

水晶振動子マイクロバランス法を用いた がん細胞に対するマイトマシNCの抗がん作用の解析

Analysis of cancer cells cell responses to mitomycin C
using quartz crystal microbalance method

龍 昊

指導教員 杉山 友康, 研究協力者 村松 宏, 山口 響

東京工科大学 応用生物学部 バイオ情報メディア研究科 機能性RNA 工学研究室

キーワード: 水晶振動子, 共振周波数, マイトマイシンC, シスプラチン, ヒト HepG2 細胞

要旨

1. はじめに

細胞はヒトの生涯を通じて、多くの内外のストレス要因に曝されることで、その機能や形態に恒常的な変化が生じることがある。代表的な変化として細胞がん化や細胞老化があり、老化細胞は特有の形態変化、例えば肥大化や扁平化といった変貌を遂げる。これらの変化は、細胞の内部構造、特に細胞骨格の変動や、各種の生物分子の活動の減少に起因すると考えられている。一方、がん化細胞（がん細胞）は不死化能力を獲得する。ヒトは老化細胞やがん細胞を排除する仕組みを持っているが、そこから免れた細胞は周辺の正常細胞に影響しながら組織をしだいに変質させて、腫瘍をはじめとする様々な病態を作り出す。

抗がん剤はがん細胞増殖を抑制して死に至らしめ、腫瘍を縮小させることができる。多くの抗がん剤が開発されているが、十分な効果が得られない腫瘍も多種あり、新しい薬剤の創製は課題となっている。新しく作った低分子化合物や、ペプチドや核酸などの中分子および新しい抗体などの高分子はその候補とし期待されている。探索のための評価方法も新しい評価視点を導入することは有用と考えられている。

水晶振動子センサーは、極めて微細な質量変化

を検出できるデバイスであり、生細胞の形態変化や質量変化をリアルタイムで評価する手段として注目を浴びている。特に、H. Muramatsuらの研究によれば(H. Muramatsuら、Analytical Chemistry, pp. 7907-7914, 2020)、このセンサーを利用することで、抗がん剤の作用と細胞の反応を非常に高い精度で評価することが可能である。このセンサーは、細胞が薬物や外部からの刺激にどのように反応するか、そしてどの程度の形態変化を遂げるかを、共振周波数や共振抵抗の変動として読み取ることができる。これにより、例えば薬物の研究開発の際に、その効果や安全性をより早期に、かつ詳細に評価することが期待されている。

細胞の老化や形態変化を正確に評価し、それをもとに新しい治療法や薬物を開発するための技術は、今後の生命科学や医療の進展において欠かせないものとなるであろう。そこで本研究は、抗がん剤でがん細胞が死ぬ過程の画像と水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法で得られる共振周波数を同時に取得して解析し、細胞の変化を評価することを目的とした。

2. 方法

ヒト肝癌細胞 HepG2 細胞はコラーゲンコートした培養ディッシュで培養液 (DMEM 高グルコース培

地;5%牛血清;ペニシリン/ストレプトマイシン)で維持、培養した。HepG2細胞の顕微鏡画像を評価して抗がん剤(シスプラチンとマイトマシNC)の最適濃度を求めた。マイトマシNCの溶解液に含まれるエチレングリコールとエタノールは細胞への影響も同様に評価した。次に水晶振動子センサー測定装置(図1)でHepG2細胞を5日間培養した。マイトマシNCに対する細胞応答はQCM法による共振周波数をリアルタイムに計測して、その処理濃度と処理時間の影響を解析した。死細胞をPI溶液で染色した。PI溶液を細胞への影響を培養実験で測定した。

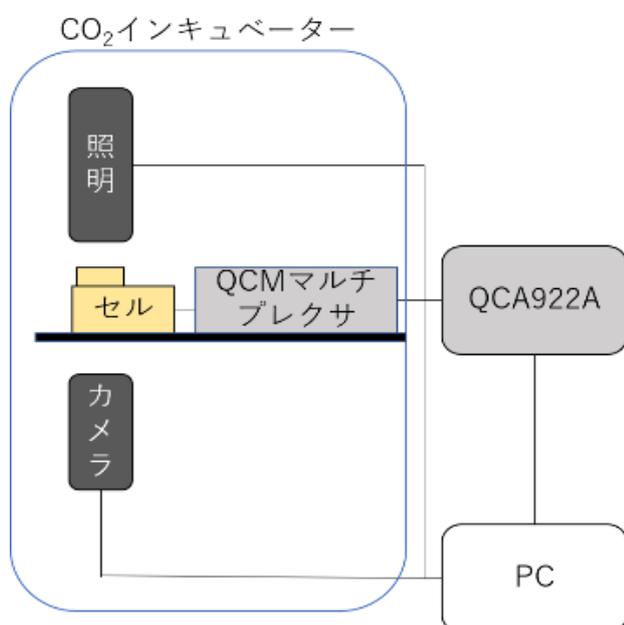


図1 水晶振動子センサー測定装置のイメージ図

3. 結果と考察

HepG2細胞を高濃度から低濃度のシスプラチン8日間処理した結果、HepG2細胞に対するシスプラチンの最適濃度は $1.2\mu\text{M}$ ~ $3.7\mu\text{M}$ であった。次に高濃度から低濃度のマイトマシNC6日間処理した結果、HepG2細胞に対するマイトマシNCの最適濃度は $1.6\mu\text{M}$ ~ $0.1\mu\text{M}$ であった。水晶振動子センサー測定装置で測定する時はこの濃度範囲で行った。水晶振動子センサーを用いて5日間にわたりHepG2細胞の増殖を測定した。その際、センサーが示す共振周波数の変化と、同時に撮影したカメラ

の写真との間に一致性が見られた。この結果は、センサーが細胞の増殖を正確に反映していることを示している。また、マイトマシNCを $30\mu\text{M}$ から $100\mu\text{M}$ の濃度で添加すると細胞は急速に萎縮したが、エチレングリコールとエタノールを同濃度で添加しても、細胞の萎縮や死滅は確認されなかった。これは、マイトマシNCのみがHepG2細胞に強い影響を及ぼすことを示している。MMCの濃度上昇に伴って、死細胞が増加し、作用時間も短縮された。さらに、長時間のMMC処理により細胞の接着力が低下する現象が確認された。一方、PI溶液での培養中に死細胞が次第に出現することから、PI溶液自体にも細胞への影響があることが示唆された。