

令和元年度 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31年4月～令和2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

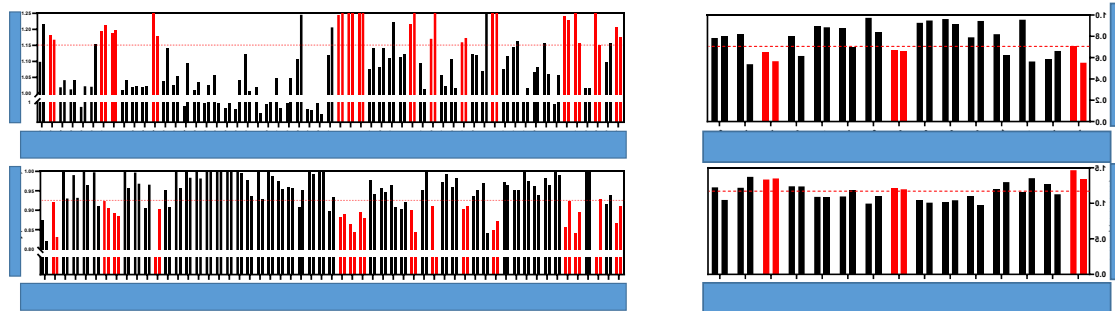
所属：機能創成専攻生体工学領域

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。

昨年度から今年度にかけて実施したスクリーニング結果（図1）を既に論文投稿している。赤色は特定の遺伝子について、特異な機能発現が見られたことを示している。そこで、本年度は、この二次スクリーニングで得られた遺伝子に該当するタンパク質（X）に着目し、本研究で開発に取り組んでいる新規工学デバイスを用いた新たな機能評価を行った。このデバイスの中心部分となる高分子材料は、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基づき合成したものである。これは、様々なタイムスケールの応力緩和特性を付与することを狙ったものである。実際に、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実際に確認している。具体的には、MCF10A細胞を同デバイス上で低密度で培養し、24時間後にsiControlとsiXを遺伝子導入し、タンパク質Xのノックダウン（発現抑制）の形態的効果（ここでは面積について示す）を調べた。



(a)一次スクリーニング結果

(b)二次スクリーニング結果

図1 遺伝子スクリーニング結果（解析対象遺伝子・パラメーターは非公開）

境研との本共同研究において、新しく開発した有機・無機ハイブリッド材料をもとにしたデバイス上に細胞を培養し、siControl と siX 処理時の細胞形態を評価した。より具体的には、ポリスチレン (PS) 上、ゼラチン (Gelatin) ゲル上、同 Gelatin ゲルに短鎖ポリアクリルアミドを導入したもの (S#)、同 Gelatin ゲルに長鎖ポリアクリルアミドを導入したもの (L#) をそれぞれ作製した (#の数字は密度を表し、数字が大きいくほど密度は小さい)。実験の結果、条件により大きく異なる細胞形態が観察された (図 2, 3; いずれも解析対象遺伝子名は伏せている)。興味深いこととして、PS 上においてタンパク質 X のノックダウンにより面積が増加するが、Gelatin 上では逆に減少することが確認された。さらに、長鎖ポリアクリルアミドの導入により、面積の増加を促進することができることが分かった。タンパク質 X は癌化抑制因子と想定しており、本来であればその発現抑制により EMT (上皮間葉転換) という (癌化の初期段階に起こる) 現象が生じ、(PS 上と同様に) Gelatin 上でも面積の上昇が当初予想された。しかしながら、Gelatin をリガンドとして受容するインテグリン分子の発現量が少なく、予想に反して EMT を起こしたにも関わらず細胞が接着して広がることができないことがわかった。それに対して、同ハイブリッド材料の特定の条件 (L2, L3) においてその状況を回避できることがわかった。今後は細胞形態だけでなく、細胞浸潤に関わる現象を含めて詳しいメカニズムを調査するとともに、さらなる人為的調節が可能であるかを検討する予定である。

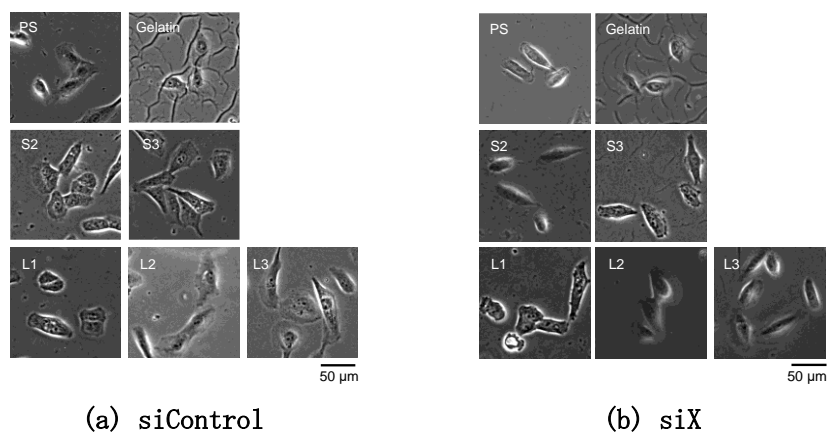


図 2 デバイス上で培養した細胞の形態に対するタンパク質 X の影響 (位相差像)

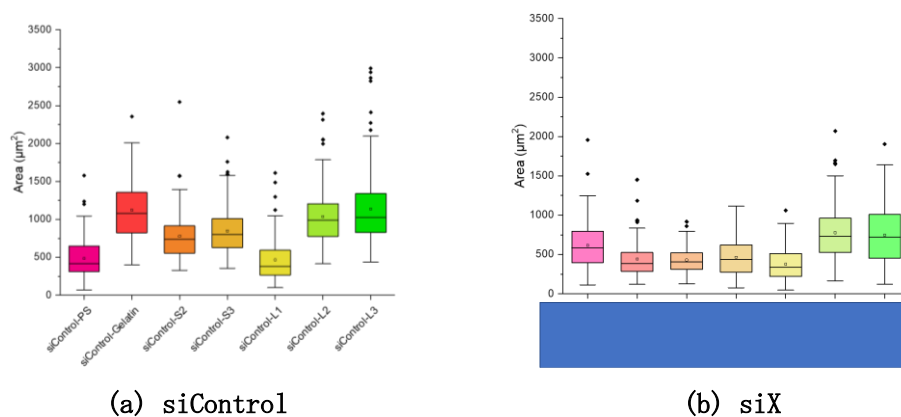


図 3 デバイス上で培養した細胞の形態に対するタンパク質 X の影響 (解析結果; (a) (b) の各棒グラフの並び順において、siControl と siX 以外の実験条件は同じである)

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（R1年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0円	1,115,820円	36,180円	0円	3,000円	1,155,000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・M2

Kang Na・機能創成専攻生体工学領域・D3

山本翔太・物質創成専攻化学工学領域・M2

発表論文等（令和2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（投稿中）

〔著書〕なし

〔学会発表〕

青崎 宏樹，松井 翼，出口 真次，“がん細胞が発生する力のアッセイ”第78回日本癌学会学術総会，京都国際，Sep. 26-28.

Kang Na, Tsubasa S. Matsui, Shiyu Liu, Sachiko Fujiwara, Shinji Deguchi, “Involvement of Rho GTPase-activating proteins in cell functions” 0th Asian-Pacific Conference on Biomechanics 2019, Chang Yung-Fa Foundation International Convention Center Taipei, Nov. 1-4, 2019

〔その他〕

青崎 宏樹，松井 翼，出口 真次，“がん細胞が発生する力のアッセイ”第78回日本癌学会学術総会，京都国際，Sep. 26-28.

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）

（採択）出口真次（代表研究者）・再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点（研究期間2020年4月1日～2021年3月31日；研究経費70万円）

（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>)