

高転移性マウス乳癌細胞における ネスチンの機械的機能の解明

SATテクノロジー・ショーケース2017

■ はじめに

細胞骨格蛋白質の一種である中間径フィラメント(IF)のネスチン(図1)は高転移性の癌細胞において高発現であり、癌細胞の転移機構に関与することが明らかとなっている。実際にネスチン遺伝子の発現を抑制した細胞は、遊走能及び転移能が低下することが報告されている。そのため我々は癌転移抑制治療の標的としてネスチンに注目しているが、ネスチンと癌転移機構の関係は不明である。本研究では、高転移性マウス乳癌細胞株SC2に対してネスチン遺伝子ノックアウト株を作製し、その機能を解析することを目的とした。

■ 活動内容

1. ゲノム編集によるネスチンノックアウト株の作製

IFは薬剤による阻害試験が出来ないため、ゲノム編集技術を用いてネスチンノックアウト株を作製した。高転移性マウス乳癌細胞SC2株に対してCRISPR/Cas9システムを用いてネスチン遺伝子を破壊した。原子間力顕微鏡(AFM)及び円柱型AFM探針を用いた細胞圧入試験の結果、ネスチンノックアウトにより細胞弾性率が1.5倍程度に上昇することが明らかとなった(図2)。さらにマトリゲルをコートした孔径8 μm のBoydenチャンバーを用いて浸潤アッセイを行った結果、ネスチンノックアウト株においては小孔を通過した細胞数が野生株の60%程度に減少したことから、ネスチンノックアウトによって細胞体の弾性率が上昇することで浸潤性が低下することが示された。

細胞の弾性は骨格蛋白質が形成する3次元ネットワーク構造により維持されている。弾性率の上昇は、ネスチンノックアウトにより他の骨格蛋白質の発現が亢進したことによる可能性が考えられた。そこでウェスタンブロットによる骨格蛋白質の発現量の評価を行った。ネスチンと共重合繊維を形成するビメンチン、細胞体の弾性率に大きく影響すると考えられるケラチン、微小管、アクチンに関して調査した結果、野生株とネスチンノックアウト株で各骨格蛋白質の発現量に顕著な差は確認されなかった。以上の結果から我々は、ネスチンは弾性率の低い3次元ネットワーク構造を形成する性質を有すると考えた。

2. 細胞骨格構造の機械的特性の解析

ネスチン発現と弾性低下の関係を調査するためにAFMを用いてIFの一種であるビメンチンの引張試験を行った。我々のグループではこれまでに直径200 nm

のナノニードルを抗体で修飾し、細胞に挿入することで生きた細胞の骨格蛋白質を検出する技術を開発した。細胞からニードルを抜去する際に得られるフォースカーブ上で、抗原抗体間の結合が破断する際にかかる力がピークとして出現することで、骨格蛋白質を検出できる。この骨格蛋白質の力学検出で得られるフォースカーブ上に、細胞骨格構造の特徴が出現し、骨格構造の機械的な性質を評価できるのではないかと考えた。そこで、抗体修飾ナノニードルを細胞に挿入し、ネスチンと共重合繊維を形成するビメンチンの引張試験を行うことで得られたフォースカーブから、機械特性を解析した。その結果、SC2株及びネスチンノックアウト株において、特徴的な形状のフォースカーブが得られ、ネスチンの発現によりビメンチンの機械的強度への寄与が低下することで細胞の弾性率が低下することが示唆された。本手法により、世界で初めて細胞骨格蛋白質の機械的・構造的解析が可能となった。本手法は、IFのみならず骨格蛋白質全般の機械的・構造的解析に応用出来ると考えている。

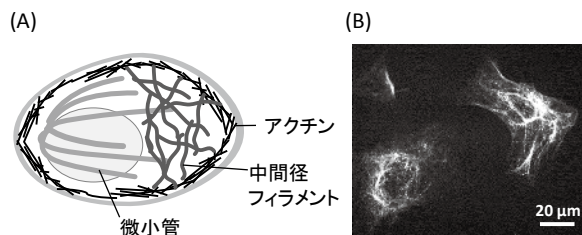


図1 細胞骨格構造 (A) 骨格蛋白質が形成する3次元ネットワーク構造 (B) 中間径フィラメントネスチンの共焦点顕微鏡画像

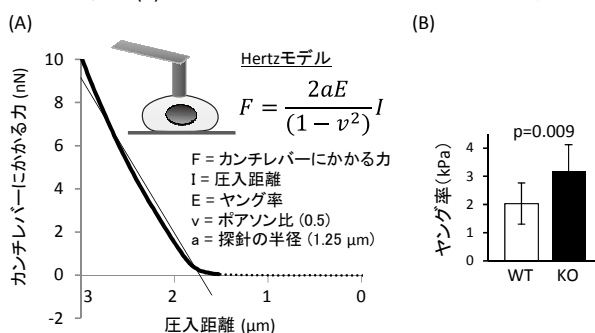


図2 細胞圧入試験による弾性率の測定

(A) AFMプローブを細胞に圧入した時に得られるフォースカーブ。Hertzモデルにより回復したヤング率を算出する。(B) 野生株 (WT) 及びネスチンノックアウト株 (KO) の細胞弾性率

代表発表者 山岸 彩奈 (やまぎし あやな)
 所属 国立研究開発法人 産業技術総合研究所
 バイオメディカル研究部門
 セルメカニクス研究グループ
 問合せ先 〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第五
 TEL: 029-861-4087 FAX: 029-861-3048
 a-yamagishi@aist.go.jp

■キーワード: (1) 原子間力顕微鏡
 (2) 乳癌細胞
 (3) 中間径フィラメント

■共同研究者: 中村 史
 国立研究開発法人
 産業技術総合研究所
 セルメカニクス研究グループ