

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07090

研究課題名(和文)がん細胞をメカノセンシタイザー攪乱によって硬化組織から排除する試み

研究課題名(英文) Research for the trial of cancer cell removal from fibrotic tissues by disturbing mechanosensitizer

研究代表者

栗山 正 (Kuriyama, Sei)

秋田大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30398226

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)：がんは一般的に硬い組織を好むと言われる。実際にはがん周辺の細胞が異常に細胞外基質を分泌し、組織が硬化することがある。しかし、がんがその硬さを認識しているかは不明である。我々は細胞骨格の張力をテンションセンサーという分子センサーで測定した。本研究では、硬さが分かっているメカノゲル上でがん細胞を培養し、その指標を基に生体内の硬さを推測するアプローチを取った。テンションセンサーはFRET (Forster Resonance Energy Transfer) という2つの蛍光タンパクの距離をエネルギー遷移量から算定する方法である。ゲル上と組織内を同等の感度で観察できる方法を開発したので報告する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんによる死亡原因の大半はがん転移によって引き起こされる多臓器不全である。がん免疫が患者に光明をもたらしているが、転移を予測、診断する方法の開発は社会的な急務である。今回は組織の硬さを測定するのではなく、がんが感じている硬さを知ろうとする研究である。がん細胞は何らかの変異を抱えていて正常細胞とは多くの点で異なっている。がん細胞が感知していた腫瘍周辺のかたさは約20kPaと平滑筋に近く、正常な肺が0.2kPaである事を考えると随分と異なっていた。他の技術を用いて答え合わせも必要であるがこのズレに注目して様々ながんの悪性度とズレの大きさを調べていく必要があるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Tumors tend to grow preferentially on stiff substrates in tissue. It is known that fibrosis increases organ stiffness due to the production of abnormal extracellular matrices by the tumor microenvironment. However, the precise way in which cancer cells sense the stiffness of their surroundings is less understood. Therefore, we aimed to measure cell surface tension, which is generated by the actin cytoskeleton, using a molecular biosensor. In this study, we compared measurements taken from a mechano-gel with a known Young's modulus to those taken from sections of lung tumor nodules. The tension biosensor is based on Forster Resonance Energy Transfer (FRET) technology, which estimates distances between two fluorophores based on the amount of energy transferred. We developed a method to measure FRET efficiency in both gel and tissue samples without quenching the fluorescence.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：メカノセンシング FRET がん浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

一般にがんはより硬い足場を好むと言われている。胃・肝臓・肺がんなどではがん周辺の間質が増加し、線維化が起きているのが観察される。間質性肺炎が肺がんの発生母地になるなど発がんとも関係が深い。線維化の亢進とがんの転移にも関連があることが予想されている。

がんにとって周辺が固くなることにどのようなメリットがあるのだろうか？

1. 硬い基質を好む細胞がより転移しやすいのか
2. 間質の変化とがんの変化はどちらが先に起こるのか？
3. がんが好まない間質に置かれたとき、生体内から排除する事は可能か？

これらについて細胞骨格が作る力である細胞内張力を測定することによって明らかにしようとする計画であった。

2. 研究の目的

肺線維化像と肺がんはしばしば共存する。がんにとって硬い基質に囲まれる事はどのようなメリットがあるのだろうか？一つの仮説としてより硬い基質を好むがん細胞が転移しやすいのではないかと考えた。プレ実験から細胞内の張力は細胞外基質強度によって変化するが、その変化の割合は細胞毎に異なる。好む、とは基質強度感知能力が高い事ではないだろうか？これを検証する。更に固有の基質強度感知機構を攪乱する事でがん転移が抑制できるかを検証する。

3. 研究の方法

研究材料として乳腺付近に移植すると高確率で肺に転移する乳がん由来培養細胞株 MX-1 を用いる事にした。理由としては皮下から肺に自然転移するがん細胞株というのはそれほど多くなく、過去の研究に用いた骨肉腫由来細胞株 143B も同じ理由で使おうとしたが、ラボ毎の状態に左右されて肺転移が再現できなかった。このため MX-1 の予備実験から始めたが、限りなく100%に近い状態で肺転移が観察された。しかし安定して遺伝子発現が維持出来なかったため以下の実験では肺がん細胞株や骨肉腫細胞株に蛍光センサー分子を導入したものをを用いた。

細胞内張力を測定するテンションセンサー分子

アクチニンというアクチン結合蛋白は細胞骨格のメッシュ状構造を形成する構成要素である。N 末端はアクチンと、C 末端のカルモジュリン様ドメインは中心部にあるスペクトリンリピート(SR1-4)と結合できる。アクチニンは二量体を形成し、細胞骨格に力が加わると N,C 末の両端に力が加わる。テンションセンサーとは FRET(Förster Resonance Energy Transfer)の原理を用いた分子センサーである。FRET とはドナー蛋白の蛍光波長とアクセプターの励起波長が重なっている2つの蛍光タンパクが十分に近い距離に存在する時に起こるエネルギー遷移の事である。簡単に言うと緑に光った蛍光タンパクがその蛍光で赤い蛋白を光らせる事である。この原理を用いて2色の蛍光タンパクをリンカーで接続し先に記述したアクチニン蛋白の SR1 と SR2 の間に挿入する。するとアクチンのメッシュ構造が表面張力により引っ張られると FRET テンションセンサーが両側に引っ張られ緑と赤が離れてしまう。すると FRET のエネルギー遷移が止まり、効率が低くなる。つまり細胞が硬い基質上で細胞が薄く伸展すると FRET が下がる。この硬くなればなるほど減衰する曲線を既知の基質強度を持つメカノゲル上で測定し、生体内の細胞が感知している周辺基質の強度を類推するのが今回の実験である。

アクセプターブリーチングと固定方法

FRET の測定方法は1つではなく FRET ratio, FRET index, FRET efficiency の3種類が代表的である。FRET ratio は $A(\text{acceptor 蛍光量})/D(\text{donor 蛍光量})$ で求められる。FRET index は $F(\text{FRET}$

蛍光量)/A(acceptor 蛍光量)となっている。FRET ratio は常にインターナルコントロールが取れる状況に無いといけない。転移巢のがん細胞を相手にするのでインターナルコントロールが常に居る状況は作れない。FRET index は non-fluorescent control を用いて予めパラメーターを決定した上で測定する。バックグラウンドノイズが一定な系では効果的ではあるが、マウス生体組織は非常にバックグラウンド(自家蛍光)が高く、餌によっても自家蛍光の強度が変化するので他個体間の平均値などを取るのには向いていない。そして FRET efficiency ではアクセプターブリーチングを用いる。アクセプター(赤)の励起波長である緑のレーザーの出力を上げ、ROI(region of interest: 興味のある場所)にのみ照射するとアクセプターの電子受取能力が無くなり、ドナー(緑)タンパクから放出された電子がブリーチされたアクセプターに跳ね返ってドナーの蛍光が上昇する。ブリーチングが成立している事が前提で D_{post} (ブリーチ後)- D_{pre} (ブリーチ前)/ D_{post} で算出される。単純で直接的であるため他サンプルと比較することが容易だが、固定が必要となる。

4. 研究成果

固定法の改良

アクセプターブリーチングによる FRET 解析ではクリアすべき技術的な問題があった。カバーガラス上に培養された細胞を FRET で解析するには何も問題が無いように思われた。しかしながら肺内の結節を解析する段階になると感度に問題があることに気付かされた。4%パラホルムアルデヒドで固定して、スクロース溶液に置換して 4°C で一晩、さらにポリマーに置換して凍結切片を作成してスライドに貼付して乾燥・接着させ再水和して封入して観察する。この長い工程の間に蛍光が減衰、または細胞中に拡散する事が観察された。細胞骨格と結合するタンパクであるのでこの構造が失われていると結果の信用性に関わる。この為、浸透性が良く短時間で分子間の距離が保存されてその後の長い工程で変質しにくい固定法を開発する必要があった。電子顕微鏡のサンプル固定に用いられるグリオキサール固定液を使用すると状況が改善されるようだったが、極少量で試してみた時の改善度に比べ多くのサンプルを連続して固定するとうまくいかなかった。固定液は酢酸溶液で PH=5 にするのだが、溶液の量が増えると不安定になるようだった。そこで PH=5 の緩衝液(MES buffer)をタンパク質同士のクロスリンク用に持っていたので使ってみた

ら固定条件が改善されたようだった。これを検証するために high control (常に可能な FRET 効率の最大値が出る設計の分子)を用いてこれまでに用いていたパラホルムアルデヒドによる固定や酢酸・グリオキサール固定液、MES 緩衝液によるグリオキサール固定液を比較した(図1)。まず酢酸グリオキサール

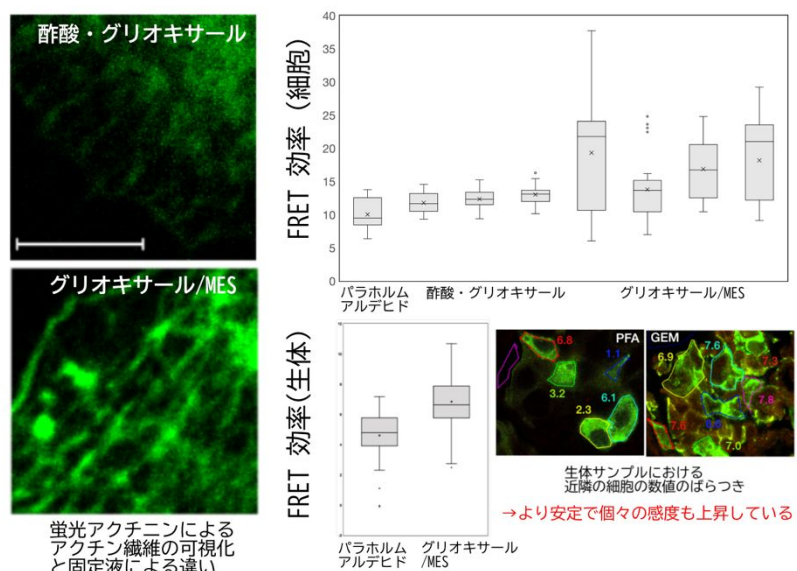


図1 固定液の違いによる細胞骨格可視化の変化とFRET効率の高感度化

とグリオキサールMESの細胞骨格の可視化における違いはパラホルムアルデヒドとの差異に

くらべて小さかったが、酢酸・グリオキサルがすでに一般的に使用されている事を考えると問題なく使えると言える。また細部を強拡大して見てもグリオキサル MES による固定でアクチン繊維の構造がよく保存されていることが分かった(図 1 左) FRET 効率を見ると細胞においてはグリオキサル MES による固定の方が中央値が高く感度が上昇していた(図 1 右上)さらに生体サンプル(肺にがん細胞を移植したものを組織凍結切片にしたもの)においてはパラホルムアルデヒド固定よりも FRET 効率の高感度化が見られ、組織像においては近隣の細胞の測定値が似通っている(つまり安定化している)事が示された(図 1 右下)。この系を用いて固定条件を最適化した。

メカノゲルと生体組織の比較から生体内の組織硬化を類推

ごく一般的にメカノゲルというとメタクリレート樹脂を用いたものが想像されるが、本研究では光制御が可能な架橋剤を用いたスチレン化ゼラチンゲルをカバーガラスに敷いたものを九州大学先端物質化学研究所の木戸秋教授から提供していただいた。生体の細胞外基質に近い状況で観察できる。特に細胞の形態などで異常な点なども見られない。High Control で決定した条件で Actinin Tension sensor を 1kPa から 50kPa の間の硬さのゲル上に培養した細胞で測定した。するとゲルのヤング率が高くなるにしたがって FRET 効率が減衰していく典型的な減衰曲線が得られた。(図 2 a)この FRET の中央値(1と3四分位数も)とゲルのヤング率をプロットした(図 2c)。生体内の硬さは High Control の値のズレをもって補正する。パラホルムアルデヒドで固定していた時はかなり値が低くなっていたのだが、グリオキサル MES 固定にした肺では FRET 最大値の口は最低限に抑えられた(図 2b)この値に従い、メカノゲルの値に若干の補正を加えた減衰曲線を元に中央値のプロットから類推される硬さを求め最大値と最小値のグラフからそれぞれ最小の硬さと最大の硬さを求めた。ここから導かれた移植後 14 日目の腫瘍結節のがん細胞が感じている硬さは 19.15kPa であった。通常の肺のかたさは 200Pa ほどで 5~20 kPa は平滑筋のかたさであるので随分と硬く感じている事が明らかになった。他の方法(超音波エラストグラフィなど)で小動物用の機材も開発されているので将来的に実際の硬さとがんが感じている硬さの差異が浸潤・転移が進むにつれて開いていくのか、それとも差が狭まっていくのか、転移結節が観察されるよりも先に硬さの変化が起こっているのかなど実験精度を上げつつ明らかにしていく必要がある。以上の結果を論文にまとめアクセプトされた(Kuriyama et al., 2024)

【引用文献】

Glyoxal-methyl-ethylene sulfonic acid fixative enhances the fixation of cytoskeletal structures for Förster resonance energy transfer (2024) Kuriyama et al. Histochem & Cell Biology DOI: 10.1007/s00418-024-02304-x

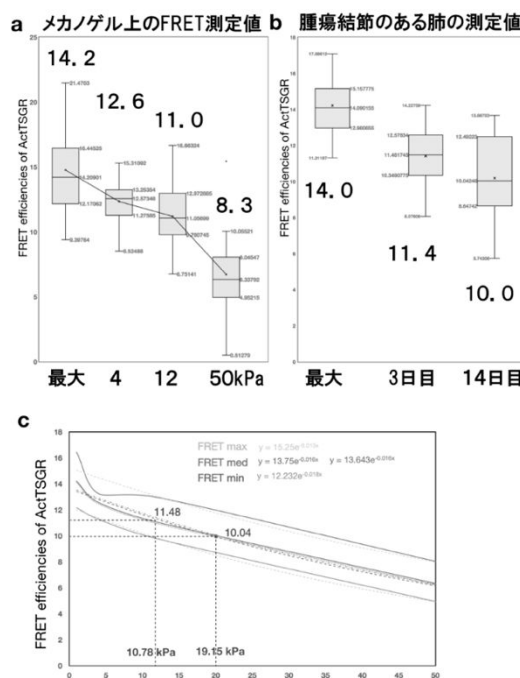


図2 メカノゲルと生体内のFRET

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takahashi So, Takagane Kurara, Itoh Go, Kuriyama Sei, Umakoshi Michinobu, Goto Akiteru, Yanagihara Kazuyoshi, Yashiro Masakazu, Iijima Katsunori, Tanaka Masamitsu	4. 巻 13
2. 論文標題 CCDC85A is regulated by miR-224-3p and augments cancer cell resistance to endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	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) 10.3389/fonc.2023.1196546	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 -
1. 著者名 Horie Misato, Takagane Kurara, Itoh Go, Kuriyama Sei, Yanagihara Kazuyoshi, Yashiro Masakazu, Umakoshi Michinobu, Goto Akiteru, Arita Junichi, Tanaka Masamitsu	4. 巻 18
2. 論文標題 Exosomes secreted by ST3GAL5 high cancer cells promote peritoneal dissemination by establishing a premetastatic microenvironment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.13524	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 -
1. 著者名 Sei Kuriyama, Kuboki Thasaneeya, Go Itoh, Satoru Kidoaki, Masamitsu Tanaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Glyoxal-methyl-ethylene sulfonic acid fixative enhances the fixation of cytoskeletal structures for Forster resonance energy transfer measurements	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	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) 10.1007/s00418-024-02304-x	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 -
1. 著者名 Kuriyama Sei, Tanaka Masamitsu	4. 巻 65
2. 論文標題 Characteristic tetraspanin expression patterns mark various tissues during early Xenopus development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth and Differentiation	6. 最初と最後の頁 109 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12836	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 -

1. 著者名 Itoh Go, Takagane Kurara, Fukushi Yuma, Kuriyama Sei, Umakoshi Michinobu, Goto Akiteru, Yanagihara Kazuyoshi, Yashiro Masakazu, Tanaka Masamitsu	4. 巻 16
2. 論文標題 Cancer associated fibroblasts educate normal fibroblasts to facilitate cancer cell spreading and T cell suppression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 166 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.13077	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 -

1. 著者名 Kuriyama Sei, Tanaka Gentaro, Takagane Kurara, Itoh Go, Tanaka Masamitsu	4. 巻 12
2. 論文標題 Pigment Epithelium Derived Factor Is Involved in the Late Phase of Osteosarcoma Metastasis by Increasing Extravasation and Cell-Cell Adhesion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.818182	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 -

1. 著者名 Takagane Kurara, Umakoshi Michinobu, Itoh Go, Kuriyama Sei, Goto Akiteru, Tanaka Masamitsu	4. 巻 41
2. 論文標題 SKAP2 suppresses inflammation-mediated tumorigenesis by regulating SHP-1 and SHP-2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1087 ~ 1099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-021-02153-1	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 -

1. 著者名 Itoh Go, Takagane Kurara, Fukushi Yuma, Kuriyama Sei, Umakoshi Michinobu, Goto Akiteru, Yanagihara Kazuyoshi, Yashiro Masakazu, Tanaka Masamitsu	4. 巻 16
2. 論文標題 Cancer associated fibroblasts educate normal fibroblasts to facilitate cancer cell spreading and T cell suppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 166 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.13077	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 -

1. 著者名 Sasaki Yuto, Takagane Kurara, Konno Takumi, Itoh Go, Kuriyama Sei, Yanagihara Kazuyoshi, Yashiro Masakazu, Yamada Satoru, Murakami Shinya, Tanaka Masamitsu	4. 巻 112
2. 論文標題 Expression of asporin reprograms cancer cells to acquire resistance to oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1251 ~ 1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14794	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 栗山 正
2. 発表標題 転移に伴う腫瘍細胞外環境の力覚能力に関する解析
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 SEI KURIYAMA
2. 発表標題 Characteristic tetraspanin expression patterns mark various tissues during Xenopus early development
3. 学会等名 第55回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗山 正
2. 発表標題 線維化と転移における生体内組織の硬さへのアプローチ
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗山 正
2. 発表標題 PEDF-lamRシグナルは溢出増加と共に腫瘍の組織化を亢進させる
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
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
研究協力者	木戸秋 悟 (Kidoaki Satoru)	九州大学・先導物質化学研究所・教授	

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
---------	---------