

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25287106

研究課題名(和文)細胞組織形成における細胞運動の協同機構の解明

研究課題名(英文)Aimed for the elucidation of mechanism of collective multi-cellular migration during 3D morphogenesis

研究代表者

川端 和重 (KAWABATA, Kazushige)

北海道大学・先端生命科学研究院・教授

研究者番号：20261274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で細胞集団は、血管のようなパイプ構造や肺胞のような球殻構造など形態を作り出すことによって特定の機能を生み出している。これらの構造は多細胞の協同性のもとに作り出されるが、協調性の起源についてはこれまで明らかにされていない。本研究では、シスト構造を形成する細胞集団をモデル実験細胞として、細胞運動の解析や細胞が出す力の解析法の開発、特定の遺伝子を欠損させた細胞株の樹立、を通じて、協同性の起源に迫った。更には、細胞や細胞外基質の物理パラメータを用いて、シスト構造の形成に対する数値シミュレーションを行った。

研究成果の概要(英文)：Construction of 3D structures by multi cellular system, such as blood vessel, clusters of air-exchanging sacks, produces specific functions. To construct 3D structures, cells should move collectively. However, the mechanism of cellular collective movement is not unclear yet. This project is aimed to elucidate mechanism of cellular collective movement by developing cell tracking system, 2D and 3D cellular traction force measurement, cell junction protein-knockout cell lines. In addition, we simulated multi cellular collective movement by making motion equation for cells. Combination of cell tracking system and established knockout cell lines showed that collective movement requires a cell-cell junction protein. The results of computer simulation indicated that important factor is not only cell-cell contact but also cellular modulate elasticity. These findings may be useful to design an intended 3D structure in the field of tissue regeneration.

研究分野：生物物理学

キーワード：生命現象の物理 多細胞の協同運動 力学計測 細胞接着 3次元構造体形成

1. 研究開始当初の背景

生体内で細胞集団は、血管のようなパイプ構造や肺胞のような球殻構造など形態を作り出すことによって特定の機能を生み出している。これらの構造は多細胞の協同性のもとに作り出される。細胞間の協同機構解明は、現在非常に多くの研究がおこなわれている一細胞に関する遺伝子・タンパク等の分子レベルの研究では限界がある。この機構解明には、協同性を実験的に研究できる細胞系と一細胞を超えた新たなアプローチが必要である。

最近、培養上皮細胞を柔らかいゲル基盤上で培養した場合、集団運動を示すことを我々のグループは見出し、さらにその個々の細胞の個別ランダム運動が協同して方向性のある集団運動を作り出す過程を解析した結果、細胞間の速度方向の相関長が、培養時間（細胞密度）に応じて発散的に伸びることを見出した。すなわち細胞運動の集団化には動的相転移的な振る舞いがあるといえる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、多細胞集団が巨視的な形態を形成する際の力学機構を明らかにすることである。そのために、3次元培養環境でシスト構造を形成する細胞集団を用いて、細胞と細胞の接着を決定する因子の同定し、細胞と基質間の接着力と細胞が出す力の空間分布を評価する技術を開発する。力学バランスの観点から細胞達による集団運動の機構を解明する。また、細胞集団の周辺のゲル基質を染色し、蛍光像の時間変化から細胞外基質における応力分布を解析するプログラムを開発する。さらには、数値シミュレーションを用いることによって、細胞集団の運動を数理的に表現する。

3. 研究の方法

(1) 細胞集団による協同運動を定量的に評価するために、細胞の核をGFPで光らせた細胞株を作製し、蛍光顕微鏡下で細胞の動きを観察する。細胞核の移動を個々の細胞の運動と定義して、運動の速度ベクトルを算出し、速度ベクトルの空間相関値を協同運動の程度を示す指標とする。

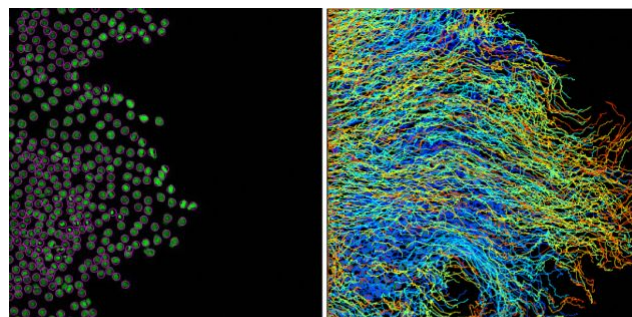
協同運動に重要な因子を同定するために、ゲノム編集技術を用いて細胞 - 細胞間の接着関連遺伝子を欠損させた細胞株を樹立する。

(2) 3次元環境下での細胞や細胞集団が運動する際に発生する力を計測するために、ゲル基質を蛍光標識して、細胞の力によってゲルに発生した変形を蛍光顕微鏡と画像解析で評価する。ゲル基質の物性値を原子間力顕微鏡で計測することで、歪の情報から応力値への変換を行う。

細胞集団が3次元シスト構造を形成する際の動きを観察することで、構造体形成の過程を計測する。更に、過去の文献から得た細胞とゲル基質の物性値を元にして、細胞運動に対する運動方程式を立て、数値シミュレーションを行う。

4. 研究成果

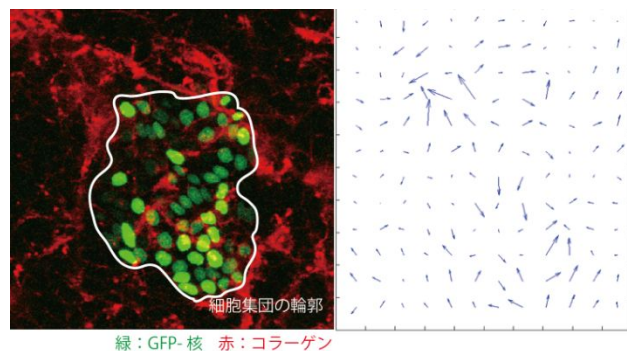
(1) 培養条件下での個々の細胞の動きを計測するシステムを構築した（下図に解析例を示す）。これにより、細胞集団内での個々の細胞の動きを計測することが可能となった。



細胞核の蛍光像

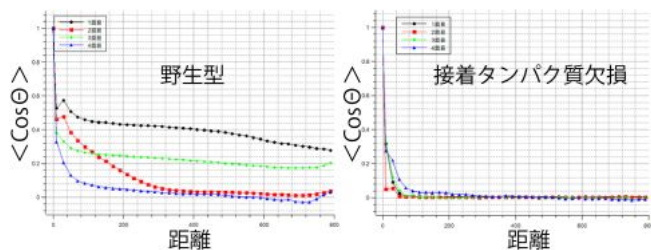
細胞運動に伴う細胞核のトラッキング

さらに、蛍光標識したゲル基質上に細胞集団を培養して、タイムラプス観察を行い、細胞がゲル基質に発生させていた力を可視化することにも成功した（下図）。



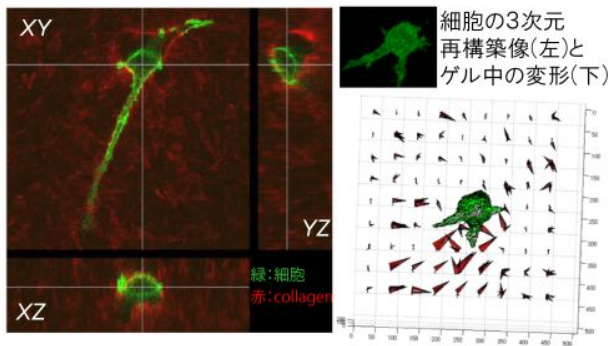
緑：GFP-核 赤：コラーゲン

ゲノム編集技術を用いて細胞 - 細胞間の接着関連タンパク質を欠損させた細胞株を樹立した後に、上述の細胞運動解析システムを用いて、細胞集団運動における空間相関値を計測し、野生型と比較した（下図）。その結果、この接着タンパク質の欠損が集団運動の協同性を著しく低下させることを見出した。

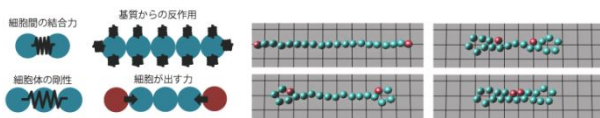


(2) 3次元環境で培養された細胞が出す力を測定する実験法を開発した（次ページ図）。蛍光標識したゲル基質中に別の色で標識した細胞を3次元培養して、細胞運動時にゲルに発生する力の3次元空間分布を計測することに成功した。細胞が発生する力は当局的ではなく、突起を進展させている箇所集中していることが明らかとなった。

変位ベクトルから数値解析によってコラーゲンゲル中に生じた歪や細胞の力を解析



上皮細胞をコラーゲンゲル上に培養し、その上にさらなるコラーゲンゲルを重層すると、細胞集団が折り返し運動をして、最終的には中心が空洞のシスト構造を形成する。この細胞の3次元運動を細胞間の接着力、細胞の収縮力、細胞の弾性、等のパラメータを用いた数値シミュレーションで表現することに成功した(下図)。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計14件)

Osamu Sato, Satoshi Komatsu, Tsuyoshi Sakai, Yoshikazu Tsukasaki, Ryosuke Tanaka, Takeomi Mizutani, Tomonobu M. Watanabe, Reiko Ikebe, and Mitsuo Ikebe, "Human myosin VIIa is a very slow processive motor protein on various cellular actin structures", 査読有、The Journal of Biological Chemistry, Vol.292(26) (2017) 10950-10960.

DOI: 10.1074/jbc.M116.765966

Jiafeng Yao, Michiko Sugawara, Hiromichi Obara, Takeomi Mizutani, Masahiro Takei, "Distinct Motion of GFP-Tagged Histone Expressing Cells Under AC Electrokinetics in Electrode-Multilayered Microfluidic Device", 査読有、

IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems, Vol.11(6) (2017) 1450-1458.

DOI: 10.1109/TBCAS.2017.2729584

Akihiro Nukuda, Hiroki Endoh, Motoaki Yasuda, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, Hisashi Haga, "Role of ATF5 in the invasive potential of diverse human cancer cell lines", 査読有、Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.474(3) (2016) 509-514.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.131

Takeomi Mizutani, Kazuya Furusawa, Hisashi Haga, Kazushige Kawabata, "Heterogeneous Filament Network Formation by Myosin Light Chain Isoforms Effects on Contractile Energy Output of Single Cardiomyocytes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells", 査読有、

Regenerative Therapy, Vol.3 (2016) 90-96.

DOI: 10.1016/j.reth.2016.02.009

Takeomi Mizutani, Hisashi Haga, Kazushige Kawabata, "Data set for comparison of cellular dynamics between human AAVS1 locus-modified cells and wild type cells", 査読有、

Data in Brief, Vol.6 (2016) 793-798.

DOI: 10.1016/j.dib.2015.12.053

Misako Imai, Kazuya Furusawa, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, Hisashi Haga, 査読有、"Three-dimensional morphogenesis of MDCK cells induced by cellular contractile forces on a viscous substrate"

Scientific Reports, Vol.5 (2015) 14208.

DOI: 10.1038/srep14208

Akihiro Nukuda, Chie Sasaki, Seiichiro Ishihara, Takeomi Mizutani, Kiminori Nakamura, Tokiyoshi Ayabe, Kazushige Kawabata, Hisashi Haga, 査読有、

"Stiff Substrates Increase YAP-Signaling-Mediated Matrix Metalloproteinase-7 Expression"

Oncogenesis, Vol.4 (2015) e165.

DOI: 10.1038/oncsis.2015.24

Takeomi Mizutani, Rui Li, Hisashi Haga, Kazushige Kawabata, 査読有、

"Transgene Integration into the Human AAVS1 Locus Enhances Myosin II-Dependent Contractile Force by Reducing Expression of Myosin Binding Subunit 85"

Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.465(2) (2015) 270-274.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.018

Hiro-taka Masuda, Seiichiro Ishihara, Ichiro Harada, Takeomi Mizutani, Masayori Ishikawa, Kazushige Kawabata, Hisashi Haga, 査読有、"Coating extracellular matrix proteins on a (3-aminopropyl)triethoxysilane-treated glass substrate for improved cell culture"

Biotechniques, Vol.56(4), (2014) 172-9.

DOI: 10.2144/000114156

Sumire Ishida, Ryosuke Tanaka, Naoya Yamaguchi, Genki Ogata, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, Hisashi Haga, 査読有、

"Epithelial sheet folding induces lumen formation by Madin-Darby canine kidney cells in a collagen gel"

PLoS One, Vol.9(8) (2014) e99655.

DOI: 10.1371/journal.pone.0099655

Takeomi Mizutani, Kazuki Takeda, Hisashi Haga, Mitsugu Todo, Kazushige Kawabata, 査読有、"Modulation of extracellular conditions prevents the multilayering of the simple epithelium"

Histochemistry and Cell Biology, Vol. 141(5), (2014) 459-471.

DOI: 10.1007/s00418-013-1176-8

Seiichiro Ishihara, Motoaki Yasuda, Ichiro Harada, Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, Hisashi Haga、査読有、
"Substrate stiffness regulates temporary NF-
B activation via actomyosin contractions"
Experimental Cell Research, Vol. 319(19)
(2013) 2916-2927.
DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.09.018

Xue Li, Seiichiro Ishihara, Motoaki Yasuda, Takeshi Nishioka, Takeomi Mizutani, Masayori Ishikawa, Kazushige Kawabata, Hiroki Shirato, Hisashi Haga、査読有、
"Lung cancer cells that survive ionizing radiation show increased integrin $\alpha 2 \beta 1$ - and EGFR-dependent invasiveness"
PLoS One, Vol. 8(8) (2013) e70905.
2916-2927.
DOI: 10.1371/journal.pone.0070905

Ryosuke Tanaka, Takeomi Mizutani, Hisashi Haga, Kazushige Kawabata、査読有、
"Tempo-Spatial Change of Cellular Stiffness and Geometry in the Process of Developing Epithelial Cell-Cell Adhesion Measured by Atomic Force Microscopy"
Japanese Journal of Applied Physics Conference Proceedings, Vol. 1 (2013) 011004 (7 pages).
DOI: 10.7567/JJAPCP.1.011004

〔学会発表〕（計5件）

中澤里紗、水谷武臣、芳賀永、「ゼブラフィッシュの胚発生におけるミオシン調節軽鎖10の役割」、第3回北大・部局横断シンポジウム、北海道大学医学部学友会館フラテホール（北海道・札幌市）、2018年1月26日

Takeomi Mizutani, Kazushige Kawabata, 「Roles of adherence junction proteins in the collective cell movement in vitro and vivo」、日本生物物理学会54回年会、つくば国際会議場（茨城県・つくば市）、2016年11月26日

Takeomi Mizutani, Hisashi Haga, Kazushige Kawabata, 「多細胞の協同運動における力学量の計測と制御」、日本生物物理学会53回年会、金沢大学（石川県・金沢市）、2015年9月13日

Rui Li, Takeomi Mizutani, Hisashi Haga, Kazushige Kawabata, 「ミオシン結合タンパク質の消失は細胞が出す力に影響を与えるのか」、日本生物物理学会52回年会、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）、2014年9月26日

水谷武臣、「細胞の力学コミュニケーション」、研究所セミナー、大阪府立母子保健総合医療センター研究所（大阪府・和泉市）、2013年11月6日

〔その他〕
ホームページ等
<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

水谷 武臣 (MIZUTANI, Takeomi)
北海学園大学・工学部・准教授
研究者番号：40451405

根本 幸児 (NEMOTO, Koji)
北海道大学・理学研究院・教授
研究者番号：60202248