

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590215

研究課題名(和文)ケモカイン受容体CXCR7による原腸胚細胞集団運動制御の解析

研究課題名(英文)Regulation of collective cell movement by chemokine receptor CXCR7

研究代表者

福井 彰雅(FUKUI, AKIMASA)

北海道大学・先端生命科学研究所(研究院)・准教授

研究者番号：80262103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：この研究ではアフリカツメガエルの原腸形成をモデルとして、細胞の集団運動におけるCXCR7の役割を調査した。結果、CXCR7は中胚葉で発現し、初期原腸胚で機能していることが示された。さらにCXCR7の強制発現で細胞解離が観察され、またこの現象にはERKを介した細胞内情報伝達経路が関与することが示唆された。本研究によりCXCR7が細胞間接着の制御に直接関与するというケモカインの新しい機能が発見された。

研究成果の概要(英文)：Collective cell movement is a widely observed biological event, and not a few parts of that are controlled by chemoattractants. A chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), also known as CXCL12, functions as chemoattractant through its G-protein coupled receptor CXCR4. CXCR7, which is identified as a second receptor for SDF-1, has been focused since its novel roles have been reported as controlling cell migration to inhibit the signaling by sequestering the SDF-1 and to signal via non-G-protein signaling pathway. In the present study, several lines of experiment suggest a CXCR7/SDF-1-dependent novel function that CXCR7 signaling modulates intercellular adhesion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：原腸形成 細胞集団運動 細胞接着 ケモカイン CXCR7 細胞内情報伝達 CXCL12 カドヘリン

1. 研究開始当初の背景

動物の形態形成運動において細胞は協調的な集団運動をおこなうことがよく知られている。しかし、細胞集団がどのような相互関係を持ちながら協調的に運動するのか、その分子的な機序は不明な点が多い。そこで、本申請では原腸形成をモデルとして細胞の集団運動について研究をおこなった。原腸形成は動物の最初の形態形成運動であり、アフリカツメガエルにおいてその細胞の再配置の様子が詳細に調べられているため、細胞集団運動の良いモデル系となりうる。原腸形成の駆動力の大部分は中胚葉細胞集団の運動であり、中胚葉の運動メカニズムを調べることは、原腸形成運動を理解するための最も基本的かつ適確な方法であると考えられる。

これまでの研究でケモカインの一種である SDF-1 のシグナルが初期発生においても機能していることを明らかにしたが (Fukui *et al.*, 2007), 移動する細胞群が SDF-1 シグナルを migration cue として認識する機構については未だ不明な点が多い。リガンドである xSDF-1 が予定外胚葉内層に広く発現していること、胞胚腔は非常に狭い空間であることから、胚内部の胞胚腔で xSDF-1 が濃度勾配を形成している可能性は低いと思われる。そのため、細胞は集団としての性質を持ち、正しい方向に動くために SDF-1 シグナルを cue として集団自律的にその進行方向を決定するメカニズムがあると考え、SDF-1 の第2の受容体として報告されている CXCR7 に着目した。CXCR7 は SDF-1 が結合すると SDF-1 と共に細胞内へ取り込まれるが、その時の細胞内への情報伝達は報告されていなかった。このことから、CXCR7 は能動的に細胞外の SDF-1 の濃度を下げる阻害因子の一つであることが示唆されていた (Boldajipour *et al.*, 2008)。実際にゼブラフィッシュの側線原基の運動時に、前方の細胞で CXCR4 が、後方の細胞で CXCR7 が発現しているという報告がある (Valentin *et al.*, 2007)。しかし、CXCR7 が GPCR の脱感作に必要なアレスチンをリクルートすることで CXCR4 の働きを増強する可能性や、直接的に神経細胞の運動に関与する可能性も報告されており (Luker *et al.*, 2009; Zabel *et al.*, 2009; Tiveron *et al.*, 2010), その作用についてはまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

協調的な細胞の集団運動がどのように制御されているかを探るため、CXCR7 に焦点をあてその細胞集団運動における役割を明らかにする。そのため、原腸胚での xCXCR7 の発現パターンを明らかにすると共に、*in vivo* と *in vitro*

における機能の解析を試みる。これらを通じて xCXCR4 と xCXCR7 の2種類の受容体の空間的な発現領域の違いが及ぼす細胞運動への影響を明らかにすると共に、細胞集団の自律的な運動場形成のためのモデルの構築を試みる。

3. 研究の方法

(1) 受容体の時間的・空間的な発現パターンの解析

発生ステージ毎の初期胚より mRNA を抽出し、cDNA を合成した後に目的遺伝子の primer を用いた PCR をおこなうことで発現時期の特定をおこなう (RT-PCR)。空間的な発現パターンは目的遺伝子の anti-sense RNA を合成し、固定した初期胚に hybridization した後に発色することで、目的遺伝子の空間的な分布を調べる (Whole mount in situ hybridization; WISH)。さらにツメガエル胞胚期胚より外胚葉、中胚葉、内胚葉等各部位を切り出した後に一定時間培養をおこない、RT-PCR と同様に cDNA を合成した後に定量的 PCR によって各遺伝子の発現量を測定する。

(2) 機能アッセイ

蛍光色素、野生型もしくは変異型 mRNA、機能阻害のための morpholino antisense oligomer (MO) 等を4細胞期胚の特定の領域に微量注入することで xCXCR7 の機能を探る。

(3) マイグレーションアッセイ

ツメガエルの中内胚葉細胞は xSDF-1 を強制発現させた細胞に向かって移動することが分かっている (Fukui *et al.*, 2007), この細胞群を用いて細胞運動に対する xCXCR7 の影響を調べる。あらかじめ予定外胚葉領域に xSDF-1 mRNA とトレーサーとして緑色蛍光色素を微量注入した胚を準備し (図1左上)、これとは別に、予定中内胚葉領域に xCXCR7 mRNA 等の目的因子を注入した胚を準備し (図1左下)、それぞれ初期原腸胚期まで培養する。これらの胚の予定外胚葉と予定中内胚葉を切り出して外植体を作製し、これを 20ng/ml のフィブロネクチンを用いて底面をコートした培養皿中で培養する

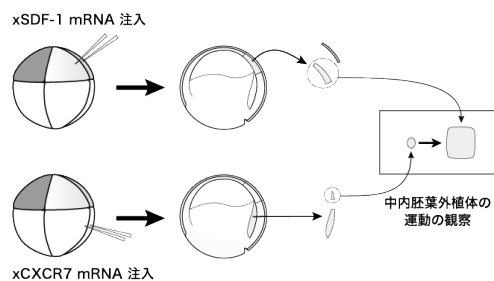


図1. マイグレーションアッセイの模式図

(図1右)。この条件下でタイムラプス撮影をおこなうことにより、xCXCR7 を強制発現させた中内胚葉の細胞集団運動の挙動について調査する。

4. 研究成果

(1) xCXCR7 の発現パターン

RT-PCR により、xCXCR7 は初期原腸胚に発現が開始され、それ以降初期幼生まで発現が続くことが示された。また WISH により、初期原腸胚では中胚葉で発現し、後期原腸胚期には予定脊索領域で発現量が上昇するが、中内胚葉ではほとんど発現していないことが分かった(図2)。同時に行った qPCR による xSDF-1 と xCXCR4 の発現解析では、xSDF-1 は予定外胚葉領域での発現が主であること、初期原腸胚の中内胚葉で発現しているのはほぼ xCXCR4 のみであることが示された。この発現パターンは一部 WISH の結果と矛盾しているが、qPCR では外植体作製後に培養したサンプルを使用しているため、細胞間の相互作用に違いがある可能性がある。実際、中胚葉誘導を阻害する Cerberus を強制発現することで中内胚葉領域の xCXCR4 の発現抑制及び xSDF-1 のより植物極側への発現領域のシフトが見られ、中胚葉誘導による発現制御システムの存在が示唆された。そこでアクチピン処理による発現量の変化をアニマルキャップアッセイにより調査したところ、アクチピン濃度の増加に伴う xSDF-1 の発現量の有意な減少が観察された。xCXCR7 の発現量はアクチピン濃度に依存することがなく、別な発現制御様式の存在が示唆された。

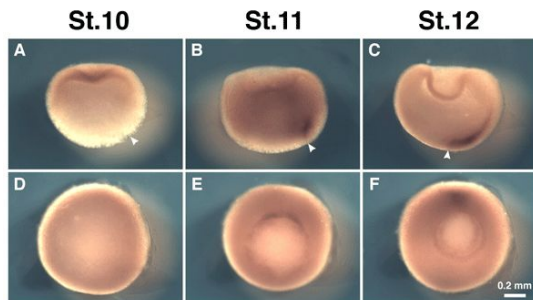


図2. xCXCR7 の発現パターン(WISH). A-C, 正中断面; D-F, 植物極側観察像.

(2) xCXCR7 の初期胚における機能の解析

xCXCR7 が初期原腸胚で機能している可能性を検証するため、背側帯域に xCXCR7-mRNA もしくは xCXCR7-MO を微量注入することで強制発現もしくは機能抑制の実験をおこなった。結果、双方共に濃度依存的な原腸形成異常の増加が観察され、注入した因子が作用していることが示唆された。また、

mRNA と MO の共発現では原腸形成不全の抑制が見られたが、MO が結合できない MO-mismatch xCXCR7 mRNA と MO の共発現では全て原腸形成不全となり、ここで見られる原腸形成の異常は xCXCR7 の発現異常に起因すること、MO は xCXCR7 の機能を確実に抑制していることが示された(図3)。

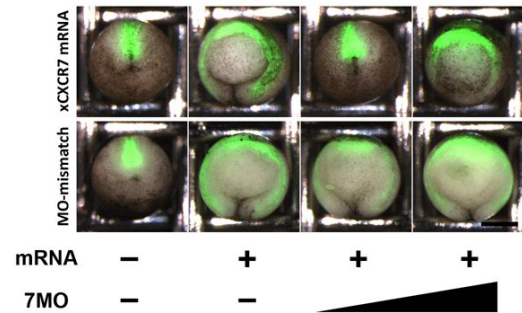


図3. 強制発現による原腸形成不全と MO によるレスキュー実験

(3) マイグレーションアッセイによる機能解析

当初、xCXCR7 は xCXCR4 の作用に対して抑制的に働くことが報告されていたので、実際に SDF-1 濃度に依存した中内胚葉細胞の方向性のある移動が阻害されるか、マイグレーションアッセイで確認をおこなった。その結果、コントロールの GFP のみを注入した外植体は集団のまま移動するが(図4左側外植体)、驚くべきことに xCXCR7 を強制発現させた中内胚葉細胞外植体は解離しながら xSDF-1 のソースに向かって移動することが判明した(図4右側外植体)。これらの結果より、xCXCR7 は細胞間の接着性に直接関与すること、xCXCR7 と xCXCR4 は独立に機能しているという 2 つの重要な示唆が得られた。

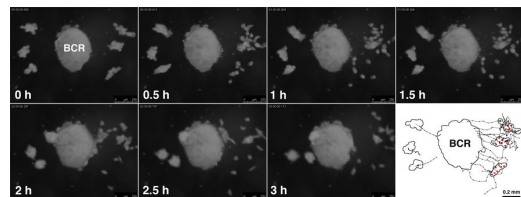


図4. xCXCR7 強制発現外植体のマイグレーションアッセイ

(4) CXCR7 情報伝達経路の細胞解離に対する影響

(3)で見られた細胞解離が CXCR7 を経由した情報伝達経路に依存していることを確認するため、xCXCR7 の C 末端を欠いた β アレスチン結合不全型の変異体 (ΔC) を作製し、細胞解離に対する影響を調査した。野生型の xCXCR7 を

注入することで 50%以上の外植体で細胞解離が見られたが(図5. 2段目), ΔC では大部分のもので解離は見られなかった(図5. 3段目)。また, CXCR7 はアレスチンを通じて Erk 情報伝達経路もしくは Akt 情報伝達経路により細胞内情報伝達をおこなっていることが示唆されている。そこで, それぞれの阻害剤を用いて細胞解離に対する影響を調べたところ, MEK 阻害剤である PD98059 により濃度依存的に細胞解離が抑制されたが(図5. 4, 5段目), PI3K 阻害剤である LY-294002 では抑制が見られなかった(図5. 6, 7段目)。これらの結果より細胞解離には CXCR7 を介した情報伝達が必要で, さらに Erk 情報伝達経路が関与することが示唆された。

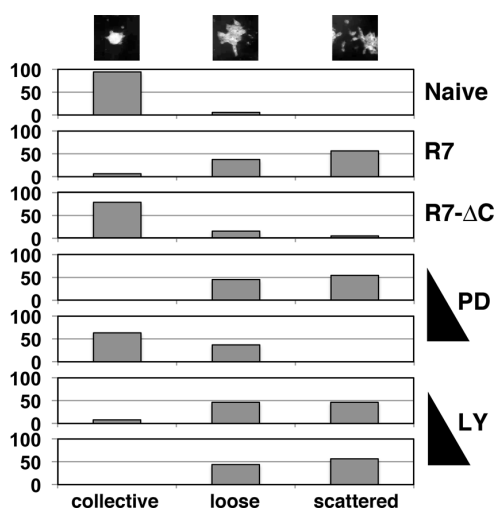


図5. xCXCR7 変異体及び阻害剤による細胞解離への影響

(5) カテニンの膜局在への CXCR7 情報伝達経路の影響

細胞間接着分子であるカドヘリンの接着性はアンカータンパク質であるカテニン類の膜への局在が必要であることが知られている。そこで, カドヘリンの作用を調べるため, カテニンの細胞内局在を免疫蛍光染色法で調査した。その結果, SDF-1 処理により β カテニンは膜への局在に変化が無いが, α カテニンは膜から解離することが示された。

(6) まとめ

本研究ではツメガエル初期胚で膜受容体である xCXCR7 が機能していることを示した。また, そのメカニズムとして xCXCR7 を介した SDF-1 シグナルによる MAP kinase カスケードの活性化と, それに続く α カテニンのカドヘリン・カテニン複合体からの解離が示唆された。このような分泌性リガンドによる細胞外からの直接的な細胞

接着制御についての報告は今回が初めてである。細胞集団運動においては, 強すぎず, 弱すぎずといった微妙な接着性の調節が必要と考えられるが, xCXCR7 はその役割の一端を担っていると考えられる。

また, マイグレーションアッセイの結果から中内胚葉細胞において細胞の解離と方向性のある運動は独立していることが示され, xSDF-1 は CXCR4 を介した細胞-基質間接着と CXCR7 を介した細胞-細胞間の接着を別々に制御していることが示唆された。このような受容体の「使い分け」による接着性の制御機構は細胞の運動性制御や生理的役割に密接に関連している可能性があり, 今後は動物の形態形成のみでなく, ガンの進行や組織形成における役割の解明にも貢献できると考えられる。

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)

1. Mishra, S.K., Nagata, T., Furusawa, K., Sasaki, N., Fukui, A. Expression of xSDF-1 α , xCXCR4, and xCXCR7 during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev. Biol.*, 査読有, 57:95-100, 2013. doi: 10.1387/ijdb.120130af.

[学会発表](計 21 件)

1. 福井彰雅: CXCR7 情報伝達による細胞接着の制御, 生体運動合同班会議 2014, 2014 年 1 月 11 日, 千葉大学(千葉市)
2. 福井彰雅, 古澤和也, 佐々木直樹: CXCR7 による原腸胚期中内胚葉細胞の細胞間接着制御機構, 日本動物学会第 84 回大会, 2013 年 9 月 26 日, 岡山大学(岡山市)
3. 福井彰雅, 榊田啓太, 小山晶平, 古澤和也, 佐々木直樹: SDF-1 情報伝達経路による細胞の接着制御, 第 7 回日本ツメガエル研究会, 2013 年 9 月 24 日, 秋吉台国際芸術村(山口県美祿市)
4. 小山晶平, 古澤和也, 佐々木直樹, 福井彰雅: CXCR7 シグナルによる α カテニン局在変化の観察, 日本動物学会北海道支部第 58 回大会, 2013 年 8 月 24 日, 北海道教育大学札幌校(札幌市)
5. 泉野奈都子, 古澤和也, 佐々木直樹, 福井彰雅: ツメガエル中内胚葉細胞のケモカイン勾配認識メカニズムについて, 日本動物学会北海道支部第 58 回大会, 2013 年 8 月 24 日, 北海道教育大学札幌校(札幌市)
6. Akimasa Fukui, Kazuya Furusawa, Naoki Sasaki: CXCR7 signaling modulates cell-cell adhesion in *Xenopus* mesendoderm cells, 46th JSDB

- conference, 2013年5月30日, くびきメッセ(松江市)
7. 泉野奈都子, 古澤和也, 佐々木直樹, 福井彰雅: 移動細胞におけるケモカイン勾配認識メカニズムに関する研究, 北大細胞生物研究集会 2013年3月22日, 北海道大学
 8. 福井彰雅: SDF-1 情報伝達による細胞集団運動の制御, 生体運動合同班会議, 2013年1月13日, 広島大学(東広島市)
 9. 森晴香, 山廣傑, 宇野好宜, 松田洋一, 古澤和也, 佐々木直樹, 福井彰雅: アフリカツメガエルアクチビン応答遺伝子の染色体マッピング, 日本分子生物学会, 2012年12月12日, 福岡国際センター(福岡市)
 10. Keita Masuda, Kazuya Furusawa, Naoki Sasaki, Akimasa Fukui: CXCR7 signaling modulates cell-cell adhesion in *Xenopus* mesendoderm cells, Asia Pacific Developmental Biology Conference 2012, 2012年10月6日, Taipei Innovation City Convention Center (台湾)
 11. Keita Masuda, Kazuya Furusawa, Naoki Sasaki, Akimasa Fukui: Modulation of cell-cell adhesion in *Xenopus* mesendoderm cells by CXCR7 signaling, 14th International Xenopus conference, 2012年9月11日, Giens Peninsula(フランス)
 12. 福井彰雅: ケモカイン SDF-1 による指向的細胞集団運動の制御, 細胞運動系研究交流セミナー, 2012年7月7日, 大滝セミナーハウス(北海道伊達市)
 13. Akimasa Fukui, Keita Masuda, Kazuya Furusawa, Naoki Sasaki: Modulation of cell-cell adhesion in *Xenopus* mesendoderm cells by CXCR7 signaling, Joint meeting of JSDB 45th and JSCB 64th, 2012年5月29日, 神戸国際会議場(神戸市)
 14. 佐藤真希, 平敏夫, 中村公則, 綾部時芳, 福井彰雅: 凍結置換法による組織常在性マクロファージの分布の観察, 第34回日本分子生物学会, 2011年12月14日, パシフィコ横浜(横浜市)
 15. 福井彰雅: xSDF-1 情報伝達関連因子の発現パターンについて, 第五回日本ツメガエル研究集会, 2011年10月6日, 熱海かんぼの宿(熱海)
 16. 榊田啓太, 長田朋子, 古澤和也, 佐々木直樹, 福井彰雅: アフリカツメガエル原腸胚期でのxCXCR7の機能について, 第五回日本ツメガエル研究集会, 2011年10月6日, 熱海かんぼの宿(熱海)
 17. 福井彰雅: ツメガエルの原腸形成に見られる細胞集団運動 -SDF-1情報伝達経路による細胞運動制御機構-, 第31回胚誘導と形態形成・第21回イモリ・ネットワーク共催シンポジウム「原腸形成研究の現在-胚葉分化と細胞運動-」, 日本動物学会第82回大会, 2011年9月21日, 旭川クリスタルホール(旭川市)
 18. 榊田啓太, 長田朋子, 古澤和也, 佐々木直樹, 福井彰雅: アフリカツメガエル原腸胚期でのxCXCR7の機能について, 日本動物学会第82回大会, 2011年9月22日, 旭川クリスタルホール(旭川市)
 19. 森晴香, 山廣傑, 宇野好宜, 松田洋一, 古澤和也, 佐々木直樹, 福井彰雅: アクチビン初期応答遺伝子の染色体マッピング, 日本動物学会第82回大会, 2011年9月22日, 旭川クリスタルホール(旭川市)
 20. 井上直樹, 古澤和也, 佐々木直樹, 福井彰雅: アフリカツメガエル PAFR の強制発現及び翻訳阻害実験による原腸陥入運動阻害の観察, 日本動物学会第82回大会, 2011年9月22日, 旭川クリスタルホール(旭川市)
 21. 佐藤真希, 平敏夫, 中村公則, 綾部時芳, 福井彰雅: ラット組織におけるマクロファージ多型の分布と局在, 日本動物学会第82回大会, 2011年9月22日, 旭川クリスタルホール(旭川市)
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g1/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
福井 彰雅 (FUKUI AKIMASA)
北海道大学・先端生命科学研究院・准教授
研究者番号: 80262103
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし