

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16127

研究課題名（和文）「力」と「組織の硬さ」に着目した樹状細胞の走化性の分子機構の解明

研究課題名（英文）The molecular mechanism of dendritic cell chemotaxis focused on traction force and tissue stiffness

研究代表者

馬場 健太郎（Kentarou, Baba）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：80836693

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：樹状細胞は誘引物質（CCL19など）に向かって移動する（走化性移動）。しかしながら、樹状細胞の走化性移動機構はよく解っていない。本研究では、樹状細胞においてshootin1bがアクチン線維と細胞接着分子L1の間を連結するクラッチ分子として機能し走化性移動のための推進力の発生に関与することが証明された。また、コラーゲンの硬さに応じて樹状細胞の移動様式が変化することが示され、そして、shootin1bが生体組織内の樹状細胞移動に関与することが解った。本研究により、shootin1bを介した樹状細胞の走化性移動機構を発見することができ、この発見は細胞の走化性の新たな理解に繋がることを期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫応答の誘導のためには樹状細胞の走化性が重要であり、樹状細胞の走化性の破綻は、病原体感染の抵抗力減少といった免疫応答の障害を引き起こす（Ato M et al., J. Immunol. 2006）。本研究成果は樹状細胞の走化性機構の理解を深めるだけでなく、免疫応答の障害の原因解明にも貢献し、人々の疾病予防にも寄与する可能性がある。また、走化性は神経回路形成や上皮組織修復、個体発生など様々な生命機能に関わる。本研究によりshootin1bを介した走化性機構を発見した。この発見は樹状細胞の走化性を研究する分野だけでなく、細胞生物学、神経科学、発生生物学の分野において学術的波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Dendritic cell has chemotaxis for chemical attractant such as CCL19. Dendritic cell migrates toward CCL19 source side. However, the clutch molecule-mediated molecular mechanism of dendritic cell chemotaxis is not well understood. In this study, we found that shootin1b functions as a clutch molecule which couples retrograde flow actin filaments with cell adhesion molecule L1 to produce traction force for CCL19-toward chemotactic migration. And we found that the dendritic cell migration mode is changed in response to soft collagen gel and hard collagen gel, and then we found that shootin1b is involved in the dendritic cell migration from lymph duct into lymph node in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：走化性 細胞移動 樹状細胞 アクチン クラッチ分子 細胞接着分子 免疫 コラーゲン

### 1. 研究開始当初の背景

免疫細胞の一種である樹状細胞は体内に侵入した細菌やウイルスなどの病原体を取り込んだ後、様々な組織の中を通過してリンパ節へと移動し T 細胞へ病原体の抗原を提示する。これにより T 細胞による病原体排除のための免疫応答が誘導される (Worbs T *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* 2016)。組織の硬さは幅広く、脳などの軟らかい組織 (約 0.1 kPa) から皮膚 (約 1 kPa) や筋肉 (10 kPa 以上) などのように硬い組織までである (Cox TR and Erler JT, *Dis. Model Mech.* 2011; Ghosh D and Dawson M, *Adv. Med. Biol.* 2018)。そのため、免疫応答を誘導するためには樹状細胞が様々な硬さの組織の中を移動する必要がある。また、樹状細胞の移動の走性の一つとして走化性があり、その一例として樹状細胞は誘引物質 CCL19 の濃度の高い側へ移動する (走化性移動)。

神経細胞の軸索伸長や細胞移動のための推進力の発生には、アクチン線維および細胞接着分子と相互作用するクラッチ分子が中心的な役割を果たし、クラッチ分子を介した細胞移動のモデルが提案されている (図 1) (Mitchison T and Kirschner M, *Neuron.* 1988)。このモデルでは、細胞の先端端においてクラッチ分子が、重合・脱重合を繰り返すアクチン線維の逆行性の動きを細胞接着分子を介して細胞外基質に伝えることで、細胞移動のための推進力を生み出す。先行研究により、クラッチ分子の候補である talin や、その talin と結合する細胞接着分子 integrin をノックアウトしても樹状細胞の移動速度が野生型に比べて変化がないことが報告された (Lämmermann T *et al.*, *Nature.* 2008)。そのため、樹状細胞の走化性に関与するクラッチ分子は未だ不明であり、樹状細胞がいかんして走化性のための力を生み出し、様々な硬さの組織の中を移動するのか、その仕組みはよく解っていない。そこで本研究では、樹状細胞の走化性に重要なクラッチ分子を同定し「力」と「組織の硬さ」の 2 つの視点からクラッチ分子を介した樹状細胞の走化性の分子機構を明らかにすることを目指した。

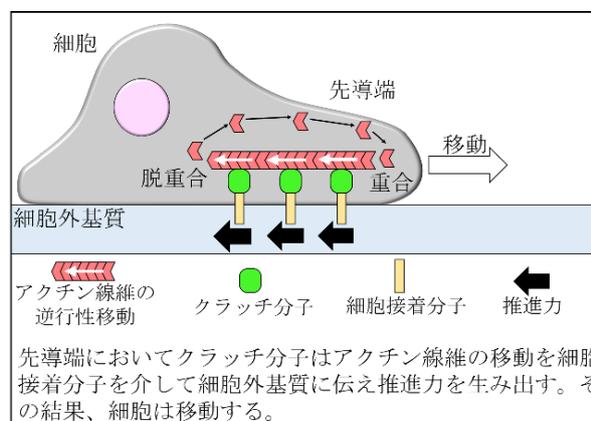


図 1. クラッチ分子の役割

### 2. 研究の目的

これまでに申請者らは、軸索伸長や軸索の走化性 (軸索ガイダンス) の分子機構を解析してきた。shootin1a が cortactin を介してアクチン線維と相互作用し、shootin1a が逆行性アクチン線維と細胞接着分子 L1 の間を連結するクラッチ分子であることを報告した (Kubo Y *et al.*, *J. Cell Biol.* 2015; Baba K *et al.*, *eLife.* 2018)。また、細胞外の誘引物質 netrin-1 の僅かな濃度勾配により軸索先端の shootin1a が非対称にリン酸化され、このリン酸化された shootin1a が軸索伸長の方向を転換させるための推進力の発生に関与することを明らかにし、shootin1a が軸索の走化性に重要なクラッチ分子として機能することを証明した (Baba K *et al.*, *eLife.* 2018) さらに、shootin1a のスプライシングバリエント shootin1b が樹状細胞に発現することが解った。shootin1b が樹状細胞のクラッチ分子として機能し走化性移動のための推進力を生み出す可能性がある。そこで、本研究では、shootin1b が樹状細胞においてクラッチ分子として機能するかを検証し「力」と「組織の硬さ」の 2 つの視点からクラッチ分子を介した樹状細胞の走化性の分子機構を明らかにすることを目的とした

### 3. 研究の方法

樹状細胞の破碎液を用いた免疫共沈降法では、我々の研究室により作製された shootin1b 抗体により破碎液中の shootin1b を沈降させ、shootin1b と相互作用する cortactin と細胞接着分子 L1 の検出を行った。1 分子イメージングでは、アクチン線維の逆行性移動を可視化するために、アクチン分子 (actin) と蛍光分子 Halotag を融合した Halotag-actin を樹状細胞に遺伝子導入し蛍光観察を行った。樹状細胞は拡散性の誘引物質 CCL19 の濃度の高い方向へと移動する (走化性移動)。そこで、CCL19 の濃度勾配を形成するデバイスにコラーゲンゲルと共に樹状細胞を培養し、CCL19 に向かう樹状細胞の移動速度を測定した。さらに、樹状細胞の走化性移動の際に発生する推進力を測定するために、蛍光ナノビーズを包埋したポリアクリルアミドゲル上で樹状細胞を培養し、細胞の先端領域直下のビーズの動きを解析した。ビーズの移動度とポリアクリルアミドゲルの硬さから推進力を算出した (Toriyama M *et al.*, *Curr. Biol.* 2013)。樹状細胞はリンパ管を通りリンパ節へと移動する。そこで、リンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動を解析した。蛍光色素でラベルした樹状細胞の懸濁液を注射針でマウスの足の裏のリンパ管に注入した。24 時間後にリンパ節を採取し、リンパ節内の樹状細胞の数を測定した。コラーゲンゲルと

組織の硬さの測定では、コラーゲン濃度 (mg/mL) を調整しコラーゲンを作製した後、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いてコラーゲンの硬さを測定した。また、硬さを測定する組織の例として、樹状細胞の走化性移動が行われるリンパ節組織に焦点を絞り、マウスから採取したリンパ節の硬さを AFM で測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 樹状細胞において shootin1b はアクチン線維結合分子 cortactin および細胞接着分子 L1 と相互作用しクラッチ分子として機能する：

Shootin1b がアクチン線維と細胞接着分子 L1 の間を連結し走化性移動のための推進力を生み出すならば、樹状細胞において shootin1b がアクチン線維結合分子 cortactin と細胞接着分子 L1 と相互作用する可能性がある。これを検証するために、樹状細胞の破碎液を用いて免疫共沈降法を行った。その結果、shootin1b と共に沈降した cortactin と L1 が検出された。この結果から、樹状細胞において shootin1b は cortactin および L1 と相互作用することが示された。また、クラッチ分子を介したアクチン線維と細胞接着分子の連結を阻害した場合、アクチン線維の移動が空回りし、アクチン線維の移動速度が上昇することが報告されている (Baba K *et al.*, *eLife*. 2018)。そこで、内在性の shootin1b と L1 の連結 (相互作用) を阻害する shootin1b 変異体を作成した (図 2)。この変異体を樹状細胞に発現させ、Halotag-actin の 1 分子イメージングを行った。その結果、shootin1b 変異体が発現する樹状細胞ではアクチン線維の移動が空回りし、コントロール細胞と比べてアクチン線維の移動速度が上昇することが解った (図 2)。以上の結果から、shootin1b は cortactin を介してアクチン線維と相互作用し、shootin1b が逆行性アクチン線維と細胞接着分子 L1 の間を連結するクラッチ分子として機能することが示唆された。

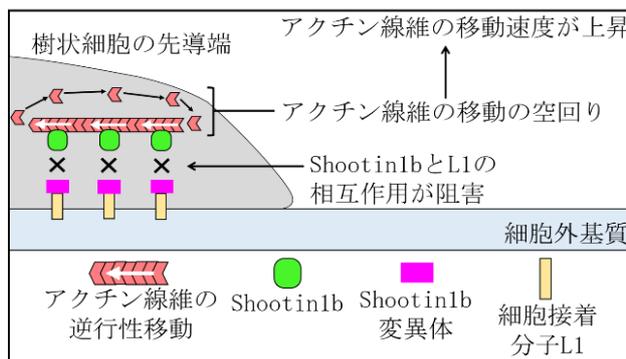


図 2. Shootin1b と L1 の相互作用の阻害

##### (2) Shootin1b は樹状細胞の走化性移動や走化性移動のための推進力の発生に関与する：

Shootin1b が逆行性アクチン線維と細胞接着分子 L1 の間を連結するクラッチ分子として機能することが示唆された。そこで、shootin1b が走化性移動や走化性移動のための推進力の発生に関与するかどうかを検証した。具体的には、CCL19 の濃度勾配を形成するデバイスに、野生型樹状細胞または、shootin1b 遺伝子欠損樹状細胞 (ノックアウト細胞) を 1.5 mg/mL 濃度のコラーゲンゲルと共に培養し、CCL19 の濃度の高い方に向かう樹状細胞の移動速度を測定した。その結果、野生型細胞と比べてノックアウト細胞の移動速度が減少することが解った (図 3)。また、走化性移動のための推進力を測定するために、蛍光ナノビーズを包埋したポリアクリルアミドゲル上に野生型細胞またはノックアウト細胞を接着させた後、細胞をコラーゲンゲルで覆い、移動のための推進力を算出した。その結果、野生型細胞と比べてノックアウト細胞の推進力が減少することが解った。以上の結果から、shootin1b が走化性移動や走化性移動のための推進力の発生に関与することが示唆された。

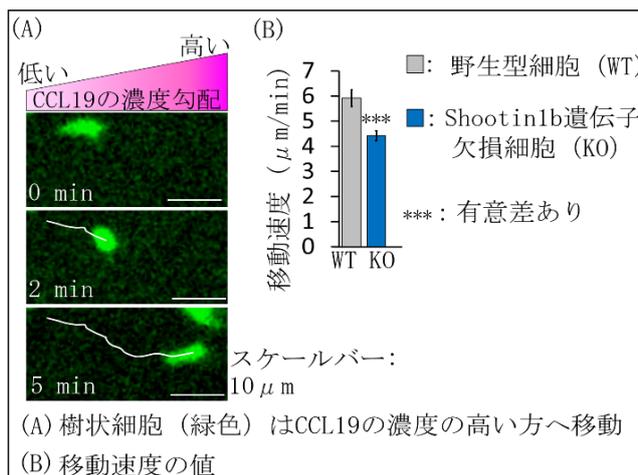


図 3. CCL19 の濃度勾配下における樹状細胞の移動速度の解析

##### (3) Shootin1b は組織内でリンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動に関与する：

Shootin1b が走化性移動や走化性移動のための推進力の発生に関与することが示された。しかしながら、shootin1b が生体組織内の走化性移動に関与するかは解っていない。樹状細胞はリンパ管を通り、誘引物質 CCL19 や CCL21 などが分泌されるリンパ節へと移動する。そこで、shootin1b がリンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動に関与するかどうかを検証した。具体的には、野生型樹

状細胞とノックアウト樹状細胞を培養し、それぞれの細胞を異なる蛍光色素でラベルした。その後、野生型細胞とノックアウト細胞の数を同じ割合で混和した懸濁液をマウス足裏のリンパ管へ注入した。約 24 時間後にリンパ節を回収し、リンパ節のマーカー分子であるラミニンの抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、リンパ節に到達した野生型細胞とノックアウト細胞の数の割合を算出した。その結果、野生型細胞と比べて、リンパ節に到達したノックアウト細胞の数の割合が減少した。すなわち、shootin1b の欠損によりリンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動が阻害されることが解った (図 4)。この結果から、shootin1b がリンパ節へ向かう樹状細胞の走化性移動に関与することが示唆された。また、免疫応答を誘導するためには樹状細胞の走化性移動が重要であり、樹状細胞の走化性の破綻は病原体感染の抵抗力減少といった免疫応答の障害を引き起こすことが報告されている (Ato M *et al.*, *J. Immunol.* 2006; Tibúrcio R *et al.*, *Front. Immunol.* 2019)。従って、shootin1b の欠損による走化性移動の阻害が免疫応答の障害を引き起こす可能性がある。

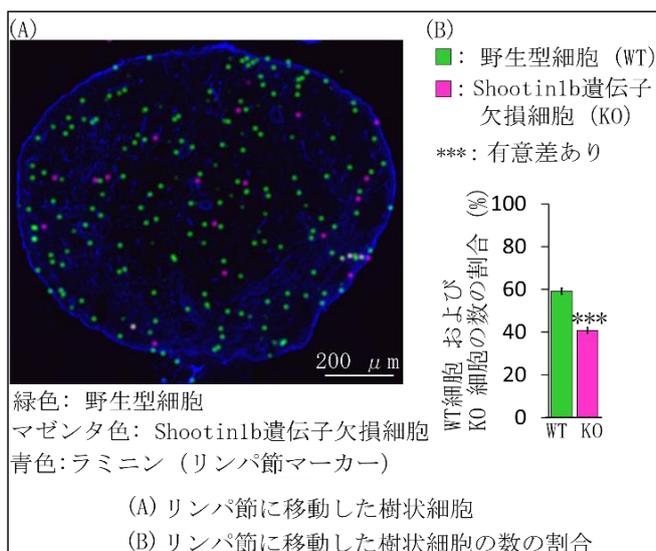


図 4. リンパ節へ向かう樹状細胞の移動の解析

(4) 樹状細胞は柔らかいコラーゲングルと硬いコラーゲングルに応じて shootin1b を介した走化性移動と shootin1b を介さない走化性移動の 2 つの移動様式を使い分ける：

組織の硬さは幅広く、組織に含まれる細胞外基質の一つであるコラーゲンの硬さが組織の硬さの維持に関与する (Cox TR and Erler JT, *Dis. Model Mech.* 2011; Ghosh D and Dawson M, *Adv. Med. Biol.* 2018)。樹状細胞は様々な硬さの組織やコラーゲンの中をどのようにして移動するのかはよく解っていない。そこで、細胞外環境の硬さとして、コラーゲングルとリンパ節組織の硬さに着目し樹状細胞の走化性移動の解析を行った。初めに、コラーゲングルの硬さやリンパ節の硬さを AFM により測定し両者の硬さを比較した。その結果、1.5 mg/mL コラーゲングルの硬さが  $130.5 \pm 4.6$  Pa、2.5 mg/mL コラーゲングルの硬さが  $303.8 \pm 14.4$  Pa であることが解った。これらのコラーゲングルの硬さ (Pa) と測定法は Alcaraz らの研究論文を参考にした (Alcaraz J *et al.*, *Integr. Biol.* 2011)。さらに、リンパ節の硬さが  $263.2 \pm 20.9$  Pa であり、1.5 mg/mL コラーゲングル (柔らかいコラーゲングル) の硬さと、2.5 mg/mL コラーゲングル (硬いコラーゲングル) の硬さの間に位置することが解った。そこで、柔らかいコラーゲングルと硬いコラーゲングルの中の CCL19 に向かう細胞移動を解析した。柔らかいコラーゲングルの中では、野生型細胞と比べてノックアウト細胞の移動速度が減少することが解った。一方で、硬いコラーゲングルの中では、野生型細胞とノックアウト細胞の移動速度が変化しないことが解った。以上の結果から、柔らかいコラーゲングルの中で樹状細胞は shootin1b を介した走化性移動を行うが、硬いコラーゲングルの中で樹状細胞は shootin1b を介さない移動を行う可能性が示唆された。すなわち、細胞外環境の硬さに応じて、樹状細胞は shootin1b を介した走化性移動と shootin1b を介さない走化性移動の 2 つの移動様式を使い分けることで、様々な硬さのコラーゲングルや組織の中を移動する可能性がある。今後は、実際のリンパ節内で樹状細胞が shootin1b を介する移動または shootin1b を介さない移動のどちらの移動を行うかを解析する。また、リンパ節以外に樹状細胞の分布する肺や肝臓、皮膚の組織の硬さを測定し、これら組織の中の樹状細胞の走化性移動を解析する。

本研究により、shootin1b が樹状細胞の走化性に関与するクラッチ分子として機能し走化性移動のための推進力を生み出すことが示唆された。さらに、環境の硬さに応じて樹状細胞が 2 つの移動様式を使い分けることで、様々な硬さのコラーゲングルや組織の中を移動する可能性が見出された。生体組織内の樹状細胞の走化性移動や樹状細胞を介した免疫応答の理解を深めるために、「組織の硬さ」と「樹状細胞の移動様式」の関係性を明らかにすることは今後の重要な課題となる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Masuda Toshihiro, Hirose Hisaaki, Baba Kentarou, Walrant Astrid, Sagan Sandrine, Inagaki Naoyuki, Fujimoto Toyoshi, Futaki Shiroh	4. 巻 31
2. 論文標題 An Artificial Amphiphilic Peptide Promotes Endocytic Uptake by Inducing Membrane Curvature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 1611 ~ 1615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.0c00239	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 該当する
1. 著者名 Kastian Ria Fajarwati, Minegishi Takunori, Baba Kentarou, Saneyoshi Takeo, Katsuno-Kambe Hiroko, Saranpal Singh, Hayashi Yasunori, Inagaki Naoyuki	4. 巻 35
2. 論文標題 Shootin1a-mediated actin-adhesion coupling generates force to trigger structural plasticity of dendritic spines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109130 ~ 109130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109130	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 該当する
1. 著者名 Masuda Toshihiro, Baba Kentarou, Nomura Takeshi, Tsujita Kazuya, Murayama Tomo, Itoh Toshiki, Takatani-Nakase Tomoka, Sokabe Masahiro, Inagaki Naoyuki, Futaki Shiroh	4. 巻 2
2. 論文標題 An influenza-derived membrane tension-modulating peptide regulates cell movement and morphology via actin remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0486-3	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 Masuda Toshihiro, Hirose Hisaaki, Baba Kentarou, Walrant Astrid, Sagan Sandrine, Inagaki Naoyuki, Fujimoto Toyoshi, Futaki Shiroh	4. 巻 31
2. 論文標題 An Artificial Amphiphilic Peptide Promotes Endocytic Uptake by Inducing Membrane Curvature	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 1611 ~ 1615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.0c00239	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 稲垣直之、馬場健太郎、前野貴則、鳥山道則、勝野弘子、山田 達也、作村 諭一
2. 発表標題 モータータンパク質を介した神経細胞内輸送の極成化
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会シンポジウム「細胞内物質輸送システム；温故知新」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ria Kastian, Takunori Minegishi, Kentarou Baba, Takeo Saneyoshi, Hiroko Katsuno-kambe, Singh Saranpal, Yasunori Hayashi, Naoyuki Inagaki
2. 発表標題 Shootin1A-mediated-actin-adhesion coupling triggers formation and plasticity of dendritic spines
3. 学会等名 Philippine Society for Developmental Biology (PSDB) National Annual Convention (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kentarou Baba, Yoshikazu Nagashima, Mizuki Sakai, Ryosuke Takeuchi, Yasuna Higashiguchi, Hiroko Katsuno-Kambe, Yoshihiro Ueda, Yuji Kamioka, Tatsuo Kinashi, Naoyuki Inagaki
2. 発表標題 Shootin1b as a clutch molecule for dendritic cell chemotaxis
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ria Kastian, Takunori Minegishi, Kentarou Baba, Takeo Saneyoshi, Hiroko Katsuno-kambe, Singh Saranpal, Yasunori Hayashi, Naoyuki Inagaki
2. 発表標題 Shootin1a-mediated Actin-adhesion Coupling Generates Force To Trigger Structural Plasticity of Dendritic Spines
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sohei Yamada、Kentaro Baba、Naoyuki Inagaki、Yoichiro Hosokawa
2. 発表標題 Adhesion Strength of Axonal Growth Cone and Its Contribution in Axon Outgrowth Evaluated by Femtosecond Laser
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Napol Kaewkascholkul、Hisashi Sasaki、Kentaro Baba、Michinori Toriyama、Naoyuki Inagaki
2. 発表標題 Shootin1a dephosphorylation by protein phosphatase-1 for netrin-1-induced axon guidance
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣直之、馬場健太郎、嶺岸卓徳、阿部幸喜
2. 発表標題 Shootin1-Mediated Molecular Mechanics of Axon Guidance and Neuronal Migration
3. 学会等名 EMBO Workshop Emerging Concepts of the Neuronal Cytoskeleton (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡野和宣、馬場健太郎、矢神希生、阿部幸喜、稲垣直之、細川陽一郎
2. 発表標題 Microfabrication of Glass-supported Thin Polymer Film for Arranging and Networking Live Cells by Femtosecond Laser Processing
3. 学会等名 TOIN International Symposium on Biomedical Engineering 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場健太郎、長嶋慶和、酒井瑞貴、東口泰奈、勝野弘子、稲垣直之
2. 発表標題 Shootin1b-mediated chemotaxis mechanism in dendritic cell
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田紗希、馬場健太郎、稲垣直之
2. 発表標題 Shootin1aと細胞接着分子N-cadherinの相互作用による軸索ガイダンスの制御機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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