

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06200

研究課題名(和文) 正常線維芽細胞の強固な方向持続的遊走を可能にする分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanism that enables robust directional migration of normal fibroblasts

研究代表者

高橋 正行 (Takahashi, Masayuki)

北海道大学・理学研究院・特任教授

研究者番号：50241295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞がシャーレー杯に増殖したコンフルエントという状態になると、「細胞遊走の接触阻害」という現象によって、細胞の遊走が停止する。正常線維芽細胞は、この状態において他の細胞と接触しているにもかかわらず、巧みにすれ違いながらまっすぐ遊走し続ける。正常線維芽細胞のこの強固な方向持続的遊走の分子メカニズムを明らかにするべく、細胞骨格と細胞間接着構造に注目し研究を進めた。正常線維芽細胞は、コンフルエント状態において、整列した細胞同士が主に触れ合う細胞の側面間で強い細胞間接着構造を形成しないこと、ミオシンIIというタンパク質が細胞側面で高度に活性化し側面からの細胞の伸展を妨げていること等を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、正常線維芽細胞が、コンフルエント状態においても強固に方向を持続した遊走を可能にする分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。本研究成果が、細胞集団内での細胞間のコミュニケーションや細胞の運動様式を制御する新たな分子基盤の発見につながることを期待される。傷ができた際に、多数の線維芽細胞が傷口に集まりコラーゲンなどの細胞外マトリックス成分を分泌し傷を修復するが、本研究成果が、将来、新しい観点からの創傷治癒の薬剤の開発につながることも期待される。

研究成果の概要(英文)：When cells reach a state of confluence in a culture dish, cell migration is stopped by a phenomenon called "contact inhibition of locomotion". Normal fibroblast cells can continue to migrate straight, smartly passing each other, even though they are in contact with other cells in the confluent state. To clarify the molecular mechanism of this persistent directional migration of normal fibroblast cells, we focused on the organization of the cytoskeleton and intercellular adhesion structure. We found that normal fibroblast cells did not form a rigid adhesive structure on the lateral sides where cells come into contact with each other in an aligned confluent state. We also found that myosin II proteins were highly activated on the lateral sides of the cell to prevent protrusion formation from there.

研究分野：生物化学

キーワード：細胞遊走 線維芽細胞 細胞骨格 接着斑 細胞間接着 ミオシンII

1. 研究開始当初の背景

細胞遊走は、胚発生、免疫応答、創傷治癒等において見られる基本的生命現象である。前後方向の極性が生じた後、アクチン骨格や微小管等の細胞骨格が適切な場所で形成されることにより細胞の遊走が可能となる。細胞遊走研究のモデル細胞として広く用いられるガン細胞(U-2 OS等)や不死化した線維芽細胞(MEF, NIH-3T3等)は培養中によく遊走するが、その遊走方向を頻繁に変える。これに対し、正常線維芽細胞は、一度遊走方向が決まると長時間にわたってその方向を維持することができることを見出した^[1]。

遊走している細胞同士が接触した場合、一旦その方向への遊走を停止したあと、お互いに遠ざかるうとして遊走方向を変える。これは細胞遊走の接触阻害(Contact inhibition of locomotion: CIL)と呼ばれる現象で、ニワトリ胎児心臓由来の培養線維芽細胞において発見された^[2]。70年近くも前に見出された現象であるものの、その分子メカニズムは未だ明らかにされていない。最近、生体内において、特に発生段階で、実際にCILが起きていることが報告され、その重要性が再認識され始めている^[3]。

我々は、ヒト胎児肺由来の線維芽細胞(MRC-5, TIG-1, WI-38等)を用いて、正常線維芽細胞の遊走の分子メカニズムに関する研究を行なっている過程で、不死化した線維芽細胞(ヒト胎児肺由来の線維芽細胞のSV40 transformant, MEF, NIH-3T3等)はコンフルエント時にcontact inhibition of locomotion (CIL)により遊走が停止するのに対し、正常線維芽細胞はコンフルエント状態になっても遊走を停止せず、巧みにすれ違いながら動き続けられることに気がついた。正常線維芽細胞は、コンフルエント時も遊走の方向持続性を維持し続ける、すなわち、強固に前後方向の極性を維持して遊走することができ、コンフルエント時のCILを克服している可能性がある。正常線維芽細胞のこの性質は不死化やガン化によって失われるので、生理的に重要であることが予想されるが、これまでほとんど注目されてこなかった。コンフルエント状態における正常線維芽細胞のすれ違い遊走の分子基盤を研究することにより、細胞集団の新たな運動様式を発見できる可能性があり、さらに、不死化やガン化でその運動制御が失われている原因を明らかにすることで、細胞遊走の観点からガン化の分子メカニズムに迫れるのではと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

正常線維芽細胞は一度遊走方向が決まると長時間にわたってその方向を維持することができる。さらに、遊走が停止していると考えられていたコンフルエント状態においてもこの性質は維持され、正常線維芽細胞は巧みにすれ違いながら動き続けられる。各細胞の周囲すべてが他の細胞と接触しているにもかかわらず遊走を続けるという挙動は、従来のCILの概念では説明がつかない。正常線維芽細胞の強固な方向持続的遊走には、細胞骨格、細胞間接着、細胞極性関連タンパク質等の多くの因子が関与すると予想される。本研究では、その中で特に細胞骨格関連タンパク質に注目することにした。方向持続的遊走に関与する分子群を同定し、その分子メカニズムの全体像を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

正常線維芽細胞としてヒト胎児肺由来のWI-38細胞とTIG-1細胞を用いた。不死化線維芽細胞としてWI-38細胞のSV40-トランスフォーマントのWI-38 VA13細胞株(VA13細胞)を用いた。これらの細胞はJCRB細胞バンクより入手した。細胞の整列の程度は、ImageJを用いて、位相差像のFFT処理、および核の配向度を解析することで評価した。

細胞骨格画分は、当研究室で確立したSERCYF法^[4]を用いて調製した。得られたタンパク質のLC/MS/MS解析による同定は、北海道大学グローバルファシリティセンター・オープンファシリティ部門にて行なった。

免疫蛍光染色像の観察は、Olympus 社の正立型顕微鏡 BX50WI、冷却 CCD カメラ DP70、対物レンズ UPlanApo 20×/0.70、UPlanApo 60×/0.70 を用いて行なった。タイムラプス観察は、Olympus 社の倒立型顕微鏡 IX71、冷却 CCD カメラ DP70 および DP73、対物レンズ UPlanApo 10×/0.30 を用いて行なった。画像解析は ImageJ を用いて行った。

4. 研究成果

(1) WI-38 細胞を用いて、細胞配向 wound healing assay を行った。スクラッチ面に対して垂直に配向した WI-38 細胞集団はスクラッチ面に侵入するが、スクラッチ面に対して平行に配向した WI-38 細胞集団は元の遊走方向を維持し続けて、スクラッチ面に侵入しないことを確認した。これは、細胞の側面において細胞同士が接触しているものの、CIL が起こっていないことを示唆する結果である。スクラッチ面に対して平行に配向した状態の細胞集団に Rho-kinase の阻害剤である Y-27632 を添加し、ミオシン II の調節軽鎖 (RLC) のリン酸化 (活性化) を阻害すると、スクラッチ面に面している細胞側面から仮足が形成し、スクラッチ面に向かって遊走し始めることがわかった。リン酸化 RLC 特異的抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、Y-27632 を添加した状態では、RLC が二重リン酸化されて特に活性化されているミオシン II がほとんど消失することがわかった。以上の結果から、正常線維芽細胞の方向持続的遊走において、ミオシン II が細胞の側面において高い活性化状態になり、そこから仮足が進展することを抑えることが重要である可能性が示唆された。

(2) WI-38 細胞とその不死化細胞株の WI-38 VA13 細胞 (VA13 細胞) の細胞骨格画分をそれぞれ分画し、LC/MS/MS 解析によってタンパク質の同定・比較定量を行なった結果、細胞骨格と細胞接着にかかわる多くのタンパク質が不死化によって減少することがわかった。不死化で減少する上位 48 種には、細胞骨格や接着に関わるタンパク質 17 種、細胞外マトリックス関連タンパク質 4 種、細胞膜関連タンパク質 10 種、その他に核内のタンパク質 17 種などが含まれていた。なお、VA13 細胞において WI-38 細胞よりも存在量が多い細胞骨格タンパク質はみられなかった。同定されたタンパク質から WI-38 細胞において VA13 細胞よりも 10 倍以上の存在量であった細胞骨格タンパク質は、上位から LMO7、カルボニン 2、セプチン 9、CKAP5、タリン 1、ピンキュリン、ミオシン IIA、セプチン 2、カルボニン 3 である。

(3) 上記の解析で細胞骨格画分における存在量が最も異なった LIM domain only protein 7 (LMO7) に注目した。LMO7 の VA13 細胞の細胞骨格画分における存在量は、WI-38 細胞の約 80 分の 1 しかなかった。LMO7 は上皮細胞において、アクチン細胞骨格に局在しアクチン細胞骨格と細胞間接着因子を結びつける役割を示すことが報告されているが、線維芽細胞における機能に関する報告はこれまでにない。また、ヒトの肺腺癌において発現量が減少していることも報告され、LMO7 は正常線維芽細胞において重要な機能をもつ可能性があると考えた。

特異的 siRNA を用いて WI-38 細胞の LMO7 の発現をノックダウンすると、VA13 細胞に似た楕円状の形態を示すように変化した。この傾向は、継代数の多い比較的細胞老化が進んだ細胞で顕著だった。正常線維芽細胞が遊走する際に前方が広がった扇型の形態になる。この極性をもった形態を顕著に示す正常線維芽細胞の TIG-1 細胞を用いて LMO7 特異的抗体によって免疫蛍光染色を行ったところ、遊走時の細胞の後方 (特に細胞周縁部) に形成するストレスファイバーに LMO7 が局在することがわかった。この局在はミオシン IIB のものと酷似していた。TIG-1 細胞の LMO7 をノックダウンすると、細胞の前後方向の形態の極性は減少し、ミオシン IIB の後方への偏った局在が見られなくなった。我々はミオシン IIB が細胞後方のアクチン細胞骨格を維持して正常線維芽細胞の方向持続的な遊走に関与していることを

報告しているが^[1]、これらの結果から、LMO7 もミオシン IIB と同様な機能を有している可能性が考えられる。

次に、LMO7 の正常線維芽細胞の遊走挙動における役割をタイムラプス観察により解析した。TIG-1 細胞は、培養基質としてフィブロネクチンをコーティングした場合、LMO7 をロックダウンしても遊走することができるが、poly-L-リジンをコーティングした場合は遊走能力が失われることがわかった。これらの結果から、正常線維芽細胞の遊走には足場としてフィブロネクチンが必要であり、LMO7 はフィブロネクチンの発現、または細胞外への分泌に関与していることが示唆された。これらの結果は、アクチン細胞骨格の細胞外基質形成に関する新たな研究の展開につながる可能性がある。

(4) 正常線維芽細胞は、細胞同士が正面から接触した際に、細胞遊走の接触阻害 (CIL) によって遊走方向を反転させるが、側面で接触した際には、お互いに離れようとはするが、できるだけ遊走方向を維持しようとし方向を反転することはないように見える。この現象には、細胞どうしが接触する部分の構造が需要であると考え、WI-38 細胞と VA13 細胞の細胞間接着構造を比較解析した。VA13 細胞の細胞集団の細胞が接触している部位においては、カドヘリンと β -カテニンが集積したジッパー状の細胞間接着構造がランダムに形成されることがわかった。ここにはピンキュリンも局在することから、これは比較的強い接着構造であることが予想される。一方、WI-38 細胞のコンフルエント状態では、ジッパー状の細胞間接着構造は細胞の前方と後方の接触部位にのみ形成され、整列した細胞どうしが主に触れ合う細胞の側面間では形成されていないことがわかった。WI-38 細胞の側面では、 β -カテニンがアクチンフィラメントと共に線状の局在を示した。そこにはカドヘリンとピンキュリンは集積を示さなかったことから、側面では強い細胞間接着構造は形成されていないことが予想される。この前後方向と側方で異なる細胞間接着構造の形成が、正常線維芽細胞のコンフルエント状態におけるすれ違い遊走に関与している可能性が考えられる (図 1)。

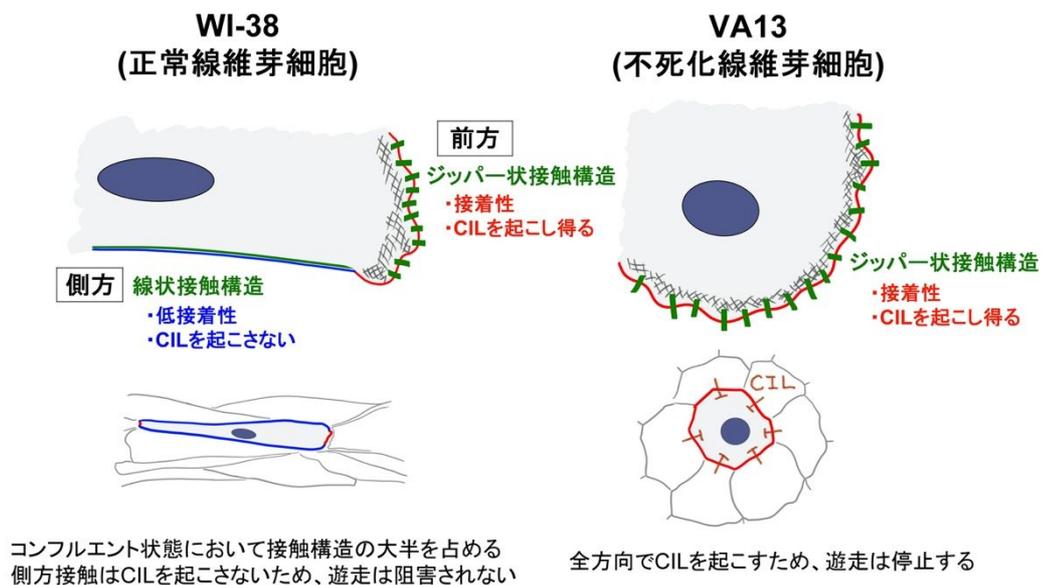


図 1

(5) 正常線維芽細胞は、培養ディッシュ内で増殖しコンフルエント状態に近づくにつれて、次第に細胞同士が整列するようになる。この整列には細胞が遊走する過程が必要と考えていたが、WI-38 細胞をはじめから高密度でまき直した場合でも、24 時間後には細胞が整列することを見出した。WI-38 細胞は、まき直し直後には円板状に伸展し、不死化線維芽細胞と同様に敷石状でコンフルエントになった。その後、細胞形態に極性が生じ、整列し始めるとほぼ同時にすれ違い

遊走を開始した。この結果は、すれ違い遊走を可能にする細胞の整列に遊走過程は必須ではなく、正常線維芽細胞がもともと持っている極性化の能力が関与していることを示している。

細胞を低密度でまき直して、整列してコンフルエントに達するためには3～5日間ほどかかり、薬剤による阻害実験や siRNA によるノックダウン実験を行いにくい状態だったが、高密度でまいてから整列する過程に対する影響を見ることで、このような解析が可能になる。この実験系で EGTA を添加し細胞外の Ca^{2+} 濃度を低下させて細胞の整列に対する影響を解析したところ、WI-38 細胞は整列できなくなることがわかった。一方で、細胞がコンフルエント状態で整列した後に EGTA を添加した場合は、細胞はすれ違い遊走を行えることがわかった。これらの結果は、カドヘリン分子間の結合は細胞同士が整列する過程では必要であるが、整列後のすれ違い遊走には関与していないことを示唆している。

本研究によって、正常線維芽細胞が強固に方向を持続した遊走をすることを可能にする分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。コンフルエント状態において、整列した細胞どうしが触れ合う細胞の側面間で強い細胞間接着構造が形成されていないということを示す可能性を見出したことによって、細胞集団内での細胞間のコミュニケーションや細胞の運動様式を制御する新たな分子基盤の発見につながることを期待される。

<引用文献>

1. M. Kuragano, Y. Murakami, and M. Takahashi. Nonmuscle myosin IIA and IIB differentially contribute to intrinsic and directed migration of human embryonic lung fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 498, 25-31 (2018).
2. M. Abercrombie and J.E.M. Heaysman. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture: I. Speed of movement of chick heart fibroblasts in relation to their mutual contacts. *Exp. Cell Res.* 5, 111-131 (1953).
3. B. Stramer and R. Mayor. Mechanism and in vivo functions of contact inhibition of locomotion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 43-55 (2017).
4. Y. Sato, Y. Murakami, and M. Takahashi. Semi-retentive cytoskeletal fractionation (SERCYF): a novel method for the biochemical analysis of the organization of microtubule and actin cytoskeleton networks. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488, 614-620 (2017).

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 0件）

1. 著者名 Kuragano, M., Murakami, Y., Takahashi, M.	4. 巻 498
2. 論文標題 Nonmuscle myosin IIA and IIB differentially contribute to intrinsic and directed migration of human embryonic lung fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 25-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.02.171	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 Kuragano, M., Uyeda, T. Q. P., Kamiyo, K., Murakami, Y., Takahashi, M.	4. 巻 29
2. 論文標題 Different contributions of nonmuscle myosin IIA and IIB to the organization of stress fiber subtypes in fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 911-922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E17-04-0215	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 Islam, Md. J., Matsuo, K., Menezes, H. M., Takahashi, M., Nakagawa, H., Kakugo, A., Sada, K., Tamaoki, N.	4. 巻 17
2. 論文標題 Substrate selectivity and its mechanistic insight of the photo-responsive non-nucleoside triphosphate for myosin and kinesin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 53-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C8OB02714E	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 Yamamoto, K., Otomo, K., Nemoto, T., Ishihara, S., Haga, H., Nagasaki, A., Murakami, Y., Takahashi, M.	4. 巻 376
2. 論文標題 Differential contributions of nonmuscle myosin IIA and IIB to cytokinesis in human immortalized fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 67-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2019.01.020	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 Sato Y., Kamijo K., Tsutsumi M., Murakami Y., Takahashi M.	4. 巻 167
2. 論文標題 Nonmuscle myosin IIA and IIB differently suppress microtubule growth to stabilize cell morphology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 25 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz082	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 Saito, T., Huang, W., Matsui, T. S., Kuragano, M., Takahashi, M., Deguchi, S.	4. 巻 20
2. 論文標題 What factors determine the number of nonmuscle myosin II in the sarcomeric unit of stress fibers?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomechanics and Modeling in Mechanobiology	6. 最初と最後の頁 155-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10237-020-01375-8	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤勇太, 上条桂樹, 堤元佐, 村上洋太, 高橋正行
2. 発表標題 Nonmuscle myosin IIA and IIB regulate microtubule growth dynamics via different effects on actin dynamics
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 傳庄夏代, 佐藤勇太, 村上洋太, 高橋正行
2. 発表標題 神経突起形成におけるミオシンIIBの役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 文 太彦, 二見 統, 村上 洋太, 高橋 正行
2. 発表標題 正常線維芽細胞の細胞遊走におけるLIM domain only 7の役割
3. 学会等名 第20回 細胞運動系研究交流セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 一輝, 二見 統, 村上 洋太, 高橋正行
2. 発表標題 正常線維芽細胞の細胞遊走におけるTalin-1とTalin-2の役割
3. 学会等名 第20回 細胞運動系研究交流セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 傳庄 夏代, 佐藤 勇太, 村上 洋太, 高橋正行
2. 発表標題 神経細胞の突起形成におけるミオシンII Bの役割
3. 学会等名 第20回 細胞運動系研究交流セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤勇太, 上条桂樹, 堤元佐, 村上洋太, 高橋正行
2. 発表標題 ミオシンIIアイソフォーム特異的な微小管伸長の抑制制御と細胞形態安定化への関与
3. 学会等名 第14回 細胞運動研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto Kei, Otomo Kohei, Nemoto Tomomi, Ishihara Seiichiro, Haga Hisashi, Murakami Yota, Takahashi Masayuki
2. 発表標題 Differential function of myosin IIA and IIB in cytokinesis of human immortalized fibroblasts
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato Yuta, Kamijo Keiju, Murakami Yota, Takahashi Masayuki
2. 発表標題 Nonmuscle myosin II suppresses microtubule growth by supporting actin polymerization
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本啓, 大友康平, 根本知己, 石原誠一郎, 芳賀永, 長崎晃, 村上洋太, 高橋 正行
2. 発表標題 ヒト不死化線維芽細胞の細胞質分裂におけるミオシンIIA, IIBの機能解析
3. 学会等名 第19回細胞運動系研究交流セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 植村康平, 倉賀野正弘, 村上洋太, 高橋正行
2. 発表標題 Actin capにおけるミオシンIIのリン酸化状態の解析
3. 学会等名 第19回細胞運動系研究交流セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田敦郎, 倉賀野正弘, 村上洋太, 高橋正行
2. 発表標題 Myosin IIB モータードメインを用いた細胞内張力負荷領域プローブの作製
3. 学会等名 第19回細胞運動系研究交流セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本啓, 大友康平, 根本知己, 石原誠一郎, 芳賀永, 村上洋太, 高橋正行
2. 発表標題 ヒト不死化線維芽細胞の細胞質分裂におけるミオシンIIA, IIBの機能解析
3. 学会等名 第8回物質・デバイス領域共同研究拠点活動報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本啓, 大友康平, 根本知己, 石原誠一郎, 芳賀永, 長崎晃, 村上洋太, 高橋正行
2. 発表標題 細胞分裂過程の形態変化におけるミオシンIIA, IIBの機能解析
3. 学会等名 第13回細胞運動研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二見統, 村上洋太, 高橋正行
2. 発表標題 正常および不死化線維芽細胞間で存在量の異なる細胞骨格因子の探索
3. 学会等名 平成30年度北大細胞生物研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西 克弥、石原 誠一郎、高橋 正行、芳賀 永
2. 発表標題 基質の硬さ依存的なアポトーシス抑制機構：2重リン酸化ミオシン調節軽鎖の核局在を介した制御
3. 学会等名 2020年度 生物物理学会学会 北海道支部 - 東北支部合同例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西 克弥、石原 誠一郎、高橋 正行、芳賀 永
2. 発表標題 基質の硬さ依存的に核局在する2重リン酸化ミオシン調節軽鎖
3. 学会等名 第5回 日本メカノバイオロジー学会学術総会
4. 発表年 2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関