、臨床応用に有意な細胞解析技術へと発展させるために医科大学との共同研究体制を整えるに至っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微小管・キネシンをはじめとするモータータンパク質は、細胞運動の根幹を成す分子であり、生物物理学や分子生物学の観点で解明研究が数多く展開されてきたが、運動機能を応用する研究では、分子の小ささに着目した報告がほとんどであった。本研究の手法は架橋した微小管のネットワークでマイクロメートル、ナノニュートンのスケールアップした運動を実現し、有益な応用の道筋として細胞の特徴を動的微小環境下で調べる新しい指標の獲得が期待できるものである。例えば、がん細胞の未知なる転移性を見抜く新技術に発展する可能性を秘めており、医工学的な有益性から社会的意義は大きいと言える。

研究成果の概要(英文)：An active matrix which was obtained by crosslinking microtubules to a network and driven by kinesin motor proteins decorated on a solid substrate was developed in this research project toward realization of mechanically active matrix to predict metastatic property of cancer cells with expectation to find a new pathological index. The driving property of the active matrix was found to agitate micro-objects actively in isotropic manner and to generate force up to several nanonewtons. In addition to the generation of microscopic fluctuation by the active matrix, micro-fluidic device was established to realize automatic liquid handling and salvage of the cells exposed to mechanical stimuli on the active matrix and separate them according to the adhesion properties in such the dynamic condition. As the active matrix can induce formation of actin aggregations in metastatic cancer cells, this cell analysis method has potential to allow detection of metastatic cancer cells.

研究分野：生物物理化学

キーワード：運動界面 がん細胞 接着挙動 細胞分離技術 力学計測 モータータンパク質 キネシン 微小管

1. 研究開始当初の背景

モータータンパク質で駆動する独自開発の「運動界面」を細胞環境材料に利用すると、細胞スケールの揺らぎ力学刺激を与えることでがん細胞が特異な変形挙動を示すことを見いだしていた。このことから「がん細胞は、転移挙動に周囲の揺らぎを利用するか」という中心的な問いをもって本課題を立案した。

細胞の変形・遊走挙動は、アクチンなどの細胞骨格の動的再構築で成り立っており、細胞を取り巻く力学環境の動静にも影響を受ける。既存の研究では、ソフト接着基板の使用や、弾性接着基板の伸縮、培養液流動のずり応力など、生体内の力学環境を模倣する手法でこれまでも動的環境に対する細胞の応答挙動が報告されていたが、未開拓の部分もあった。例えば、生体内では自律的に変形する細胞が集団となって動的な細胞環境をなしており、各細胞変形が様々な方向・タイミングで多点に発生する。このような細胞スケールの力学的な揺らぎは生体内の様々な組織に発生すると考えられるが、培養系で再現する手法が無かった為、もたらず影響について調べることが難しかった。そこでこの問題に取り組むツールとして運動界面を利用することにした。

これまでの研究では、微小管（細胞骨格）とキネシン（モーター）のモータータンパク質系で運動界面を構築し、そこへ転移性の高いがん細胞（マウスメラノーマ）を播種すると、揺られながら接着して、一部の細胞が特異な突起を形成することを発見していた（図1、2015Kawamuraら *ACS Biomater. Sci. & Eng.*）。さらに、運動界面に接着タンパク質を添加して細胞の接着性を改良すると、接着した細胞の内部にアクチンの凝集が形成されることを明らかにしていた。がん細胞が転移する際に形成する浸潤突起内部のアクチンメッシュ構造と、運動界面上で形成されたアクチン凝集とに類似性がみられたことから、運動界面の揺らぎ力学刺激によってがん細胞の潜在的な転移性が顕在化されている可能性が考えられた。すなわち、本来細胞の構造形成と運動を担う微小管・キネシンの材料で構成する運動界面は、従来のシャーレの静的な力学環境では見られない、生体内の細胞群が発するような細胞スケールの力学的な揺らぎを模倣し、がん細胞の転移に関わるような動的挙動を引き出している可能性があると考えた。

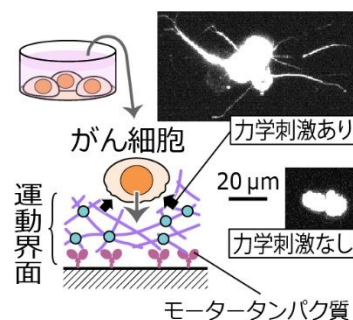


図1: 運動界面での細胞接着

2. 研究の目的

がん細胞の潜在的な転移性を顕在化させて細胞を計測する新しい指標を得ることを最終的な目標に据え、運動界面を培養環境で細胞に力学刺激を与えるツールとして開発することを目的とした。基本的な知見として、運動界面の揺らぎ力学刺激に対するがん細胞の応答挙動を観測していたが、出力特性と動作条件の相関解明など、運動界面の駆動様態が未解明であった為、これを明らかにすることにした。また、細胞スケールの揺らぎ力学刺激の発生だけでなく、生体内で細胞が置かれる動的力学環境を多面的に模倣したり、接着挙動に追加する解析で細胞の詳細を解明できるようにしたりすることで、従来の静的培養環境では可視化されなかったようながん細胞の特徴を追う方針とした。臨床応用に繋がる基盤技術を獲得するという将来に向けた目的を掲げて研究を実施することとした。

3. 研究の方法

運動界面を活用したがん細胞計測指標の獲得を目指し下記の3工程に分けて研究を実施した。

- (1) 細胞の力学刺激ツールとしての駆動・出力特性の解明：
運動界面の動態解析と直接的な力学計測による細胞スケールの出力特性解明と駆動条件のもたらず効果の解明に取り組んだ。
- (2) 生体内に近い細胞力学環境の模倣と細胞操作性についての開発：
ポンプとバルブをプログラムで制御する流路系を構築し、運動界面に流動場の力学条件を付加し、同時に操作の再現性向上と簡便化、および細胞回収操作の実現を図った。
- (3) 高接着性がん細胞株の選別・収集による細胞株樹立と生物学的特徴の解明への基盤構築：
運動界面に接着した細胞を酵素による剥離処理と流路系を活用して回収した後、生化学的な検証に向けて培養して増殖させた。細胞の詳細な解析に向けて医科大学との共同研究体制を構築した。

4. 研究成果

(1) 細胞の力学刺激ツールとしての駆動・出力特性の解明 :

細胞スケール(マイクロメートル)で揺らぎを発生する力学ツールとして、キネシンの剥離・重点によって駆動の機能を再生できることを初年度に専門誌に発表した(2019Kawamuraら、Japanese Journal of Applied Physics)事に続き、揺らぎによる攪拌の様子を詳細に追跡して特徴を明らかにした。振動モーターによる容器全体を揺らす方式と比較して、キネシンのナノメートルの駆動ステップが微小管のネットワークに統合されて繰り返される攪拌の動作は、微粒子をトレーサーとして動態を追跡すると、粒子間距離が等方向的に変化し、振動モーターでは一軸的に制限されるのと対照的であることを見出した。つまり、細胞を対象にした場合、ミクロスケールで方向に偏りのない揺らぎをもたらすという点で独特の力学刺激をあたえることがわかった。この成果は、プレプリントとして2022年にChemRxivに発表しており、現在は専門誌での発表に向けて投稿準備を進めている。

運動界面の出力特性については、ガラスマイクロニードルを用いた計測装置を作製し、マイクロメートルスケールの変位、ナニュートン規模の出力検出に成功した。また、ガラスマイクロニードルの曲げで出力を計測する中で、周期的な出力変化も観測している。エネルギーであるアデノシン三リン酸の濃度や溶液塩濃度の影響を受けて周期性が変化することを見出しており、多分子のモータータンパク質で駆動する力学ツールに独特な駆動特性が備わっていることが示唆された。細胞の力学刺激ツールとしては、このような周期性も細胞挙動を明らかにする要素になることも考えられる為、細胞の応答挙動との相関解明が期待される場所であるが、本研究の計画の範囲内では下記に述べる流路系の構築に注力した為、解明には至らなかったため今後の課題とする。出力計測の成果については、日本生物物理学会で発表(口頭・オンライン)に至っている。

(2) 生体内に近い細胞力学環境の模倣と細胞操作性についての開発 :

送液ポンプと流路変更用の切替えバルブをプログラムで制御する流路系を構築し、運動界面に流動場の力学条件を付加した。従来的には、手動の溶液操作で再現性に問題があった点を解決し、操作の安定・簡便化も実現できた。微小管のネットワークで構築する運動界面は溶液のずり応力によって容易に破壊される恐れがあったが、微粒子の駆動様態追跡から、基板上で偏りなく力学刺激を発生できることを確認している。また、自動送液による安定な送液だけでなく、電動バルブを接続してプログラム運転することで、細胞を運動界面に播種した後、免疫染色による細胞形態変化の顕微鏡撮影および細胞回収操作を自動的に再現よく行う技術を確立した。様々な細胞種を様々な力学刺激条件で網羅的に調べることで、がん細胞に潜む転移性の予測など臨床応用に有益な指標の獲得が今後期待される。

(3) 高接着性がん細胞株の選別・収集による細胞株樹立と生物学的特徴の解明への基盤構築 :

運動界面と流路を組み合わせることで、細胞を動的力学環境で接着し剥離する過程で細胞を分離することが可能になった為、高転移性株として知られるマウスメラノーマ細胞(B16F10)を分画し、継続的な培養でさらなる生化学的な解析に向けて増殖することに成功した。大学間協定の枠組みを活用して、埼玉医科大学の研究者と共同研究を開始し、二次元電気泳動による発現タンパク質の違いを解析し、動的力学環境への応答挙動の違いが意味するところを解明している予定である。また、本研究で開発した運動界面を駆使した細胞解析・分離の手法を医工学的に有用な技術へと発展させる狙いで、埼玉医科大学から臨床由来の組織片・細胞試料の提供を受ける共同研究の体制を構築した。今後は、臨床応用に向けた開発も展開する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keisuke Meguriya, Tsuyoshi Yokoyama, Naritaka Kobayashi, Hiroshi Y. Yoshikawa, Seiichiro Nakabayashi and Ryuzo Kawamura	4. 巻 -
2. 論文標題 Agitation of non-Brownian particles by active matrix of kinesin and microtubule motor proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26434/chemrxiv-2022-p5xsl	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ken-Ichi Sano, Ryuzo Kawamura, Yoshihito Osada	4. 巻 -
2. 論文標題 Intelligent gels-artificial soft tissue for the next era	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymer International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pi.6305	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Ryuzo Kawamura
2. 発表標題 Enhanced movement of kinesin-driven microtubules by crosslink and the application as active material
3. 学会等名 International Workshop on Emergence of Life-Nano-Bio Science（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuzo Kawamura, Keisuke Meguriya, Tsuyoshi Yokoyama, Daiki Uehara, Naritaka Kobayashi, Seiichiro Nakabayashi, Hiroshi Y. Yoshikawa
2. 発表標題 Active network of motor proteins as artificial dynamic microenvironment for cells
3. 学会等名 ISAGMSM(The 3rd International Symposium for Advanced Gel Materials & Soft Matters)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuzo Kawamura, Daiki Uehara, Naritaka Kobayashi, Seiichiro Nakabayashi, Hiroshi Yoshikawa
2. 発表標題 Kinesin-driven microtubule network for mechanical cellular stimuli
3. 学会等名 NMC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuzo Kawamura
2. 発表標題 ATP-fueled active network of microtubules as a dynamic environment for cells
3. 学会等名 2nd GLowing Polymer Symposium in KANTO (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川村隆三
2. 発表標題 細胞骨格タンパク質を利用した動的ゲル材料の開発
3. 学会等名 高分子埼玉地区懇話会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻 成瑛、小林 成貴、中林 誠一郎、吉川 洋史、川村 隆三
2. 発表標題 架橋微小管-キネシン運動系の出力計測とその駆動環境との相関
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------