

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0104

研究課題名(和文)細胞集団が微小環境の広さと硬さを検知する機構の解明

研究課題名(英文) Mechano-pattern induced durotaxis in cranial neural crest migration

研究代表者

栗山 正 (Kuriyama, Sei)

秋田大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30398226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経堤細胞は胚発生期に現れる細胞であり、高い移動能・浸潤能を持ち様々な細胞種へと分化する。ツメガエル頭部神経堤細胞は集団的に移動する。本研究では2種類の硬さの異なる基質の境界に沿った集団移動を見出し、そのメカニズムを明らかにしようとした。神経堤細胞はある条件において集団を解除することなくメカノパターンゲルの上を移動する。既知の移動原理との比較を行い、それらとは異なるメカニズムで制御されている事が分かったが、唯一LPA2シグナル阻害によっては移動が制限された。これによりLPA2が力学的受容に関与している事が示唆された。生体内で同じ原理で移動するかを調べたが、今の所分かっていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

集団的移動は発生でも成体でも観察され様々な役割を果たしている。特にがんの転移などはすでに発生プログラムが終了しているのに炎症などで細胞は誘引されるが足場の有無が重要となる。がんは硬い基質を好むため様々な因子を出して領域を固くして移動を促進すると考えられている。しかし生体内では様々な移動制御機構が関わっているため、未だ力学的な情報の貢献は明らかになっていない。ツメガエルは単純塩緩衝液で培養できるので他の因子の存在無しで移動を解析できる。ツメガエル神経堤細胞の移動の解明を目指して研究を始めたが現在の技術では達成できない問題が見つかりがん細胞を用いて研究を行った。今後は癌で研究を継続する。

研究成果の概要(英文)：Neural crest cells are transient cell types that appear during embryonic development and have a high migratory and invasive capacity, and differentiate into various cell types. African clawed frog cranial neural crest cells migrate in a collective manner. In this study, we found collective migration along the boundary of two differently stiffened substrates (collective durotaxis), and attempted to clarify the mechanism. Neural crest cells migrate straight along the mechanopattern stripes without dissociating the cell adhesions under certain conditions. We compared it with the known neural crest migration principles, and found that only depletion of LPA receptor2 signaling restricted the collective durotaxis. This suggests that LPA2 is involved in mechanosensing. We have investigated whether the same principle is applied in vivo, but so far it is not known.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：メカノタクシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経堤細胞は発生期に現れる一過的な細胞の分化状態であり、間葉系幹細胞のように様々な細胞に分化する。進化的に神経堤細胞の存在自体は広く保存されているものの、発生のバリエーションと相まってそれぞれの神経堤細胞の特徴には大きな違いが見られる。アフリカツメガエルにおいては頭部の神経堤細胞が細胞接着を保ったまま集団で移動することが知られている。研究代表者の過去の研究においてこの集団内の細胞接着は LPA-LPAR2 シグナルによって制御されており、生体内の立体狭窄部において接着分子のターンオーバーが促進されることにより、集団が細胞一つ一つの位置関係を自由に变化させて立体狭窄部をすり抜ける事を見出した (Kuriyama et al., 2014)。細胞集団を分子に見立てると物質が流体 (流動的になる) 状態と似ていた事から組織流動性と呼び、そのコンセプトはがんの転移浸潤にも適用され、集団的に転移するがんの病態を記述するのにも役立った (Kuriyama et al., 2016)。研究開始当初の画像解析などの様々な解像度の問題で A.「組織が流動性を獲得した後に狭窄を通過したのか」あるいは B.「狭窄を通る時に流路を何らかの方法で感知し、その接触点の流動性が変化していくことによって組織が変形する」のかという順序がわからなかった。ここで乗り越えなければ行けない問題が大きく 2 つあった。まずは立体狭窄部に使われた素材が胚の中には無い生理的な硬さを遙かに超える樹脂でできていた事。これにより異物との反応を見ている可能性があった。もう一つは純粋に画像解像度の問題でアクチンの状態変化を示唆するデータがあったがそれを証明する方法がなかった。この 2 点に関してははかかなり前進したと思われる。

2. 研究の目的

生体内集団的細胞遊走の「足場」を細胞から見た空間の「広さ」と「硬さ」の 2 つのパラメーターに絞って「操作する」事を手段とし、細胞が細胞外環境を感知するメカニズムの包括的な理解を目指す。

3. 研究の方法

< 光重合ゼラチンを用いたメカノパターン >

ゼラチン分子に特殊な化学架橋を施したスチレン化ゼラチンという分子と光に反応性がある重合架橋剤を用いて照射する光の強さを変える事でゼラチン基質の硬さを自由に変える技術を開発した九州大学の物質先端研の木戸秋教授とのコラボレーションを行い、細胞外基質の濃度変化がなく、硬さだけが異なるゼラチン基質でできたメカノゲルを神経堤細胞培養に用いた。実験開始当初は硬さが 10~25 kPa のゲルが柔らかいゲル、50~150kPa が中強度、数 100kPa が高強度のゲルであった。後に市販のハイドロゲル (パターンなし) で 0.2kPa~4kPa の硬さのゲルを試した。

さらにこの技術を応用し、光を当てないよう一部マスク (黒塗) された画像をゲル面に投影することで硬さの異なる縞状のゲルを交互に並べたメカノパターンゲルを作成し、この縞の幅や形状、硬さの組み合わせを様々に変える事によって足場を操作し、生体内での挙動と比較した。

< FRET tension sensor 分子を用いた生体内張力の類推 >

アクチンに結合するタンパクであるアクチニンを分割し、EGFP と mCherry 分子をクモの糸の分子構造を参考に作成された弾性リンカー (ばね) で連結しアクチニンに挿入した分子を Actinin-tension sensor (ActTS) と呼ぶ。これを細胞に発現させ、細胞を培養する。細胞基質間接着が強まると細胞内表層近傍にあるアクチンが配向し、アクチニン分子の N 末と C 末が両側に引っ張られる。その時真ん中にある EGFP と mCherry 分子で起こっている励起電子の供与 (FRET) が遮断され FRET 効率が減衰する。この減衰度を調べる事で細胞内にかかる力の大きさを類推できる。研究代表者は ActTS を 肺がん細胞に導入し、生体内がん組織での組織の硬さを調べ、さらに アフリカツメガエル神経堤細胞においても同様の実験を行った。

4. 研究成果

1. 神経堤細胞の集団的弾性応答 (Collective Durotaxis) と既知の移動原理との比較

アフリカツメガエル神経堤細胞はコラーゲン上やゼラチン上では移動が観察されない。このためメカノパターンゲルのスチレン化ゼラチン分子に余っているアミノ基を利用してフィブロネクチンを化学架橋した状態で用いている。フィブロネクチンを架橋した光重合ゼラチンゲルの 10kPa 上では神経堤細胞の塊を置いても集団の移動は観察されない。しかし 25kPa 辺りでは集団が接着を維持したまま移動するのが観察される。50~150kPa の広い範囲で一部が接着を解除して単独の細胞として移動し、一部は集団として移動する事が観察される。そして数 100kPa では細胞は他の硬さにおいては集団を維持しているタイミングで早期に細胞接着を解除して単独の細胞として移動する。

これらの硬さの組み合わせを様々に変更して検討した結果、2 つの領域の差ではなく比が一定の領域にある時に図 1 のような縞に沿った移動が惹起されることが分かった。例えば [295kPa/150kPa] と [150kPa/5kPa] のゲルが

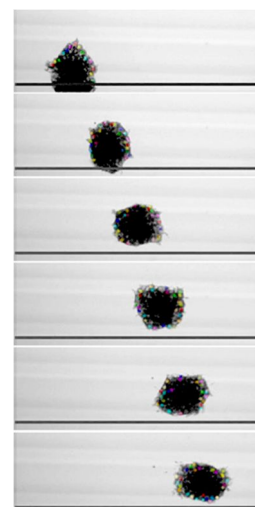


図 1 弾性応答による神経堤集団移動

ある場合、差は共に 145kPa であるが移動が起こるのは後者だけであった。

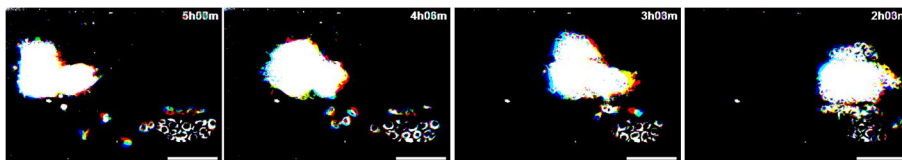


図2 移動(右から左へ) 集団は細胞と同じように挙動する

集団移動中の細胞の挙動を調べるためそれぞれの細胞位置をトラッキングしたが移動方向に対する明確な挙動の変化が見られなかった。そこでタイムラプス画像を RGB のそれぞれのチャンネルに振り分けマージしたところ(+1 frame Blue/0 frame Green/-1 frame Red)、一つの細胞のように進行方向に広く青チャンネルが広がり、後方は細く長く赤の領域ができた。これは細胞が前方にラメリポディアが出来て前進したのち、後方の構造が長く伸長しその後退縮するのによく似ている。つまり集団内は細胞接着を介してつながっており、基質の状態を一つの集団で認識している事が示唆された。またゲル上において各ストライプ内での細胞移動の変化についても解析した。するとストライプのエッジの部分にいる細胞の加速度が周期的に上下することが分かった。側面の細胞突起の伸長と退縮の繰り返しが駆動力になっている可能性も考えられたが、前方向移動へと駆動力が変化する理由を説明するには至っていない。

既知の神経堤細胞移動制御因子との関係について

LPAR2 (Kuriyama et al., 2014)

過去の実験に倣い LPAR2 をロックダウンし、細胞集団の接着を安定化させ組織流動性を抑えた。すると LPAR2(-) 神経堤細胞は移動できなくなった。細胞接着の上昇がメカノセンシングに関わっている可能性、あるいは LPAR2 シグナルが Collective Durotaxis に直接関与している可能性が示唆された。

Contact Inhibition of Locomotion (CIL) (Carmona-Fontaine, et al., 2008)

CIL は集団移動に必要な原理であり、non-canonical Wnt シグナルによって制御されている。ROCK inhibitor である Y27632 を用いて神経堤の CIL をブロックしたが、動きが緩慢になるだけで CD は阻害しなかった。CIL と Collective Durotaxis には関係が無いことが考えられる。

Co-attraction (Co-A) (Carmona-Fontaine, et al., 2011, Szabó et al., 2016)

Co-A は CIL と同じく神経堤細胞の移動原理であり Complement シグナルの断片である C3a とその受容体 C3aR によって起こる。集団同士を引きつけあうシグナルである。一部 Collective Durotaxis を阻害したが正常細胞と同居させると影響を与えなかった事から環境因子として移動を促進しているが必須のシグナルでは無いと考えられた。

N-cadherin (Theveneau et al., 2010, Kuriyama et al., 2014)

N-cadherin は集団移動する神経堤細胞を繋ぐ細胞間接着因子である。N-cadherin の阻害は多くの場合神経堤細胞の移動を阻害する。しかしながら N-cadherin 阻害神経堤細胞は移動を阻害しなかった。またゲルのストライプ上では細胞解離も引き起こさなかった。他の接着分子が働いている可能性がある。

II. 足場の広さ・形と集団移動

ストライプの構成

Soft gel stripe=S 幅 100 μ m, Hard gel stripe=H 幅 60 μ m (S100/H60), H100/S60, H150/S60 を比較した。

H100/S60 のゲルのみが集団移動を惹起し、H150/S60 は若干の移動は引き起こすものの Hard 部分が大きすぎるため方向性を限定することができず結果細胞が全方向に拡散してしまう。奇妙な事にユニフォームな Soft ゲルが集団移動を引き起こすにも関わらず S100/H60 は強く細胞乖離を引き起こした。理由はよく分かっていない。これらの結果から通常の実験において H100 μ m, S 60 μ m となるように実験条件を固定した。

ストライプの形や配置

上記の実験より、集団のストライプ側面にある集団が周期的に運動していることが分かった。このためストライプ自体を並行ではなく片側を引き離していく(ハの字にする)と移動が促進されるのではないかと考えストライプそのものの角度を傾けたがその事による移動の促進は起こらなかった。ストライプの幅を徐々に狭めていくゲルも試したがこれもまた移動を促進しなかった。

以上の事から均一な幅のゲルに接着するとストライプに沿った移動が惹起されるがその幅は細胞 1 つの長軸の最大値と同じ程度のサイズに限られ、ストライプ間の間隔を変えても特に変化がなかったことから立体構造を認識しているのではなく細胞単位の反応が元になっている事が

予想される。生体内にはこのような均一な繰り返し構造が無いためここで見られている Collective Durotaxis は実験系における artifact ではないかと考えられた。また本研究で用いられている光重合ゲルのもっとも柔らかいゲル強度はおよそ 1000 Pa であるが(Barriga et al., 2018)によると生体内の神経堤細胞を取り巻く領域の硬さはおよそ 150 Pa であり、我々が 10 kPa ゲルと 150 kPa ゲルで見ていた移動度の差異は 50 Pa と 150 Pa で観察されている。これらの条件は我々が実験に用いている硬さの誤差範囲に含まれる差であり、生体の反応を再現していない可能性が示唆された。

III. 生体内の硬さを測定する Actinin-Tension sensor probe

実際の生体の硬さの実測値の 1000 倍ほど硬いゲルで観察されていた反応だが、仮説として細胞内に伝わっている張力はゲルの硬さとは直接関係ないのではないかと考えた。そこで細胞内の細胞骨格に結合するアクチニンタンパクを用いた表層アクチンの張力を直接測定し、異なるゲル強度上での張力変化を先に捉え、生体内での張力と比較することで生体内移動に必要な張力変化を明らかにしようと考えた。

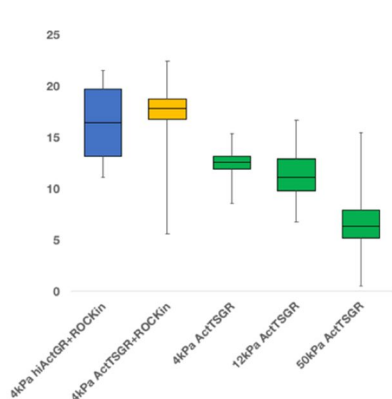


図3 メカノゲル上での弾性応答

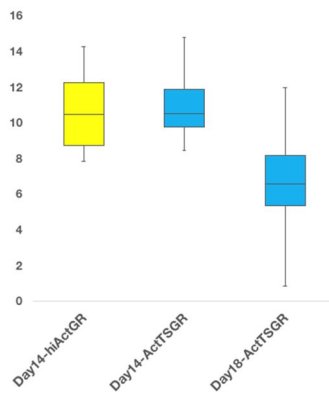


図4 肺組織内での腫瘍の硬さ変化

まず「メカノゲルを物差しにして実際の生体内の硬さを類推することが可能か？」を調べるために ActTS, ポジティブコントロールの hiAct を発現させた肺がん細胞株 A549 を作成し、市販のハイドロゲルで 0.5kPa, 1kPa, 4kPa, 12kPa, 50kPa の上での FRET 効率を測定しプロットした。しかし 0.5kPa, 1kPa においては通常硬い基質の方が張力が高く FRET 効率が低くなるが 0.5kPa における FRET 効率が非常に低かった。これは 0.5kPa ゲルに細胞が接着しにくい事や細胞同士の接着が強く細胞張力が測定しにくい状態にあるなどいくつかの要因があると考えられる。しかし 4kPa~50kPa においては段階的な中央値の減衰が観察された(図3) ROCKinhibitor はアクチンとミオシンの相互作用を遮断し、ActTS の分子が引っ張られる事がなくなるのでほぼ最大値を示す。さらにこの減衰(リニアリティ)が生体内でも保存されていると考えて、肺に ActTS 発現がん細胞を移植し、腫瘍を作らせた。腫瘍の増殖はルシフェラーゼ細胞を混ぜる事でモニタし、同様に移植が成功したマウスを比較のため 14 日目と 18 日目に肺ごと組織を取り出した。凍結切片により肺内の腫瘍の FRET 効率を測定し、その減衰度をメカノゲルと比較して組織の硬化度を類推した。14 日目の組織の硬さは 4kPa 以下、18 日目の組織は 34.3kPa となった。文献をあたったが線維化した肺の硬さを測定した論文は見つからず、乳がん患者の組織を超音波エラストグラフィを用いて測定した腫瘍の硬さの平均値が 33kPa と記載されている事から同ストラテジーで組織内の硬さを類推することは可能であると判断した。

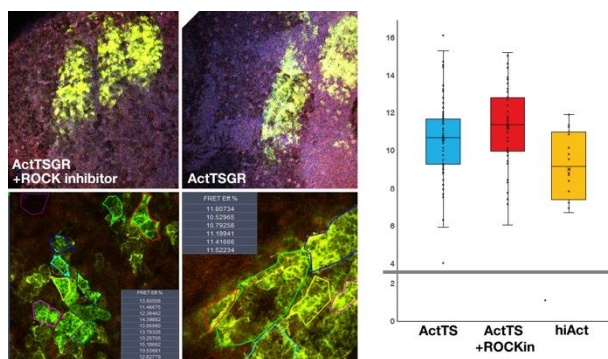


図5 ツメガエル神経堤細胞 FRET (胚内) の結果

アフリカツメガエル胚に ActTSGRmRNA を注射し、蛍光胚から無蛍光胚に神経堤細胞を移植した。(図5)神経堤細胞を移動させた後、胚を固定し頭部の移植側半分をスライドガラスにマウントし神経堤細胞の FRET 解析を行った。その結果、胚全体を ROCKinhibitor で処理し、表面張力を分断した値より ActTS のみの方が少しだけ中央値が下がるという結果になった。これは移動中の神経堤細胞が基質接着をほとんど必要としていないか測定できていない非常に小さな値を取る事が予想される。

FRET 解析の過程で FRET 効率が全体的に減衰し、アクセプターブリーチ (ActTS プローブでは EGFP(緑)から mCherry(赤)へと電子が受け渡される。mCherry に強い励起光を当て蛍光タンパクを破壊すると EGFP から mCherry へと渡っていた電子の分、EGFP の蛍光が強くなる)のブリーチ効率が良くない、あるいはアクチンの解像度が悪いという点を固定法を改善することで解消することができた。しかしながら固定液は除去する必要があり、元々低強度ゲルには細胞がほとんど接着していないため固定液の洗浄プロセスで細胞がダメージを受けデータが取れない事が多い。この点に改良を加えた手法を公開したいと考えている。

結論

アフリカツメガエル頭部神経堤細胞を用いてメカノパターンゲル上での大変興味深い細胞移動様式を発見した。個々の細胞のおおよそ長軸サイズに相当する足場においては継続して集団移動を続ける事が見られたが、集団が空間を認識しているのではなく縞の端を感知して戻るという確率論で決まっていると考えられる。しかし決定的なデータは取れていない。既知の移動制御因子とは並行して移動を制御していると考えられたが、LPA2 だけが Collective Durotaxis にも影響を与えた。LPA2 シグナルが基質接着に与える影響はまだ分かっていない。本研究で ActTS を用いて解析した表層アクチンだけではなく、カドヘリンと会合するアクチンに關与する CadherinTS を用いて調べる必要がある。しかしながらカドヘリンは細胞外基質と直接相關している訳ではないため両方を解析する必要があり、本研究期間中には果たせなかった。本研究で使用した ActTS に用いられている Tension Sensor module は(Cost et al., 2014)によると 1~5 pN の分解能を持っており $1\text{Pa}=1\text{N}/\text{m}^2$ であるから 0.5kPa では神経堤細胞 1 つ ($\sim 2500\mu\text{m}^2$) あたり 0.2pN 相当の力がかかっている事になるが、50 細胞程度のクラスターであれば(1pN)検出できる範囲である。より詳細な解析が必要である。先頭の細胞だけを調べると異なる力学マップがあるかもしれない。集団の中の細胞の FRET 効率を用いて $[(F_{\text{max}}-F_{\text{front}}) * \text{front cell area}] / [(F_{\text{max}}-F_{\text{rear}}) * \text{rear cell area}]$ を求めると前後軸のかかる力の違いを Ratio で算出できる。この時は個々のゲルの基質強度を求める必要が無い。これを移動に Bias が掛かった状態で求めたかったが、ゲルの製法が変わって以来、ゲル上での効率的な集団移動を再現する事が困難になり、研究期間中には達成できなかった。また本研究に用いた肺がん細胞は市販のメカノゲルや光重合ゼラチンの基質強度範囲にマッチしているため本研究で達成できなかった実験を補完できる可能性がある。今後は肺の線維化の系を用いて Collective Durotaxis が生体内で果たす役割について解析していきたい。

文献

- Kuriyama et al., 2014 J Cell Biol doi: 10.1083/jcb.201402093.
Kuriyama et al., 2016 Oncogene doi: 10.1038/onc.2015.155
Carmona-Fontaine et al., 2008 Nature doi: 10.1038/nature07441.
Carmona-Fontaine et al., 2011 Dev Cell doi: 10.1016/j.devcel.2011.10.012
Theveneau et al., 2010 Dev Cell doi: 10.1016/j.devcel.2010.06.012.
Barriga et al., 2018 Nature doi: 10.1038/nature25742
エラストグラフィ徹底解説生体の硬さを画像化する (学研メディカル秀潤社・荒木力 2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Umakoshi M, Takahashi S, Itoh G, Kuriyama S, Sasaki Y, Yanagihara K, Yashiro M, Maeda D, Goto A, Tanaka M.	4. 巻 38(12)
2. 論文標題 Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2162-2176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0564-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimazu K, Inoue M, Sugiyama S, Fukuda K, Yoshida T, Taguchi D, Uehara Y, Kuriyama S, Tanaka M, Miura M, Nanjo H, Iwabuchi Y, Shibata H.	4. 巻 109(10)
2. 論文標題 Curucumin analog, GO-Y078, overcomes resistance to tumor angiogenesis inhibitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3285-3293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13741.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuriyama Sei, Tsuji Tadahiro, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Tanaka Masamitsu	4. 巻 4
2. 論文標題 PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax-Bak hetro-oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 11-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-017-0006-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itoh Go, Ikeda Masanori, Iemura Kenji, Amin Mohammed Abdullahel, Kuriyama Sei, Tanaka Masamitsu, Mizuno Natsuki, Osakada Hiroko, Haraguchi Tokuko, Tanaka Kozo	4. 巻 8
2. 論文標題 Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 00-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22164-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuriyama S, Tsuji T, Sakuma T, Yamamoto T, Tanaka M	4. 巻 4
2. 論文標題 PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax-Bak hetero-oligomerization through interaction with Bid in human colon cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-017-0006-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Itoh G, Ikeda M, Iemura K, Amin MA, Kuriyama S, Tanaka M, Mizuno N, Osakada H, Haraguchi T, Tanaka K	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-22164-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 栗山 正
2. 発表標題 骨肉腫由来細胞株を用いた臓器親和性関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sei Kuriyama
2. 発表標題 PLEKHN1 promotes apoptosis by enhancing Bax/Bak hetero-oligomerization through the interaction with Bid in human colon cancer
3. 学会等名 Cell and Developmental Biology Meeting
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	久保木 タッサニーヤ (Kuboki Tassanya)		
研究協力者	木戸秋 悟 (Kidoaki Satoru)		