

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12138

研究課題名(和文)免疫細胞における時空間情報処理特性の解析

研究課題名(英文)Analysis of spatio-temporal information processing in immune cells

研究代表者

澤井 哲(Sawai, Satoshi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：20500367

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、免疫細胞の移動を決定する、複雑な外部環境の時空間的情報処理の理解を目的とした。時空間的に変化する誘引分子fMLPの濃度プロファイルにたいして、好中球様細胞HL60がどのように応答するかを、微小流路系を用いた勾配形成とその操作によって、おもにライブセルイメージングを中心に解析した。その結果、HL60細胞はfMLP濃度上昇にたいして大きな変化を示し、濃度減少にたいして小さな変化を示すこと、同様の応答の非対称性がCdc42の一過的な活性変化でみられることが明らかになった。こうした特性は、免疫監視における細胞遊走の働きとその仕組みの理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文):The project aimed to understand cellular sensory perception of migrating immune cells with an emphasis on spatio-temporal dynamics. Microfluidics gradient chamber was employed to generate a bell-shaped gradient, and by precise flow control, it was propagated in space at a specified speed. We found that neutrophil-like HL60 cells exhibit specific and asymmetric migratory patterns depending on the spatio-temporal property of the imposed dynamic gradients. We analyzed spatio-temporal dynamics of the major signaling components relative to the observed migratory response by employing live cell time lapse imaging of cells expressing FRET-sensors and other fluorescent marker proteins. The obtained signaling response suggests close relation between the observed migratory behavior and the spatio-temporal property of the signaling activities.

研究分野：定量生物学

キーワード：走化性 免疫細胞 数理モデル 生命情報

1. 研究開始当初の背景

細胞の両端におけるケモカインの濃度差が0.4%ほどあれば、リンパ細胞は高濃度側にたいする正の走性を示す。これは信号の検出についての物理限界を一見すると越えている。また、組織内の免疫細胞の遊走は動きと間変化によっても運動が変調される。これらの情報処理特性は、複雑な環境下で目的の細胞や組織に正確に到達することに深く結びついていると考えられる。代表者の研究より、粘菌の先端形成に微分回路と整流回路としての特性があることが明らかになった。こうした信号処理は、ゆらぐ環境から必要な情報だけを読み取るためのカットオフフィルターの役割を果たすと考えられ、また細胞の方向検出機構の基本的なしくみから出現すると考えられるため、細胞性粘菌と同様に早く動く免疫細胞の特性について多くの予想を与えている。

2. 研究の目的

免疫細胞の移動、停止、浸潤を決定する細胞外要因は複雑であり、組織内の他の細胞を足場とする空間の中で、運動を誘引する液性因子(自由に拡散するもの)、接着因子が不均一に分布している。そのような状況下で、免疫細胞は極めて精度の高い情報処理をおこないつながら、免疫監視過程を担っている。本研究では、複雑な外部環境の時空間的情報処理の理解にむけて、代表者が粘菌で進展させてきた、微小流路と層流を利用した動的刺激系、ライブセルイメージング解析、数理モデル解析のアプローチと、分担者らが培ってきた免疫細胞運動についての知見とノウハウを融合させて、免疫細胞の運動方向がいかに決定しているかに挑む。

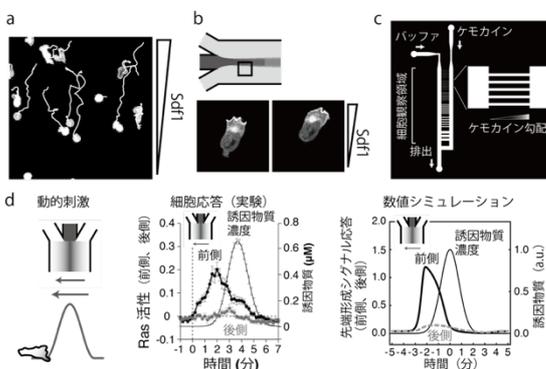


図1 微小流路内のケモカイン(Sdf1)勾配に対するBa/f3細胞の一方向的動き。a)細胞の軌跡。b)勾配形成の層流系と細胞先端におけるRap1 GDS (RBD)-GFPの局在(Rap1の活性)。c)新規に作成する微小流路系のデザイン。d)粘菌における動的刺激への勾配検出応答の解析

3. 研究の方法

微小流路系を用いた勾配形成によって、ケモカイン刺激を高い精度で時空間的に変動、配置し、免疫細胞の運動と、先端形成に主要な役割を果たしているシグナルの活性化動態を生細胞測定から定量的に解析する。細胞の移動によって生じる、刺激の時間的変動の効果にも着目し、実験解析データと、フィードフォワード型反応ネットワークから予想されるシグナル応答特性とを、数値シミュレーションと理論解析から比較検証する。細胞先端形成シグナルが出現する方向、タイミング、リズムが、動的勾配の変化時間や離散パターンの間隔・異方性によって、いかに影響を受けるかに注目して解析し、免疫細胞の信号処理特性を特徴づける。

4. 研究成果

微小流路系を用いた勾配形成によって、ケモカイン刺激を高い精度で時空間的に変動、配置し、免疫細胞の運動と、先端形成に主要な役割を果たしているシグナルの活性化動態を生細胞測定から定量的に解析した。具体的には、微小流路系を用いた勾配形成によって、ケモカイン刺激を高い精度で時空間的に変動させ、ヒト好中球様HL60細胞並びにマウスproB細胞様BAF細胞の運動を定量的に解析した。微小流路は代表者らがこれまで用いてきた流路と、狭い組織内環境を模擬するために低い天井高の観察領域流路を二層のPDMSによって実現した改良型(図1)を用い、チャンバー内をフィブロネクチンでコートし、細胞を接着させ、精密な圧力制御によって変動させる勾配刺激のもと、先端形成の生細胞イメージングをおこなった。HL60にはケモカインとしてfMLP(細菌が産生するペプチド)を、Ba/f3にはSDF1を用い、刺激の可視化のためにはフルオセインまたはAlexaを用いた。

当初はHL60のBa/f3細胞の両方を用いていたが、運動がより顕著なHL60を対象をしばって解析を進めた。HL60細胞はfMLPの波の前側では前進する運動を示すものの、後ろではターニング運動を示さないこと、この選択的な応答には伝搬速度依存性が認められた。このほかにも、谷型の刺激、上昇する波フロント、現象する負の波フロントにたいする重心移動の解析をおこなった。得られた結果の特性は、代表者が細胞性粘菌でこれまでに明らかにしている、時間変化応答性から説明できるが、極性が強く残る記憶ともいえる性質の関与も疑われた。微小管の阻害剤やRockの阻害剤などによって、この極性の記憶への影響の解析を進めた。

PI3キナーゼの活性化をAkt/PKBのPHドメインとGFP, RFPの融合タンパクの膜への移動

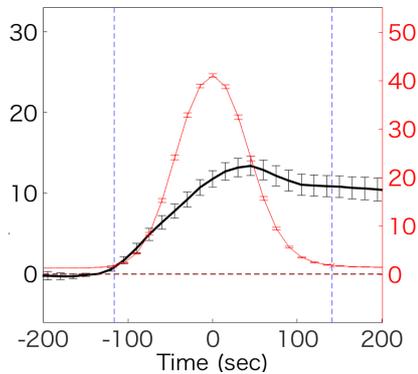
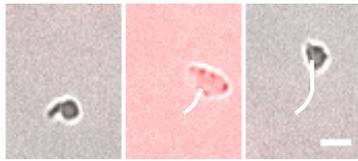


図2 一山形の進行波刺激にたいする HL60 細胞の応答。(上パネル) 細胞の代表的なスナップショット(グレースケール:透過光と赤:Alexa 蛍光像のマージ像) 黒重心の変位 赤: fMLP 濃度。

として検出するセルラインを作出し、Cdc42, PI3K, Rac, Rho の活性を測定するための FRET 蛍光プローブを発現する HL60 の安定株を作出し、動的勾配に対する走化性におけるこれらの分子活性の役割について解析を進めた。特に動きとの相関が強かった Cdc42-Raichu (FRET 蛍光プローブ) を発現する安定株を用い、fMLP 濃度の時間変動に対する Cdc42 活性と RhoA 活性についてライブセルイメージングを中心に解析を進めた。また、ROCK の阻害剤である Y27632 処理下における Cdc42 活性を解析した。その結果、HL60 細胞では Cdc42 の適応的な応答があること、その応答が fMLP の濃度上昇にたいして大きな変化を示し、濃度減少にたいして小さな変化を示すこと、さらに、このことと進行波刺激への応答を総合すると、過渡的な Cdc42 活性の上昇による先端形成機構の存在が強く示唆された。また、ROCK 阻害などの薬理実験から、極性による履歴効果と、時間的な応答は競合的に働くことが予想される。

好中球細胞の走化性においては、古くから時間応答性の関与が示唆されてきたが、本研究によってそれが初めて具体的に示された。こうした特性は、これまでほとんど知られておらず、免疫監視における細胞遊走の働きとその仕組みの理解に、今後つながることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①K. Kamino, Y. Kondo, A. Nakajima, M. Honda-Kitahara, K. Kaneko, S. Sawai, “Fold-change detection and scale-invariance of cell-cell signaling in social amoeba” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114(21): E4149-E4157. (2017) 査読有, DOI: 10.1073/pnas.1702181114

② A. Nakajima, M. Ishida, T. Fujimori, Y. Wakamoto, S. Sawai, “The Microfluidic lighthouse: an omnidirectional gradient generator” Lab Chip 16, 4382-4394. (2016) 査読有, DOI: 10.1039/C6LC00898D

[学会発表] (計 18 件)

①澤井 哲, 自然科学研究機構新分野創成センター合同シンポジウム『分野横断・分野融合研究による生命創成を探究する新しい科学の創成』, 「動く細胞の情報処理特性の理解に向けて」2018年3月15日. 招待講演 (自然科学研究機構生理学研究所)

②石田 元彦, 新学術領域「数理シグナル」第2回公開シンポジウム 若手研究交流会, 「変動する誘引物質濃度勾配への好中球様 HL60 細胞の追従性能の解析」 2018年2月10日 ポスター発表 (東京大学医科学研究所)

③石田 元彦, 第55回日本生物物理学会年会 “Chemotactic analysis of neutrophil-like HL60 cells based on cells’ persistent polarity and immediate responsiveness to chemoattractant.” 2017年9月19日 口頭発表 (熊本大学黒髪北地区)

サブシンポジウム, 「走化性細胞遊走の時空間情報処理特性」 2017年9月8日. 招待講演 (武蔵野大学有明キャンパス)

⑤石田 元彦, 新学術領域「数理シグナル」第1回 若手ワークショップ, 「動的な誘引場における好中球様 HL60 細胞の走化性解析」 2017年8月6-8日 口頭発表 (ラフォーレ修善寺)

⑥石田 元彦, 新学術領域「数理シグナル」若手研究交流会, 「進行波刺激に対する HL60 細胞の応答解析」 2017年6月20日 ポスター発表 (東京大学医科学研究所)

⑦澤井 哲, International Symposium of the origin of life – synergy among the RNA, protein and lipid worlds, “Spatio-temporal constraints on cellular sensing: what it means for universal biology” 2017年5月30日 招待講演 (Graduate School of Mathematical Sciences, Tokyo Univ., Tokyo, Japan)

- ⑧澤井 哲, JST ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト第 4 回 ERATO 学術セミナー, 「細胞性粘菌にみる微生物の集団性・振動、波、走化性」2017 年 2 月 6 日. 招待講演 (筑波大学 総合研究棟)
- ⑨石田元彦, 定量生物の会第 8 回年会「時空間的に変化する誘引物質場における好中球様 HL60 細胞の走化性運動の解析」2017 年 1 月 8-9 日. ポスター発表 (岡崎コンファレンスセンター)
- ⑩澤井 哲, 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム「シグナル伝達における時間情報のコーディングシステム」, 「走化性における適応応答依存的な時間情報コーディング(2AS15-5)」2016 年 12 月 1 日. 招待講演 (パシフィコ横浜)
- ⑪石田元彦, 生物物理学会第 54 回年会「ライブセルイメージングと薬剤実験に基づく動的な誘引物質勾配場における HL60 細胞の走化性運動の解析」2016 年 11 月 27 日. 口頭発表 (つくば国際会議場)
- ⑫Satoshi Sawai, The 26th IUPAP International conference on Statistical Physics (STATPhys26), “Microfluidic analysis of collective cell migration during contact-following in Dictyostelium” 2016 年 7 月 21 日. 招待講演 (Palais des Palais des Congres, Lyon, France)
- ⑬澤井 哲, 第 68 回日本細胞生物学会年会 ミニシンポジウム, “Microfluidic analysis of persistence and reorientation of cell migration during contact-following in Dictyostelium” 2016 年 6 月 16 日. 招待講演 (京都テルサ)
- ⑭Akihiko Nakajima, 4th Annual Winter Q-Bio Meeting, “Delineating temporal and spatial aspects of directional sensing in migrating cells” 2016 年 2 月 17 日. 口頭発表 (Oahu – Sheraton Waikiki, Hawaii)
- ⑮澤井 哲, 定量生物学の会シンポジウム, “Revisiting directional migration mechanisms of crawling cells” 2016 年 1 月 10 日. 招待講演 (東京大学生産技術研究所)
- ⑯石田元彦, 定量生物学の会シンポジウム, “Asymmetric chemotaxis response of neutrophil-like HL60 cells to temporally increasing / decreasing fMLP gradient stimulus” 2016 年 1 月 9-10 日 ポスター発表 (東京大学生産技術研究所)
- ⑰石田元彦, BMB2015 「動的な fMLP 勾配刺激にたいする好中球様 HL60 細胞の走化性応答」2015 年 12 月 3 日. 口頭発表 (神戸ポ

ートアイランド)

- ⑱ Akihiko Nakajima, ICSB2015, “Dissecting temporal and spatial information for direction sensing in migrating cells” 2015 年 11 月 24 日. 招待講演 (Biopolis, Singapore)

[図書] (計 4 件)

- ①石原秀至 澤井 哲「細胞内反応場のゆらぎと細胞運動」物理科学雑誌パリティ『特集 ゆらぎと構造からみる非平衡の世界』32 (11) p.22-25. 丸善出版 (2017)
- ②澤井 哲「時空間的なシグナルの検出とは何か —這いまわる細胞の走化性を例に」実験医学増刊『生命科学で使えるはじめての数理モデルとシミュレーション』35(5) (鈴木 貴、久保田浩行 編) p.195-199. 羊土社 (2017)
- ③中島昭彦 石原秀至 澤井 哲「動く細胞が読み取る時間と空間：走化性のパラドクスと整流作用」生物物理学会誌 56(2)p.98-101. 生物物理学会 (2016) (カバーイラスト)
- ④ Akihiko Nakajima & Satoshi Sawai Dissecting Spatial and Temporal Sensing in Dictyostelium Chemotaxis Using a Wave Gradient Generator in Chemotaxis: Methods and Protocols 2nd Ed. (ed. Dale Hereld, Tian Jin) Methods in Molecular Biology 1407, 107-122. Springer (2016)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：流体流制御装置及び流体流制御方法
 発明者：澤井 哲、中島昭彦
 権利者：国立大学法人 東京大学
 種類：特許
 番号：特許願 2016-087745
 出願年月日：2016 年 4 月 26 日
 国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://sawailab.c.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤井 哲 (SAWAI, Satoshi)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：20500367

(2) 研究分担者

片桐 晃子 (KATAGIRI, Kouko)

北里大学・理学部・教授

研究者番号： 00322157

木梨 達雄 (KINASHI, Tatsuo)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：30202039