

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570158

研究課題名（和文）基質の軟らかさによって誘引される細胞の協調的集団運動に関する研究

研究課題名（英文）Collective migration of epithelial cells induced by softness of substrates

研究代表者

芳賀 永 (HAGA HISASHI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：00292045

研究成果の概要（和文）：

多数の細胞が集団で協調的に運動することは、生体組織の形成や維持など様々な生命現象において重要な役割を果たす。本研究では、細胞集団に自発的な協調運動を誘引させるため、軟らかいコラーゲンゲルを作成し、その上に上皮細胞（MDCK細胞）を培養した。細胞外基質との接着構造を解析し、リーダー細胞の出現機構について調べた。さらに、細胞間に「力」を伝達するセンサーの探索を行った。

研究成果の概要（英文）：

Cell movement plays an important role in many physiological processes, including wound healing, embryonic development, and morphogenesis. In this study, we observed that epithelial cells (Madin-Darby canine kidney cell) migrated collectively along one direction on a soft substrate. Cell-substrate adhesions, cell-cell mechanotransduction, and appearance of leader cells were studied.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：上皮細胞，細胞運動，集団性，メカノセンス，コラーゲンゲル，接着構造

1. 研究開始当初の背景

多数の細胞が集団で協調的に運動することは、生体組織の形成や維持など様々な生命現象において重要な役割を果たす。例えば、胚の発生では、細胞が協調的に特定の位置へ移動することによって組織や器官が形成される。また、組織の一部が傷ついたとき、細胞が傷口に向かって一斉に移動することで組織が再生される。しかし、このような集団運動が生じるメカニズムについては明らかに

なっていない。それどころか、*in vitro*において細胞の自発的な集団運動を観察する実験系がこれまで確立していなかったのが現状である。培養細胞の運動に関する研究では、ガラスやポリスチレンのシャーレ（もしくはフラスコ）を用いて細胞を培養し観察する方法が主流である。しかし、近年、軟らかいゲルを基質とすることで、より生体内に近い環境を実現し、細胞運動に関する新しい知見が得られるようになった。例えば、細胞が運動

するためには、生化学的なシグナルのみならず細胞周囲の物理的状況など幾つかの要因が必須であることが明らかとなっており、その中でも、細胞が運動する際の足場となる基質の硬さという物理的な要素が細胞運動に大きな影響を及ぼすことが明らかとなっている。申請者はこの点に着目し、上皮細胞を軟らかいコラーゲンゲル上で培養することで、上皮細胞の自発的な集団的動態の観察に成功した (H. Haga, *et al.*, *Biophys. J.*, **88**, 2250-2256, 2005)。申請者の研究から、上皮細胞は硬いガラス基盤上で培養すると個々の細胞がランダムな方向に運動するのに対し、軟らかいコラーゲンゲル上で培養すると隣接細胞との接着を維持したまま同一方向に集団で運動することが明らかとなった。さらに、大きな葉状仮足を伸ばした細胞 (リーダー細胞) が細胞集団の端から突出し、この後方を後続の細胞集団が次々と追従することで集団運動が起きることが明らかとなった。しかし、(1) 基質の硬さに依存して集団運動が生じる理由、(3) リーダー細胞が出現するメカニズム、(2) 細胞間の情報伝達方法などについては明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

集団運動のメカニズムを解明するために、論点を上記 (1) ~ (3) に絞り研究を遂行する。具体的には次の仮説を設定して実験を行う。
仮説 1 基質の弾性率に依存して、細胞と基質間の接着構造が異なる。その結果、軟らかいゲル上の上皮細胞は白血球のような丸い形態と運動様式を示す。

仮説 2 リーダー細胞の出現頻度は基質の弾性率に依存する。

仮説 3 多数の細胞が集団で一方向に運動するためには、隣接細胞の運動方向を何らかの方法で知覚する必要がある。軟らかいゲル上の細胞には、隣接細胞の運動方向を知覚する機械刺激受容機構 (メカノセンサー) が存在する。

3. 研究の方法

(1) 細胞-基質間の接着構造の解析

基質の硬さにかかわらず、上皮細胞はアクチンミオシンから成るストレスファイバーの収縮力によって運動する。しかし、研究代表者らによるこれまでの実験結果から、軟らかいゲル基質においては、細胞の基質との接着部位に *integrin*, *vinculin*, *talin*, *FAK* などが局在しておらず、ガラスなど硬い基盤で観察される接着斑構造 (FA; Focal Adhesion) が存在しないことが明らかとなっていた。基質が硬くなるにつれてストレスファイバーの端に FA が現れることから、細胞-基質間の接着構造は基質の硬さに依存する。それでは、生体内に近い環境 (基質弾性率: 0.1~数 kPa) で

は、細胞は基質とどのように接着しているのであろうか。基質を軟らかくすると上皮細胞の形態は白血球のような丸い形態へと変化し、運動様式も類似する。このことから、研究代表者らは接着に関わるタンパク質の候補を幾つか絞り込んで実験を行った。

(2) リーダー細胞の出現機構の解明

軟らかい基質の上を集団運動する上皮細胞に対して、間質細胞マーカーである *vimentin* の抗体で蛍光染色を行ったところ、リーダー細胞とその付近に *vimentin* が強く発現することが明らかとなっていた。さらに、ゲル基質上の上皮細胞に *vimentin* の重合阻害剤を投与すると、リーダー細胞の出現が失われ、集団運動が見られなくなった。これらのことから、研究代表者らは、基質の硬さが上皮細胞に間質細胞への変化を促し、それがリーダー細胞の出現に至ると考えた。そこで、ゲルの硬さを変化させて、リーダー細胞の出現頻度と基質の硬さ依存性を調べた。

(3) 細胞間メカノセンサーの探索

lyn-venus 等の蛍光タンパク質を上皮細胞の集団に発現させ、個々の細胞がどのように形態を変化させながら運動するのを経時観察した。その結果、軟らかい基質上では、集団から飛び出したリーダー細胞の運動がきっかけとなり、それに隣接する細胞が次々と追従する様子が観察された。つまり、ある一つの細胞がどちらかへ運動すると、その運動方向が隣接する細胞に伝播し、最終的には多数の細胞が集団で一方向に運動すると考えられる。上皮細胞が集団で運動する際にも細胞間接着構造は常に維持されていることから、上皮細胞は細胞間接着を介して隣接細胞の移動方向を知覚している可能性がある。そこで、細胞間においてメカノセンスを担うタンパク質の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞-基質間の接着構造の解析

軟らかいゲル基質上においては、リーダー細胞のみが基質との接着部位に *integrin-β1* を発現し、リーダー細胞以外の細胞は別の接着タンパク質を発現していることを見出した。さらに、逆転写 PCR 法により、リーダー細胞以外の細胞における接着構造の解明を目指した。その結果、*integrin-β3*, *β4*, *β7* など幾つか候補が見つかった。また、RNA 干渉法によって *laminin-10* のサブユニットである *laminin-α5* の発現を抑制したところ、コラーゲンゲル上での協調的な集団運動が阻害された。このことから、軟らかい基質上の細胞集団は細胞外基質に *laminin-10* の濃度勾配を形成することで協調的な集団運動を行うことが明らかとなった。

(2) リーダー細胞の出現機構の解明

研究代表者らによるこれまでの実験結果から、基質の硬さに伴って上皮-間質転換 (EMT) が誘引され、リーダー細胞が出現することが示唆されていた。そこで、MDCK 細胞のサブクローニングを行い、発現遺伝子と表現型を調べることで EMT を検証した。その結果、ガラス基盤上でも集団運動を示すサブクローンの獲得に成功した。そのサブクローンは細胞間接着が極めて強固であり、E-cadherin が有意に発現していることが明らかとなった。さらに、他のサブクローンに比べて、リーダー細胞の出現頻度が少ないという結果が得られた。これらのことから、EMT とリーダー細胞の出現との相関が明らかとなった。また、コラーゲンゲル上の細胞集団に TGF- β 1 受容体の阻害剤を投与した。その結果、リーダー細胞のみが運動を停止し、後続の細胞集団は運動を継続し、結果的に協調的な集団運動が阻害された。このことから、TGF- β 1 のシグナル経路によって誘引される EMT がリーダー細胞の出現要因であることが明らかとなった。

(3) 細胞間メカノセンサーの探索
接着結合の構成タンパク質のひとつである p120-catenin が細胞間に「力」を伝達するメカノセンサーであることが実験によって示唆された。p120-catenin の発現を RNA 干渉法によって阻害し、集団運動に変化がみられるのかを調べた。その結果、研究代表者らが「波状運動」と名付けた特殊な細胞集団が、p120-catenin の発現阻害で停止することが明らかとなった。さらに、Rac1 の活性阻害剤を投与すると、リーダー細胞のみが運動を停止し、コラーゲンゲル上での協調的な集団運動が阻害された。このことから、laminin-10 の濃度勾配と TGF- β 1 由来の EMT をつなぐシグナル経路には、Rac1 の活性が関与していることが明らかとなった。

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 9 件)

- ① K. Tamura, T. Mizutani, H. Haga, and K. Kawabata, Active fluctuation in the cortical cytoskeleton observed by high-speed live-cell scanning probe microscopy, *Acta Biomaterialia*, 査読有、7 巻、2011、3766-3772
DOI: 10.1016/j.actbio.2011.06.013
- ② K. Tamura, T. Mizutani, H. Haga, and K. Kawabata, Nano-mechanical Properties of Living Cells Expressing Constitutively Active RhoA Effectors,

Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、403 巻、2010、363-367

DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.036

- ③ T. Mizutani, K. Kawabata, Y. Koyama, M. Takahashi, and H. Haga, Regulation of Cellular Contractile Force in Response to Mechanical Stretch by Diphosphorylation of Myosin Regulatory Light Chain via RhoA Signaling Cascade, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 査読有、66 巻、2009、389-397
DOI: 10.1002/cm.20378

[学会発表] (計 18 件)

- ① 芳賀 永、軟らかい基質がもたらす上皮細胞集団の協調運動、日本動物学会第 82 回大会、2011 年 9 月 23 日、旭川市大雪クリスタルホール
- ② 芳賀 永、Collective behavior of epithelial cells responding to stiffness of the extracellular matrix、第 63 回日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 27 日、北海道大学
- ③ 芳賀 永、細胞外基質の硬さ・表面形状・組成に応答する上皮細胞の集団協調運動、口腔先端応用医科学研究会第 3 回学術会議、2011 年 1 月 22 日、東京医科歯科大
- ④ 芳賀 永、上皮細胞の集団運動と 3 次元形態形成、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸国際会議場
- ⑤ 芳賀 永、培養基質の硬さがもたらす細胞集団の協調運動と形態形成、第 1 回バイオエンジニアリング サマースクール、2010 年 9 月 3 日、北海道医療大学・サテライトキャンパス
- ⑥ 芳賀 永、細胞外基質の硬さおよび組成に応答する細胞集団の協調挙動と形態形成、北海道医療大学個体差研セミナー、2010 年 4 月 2 日、北海道医療大学
- ⑦ 芳賀 永、3D Morphogenesis and Collective Migration of Epithelial Cells Observed on a Soft Substrate Containing Laminin、第 49 回米国細胞生物学会年会、2009 年 12 月 8 日、サンディエゴコンベンションセンター

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳賀 永 (HAGA HISASHI)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
准教授
研究者番号：00292045

(2) 研究分担者

川端 和重 (KAWABATA KAZUSHIGE)
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
教授
研究者番号：20261274

(3) 連携研究者

なし