

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657049

研究課題名（和文） 「場所取り」現象による細胞接着領域の確保と、その機序解明

研究課題名（英文） Occupying the space: A new phenomenon in cell attachment, and the elucidation of molecular mechanism

研究代表者

幸野 貴之 (KOHNO TAKAYUKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10374563

研究成果の概要（和文）： 単層で増殖する培養動物細胞を培養容器に播種すると、それらの細胞は、ほぼ均一に分散して培養容器に接着する。それらの細胞はやがて敷石状に成長し、その後、接触阻害により細胞の運動や増殖が停止する。この「接触阻害」という現象は、半世紀以上も前から知られている。本研究では、この「均一に分散する過程」において、「場所取り」という新たな現象が存在することを初めて見いだした。さらに、本現象の普遍性を検討した。

研究成果の概要（英文）： When suspended adherent monolayer mammalian cells are plated onto a culture dish, the cells disperse almost uniformly as single cells and attach to the surface of the plastic cell cultureware. Subsequently, the cells grow in the shape of a pavement, and finally the cell growth and motility arrest by “contact inhibition”. This phenomenon is known for more than half a century. In this study, I found that a new phenomenon called “occupying the space” existed for the first time in this process to disperse the cells uniformly. Furthermore, I considered the generality of this finding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：細胞接着，場所取り

1. 研究開始当初の背景

(1) 例えば、単層で増殖する動物細胞を培養容器に播種すると、それらの細胞は、ほぼ均一に分散し、培養基質に接着後、敷石状に成長する。その後、接触阻害 (contact inhibition) により細胞の運動や増殖が停止する。この現象は、半世紀以上も前から知られている (Abercrombie M, 1954)。一般的に単層で増殖する動物細胞のうち、足場依存性の細胞は、培養基質に足場をアンカーすることで接

着し、その後伸展する。さらに、周辺環境に足場を拡張できるだけの余裕があれば、増殖を開始する。これらの細胞を実験で使用するときや継代するときには、トリプシン等の細胞剥離液を用いて細胞-細胞間および細胞-培養基質間の結合を切断し、培養液に分散させた状態の接着細胞は、通常、重力に逆らって運動することができない。従って、このような細胞浮遊液を新たな培養容器に一定量だけ分注すると、これらの細胞には、細胞

接着領域に「着地」するまでの間に、重力のみが作用する。細胞浮遊液中の個々の細胞は、自由落下によってのみ細胞培養基質に「着地」するために、着地後の細胞は、高密度領域から低密度領域まで不均一に分布する。一方、培養基質に「着地」した後に伸展した細胞は、新たに水平方向の運動能を獲得する。従って、高密度領域に着地した細胞は低密度領域方向へと移動し、そこで増殖する。その後、増殖可能な領域がなくなるまでこれらの運動を繰り返し、最終的に敷石状に成長して運動および増殖を停止させる。この増殖停止に至るまでの一連の形態変化を接触阻害 (contact inhibition) という。

(2) 本研究を開始するにあたり、浮遊状態の足場依存性接着細胞を培養容器へと播種すると、それらの細胞は、必ずしも自由落下によってのみ培養基質へ「着地」するわけではないことを示唆する現象を見いだした。つまり、播種された細胞浮遊液中の細胞が培養基質へ接着するまでの一連の過程において、個々の細胞があらかじめ自身の接着領域を確保する「場所取り」という現象が存在する可能性が示唆された。この「場所取り」という表現は、たとえばイベントやお祭りで、よい場所を事前に確保するために行う行動に由来し、本研究で初めて命名したものであるが、未報告の現象であるため、確立された生理現象ではない。なお、「場所取り」現象を実行中であっても、浮遊状態の接着細胞には運動能を確認することはできない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、浮遊状態の細胞が培養基質へと接着・伸展するときに行う、「場所取り」という新現象を細胞機能の一つとして確立させるために、それらの過程を制御する分子メカニズムの解明に取り組む。さらに、この「場所取り」現象が細胞の世界では普遍的な現象であることを証明し、「場所取り」を標的とした新たな細胞機能の制御が可能かを検討する。本研究は、個人研究として2年の研究期間で行う。

(2) 足場依存性の培養動物細胞の多くは、培養容器に接着した状態で生育している。これらの細胞を実験に供するときには、一般的にトリプシンやEDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)、およびそれらの混液を用いて培養基質から細胞を剥離させる必要がある。培養容器から剥離させたこれらの細胞は、適切な培地に懸濁し、別の培養容器に播種することで新たな実験に使用でき、また増殖させることが可能である。足場依存性

の培養動物細胞を本来の性質を維持したままに増殖させるためには、通常、培養基質への接着が必要である。しかし、培養基質から剥離され、単一に分散したこれらの細胞は、運動能を持たないため培養溶液中を泳動することはできない。従って、浮遊状態の足場依存性接着細胞は、重力による自由落下に唯一依存して培養基質へと着地 (すなわち接着) する。この過程では、細胞には鉛直方向にだけしか外力が作用しないにもかかわらず、興味深いことに、細胞密度が一定以下の条件下において、多くの場合では、着地した細胞に別の細胞が重なって着地する現象はほとんど観察されない。このことは、これらの細胞が培養基質へと着地するとき、個々の細胞間で、互いに反発する何らかの力が作用している可能性があることを示唆する。そこで本研究では、この反発に関連する未知の生理現象が実際に存在することを確認し、容易に理解できるよう、「場所取り」と命名し、その生理的役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 「場所取り」現象の普遍性を検証するために、ある種の足場依存性を有する培養動物細胞で観察された「場所取り」という現象が、多くの動物細胞において普遍的な現象であることを証明する。そのためにまず、「場所取り」で放出される因子を同定する。さらに本現象の普遍性を検証する。

① 浮遊状態の接着細胞が接着の過程で行う「場所取り」において、細胞から培養溶液中に放出される「場所取り」因子を観察するために、「場所取り」因子を特異的に染色・同定するための試薬のスクリーニングを行う。「場所取り」因子の観察は蛍光顕微鏡を用いて行うために、蛍光を発する化合物を中心に検討する。

② 「場所取り」因子の同定は、質量分析装置を用いる。培養溶液からの「場所取り」因子の精製に関わる条件検討は適宜行う。次に、「場所取り」因子の放出を担う分子を同定する。分泌性のタンパク質、ペプチド、脂質や複合糖質の多くは、細胞表面膜に存在するタンパク質を介して放出される。これまでに、薬剤やコレステロールなどの排出に関与するABC (ATP-Binding Cassette) タンパク質が、分子量300から2000程度の多様な化合物の細胞内外の輸送に関連することが報告されている。本研究では、「場所取り」因子を低分子化合物と予想していることから、本因子の放出を担うタンパク質を同定するために、トランスポータータンパク質の各種阻害剤やsiRN

Aによる発現量制御下での本因子の放出の有無を検討する。

③ 「場所取り」現象の普遍性を検証するために、癌細胞を含む種々の培養細胞を用いて「場所取り」現象の有無を観察する。まず、所属研究室で保有する上皮系、間質系培養細胞から20種程度を選択し、「場所取り」因子放出の有無を共焦点顕微鏡、及び質量分析装置を用いて確認する。次に、本因子の放出・認識に関わるタンパク質の発現の有無をウェスタンブロット法により確認し、それらの発現量の人為的な増減が、「場所取り」現象に影響するかを観察する。さらに、足場依存性の無い接着性動物細胞や、浮遊状態で増殖する血球系細胞を用いて「場所取り」現象の有無を観察し、「場所取り」現象の普遍性や生理的意味を検証する。

(2) 「場所取り」現象の生理的役割を解明するために、「場所取り」因子の生成機構、放出機構、および認識機構を検討する。その後、病態モデル動物を使用して「場所取り」現象の生理的役割を検証する。

① 「場所取り」因子を産生・放出するまでの、細胞内のシグナル伝達に関連するタンパク質を同定する。まず、共焦点顕微鏡を用いて、蛍光標識した本因子と、その産生酵素の抗体、またはGF P標識酵素を、細胞内小器官特異的マーカーの存在下で観察し、本因子の細胞内での産生・貯蔵部位を同定する。次に、本因子の放出過程を顕微鏡下で可視化する条件を確立し、放出に至る初動信号を、細胞外基質や他の細胞との接触に着目して探索する。さらに、これらの信号伝達経路を担うタンパク質を、siRNAによる発現量制御や機能変異タンパク質の導入により同定する。

② 細胞外周辺環境に存在する「場所取り」因子を認識した細胞が、同因子を放出した細胞から反発する作用機序を解明する。ここでは、別に精製した「場所取り」因子を細胞培養液に添加し、その後の細胞応答を、タンパク質リン酸化を指標にして質量分析装置により解析する。興味深いことに、コラーゲン等の細胞外基質の有無や種類の違いで、細胞の形態を分散から偏在へと変化させる種類の細胞が存在する(ヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC4など)。これらの細胞において、「場所取り」因子の放出と認識の有無を確認し、これらの形態変化に「場所取り」現象が関与するかを検討する。

③ 「場所取り」因子の認識タンパク質を欠損した細胞株を樹立し、精製した本因子を添

加後の細胞増殖速度の変化、及び走化能への影響を調べる。さらに、本因子の産生酵素、または放出タンパク質を欠損させた細胞株を樹立し、同様に検討する。個体での検討は、非転移性、または好転移性腫瘍細胞を移植した担癌マウスを用いる。これらのマウスに、精製した「場所取り」因子を投与し、癌組織の増殖速度の変化、または転移抑制効果の有無を調べる。また、各種担癌マウス血清中の本因子濃度を高速液体クロマトグラフ法により測定することで、本因子が腫瘍マーカーになり得るかの基礎的検討を行う。

4. 研究成果

(1) 本研究で使用したヒト子宮頸癌由来細胞(Hela)細胞は、足場依存性の接着細胞であり、癌細胞であるために明瞭な接触阻害作用を示さない。この細胞をトリプシン等で培養基質から剥離させ、新たな培養液中で懸濁させて単一細胞に分離させた後、新たな培養容器に播種した。つづいて、浮遊状態にあるこの細胞が、球状の形態を維持したままに培養基質へと「着地」する過程を顕微鏡下で観察した。培養液中の個々の細胞は、重力による自由落下だけに依存して培養基質に接着する。顕微鏡での観察下にある培養液中では、鉛直方向に複数の球状の細胞が存在するにもかかわらず、個々の細胞は、隣接する細胞との間に一定の距離を取って培養基質へと「着地」する様子が観察された。さらに、時間的に先に「着地」した細胞に対して、後から落下してきた細胞が、先に接着した細胞と隣接する位置へ「着地」する様子はほとんど観察されなかった。同様に、鉛直方向に重積して「着地」した細胞もほとんど存在しなかった。従って、この過程には「場所取り」現象の存在が強く示唆され、近接する細胞間には、細胞同士が互いに離れて着地するための「場所取り」因子の存在が予想された。そこで、本現象を観察する際に、適切な蛍光標識化合物を培養液中に添加した。顕微鏡による観察条件を適宜検討した後、上記と同様に浮遊状態の細胞が培養基質へ接着する過程を観察した。その結果、個々の細胞が培養基質への接着に先行して「場所取り」因子を培養基質へと放出する様子の可視化に成功した。この「場所取り」因子は、着地した細胞を中心とする同心円状に拡散し、領域の辺縁部ほど濃度が高い分布形態を示した。「場所

取り」因子が塗布された領域は、「着地」した細胞が後に伸展する領域面積と同程度に拡散した。近接状態にある複数の細胞が、時間的にほとんど同時に培養基質へ「着地」した場合には、「場所取り」因子は同心円上には分散せず、接線を共有する形態を呈した。興味深いことに、時間的に後から「着地」する細胞は、先に着地した細胞によって形成された「場所取り」領域を避けて「着地」する様子が観察された。この「場所取り」因子は、既知の接着因子による細胞間相互作用が働く距離よりも、はるかに遠くの細胞に対して接近阻害作用を発揮した。従って、この「場所取り」現象は、全く新しい機序の生理機能であることが強く示唆された。

(2) 浮遊状態で播種された接着細胞が、培養容器に接着して増殖する過程において、見かけの上で、一様に分散した形態を呈する現象は、これまでは、接触阻害 (c o n t a c t i n h i b i t i o n) 作用が中心的に作用することで観察される、と理解されてきた。しかし、浮遊状態にある球状の接着細胞が、培養基質へ接着して間もない状態ですでに、近接細胞間に一定の距離が存在する様子は頻繁かつ容易に観察できる。接着細胞は伸展した形態を取ったうえで細胞間が密着したときに接触阻害作用を示すことから、上記の過程を詳しく説明するためには、新たな概念が必要である。本研究により、浮遊状態に置かれた足場依存性の接着細胞が培養基質へと接着する過程には、「場所取り」という新現象の存在が明らかになった。さらに、これらの細胞は基質に接着・伸展する前に、積極的に一様に分散する能力を有することが明らかになった。細胞接着の際の「場所取り」現象の普遍性が、本研究により立証され、さらに細胞の増殖や移動との関連を見いだすことができれば、細胞の基本原理に新たな礎を築くことができる、と考えている。「場所取り」現象は、全く新しい概念であり、この現象について、本研究事業の期間内において明らかにできたのはごく一部に過ぎず、本因子の同定、およびその機能解析には更なる検討が必要であることが明らかになった。今後も引き続き本研究を遂行することで、「場所取り」現象を新たな細胞機能として確立させることができると考えている。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幸野 貴之 (KOHNO TAKAYUKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10374563

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし