

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2014

課題番号：26891012

研究課題名(和文) 創傷治癒における細胞集団の協調メカニズムの探索

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of collective cell movement during wound healing

研究代表者

進藤 麻子 (Shindo, Asako)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60512118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：生物の体内の組織・器官形態の形成、維持、および修復は、組織・器官を構成している細胞集団が制御され、適切に移動することでなされており、そのメカニズム解明は生物学的に重要な課題である。本研究ではモデル動物の胚性表皮における創傷治癒機構に着目し、創傷を閉鎖する細胞集団を制御するメカニズムを探索した。胚性表皮の創傷は創傷辺縁に蓄積する細胞骨格アクチンとミオシンにより成体よりも迅速に閉鎖される。今回、アクチン・ミオシンの機能には細胞骨格セプチンが必要であることが新たに判明した。セプチンはアクチン・ミオシンの動態を介して各細胞の形態変化や移動を制御し、細胞集団の協調的な動態に貢献していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Collective cell movement is a fundamental cellular event for tissue morphogenesis and repair. The molecular mechanisms of the coordinated cell behaviors are largely unknown. In this research, we have focus on embryonic epithelial wound healing as a model, and analyzed the process of cell shape change and cell movement. It has been known that the driving force for cell movement during embryonic wound closure is contractile force generated by actomyosin at the wound edge. We have found that the actomyosin requires septins, a cytoskeletal element, to close the wound. We concluded that septins controls cell shape and movement to coordinate the collective cell movement in the tissue via actomyosin.

研究分野：細胞生物学、発生生物学

キーワード：創傷治癒 細胞集団 細胞骨格

## 1. 研究開始当初の背景

生物の体内の組織・器官はそれぞれ独自の形態を持ち、その形態は各組織・器官を構成する細胞が、集団となって協調した移動や変形を行うことにより作られる。これは主に胚発生過程で見られる現象であるが<sup>1</sup>、それ以外にも創傷を受けた組織の修復過程<sup>23</sup>などで同様の細胞集団運動が見られる。また、様々な病態を示す器官においては、正常な形態維持機構が失われ、異常な形態を示すことで機能不全に拍車をかける場合も多い。しかし、組織形態の基盤となる細胞集団の動態制御機構には不明点が多い。

上述したような組織形態の基盤となる協調的な細胞集団運動を可能にするためには、集団内の適切な細胞で、かつ適切なタイミングで細胞骨格が制御、再分配されることが必要である。そのため、各細胞内の動態に着目した組織・器官の形態制御機構は生物学・医学上最も重要な分野の一つであり、その分子メカニズムの解明が求められていた。

## 2. 研究の目的

細胞集団の動態を制御するメカニズムを探索するため、協調的な細胞運動を示す過程における細胞骨格動態とその制御機構、およびそれらと細胞形態・細胞移動の関連を明らかにすることを第一の目的とした。本研究では、アフリカツメガエル胚をモデルとし、個々の細胞動態や細胞骨格の可視化が容易な系である、胚性表皮の創傷治癒を細胞集団運動のモデルとし、創傷の閉鎖過程を詳細に解析することにより細胞集団運動の制御メカニズムの解明を目指した。

まず、創傷の閉鎖を担う細胞集団の運動に必須と考えられている細胞骨格アクチン・ミオシン<sup>4</sup>を可視化し、その局在や活性の制御メカニズムの解明を目指した。さらにその制御因子の候補として別の細胞骨格セプチン<sup>56</sup>の役割に着目し、その機能を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、迅速な創傷閉鎖を示すことが知られていたアフリカツメガエル尾芽胚の表皮を用いた。本研究の目的に必須である遺伝子操作や細胞骨格の可視化など、発生生物学的手法が応用できる点が利点である。アフリカツメガエル尾芽胚の表皮に、細胞膜およびアクチンを標識する蛍光蛋白質をマイクロインジェクションにより発現させ、ピンセット、またはレーザーを用いて微小な創傷を作成した。その後のアクチン局在および細胞の形態変化と移動を共焦点顕微鏡にて経時的に撮影した。また、細胞骨格セプチンの

ノックダウンを行い、アクチンと細胞動態に対するセプチンの役割を検証した。セプチンの役割解明のため、セプチンの相互作用蛋白質の創傷治癒における役割も検討した。より微細な細胞内構造を解析するため、電子顕微鏡を用いた。

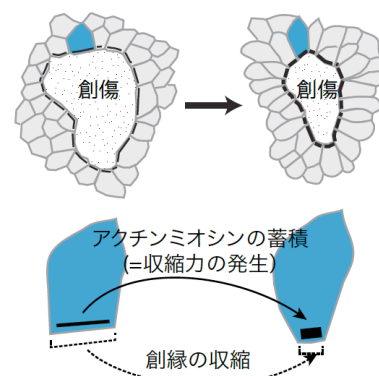
## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

アフリカツメガエル尾芽胚表皮の創傷は、創傷の辺縁に蓄積される細胞骨格、アクチンとミオシンを動力として細胞が移動と形態変化を生じ、閉鎖される。蓄積したアクチンとミオシンは創傷の辺縁で収縮力を発生し、巾着袋を閉める要領で創傷を閉鎖するとされている(図1・創傷に接する黒線(太)がアクチン・ミオシン)。本研究におけるイメージングでも、アクチン線維が創傷の辺縁に蓄積している様子が確認され、その細胞辺が短縮する過程が撮影された。また、創傷閉鎖過程では創傷に接する細胞の伸長も顕著であることがわかった(図1, 青色細胞の形が閉鎖過程で細長く変化)。

今回、創傷を閉鎖するアクチンとミオシンの機能に、もう1つの細胞骨格であるセプチンの機能が必要であることを見いだした。研究代表者の過去の研究では、セプチンとアクチン・ミオシンが組織形成を担う細胞集団の動態に必須であることを示している。<sup>7</sup>本研究ではセプチンが同様の機能を果たしていることを予想し、セプチンのノックダウンを行い、創傷の閉鎖過程を観察した。予想した通り、細胞をセプチンの不足状態にすると、アクチン、ミオシンによる創縁の収縮が十分に生じず、創傷の閉鎖が阻害されるか、正常よりも遅く閉鎖するという結果が得られた。このことは、アクチン・ミオシンの適切な収縮力発生にセプチンが必須であることを示している。また、セプチンの機能は、この創傷に接する細胞の形態変化にも必要である事が判明した。胚発生過程における組織の形態形成においてもセプチンはアクチン・ミオシ

図1. 創傷閉鎖におけるアクチン・ミオシンの役割



ンを制御することから<sup>7</sup>、セプチンとアクチン・ミオシンは細胞集団の動態にとって普遍的に重要な機能をもつ可能性が見いだされた。

次に、セプチンがいかにしてアクチン・ミオシンを制御しているか、その詳細を解明するために蛍光蛋白質を用いた観察、解析に加え、電子顕微鏡による観察も開始した。また、セプチンとアクチン・ミオシンの相互作用に機能的に関わると予想された細胞骨格関連因子の創傷治癒における役割も検証した。興味深いことに、それらの機能阻害もまた創傷治癒の遅延または阻害を引き起こすことがわかってきている。これらに加え、セプチンとアクチン・ミオシンを制御していると予想される上流の制御因子の探索も開始している。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究の成果は、主に以下の三点において意義があると考えられる。

第一に、セプチンの機能が多岐にわたることを示唆した点である。セプチンは、主要な細胞骨格であるアクチン、微小管に比べ、その機能には未だ不明点が多い細胞骨格である。しかしその機能は胚の様々な組織、器官の形成に必要であることが示唆されており、様々な実験系での解析が求められていた。今回見いだされた創傷閉鎖における必須の機能は、細胞集団運動という生物にとって根幹となる現象にセプチンが深く関わることを示している。また、組織の形態制御においても、セプチンは必須の役割をもつことがわかっており、本研究によりセプチンが関わる細胞集団運動は多岐にわたる可能性が提唱されることとなった。また、細胞集団に必須な駆動力であるアクチン・ミオシンの機能に対するセプチンの役割を解析することは、細胞が集団として協調した振る舞いを示すメカニズムの解明につながる可能性がある。

本研究の第二の意義として、創傷治癒過程に新たな知見が得られたことがあげられる。胚性表皮の創傷は迅速に閉鎖することが知られていた。また、その迅速な閉鎖が細胞にとって必須の駆動力であるアクチン・ミオシンが発生する収縮力にあることは知られていたが、その制御メカニズムには不明点が多かった。今回、セプチンが創傷閉鎖に必須であること、さらにセプチンと相互作用すると予想された細胞骨格系の因子もまた創傷閉鎖に必須であることが示されたが、それらがアクチン・ミオシンの制御メカニズムの解明につながることを期待される。

第三の意義として、細胞にとって異常状態である創傷治癒過程に、胚発生過程などの正常状態で機能している細胞の駆動力が共通して利用されている可能性が示されたことがあげられる。今回、セプチンとアクチン・

ミオシンという胚発生に機能している細胞駆動力が、同じく創傷治癒過程でも機能していることが見いだされたことは、生物の体が異常状態に対してどのような対策を持っているのかを考える点で興味深い。また、正常状態と異常状態の共通点、相違点を理解する上でも重要な発見と言える。今後の解析で、セプチンのアクチン・ミオシンに対する制御機構が詳細に解明されれば、創傷閉鎖のみならず、組織の形態制御機構解明にも応用できる可能性もある。

(3) 今後の展望

今回、セプチンが迅速な創傷閉鎖に必須であることが示されたが、このセプチンの機能を人為的に操作できれば、創傷閉鎖のコントロール、さらには組織形態の制御方法を見いだすきっかけとなる可能性がある。また、胚性表皮でみられる迅速な創傷閉鎖機構が、成体の創傷閉鎖の制御に応用可能か否か検証していくためにもアクチン・ミオシンおよびセプチンの機能解析は重要であると考えられる。今後は引き続き胚性表皮の創傷閉鎖過程におけるセプチンの機能をより詳細に解析するために、セプチンと共に機能していると予想される他の細胞骨格関連因子の制御機構を詳細に解明していく。さらに、セプチンと相互作用する新たな蛋白質の同定も目指す。セプチンとアクチン・ミオシンの細胞集団運動における普遍的な機能が示されたことから、今後得られる新たな成果は胚性表皮の創傷治癒のみならず、胚発生過程で見られる組織・器官形成過程といった、細胞集団の運動が関わる現象の普遍的なメカニズムの解明に貢献することが期待できる。

[引用文献]

1. Rørth, P. Collective cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 407–429 (2009).
2. Martin, P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. (1997). doi:10.1126/science.276.5309.75
3. Martin, P. & Lewis, J. Actin cables and epidermal movement in embryonic wound healing. *Nature* **360**, 179–183 (1992).
4. Lecuit, T., Lenne, P.-F. & Munro, E. Force Generation, Transmission, and Integration during Cell and Tissue Morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 157–184 (2011).
5. Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F. & Mitchison, T. J. Self- and actin-templated assembly of

Mammalian septins. *Dev. Cell* **3**,  
791–802 (2002).

6. Mostowy, S. & Cossart, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 183–94 (2012).
7. Shindo, A. & Wallingford, J. B. PCP and septins compartmentalize cortical actomyosin to direct collective cell movement. *Science* **343**, 649–52 (2014).

#### 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 0 件)  
該当なし

[学会発表] (計 1 件)  
① 進藤 麻子, Septins control contractile forces during collective cell movement. 第37回日本分子生物学会 2015年11月25日、パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)  
該当なし

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

進藤 麻子 (SHINDO, Asako)  
名古屋大学・理学研究科・助教  
研究者番号: 60512118

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし