

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15541

研究課題名(和文)細胞頂上膜面の細胞質突起3次元ダイナミクス-SICMによる新しい解析法の確立-

研究課題名(英文)Three dimensional dynamics of apical membrane ruffles on living cells by scanning ion conductance microscopy

研究代表者

水谷 祐輔(Mizutani, Yusuke)

北海道大学・総合IR室・特任准教授

研究者番号：40646238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)は、電解質溶液を充填したガラスピペットを探針とし、この探針と電極との間を流れるイオン電流の減衰から試料表面を非接触で検知することができる顕微鏡である。本研究では、細胞頂上膜面の細胞質突起の3次元ダイナミクス観察方法を確立することに成功した。

また、SICMと蛍光顕微鏡を用いることによって、細胞質突起微細構造のダイナミクスと細胞運動に関連する細胞内の細胞骨格タンパク質を観察することの有用性を示した。さらに、がん細胞の細胞質突起の構造の観察をおこない、がん細胞の悪性度によって細胞質突起構造やダイナミクスが大きく異なることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、走査型電子顕微鏡(SEM)や生物試料の処理方法の発達に依り、高い分解能で細胞膜表面の微細構造の観察が行われてきたが、生きた細胞運動の経時的変化の観察は困難であった。本研究では、変位がドラステックであり、膜の表面積の拡大、足場のセンシングなどに重要であると考えられている細胞質突起と呼ばれる細胞の頂上膜面に存在する微細構造を液中で生きたまま観察することを可能にした。

また、悪性度の異なるがん細胞において細胞質突起のダイナミクスが大きく異なることが明らかになったことから、細胞診断や細胞に対する薬剤の評価の新たな手法の基盤となる一助となることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Scanning Ion Conductance Microscopy (SICM) is the family of scanning probe microscopy. This technique uses a glass nanopipette filled with an electrolyte as a probing tip and regulates the tip-surface distance by detecting the ion current passing through a small hole of the pipette. Thus, SICM can obtain images of three-dimensional structures in liquid conditions without mechanical contact. In this study, we succeeded in establishing a method for observing the three-dimensional dynamics of microvillous structures including dorsal ruffles on the cell membrane surface.

By using SICM and fluorescence microscopy, we observed the dynamics of the dorsal surface ruffles and the intracellular cytoskeleton related to cell motility. Furthermore, we observed the dorsal surface ruffles of cancer cells, and showed that the structure and dynamics of dorsal surface ruffles differ greatly depending on the grade of cancer cells.

研究分野：組織学 顕微解剖学

キーワード：イオンコンダクタンス顕微鏡 3次元ダイナミクスイメージング 細胞質突起 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞の頂上膜面には微細構造が存在し、細胞質突起と呼ばれている。この細胞質突起は、膜の表面積の拡大、足場のセンシングなどに重要であると考えられ、薬剤付加前後で消失が認められる例があるように感受性が高く、変位がドラスティックであることが判明している。これまで走査型電子顕微鏡 (SEM) や生物試料の処理方法の発達に依り、高い分解能で細胞膜表面の微細構造の観察が行われ、組織や細胞の形態について多くの発見がなされてきたが、SEM で表面観察するためには生物試料を固定・脱水処理し、試料室を真空にする必要があり、生きた細胞運動の経時的変化の観察をするのは困難である。また、蛍光タンパク質の遺伝子導入や超解像顕微鏡といった光学顕微鏡技術の発達などにより、細胞内部の情報や細胞辺縁部のラメリポディア、フィロポディアは非常に多くの研究がなされているが、それと比べて生きた細胞頂上膜面の細胞質突起 3次元ダイナミクスの観察例はほとんどない。

(2) 研究代表者は、これまでに走査型プローブ顕微鏡 (SPM) を用いて生きた細胞の表面形状や物性評価に関する生物物理学的研究を行い、解析することに取り組んできた。その中で、イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) はイオン電流の減衰から試料表面を非接触で検知することができる装置であり、生きた細胞を無処理で簡単に観察できることから、細胞表面の構造や物性の違いから研究を行う際に、SICM の測定結果が重要な役割を果たすと考えた。また、アクチンフィラメントは細胞運動、接着の制御において中心的な役割を担っている。細胞質突起はアクチンフィラメントが軸となっていることから、細胞頂上膜面の細胞質突起のダイナミクスは細胞機能と密接に関連しているとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、液中において非接触で試料の表面位置を測定できる利点をもつ高性能化した SICM を用いて、生きた細胞の精密な非接触計測を行い、イソギンチャクのように "ひだ" が常に形を変え続けている細胞頂上膜面の細胞質突起の 3次元ダイナミクス観察方法を確立することを目的とした。さらに、既存の研究データと比較し裏付けが行えるように、細胞機能を評価する一要素である細胞骨格との関連を蛍光顕微鏡を併用し評価することとした。これにより、まだ解明されていない細胞頂上膜面における細胞質突起ダイナミクスを解明し、細胞診断や細胞に対する薬剤の評価の新たな手法の基盤とすることを目指した。

3. 研究の方法

研究目的を達成するために、以下のことを計画し取り組んだ。

(1) 既存の SICM は装置自体が実用化されてから初期段階であるため、S/N 比が低く帰還制御がうまく行かずにサンプルに探針が接触してしまうことや、細胞などの柔らかいサンプルであると探針のアプローチスピードが適切でなく細胞が変形してしまう状態を引き起こす。そのため、改良および固定細胞・生細胞頂上膜面検知のための測定条件の最適化をおこなった。

(2) 遺伝子導入を行うことで、GFP-アクチンなど蛍光タンパクと融合している細胞骨格関連タンパク質を発現する細胞を作出し、サンプルとして用いることとした。SICM と蛍光顕微鏡を用いて作出した細胞の細胞質突起のダイナミクスと細胞骨格との関連を解析した。

(3) 細胞内アクチンフィラメントでは G タンパク質 Rho ファミリーが細胞外シグナルとして受容体を介し、構造再編を引き起こし、細胞運動や細胞形態変化を引き起こす事が知られている。そこで、Rho, Rac, Cdc42 をそれぞれアクティベートする Calpeptin や EGF を付加し、SICM を用いて細胞質突起の構造変化を経時的に観察した。それにより、細胞骨格の性状を変化させた際の細胞質突起のダイナミクスが細胞骨格とともにどのように変化するかを解析した。

(4) がん細胞の悪性度は、細胞移動能と関連しており、細胞骨格や細胞接着によって制御されている。そこで、がん細胞の悪性化と細胞質突起の構造観察および解析について取り組んだ。

4. 研究成果

(1) SICM の改良による時間分解能および空間分解能の向上

既存の装置ではアンプの S/N 比が低く帰還制御がうまく行かずに実験試料に探針が接触することが多かったため、装置の S/N 比の改善に着手した。SICM は通常、ピペット電極とバス電極の間に一定の電圧をかけ、ピペットを流れる電流の変化を検出することで表面を検知するため、当初の計画では極低雑音の電流増幅器を購入し、導入することを計画していた。しかしながら研究を進める中で、ピペット電極からバス電極に一定の電流を印加し、電圧の変化を検出するという電流源に基づいた方式を採用することで、周波数特性とノイズスペクトルが従来の電圧源よりも優れていることが分かり、自作の定電流回路を導入することとした。その結果、S/N 比が改善し、計測されたシグナルを平均化することなくデータを取得することが可能となった。このことから、画像取得平均時間を短縮でき、時間分解能を約 150% 強改善することに成功した。さらに、探針であるガラスピペットの改良をおこない、通常約 100 μm であったピペットの開口径を簡易的により小さくした。この改良されたピペットを用いて固定した組織切片表面を観察

し検討をおこなった結果、空間分解能の改善が認められた。

(2) 生きた細胞の細胞質突起のダイナミクス観察

SICMを用いる事により、生きたまま無染色で細胞頂上部の細胞質突起を長時間に渡り、多数観察することが可能となった。その上で、細胞質突起は短時間のうちに大きく揺ぎ、また融合するなどダイナミックに形状を変化させている事が分かった。図1にはインドホエジカ胸腺由来細胞株である Indian Muntjac (Mm2T) 細胞のタイムラプス観察結果を示した。

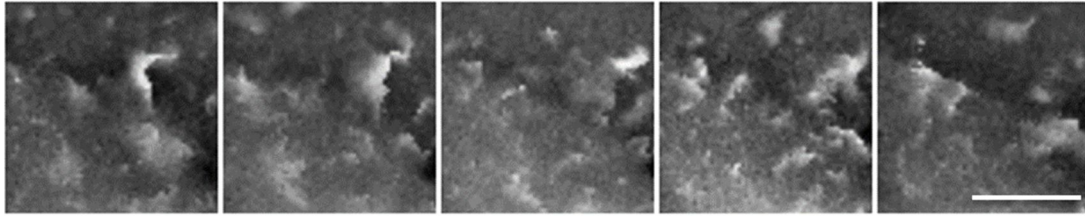


図1：Mm2T細胞における細胞質突起のタイムラプス観察結果 (Bar = 5 μm .)

(3) 各種顕微鏡との相補観察の成功

蛍光顕微鏡、SEMやTEMといった他の顕微鏡技法により取得した画像を相補的に用いた。図2にはCa9-22細胞のアクチン線維の蛍光像を示した。細胞底部のアクチン線維がラメリポディアとして張り出していたのに対し、細胞頂上部のアクチン線維は点在し、細胞質突起の芯となっている事が示唆された。また、図3にはCa9-22細胞の同一細胞における細胞表面のSEM像とSICM像を示した。Ca9-22細胞では細胞表面の突起が糸状、ひだ状もしくは球状をしており、その分布もやや疎であることが分かった。以上のようにSEM像とSICM像を比較することで、SICM観察における適した測定条件の確認をおこなえ、SICMを用いることでラベリングをおこなうことなく、液中にてSEM同様の観察がおこなえることが確認された。

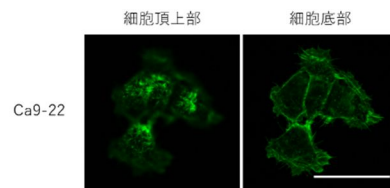


図2：Ca9-22細胞のアクチン線維蛍光像 (Bar = 5 μm .)

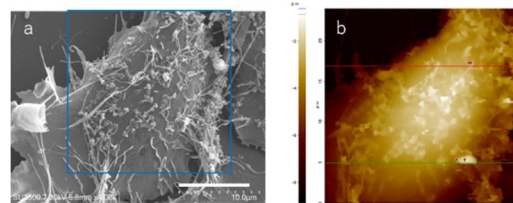


図3：Ca9-22細胞のSEM像(a)、SEM像青枠内のSICM像(b) (Bar = 10 μm .)

(4) 細胞内アクチンフィラメント重合阻害剤による細胞質突起構造のダイナミクス観察

Gタンパク質 Rhoファミリーがアクティベートする Calpeptin や EGF を付加を検討したが、細胞質突起は細胞骨格関連タンパク質が芯となっているため、細胞質突起がよりドラスティックに変化するものと考えられる細胞骨格の重合阻害剤を付加した際の構造変化を観察した。その結果、阻害剤付加後、単位面積あたりの細胞質突起の数に急激な変化はなかったが、突起1つあたりの大きさが徐々に小さくなっていく様子がSICMで観察され、細胞質突起はアクチンの線維化の影響を大きく受けている可能性があり、非常に薄い濃度でも構造変化をしていることが示唆された。

(5) 悪性度の異なるがん細胞における細胞質突起のダイナミクス観察

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)はセリンプロテアーゼインヒビターで、腫瘍の悪性化を亢進することが知られている。そこで、SLPIを強発現するヒト口腔上皮癌由来Ca9-22細胞とSLPI遺伝子欠損Ca9-22細胞(SLPI Ca9-22細胞)の細胞質突起構造をSICMを用いて形態学的解析をおこなった。その結果、Ca9-22細胞の大きなひだ状の細胞質突起はダイナミックに変化するのに対し、SLPI Ca9-22細胞の細胞質突起は小さなひだ状であり、かつ変位は小さいものであった。各細胞の移動能同様に細胞質突起のダイナミクス動態は大きく異なり、SLPIは細胞膜表面構造を変化させることで腫瘍の悪性化に関与していることが示唆された。よって、これら細胞質突起構造の変化はSLPI依存型のがん悪性化のマーカーとなる可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Mizutani Yusuke, Omagari Daisuke, Hayatsu Manabu, Nameta Masaaki, Komiyama Kazuo, Mikami Yoshikazu, Ushiki Tatsuo	4. 巻 14
2. 論文標題 SLPI facilitates cell migration by regulating lamellipodia/ruffles and desmosomes, in which Galectin4 plays an important role	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Adhesion & Migration	6. 最初と最後の頁 195 ~ 203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19336918.2020.1829264	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 Iwata Futoshi, Shirasawa Tatsuru, Mizutani Yusuke, Ushiki Tatsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Scanning ion-conductance microscopy with a double-barreled nanopipette for topographic imaging of charged chromosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microscopy	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） 10.1093/jmicro/dfab009	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 水谷祐輔, 山川明里, 早津学, 牛木辰男
2. 発表標題 走査型イオン伝導顕微鏡を用いた組織切片表面微細構造解析
3. 学会等名 第75回日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷祐輔, 早津学, 三上剛和, 牛木辰男
2. 発表標題 イオン伝導顕微鏡による組織切片表面の微細構造イメージング
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Mizutani, Y. Mikami, M. Hayatsu, T. Ushiki
2. 発表標題 Simultaneous observation of the cell surface structure and cytoskeleton by scanning ion conductance microscopy and fluorescence microscopy
3. 学会等名 The 20th International Scanning Probe Microscopy Conference (ISPM 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷祐輔, 三上剛和, 牛木辰男
2. 発表標題 細胞表面微細構造と移動能の関連性についての走査型イオン伝導顕微鏡による解析
3. 学会等名 第74回日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷祐輔, 牛木辰男
2. 発表標題 走査型イオン伝導顕微鏡による組織・細胞観察
3. 学会等名 2019年度精密工学会春季大会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷祐輔, 早津学, 三上剛和, 牛木辰男
2. 発表標題 イオン伝導顕微鏡による細胞・組織イメージング
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Mizutani, Y. Yamada, Y. Mikami, T. Ushiki
2. 発表標題 Movement of oral carcinoma cells investigated by scanning ion conductance microscopy
3. 学会等名 The 19th International Scanning Probe Microscopy Conference (ISPM 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水谷祐輔、三上剛和、早津学、牛木辰男
2. 発表標題 走査型イオン伝導顕微鏡による細胞膜表面観察とがん細胞動態解析への応用
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizutani Yusuke, Hayatsu Manabu, Mikami Yoshikazu, Ushiki Tatsuo
2. 発表標題 Scanning ion conductance microscopy for visualizing the surface topography of rat tissue sections
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国集会
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	牛木 辰男 (Ushiki Tatsuo)	新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (13101)	

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