

A03 胃癌細胞の非平衡形状ゆらぎのもたらす時空間秩序と転移の相関

京都大学物質-細胞統合システム拠点 田中 求

京都大学大学院医学研究科 鶴山竜昭

本研究では、悪性上皮性腫瘍である胃腺癌の転移を研究対象として選び、代表田中の確立した“Supported Membrane”という実験手法を駆使して（1）精密にデザインされた細胞膜モデル（2）非侵襲的な細胞接着力計測の新技术（3）細胞形態の動的ゆらぎの統計解析、を有機的に組み合わせて、癌の転移において重要な役割を果たす接着分子（カドヘリン）で修飾した精密細胞膜モデルを構築・測定することを目指す。

2014年度は接着分子を担持した細胞膜モデルを構築し、技術的に困難であるヒト胃腺癌細胞株（3種）の継代培養の最適化を行った。並行して細胞接着力計測・解析装置を本研究の用途のために改善し、細胞の形状ゆらぎと遊走運動の解析をヒト赤血球（成人・新生児）およびヒト造血幹細胞の二つの系を用いて行った。

(A) 細胞膜モデルの構築・ヒト胃腺癌細胞株の継代培養

本研究で用いる、ヒスチジンでタグ付けされた接着分子カドヘリンの再構成タンパク質を、ガラス基板上に作製した Supported Membrane に結合させ、その均一性を蛍光顕微鏡やX線鏡面反射で確認し、マスターコピー細胞を用いて選択的な接着を確認した。ヒト胃腺癌細胞株（3種）は理研細胞バンクから購入し、これまでに数種類の異なる培地や培養条件を試した。当初計画していたよりも細胞を安定に継代培養する条件の絞込みに時間がかかったため、以下の項で詳述するように物理学的なリードアウトの確立は現在進行中のほかの細胞系を用いて行うこととなった。

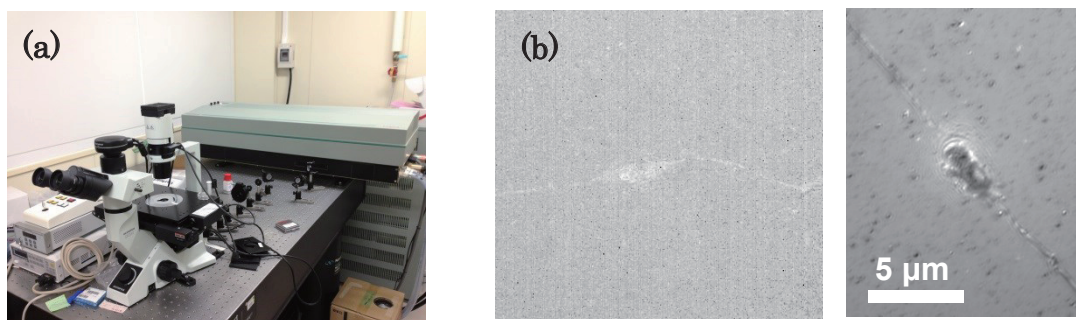


図1：(a)細胞接着機能を定量するためのレーザーパルス装置。顕微鏡観察による細胞位置の変化により基板から脱離する臨界圧力を決定する。ステージ上にはヒーティングチャンバーを搭載し安定した条件で測定を行う。(b)RICMによる生細胞のイメージング。光学系の改善（改善前：左、改善後：右）により、鮮明な干渉像が得られるようになった。

(B) 細胞接着の定量評価技術の最適化

「レーザーパルスで誘起される圧力波を用いた細胞接着機能の定量化装置」の光学系およびサンプル台を本研究のために改善した(図1 a)。特にモーター制御型のXYステージを導入することにより測定のスループットを約10倍程度(毎時20~30回の計測頻度を毎時200以上に)向上させた。これは一般的に広く用いられる原子間力顕微鏡(1日2~3回)に較べると約2000倍のスループットに対応し、細胞接着強度の時間発展を高い時間分解能で追跡することが可能となった。また、形状ゆらぎをラベルフリーで追跡する反射干渉顕微鏡(Reflection Interference Contrast Microscopy, RICM)の光学系を改善し、従来の装置と較べてはるかに高いコントラストで反射干渉パターンを得ることに成功した(図1 b)。

(C) 形状ゆらぎと遊走運動の解析

先述の胃腺癌系の細胞株の確立と技術面の最適化と並行して、細胞の形状ゆらぎの解析を二つの系を用いて行った。

ハイデルベルク大学・大学病院新生児科のJ. Poeschl教授との協力のもと、A03-004班の伊藤さん(博士課程2年)がゆらぎの平均2乗振幅のフーリエ変換から新生児の赤血球の力学特性を初めて定量計測し、これを成人の赤血球の値と比較した。従来の人工膜の力学モデルと異なり、細胞骨格と膜のカップリング強度を入れて解析を行うことにより、これまで細胞の「変形率(アスペクト比)」などの現象論的記述にとどまっていた、血球細胞のシェア弾性の定量に成功した。微小流路(Diffusion Chamber)との組み合わせにより、赤血球の形状ゆらぎを毒素ストレスの前後で定量比較することに成功しただけでなく、臨床試験中の抗敗血症薬剤の機能の評価にも成功した(投稿中(1))。

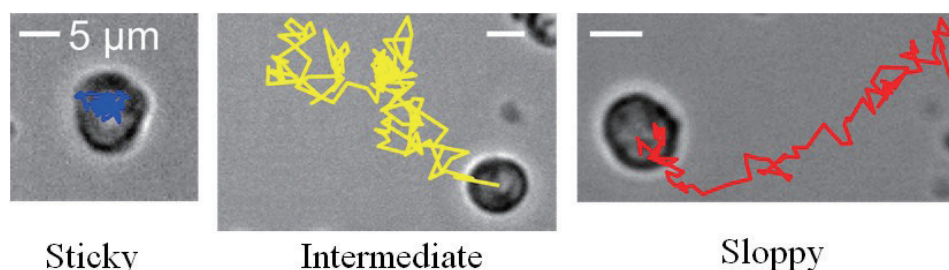


図2 ヒト造血幹細胞の接着性の異なる骨髄モデル上での移動の軌跡(2)

またこれまで田中グループが行ってきた、ヒト造血幹細胞の骨髄モデル上での形状ゆらぎと遊走運動の相関を明らかにするために、A01-003班太田教授・佐野教授と議論を進めてきた。そこで、田中グループの実験で定量された結果(図2)を太田・佐野の表面との摩擦を考慮に入れた新しいcell crawling modelに組み込む作業を行っている。

参考文献:

- (1) H. Ito, N. Kuss, B. Rapp, M. Ichikawa, T. Gutschmann, K. Brandenburg, J. Poeschl, M. Tanaka, submitted.
- (2) A. Burk, C. Monzel, H. Yoshikawa, P. Wuchter, R. Saffrich, V. Eckstein, M. Tanaka, A.D. Ho, *Sci. Rep.*, accepted for publication.