

細胞の刺激応答性の観察～生命現象のアクティブウォッチング～

中西 淳

1 はじめに

最初にお断りしてしまおうが、本特集は生命現象“見える化”の方法論に関するものであるが、筆者が紹介する内容には、“見る”技術そのものの開発は含まれていない。その代わりに筆者らが取り組んでいるのは、見る対象となる生命現象（応答）を引き起こすために、多くの場合、見る行為とセットになる、細胞に刺激を与える技術である。換言すれば、「刺激に徹底的にこだわった分析化学」をやっていると見えるのかもしれない。一見、アブナイ人と勘違いされそうだが、そうではなく至って真剣である。以下で二種類の「刺激」にこだわった最近の研究例を紹介しながら、我々の分析化学的なねらいを示したい。

2 細胞-基質間接着の刺激

細胞内シグナル伝達を見る場合、成長因子やサイトカインなどの液性因子で細胞を刺激して、その応答を解析

するのが一般的だ。これら液性因子は、細胞膜上のさまざまな受容体タンパク質に結合すると、それに呼応して、Ca²⁺等セカンドメッセンジャーの生成やタンパク質のリン酸化、遺伝子発現などという形で細胞が応答を示すため、それらの変化が見やすくなるからである（図1a）。一方で、日常的に細胞を取り扱う人にとっては、当たり前すぎて普段は意識しないが、細胞（浮遊系でなく、接着性の）は、培養に用いる培養皿からも、その生存に不可欠な刺激を受け続けている。やや古めかしい表現を用いると、足場から生存シグナルを受け取っているのである。その生存シグナルの中身を紐解いてみると（図1b）、培地に含まれる細胞外マトリクスタンパク質（フィブロネクチンなど）が培養皿の表面に吸着し、それらが細胞膜に存在するインテグリンと結合し、両者が鍵と鍵穴の関係で相互作用することで、液性因子と同様に細胞内シグナルを発動するのである。従来の分子生物学的な発想では、この鍵と鍵穴の関係は、化学的親和性、すなわち結合定数で論じられるため（図1c）、我々

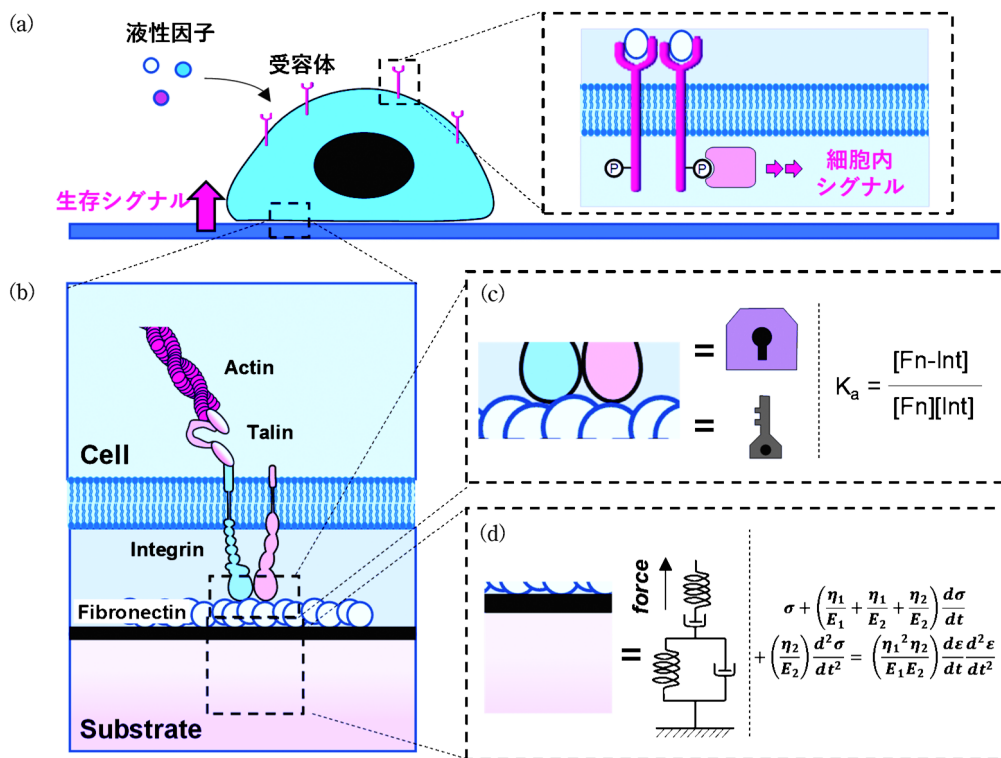


図1 (a)液性因子と基質による細胞の刺激。(b)細胞-基質界面の細胞接着装置。(c)分子間相互作用に基づく生化学作用。(d)細胞の牽引力に由来する力学的相互作用。

分析化学者にとっても至ってイメージしやすいわけであるが、殊に細胞接着という現象においては、我々からはやや縁遠い力学的な相互作用というものも加味する必要がある(図1d)。その際、「力」というものは伝播する性質があるため、界面における相互作用の局所情報(化学種・濃度)を注目するだけでは不十分であり、そこからさらに奥まった、材料バルクの力学的特徴までもが細胞は自らが発する牽引力により感知しており、それがゆえに弾性率や応力緩和などと言った材料の硬さの指標が重要な意味を持つようになる。一般に用いられる培養皿は硬すぎるために、その影響はほとんど見られず、それが故に我々も軽視しがちなのであるが、硬さが生理的な軟組織のレベルに近づいてくると非常にクリティカルである。細胞がどのように足場の硬さの違いを感じ取るかという点は、まさしくメカノバイオロジーの中心的な課題であるが、その詳細な説明は他所に委ねることにする¹⁾²⁾。ここで強調したいのは、細胞-基質間においては、通常の液性因子の作用を支配する化学平衡といった、分析化学の教科書の最初の方で現れる指標に加え、力という物理量をも考慮する必要があるという事実であろう。さらに、もう一つ大きな違いを挙げるなら、通常の液性因子を細胞に添加する場合、その濃度やタイミングを比較的容易にコントロールすることができるが、細胞と基質間の相互作用においては、多くの場合、最初に設定した条件に対して細胞が馴染んでいく様子を見守るという受動的な使い方をするのが一般的であった。したがって、足下から受ける刺激に対峙した細胞の応答を調べる方法論が決定的に不足しており、その作用機序を深く洞察できなかったのである。まさしく灯台下暗しである。

この方法論的な閉塞感を打破しようと、筆者らが取ったのは、それこそ細胞の足下に光を当てるという戦略である。ガラス基板の表面を、ケージド化合物に利用される光分解性2-ニトロベンジル(2-NB)基を有するシランカップリング剤で修飾し、そこに水溶性高分子のポリエチレングリコール(PEG)を反応させた(図2a)³⁾。PEGのような水溶性高分子を修飾した表面では、タンパク質の吸着が抑えられるため、上述したフィブロネクチン等の細胞への生存シグナルのトリガーが入らなくなる。それがゆえに、この状態では細胞は基材表面に接着することができない。一方で、照射によって2-NB基を切断すると、PEGによるタンパク質の吸着抑制が解除され、タンパク質が表面に吸着できるようになり、その結果、細胞が基材表面に接着するという算段である。この光応答性の基板で、単純に細胞の接着をOFF/ONして、そこに細胞の接着を制御するだけでは、上述の「受動的な～」というものと大差ない。そこで筆者らは、照射で細胞に接着する位置・範囲を決めておいて(パターンニング)、そこに接着させた細胞の周囲の領域を

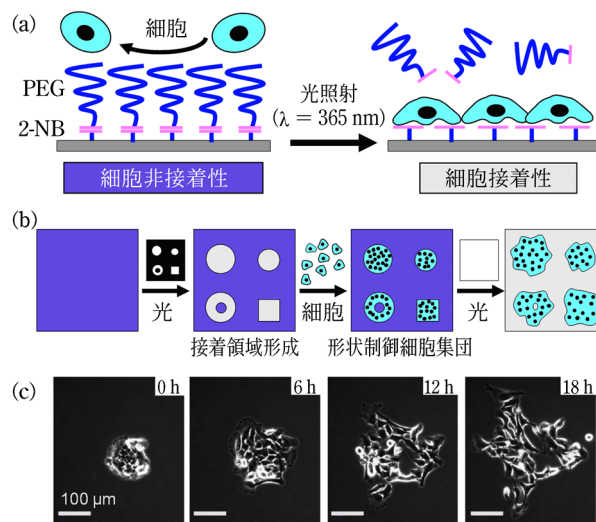


図2 光応答基板の原理と応用。(a)光分解性2-ニトロベンジル(2-NB)基を介してPEGが固定化された光応答基板。照射に応じて細胞非接着性から接着性へと変化する。(b)光応答基板を用いた細胞集団移動の解析方法。(c)基質のリガンド密度低下によって観察される細胞間接着が弱まった集団移動挙動。文献5より引用。

照射することで、細胞の接着可能な領域を拡張するという戦略で上皮細胞の集団移動挙動の観察・評価することにした(図2b)⁴⁾。細胞移動の研究でよく用いられる創傷治癒試験を光で実施するイメージである。この研究を通して、最初に細胞を閉じ込める領域のサイズに依存して、リーダー細胞と呼ばれる活発にラミリポディア(葉状仮足)を伸ばして、集団を先導していく細胞の出現頻度が低下していくことを見いだすことができた。それと同時に、この結果が意味するところは、最初の細胞集団の幾何学形状(初期状態)を規格化して秩序を与えることが、奔放に動き回る細胞に内在する性質を再現よく炙り出す上で好都合という側面であり、ここにも分析化学的マインドが見え隠れする。

また、同様の戦略を金基板上に展開し、光分解PEGとcRGDペプチド(フィブロネクチンの接着活性中心由来のペプチドで、環状にすることでよりインテグリンとの結合能が高められている)を共固定した自己組織化単分子膜を形成した。この際のcRGDペプチドの密度を調節することで、細胞に入るcRGDの刺激量を調節できるわけである⁵⁾。すると、cRGDの刺激量が低下するにつれて、細胞間の接着が弱まっていく様子が確認された(図2c)。一般に細胞-基質間と細胞間の接着はTag-of-war(綱引き)の関係にあると考えられているが⁶⁾、筆者らの観察結果はこのルールの逆を行っている。したがって、細胞が基質からの刺激の低下に伴って、細胞内シグナルを変調させて、積極的に細胞間の接着を弱めていることが浮き彫りになった。ここにおける細胞骨格・細胞接着装置が絡んだメカノバイオロジカルな応答機構も詳細に調べているが⁷⁾、本誌のスコープが

ら逸脱してしまうので割愛することにする。また、この光分解性 PEG の反応は界面現象であるため、さまざまな基質にその基本戦略が適用可能であり、例えば、ハイドロゲルでバルク力学特性を制御すれば、足元からの力学刺激が細胞移動挙動に与える影響を調べることもでき、メカノバイオロジー的な考察が可能になってくる(図 2d)⁸⁾。さらにはここに表面の化学的特性の影響も加味できる材料なども開発しており⁹⁾、足元から与えられる化学・力学刺激の協調作用などを探究しているところである。また現在は、力学特性を途中で変化させる基板などを開発しており、その方がメカノバイオロジー的な用途も大きい。このあたりの進捗については、別の機会に、もう少しメカノバイオロジーの真髓に触れながら紹介できればと思う。

3 ナノ粒子(空間)を介した刺激

さて、上で述べた光応答基板の応用の一つとして、表面に、粒径 10 nm 弱の金ナノ粒子がアレイ状に配置されたガラス基板への応用も着手している¹⁰⁾。使用したナノ粒子の大きさは、インテグリン分子(正確にはそのヘテロ二量体)が収容される程度の大きさのため、最初の基板調整の段階でナノ粒子の間隔を調節しておけば、それに応じて細胞と基質間に形成される分子複合体の間隔をナノスコピックに、しかも分子レベルで制御でき、その結果として引き起こるシグナル伝達と細胞集団移動挙動との関係を精査できる。この研究のさらなる展開として、基板上で示す細胞の移動挙動の変化が塑性的なものか調べたく(同時期に Anseth らが発表した Mechanical memory¹¹⁾と似たような発想で Nano memory がないかと思って)、トリプシン処理により細胞を剥離回収しようとしたが、思うように細胞が剥がれてくれなかった。恐らく金ナノ粒子上で何かしら頑強な高次複合体ができあがっているのだろうと漠然と思い、サンプルが回収できないのでは仕方ないのでと、当時はそれ以上の深追いはしなかった。

一方で平行して、金ナノ粒子(こちらは先ほどの基板と異なり水溶液中に分散した金コロイド)に光分解性の 2-NB 基を介して生理活性分子を固定化するという新しいコンセプトのケージド化合物を開発し、液性因子の刺激の時空間を光制御する方法の開発も進めていた。最初の低分子化合物での実証研究から¹²⁾、次にケージドタンパク質へと水平展開するために、まずは上皮成長因子(EGF)をターゲットにした。冒頭で触れた、“見る”こととの対という意味合いで、粒子から放出される EGF が誘起する細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を蛍光イメージングで解析していたのだが、興味深いことに、コントロールとして調製した金コロイド上に固定化された状態の EGF が、 Ca^{2+} 応答を誘起しないという現象に遭遇した。コロイドの表面組成などをいろいろと検討したも

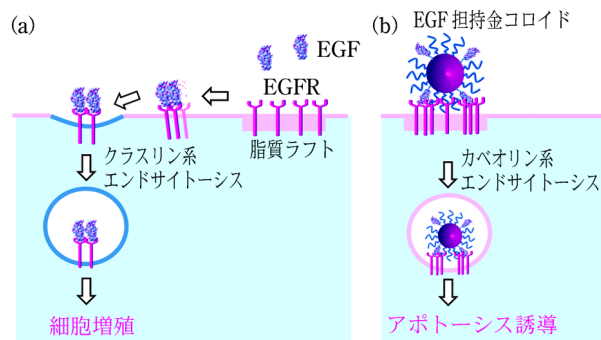


図3 上皮成長因子(EGF)固定化金コロイドによる特異な細胞シグナルの誘導。(a)通常の遊離型EGFによる細胞応答。(b)EGF固定化金コロイド添加による細胞応答。

の、一切切切 Ca^{2+} は動いてくれない。とすると、これはもしかしたら、金コロイドに固定化すると、遊離型の EGF とは全く別のシグナル伝達経路が発動している、すなわちシグナル伝達に対する選択性が変化しているのではないかと、思い、またもや分析化学者魂に火が点いたのである。

そこでターゲットを光放出される EGF 分子から、金コロイド上に固定化された EGF に切り替え、 Ca^{2+} シグナルと関連する EGF 受容体(EGFR)のリン酸化状態や、下流のタンパク質のリン酸化やナノ粒子の動態などをいろいろ調べていった結果、最終的に以下のような事実が明らかになった¹³⁾：EGFR は静止状態では脂質ラフトに存在し、通常の遊離型の EGF で刺激されるとラフトを抜け出し、クラスリンコートピットに移行し、そこからクラスリン経路でエンドサイトーシスされる(図 3a)。これに対して金コロイドに固定化された EGF は、EGFR を脂質ラフト内に拘束し、その後にかベオリン経路でエンドサイトーシスされる(図 3b)。しかもその作用の帰結として、通常の EGF と正反対のアポトーシスが誘導されるのである。生きるか死ぬかなどといった細胞にとっての大問題が、細胞に与える刺激の仕方をわずかに変えるだけですり替わってしまう。その上、金コロイドと細胞の界面に形成される場(ナノ空間)が重要であり、そこには、先に紹介した金ナノ粒子固定化基板で何となく察知していた高次複合体の存在を示唆する結果もつかんでいる。その実体については、今後の筆者らの研究で明らかにしていきたいところだが、いずれにせよ、ナノ空間に刺激分子を置く感覚が大切なようである。このように、刺激をいろいろと工夫することが、結果的に生命現象の逆方向からの“見える化”につながっていくものと筆者らは考えている。

4 おわりに

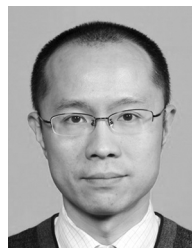
冒頭でエクスキューズしたように、筆者らは見る技術そのものを研究していないが、今回、編集委員会の森田

耕太郎先生に理学的な観点での見る技術を紹介してほしいと依頼を受けて、ここ数年来の自身の思考過程などを呼び起こしながら、刺激にこだわった研究遍歴をまとめてみた。個人的な思いを述べさせていただくと、オプトジェネティクスの飛躍的な進歩などに見られるように、生命活動を見る方法と細胞・生物に刺激を与える方法、これらは車の両輪のような関係にあり、どちらも生命現象の理解に不可欠なツールである。しかも刺激にこだわると、見るだけでは到達しえない、医療行為に直接つながるといった副産物もある。それにもかかわらず、分析化学者は見る方の開発にバイアスしている印象が強い。「刺激にこだわりながら見る」、いわばアクティブウォッチングとも言えそうな研究の可能性を、拙稿が喚起できれば何よりである。最後になるが、後半で紹介したEGF担持ナノ粒子の研究については、上で述べたようなさまざまな紆余曲折^{うよ}があって、一つの仕事として熟成されたものだ。その間、根気強く本研究を推し進めた山本翔太博士（現：学振特別研究員）にこの場を借りて感謝申し上げる。

文 献

- 1) A. Elosegui-Artola, X. Trepal, P. Roca-Cusachs: *Trends Cell Biol.*, **28** 356 (2018).
- 2) F. Martino, A. R. Perestrelo, V. Vinarský, S. Pagliari, G. Forte: *Frontiers in Physiology*, **9**, 824 (2018).
- 3) Y. Kikuchi, J. Nakanishi, H. Nakayama, T. Shimizu, Y. Yoshino, K. Yamaguchi, Y. Yoshida, Y. Horiike: *Chem. Lett.*, **37** 1062 (2008).
- 4) C. G. Rolli, H. Nakayama, K. Yamaguchi, J. P. Spatz, R.

- Kemkemer, J. Nakanishi: *Biomaterials*, **33**, 2409 (2012).
- 5) Y. Shimizu, M. Kamimura, S. Yamamoto, S. A. Abdellatef, K. Yamaguchi, J. Nakanishi: *Anal. Sci.*, **32**, 1183 (2016).
- 6) D. Gonzalez-Rodriguez, K. Guevorkian, S. Douezan, F. Brochard-Wyart: *Science*, **338** (6109), 910 (2012).
- 7) S. A. Abdellatef, J. Nakanishi: *Biomaterials*, **169**, 72 (2018).
- 8) M. Kamimura, M. Sugawara, S. Yamamoto, K. Yamaguchi, J. Nakanishi: *Biomater. Sci.*, **4**, 933 (2016).
- 9) S. Yamamoto, K. Okada, N. Sasaki, A.C. Chang, K. Yamaguchi, J. Nakanishi: *Langmuir*, **35** (23), 7459 (2019).
- 10) Y. Shimizu, H. Boehm, K. Yamaguchi, J. P. Spatz, J. Nakanishi: *Plos One*, **9**, e91875 (2014).
- 11) C. Yang, M. W. Tibbitt, L. Basta, K. S. Anseth: *Nat. Mater.*, **13**, 645 (2014).
- 12) J. Nakanishi, H. Nakayama, T. Shimizu, H. Ishida, Y. Kikuchi, K. Yamaguchi, Y. Horiike: *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3822 (2009).
- 13) S. Yamamoto, Y. Iwamaru, Y. Shimizu, Y. Ueda, M. Sato, K. Yamaguchi, J. Nakanishi: *Acta Biomater.*, **88**, 383 (2019).



中西 淳 (Jun NAKANISHI)

物質・材料研究機構機能性材料研究拠点、早稲田大学先進理工学研究科ナノ理工学専攻（兼務）（〒305-0044 茨城県つくば市並木1-1）。東京大学大学院理学系研究科化学専攻博士課程修了。学位（理学）。《現在の研究テーマ》メカノバイオリジカル材料の創製とその応用。《主な著書》猪飼 篤、伏見 謙、櫻井 実、佐藤 衛、高橋 榮夫、中西淳共訳、「バイオサイエンスのための物理化学（第5版）」。（東京化学同人）。《趣味》早寝早起き。

会 員 の 拡 充 に 御 協 力 を !!

本会では、個人（正会員：会費年額9,000円＋入会金1,000円、学生会員：年額4,500円）及び団体会員（維持会員：年額1口79,800円、特別会員：年額30,000円、公益会員：年額28,800円）の拡充を行っております。分析化学を業務としている会社や分析化学関係の仕事に従事している人などがお知り合いにおられましたら、ぜひ本会への入会を御勧誘くださるようお願い致します。

入会の手続きなどの詳細につきましては、本会ホームページ（<http://www.jsac.jp>）の入会案内をご覧ください。下記会員係までお問い合わせください。

◇〒141-0031 東京都品川区西五反田1-26-2 五反田サンハイツ304号（公社）日本分析化学会会員係
〔電話：03-3490-3351, FAX：03-3490-3572, E-mail：mem@jsac.or.jp〕