

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462924

研究課題名(和文) 組織拡散を決定する因子としての細胞膜表面糖タンパク構造について

研究課題名(英文) Glycoprotein of intact plasma membrane determines the diffusion properties of cellular water

研究代表者

榮田 智 (EIDA, Sato)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：80325662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、in vitro拡散強調MRイメージングシステムを用いた実験から、細胞膜の長さ(CPL)が水分子の拡散係数(ADC)と関連していることが分かった ( $ADC = -0.21 \times CPL + 1.10$ )。つまり細胞膜の影響により水分子の動きが制限されていると考えられる。また、apoptosis や necrosis といった異なる細胞死の過程を、ADC値の変化で捉えている。つまりADC値は細胞死を予測する指標と成り得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using an in vitro system and a high-resolution MR imaging technique, we show that the length of the intact plasma membrane is a major determinant of water diffusion in a controlled cellular environment and that the cell perimeter length (CPL) is sufficient to estimate the apparent diffusion coefficient (ADC) of water in any cellular environment in our experimental system ( $ADC = -0.21 \times CPL + 1.10$ ). We used this finding to further explain the different diffusion kinetics of cells that are dying via apoptotic or necrotic cell death pathways exhibiting characteristic changes in size, nuclear and cytoplasmic architectures, and membrane integrity. These results suggest that the ADC value can be used as a potential biomarker for cell death.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞膜 糖蛋白 ADC

## 1. 研究開始当初の背景

拡散は細胞密度、細胞外マトリックスの割合、粘稠度、出血、腫瘍細胞周囲の血管(微小循環)、necrosis、結合組織の存在、核と細胞質の割合、細胞性浮腫との関係、あるいは温度などの物理的な要因によって大きく影響を受ける。生体内では細胞膜の存在が拡散に与える影響は大きく、このため細胞密度の増加は組織の拡散を低下させる最大の要因の一つである。細胞の存在が水分子の拡散を低下させる理由は大きく2つに絞られる。1つには **a)** 細胞内に存在する核や様々な大きさの膜構造を有する vesicle の存在により細胞内拡散が抑えられること。2つめは **b)** 細胞膜の存在が水分子の自由な動きの妨げになっていることである。特に細胞膜は水分子が衝突するため細胞内外水分子の自由な動きの妨げになっていると考えられている。しかしこの解釈は間違っているかもしれない。Singer と Nicolson は流動モザイクモデルを提唱し、細胞膜を構成するリン脂質とタンパク質が膜造の中でモザイク状に分布し、共に流動性をもっていると考えた。さらに Agre は水を選択的に効率よく通過させる膜タンパク(アクアポリン)の存在を明らかにしている。こうした仮説に立てば、膜が強固な障壁となって水分子の前に立ちはだかつて、水分子の自由な動きを制約しているとは考えにくい。つまり、リン脂質とタンパク質そのものは水分子の動きにあまり影響を与えないのかもしれない。細胞膜ではリン脂質は親水性である頭部を外側に、疎水性である尾部を内側に向け、二重膜を形成している。くわえて細胞膜には、脂質の中に埋め込まれたり、脂質自体に結合した状態のタンパク質(膜タンパク質)が存在し、細胞表面に露出した脂質や膜タンパクには多くの場合、オリゴ糖が結合しており、これらは糖鎖の被覆層を形成している。したがって細胞表層は全体としてより立体的な構造となり、さらには細胞の種類ごとに特徴的な糖鎖構造をとっている。糖鎖の負荷電は多量の陽イオンを細胞表面に引きつける。つまり細胞膜外側では細胞膜近傍の水分子の動きが大きく阻害されている。したがって細胞膜表面では水分子のプロトンもこの糖鎖にトラップされていると考えられている。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、組織拡散を決定する因子として、細胞膜表面糖鎖構造に着目した。わ

れわれは次のような仮説をたてた。すなわち細胞膜の存在で拡散が抑制されるのは、細胞表面の脂質や細胞膜に突出したタンパク質から伸びた糖鎖が水分子と結合することによって細胞膜近傍の水分子の動きが大きく阻害されることが原因であると。この仮説に従えば、細胞膜近傍に突出した糖鎖の長さに応じて水の拡散が極めて強く抑制されるごく薄い層が形成されていると想定される(Slow-Diffusion Layer)。当然のことながら糖鎖が多く存在すれば、拡散係数は低下し、少なれば拡散係数は高くなると推測される。一方、細胞質側でも同様の層が形成されるが、これは細胞表面とは異なり、膜を構成するタンパク質から伸びる細胞骨格が水分子の自由な動きを制限する原因となっていると思われる。本研究ではこのうち細胞表面の糖タンパクに焦点をあて、SDL 仮説を検証したい。

## 3. 研究の方法

### Slow-Diffusion Layer (SDL)モデルの作製

膜細胞表面の糖鎖がいかに細胞膜近傍の水分子の動きを抑制しているのかを確かめるために SDL モデルを開発する。その為には、**a)** 基盤となるマイクロビーズの材料は、拡散値を計測するとき、アーチファクトを生じるなどの障害陰影を生じない材質を選ぶこと、**b)** 糖鎖を有するタンパク質と結合しやすい官能基を選択すること、が求められる。また作製したモデルを用いた計測では、糖鎖がある場合とない場合に生じる拡散値の差、マイクロビーズの粒径に伴う糖鎖量で生じる拡散値の差、単位体積あたりのビーズ数の違いで生じる拡散値の差、を検証しなければならないため、**1)** マイクロビーズの粒径や **2)** 糖鎖量を変化させた複数のモデルを作製しなくてはならない。SDL 構造を有していない官能基を有するマイクロビーズに、官能基を活性化する為の試薬を加え、糖タンパク質のアミノ基と結合させることで、SDL モデルを作製する。

### 拡散値の測定

測定においては、**1)** 細胞内外や細胞膜近傍といったミクロの計測を行う為に共焦点レーザ走査型顕微鏡による RICS 解析を、また **2)** 単位体積あたりのといったマクロの計測を行う為に in vitro 拡散強調 MR イメ

ージングシステムを用いる。

### 1) 共焦点レーザー走査型顕微鏡 拡散計測ソフトによる RICS 解析

Raster Imaging Correlation Spectroscopy (RICS)解析。細胞内外や細胞膜近傍では様々なサイズの分子が流動的に動きながら存在している。分子を EGFP (Enhanced Green fluorescence Protein) でラベリングし、この流動的に動いている分子の動き情報を、細胞の形態情報と一緒に画像データとして取得する方法である。この得られた画像データは各画素ごとにサンプリングした画像データは各画素ごとにサンプリングした時間が異なるので、それぞれ X Y の空間情報に加え、経過時間が異なる時間を加味したデータとなっている。このデータを空間相関という統計的アルゴリズムで解析することにより、分子の拡散係数を算出する。分子の動きが悪いと蛍光イメージは強調され、拡散係数は低下することになる。

### 2) in vitro 拡散強調 MR イメージングシステム

当教室では、細胞ならびに細胞間の様々な拡散係数の変化に関する基礎的検討を行うため、「in vitro 拡散強調 MR イメージングシステム」を考案した。このシステムを利用することで、周囲磁場の均一性が向上することをすでに確認している。周囲磁場の影響を受けやすい ADC マップの作成にあたっては高い signal intensity ratio が実現し、細胞の微細な特徴の描出が可能である。

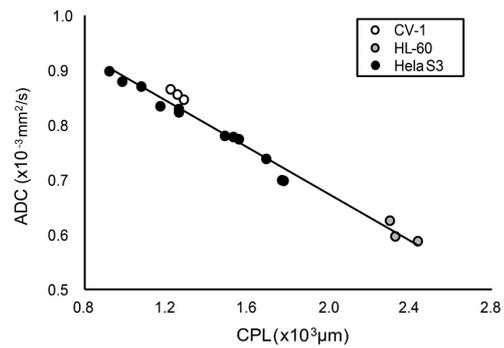
培養細胞を使って、実際の細胞表面に存在する SDL の動態が apoptosis や necrosis といった各種ストレスを与える。例えば、apoptosis は細胞周囲の blebbing および膜構造改変に伴う膜表面レセプターのプロファイルの変化を、necrosis は細胞死に伴う膜の電位および透過性の変化、ならびに膜の断裂によって引き起こされる膜構造の縮小といった減少が起こると考えられる。細胞の変化に伴って拡散係数がどのように変化するかを RICS 解析および MR イメージングシステムを用いて行う。

### 4. 研究成果

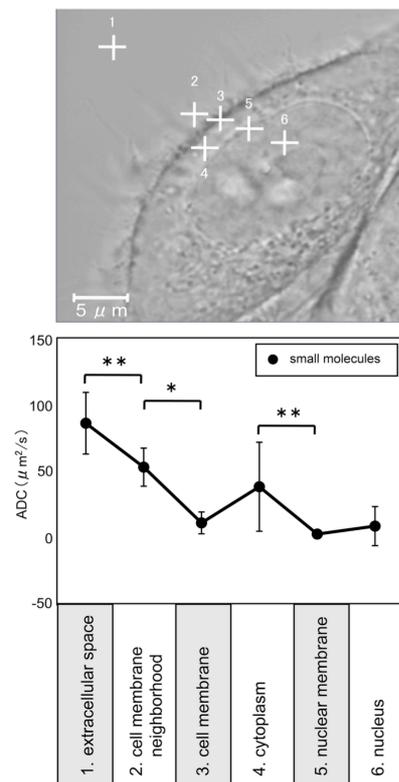
マイクロビーズを用いた SDL モデルでは拡散係数の変化をうまくとらえることができない

かった。そこで、培養細胞を使った研究結果を以下に示す。

(1) ペレット内での細胞の占める割合 CA (cell area) や細胞に対する核の占める割合 nCA (nucleus-weighted CA)、細胞辺縁の長さ CPL (cell perimeter length) について ADC 値との関係を検討を行った。有意差が見られたのは CPL のみであった。CPL と ADC 値の関係は、 $ADC = -0.21 \times CPL + 1.10$  ( $R^2 = 0.97827$ ) で示され、CPL が大きくなると、ADC 値は低くなった(下図)。つまり細胞膜の影響により水分子の動きが制限されていると考えられる。

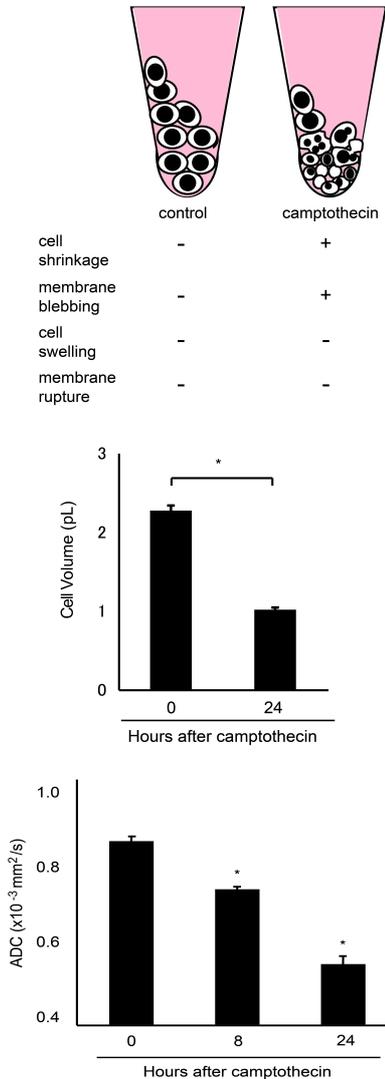


(2) RICS 解析では結果が得られなかったため、流動的に動いている分子 (Dio) の動きを数値化して捉える Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) にて解析を行った。細胞外や細胞膜近傍、細胞膜など 6 つの計測点を設定し、Dio 分子の動きを測定した。細胞膜や核膜での動きが制限されていることが分かり、膜の影響が考えられる (下図)。

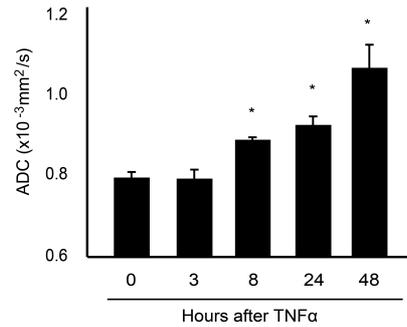
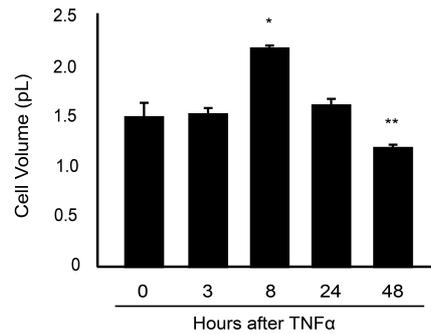
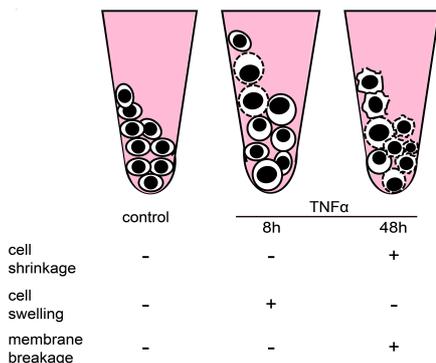


(3) 薬剤を用いて、apoptosis や necrosis と いったストレスを与えた。

apoptosis (camptothecin-treated HeLa S3 cells) では cell shrinkage や membrane blebbing が起こり、cell Volume の低下に伴い、ADC 値も低下する(下図)。



一方、necrosis (TNF  $\alpha$ -treated L929 cells) では cell shrinkage や membrane breakage が起こり、cell Volume の低下に伴い、ADC 値は上昇する(下図)。



この両者の違いは細胞膜が保たれているかどうかの状態によるものと考えられる。

(1)~(3)の結果から、細胞膜の存在や変化と関係して分子の動きが制限の違いがあるということは、細胞表面の糖タンパクの関与が考えられ、SDL 仮説を示唆する結果となった。

さらに(3)の結果は、apoptosis や necrosis といった異なる細胞死の過程を、ADC 値の変化で捉えている。つまり ADC 値は細胞死を予測する指標と成り得る可能性が示唆された。

### 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1件)

① Eida S., Van Cauteren M., Hotokezaka Y., Katayama I., Sasaki M., Obara M., Okuaki T., Sumi M., Nakamura T.  
Length of intact plasma membrane determines the diffusion properties of cellular water.  
Scientific reports. 6:19051  
Doi:10.1038/srep19051.2016.  
(査読あり)

[学会発表] (計2件)

① Eida S., Van Cauteren M., Hotokezaka Y., Katayama I., Sasaki M., Obara M., Okuaki T., Sumi M., Nakamura T.  
Differentiation between apoptotic and non-apoptotic cell death using diffusion-weighted MR.

ISMIRM 21st Annual meeting and exhibition

(Salt Lake City, USA) April 20 to 26, 2013.

② Hotokezaka Y, Eida S, Katayama I,  
Sasaki M, Sumi M, Nakamura T.

In vitro measurement of apoptotic and  
non-apoptotic cells using  
diffusion-weighted MR.

The 19th International Congress of  
Dento-Maxillo-Facial Radiology IADMFR  
(Bergen Norway) June 22 to 27, 2013  
program, P22.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴田 智 (EIDA, Sato)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：80325662

### (2) 研究分担者

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA, Yuka)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：10244089

片山 郁夫 (KATAYAMA, Ikuo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：80295089

佐々木 美穂 (SASAKI, Miho)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：10437874

中村 卓 (NAKAMURA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：30172406