

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25810087

研究課題名(和文) 単一細胞での膜界面における細胞外マトリックス分解反応と腫瘍細胞浸潤能の同時計測

研究課題名(英文) Simultaneous measurement for ability of tumour-cell invasion and degradation of collagen IV on a surface of single living cell

研究代表者

東海林 敦 (Shoji, Atsushi)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90459850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞を支持する細胞外マトリックスの主要な成分のコラーゲン IV 分解反応をリアルタイムで評価できる手法を構築した。本計測法により、カテプシン B のエンドペプチダーゼ活性とエキソペプチダーゼ活性によりコラーゲン IV が分解されることが示唆された。また、コラーゲン IV 分解反応の阻害活性を評価する手法を構築した。これら計測法を発展させ、細胞-コラーゲン IV で形成される微小空間内のカテプシン B によるコラーゲン IV 分解反応を可視化するために、表面プラズモン共鳴イメージング装置を開発した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method of real-time measuring cathepsin B activity for degrading collagen IV, which is a fundamental component of the extra cellular matrix proteins. This method has indicated that collagen IV was degraded by exopeptidase and endopeptidase activity. In addition, an evaluation method of inhibitory activity for digesting collagen IV has been developed. In order to develop an imaging method for degradation of collagen IV in local area formed between cell and collagen IV, we have made a surface plasmon resonance imaging apparatus.

研究分野：生体分析化学

キーワード：コラーゲン IV カテプシン B バイオセンサー 表面プラズモン共鳴

1. 研究開始当初の背景

細胞界面の微小空間における細胞外マトリックス (ECM) の分解反応の側から、集団および単一細胞レベルで腫瘍細胞の浸潤を解釈するは重要である。しかしながら、特異な 3 重らせん構造と網目上のネットワークを形成するコラーゲン IV (ECM の主要な成分) の分解反応をリアルタイム計測するは難しい。また、細胞と ECM の間における nm サイズの界面領域を観察することも難しい。これらのことが、細胞 - コラーゲン IV の微小空間におけるコラーゲン IV 分解反応を評価する手法開発の障害となっており、技術開発には新たな計測法の視点が必須である。

2. 研究の目的

単一細胞レベルで腫瘍細胞の浸潤能と細胞膜界面の微小空間で生じる細胞外マトリックス (ECM) 分解を表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージングにより、リアルタイムで可視化する技術に繋がる基盤技術を確立する。生体内で形成される nm レベルの微小空間内で生じる生体分子の動的な変化を計測するための基盤技術を構築することに寄与する。ゼラチンやコラーゲン IV の分解反応を評価する手法開発に焦点をあて、構築した方法により、代表的な分解酵素であるカテプシン B による反応メカニズムを基質や酵素の立体構造の視点で理解する。また、この方法を発展させて、薬物による阻害活性評価法を構築する。さらに、ナノ空間を観察する手段として、表面プラズモン共鳴イメージング装置に着目し、その装置開発を行った。

3. 研究の方法

コラーゲン IV を SPR センサーチップの表面に、アミノリングおよびチオールカップリングを介して化学修飾した。このセンサーチップに還元剤 (ジチオスレイトール) で活性化したカテプシン B を送液した。コラーゲン IV の分解量に応じた SPR シグナルの減少を酵素反応の指標とした。酵素活性の pH 依存性や濃度依存性の詳細を解析し、腫瘍細胞外で見られる ECM 分解メカニズムの一端をカテプシン B 活性の視点から理解する。また、ゼラチンあるいはコラーゲン IV を基質にした場合における酵素活性を、基質の立体構造の視点で理解する。さらに、クレッチマン配置の SPR イメージング装置を構築する。

4. 研究成果

(1) ゼラチン分解反応の計測

カテプシン B はコラーゲン IV の一本鎖領域や、コラーゲン IV を熱やアルカリなどで処理したゼラチンを切断することが知られている。ゼラチンの分解反応を計測する手法として、ザイモグラフィが汎用されて

いるが、定量的な活性評価を行うことは難しい。また、界面活性剤を使用するために、カテプシン B が失活する恐れがある。カテプシン B 活性を評価するのに汎用されるジペプチド基質は、ゼラチンとアミノ酸配列が大きく異なる。

本研究では、ゼラチン分解反応を評価する手法を構築するにあたり、ソルバトクロミック色素として知られているナイルブルーに着目した。ナイルブルーは、親水環境化で消光性の H-会合体を形成する一方、有機溶媒やミセル中など、疎水環境下で単量体となり蛍光性を示すことが報告されている。我々は、流動性があり疎水環境である脂質二分子膜内にナイルブルーが取り込まれ、蛍光性を示すことを見出した。ゼラチンゲル内にリポソームを封入することで、ナイルブルーの脂質二分子膜内への取り込みは抑制されるものの、このゲルを分解酵素で処理した場合、ナイルブルーが脂質二分子膜内に取り込まれ蛍光性を示す。このことを利用して分解酵素活性を評価することにした。この評価法を構築するにあたり、モデルとしてトリプシン活性を評価した。その結果、トリプシン B の濃度が増大するのに伴い、蛍光強度が増大した。一方、表面プラズモン共鳴センサーを利用する手法も検討した。センサー界面にゼラチンを化学修飾し、カテプシン B を送液した。時間の経過とともに、カテプシン B による分解反応が進行するため、SPR シグナルが減少していった。また、この SPR シグナル変化量は、カテプシン B 濃度に依存して大きな値を示した。蛍光分析と比較して SPR では、センサー界面のゼラチン分解反応を観測しているため、基質であるゼラチン分子数は限られている。そのため、微量なカテプシン濃度でも活性を評価することができた。

(2) コラーゲン IV 3 本鎖らせん構造の安定性とカテプシン B 活性評価

カテプシン B はコラーゲン IV の一本鎖領域を分解することで知られている。コラーゲン IV を化学修飾したセンサーチップを用いて、カテプシン B の活性を評価した。カテプシン B によるコラーゲン分解反応は pH 4-6 の範囲で観測することができた。低い pH ほど、大きな活性を示すことがわかった。また、円二色性スペクトルから、コラーゲン IV の 3 本鎖らせん構造は、pH 4 で最も不安定であることがわかった。また、酵素活性の初速度に対して、カテプシン B の濃度をプロットしたところ、ゼラチンを基質として用いた場合と pH 4.0 でコラーゲン IV の分解反応を評価した場合、濃度依存性に二相性が見られた。一方、この濃度依存性のグラフが pH 5.0 で二相性は観測できなかった (Fig. 1)。これらの結果から、カテプシン B によるコラーゲン IV 分解反応のメカニズムを提案した。カテプシン B はエキソペ

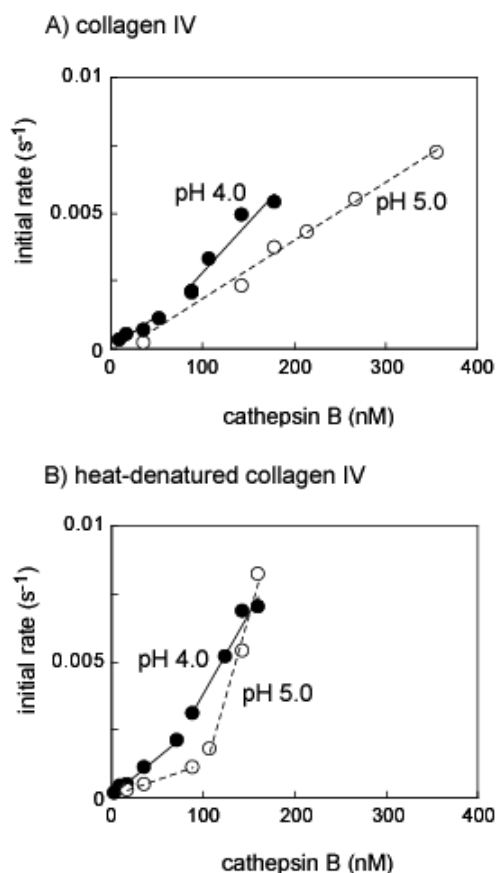


Fig. 1 カテプシン B の濃度依存性
 A) 基質：コラーゲン IV
 B) 基質：ゼラチン

プチダーゼ活性により、コラーゲン IV 末端の 1 本鎖構造を分解する。この分解反応の進行に伴い、コラーゲン IV 立体構造が安定化し、局所的に 1 本鎖構造になる。この領域がカテプシン B のエンドペプチダーゼ活性により分解されるものと考えられる。

(3) カテプシン B 阻害活性評価法

カテプシン B 活性の阻害活性を評価する際には、通常、ジペプチド基質が用いられる。しかしながら、ジペプチドと異なり、コラーゲン IV は特徴的な立体構造を有していることに加え、その分解反応はカテプシン B のエキソペプチダーゼ活性やエンドペプチダーゼ活性が関与する。これらのことから、ジペプチド基質を用いたカテプシン B 阻害活性法により、生体内で存在するコラーゲン IV の分解反応を理解することは難しいものと考えられる。そこで、構築してきたコラーゲン IV 分解反応のモニタリング法を進展させて、カテプシン B 阻害活性評価法を構築した。阻害剤共存下でカテプシン B をコラーゲン IV センサーチップに送液したところ、阻害剤を含まない場合と比べて SPR シグナル変化が小さかった。阻害剤により、コラーゲン IV 分解反応が抑制されたためであった。化合物が非可逆的な阻害剤であれば、この評価法では、複合体を形成していない遊離のカテプシン B 濃度を計測できる。

そのため、簡便に阻害定数 K_i 値を算出できる。この K_i 値は、ジペプチド基質を用いて得られた値と必ずしも一致するわけではなかった。これは、アミノ酸配列や立体構造の違いに基づくと示唆される。

(4) 高倍率の SPR イメージング装置の作製

上述の研究を進展させて、細胞界面の微小空間におけるコラーゲン IV の分解反応を可視化できる計測法の構築を目指した。その際、これまでの計測法と同様に表面プラズモン共鳴に着目した。SPR イメージング装置を作製するにあたり、光源としてレーザーを使用したところ、干渉縞が観測されたため、SPR 画像が不明瞭であった。できるだけ画像処理にたよらずに、コラーゲン IV の分解反応を可視化したいと考え、LED を光源として使用した。作製した SPR 装置を示した。この装置で得られた画像は $10 \mu\text{m}$ 程度のサイズの画像を取得することができた。

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 9 件)

- 1 M. Sakamoto, A. Shoji, M. Sugawara. Giant unilamellar vesicles containing rhodamine 6G as a marker for immunoassay of bovine serum albumin and lipocalin-2. *Anal. Biochem.*, (2016) in press.
- 2 K. Tanaka, A. Shoji, M. Sugawara. An Enzyme-entrapped Agarose Gel for Visualization of Ischemia-induced L-Glutamate Fluxes in Hippocampal Slices in a Flow System. *Anal. Sci.*, 31 (2015) 1-5. 査読あり
- 3 東海林 敦. 表面プラズモン共鳴による細胞応答の評価. *ぶんせき*, 6 (2015) 245-246. 査読無し
- 4 M. Sugawara, A. Shoji, M. Sakamoto. Pore-forming Compounds as Signal Transduction Elements for Highly Sensitive Biosensing. *Anal. Sci.*, 30 (1) (2014) 119-128. 査読あり
- 5 A. Shoji, M. Kabeya, Y. Ishida, A. Yanagida, Y. Shibusawa, M. Sugawara. Evaluation of cathepsin B activity for degrading collagen IV using a surface plasmon resonance method and circular dichroism spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 95 (2014) 47-53. 査読あり
- 6 Y. Ikegami, S. Hozumi, A. Shoji, A. Hirano-Iwata, T. Bliss, M. Sugawara. Real-time monitoring of extracellular L-glutamate levels released by high-frequency stimulation at region CA1 of hippocampal slices with a glass capillary-based L-glutamate sensor. *Sensing and Biosensing Research*, 76 (2014) 78-82.

査読あり

- 7 M. Sakamoto, A. Shoji, M. Sugawara; Highly sensitive and rapid assay of substance P and streptolysin O in human serum using immuno-liposomes and gramicidin channels. Anal. Sci., 29 (9) (2013) 877-883. 査読あり
- 8 R. Takeuchi, A. Shoji, M. Sugawara; A Solid Phase-based Nanopore Sensing System for Biomolecules using Lipid-loaded Mesoporous Silica MCM-41 and a Fluorescent Dye. Sens. Actuators B Chem., 181, (2013) 29-37. 査読あり
- 9 N. Soma, N. Watanabe, A. Shoji, M. Sugawara; Implantable Patch Sensor for L-glutamate in Hippocampal Slices. Anal. Sci., 29 (2) (2013) 181-185. 査読あり

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1 石田 裕樹, 東海林 敦, 渡部 成美, 菅原 正雄, “コラーゲン IV を用いるカテプシン B 阻害活性の評価 : 表面プラズモン共鳴法の適用”, 日本分析化学会第 62 年会, 大阪, 2013 年 9 月 10 日
- 2 東海林 敦, 高橋 裕輔, 大里 沙紀, 阪本 美里, 柳田 顕郎, 洪澤 庸一, 菅原 正雄, “脂質二分子膜をパターンニングしたガラスキャピラリーによる乳酸およびグルコースの同時計測” 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014 年 3 月 27 日
- 3 青柳 美紀, 高辻 龍太郎, 柿崎 郁美, 東海林 敦, 柳田 顕郎, 洪澤 庸一, 菅原 正雄, “脂質二分子膜内ステロール化合物によるストレプトリジン 0 のナノポア形成能の制御” 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014 年 3 月 27 日
- 4 池谷 佳奈, 青柳 美紀, 高辻 龍太郎, 柿崎 郁美, 東海林 敦, 柳田 顕郎, 洪澤 庸一, 菅原 正雄, “脂質二分子膜内ステロールの酸化反応評価法に関する基礎検討” 第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 東京, 2014 年 8 月 20 日
- 5 東海林 敦, 壁谷 充堯, 石田 裕樹, 菅原 正雄, “表面プラズモン共鳴法を用いたカテプシン B によるコラーゲン IV 分解反応の評価”, 日本分析化学会第 63 年会, 広島, 2014 年 9 月 14 日
- 6 渡部 成美, 池上 由季, 穂積 志津子, 東海林 敦, 平野 愛弓, 菅原 正雄, “海馬 CA1 領域の高頻度刺激時に放出されるグルタミン酸の計測”, 日本分析化学会第 63 年会, 広島, 2014 年 9 月 14 日
- 7 河野 智成, 東海林 敦, 柳田 顕郎, 洪澤 庸一, “脂質二分子膜内におけるナイルブルーの蛍光増強を利用したプロテアーゼ検出法に関する基礎検討”, 第 58 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2014 年 10 月 4 日
- 8 濱 達也, 東海林 敦, 柳田 顕郎, 洪澤 庸

一, “膜非破壊的な脂質二分子膜内コレステロール定量法に関する基礎検討”, 第 58 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2014 年 10 月 4 日

- 9 東海林 敦, 河野 智成, 飯室 翔平, 柳田 顕郎, 洪澤 庸一, “脂質二分子膜内ナイルブルーのモノマー化を利用した蛍光プロテアーゼ定量法”, 日本薬学会第 135 年会, 神戸, 2015 年 3 月 25 日
- 10 飯室 翔平, 東海林 敦, 柳田 顕郎, 洪澤 庸一, “脂質二分子膜内におけるナイルブルーの蛍光増強を利用したプロテアーゼ定量法” 日本分析化学会第 75 回分析化学討論会, 山梨, 2015 年 5 月 13 日
- 11 内田 大貴, 佐坂 徳成, 中村 邦彦, 森田 健司, 東海林 敦, 柳田 顕郎, “光ファイバー表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーと patch-clamp の一体化計測技術に関する基礎検討”, 平成 27 年度日本分析化学会関東支部若手交流会, 東京, 2015 年 6 月 26 日
- 12 吉川 未季子, 東海林 敦, 菅原 正雄, 柳田 顕郎, “脂質二分子膜内コレステロールの酸化反応評価法” 平成 27 年度日本分析化学会関東支部若手交流会, 東京, 2015 年 6 月 26 日
- 13 飯室 翔平, 東海林 敦, 柳田 顕郎, “脂質二分子膜内におけるナイルブルーの蛍光増強を利用したプロテアーゼ定量法” 第 13 回次世代を担う若手のためのフィジカルファーマ・フォーラム (PPF2015), 長崎, 2015 年 8 月 20 日
- 14 當麻 恵理, 東海林 敦, 柳田 顕郎, “金電極-脂質二分子膜で形成されるナノ空間への電気活性物質封入法と電気化学計測” 第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 長崎, 2015 年 8 月 21 日
- 15 東海林 敦, 池谷 佳奈, 吉川 未季子, 柳田 顕郎, 菅原 正雄, “固定化リポソームを用いる脂質膜内コレステロール酸化反応の計測法”, 日本分析化学会第 64 年会, 福岡, 2015 年 9 月 9 日

〔図書〕(計 1 件)

- 1 A. Shoji, M. Sakamoto, M. Sugawara. Design of liposomes with a pH-sensitive fluorescent dye and gramicidin channels for immune-sensing. Advances in Liposomes Research., chapter 6 (2014) 147-170. 査読あり

〔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

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/seitaibunseki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東海林 敦 (SHOJI Atsushi)

東京薬科大学薬学部・講師

研究者番号：90459850