

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650109

研究課題名(和文)細胞が接着領域を確保するために行う新現象「場所取り」の解析

研究課題名(英文)Analysis of the space-occupying process as a novel phenomenon in cell adhesion

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

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): 接着細胞の多くは、培養容器への接着が正常に生育させるためには必須である。浮遊状態におかれた接着細胞は、培養容器との接着の足場を形成するために必要ないくつかの細胞外マトリックスを放出することが知られている。本研究では、細胞が培養容器へ接着する過程において、排他的に接着領域を確保する現象、すなわち「場所取り」現象が存在することを見いだした。そして、この現象に關与する未知の因子の同定を試みた。

研究成果の概要(英文): Cell adhesion onto a cell culture plate is a necessary for a normal cell growth in every monolayer adherent cells. Once adherent cells were suspended, it is known that many extracellular matrix components were released from cells to create an anchor for the cell culture plate. In this study, I discovered a novel event of an exclusive reservation for cell adherent area, which we named "space-occupying process" in cell adhesion processes. Moreover, I tried to identify the factor in this phenomenon.

研究分野：細胞生物学

キーワード：場所取り

1. 研究開始当初の背景

(1) 汎用の研究素材としての哺乳類細胞のうち、単層で生育する細胞について、継代の過程で培養容器へと播種した場合、これらの細胞の多くは培養容器の底面にほとんど均一に分布し、互いに接着するまで増殖を繰り返した後、増殖を停止する。この過程は接触阻害効果 (contact inhibition) とよばれる。接触阻害効果により増殖が停止したこれらの細胞は、敷石状に分散し、細胞周期を停止させて休止期を維持している。これら接着細胞における増殖から休止期に至る過程は相当以前から知られている疑いの余地のない基本的な生命現象である (Abercrombie M, 1954)。多くの単層で生育する哺乳類細胞のうち、培養容器と接着する細胞の多くは、細胞外接着因子を「足場」として利用することで細胞と培養容器との接着を維持する。これらの接着機構は、足場依存的接着とよばれる。これら足場依存的接着が必要な細胞を実験に供する場合、及びこれらの細胞を継代する場合、まず、トリプシンや類縁化合物等の細胞剥離剤を用いて細胞を培養容器から剥離させる。この際、多くの細胞は細胞と細胞の間の結合も破壊され、単一の状態で培養溶液中に分散する。次に、これらの細胞浮遊液を別の細胞培養容器に播種すると、細胞は新たな増殖エリアに接着して増殖を開始させる。この過程において、単離されたほとんどすべての哺乳類培養細胞は、活発な運動能を有する精子細胞を除くと、培養溶液中で自発的に運動することはできない。従って、単離された培養細胞が培養容器へと接着する過程で働く唯一の力は重力だけである。なお、ブラウン運動は細胞に運動能を与えるほど大きい力ではないので、ここでは考慮するに値しない。培養溶液中で単離された培養細胞は、重力による自由落下だけに依存して培養容器に接着、

すなわち着地する。着地した細胞は、自身で形成する足場を利用することで、細胞と細胞との間の接着機構を形成するだけでなく、培養器材との接着力を変化させることで平面内での水平方向への運動能を獲得できる。すなわち、自身の増殖領域を確保するために、細胞密度が低い領域へと移動することが可能になる。これらの細胞はその後、接触阻害効果が発揮されるまで増殖し、また増殖可能領域へと移動することで、見かけ上、細胞は敷石状に分散する。

(2) 本研究のきっかけは、上記過程すなわち、単離された哺乳類培養細胞が、培養容器へと接着する過程において、未知の機序が存在する可能性があることを認知したことである。たとえば、単離された細胞懸濁液を播種した場合、仮に自由落下によってのみ細胞が沈降すると定義すると、播種された細胞は、培養容器上において低密度領域から高密度領域へとかなり偏向した密度の分布形態を示すはずである。しかし、実際に播種後の比較的早い時間に播種された細胞を観察すると、ほぼ均一に細胞が分散している場合が多い。細胞の平面方向の運動性は、足場が形成され、細胞が十分に伸展してからでなければ発揮されないことから、この分散過程に細胞自身の運動能が関与していることは考慮しがたい。従って、浮遊状態の接着細胞が培養容器へ接着する過程には、自由落下による沈降以外に、これまでに知られていない、新奇の機序が存在する可能性が示唆された。そこで、本研究では、播種された細胞が培養容器へと接着する過程を詳細に解析した。その結果、播種された浮遊状態の足場依存性哺乳類接着細胞は、培養容器へと接着する過程において、排他的に自身の接着領域を確保していることを見いだした。この現象はこれまでに知られていない現象であり、その様子から「場所取り」と申請者が名付けた。この「場

所取り」現象は、花見等のイベントで観察される場所取りに相応する。なお、「場所取り」現象は本研究で初めて見いだされた現象であり、確立された生命現象ではない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、「場所取り」、すなわち、浮遊状態におかれた足場依存性の哺乳類培養接着細胞が、培養容器へと播種された後に接着する過程で観察された、新現象の解析を行う。申請者が観察したこの現象はこれまでに報告がないことから、新規の細胞機能である可能性が高い。なお、「場所取り」現象とは、単離後に播種された培養接着細胞が、自身の接着場所をあらかじめ確保する現象のことである。本研究では、それらの機序の解析に取り組む。さらに、「場所取り」が、人為的な培養操作の過程だけで生じる現象ではなく、生体内で普遍的な現象であることを検証する。本研究の遂行で、「場所取り」現象が意図しない細胞増殖や転移を制御するための標的となり得るかを考察できる。本研究は、基礎細胞生物学の新たな領域の創出に寄与できると考えている。

(2) 培養動物細胞の多くは、足場依存的に増殖し、その足場は培養容器と相互作用している。培養細胞を用いた実験において、これらの細胞を継代する過程では、接着している細胞を培養容器から剥離し、適宜細胞数を調整した後に継続的に培養する必要がある。その際に、一般的に使用される細胞剥離剤として、トリプシンやエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA_{2Na})、およびそれらの混液、あるいはそれらの類縁化合物が知られている。多くの場合、これら試薬を用いて培養基質から細胞を剥離させ、適宜必要な細胞数に調整し、新たな培地で懸濁し、別

の培養容器へと播種する。細胞を増殖させる過程において、足場の形成を必要とする培養哺乳類細胞の場合、本来の性質を維持したままに増殖させるためには、培養容器または培養基質への接着が必須である。一旦剥離させたこれらの細胞が培養容器の接着面と接触するまでに作用する外的動力は、重力のみである。つまり、培養哺乳類細胞が培養容器に接触する過程の機序は、重力依存的な自由落下であり、これが唯一知られている機序である。哺乳類培養細胞の多くは、精子細胞を例外として、溶液中を自発的に泳動する能力を有しないため、剥離後の単離浮遊状態で培養溶液中を自由に浮遊泳動することは不可能である。剥離された培養接着細胞を培養溶液に懸濁した後に播種すると、細胞数が極端に稀薄でない場合、先に着地した細胞に別の細胞が重積して接着する可能性が考えられる。しかし、興味深いことに、鉛直自由落下に依存的に細胞が沈降するにもかかわらず、浮遊状態の培養細胞の多くは、着地した培養容器表面において重積状態ではなく、相互にほぼ均一に分散して存在する。この現象から考察すると、これらの細胞が培養容器底面に接着する過程において、個々の細胞間で互いに反発的な何らかの応力が存在している可能性が示唆される。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ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、「場所取り」という現象の普遍性を確立するために、研究の対象として、多くの研究室で汎用される足場依存的に増殖する培養接着細胞を用いる。「場所取り」現象の普遍的存在を確認する、という研

究目的を達成するためには「場所取り」で放出されると推測される「場所取り」因子の同定がもっとも重要である。まず、その因子の同定を試み、そのうえで本現象の普遍性の検討を行う。

接着性培養哺乳類細胞をトリプシン-EDTAを用いて単離させ、培養液に再懸濁し、新たな培養容器へと播種した際に、それらの細胞が接着する過程で行われる「場所取り」について、その現象のもっとも主要な役割を有する「場所取り」因子を直接、可視的に観察するために、特異的に「場所取り」因子と相互作用し、染色可能な化合物のスクリーニングを実施する。なお、この現象の観察は、共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて行うために、対象となる化合物は蛍光指示薬に絞って探索する。

実際の研究において、「場所取り」因子を同定する際には、質量分析装置を使用する。培養溶液または播種した単離状の培養細胞からの「場所取り」因子の抽出方法や精製方法は、適切な文献を調査し、適宜、試行錯誤により実施する。この化合物の同定が達成された後に、「場所取り」因子の細胞外放出機構の探索と、その機序を制御する分子メカニズムを検討する。なお、これまでに知られている細胞外放出因子として、分泌性タンパク質、分泌性のペプチド、脂質、糖鎖、糖脂質、複合糖鎖等が知られている。本研究では分泌小胞の可能性も考慮するが、細胞外遺伝子断片等の核酸関連化合物は考慮しない。これらの化合物の多くは細胞表面膜に局在するタンパク質の能動的機序により放出される場合が多い。これまでに知られている因子のうち、コレステロール等の脂質を含む低分子化合物の放出に関与するタンパク質として、ABC(ATP-Binding Cassette)タンパク質が代表的な放出装置であ

る。このタンパク質は、自身がポンプとなり、分子量が数百から数千程度の化合物を非特異的に通過させる。本研究では、「場所取り」因子が低分子化合物との推測のもと、細胞外放出に関わる装置として同様のタンパク質の関与を想定している。そこで、各種の細胞内外の物質輸送タンパク質に対する機能阻害剤を用いて「場所取り」因子の放出に関連する標的タンパク質を同定する。また、標的タンパク質をsiRNAにより発現量を制御させた条件下での「場所取り」機序に対する影響を検討する。

「場所取り」が普遍的な現象であることを確認するために、足場依存的な細胞のうち、がん細胞を含めてさまざまな培養哺乳類細胞における「場所取り」現象を観察する。本研究では、容易に入手可能な汎用培養細胞の中から数十種を選択し、「場所取り」現象が実際に存在するかを観察する。さらに、「場所取り」因子が放出する過程の観察も行う。これらには、共焦点レーザー顕微鏡や質量分析装置を使用する。その後、「場所取り」因子の放出とその認識に関与するタンパク質の探索を実施する。ここでは、ウェスタンブロット法のほか、質量分析装置を使用する。さらに、それらの発現量の人為的な増減で「場所取り」現象にどのような影響が見られるかを検討する。なお、足場に非依存的に増殖可能な培養細胞や、浮遊性の血球細胞等における「場所取り」現象の有無を検証する。これらの研究を通して、「場所取り」現象の普遍性を明らかにすることが可能である。

(2) 「場所取り」現象の生理的な役割の検討を行う。ここでは、「場所取り」因子の産生機構や放出制御機構、およびそれらの因子の認識に関わる分子機序の探索を行う。さらに、病態モデルマウスを用いて、生理的な「場所取り」現象の存在意義を明らかにする。

「場所取り」因子の産生と放出に関わる細胞内情報伝達に関連するタンパク質群を同定する。まず、蛍光化合物で標識させた「場所取り」因子を作成し、さらに、「場所取り」因子の産生に関わるタンパク質に対する抗体を作成する。同時に、GFP等で標識した同タンパク質を作成する。これらとともに、細胞内小器官を標識可能な各種抗体またはレポータータンパク質を使用して共焦点レーザー顕微鏡により観察し、「場所取り」因子の産生と蓄積、放出機序の可視的解析を行う。また、「場所取り」因子の放出過程を直接ライブイメージ観察可能な条件を確立し、この放出制御機構を観察する。とくに、「場所取り」因子と細胞外基質、または非自己細胞との相互作用に着目して注意深く観察する。

播種された接着性培養細胞のうち、先行した細胞が放出した「場所取り」因子を認知した周辺細胞が、どのように同因子を認識し、先行細胞からの反発に関連する分子メカニズムを解析する。そのために、まず「場所取り」因子の大量精製を行う。その後、「場所取り」因子を細胞培養液に加え、その際に生じる細胞反応を、網羅的リン酸化タンパク質解析方法を利用して探索する。有益な既知情報として、細胞外基質の種類の違いで細胞の生育形態を変化させる培養細胞が存在する（ヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC4など）。この細胞を用いることで、「場所取り」因子の放出と認知に関連する分子機序をより詳細に解析可能である。また、細胞の生育形態の変化と「場所取り」現象との関連も考察可能である。

「場所取り」現象に関わるタンパク質の発現量を制御した細胞を作成し、人為的に「場所取り」因子を添加した培養系における、同細胞の培養器質への接着機序、増殖、生育

への影響を検討する。さらに、接着後の細胞の運動能も検討する。また、「場所取り」因子の産生機序を欠損した細胞を作成し、上記実験を並行して行い、同様の結果が得られるかを検討する。生体における「場所取り」現象の有無を観察するために、担癌マウスを使用する。移植する癌細胞は非転移性、好転移性の両方を用い、癌細胞の転移に関連する接着機序に「場所取り」現象が関与するかを検討する。さらに、「場所取り」因子が腫瘍マーカーとしての役割を持つかを検討するために、各種の担癌マウスの血清中の「場所取り」因子を定量する。

4. 研究成果

(1) 本研究課題では、ヒト子宮頸癌由来細胞(HeLa細胞)を使用した。この細胞は接着性細胞であり、足場依存性に増殖する癌細胞である。HeLa細胞は明確な接触阻害(contact inhibition)作用を示さない。この細胞をトリプシン-EDTAを用いて培養容器から剥離させ、細胞塊を分散させて単離させ、別の培養液に再懸濁し、新たな培養容器へと播種した。その後、直ちに共焦点レーザー顕微鏡に試料を設置し、浮遊状態の単離HeLa細胞が培養容器へと着地する過程を継続的に観察した。その結果、培養溶液中のそれぞれの細胞は、重力に依存して自由落下によって培養容器底面に着地した。この際、鉛直方向には複数の細胞が浮遊しているため、先行して着地した細胞に重積するように着地する細胞が当然存在すると思われた。しかし、実際の顕微鏡での観察条件下では、鉛直方向に複数の細胞が浮遊しているにも関わらず、先行して着地した細胞に接することなく、一定の間隔を保って次々と着地する様子が観察できた。興味深いことに、先行して着地した細胞に対し

て、隣接して着地する細胞はほとんど観察されなかった。また、先行細胞に重積して着地する細胞もほとんど存在しなかった。このことから、この過程には「場所取り」現象が存在していることが強く示唆された。すなわち、先行して着地した細胞が「場所取り」因子を放出することで、排他的に自身の接着領域と伸展領域を確保し、後から着地しようとする細胞は、先行細胞が陣取った領域から反発して着地する現象が存在している。この「場所取り」現象をより客観的に提示するために、「場所取り」因子の可視化に取り組んだ。その結果、いくつかの蛍光標識化合物が「場所取り」因子を特異的に染色することを見いだした。この化合物を培養溶液中に添加することで単離した浮遊状態の細胞が、培養容器へと接着する際に放出した「場所取り」因子を可視的に観察することが可能になった。また、その蛍光標識化合物の蛍光像の解析から、「場所取り」因子は先行して着地した細胞から放射状に拡散分布している様子が観察できた。また、「場所取り」因子の濃度分布は均一ではなく、領域の辺縁部ほど高かった。先行して着地し、「場所取り」因子を放出した細胞に対して、鉛直上方に浮遊して存在する細胞は、「場所取り」因子が展開する領域には着地せず、その周辺領域に着地する様子も観察できた。なお、この「場所取り」因子による排他的反発作用は、既知の接着分子による細胞間相互作用が及ぶ距離よりも遠くの細胞に対して作用した。つまり、この排他的反発機構は新しい生命現象であることが推測された。

(2) 単離され、浮遊状態におかれた接着性培養細胞を、新たな培養容器に播種すると、その細胞が着地する過程では、見かけ上、一様に分散する様子が観察できる。従来はこの現象を接触阻害 (contact inhibition) 作用に依存的な機序として説

明されてきた。しかし、本研究において、「場所取り」現象が存在するからこそ、このほぼ均一に分散して着地することが明らかになった。これは、播種された個々の細胞が、培養容器に着地ののちに比較的早い段階で均一に分散して接着していることから明らかである。この「場所取り」現象という新たな概念は、これまでの認識を覆す革新的な生物モデルであることが予想される。接着細胞の浮遊状態からの接着過程に「場所取り」現象が普遍的に存在することが本研究により立証された。なお、本研究事業の期間内において明らかにできたのは、「場所取り」現象のごく一部だけである。これは、「場所取り」因子が全く未知の化合物であり、「場所取り」現象も確立された生命現象ではないため、解決すべき検討事項が膨大になったためである。従って、本研究成果を公開するまでには、更なる支援が必要である。今後も引き続き本研究に取り組むことで、「場所取り」現象が新たな生命現象として確立可能であると思われる。

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