

平成 30 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：新領域開拓 研究期間：平成 30 年 10 月～平成 31 年 3 月

研究課題名：新規工学デバイスによる細胞運動関連遺伝子の網羅的探索

ラボ長

所属：機能創成専攻生体工学領域

氏名：出口真次

研究成果

本研究では、がん細胞の浸潤に不可欠な遺伝子（本報告書は公開されるため具体的な名前を伏せ、そのタンパク質群をここでは X と記す）の同定とその活性化メカニズムの解明を主たる目的とする。上皮性細胞から発生するがん細胞は、上皮性細胞時にはなかった浸潤能（3 次元環境内での移動能）を獲得して周囲の器官に広がり、転移のもととなる。過去の研究によりがん細胞に発現する遺伝子群が明らかにされているが、細胞が浸潤を達成するために時空間的にどのようにそれらの遺伝子およびタンパク質が活性化されるか、その詳細には不明な点が多い。本研究では、新規工学デバイスを用いて中規模スクリーニングを行い、X タンパク質群から浸潤能に関わる分子を同定する。その機能解析を通して、がん細胞の浸潤過程に関する新しい知見を得ることを目的とする。

本年度は当初予定していた実験の大部分を実施した。ただし計画当初、96 ウェルプレート性の工学デバイスを作製予定であったが、試作を踏まえて再検討を行い、顕微鏡を用いた検出の容易性、コスト、および実験に係る時間を鑑み、まずは 24 ウェルプレート性デバイスを作製して研究目的の達成を目指すことにした（図 1）。96 ウェルに比べて個々のウェルの大きさは 4 倍になるためにスループットは落ちるが、本スクリーニング方

法の有効性の検証という目的においては、手段として本質的に同じものである。

がん細胞としてヒト骨肉腫 U2OS 細胞と子宮頸がん由来 HeLa 細胞を用い、多数ある X タンパク質群の中から、スク

リーニング実験を進めている。その一部を図 2 に示す通り、複数のパラメーターに基づいて選別を行い、幾つかの候補遺伝子を得ることができた（図中において赤色で示したもの；左端はコントロールを示す）。さらに多段階スクリーニングを進め、複数のパラメーターをもとに現在のとこ



図 1 24 ウェル性工学デバイス

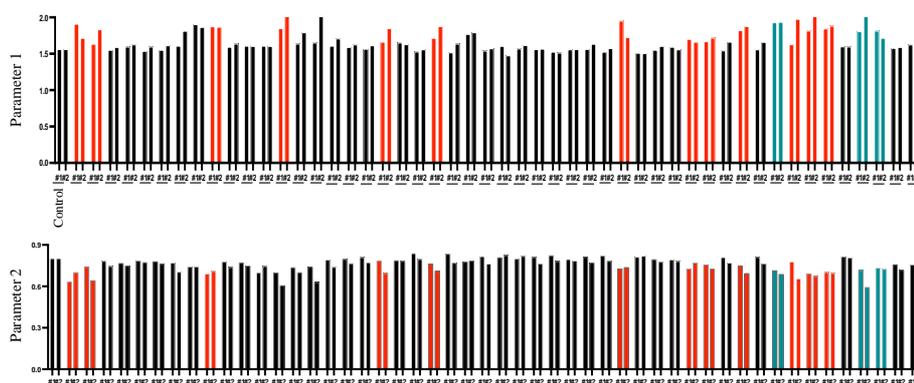


図 2 スクリーニング実験結果の一例

ろ 14 種類のタンパク質まで絞り込みを行っている (図 3)。これらのスクリーニングにおいては選別の指標とする細胞の特性を画像解析に基づいて数値化して抽出し、各 siRNA が及ぼす影響を幾つかのパラメーターに基づいてスコア化して評価した。本実験では異なる遺伝子ごとに 3 種類程度実施した。さらに再現性の確認のため複数回独立して実験を行うとともに、特定のタンパク質 X1 についてはアクチン細胞骨格との共局在観察を行い (図 4)、レスキュー実験で確認を行った。タンパク質 X1 は、疾患との関連性などを文献・データベースによって調査した結果絞り込みを行ったものである。

さらに、当初次年度 (平成 31 年度) に実施予定であった質量分析装置を用いたプロテオミクス解析も既に前倒して

実施を始めている。そこで得られたタンパク質 X1 との結合タンパク質について解析を進めている。

また同時に、様々なタイムスケールの応力緩和特性を付与した高分子材料の力学特性を詳細に調べ、工学デバイスとしての性能向上を図っている。これまでに分子長の揃った高分子を精密重合により合成し、生体適合性・細胞接着性を有する高分子にグラフトさせるという分子設計により、幾つかの高分子を合成している。これらの材料について、グラフト鎖の分子運動に応じた応力緩和の性質を付与し、グラフト鎖の分子長や修飾密度によって材料の緩和強度・時定数が制御できることを詳細に確認した。特に本年度はグラフトポリマーを有する高分子ゲルについて、光散乱型レオメーターを用いてプローブ粒子のブラウン運動から粘弾性を測定し、ゼラチンを主鎖とし側鎖にポリアクリルアミドを末端修飾したヒドロゲル (Gela-e-pAAM gel) の試料において周波数 $f = 10^3 \text{ Hz}$ 近傍に緩和が見られた。このように本研究独自の材料設計が細胞の動態制御に繋がる可能性が示された。さらには工学デバイスとしての性能の向上を図り、画像解析においてディープラーニングによる機械学習評価も取り入れつつある。

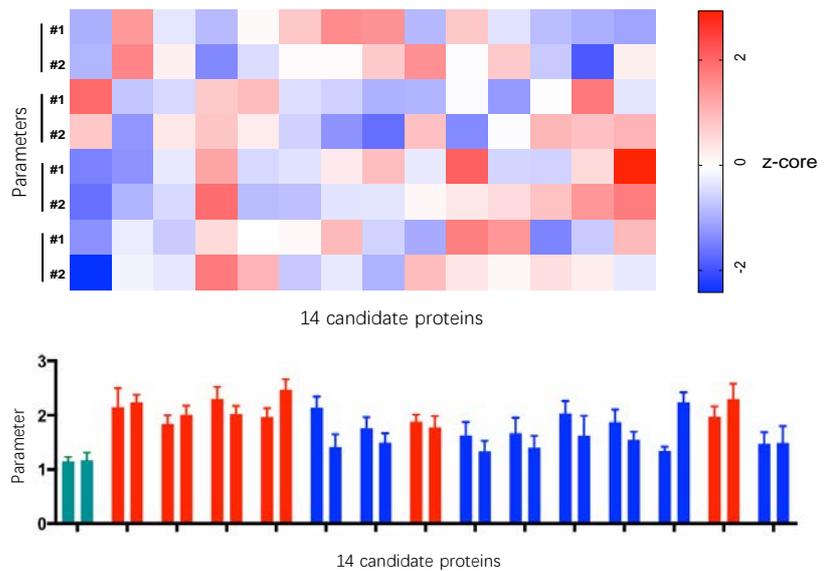


図 3 高次スクリーニング実験結果の

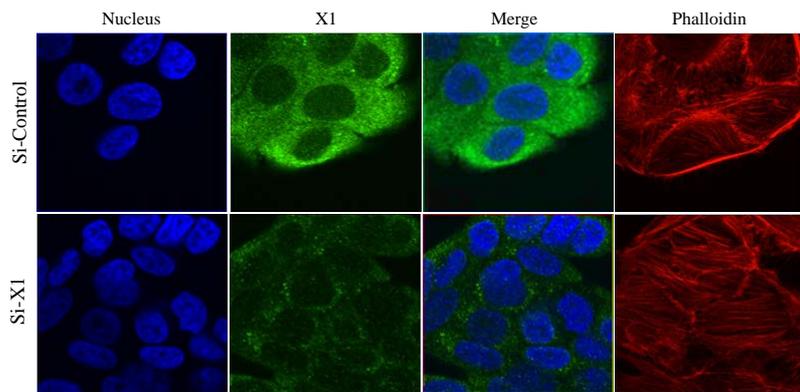


図 4 アクチン細胞骨格共局在観察

キーワード：細胞生物学、がん細胞浸潤、バイオマテリアル、メカノバイオロジー

研究経費（H30年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
190,166 円	696,759 円	87,420 円	0 円	25,655 円	1,000,000 円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

境慎司・物質創成専攻化学工学領域

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

谷口理恵・機能創成専攻生体工学領域・技術補佐員

青崎宏樹・機能創成専攻生体工学領域・M1

山本翔太・物質創成専攻化学工学領域・M1

発表論文等（平成31年3月31日現在）

研究代表者および主な共同研究者の研究業績のうち、本研究課題に関連するもののみを、現在から順に発表年次を過去に遡って記入してください。

〔雑誌論文〕 なし

〔著書〕 なし

〔学会発表〕 なし

〔その他〕 青崎宏樹，松井翼，出口真次，“「力」の発生源となる遺伝子を見つける” 第3回豊中地区研究交流会，大阪大学，2019年12月18日。

外部資金獲得状況・申請状況（本研究課題に関連して、科研費、JST等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください）

（申請中）出口真次（分担）・AMED ゲノム創薬基盤推進研究事業 ゲノム情報研究の医療への実利用を促進する研究（代表：塚本蔵・大阪大学大学院医学系研究科）

参考となるHP等

基礎工・出口研ウェブサイト (<http://mbm.me.es.osaka-u.ac.jp>)

基礎工・境研ウェブサイト (<http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/home.html>)