

令和 4 年 10 月 14 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20665

研究課題名（和文）細胞膜の軟化に基づく炎症誘起メカニズムの定量解明

研究課題名（英文）Quantitative elucidation of inflammation-inducing mechanism based on membrane softening

研究代表者

松崎 賢寿（Matsuzaki, Takahisa）

埼玉大学・理工学研究科・助教

研究者番号：50830527

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）：肝臓が炎症を起こし、そこから線維化が進行する疾病化の過程においては、初期段階である炎症反応に細胞膜の硬さが関与することが示唆されてきた。しかし、複数種の細胞が関与するようなヒト肝臓モデルが存在しなかったため、実際に「細胞膜の軟化がヒト肝臓の炎症を誘起させ得るか」といった問いは未解決なままである。そこで本研究では、複数種の細胞が関与するヒトのミニ肝臓創出法を生かして、その炎症過程における細胞膜の軟化過程を精細に可視化する顕微鏡システムを構築した。実際に細胞膜の硬さを計測すると、ヒトのミニ肝臓においても一気に細胞膜の硬さが軟化していることを初めて可視化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓の炎症メカニズムに関しては分子生物学的な研究が先行しており、毒（細菌成分や過剰のアルコール・脂肪）が細胞膜のタンパク質に結合して起こる緩やかな反応に着目が置かれている。しかし、ヒトの肝臓モデルが無かったため、既存研究は単一種の細胞に強く依存して行われていた。一方で本研究ではヒトのミニ肝臓を対象に、構築した顕微鏡システムを用いて細胞膜の硬さの精密測定が可能である。これによって生物学的なアプローチだけでは見えてこなかった炎症・線維化のメカニズムを物理化学的なアプローチからも切り込み、新規炎症メカニズムの解明につながる重要な課題と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recently, mechanical properties of the cell membrane is involved in the initial inflammatory reaction of the liver steatosis. Since there was no human liver organoid model in which multiple types of cells were reconstructed, the question "Can softening of the cell membrane induce inflammation of the human liver?" remains unsolved. In this study, I constructed a microscopic system to visualizes the softening process of the cell membrane during inflammatory process of liver organoid. Interestingly, we clearly visualized the membrane of liver organoid rapidly started to soften after the addition of inflammation inducer.

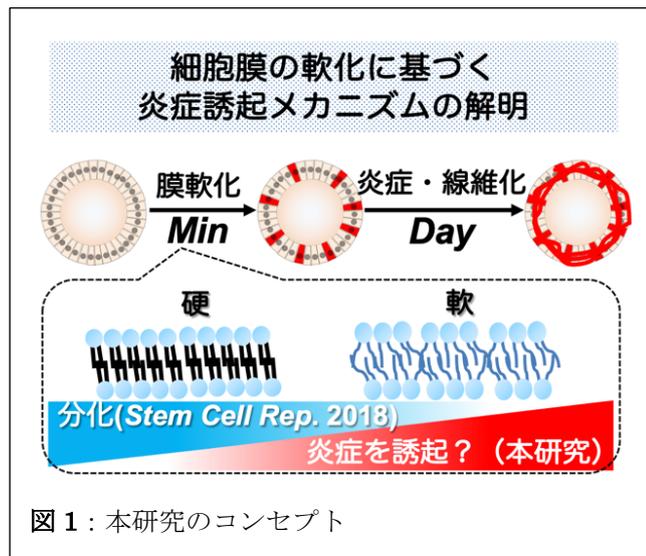
研究分野：生物物理学

キーワード：光技術 細胞膜 硬さ イメージング 発生 疾病 臓器

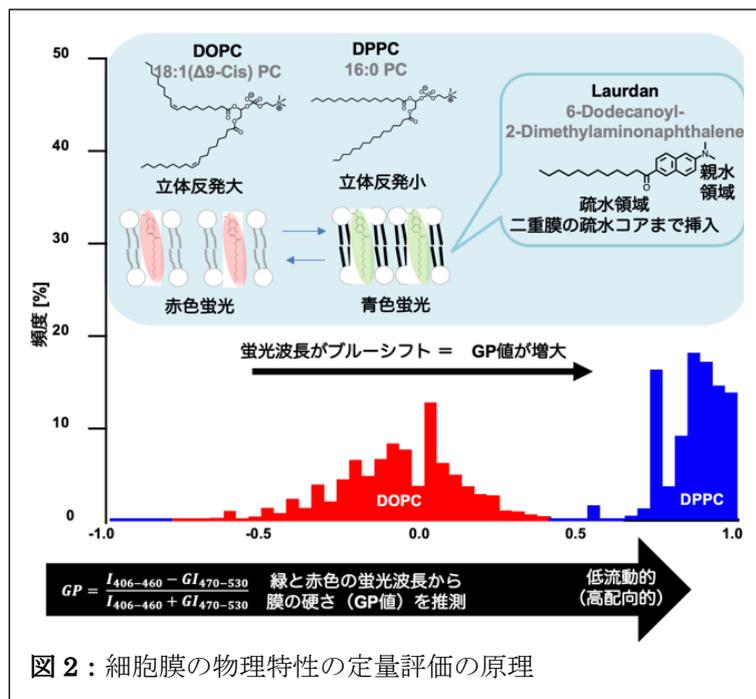
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景: 肝硬変の発症化のプロセス (炎症→線維化→発症) において、初期段階である炎症反応には細胞膜の硬さが軟化することが重要と示唆されてきた¹。例えば Sargentらはマウス由来の肝臓細胞株を用いて、炎症反応が起こるよりも先にアルコールが細胞膜を軟化し、その後の炎症と線維化の引き金となっている事を見出した²。しかし、複数種の細胞が関与するようなヒト肝臓モデルが存在しなかったため³、実際に「細胞膜の軟化がヒト肝臓の炎症を誘起させ得るか」といった問いは未解決なままである。一方で本研究では、複数種の細胞が関与するヒトのミニ肝臓創出法の技術が適用できるだけでなく (Takebe, ...Matsuzaki et al., *Cell Stem Cell* 2015 Front cover, Best of *Cell Stem Cell* 2015.)、さらには膜の硬化が引き金となって正常な分化が誘導されている事を解明した測定実績も有ることから (Matsuzaki,...Takebe, *Stem Cell Reports* 2018)、物理化学的なアプローチを用いて問いを解決へと導く十分な技術・実績を有している。

2. 研究の目的: そこで本研究の目的は、細胞膜の硬さを迅速かつ簡便に計測できるシステムを開発し、ミニ肝臓モデルによる線維化の再現系 (Ouchi, Takebe et al., *Cell Metabolism* 2019.) に適応して、細胞膜の軟化に基づく新規炎症メカニズムの解明を目的とした (図1)。その検証のために構築した顕微鏡システムの原理は3で説明し、ミニ肝臓の炎症過程における細胞膜の硬さのタイムラプス取得に応用した成果を4で記述する。



3. 研究の方法: 細胞膜の硬さを反映する物理学的特性として、本研究では脂質膜の流動性に着目した。その硬さをの測定するには、蛍光波長が変化する Laurdan (6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene)^{4,5}を用いた。Laurdanは脂質二重膜を構成する疎水性部位に挿入され、その周囲の水和分子の量 (分子パッキングの程度) によって蛍光波長が変化する化合物である。まず硬さが異なる脂質二重膜のベシクル (φ ~ 40 nm) 溶液を2種類準備し、システムの検証を行った。一つ目の DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) は不飽



和結合を2箇所疎水部位に含んでおり、脂質二重膜を形成した時には疎水基同士がファンデルワールス力で結合する力が弱い。そのため、Laurdan 周囲にある分子パッキングもゆるく水和分子の量が豊富となるため、その蛍光波長はレッドシフトする。一方で、DPPC (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine) は疎水基に不飽和結合を含まない直鎖の飽和炭化水素である。そのため、脂質分子の疎水基同士が密にパックし、Laurdan 周囲の水分子の流入量も少ない。よって流動性は低く硬い膜、つまり蛍光波長がブルーシフトする。Laurdan は $\lambda = 405 \text{ nm}$ の光を吸収し、周囲環境の水和強度から蛍光波長が変化するため、緑色 ($I_{406-460}$ 、下付文字の値は波長)、赤色 ($I_{470-530}$) の蛍光波長の比から、GP 値 (Generalized polarization value) で膜の流動性を評価することができる。実際に取得した DOPC と DPPC の GP 値のヒストグラムの裾野は、明確に別れており、この GP 値を基準に実際の細胞膜の硬さを議論できる。

4. 研究成果: 以上に
よって構築したシス
テムを用いて、ミニ
肝臓の炎症過程の膜
の硬さのタイムラプ
スを初めて取得する
ことに成功した。ま
ず正常なミニ肝臓に
10 μM の Laurdan
を添加し、405 nm レ
ーザーで照射した際
の緑色と赤色の蛍光
画像を独立に取得し
た。一般的なオルガ
ノイドと同様に、内
部が中空で単層の上
皮細胞が構成してい

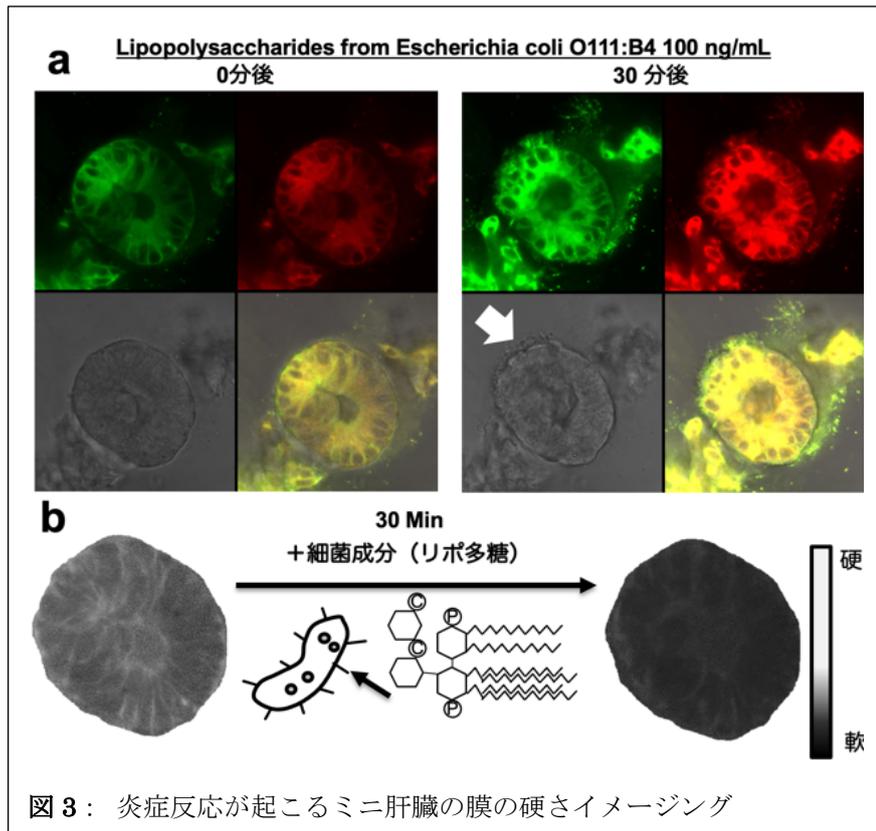


図 3: 炎症反応が起こるミニ肝臓の膜の硬さイメージング

る様子わかる (図 3a 左)。次に、細菌感染によって細菌から放出される Lipopolysaccharide (リポ多糖、LPS) を添加した時には、およそ 30 分程度で蛍光強度が増強し、さらに透過像の矢印で示したように、細胞表面が毛状の構造体が分泌されてオルガノイド全体が変形しているように見える (図 3a 右)。この時の細胞膜の硬さを評価したのが図 3b である。正常のミニ肝臓を構成する単層の上皮細胞一つ一つが染色されて、細胞と細胞との境界である細胞膜がよく染色できていることがわかる。さらに LPS 添加によって、細胞膜の位置はわかるが、その細胞膜の硬さはたった 30 分という非常に早いタイムスケールで一気に減少して軟化していることが明らかとなった。これは炎症線維化が起こるタイムスケール (Day) ^{1,2} よりも非常に早く (図 1)、細胞膜の軟化が炎症を誘導する最初の要因となる可能性を示唆する重要なデータとなっている。現在時間軸をより細かく設定し、その詳細な軟化機序の解明に取り組んでいる。

参考文献 ¹Sergent et al., *Trends in Alcoholic Liver Disease Research* 2012. ²Sergent et al., *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 2004. ³Szabo, *Nat. Rev. Gastro. Hepat.* 2018. ⁴Gaus et al., *PNAS* 2003. ⁵Owen et al., *Nat. Proto.* 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abe Yoshinori, Meguriya Keisuke, Matsuzaki Takahisa, Sugiyama Teruki, Yoshikawa Hiroshi Y., Morita Miyo Terao, Toyota Masatsugu	4. 巻 37
2. 論文標題 Micromanipulation of amyloplasts with optical tweezers in <i>Arabidopsis</i> stems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 405 ~ 415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.20.1201a	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 Naritaka Kobayashi, Shodai Togo, Takahisa Matsuzaki, Kaede Hashiseko, Ryuzo Kawamura, Masami Sukanuma, Seiichiro Nakabayashi, Yosuke Yoneyama, Rie Ouchi, Takanori Takebe, and Hiroshi Y Yoshikawa	4. 巻 13
2. 論文標題 Stiffness distribution analysis in indentation depth direction reveals clear mechanical features of cells and organoids by using AF	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Appl. Phys. Express	6. 最初と最後の頁 097001-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 M. Sukanuma, A. Rawangkan, P. Wongsirisin, N. Kobayashi, T. Matsuzaki, H. Y. Yoshikawa, T. Watanabe	4. 巻 -
2. 論文標題 Stiffening of Cancer Cell Membranes is a Key Biophysical Mechanism of Primary and Tertiary Cancer Prevention with Green Tea Polyphenols	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem Pharm Bull	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） なし	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 松崎賢寿、武部貴則、吉川洋史	4. 巻 45
2. 論文標題 オルガノイド形成に資する「細胞と外場」の力学特性の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 10-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 松崎 賢寿, 東郷 祥大, 寺村 裕治, 吉川 洋史	4. 巻 31
2. 論文標題 反射干渉顕微鏡による細胞接着のナノ計測 : 細胞接着に基づく生命現象の理解に向けて (特集 細胞の計測・制御の新手法)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular electronics and bioelectronics = 応用物理学会, 有機分子・バイオエレクトロニクス分科会誌	6. 最初と最後の頁 231 - 236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 松崎賢寿、武部貴則、吉川洋史
2. 発表標題 細胞膜流動性と肝臓原基の自己組織化
3. 学会等名 第62回 日本脂質生化学 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野呂捷太、渡部舞美、東郷祥大、藤井真衣、菅沼雅美、小林成貴、川村隆三、松崎賢寿、中林誠一郎、吉川洋史
2. 発表標題 細胞膜の形状と分子パッキングを同時計測可能な新規光学顕微システムの開発
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川 浩平, 大熊 菜穂, 松崎 賢寿, 吉川 洋史, 菅沼 雅美, 寺 正行
2. 発表標題 水溶性歪みジイン化合物を用いた細胞表面修飾法の開発
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大熊 菜穂, 北川 浩平, 菅沼 雅美, 吉川 洋史, 寺 正行, 松崎 賢寿
2. 発表標題 Click反応による細胞接着の化学的制御 高次の組織形成を目指して
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahisa Matsuzaki
2. 発表標題 Mechanics of extracellular matrix and cell membrane defines life phenomena
3. 学会等名 International Workshop on Emergence of Life-Nano-Bio Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎賢寿, 武部貴則, 吉川洋史
2. 発表標題 「細胞と外場」の力学特性と器官原基の自己組織化
3. 学会等名 生物工学Webシンポジウム2020(WS6-B02) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mai Fujii, Hayata Noro, Shodai Togo, Mami Watanabe, Masami Suganuma, Naritaka Kobayashi, Ryuzo Kawamura, Seiichiro Nakabayashi, Takahisa Matsuzaki, Hiroshi Y Yoshikawa
2. 発表標題 細胞接着界面の膜分子配列性の評価:がん細胞と正常細胞の比較
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hayata Noro, Mai Fujii, Shodai Togo, Mami Watanabe, Masami Suganuma, Naritaka Kobayashi, Ryuzo Kawamura, Seiichiro Nakabayashi, Takahisa Matsuzaki, Hiroshi Y. Yoshikawa
2. 発表標題 Evaluation of molecular packing of cancer cell membrane at cell substrate interface by fluorescence and interference reflection microscopy
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 複合体、複合体の製造方法および化合物	発明者 寺 正行, 北川 浩平, 松崎賢寿, 大熊 菜 穂, 吉川 洋史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-28795	出願年 2021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