

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15373

研究課題名（和文）癌転移における細胞の内圧緩和機構の解明に向けた外圧印加型塩素イオンセンサーの開発

研究課題名（英文）Development of an external pressure-applied chloride ion sensor to elucidate the mechanism of internal pressure relaxation of cancer cells during metastasis

研究代表者

山岸 彩奈（Yamagishi, Ayana）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：00778293

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：癌細胞で発現の亢進が確認されている塩化物イオンチャネルClic1は、低浸透圧刺激を加えた際の細胞容積調節に関与している。我々は癌細胞が浸潤時に間隙を通過する際の細胞変形に伴う細胞膜伸展によってClic1が開口し、同イオンを排出することで容積を減少させ、浸潤を促進すると考えた。そこで本研究では、原子間力顕微鏡を用いて癌細胞に外力を印加した際の塩化物イオン排出能評価方法を構築した。その結果、癌浸潤と塩化物イオン排出能には相関性があることを見出し、癌細胞が機械刺激に应答して同イオンを排出する際にClic1が寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在癌診断では、患者から得られる細胞あるいは組織を染色し、癌細胞が含まれるかどうかを確認する細胞診・組織診が用いられている。一方で、染色した細胞の異形や細胞配列を正常細胞あるいは組織と比較することで癌細胞の有無を調べる手法であることから、実際にその細胞が転移しやすいかどうかという悪性度を知ることは出来ない。機械的刺激が誘起する塩化物イオン排出能の測定は、生きた癌細胞の浸潤に関わるチャネルの機能を評価する。従来の手法では得られない浸潤能という情報を、癌の転移や治療薬選択の指標とすることができれば、癌治療において極めて有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The chloride ion channel Clic1, whose expression is upregulated in cancer cells, is involved in the regulation of cell volume when hypoosmotic stimuli are applied to cells. We hypothesized that Clic1 is opened by cell membrane stretching associated with cell deformation when cancer cells pass through the gap during invasion, and that the volume is decreased by exporting chloride ions, thereby promoting invasion. In this study, we established a method to evaluate the chloride ion efflux ability when external force is applied to cancer cells by atomic force microscope and investigated the relationship between cancer invasion and chloride ion efflux ability.

研究分野：細胞生物学

キーワード：癌細胞 塩化物イオン 浸潤性 イオンチャネル

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌細胞は、組織や細胞間の狭い隙間を通過しながら遊走・浸潤し、全身に転移していく。この浸潤過程では、細胞が狭窄されることで一時的に核膜の消失やDNAの損傷が生じるが (Science, 352, 353-8, 2016)、隙間の通過後直ちに修復されることから、転移能の高い癌細胞では細胞変形に伴う障害を緩和する能力が向上していると推察される。これまでに申請者は高転移性マウス乳癌細胞 FP10SC2 (SC2) 株を用いて、中間径フィラメントの一種であるネスチンの遺伝子ノックアウト(NKO)により、浸潤能が有意に低下することを明らかにした。この NKO 株では元株と比較して細胞弾性率が上昇していたことから、癌細胞は隙間を通過しにくくなり浸潤能が低下したと考えられる。さらに NKO 株の RNAseq 解析の結果から、塩化物イオンチャネルの一種である *Clic1* の発現量がネスチン KO により有意に減少していることを見出した (図 1A)。*Clic1* は胃癌、乳癌、肺癌、肝細胞癌など複数の癌種においてその発現が亢進する、癌バイオマーカーの一種である。また、*Clic1* の遺伝子発現抑制により、様々な癌細胞の増殖や遊走能、浸潤能が低下することから、*Clic1* は癌の悪性度に関与すると考えられている (Biochim Biophys Acta, 1848, 2523-31, 2015, J Cell Mol Med, 22, 2569-2579, 2018)。塩化物イオンチャネルは細胞内外の塩化物イオンの濃度に応じて塩化物イオンの取り込みあるいは排出を行うが、これによって細胞容積を調節する役割を持つことが分かっている。*Clic1* も浸透圧性膨張後の容積調節機能を有することが報告されており (Mol Cell Biochem, 365, 313-321, 2012)、これが癌遊走能・浸潤能に寄与する要因の一つと考えられている。弾性率が上昇し浸潤能が低下した癌細胞において *Clic1* の発現量が減少していたことから、*Clic1* は細胞が狭い空間を通過する際に変形し細胞膜が伸展した時に、塩化物イオンを排出することで、水分子の排出が誘導され、容積の減少により浸潤を促進するのではないかと着想した (図 1B)。

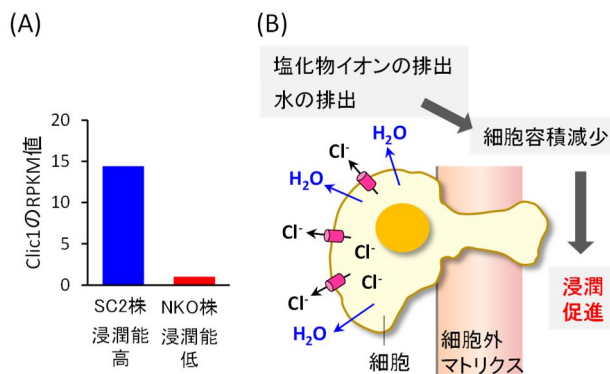


図1 RNAseqによる塩化物イオンチャネル*Clic1*発現量の評価 (A)、塩化物イオン排出による癌細胞の浸潤機構 (B)

### 2. 研究の目的

本研究では、*Clic1* がマウス乳癌細胞の細胞容積調節能に寄与するとともに、細胞膜の伸展に伴い塩化物イオンを排出することで細胞容積を減少させ、浸潤を促進する役割を持つことを明らかにする。そのために、細胞が狭窄された状態を模擬したうえで塩化物イオン排出能を測定する手法を開発し、*Clic1* の機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 浸潤性の異なるマウス・ヒト乳癌細胞株における *Clic1* 発現量の測定

高転移性マウス乳癌細胞 SC2 株、同株を用いて作製した低浸潤性の NKO 株、高浸潤性のヒト乳癌細胞 MDA-MB-231 株、及び低浸潤性の MCF-7 株を用いて、ウェスタンブロットにより *Clic1* 発現量を評価した。

#### (2) 原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた細胞に対する機械的外力印加

細胞に対して核外排出シグナルを付与した赤色蛍光タンパク質 DsRed-NES を発現するプラスミドベクターを導入し、原子間力顕微鏡 (AFM) 及び先端に直径 10  $\mu\text{m}$  のポリスチレン粒子を取り付けたチップレスカンチレバーを用いて、set point が 10, 20, 30 nN に達するまで細胞を圧入した。同時に共焦点蛍光顕微鏡による観察を行い、得られた画像から外力印加時の細胞高さを評価した。

#### (3) 機械的に外力を印加した細胞の塩化物イオン排出能評価

塩化物イオンと結合することで蛍光強度が減少する細胞膜透過性の蛍光試薬 N-Ethoxycarbonylmethyl-6-methoxyquinolinium bromide (MQAE) を終濃度 2.5  $\mu\text{M}$  となるよう細胞培地に添加し、1 時間インキュベートすることで細胞内に導入した。PBS を用いて洗浄することで培地中の過剰な MQAE を除去した後、PBS 中の細胞に対して AFM を用いて 10 nN の外力を 10 分間印加した。このとき細胞内 MQAE 蛍光強度を蛍光顕微鏡により経時的に観察し、外力印加前の蛍光強度を 1 としたときの相対蛍光強度を算出することで、塩化物イオン排出能の評価を行った。

#### (4) 高転移性マウス乳癌細胞における *Clic1* の機能解析

SC2 株を用いて *Clic1* 遺伝子ノックアウト (CKO) 株を作製し、*Clic1* が癌転移能の指標にな

り得るかどうかを確認した。CKO 株は CRISPR/Cas9 システムにより作製した。癌浸潤性に寄与すると考えられる、間隙を細胞が通過する際の移動度を評価するために、SC2 株及び CKO 株を用いてポイデンチャンバーを通過した細胞数を計測した。また、創傷治癒アッセイにより細胞遊走能を、AFM を用いた細胞圧入試験により弾性率を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 外力印加条件の検討

まず外力印加時の細胞の高さを測定することで、AFM の印加外力を検討した。外力印加前、及び印加中の細胞の高さを、DsRed-NES を発現させた SC2 細胞の共焦点顕微鏡画像で測定した。設定値 10、20、30 nN の外力印加によって、圧入前の SC2 細胞の高さのそれぞれ 56%、33%、27%まで圧入されたことが確認された。さらに設定値 10 nN では、NKO、MDA-MB-231、および MCF-7 細胞は、外力印加前の細胞高さの 40% 以上には圧入されないことが確認されたことから、外力印加による細胞への影響を考慮し、以降の実験では 10 nN の set point で外力印加を行った。

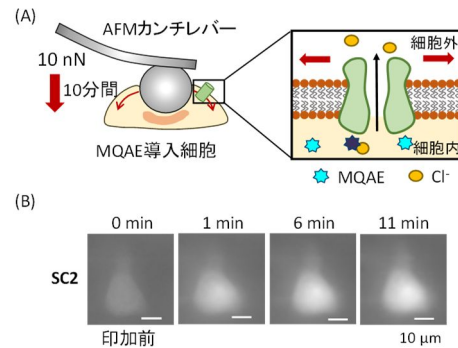


図2 AFMカンチレバーを用いたMQAE導入細胞に対する外力印加(A)、印加時におけるSC2細胞内のMQAE蛍光画像(B)

##### (2) 機械刺激が誘起する塩化物イオン排出能と癌浸潤性の関係

SC2 細胞に対する外力印加を行った結果、印加直後に細胞内 MQAE の相対蛍光強度の上昇が確認された。よって、機械刺激を印加するだけで癌細胞からの塩化物イオン排出を誘起可能であることが明らかとなった(図2)。そこで、浸潤性の異なる二種類のマウス乳癌細胞(SC2、NKO)とヒト乳癌細胞(MDA-MB-231、MCF-7)に対して機械刺激を印加し、塩化物イオンの排出能を評価した。1分間外力を印加した際の細胞内 MQAE 蛍光強度の変化率から、高浸潤性の SC2 及び MDA-MB-231 株は、低浸潤性の NKO 株及び MCF-7 と比較して、有意に蛍光強度が上昇していた(図3)。これらの細胞における Clc1 タンパク質発現量を評価したところ、SC2 株もしくは MDA-MB-231 株と比較して NKO 株もしくは MCF-7 株における Clc1 発現量は約 30%減少していた。よって、塩化物イオン排出能と癌細胞の浸潤能には相関があり、機械刺激にตอบสนองして同イオンを排出するチャンネルは Clc1 であることが示唆された。

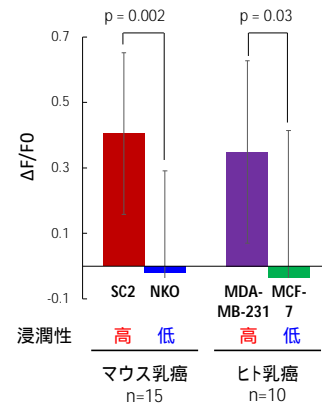


図3 1分間外力印加を行った細胞のMQAE蛍光強度変化率

##### (3) Clc1 の KO が癌浸潤性、遊走性に与える影響評価

上記の手法と同様に CKO 株に対して外力印加を行ったところ、元株と比較して有意に同イオンの排出能が低下していることが明らかとなった。さらに CKO 株の浸潤性をポイデンチャンバーアッセイで、遊走性を創傷治癒アッセイで評価した結果、元株と比較して CKO 株では浸潤性・遊走性ともに低下していた。この二つのアッセイは、どちらも細胞が狭い空間を運動するときの能力を評価しており、細胞の固さや細胞自身の運動能が寄与すると考えられる。そこで、元株と CKO 株の細胞弾性率と細胞運動速度を評価した。AFM を用いて細胞の圧入試験を行い、細胞弾性率を算出したところ、元株と CKO 株の弾性率に有意差は認められなかった。また、単一細胞の運動速度をタイムラプス撮影した細胞画像から算出したところ、Clc1 の KO による運動速度の低下も確認されなかった。よって Clc1 の KO による浸潤性、遊走性の低下は細胞が固くなる、あるいは運動能が低下したためではなく、塩化物イオン排出能が低下し、容積調節能が低下したためであると考えられた。

以上のように本研究では、Clc1 が機械的な外力印加にตอบสนองして塩化物イオンを排出することを明らかにした。さらに、癌細胞の浸潤・遊走において Clc1 の塩化物イオン排出による容積減少が重要であることが示唆された。本研究で開発した癌細胞の塩化物イオン排出能評価方法は、生検で得られた癌細胞の浸潤能評価にも適用できる可能性があると考えている。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamagishi Ayana, Ito Fumie, Nakamura Chikashi	4. 巻 93
2. 論文標題 Study on Cancer Cell Invasiveness via Application of Mechanical Force to Induce Chloride Ion Efflux	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 9032 ~ 9035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.1c01589	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山岸彩奈, 伊藤文恵, 金 賢徹, 中村 史
2. 発表標題 浸潤性の異なる乳がん細胞株の塩素イオン排出能の評価
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸彩奈, 伊藤文恵, 中村 史
2. 発表標題 外圧印加が誘起する細胞の塩素イオン排出とがん浸潤能の関係
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸彩奈, 伊藤文恵, 金 賢徹, 中村 史
2. 発表標題 狭窄状態の高転移性マウス乳癌細胞株における塩素イオン排出能の解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山岸彩奈、伊藤文恵、金 賢徹、中村 史
2. 発表標題 マウス乳癌細胞の浸潤過程における塩素イオンチャネルの機能解明に向けた細胞狭窄時における塩素イオン排出能の評価
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山岸彩奈、伊藤文恵、金 賢徹、中村 史
2. 発表標題 高転移性マウス乳がん細胞の浸潤機構に関わる塩素イオンチャネルClc1の機能解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤文恵、山岸彩奈、金 賢徹、中村 史
2. 発表標題 マウス乳癌細胞における外圧印加時の塩素イオン排出能評価
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山岸彩奈、長田あかね、中村 史
2. 発表標題 塩化物イオン排出能の測定によるがん細胞の浸潤性評価
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長田あかね、山岸彩奈、中村 史
2. 発表標題 外力印加時に塩化物イオンを排出するがん浸潤関連チャネルClic1の機能解析
3. 学会等名 第73回生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayana Yamagishi, Fumie Ito, Hyonchol Kim, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Evaluation of chloride ion efflux ability in highly metastatic mouse breast cancer cell
3. 学会等名 Biosensors 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayana Yamagishi, Fumie Ito, Hyonchol Kim, Chikashi Nakamura
2. 発表標題 Analysis of chloride ion efflux ability in breast cancer cell by using atomic force microscopy
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長田あかね、山岸彩奈、中村 史
2. 発表標題 がん浸潤関連チャネル Clic1が開口する外力条件と細胞接着状態の関係
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 がん細胞の評価方法および評価デバイス	発明者 山岸彩奈、中村史	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2020-098505	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------