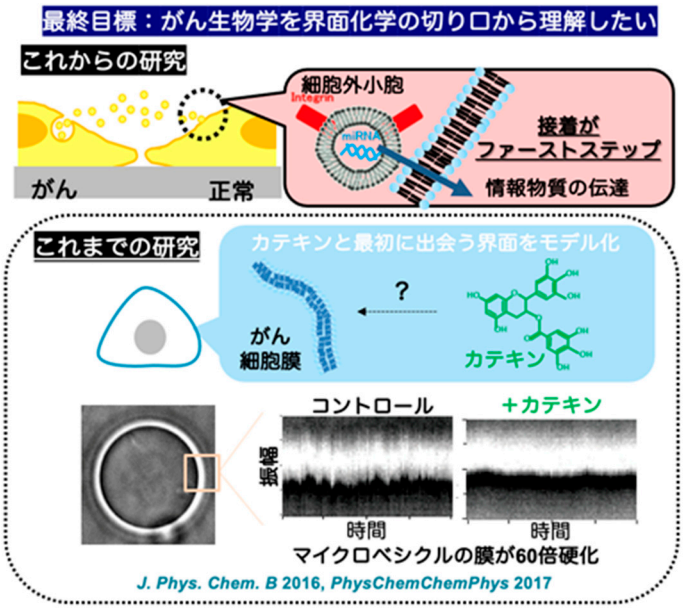
207　界面の硬さが切り拓くがん転移メカニズムの定量解明	松﨑　賢寿

【目的】本研究の最終目的は、がん転移メカニズムの解明に向けて、がん－正常細胞間相互作用における界面の硬さの役割を明らかにすることである。近年、がん細胞は細胞外小胞（Extracellular vesicle：EV）を細胞外に分泌して、周囲の正常細胞を調教して自分に都合の良い環境を作ることが示唆されてきた。その研究の中心は、EV に含まれる生物学的因子（遺伝情報やタンパク質）の中から、がん転移を促す要因を網羅的に探索することであった。しかし、そもそもがん細胞から分泌された EV は、正常細胞と“初めて出会う界面”である細胞膜と相互作用しなければ、情報物質の伝達は起こらず、その後の細胞性質の変換も起こり得ない（下図上）。そこでその相互作用を制御する基礎的な物理学的因子として、研究代表者は細胞膜の硬さに着目して研究を進めている。研究代表者はこれまでに抗がん効果を示す緑茶カテキンががん細胞と出会う最初の界面である細胞膜を約 60 枚程度硬化していることを明らかとしている（下図下）。膜の急激な硬化はがん細胞の基礎機能（細胞接着から転移運動まで）を大きく阻害したことを発見した経験から、EV 膜の硬さががんの悪性化を促すより身近な因子として膜の硬さがあると着想した。しかし、現状の界面解析技術では凍結乾燥によって変性した界面しか評価できておらず、膜物性そのものに着目した研究は未開の分野である。そこで、我々の独自の光技術をベースに“生きた”界面を「見て・測って・操る」実験プラットホームを構築することを第一目標とした。

【方法】その実験プラットホームを構築するためには、まず細胞膜を見て・測れる技術が必要となる。そこでまずはその顕微鏡システムの構築を目指した。具体的には、細胞膜の硬さ（ここでは膜の流動性）に応じて硬さが変化する蛍光物質（Laurdan）を用いた。既存の高価なレーザーソース（多光子レーザー）やスペクトルディテクターを用いずとも、独自のフィルターの組み合わせによって迅速かつ簡便に可視化し、それを定量評価する手法の開発を進めた。

【結果】構築した顕微鏡システムを用いて、EV が放出する直前の細胞内膜と細胞外膜の硬さの分布の精密な可視化に成功した。さらに初期アポトーシスが起こり、1μm 程度の EV が内部から放出される際に起こる細胞外膜の硬さの変化を追跡することにも成功した。これによって細胞膜表面の硬さがダイナミックに柔らかくなることで、EV が放出される初期的なデータ取得に成功した。これによって、研究代表者が有する細胞膜の硬さ制御技術と組み合わせて、“生きた”界面を「見て・測って・操る」実験プラットホームの構築が達成できた。現在では本プラットホームで、がん細胞から抽出した EV を用いて、より詳細ながん－正常細胞間相互作用における界面の硬さの役割を解析中である。

本研究の概要と着想に至った経緯



207. 界面の硬さが切り拓くがん転移メカニズムの定量解明

松﨑　賢寿

埼玉大学 理工学研究科 戦略的研究部門 ライフナノバイオ 中林研究室

Key words：光技術，膜物理学，界面化学，がん生物学

緒　言

本研究の目的は、がん転移メカニズムの解明に向けて、がん－正常細胞間相互作用における界面の硬さの役割を明らかにすることである。近年、がん細胞は細胞外小胞（Extracellular vesicle：EV）を細胞外に分泌して、周囲の正常細胞を調教し［1］，自分に都合の良い環境を作ることが示唆されてきた［2］。例えば、Valaidi らは遺伝物質である miRNA が EV を介してがん細胞から正常細胞に移動することで、正常細胞のがん化を促すことを報告している［3］。また、Hoshino らは EV 表面の膜タンパク質（インテグリン）が正常細胞に取り込まれた際に、がん転移を促す調教された場が形成することも報告している［4］。以上のように EV に内包される生物学的因子（遺伝情報や膜タンパク質）ががん転移には重要である可能性が示されつつある。しかし、そもそも EV が正常細胞と“初めて出会う界面”である細胞膜と相互作用しなければ、情報物質の伝達は起こらず、その後の細胞性質の変換も起こり得ない（図 1 上）。そのため、がん転移のメカニズム解明には最初の EV 接着を詳細に評価することが重要となる。

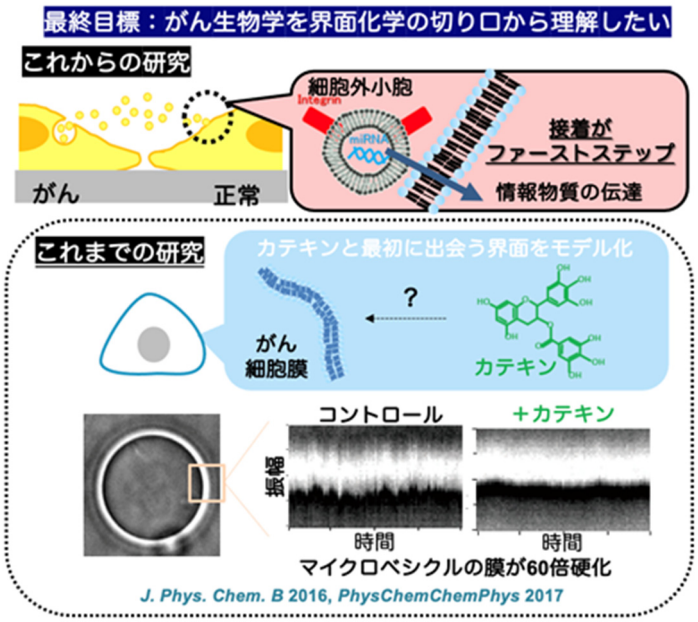


図 1．本研究の概要と着想に至った経緯

それでは、EV が細胞膜と相互作用するには、どのようなパラメーターが重要なのだろうか？研究代表者は、細胞膜の接着エネルギーが膜の物理特性（硬さ）によって制御されるというモデルから［5］、脂質分子が組成の大半を占める EV においてもその硬さが正常－がん細胞間相互作用の強度を制御する要因だと着想した。研究代表者はこれまでに抗がん効果を示す緑茶カテキンががん細胞と出会う最初の界面である細胞膜をモデル化して、緑茶カテキン前後の膜

弾性を測定すると、約 60 枚程度増大していることが明らかとなった（図 1 下）。この膜弾性の急激な増大は、幅広いがん機能（細胞接着から転移運動まで）を阻害していたことを解明した経験も、研究代表者の EV 膜の硬さががんの悪性化を促す重要な要因になるという仮説を支持している。しかし、現状の界面解析技術（電子顕微鏡法）では凍結乾燥によって変性した界面しか評価できておらず、膜物性そのものに着目した研究は未開の分野である。そこで、我々の独自の光技術をベースに"生きた"界面を「見て・測って・操る」実験プラットホームを構築し、がんー正常細胞間相互作用における界面の硬さの役割を解明することを目的とした。本研究では、その要である生きた細胞膜を「見て」、その硬さを簡便かつ迅速に「測れる」光技術の開発に成功した。以下に詳細を述べる。なお本研究の一部を、論文 4 報、日本語雑誌 1 報、招待講演 4 報（うちオーガナイザー1 件)、学会発表 2 件、研究費獲得 2 件、特許 1 件で発表した（詳細は筆者の research map 参照)、以下に詳細を述べる。

方法、結果、および考察

1. 細胞膜の物理特性の定量評価の原理

Laurdan（6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene）は脂質二重膜の内側にある、疎水性コアにまで挿入され、その周囲での水和分子の量（ひいては分子パッキングの程度）によって蛍光波長が変化する蛍光物質である。例えば、DOPC（1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）と DPPC（1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine）という分子パッキングの程度が異なる脂質分子を用いて、脂質二重膜の小胞（直径 30～100 nm）の GP 値（Generalized polarization value）を測定した。まず DOPC は不飽和結合を 2 箇所含んでおり、脂質二重膜を形成した際には脂質分子の疏水基同士がファンデルワールス力で結合することができない。そのため、脂質二重膜の疎水性コアまで水分子が入り込み、Laurdan を水和する分子量も豊富となってその蛍光波長はレッドシフトする。一方で不飽和結合を持たない直鎖の DPPC は、脂質分子の疏水基同士が密にパックすることができるので、その流動性は低く硬い膜になる。そのため、Laurdan 周囲の水和分子の流入量も少なく、蛍光波長もブルーシフトする。膜の硬さの指標である流動性を GP 値で評価することになるが、Laurdan はλ＝405 nm の光を吸収するため、そこから出てくる青色（$I_{406-460}$、下付文字の値は波長)、赤色（$I_{470-530}$）の蛍光波長の比の式を用いて GP 値を算出する。実際に DOPC と DPPC の EV 溶液の GP 分布を取得すると、DOPC のヒストグラムの裾野と DPPC のそれとは明確に分離していることが明らかとなった。

2. 細胞膜から分泌される EV を生きたまま、簡便に可視化することに成功！

これまでの Laurdan による赤と青色の蛍光波長の計測には、スペクトルディテクターをベースに開発を進めてきた（Leica、TCS SP8 confocal microscope and the spectral detector）［6］。スペクトルディテクターは高精細な分光器であり、入射した蛍光を回折格子で分けとり、リニアアレイのディテクター（GaAsP や PMT）を配置することで、波長ごとの輝度分布を測定できるというものである。しかし、そもそもスペクトルディテクターは非常に高価であり、当初は Nikon の共焦点顕微鏡 A1 をベースに構築を進めていたが、撮像時間が非常に遅いことが問題となっていた（A1-DUVB-2 GaAsP Detector Unit)。そこで我々は、通常の共焦点システム（Nikon-C2）のディテクター側にフィルターをカスタムメイドし、高輝度 405 nm Laser を導入して、赤と青の蛍光波長を同時に計測するシステムを構築した。さらに本研究で購入した電動ステージと組み合わせることで（図 3a、矢印)、多細胞、広域の解析も達成している（*unpublished data*)。実際に撮像した画像を図 2a に示す。Laurdan によって細胞外膜が強い緑色、細胞内部が赤色の蛍光を示すことがわかる。前の EV が非常に柔軟であることを定性的には示している。実際に本助成金によって購入した高機能解析 PC（図 3b）を用いて、膜の流動性（Fluidity）を測定したものを右下に示す。GP 値が大きくなるほど赤色を示しているが、細胞内部に比べて細胞外膜が強い GP 値を示すことがわかり、先ほどの定性的な感覚とも良い一致を示している。ここでヒストグラムによって GP 平均値を取得すると、GP_{avg}=0.03±0.19 となっており、膜としては柔らかすぎも硬すぎもしない領域が大半を占めていることがわかる。一方で初期アポトーシスが始まり、細胞から分泌される EV が多くなる時期を撮像したものが右のパネルである（図 2b)。アポトーシス前は硬く緑色に見えていた細胞外膜がオレンジ色に変化することが明らかとなった。さらに興味深いことに、Fluidity Image において解析し

た膜の硬さも柔軟となり、矢印で示すように直１μｍの EV 構造の分泌する様子を確認した。この時の膜の硬さを定量的に評価するために、ヒストグラムを取得してその平均 GP 値を算出すると、GP_{avg}＝−0.24±0.18 とアポトーシス前に比べて大きく負側、つまり流動的で柔らかい膜になっていることが明らかとなった。これにより、スペクトルディテクターに頼らない、通常の顕微鏡セットアップ・操作感覚に近い簡便な細胞膜の流動性評価法の構築に成功した。

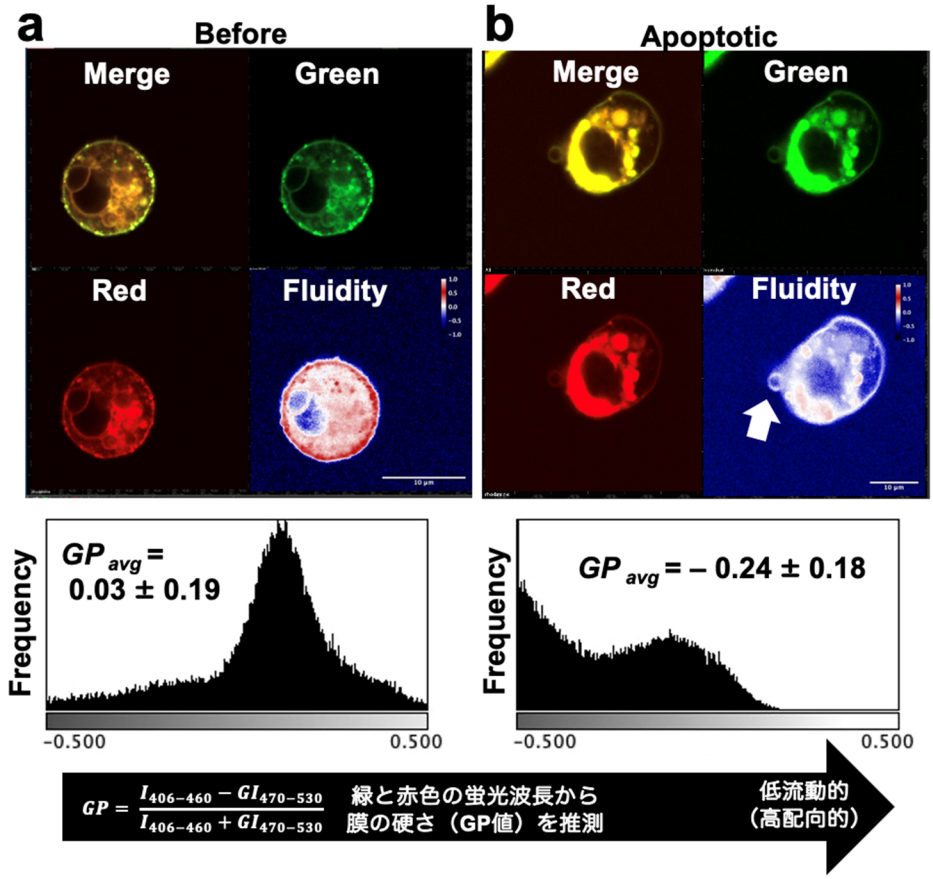


図 2.　新規顕微鏡システムによる細胞膜の流動性の評価

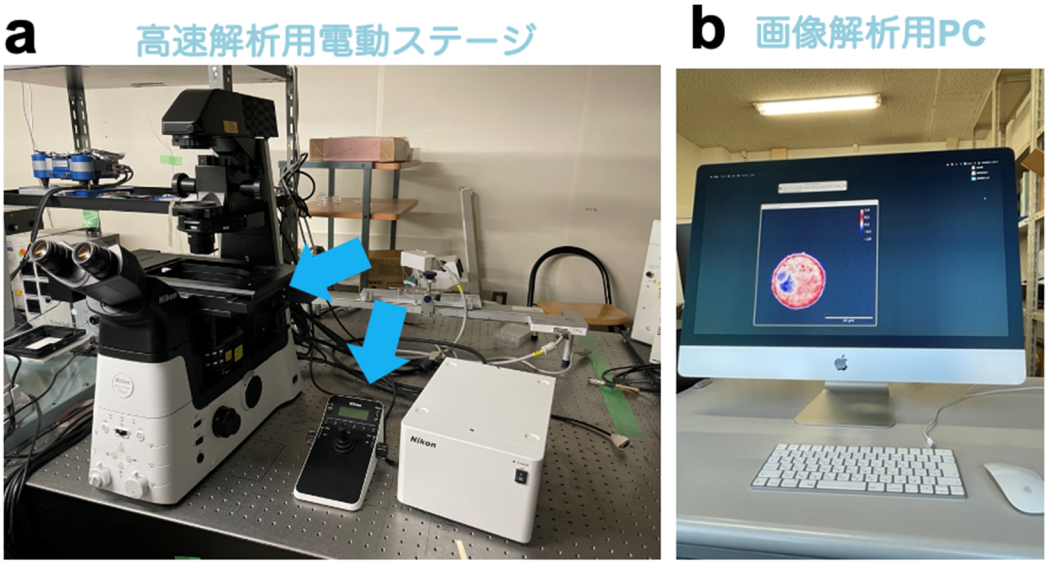


図 3.　(a) 購入した電動ステージ（矢印）と (b) 画像解析用 PC を用いて構築した顕微鏡システムの詳細

3. Conclusions

以上によりこれまでスペクトルディテクターを用いて評価してきた細胞膜の物理特性であるが、本顕微鏡システム（フィルターの組み合わせ）によって迅速かつ簡便に可視化し、それを定量評価する手法を構築することができた。これは我々の独自の光技術をベースに“生きた”界面を「見て・測って・操る」実験プラットホームにおける見る、測る、部分の肝となるシステムとなり、現在はがん細胞から抽出した EV を用いて、より詳細ながんー正常細胞間相互作用における界面の硬さの役割を解明することを目指して研究を進めている。

共同研究者・謝辞

2020 年 7 月に埼玉大学に助教として着任した直後、コロナ禍が始まって実験を進めることが通常よりも厳しい状況になりました。その中でも公益財団法人上原記念生命科学財団研究奨励金（新領域 4.0 の第一期生：生命科学と他分野の融合領域、生体情報学、生体医工学、生体材料学等）のサポートを頂けたこと、この場を借りて心から感謝申し上げます。また、本顕微鏡開発に貢献頂いた学生の佐藤奨真君（埼玉大学理学部基礎化学科修士 1 年）、研究協力者の吉川洋史教授（大阪大学）、菅沼雅美元教授（埼玉県立がんセンター、埼玉大学）、中林誠一郎教授（埼玉大学戦略的部門領域長）、さらに埼玉大学内において申請書添削頂いた URA オフィスの皆様（特に大場博士）、埼玉大学内で推薦頂いた坂井貴文学長に、この場を借りて感謝申し上げます。

文　献

1） Syn NL, Wang L, Chow EK, Lim CT, Goh BC. Exosomes in Cancer Nanomedicine and Immunotherapy: Prospects and Challenges. Trends Biotechnol. 2017 Jul;35(7):665-676. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.03.004. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28365132.

2） Madar S, Goldstein I, Rotter V. 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye. Trends Mol Med. 2013 Aug;19(8):447-53. doi: 10.1016/j.molmed.2013.05.004. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23769623.

3） Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007 Jun;9(6):654-9. doi: 10.1038/ncb1596. Epub 2007 May 7. PMID: 17486113.

4） Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N et al., Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. Nature. 2015 Nov 19;527(7578):329-35. doi: 10.1038/nature15756. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26524530; PMCID: PMC4788391.

5） Goennenwein S, Tanaka M, Hu B, Moroder L, Sackmann E. Functional incorporation of integrins into solid supported membranes on ultrathin films of cellulose: impact on adhesion. Biophys J. 2003 Jul;85(1):646-55. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74508-1. PMID: 12829518; PMCID: PMC1303119.

6） Matsuzaki T, Matsumoto S, Kasai T, Yoshizawa E, Okamoto S, Yoshikawa HY, Taniguchi H, Takebe T. Defining Lineage-Specific Membrane Fluidity Signatures that Regulate Adhesion Kinetics. Stem Cell Reports. 2018 Oct 9;11(4):852-860. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.08.010. Epub 2018 Sep 6. PMID: 30197117