

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15010

研究課題名(和文) 超解像顕微鏡を用いた細胞の力学量測定法の確立

研究課題名(英文) Measurements of cellular mechanics using super resolution microscope

研究代表者

水谷 武臣 (MIZUTANI, TAKEOMI)

北海道大学・先端生命科学研究院・助教

研究者番号：40451405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞群が器官などの3次元形態を形成する過程では、個々の細胞がランダムに移動するのではなく、決まった方向に細胞集団で運動(協調的運動)する必要がある。本研究では、細胞集団が協調的に運動する際の力学情報と生化学情報を計測することで、細胞集団の運動機構の一端を明らかにした。細胞集団が協調的な運動を行うためには、細胞間の接着が重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：During the generation of organs, cells should migrate not in a random walk but in a directional mode (collective migration). In this project, we measured mechanical and biochemical information within collective cell migration, and revealed an aspect of the mechanism of collective migration. As a result, we found that cell-cell junction is essential for the collective migration.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞運動 力学 共同現象

### 1. 研究開始当初の背景

細胞群が器官などの3次元形態を形成する過程では、個々の細胞がランダムに移動するのではなく、決まった方向に細胞集団で運動(協調的運動)する必要があります。協調的に運動するためには、運動方向をそろえるための因子が必要です。因子の候補として、ケモカインの濃度勾配のような生化学要因と、細胞が出す「力」やそれに伴う「歪」といった物理学要因が考えられます。逆遺伝学的解析により重要な分子の同定は進んできておりますが、複雑な3次元臓器の形成では、生化学因子の濃度勾配を形成するのが困難であるため、これだけで説明出来ない現象が多く残されています。物理学要因については、測定の高難度から立ち遅れているのが現状です。

### 2. 研究の目的

本研究では、協調運動を引き起こす新規の生化学要因を同定します。更には、多細胞システムにおける「細胞 - 基質間」、「細胞 - 細胞間」の力学量を測定する新規手法を開発することで、協調運動における物理学要因の解明に迫ります。

### 3. 研究の方法

細胞集団による協調運動への生化学要因と物理学要因の影響を明らかにするために、協調運動のモデル細胞株(イヌ腎由来上皮細胞MDCK)を用いました。細胞間接着タンパク質の発現を抑制した状況で、運動における協調性的変化を計測することで、協調運動に關与する生化学要因を探索しました。ゲル上に培養した細胞集団が出す力の空間分布を計測することで細胞 - 基質間の力学情報を取得し、細胞の力と細胞運動の方向との対応関係を計測しました。また、シングルセルでの細胞運動に關与するとの報告がある Rac1 と呼ばれるタンパク質の活性と細胞集団の運動、細胞の力との関係性を観察しました。更には、細胞間接着タンパク質を超解像度顕微鏡で観察することにより、細胞 - 細胞間の力学情報を計測しました。

### 4. 研究成果

細胞集団内での Rac1 活性化の局在を観察するために、Rac1 が活性化すると Fluorescence resonance energy transfer (FRET) 効率が変化するプローブ(Raichu-Rac1)を恒常発現する細胞株を樹立しました。この細胞株をコラーゲンゲル上に播種し、細胞集団から成る一つのコロニーが運動する際の Rac1 の活性と細胞の力の変化を計測しました(図1)。およそ20細胞から成るコロニーに対して、3分間での細胞の動きを解析しました(A)。コロニー内の領域毎の移動速度を白矢印の方向と大きさで表しています。特定の領域で顕著な運動が観察されました。更に、Rac1 の活性を FRET 効率から評価しました(B)。高活性の

個所を赤、低活性の場所を青で表しています。コロニー内で数か所ほど高活性のドメインが観察され、その多くは細胞の移動が大きい箇所と対応していました(Bの白円)。次に、3分間でのコラーゲンゲルに発生した変形(C)から細胞が出す力の変化を評価しました(D)。力の空間分布は、(A)内の破線で囲われた領域と対応しています。細胞の動きと力の間には、大きさ向き共に、顕著な相関が見出されませんでした。その一方で、コロニー内で Rac1 が高活性の箇所では、細胞が大きく移動することが明らかになりました。

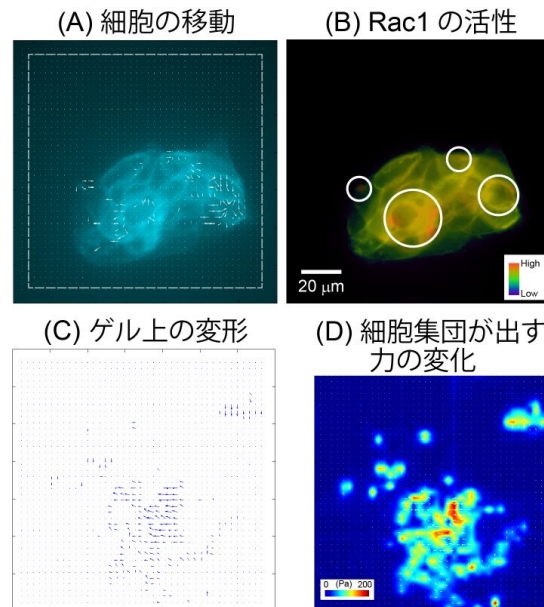


図1 細胞集団の運動における生化学因子と力学因子の計測例

次に、細胞 - 細胞間接着タンパク質の発現を抑制し、細胞集団の運動における協調性的変化を計測しました。細胞 - 細胞間には、アドヘレンスジャンクションやタイトジャンクションと呼ばれる接着構造体が存在します。それらを構成するタンパク質の発現を抑制することで、どの接着構造体が集団運動に重要なのかを調べました。図2にアドヘレンスジャンクションを構成するタンパク質の発現抑制の例を示します。

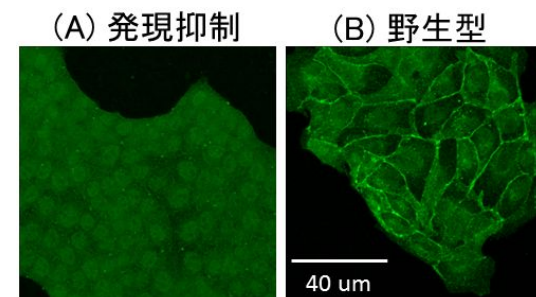


図2 細胞 - 細胞間接着タンパク質の発現抑制の一例

発現抑制細胞をサブクローンしたのち、標的タンパク質特異的な抗体を用いて免疫蛍光染色を行いました。野生型の細胞株では細胞-細胞間に発現したタンパク質のシグナルが存在していますが、発現抑制させた株では細胞間のシグナルが消失していることが分かります。標的タンパク質を幾つか選定して発現抑制株を作製しました。それらを培養皿の上で培養し、細胞集団が運動する様子を光学顕微鏡でタイムラプス観察しました。各細胞の運動の軌跡から、相互相関係数を算出しました(図3)。その結果、アドヘレンスジャンクションが協調的な運動に重要であることが明らかとなりました。

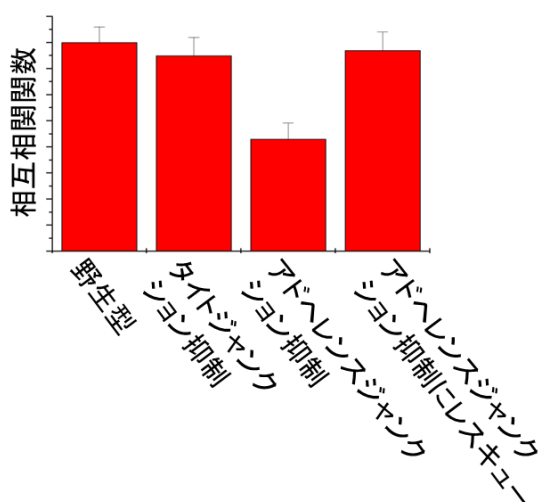


図3 細胞間接着タンパク質の発現抑制にもなう細胞運動の協調性の変化

次に、細胞集団のコロニーが協調的に運動する際の細胞-細胞間接着構造を超解像度顕微鏡で観察しました。協調運動の先頭付近の細胞間では、接着構造が大きく変形しているのに対して、後方付近では、変形がそれほど大きくないことが明らかとなりました。

#### 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 7 件)

Takeomi Mizutani, Hisashi Haga, Kazushige Kawabata: Data set for comparison of cellular dynamics between human AAVS1 locus-modified and wild-type cells, *Data in Brief*, 査読有, Vol. 6, 2016, pp. 793-798.  
DOI: 10.1016/j.dib.2015.12.053

Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Naoki Sasaki: Development of the evaluation system for barrier functions of engineered epithelial lumens,

*Regenerative Therapy*, 査読有, Vol. 3, 2016, pp. 82-89.

DOI: 10.1016/j.reth.2016.02.010

Takeomi Mizutani, Kazuya Furusawa, Hisashi Haga, Kazushige Kawabata: Heterogeneous Filament Network Formation by Myosin Light Chain Isoforms Effects on Contractile Energy Output of Single Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells, *Regenerative Therapy*, 査読有, Vol.3, 2016, pp. 90-96.  
DOI: 10.1016/j.reth.2016.02.009

Takeomi Mizutani, Rui Li, Hisashi Haga, Kazushige Kawabata, Transgene Integration into the Human AAVS1 Locus Enhances Myosin II-Dependent Contractile Force by Reducing Expression of Myosin Binding Subunit 85, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, Vol. 465 No. 2, 2015, pp. 270-274.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.018

Akihiro Nukuda, Chie Sasaki, Seiichiro Ishihara, Takeomi Mizutani, Kiminori Nakamura, Tokiyoshi Ayabe, Kazushige Kawabata, Hisashi Haga: Stiff Substrates Increase YAP-Signaling-Mediated Matrix Metalloproteinase-7 Expression, *Oncogenesis*, 査読有, Vol. 4, 2015, pp. e165.  
DOI: 10.1038/oncsis.2015.24

Misako Imai, Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, Hisashi Haga: Three-dimensional morphogenesis of MDCK cells induced by cellular contractile forces on a viscous substrate, *Scientific Reports*, 査読有, Vol. 5, 2015, pp. 14208.  
DOI: 10.1038/srep14208

Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Hiromi Machino, Saki Yahata, Akimasa Fukui, and Naoki Sasaki: Application of multichannel collagen gels in construction of epithelial lumen-like engineered tissues, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 査読有, Vol. 1, No. 7, 2015, pp. 539-548.  
DOI: 10.1021/acsbomaterials.5b00003

[学会発表](計 5 件)

Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata: Roles of adherence junction proteins in the collective cell movement in vitro and vivo, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年 11 月 26 日, つくば国際会議場(茨城県つ

くば市)

水谷 武臣、川端 和重: 細胞、多細胞集団、個体での細胞の運動と力学量制御, 第 27 回バイオフロンティア講演会, 2016 年 10 月 22 日, 北海道大学(北海道札幌市)

Takeomi Mizutani, Hisashi Haga, Kazushige Kawabata: 多細胞の協同運動における力学量の計測と制御, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 13 日, 金沢大学(石川県金沢市)

水谷 武臣、李 瑞、芳賀 永、川端 和重: 細胞の力学計測と応用展開, 細胞運動研究会, 2015 年 9 月 4 日, 北海道大学(北海道札幌市)

水谷 武臣: 力学計測による細胞運動へのアプローチと応用展開, 第 17 回次世代医工学研究会, 2015 年 7 月 30 日, 登別プリンスホテル石水亭(北海道登別市)

〔図書〕(計 1 件)

水谷 武臣、コロナ社、「3次元化細胞の力学」細胞社会学、2016、pp. 50-62

〔その他〕

ホームページ等

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g3/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水谷 武臣 (MIZUTANI TAKEOMI)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・助教

研究者番号: 40451405