

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 6 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657047

研究課題名（和文） 細胞認識性マイクロ粒子を用いた局所刺激による
細胞間情報伝搬の動的挙動解析研究課題名（英文） Analysis of cellular signal propagation of local stimulation by cell
recognizable micro-sphere

研究代表者

原田 伊知郎 (HARADA ICHIRO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：00361759

研究成果の概要（和文）：近年、細胞集団中に生じた局所的な増殖因子や機械的刺激がコロニー全体の細胞へ何らかの形で情報を伝搬・交換するよう見える現象が多く報告されている。そこで、本研究では局所的な刺激に対して細胞の集団的挙動の解析を行うことを目的に、E-カドヘリンを直径1～3 μm のポリスチレン粒子に固定化した細胞認識マイクロ粒子を固定化し、それら粒子の作用が細胞集団にどのように認識されるのか検討した。その結果、E-カドヘリンを固定化した粒子は細胞コロニーの周辺部位にのみに作用し、コロニー全体の集団運動を抑制する作用があることが確認された。さらに、周辺部位からコロニー内部の細胞へ MAP kinase ERK1/2 の脱リン酸化が伝搬していく様子が確認された。他方で、細胞集団の一部の細胞に機械的な刺激を与えると ERK1/2 のリン酸化は刺激を受けていない細胞へと伝搬することも確認された。このことから、コロニーを形成する細胞は E-カドヘリンを介して力のバランスが保たれており、そのバランスの変化が E-カドヘリンを介して細胞間情報伝達を促していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Numerous studies have shown that there are signal propagation between cells in a colony involved in the intercellular signaling. To analyze mechanism of the signaling propagation in the cell colony, we designed local stimulation technique using E-cadherin-immobilized micro-spheres or hydrogel, which gives local mechanical stimulation in a cell-sheet. We found that the local stimulation of E-cad-spheres to the periphery of the MDCK cell inhibit collective motion of the cell colony and inactivate ERK signaling, which propagated into the cell colony. Also, we found that local mechanical stimulation to the cell sheet induced ERK signaling to cells in a non-stimulated section suggested mechanical balance involved in actin network is one the transducer of signal propagation involved in collective cellular motion.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,700,000 | 360,000 | 3,060,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：細胞間情報伝達

1. 研究開始当初の背景

現在まで数多くのサイトカイン・増殖因子が同定されてきたが、近年増殖因子刺激は時空間的に制御され、細胞はその時空間情報を認識して応答していることが示されつつあり、増殖因子によるシグナル誘起は単なるレセプター・リガンドのような単純な分子相互作用だけでは説明できない現象が多く報告されている。例えば、上皮増殖因子レセプター (EGF-R) の過剰発現の活性化量はレセプター自身の発現量の大小にかかわらず、直接的に関係のない E-カドヘリンの発現の有無によって制御されていることが知られている。また、上皮増殖因子 (EGF) シグナルは細胞間相互作用の強度に依存して応答性が変化するなど、増殖因子によるシグナル伝達機構は膜状にて高度に制御されており、同一細胞のコロニーに対する EGF 刺激もコロニーの位置によって細胞の応答性が異なるなど、強固な細胞間接着を形成する細胞においては増殖因子刺激に対する応答性の空間的不均一性が生じることが示されている。生体内環境では、特定の組織にある細胞が全て同等に増殖因子等の液性因子による刺激を受ける場合は少なく、空間的な不均一情報を積極的に伝搬・交換するシステムが備わっていることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、細胞間情報伝達の担い手として Cadherin に着目し、細胞認識素子として E-cadherin を固定化したマイクロ粒子を作製する。その粒子を細胞へ局所的に作用させることによって、その後続く細胞運動性、細胞間接着の動的挙動を解析し、(1) 1 細胞レベルにおいて局所的に受けた刺激に対してどのような挙動を示すのか、(2) コロニー形成しているような細胞集団中の特定の細胞に作用させ、その刺激に続く細胞集団の動的挙動を解析することによって、細胞の局所刺激の認識性と細胞間における情報伝達のメカニズムに迫ることを

目的とした。

3. 研究の方法

細胞間接着分子である E-cadherin を固定化した直径 $0.1\text{--}6\ \mu\text{m}$ の細胞認識性マイクロ粒子を作成し、局所的に粒子を作用させたときの細胞集団的運動挙動の解析方法を確立する。

また、細胞間接着が形成されている細胞コロニーにおいて力のバランスがどのように保たれており、そのバランスの崩壊がどのように細胞間相互作用を調整しているのか、という問題に対して温度応答性高分子ゲルを利用した、細胞シートに局所的に伸展刺激を加える方法を開発する。

4. 研究成果

①細胞認識性マイクロ粒子作成

本研究ではまず、固相化可能な E-cadherin として Halo-Tag を C 末端に付加したキメラタンパク質を作成し、基質へ共有結合させることが可能な分子の作成を行った。Halo-tag 基質を表面に有するマイクロ粒子に E-cadherin の極性を有した状態で固相化することが可能であった。また、その E-cad 粒子は細胞に認識され、E-cadherin 同士の生理的な接着機構と同様に、粒子を作用させた部位に細胞の内在性の E-cadherin、その裏打ちタンパク質である α -catenin 等が局在することが分かった。

②E-cad 粒子の作用

E-cad 粒子を細胞集団に添加すると、粒子はコロニーの周辺のみならず、粒子はコロニーの周辺のみならず作用することが分かった。また同様に、培養細胞系において擬似的に傷が生じた状況を作り出す wound healing assay においても、粒子は集団先頭、すなわち傷口の最前列の細胞とのみ相互作用することが分かった。特に、wound healing assay 時に粒子を作用させると、集団的に運動していた細胞群は、粒子が作用した先頭の細胞から順に、移動が抑制され、その運動抑制が後方の細胞へと伝搬するように観察された。このことから、細胞の走化性に関与するシグナル伝達の抑制機構が伝搬しているのではないかと考え、E-cad 粒子を作用させてから時系列毎に、phospho ERK1/2 の免疫染色を行った。その結果、細胞シートに傷をつけた直後には著しく ERK がリン酸化し走化性が E-cad 粒子を反応させてから、時重 k んとともに最前列の細胞から後方への細胞へと ERK1/2 のリン酸化が低下し、

走化性の不活性化が後方の細胞へと伝搬しているように観察された。

③溶液状態の E-cadherin 添加実験

次に、作成した E-cad-Halo-tag を粒子に固定せず溶液状態にて細胞に添加する実験を行った。その結果、wound healing assay においては細胞シートに傷をつけた直後に ERK1/2 のリン酸化が上昇していたが、添加直後にコロニー全体において ERK1/2 のリン酸化が低下した。低下していく様子は、E-cad 粒子を添加した時と同様に、傷口前方の細胞から後方への細胞へと伝搬したが、その伝搬速度は速く、ほど同時に全ての細胞の形態が扁平化し、走化性も同時に低下するように観察された。これは、溶液状態の E-cadherin は粒子状態では侵入しにくい細胞間接着内にも侵入し、細胞-細胞間接着の E-cadherin の正常な接着機構を阻害したためであると考えられた。これらの結果に見られたように、E-cadherin の正常な接着機構の阻害は細胞の集団的な運動を低下させることから、E-cadherin 接着機構は細胞の集団運動に必須であり、局所的な正常接着機構の阻害は細胞の後方に伝搬するものであることが示唆された。

④局所的な力学的刺激方法の開発

このような E-cad 粒子添加や溶液状態の E-cadherin を添加した後の細胞集団運動時に見られる ERK1/2 の活性化・不活性化の伝搬は、細胞間接着を介した機械的なバランスによって生じているのではないかと考えた。そこで、研究開始時には予定していなかった方法として局所的に細胞に力学的な伸展刺激を印可する方法を開発した。それは、温度変化によって膨潤・収縮する poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAAm) ゲルと温度感受性の無い poly-acrylamide (PAAm) ゲルを結合させた一枚の板とした培養基板ゲルである。本培養基板に対して両ゲルをまたぐように細胞シートを培養し、シート片側の細胞にのみ伸展刺激を印可する実験を行った。その結果、伸展刺激を受けた細胞は ERK のリン酸化の上昇が見られ、さらに伸展刺激を受けていない細胞側にも ERK シグナルが徐々に伝搬していく様子が確認された (図)。この現象は E-cadherin を発現していない繊維芽細胞では生じない現象であったため、ERK シグナルの伝搬は E-cadherin とそこへリンクするアクチンネットワークの力学的バランスの変化によって生じてい

るものであることが示された。

④今後の展望

外部 E-cadherin の作用がどのように ERK シグナルの抑制の伝搬につながったのか、その詳細については明らかにならなかった。しかし、局所的な力学作用は E-cadherin を介した細胞間の情報伝搬機構の担い手になっていることが示された。今後は、外部 E-cadherin を作用させたときの細胞間力学バランスのイメージングを行い、局所的な刺激と E-cadherin のダイナミクス変化がどのように細胞伝搬機構の担い手になり得るか具体的なモデルについて検討を行う。

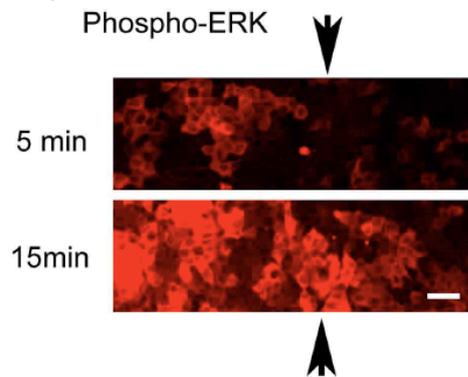


図 細胞シートに対する局所的な伸展刺激に対して無刺激の細胞群も時間経過とともに ERK のリン酸化が上昇する。矢印は温度感受性ゲル (左; PNIPAAm) 温度によって膨潤が変化しないゲル (右; PAAm) の境界を示す。伸展刺激 5 分後 (上図) では刺激が加えられた左側の細胞のみ ERK のリン酸化が上昇するが、15 分後は刺激側がさらに上昇し、無刺激側の細胞もリン酸化が上昇した。

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 1 件)

Harada I, Yanagisawa S, Iwasaki K, Cho CS, Akaike T. Local mechanical stimulation of mardin-darby canine kidney cell sheets on temperature-responsive hydrogel *Int J Mol Sci*. 2012. 13(1),1095-108 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 安富祐介、櫻井翼、坂井慎一、原田伊知郎、赤池敏宏 「細胞局所マニピュレーション法を用いた E-カドヘリン相互作用のダイナミクスと細胞間情報伝達機構の制御」 第 33 回日本バイオマテリア

- ル学会 京都府民総合交流プラザ京都テルサ 2011年11月21日
2. 安富祐介、原田伊知郎、赤池敏宏 第63回 「細胞局所マニピュレーション法を用いたE-カドヘリン相互作用のダイナミクスと細胞間情報伝達機構の」日本細胞生物学会 北海道大学 学術交流会館 2011年6月28日
 3. 原田伊知郎 「足場の物性に依存した接着点分子複合体のダイナミクス解析」日本細胞生物学会 北海道大学 学術交流会館 2011年6月27日
 4. 安富祐介、原田伊知郎 「Analysis of E-cadherin Dynamics and Signal Transduction of Cell-Cell Adhesion Using Local Manipulation Methods」第48回 日本生物物理学会 東北大学 2010年9月22日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 伊知郎 (HARADA ICHIRO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号：00361759