

子宮頸癌細胞の弾性率に与える摩擦刺激および紫外線の影響

Effects of Frictional Stimulation and Ultraviolet on the Elastic Modulus of Cervical Cancer Cells

東理大・工（学）*島村 龍汰 東理大・工（正）佐藤 魁星 東理大・院（非）関口 大裕

東理大・工（非）金 スヨン 東理大・工（非）元祐 昌廣 東理大・工（正）佐々木 信也

Ryuta Shimamura*, Kaisei Sato*, Daisuke Sekiguchi**, Kim Sooyoung*, Masahiro Motosuke*, Shinya Sasaki*

*Tokyo University of Science, ** Tokyo University of Science Graduate School

1. 緒言

癌疾患は日本人の死因第1位であり、年間約30万人が死亡している。癌疾患の主な原因は正常細胞の遺伝子の異常とされている。遺伝子の異常が発生すると、細胞の分裂回数が増加する。正常細胞においては、その分裂回数には制限がある一方で、癌細胞には分裂を制御する機構が無いため無秩序に増殖する。増えすぎた癌細胞は腫瘍として肥大化し、最終的に悪性化し、浸潤と転移という現象が起きる。浸潤とは、癌細胞が最初に発生した部位から周囲の組織へ拡大する現象であり、浸潤が進行した臓器は正常に機能することができなくなる。転移とは、癌細胞が血管やリンパ管を通じて別の部位に移動し、そこで増殖する現象であり、複数の臓器で癌疾患が発生すると治療が困難になる。そのため、癌細胞が悪性化する前に癌細胞を死滅させる治療が必要となる。

近年、癌細胞の機械的特性と悪性度の関係に注目が集まっている。癌細胞の弾性率は、細胞膜の張力に依存し、その張力は細胞膜と細胞骨格タンパク質との接着により制御される。先行研究では、このタンパク質を癌細胞の細胞膜に付着させると細胞膜の弾性率が高くなり、転移能が消失し悪性度が下がることが報告されている¹⁾。また、副作用が小さい癌治療の研究が進んでおり、その例として温熱療法と光線力学療法がある。温熱療法とは癌細胞が42.5℃以上になると死滅する性質を利用し、選択的に癌細胞の温度を上昇させる治療法である。患部を一對の電極板で挟み、その電極間に高周波である8MHzのラジオ波を流して、双極子を持つ生体分子に回転と振動を起し、分子摩擦により患部の温度を上昇させる。光線力学療法とは、癌細胞に特異的に付着する光感受性物質を投与し、その後光線を照射することで薬剤を反応させ、癌細胞のみを破壊する治療法である。しかし、これらの治療法における摩擦および光線それぞれが、癌細胞の転移能にかかわる物理特性である弾性率に与える影響を調査した事例は少ない。

本研究では、先行研究で示唆された癌細胞の弾性率と悪性度の関係に着目し、摩擦刺激および紫外線照射が子宮頸癌細胞の弾性率に与える影響を、原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscopy, AFM）を用いて評価した。

2. 実験概要

2.1 実験材料

実験サンプルには子宮頸癌細胞であるHeLa細胞と、抗腫瘍作用を有する6-チオグアニンに対する耐性を持つTG細胞、また、生死状態による弾性率の違いを測定するために、塩化銅(II)および塩化鉄(III)で死滅させたHeLa細胞も用いた。これらの細胞は、MEM（Minimum Essential Medium）培地にストレプトマイシンとペニシリンの混合物、ならびにウシ胎児血清を混合し、温度37℃、CO₂濃度5~6%の条件下で培養を行った。Table 1に各培養条件を示す。測定する細胞は、全て播種してから48~72時間経過したものを用いた。

Table 1 Details of culture

Medium	MEM
Antibiotics	Penicillin Streptomycin
FBS	Fetal Bovine Serum
CO ₂ concentration, %	5~6
Temperature, °C	37

2.2 実験方法

摩擦刺激および紫外線が細胞の弾性率に及ぼす影響を調査するため、培養液中の細胞表面のZX面のフォースカーブ測定を行った。AFMはSPM-8100FM（SHIMADZU, JP）を使用した。フォースカーブ測定は、摩擦試験前後および紫外線照射前後で測定を行った。式(1)に、弾性率の算出理論であるJKR2点法の式を示す。

$$K \approx \frac{1.27F_1}{\sqrt{R(\delta_0 - \delta_1)^3}} \quad (1)$$

ここで、 K は弾性定数、 F_1 は最大凝着力、 R はカンチレバー先端の直径、 $\delta_0 - \delta_1$ は押し込み量である。上記の式を用いて、AFM測定で得られたフォースカーブをもとに、弾性率を算出した。Table 2にZX面のフォースカーブ測定条件、Table 3に摩擦試験の測定条件、Table 4に紫外線の照射条件を示す。また、紫外線照射後の細胞に対しては、0.4 w/v %のTrypan blueを用いて死細胞を染色し、生死確認を行った。カンチレバーには、直径6 μmのポリスチレン球をチップレスカンチレバーの先端に取り付けた自作のコロイダルカンチレバーを使用した。また、カンチレバーのばね定数

は 0.12 N/m である。

Table 2 AFM observation condition

Temperature, °C	37
Operation point, V	0.4
Scan speed (Z), Hz	8

Table 3 Friction tests condition

Temperature, °C	37
Scan speed, Hz	6
Contact load, nN	2.61
Scan range, μm	30×30
Time, min	30

Table 4 Ultraviolet irradiation test condition

Temperature, °C	37
Wavelength, nm	312
Time, h	3
Irradiation calorific value, J	12.9

3. 実験結果

3.1 摩擦試験

Figure 1 に、摩擦試験前後の HeLa 細胞および TG 細胞の弾性率の測定結果を示す。HeLa 細胞の摩擦試験前の弾性率は 1.24 kPa、摩擦試験後の弾性率は 1.61 kPa となり、TG 細胞の弾性率は摩擦試験前 20.4 kPa、摩擦試験後 28.9 kPa となった。Figure 1 より、TG 細胞の弾性率が通常の HeLa 細胞よりも大きく、どちらの細胞においても、摩擦試験後に弾性率が大きくなることが確認された。

3.2 紫外線照射試験

Figure 2 に紫外線照射前、Fig. 3 に 3 時間照射後における HeLa 細胞の光学顕微鏡像を示す。二つの図を比較すると、照射後に細胞膜表面に細かな凹凸が現れることが確認された。また、HeLa 細胞の紫外線照射前の弾性率は 1.24 kPa、紫外線照射後の弾性率は 0.306 kPa となり、紫外線照射により弾性率が低下することが確認された。Fig. 4 に、紫外線照射後および二種の化学物質で死滅させた HeLa 細胞の弾性率測定結果を示す。照射後の細胞の死滅率は約 85 % であり、また、塩化銅(II)および塩化鉄(III)で死滅させた HeLa 細胞の弾性率は、それぞれ 0.554 kPa、0.356 kPa となり、死滅した細胞の弾性率は生きている細胞に比べて低い傾向が得られた。

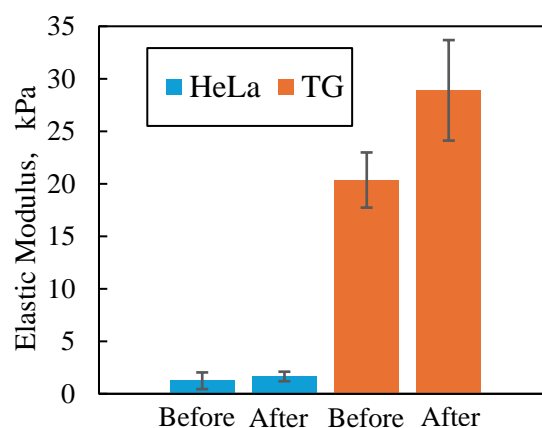


Fig.1 Averaged elastic modulus of before and after the friction test

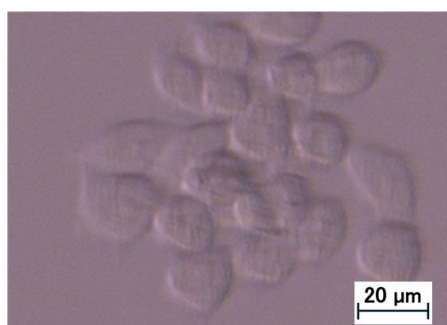


Fig. 2 Image of HeLa before irradiation

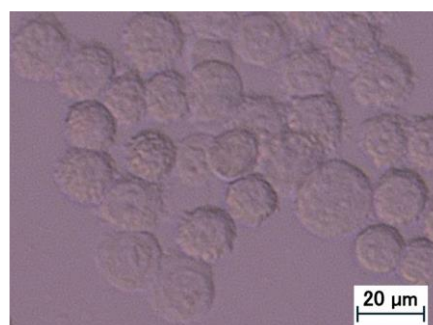


Fig. 3 Image of HeLa after 3 hours irradiation

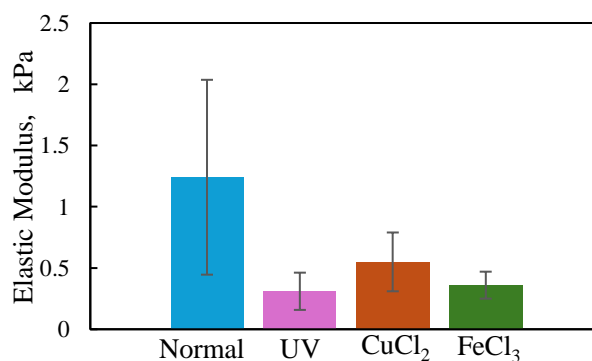


Fig. 4 Elastic modulus of dead cells

4. 考察

4.1 摩擦刺激による影響

細胞の機械的強度を担う細胞骨格タンパク質の一つとして、細胞内にはアクチンフィラメントというタンパク質の重合体が存在する。先行研究により、細胞に機械的刺激が加わると、Fig. 5 のように新たなアクチンフィラメントの重合反応が生じること、アクチンの重合が起きる際には細胞膜が伸び細胞膜張力が増加すること、細胞の弾性率は細胞膜の張力に依存することが報告されている¹⁾²⁾³⁾。本実験においては、摩擦により細胞の弾性率が増加することが確認された。これは、機械的刺激の一種である摩擦によってアクチンの重合反応が生じたことで、細胞膜の伸長と細胞膜の張力増加が発生したためと考えられる。

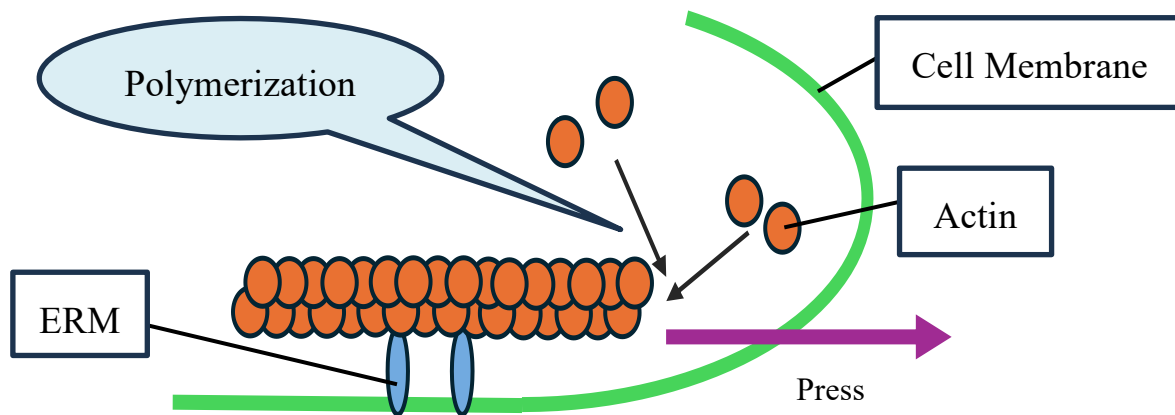


Fig.5 Increased cell membrane tension due to actin polymerization

4.2 紫外線照射による影響

癌細胞の紫外線による影響は二種類あることが報告されており、波長 222 nm の遠紫外線を照射すると、細胞が膨張し細胞膜に傷害が生じて細胞死を誘導する。一方、波長 260 nm の深紫外線を照射すると、細胞は凝集し、DNA 障害を起こしてアポトーシスにいたると報告されている⁴⁾。本実験では、Fig. 2, Fig. 3 の結果より、細胞膜の表面画像に変化が現れた。このことは、312 nm の紫外線照射により細胞膜に損傷が起きたことを示唆している。また、その細胞膜への損傷により弾性率が低くなり、細胞死が誘導されたと考えられる。

5. 結言

摩擦刺激および紫外線照射試験による子宮頸癌細胞の弾性率への影響を、AFM を用いて調査した結果以下の知見を得た。

- (1) 摩擦刺激により、HeLa 細胞および TG 細胞の弾性率が上昇することが確認された。この原因は、細胞への機械的刺激により新たなアクチン重合が促され、細胞膜の張力が増加したためと考えられる。
- (2) 312 nm の紫外線を 3 時間照射したところ、HeLa 細胞表面に変化が現れ、弾性率が低下した。この原因としては、紫外線による細胞膜傷害の可能性が考えられる。

文献

- 1) K. Tsujita, R. Satow, S. Asada, Y. Nakamura, L. Arnes, K. Sako, Y. Fujita, K. Fukami & T. Itoh: Homeostatic membrane tension constrains cancer cell dissemination by counteracting BAR protein assembly, *Nature Communications*, 12, 1 (2021) 5930.
- 2) C. Higashida, T. Kiuchi, H. Mizuno, M. Maruoka, S. Narumiya, K. Mizuno, N. Watanabe: F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins, *Nature Cell Biology*, 15, 4(2013), 395–405.
- 3) K. Tsujita, T. Takenawa, T. Itoh: Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-bending proteins organizes cell polarity during leading edge formation, *Nature Cell Biology*, 17, 6 (2015), 749-758.
- 4) J. Nishikawa, Y. Tamura, T. Fujii, S. Fukuda, S. Yoneda, N. Yamaura, S. Takahashi, T. Yamamoto, J. Nojima, Y. Suehiro, T. Yamasaki, T. Takami: Far-Ultraviolet Light at 222 nm Affects Membrane Integrity in Monolayered DLD1 Colon Cancer Cells, *International J of Molecular Sciences*, 25, 13 (2024), 7051.