

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05351

研究課題名(和文)がん細胞のダイナミックな接着制御機構の定量解明

研究課題名(英文)Quantitative evaluation of dynamic regulation of cancer cell adhesion

研究代表者

吉川 洋史 (YOSHIKAWA, Hiroshi)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：50551173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、種々の光学・力学計測技術や機能性材料を用いて、がん細胞の接着界面構造や力学特性を定量計測し、がん細胞のダイナミックな接着制御プロセスを定量理解することを目的とした。具体的には主要な研究成果として以下の2つを得た。(1)がん細胞の接着性を定量評価可能な実験システムを構築し、がん細胞の転移能の評価や薬剤スクリーニングが可能であることを示した。(2)がん転移抑制効果のある緑茶カテキンが、物理吸着により細胞膜を数十倍程度硬化させることを発見し、力学的見地からの新しいがん転移抑制メカニズムを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this work, to quantitatively understand dynamic adhesion process of cancer cells, interface structures and mechanical properties of cancer cells have been characterized by using various optical/mechanical measurement techniques together with functional materials. The project gained mainly the following two achievements. (1) New experimental platforms for the quantitative evaluation of cancer cell adhesion was developed, which can be used to identify metastatic ability of cancer cells and to carry out drug screening. (2) Physico-chemical measurement revealed that green tea catechin with galloyl moiety can be physically adsorbed to phospholipid membranes, which leads to the significant stiffening of phospholipid membranes. This finding will be useful to design a new class of drugs for cancer therapy from mechanical viewpoints.

研究分野：生物物理化学

キーワード：がん 緑茶カテキン 細胞膜 反射干渉顕微鏡 力学計測 細胞接着 界面 超解像光学顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、原発巣からの脱離と移動、そして他の臓器への固着と、外部環境(外場)との接着を巧みに制御しつつ転移を成し遂げている。これまで、このようながん細胞のダイナミックな接着制御機構の解明のために、主に鍵 鍵穴結合を形成する接着分子の同定や、1分子レベルの力計測が行われてきた。一方、生体内の細胞には、鍵 鍵穴結合だけでなく、クーロン力など様々な引力・斥力相互作用が協同的・競争的に働いており、その総和が細胞-外場間の接着相互作用として存在しているはずである。実際のがん転移プロセスでは、このような細胞レベルでの接着強度の変化が重要となるが、分子の同定や力計測のみから、細胞レベルでの外場との力学的相互作用を定量的に解明することは困難である。また、近年の研究で、転移性のがん細胞ほど柔らかいことが明らかとなり、細胞の硬さという力学的な因子が転移機構に作用していることが明らかになりつつある^{1,2}。よって、ダイナミックに変化するがん細胞の接着機構を定量解明するためには、従来の分子生物学的なアプローチだけでなく、細胞レベルでの接着性や硬さを定量的に評価し、がん転移プロセスとの相関を解明する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、種々の光学・力学計測技術や機能性材料を用いて、がん細胞の接着界面構造や力学特性を定量計測し、がん細胞のダイナミックな接着制御プロセスを定量理解することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、主に以下の3種類の実験方法を駆使して、研究を遂行した。

(1) 光学計測手法

本研究では、細胞と外場間のナノスケールの接着構造を計測するために、反射干渉顕微鏡法(Reflection Interference Contrast Microscopy, RICM)を用いた(業績論文

)。RICMは、蛍光標識フリーな細胞膜 基板界面の可視化法であり、基板(ガラスなど)の背面より単色光を入射し、試料 溶液界面での反射光と基板 溶液界面での反射光とが形成する干渉光を計測する。この時、干渉光Iの輝度は、試料 基板間距離hを反映したものになる。その関係性は、疑似的に光の垂直入射と垂直反射を仮定した最も単純なモデルとしては以下の式により表すことができる。

$$\frac{2I - (I_{\max} + I_{\min})}{-(I_{\max} - I_{\min})} = \cos\left(\frac{4\pi n}{\lambda} h\right)$$

ここで I_{\max} と I_{\min} それぞれ干渉縞の最大および最小の光強度、 n は溶液の屈折率、 λ は光の波長である。このように距離情報を含む干

渉像が得られることが RICM の最大の特徴であり、その Z 軸方向の空間分解能は約 2 nm にも達することが報告されている³。これにより、蛍光標識では検出することが難しい、非特異的な力学的相互作用(例:クーロン力)を含めた細胞-外場間の接着構造を評価することができる。

また、特定の細胞構造の可視化には、蛍光顕微鏡も合わせて使用した(業績論文)。具体的には、細胞接着タンパク質であるパキシリン、細胞骨格のアクチンなどを蛍光染色し、レーザー走査型共焦点蛍光顕微鏡、超解像顕微鏡(構造化照明)などでその構造を計測した。

(2) 力学計測手法

細胞の力学特性の計測には、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy, AFM)を用いた(業績論文)。AFMでは、カンチレバーと呼ばれる針状のプローブを細胞に押し込み、得られた力-変形曲線から細胞の硬さ(ヤング率)を得ることができる。本研究では、データ解析手法の改善にも取り組み、細胞内部の異方的な硬さ分布の計測ができることを見出し、特許出願も行っている(小林, 吉川ら, 特願 2017-179265)。

また、細胞膜を構成する脂質二分子膜の力学特性を評価する手法として、Flicker spectroscopy も用いた(業績論文)。本手法では、細胞サイズのリポソームの熱揺らぎを解析することで、ラベルフリーで膜の曲げ弾性を決定することが出来る。本研究では Flicker spectroscopy を用いて、がん転移抑制作用が知られている緑茶カテキンが細胞膜の力学特性に与える影響の解明に取り組んだ。

(3) 化学デザインした細胞培養基板

本研究では、種々の機能性材料を用いて、細胞接着特性評価のための培養基板を構築した。具体的には、アクリルアミドをベースとした硬さ・接着分子密度が制御可能なゲル基板、化学エネルギーにより駆動する微小管ゲル基板、有機シラン単分子膜を用いた細胞接着/非接着パターン基板(早稲田大学・谷井孝至先生からご提供)を用いた。

4. 研究成果

本研究の主要成果として論文化されているものを中心に以下に詳細を述べる。

(1) がん細胞の接着特性の定量解明

RICM を用いてがん細胞の接着性の定量評価に取り組んだ。一例として高転移性(B16-F10)および低転移性(B16-F1)のマウスメラノーマ細胞の接着性を比較した結果を図1に示す(業績論文)。ここでは、フォトリソグラフィによりガラス基板上に直径約 18 ミクロンの細胞接着性の円形スポットを作製し、その上で細胞を顕微鏡観察した。すると透過像では細胞形状に有意な差はなかったが、RICM 像からは高転移性がん細胞

が基板に対して大きく接着している様子が観察できた(図1A)。次に、がん転移抑制効果が知られている緑茶カテキン(EGCG)存在下で、細胞接着面積をRICMにより調べた。その結果、EGCG濃度の上昇に伴い、がん細胞の接着面積がシグモイド関数状に減少した(図1B)。このような、強接着から弱接着に切り替わる濃度(c_{half})を算出したところ、低転移性の細胞では $c_{half} = 23.4 \mu\text{M}$ だったのに対して、高転移性のがん細胞は約1.6倍大きな濃度となっていることを見出した。本結果は、高転移性のがん細胞ほど緑茶カテキンに対する耐性が大きく、がん転移の鍵となる細胞接着性への影響が少ないことを示している。我々は本手法を用いて、がん細胞と正常細胞間の接着特性に有意な差があることも見出し(業績論文)、転移機構の解明や、がん細胞検出、薬剤スクリーニングとして本手法が応用できうることを期待している。

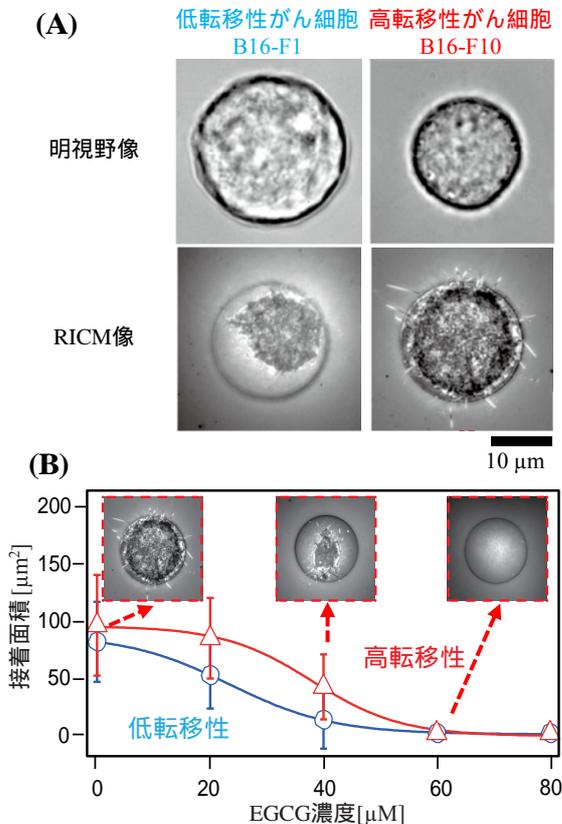


図1：(A)高転移性・低転移性のがん細胞の明視野像およびRICM像(B)がん細胞接着面積の緑茶カテキン濃度依存性。業績論文より許可を得て転載(英語部分を日本語に翻訳)。

(2) 緑茶カテキンのがん細胞硬化作用に関する新規メカニズムの解明

緑茶カテキンは、がん転移抑制効果を示す物質として広く知られている⁴。これまで緑茶カテキンによるがん転移抑制メカニズムとして、抗酸化作用や腫瘍関連タンパク質への特異的な結合など、生化学的な機構が調べ

られてきた。一方、近年の研究で緑茶カテキンががん細胞を硬化することが明らかとなり、がん転移抑制に対する力学的なメカニズムの存在が示唆されている²。そこで本研究では、細胞接着に顕著な影響を及ぼす器官として細胞膜に着目し、主要な4つの緑茶カテキンを用いて、細胞膜の構造・力学特性に対する影響を調べた(業績論文)。まず、AFM観察、円偏光二色性測定などの結果から、ガロイル基を有する緑茶カテキンが溶液中で凝集体を形成し、リン脂質膜に対して静電的相互作用などを介して強く物理吸着することがわかった。また、その緑茶カテキンの物理吸着により、リン脂質膜の曲げ弾性が数十倍程度増加することが明らかとなった。以上の結果から、図2に示すような緑茶カテキンと細胞膜との間の物理的相互作用とその力学的影響が初めて明らかになったとともに、がん細胞硬化に基づく新しい薬剤開発に対する基礎的な知見を与えることに成功した。

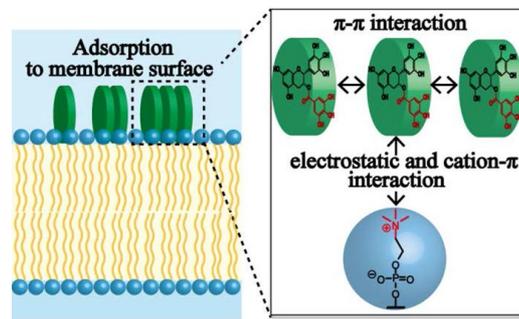


図2：緑茶カテキンとリン脂質膜間の物理的相互作用。発表論文より許可を得て転載。

(3) 細胞力学刺激法の開拓

がんを含む生体内の細胞は、動的に揺らぐ環境にさらされており、このような刺激下でどのように規律的な細胞機能が発現しているかは興味深い。そこで本研究では、刺激応答性高分子を用いた培養ゲル基板を作製し、細胞に対して動的な刺激を与えることに成功した(業績論文など)。

また細胞の局所に力学刺激を与える手法として、レーザーによる細胞骨格構造の時空間制御にも挑んだ。これまでに、細胞内外で、細胞骨格タンパク質によるネットワーク構造を改変することに成功しており、現在論文文化に向けて更に実験を進めている。またその研究を進めるで、レーザープロセスの基礎技術となるものとして、レーザーによる有機結晶の成長制御法を見出した(業績論文)。ここでは、有機結晶の局所領域をレーザー破壊(レーザーアブレーション)することで、成長に有利な結晶構造(らせん転位)を強制発生させ、結晶成長を促進させることができる。本手法は、従来までに温度や濃度などの環境パラメータの最適化とは一線を画した新しい結晶育成アプローチとして高く評価

され、Nature Photonics 誌に論文が掲載された。

【参考文献】

1. Cross et al., Nature Nanotechnology, Vol. 2, 2007, pp. 780-783.
2. Watanabe et al., Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Vol. 138, 2012, pp. 859-866.
3. Limozin et al., ChemPhysChem, Vol. 10, 2009, pp. 2752-2768.
4. Shimizu et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, Vol. 17, 2008, pp. 3020-3025.

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18件)

T. Matsuzaki, H. Ito, V. Chevreva, A. Makky, S. Kaufmann, K. Okano, N. Kobayashi, M. Sukanuma, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, M. Tanaka, Adsorption of Galloyl Catechin Aggregates Significantly Modulates Membrane Mechanics in Absence of Biochemical Cues, Physical Chemistry Chemical Physics, 査読有, Vol. 19, 2017, pp. 19937-19947.
DOI: 10.1039/C7CP02771K

K. Iida, R. Sakai, S. Yokoyama, N. Kobayashi, S. Togo, H. Y. Yoshikawa, A. Rawangkan, K. Namiki, M. Sukanuma, Cell Softening in Malignant Progression of Human Lung Cancer Cells by Activation of Receptor Tyrosine Kinase AXL, Scientific Reports, 査読有, Vol. 7, 2017, pp. 17770 (11 pages).
DOI: 10.1038/s41598-017-18120-4

吉川洋史, 松崎賢寿, 反射干渉顕微法～ソフト界面の非侵襲ナノイメージング～, 査読有, 生物物理, Vol. 57, 2017, pp. 318-322.
DOI: 10.2142/biophys.57.318

T. Matsuzaki, K. Ito, K. Masuda, E. Kakinuma, R. Sakamoto, K. Iketaki, H. Yamamoto, M. Sukanuma, N. Kobayashi, S. Nakabayashi, T. Tanii, H. Y. Yoshikawa, Quantitative Evaluation of Cancer Cell Adhesion to Self-Assembled Monolayer-Patterned Substrates by Reflection Interference Contrast Microscopy, Journal of Physical Chemistry B, 査読有, Vol. 120, 2016, pp. 1221-1227.
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11870

Y. Tominaga, M. Maruyama, M. Yoshimura,

H. Koizumi, M. Tachibana, S. Sugiyama, H. Adachi, K. Tsukamoto, H. Matsumura, K. Takano, S. Murakami, T. Inoue, H. Y. Yoshikawa, Y. Mori, Promotion of protein crystal growth by actively switching crystal growth mode via femtosecond laser ablation, Nature Photonics, 査読有, Vol. 10, 2016, pp. 723-726.
DOI: 10.1038/nphoton.2016.202

M. Sukanuma, A. Takahashi, T. Watanabe, K. Iida, T. Matsuzaki, H. Y. Yoshikawa, H. Fujiki, Biophysical Approach to Mechanisms of Cancer Prevention and Treatment with Green Tea Catechins, Molecules, 査読有, Vol. 21, 2016, pp. 1566 (17 pages).
DOI: 10.3390/molecules21111566

R. Kawamura, D. Uehara, N. Kobayashi, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, Kinesin-driven active substrate giving stochastic mechanical stimuli to cells for characterization, ACS Biomaterials Science & Engineering, 査読有, Vol. 2, 2016, pp. 2333-2338.
DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00538

R. Sakamoto, E. Kakinuma, K. Masuda, Y. Takeuchi, K. Ito, K. Iketaki, T. Matsuzaki, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, H. Yamamoto, Y. Sato, T. Tanii, Quantitative comparison of cancer and normal cell adhesion using organosilane monolayer templates: An experimental study on the anti-adhesion effect of green-tea catechins, In Vitro Cellular & Developmental Biology -Animal, 査読有 Vol. 52, 2016, pp. 799-805.
DOI: 10.1007/s11626-016-0049-6

〔学会発表〕(計32件)

吉川洋史, がん細胞・幹細胞のバイオメカニクス, 日本機械学会 2017 年度年次大会 (招待講演), 2017.

吉川洋史, フェムト秒レーザーアブレーションによる有機結晶の成長制御, 第78回応用物理学会 秋季学術講演会(招待講演), 2017.

岡野和希, 小林成貴, 川村隆三, 中林誠一郎, 吉川洋史, 液中周波数変調原子間力顕微鏡を用いた緑茶カテキンを含む脂質二分子膜の分子分解能観察, 日本化学会第97回春季年会, 2017.

吉川洋史, 川村隆三, 規律的な組織形成に資する細胞-外場間力学的相互作用の解明, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 (招待講演), 2016.

吉川洋史, 池滝憲太郎, 柳川史樹, 川

村隆三, 吳國愷, 田中泰誠, 小嶋勝, 新井健生, 米山鷹介, 伯野史彦, 高橋伸一郎, 高木俊之, 金森 敏幸, 中林誠一郎, 杉浦慎治, Development of a new method for evaluating cell mechano-response to multidirectional and anisotropic mechanical strain by using photodegradable hydrogel (招待講演), 第67回コロイドおよび界面化学討論会, 2016.

T. Matsuzaki, H. Ito, V. Chevreva, A. Makky, S. Kaufmann, M. Sukanuma, S. Nakabayashi, H. Yoshikawa, M. Tanaka, Physical Interactions of Catechin Derivatives with Cell Membrane Models, PACIFICHEM 2015, 2015.

H. Yoshikawa, Physical Studies of Cell-Substrate Mechanical Interactions for the Regulation of Cell Migration and Tissue Formation, Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter (招待講演), 2015.

〔図書〕(計1件)

吉川洋史, 武部貴則, コロナ社, 細胞社会学, pp. 41-49 (2.3 節「細胞凝集塊制御技術」を執筆), 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞の弾性特性を解析する方法、解析システム、細胞の弾性特性を可視化する方法および同左

プログラム

発明者: 小林成貴, 吉川洋史, 菅沼雅美, 中林誠一郎

権利者: 小林成貴, 吉川洋史, 菅沼雅美, 中林誠一郎

種類: 特許

番号: 特願 2017-179265

出願年月日: 2017年9月19日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 洋史 (YOSHIKAWA, Hiroshi)

埼玉大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 50551173