

ナノファイバーデバイスを用いた細胞遊走時における 細胞内イオンの定量的解析

研究代表者： 藤田 聡（工学研究科・准教授）

共同研究者： 松岡 達（医学部・教授）、竹内 綾子（医学部・特命助教）

概 要
細胞遊走とは、生体組織中を細胞が移動するプロセスで、創傷治癒や癌の転移などさまざまな生体現象で重要な役割を果たしているが、細胞内外との情報伝達と細胞遊走の関係についてはいまだ十分には理解されていない。本研究では、ナノファイバーを用いたアプローチにより、細胞体全体の遊走挙動細胞遊走時における細胞体全体に関わるカルシウムイオンの役割を明らかにすることを目的とする。1本のナノファイバー上での1細胞の遊走挙動と細胞内カルシウムイオン濃度について継時的に観察したところ、移動中の細胞では細胞内カルシウム濃度に際があること、細胞カルシウムイオン強度を変動させることで細胞遊走挙動を制御できる可能性があることが見出された。
関連キーワード
細胞遊走、細胞内シグナル、Ca ²⁺ 、細胞極性、ナノファイバー

研究の背景および目的

細胞遊走とは、生体組織中を細胞が移動するプロセスで、創傷治癒や癌の転移などさまざまな生体現象で重要な役割を果たしている。細胞遊走の際の退縮や伸展などの機械的なメカニズムは、分子的にも詳細に理解されつつあるが、一方でどのようなタイミングで何がトリガーとなって遊走が起こるのか、遊走の方向性を決定するのは何か、といった細胞内外との情報伝達と細胞遊走の関係についてはいまだ十分には理解されておらず、解明が望まれている。

細胞内応答で重要な役割を果たす情報伝達物質として細胞内 Ca²⁺イオンがよく知られており、細胞遊走においても、伸展する細胞突起中での細胞内 Ca²⁺濃度の局在と細胞遊走の関連について報告されている。しかしながら、細胞質 Ca²⁺やER Ca²⁺のダイナミズムや Ca²⁺パルスの経時的な変化と細胞突起の伸長や退縮、さらには細胞全体の遊走挙動との関係はよくわかっていない。

これまでに研究代表者らは、ECM中における細胞の遊走挙動を詳細に解析する方法として、1本

の微細ファイバーを作製し、このファイバーに沿って細胞が遊走する様子が、ECMに沿った細胞の遊走の様子を表すモデル化を試みてきた。この実験系では、繊維状の構造をとるECMのもっともシンプルなモデルとして、ECM中に存在する細胞の挙動を単純化することができる。すなわち細胞の遊走はファイバーに沿った一次元の動きのみに限定され、細胞の遊走方向において、細胞極性が明確に判断できる。細胞遊走時の細胞内 Ca²⁺のダイナミズムを解析するにあたり、先端突起等の細部の詳細な解析と細胞体全体における解析を比較検討しやすくと考えられる。

そこでナノファイバーを用いたアプローチにより、細胞体全体の遊走挙動細胞遊走時における細胞体全体に関わるカルシウムイオンの役割を明らかにするための実験系を構築することを本研究の目的とする。これにより、細胞の遊走制御につながり、さらには腫瘍細胞の転移、浸潤現象の解明にもつながることを期待している。

研究の内容および成果

【ナノファイバーの作製方法】エレクトロスピンニング法によりナノファイバーを作製した。エレクトロスピンニング法とは高電圧を印加したシリンジから溶液を射出することで、極細繊維を紡糸する方法である。今回、ファイバーの材料として、培養ディッシュの材料に用いられている素材と同一の材料であるポリスチレンを用いた。ポリマー溶

液の流速 1.0 ml/h、コレクタの回転速度 1,500 rpm、電界 2.5 kV/cm の条件でエレクトロスピンニングをおこない、アクリル製の担持用基板の上に紡糸した。ファイバーは、ファイバー担持用基板中央の培養領域に橋架けするように担持させた。この領域で、ファイバーは基板には接しておらず、細胞はこの橋架けしされた部分で培養する。

【ファイバー上での細胞培養方法】ファイバーが担持された基板を、ファイバー担持面が下になるようにディッシュにセットし、腫瘍細胞株 HT-1080 細胞の懸濁液を播種し、2 h インキュベートして、ファイバーに細胞を接着させた。

【細胞内カルシウムの定量方法】細胞にカルシウム感受性蛍光色素 Cal-520AM (1.0 μM) を添加し、37°C で 30 分間インキュベートすることで、色素を取り込ませた Cal-520AM は細胞内に取り込まれるとエステラーゼによる加水分解を受け、蛍光を発する。蛍光強度は Ca^{2+} イオン濃度に依存する。

【細胞遊走中の細胞内カルシウムの定量結果】本研究では細胞内のカルシウムイオン濃度を変化させる為の薬剤として BAPTA-AM を用いた。BAPTA-AM は細胞質内に取り込まれると加水分解され、細胞質内のカルシウムイオンのキレート剤として働く。これにより、細胞質内のカルシウムイオン濃度は減少する。

図 1 にファイバー上に播種した細胞の移動の様子とカルシウム指示薬の輝度変化の蛍光顕微鏡画像を示す。細胞はファイバー上で遊走する際、紡錘形の形態をとり、この形態を大きく崩すことなく、伸展と退縮を繰り返しながら遊走していた。添加前後でファイバー上を遊走する際の細胞体の長さを定量的に解析した。その結果、BAPTA-AM 添加前の細胞体の長さは、約 15-50 μm だったのに対し BAPTA-AM 添加後は、約 10-35 μm と短くなった。BAPTA-AM を添加することによって、細胞は小さく丸くなってしまいその場からほとんど遊走しなかった。細胞体内のカルシウムイオン濃度を表すカルシウム指示薬の局在を観察したところ、BAPTA-AM 添加前の遊走中の細胞では細胞体前方でイオン濃度の上昇がみられた。BAPTA-AM 添加後については、細胞内での局在は観察されなかった。細胞全体のカルシウムイオン濃度については BAPTA-AM を添加することによって大幅に減少した (図 2)。ファイバー上の細胞遊走速度を時間に対してプロットしたところ (図 3)、BAPTA-AM 添加後の細胞遊走速度は低下した。

以上より、移動中の細胞ではカルシウムの細胞内濃度に差があること、細胞カルシウムイオン強度を変動させることで細胞遊走挙動を制御できる

可能性があることが見出された。

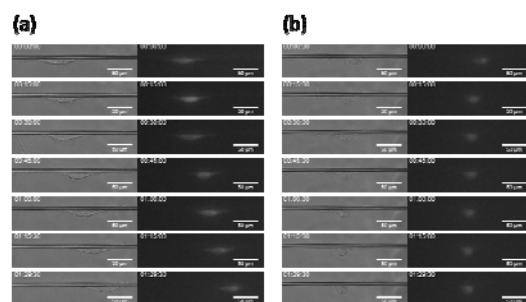


図 1. ファイバー上での細胞遊走とカルシウム指示薬の輝度。BAPTA-AM 添加前(a)および後(b)。

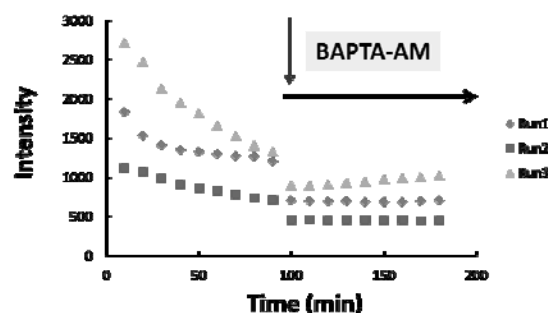


図 2. BAPTA-AM 添加前後のカルシウム指示薬の蛍光強度の変化。

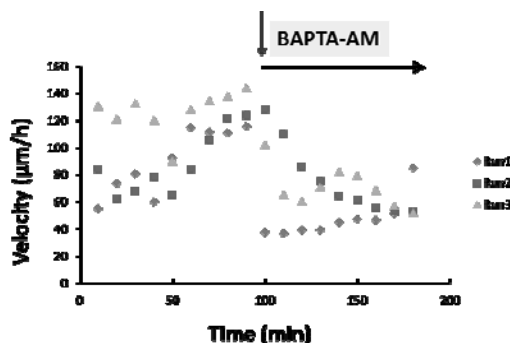


図 3. BAPTA-AM 添加前後の細胞遊走速度。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

- O. Batnyam, H. Shimizu, K. Saito, T. Ishida, S. Suye, S. Fujita, Biohybrid hematopoietic niche for expansion of hematopoietic stem/progenitor cells by using geometrically controlled fibrous layers. *RSC Adv.* 5 80357-80364 (2015)
- 早水 亮貴, 末 信一朗, 赤池 敏宏, 藤田 聡, 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, 第 4 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会 (2015)

- 鳥本 雄太, 金森 啓一郎, 末 信一朗, 藤田 聡, 細胞形状の変形をもとにした 1 細胞遊走挙動の解析, 第 4 回日本バイオマテリアル学会北陸若手研究発表会 (2015)

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 藤田 聡, 科研費・基盤研究(A), 2015 年度, 次世代器官再生医療のための基盤技術の開発 (分担), 採択, 156 万円
- 松岡達, 藤田聡, 竹内綾子, 科研費・基盤研究(B) (特設分野研究), 2016 年度, ミトコンドリアによる細胞遊走・走化調節に関する構成的システム生物学研究, 申請