

平成 年 月 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成28年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：福井大学 大学院工学研究科

職名：准教授

氏名：藤田 聡

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：細胞間相互作用の制御にもとづく単個細胞から細胞凝集塊への形成過程のタイムラプス解析
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：有馬 祐介
3. 研究期間：平成28年4月1日～平成29年3月31日
4. 研究経過及び研究成果：

本研究では、単個細胞が相互作用し、集合体を形成していく動的なプロセスを、細胞の移動性を前後方向に限定した一次元細胞遊走モデルを用いてタイムラプス解析することで解析することを目指した。これにより細胞の凝集過程を定量的に表現し、細胞から組織が構築される動的原理の統合的理解につなげる。そのアプローチとして、エレクトロスピンニング法で紡糸したポリスチレンの微細ファイバーを用いた。このファイバー上に細胞接着分子を固定化したのち、細胞を播種し、タイムラプス顕微鏡で遊走のムービーを取得した。ムービーを画像解析することにより、ファイバー上に接着する細胞の伸展および遊走速度を定量化した。

まず、軟骨細胞での細胞遊走挙動の解析を試みた。その結果、細胞間相互作用が細胞と基材の相互作用よりも強固であるため、細胞同士がすぐに強い凝集塊を形成し、基材であるファイバーにほとんど接着しなかった。そこで以降の検討では、ヒト由来線維肉腫細胞株 HT-1080 を用いた。

腫瘍細胞の多くは上皮組織に由来する。ここで上皮間葉転換 (EMT) が誘導されると、細胞極性の喪失や細胞形態、細胞接着分子の変化などの細胞の性質に大きな変化が見られ、浸潤能の獲得などに影響を与える。一般的に EMT の誘導により Cadherin 依存性の細胞同士の接着から Integrin 依存性の細胞-細胞外マトリクス (ECM) 間の接着へと変化することが知られている。このプロセスは単個細胞が凝集塊を形成する場合と逆の過程でありこれを理解することは、単個細胞から細胞凝集塊へと移行していくプロセスと本質的に同等の現象だと推察される。そこで、ファイバー上での細胞遊走プロセスについて、細胞間接着を模した Cadherin 依存のもと起こる場合と、細胞-ECM 間接着を模した Integrin 依存のもと起こる場合でどのように違うかを比較した。

Cadherin の微細ファイバー上への固定化には、IgG の Fc 部と E-cadherin (E-cad) を結合させた E-cad-Fc キメラタンパクを用いた。このキメラタンパクは疎水性に富んだ Fc 部分を有することから、疎水性の高いポリスチレンなどの材料と疎水性相互作用により強く吸着し、材料表面には E-cad が配向方向を揃えて固定化される。Integrin 依存のもとでの細胞培養には、Fibronectin (FN) 固定化ファイバーを用いた。細胞の接着部位を解析するためにアクチン繊維と裏打ちタンパク質の免疫染色を行った。E-cad 依存性接着は β -catenin を染色、Integrin 依存性接着は Paxillin を染色、アクチン繊維は蛍光標識された Phalloidin で染色することで観察した。

その結果、FN 上の細胞は長い仮足を伸展させているのに対し、E-cad-Fc 上の細胞は丸い形状で接着しており、仮足は伸びていなかった。次に、観察開始から 6 時間に渡る細胞の長さや速度を比較検討したところ、FN 上の細胞は移動の際、細胞が伸展と退縮を繰り返している事がわかった。細胞がアクチン繊維の張力を駆動力にして移動する際にファイバー上でこうした移動形態をとると考えられる。一方で E-cad-Fc 上の細胞は細胞の伸展退縮や移動はほとんど見られなかった。

次に FN、E-cad-Fc 上の細胞のアクチン繊維と接着部位を免疫染色により観察した。その結果、FN 上の細胞ではアクチンのストレスファイバーの形成が見られたが、E-cad-Fc 上の細胞はストレスファイバーの形成は見られず、アクチンは皮質部分にしか存在していなかった。また、接着部位に局在するタンパク質染色では、FN 上の細胞には顕著な Paxillin 発現が見られ、基材に対して Integrin 依存で接着している事がわかった。一方で、E-cad-Fc 上の細胞は Paxillin の発現が見られなかったことから、基材に対しての接着に Integrin の寄与は少ない事が考えられる。また、 β -catenin の染色像では、E-cad-Fc 上の細胞のみに β -catenin の強い発現が見られたことから、基材に対する E-cad 依存接着がおき、それによって β -catenin の増加が起きたと考えられる。さらに、これらの細胞の形態や接着タンパクの発現量は、ファイバーへの接着時間に大きく依存することもわかった。ここまでの、単個細胞における接着タンパク質の違いによる影響を見ることができたため、今後は、複数細胞の遊走挙動をより詳細に解析していく。

また、細胞集団の遊走挙動解析へ向け、細胞間接着の制御による細胞塊形成についても検討した。細胞表面修飾材 (単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体) を用いることで細胞表面を単鎖 DNA で修飾することができる。他方の細胞を相補 DNA

で修飾することで、細胞間の接着を誘導することができた。さらに、細胞間接着を誘導する分子として、単鎖 DNA の代わりに E-カドヘリン細胞外ドメインについても検討した。細胞表面を E-カドヘリン修飾することで、同種細胞間の接着を誘導し細胞塊を形成することができた。これにより、上述のファイバー-細胞間でのカドヘリン相互作用に加え、細胞-細胞間でのカドヘリン相互作用も人工的に誘導できることが分かった。細胞集団の遊走挙動解析のためには一定サイズ（細胞数）の細胞塊を形成させることが必要であるため、今後は細胞塊サイズを制御する条件検討を行っていく。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表、特許取得等

1. Analysis of cell migration on a single fiber immobilized with Fc-cadherin, R. Hayamizu, S. Suye, T. Akaike, S. Fujita, *9th International Conference on Fiber and Polymer Biotechnology*, Osaka (2016)
2. Fc-カドヘリン固定化ファイバー上での細胞遊走挙動の解析, 早水 亮貴, 末 信一郎, 赤池 敏宏, 藤田 聡, *第65回高分子学会年次大会*, 神戸 (2016)
3. 神経膠芽腫細胞遊走におけるミトコンドリア動態のシングルファイバーを用いた解析, 河合 佑介, 竹内 綾子, 藤田 聡, 松岡 達, *第63回中部日本生理学会*, 岡崎 (2016)
4. Fc-カドヘリン固定化ファイバー上での細胞遊走挙動の解析, 早水 亮貴, 末 信一郎, 赤池 敏宏, 藤田 聡, *平成28年度高分子学会北陸地区若手研究会*, 福井 (2016) (優秀ポスター賞)
5. カドヘリンの勾配を表面に有するファイバー上での細胞遊走解析, 早水 亮貴, 赤池 敏宏, 末 信一郎, 藤田 聡, *日本バイオマテリアル学会第5回北陸信越若手研究発表会*, 長岡 (2016)
6. Control of multicellular aggregate structure using cell surface modification with recombinant proteins. Y. Arima, Y. Hirai, H. Iwata, *10th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016)*. Tsukuba (2016)