

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26247070

研究課題名(和文)細胞遊走現象における細胞骨格の非平衡ダイナミクス

研究課題名(英文)Non-Equilibrium Dynamics of Cytoskeleton During Cell Migration

研究代表者

田中 求 (Tanaka, Motomu)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点教授

研究者番号：00706814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞遊走現象における接着に誘起される張力と細胞骨格の非平衡ダイナミクスの相関を解明することを目指す。具体的には、細胞と基板の力学的カップリングを空間的に制御可能な新しい実験系として、申請者の専門である精密に機能化された細胞膜モデルを用いる。独自に開発した物理学的手法を駆使して、細胞接着とそれに誘起される張力を定量し、これが細胞内微小空間における細胞骨格の自己秩序化や遊走の時空間パターンに与える影響を解析する。顆粒細胞ニューロンと、癌細胞を用いた実験を行い、異なるモードの遊走や形態変化を比較することで、自己駆動する細胞内での骨格タンパクの動態の本質を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：The main thrust of this study is to unravel the correlation between adhesion-induced tension and cytoskeleton dynamics out of equilibrium. Precisely functionalized planar lipid membranes (supported membranes) are used as a quantitative surrogate surface to modulate the coupling between cells and model surfaces. Unique experimental techniques developed in our lab are utilized to unravel the influence of adhesion-induced tension on the active ordering of cytoskeletons and the spatio-temporal patterns in cell migration. The experiments with cells undergoing different modes of deformation and migration, such as neural granule cells and cancerous epithelial cells, enable to gain general principles of non-equilibrium dynamics of cytoskeletons inside self-propelled, crawling cells.

研究分野：数物系科学

キーワード：生命現象の物理 形状と運動 細胞遊走

1. 研究開始当初の背景

物理学の視点から自然界を見た場合「生命」は究極の動的な非平衡開放系として考えることができる。例えば、丸い細胞が極性を持ち、目的の部位へと自己駆動する細胞遊走現象は、器官形成や病的過程においても重大な役割を果たす。

この中で一つの流れは細胞の人工モデルを用いた人工生物学で、日本発の研究としては細胞の自己増殖モデルなどの成果が上がっている。一方で、非平衡統計力学からのアプローチとして、生物・非生物を問わず、自己駆動するシステムを統一的に扱おうとするのが「アクティブマター物理」である。

この二つのアプローチを統合するものとして、現在「Physics of Active Soft Matter」が世界的な新しい流れとなりつつある。

2. 研究の目的

上記のような流れの中で、本研究では細胞遊走現象における接着に誘起される張力と細胞骨格の非平衡ダイナミクスの相関を解明することを目指す。

ここでは、細胞と基板の力学的カップリングを空間的に制御可能な新しい実験系として、申請者の専門である精密に機能化された細胞膜モデルを用いる。独自に開発した物理学的手法を駆使して、細胞接着とそれに誘起される張力を定量し、これが細胞内微小空間における細胞骨格の自己秩序化や遊走の時空間パターンに与える影響を解析する。

顆粒細胞ニューロンと、癌細胞を用いた実験を行い、異なるモードの遊走や形態変化を比較することで、自己駆動する細胞内での骨格タンパクの動態の本質を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

精密に機能化した細胞膜モデルを用いて、細胞遊走運動における、細胞接着の時空間展開と細胞骨格の非平衡ダイナミクスの相関を解析する。

まず、接着の位置や強度、また接着に誘起される張力を独自の物理学的手法を用いて接着分子の表面密度の関数として定量する。次に、固定化したサンプルの顕微鏡画像から解析する「静的」なアプローチと、細胞骨格蛋白の細胞内での流れを可視化する「動的」なアプローチを組み合わせ、細胞内での微小管とアクチンの動態を解析する。

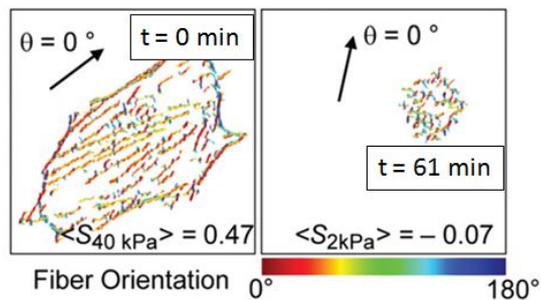
進行方向に数百マイクロンにおよぶ先導突起を伸ばし、微小管とアクチンを用いて核を運搬する神経顆粒細胞と、アクチンに依存して

細胞全体が推進する胃癌細胞という、二つの異なるモードの運動を行う二つの細胞系を比較することで、細胞種をこえた統一的な理解を目指す。

4. 研究成果

(1) 細胞骨格の秩序変数解析手法の確立

研究代表・田中と研究分担・吉川は、これまでにパラフォームアルデヒドなどで化学的に固定した細胞の細胞骨格の秩序変数の定量解析を開拓してきた (Yoshikawa... Tanaka, *J Phys Chem B*, 117, 4081 (2013)). 具体的には、非対称ガウシアンフィルターのラプラス変換により、最大のレスポンス画像を抽出し、そこで認識されたアクチン細胞骨格が細胞の長軸方向に対してなす角度 θ の分布から、ネマティック秩序変数 $\langle S \rangle = \langle \cos 2\theta \rangle$ を計算した。

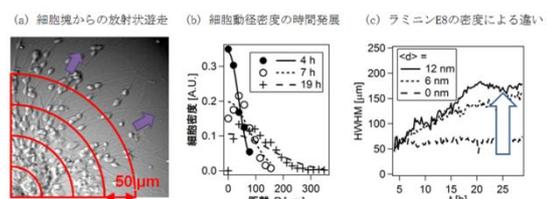


この手法をさらに生細胞へと大きく応用展開して、筋芽細胞内のアクチン細胞骨格をLifeActで染色し、外部の力学的微小環境の動的な変化に対する秩序変数の時間発展をライブで追跡することに成功した (Inoue... Tanaka, *Biomaterial Sciences* 3, 1539 (2015)). さらにこの解析手法をヒト骨髄由来の間葉系幹細胞の動的制御に応用した研究を、もう一報の論文として発表している (Frank... Tanaka, *Scientific Reports* (2016) Hot Topic として特集)。

本研究では、これをマウス神経顆粒細胞とヒト胃癌細胞に応用することにより、丸い細胞が細胞内部構造の秩序変数の不連続変化に伴って対称性の破れを引き起こし、細胞遊走に至る過程の解析に用いている。

(2) 神経細胞の遊走運動解析

ここでは、分担研究者・見学とともに、脳皮質形成期のニューロン細胞の遊走における、細胞接着に誘起される細胞の変形と運動に注目した。

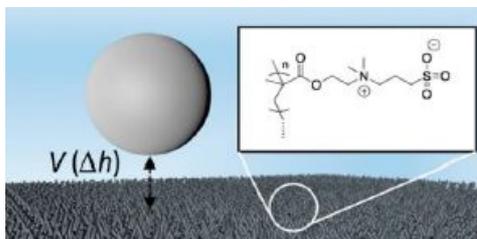


神経細胞移動のモデルとして用いる小脳

顆粒細胞の分散培養系については、もっとも生体実験に近い結果を示した、オリゴヒスチジンで修飾されたラミニン E8 フラグメントで機能化した生体膜モデル系を用いて実験系を確立した。顆粒細胞がその再凝集体から放射状に遊走する際の疎視化した集団ダイナミクスが、ラミニンの膜表面での分子間距離に非常に敏感に依存することを見出した (Yamamoto,...Kengaku, Tanaka, 投稿準備中)。

(3) 界面相互作用ポテンシャル計測

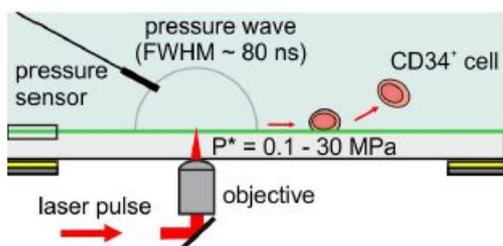
研究代表・田中は、円偏光した単色光の界面での多重反射を用いた「反射干渉顕微鏡」という独自の手法を用いて、生体界面における細胞形状のラベルフリー解析を行ってきた (Kindl,... Tanaka, *Journal of Physics Condensed Matter* (2009)など)。



本研究ではこの技術をさらに発展させて、細胞や細胞サイズの粒子が界面近傍で行う垂直方向のブラウン運動を解析し、その高さ分布関数 $P(h)$ から界面ポテンシャル $V(h) = kT \ln P(h)$ を計算することに、刺激応答性ヒドロゲル (Monzel,... Tanaka, *Langmuir* (2015)) や双イオン性高電解質 (Higaki,...Tanaka, *The Journal of Physical Chemistry B* (2017)) を用いて成功した。

(4) 細胞接着力の定量計測

研究代表・田中と研究分担・吉川は、対物レンズを通じて集光した強力なピコ秒レーザーパルスによって誘起される、超音速で水中を伝播する圧力波を用いて、細胞接着強度を細胞にダメージを与えることなく計測可能にする新技術を開発した (Yoshikawa,...Tanaka, *Journal of American Chemical Society* 133, 1367 (2011), *J Phys Chem B* 116, 8024 (2012))。

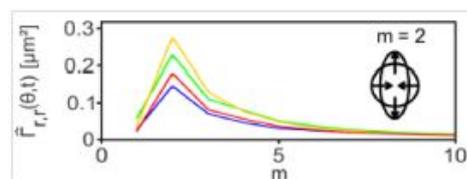


ここではこの技術を、健康なドナーから提供されたヒト臍帯血や循環血中の造血幹細胞が、骨髄モデルに接着する強度の精密定量に応用し、さらに健康な幹細胞と「血液のが

ん」である急性骨髄性白血病患者の芽球細胞との接着強度が大きく異なることを示した (Burk,...Yoshikawa,...Tanaka, Ho, *Sci Rep* (2015))。またピエゾスキャナを組み合わせることにより時間分解能をあげることに成功し、これによってマラリアの胎内感染を引き起こす、マラリア感染赤血球の胎盤表面への沈着強度の時間発展を定量することにも成功するなど、本技術を大きく展開させている (Rieger, Yoshikawa,...Tanaka, Lanzer, *Blood* (2015) Editor's Choice)。

(5) 細胞の自発変形・運動と疾患

ここでは、細胞接着に誘起される細胞の変形と運動を定量解析する手法を開拓した。具体的には、変形のフーリエ変換しパワースペクトル $\hat{f} = \langle c_m c_{m-} \rangle / \sum \langle c_m c_{m-} \rangle$ から細胞が自発変形によって散逸するエネルギーを見積もったり、細胞遊走の緩和を持続時間 τ $e^{-t/\tau} = \langle \cos \zeta(t) \cos \zeta(0) + \sin \zeta(t) \sin \zeta(0) \rangle$ から計算した。



これにより、ヒト造血幹細胞では細胞は主に $m = 2$ の楕円形の自発変形を行ってエネルギーを散逸すること、またそのエネルギー散逸が 5 ng/mL のような非常に微量のケモカインによって強く抑制されることなどを見出した (Burk,...Yoshikawa,...Tanaka, Ho, *Scientific Reports* (2015))。この手法をさらに応用することによって、上皮選択的なたんぱく質 CD44 の機能喪失が皮膚損傷の回復を遅らせるという現象論的観測が、細胞変形と遊走の抑制によって引き起こされることを定量的裏づけることに成功した (Shatlishvili,...Tanaka, Rousseau, *Cell Death and Diseases* (2016))。

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21件)

1. Korytowski, A.; Abuillan, W.; Amadei, F.; Makky, A.; Gumiero, A.; Sinning, I.; Gauss, A.; Stremmel, W.; Tanaka, M., Accumulation of phosphatidylcholine on gut mucosal surface is not dominated by electrostatic interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2017**, 1859, 959-965. 査読有

- DOI: 10.1016/j.bbame.2017.02.008
2. Higaki, Y.; Fröhlich, B.; Yamamoto, A.; Murakami, R.; Kaneko, M.; Takahara, A.; Tanaka, M., Ion-Specific Modulation of Interfacial Interaction Potentials between Solid Substrates and Cell-Sized Particles Mediated via Zwitterionic, Super-Hydrophilic Poly(sulfobetaine) Brushes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121*, 1396-1404 查読有
DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b11540
 3. Yoshikawa, H.Y.; Pink, D. A.; Acevedo, N. C.; Peyronel, F.; Marangoni, A. G.; Tanaka, M., Mechanical Response of Single Triacylglycerol Spherulites by Using Microcolloidal Probes. *Chemistry Letters* **2017**, *46*, 599-601 查読有
DOI: 10.1246/cl.170014
 4. Dai, W.; Lee, L.-T.; Schütz, A.; Zelenay, B.; Zheng, Z.; Borgschulte, A.; Döbeli, M.; Abuillan, W.; Kononov, O. V.; Tanaka, M.; Schlüter, A. D., Three-Legged 2,2'-Bipyridine Monomer at the Air/Water Interface: Monolayer Structure and Reactions with Ni(II) Ions from the Subphase *Langmuir* **2017**, *33*, 1646-1654 查読有
DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b04282
 5. Murakami, R.; Tsai, C.-H. D.; Ito, H.; Tanaka, M.; Sakuma, S.; Arai, F.; Kaneko, M., Catch, Load and Launch toward On-Chip Active Cell Evaluation. *2016 Ieee International Conference on Robotics and Automation* **2016**, 1713-1718 查読有
 6. Shatirishvili, M.; Burk, A. S.; Franz, C. M.; Pace, G.; Kastilan, T.; Breuhahn, K.; Hinterseer, E.; Dierich, A.; Bakiri, L.; Wagner, E. F.; Ponta, H.; Hartmann, T. N.; Tanaka, M.; Orian-Rousseau, V., Epidermal-specific deletion of CD44 reveals a function in keratinocytes in response to mechanical stress. *Cell Death and Disease* **2016**, *7* e2461 查読有
DOI: 10.1038/cddis.2016.342
 7. Tsai, C.-H. D.; Horade, M.; Ito, H.; Kaneko, M.; Tanaka, M., High-Resolution Cell Manipulation for Longstanding Load on Red Blood Cells. *2016 Ieee International Conference on Mechatronics and Automation* **2016**, 914-919 查読有
 8. Hartel, A. J. W.; Glogger, M.; Jones, N. G.; Abuillan, W.; Batram, C.; Hermann, A.; Fenz, S. F.; Tanaka, M.; Engstler, M., N-glycosylation enables high lateral mobility of GPI-anchored proteins at a molecular crowding threshold. *Nature Communications* **2016**, 712870 查読有
DOI: 10.1038/ncomms12870
 9. Veschgini, M.; Gebert, F.; Khangai, N.; Ito, H.; Suzuki, R.; Holstein, T.; Mae, Y.; Arai, T.; Tanaka, M., Tracking mechanical and morphological dynamics of regenerating Hydra tissue fragments using a two fingered micro-robotic hand. *Applied Physics Letters* **2016**, *108*(10), 103702. 查読有
DOI: 10.1063/1.4943402
 10. Frank, V.; Kaufmann, S.; Wright, R.; Horn, P.; Yoshikawa, H. Y.; Wuchter, P.; Madsen, J.; Lewis, A. L.; Armes, S. P.; Ho, A. D., Frequent mechanical stress suppresses proliferation of mesenchymal stem cells from human bone marrow without loss of multipotency. *Scientific reports* **2016**, *6*, 24264 查読有
DOI: 10.1038/srep24264
 11. Yamamoto, A.; Abuillan, W.; Burk, A. S.; Körner, A.; Ries, A.; Werz, D. B.; Demé, B.; Tanaka, M., Influence of length and conformation of saccharide head groups on the mechanics of glycolipid membranes: Unraveled by off-specular neutron scattering. *The Journal of Chemical Physics* **2015**, *142*(15), 154907. 查読有
DOI: 10.1063/1.4918585
 12. Rieger, H.; Yoshikawa, H. Y.; Quadt, K.; Nielsen, M. A.; Sanchez, C. P.; Salanti, A.; Tanaka, M.; Lanzer, M., Cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin-4-sulfate is cooperative and shear enhanced. *Blood* **2015**, *125*(2), 383-391. 查読有
DOI: 10.1182/blood-2014-03-561019
 13. Monzel, C.; Veschgini, M.; Madsen, J.; Lewis, A. L.; Armes, S. P.; Tanaka, M., Fine Adjustment of Interfacial Potential between pH-Responsive Hydrogels and Cell-Sized Particles. *Langmuir* **2015**, *31*(31), 8689-8696. 查読有
DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b01896
 14. Makky, A.; Tanaka, M., Impact of Lipid Oxidization on Biophysical Properties of Model Cell Membranes. *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, *119*(18), 5857-5863. 查読有
DOI: 10.1021/jp512339m

15. Korytowski, A.; Abuillan, W.; Makky, A.; Kononov, O.; Tanaka, M., Impact of Lipid Oxidation on Vertical Structures and Electrostatics of Phospholipid Monolayers Revealed by Combination of Specular X-ray Reflectivity and Grazing-Incidence X-ray Fluorescence. *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, 119 (30), 9787-9794. 査読有
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b04451
16. Ito, H.; Kuss, N.; Rapp, B. E.; Ichikawa, M.; Gutschmann, T.; Brandenburg, K.; Pöschl, J. M. B.; Tanaka, M., Quantification of the Influence of Endotoxins on the Mechanics of Adult and Neonatal Red Blood Cells. *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, 119 (25), 7837-7845. 査読有
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b01544
17. Inoue, S.; Frank, V.; Hörning, M.; Kaufmann, S.; Yoshikawa, H.Y.; Madsen, J.; Lewis, A.; Armes, S.; Tanaka, M., Live cell tracking of symmetry break in actin cytoskeleton triggered by abrupt changes in micromechanical environments. *Biomaterials science* **2015**, 3 (12), 1539-1544. 査読有
DOI: 10.1039/c5bm00205b
18. Herrmann, M.; Schneck, E.; Gutschmann, T.; Brandenburg, K.; Tanaka, M., Bacterial lipopolysaccharides form physically cross-linked, two-dimensional gels in the presence of divalent cations. *Soft Matter* **2015**, 11 (30), 6037-6044. 査読有
DOI: 10.1039/c5sm01002k
19. Nguyen, P. N.; Veschgini, M.; Tanaka, M.; Waton, G.; Vandamme, T.; Krafft, M. P., Counteracting the inhibitory effect of proteins towards lung surfactant substitutes: a fluorocarbon gas helps displace albumin at the air/water interface. *Chemical Communications* **2014**, 50 (78), 11576-11579. 査読有
DOI: 10.1039/c3cc47840h
20. Frenkel, N.; Wallys, J.; Lippert, S.; Teubert, J.; Kaufmann, S.; Das, A.; Monroy, E.; Eickhoff, M.; Tanaka, M., High Precision, Electrochemical Detection of Reversible Binding of Recombinant Proteins on Wide Bandgap GaN Electrodes Functionalized with Biomembrane Models. *Advanced Functional Materials* **2014**, 24 (31), 4927-4934. 査読有
DOI: 10.1002/adfm.201400388
21. Frenkel, N.; Makky, A.; Sudji, I. R.; Wink, M.; Tanaka, M., Mechanistic Investigation of Interactions between Steroidal Saponin Digitonin and Cell Membrane Models. *The Journal of Physical Chemistry B* **2014**, 118, 14632-14639. 査読有
DOI: 10.1021/jp5074939.
- 〔学会発表〕(計15件)
1. Motomu Tanaka, Spatio-temporal patterns in migrating cells: towards physical diagnosis of human diseases. Gordon Research Conference Biointerface Sciences (招待講演) 2016.6.12-2016.6.17 Les Diablerets (Switzerland)
 2. Motomu Tanaka, Quantitative physical tools for optimizing stem cell therapy of myeloid leukemia. MANA International Symposium 2016(招待講演) 2016.3.9-2016.3.11 国立研究開発法人物質・材料研究機構(茨城県つくば市)
 3. Motomu Tanaka, 臨床医学と物理学の出会い: 疾患の物理学. 物理学は生物現象の謎を解けるか(招待講演) 2016.1.5-2016.1.6 大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所(愛知県岡崎市)
 4. Motomu Tanaka, Spatio-Temporal Patterns of Migrating Cells Tracked on Supported Membranes. Tethered Membrane 2015 International Conference (招待講演) 2015.11.8-2015.11.11 Singapore
 5. Motomu Tanaka, Morphological Dynamics and Adhesion of Cells in Human Diseases. EMBO Conference "Physics of Cells" (招待講演) 2015.8.30-2015.9.4 Lichtenfels (Germany)
 6. Motomu Tanaka, Differential Morphological Dynamics and Adhesion between Human Hematopoietic Stem Cells and Blasts from Acute Myeloid Leukemia Patients. International Conference "System Biology of Human Diseases"(招待講演) 2015.7.1-2015.7.4 Heidelberg (Germany)
 7. Motomu Tanaka, Physics of Carbohydrates at Biological Interfaces. 76th Gifu Glycoscience Lecture(招待講演) 2015.6.29 岐阜大学(岐阜県岐阜市)
 8. Motomu Tanaka, Physics of Sugars at Interfaces: Electrostatics, Mechanics to Biological Functions. Hierarchical

- Structures and Dynamics at Soft Interfaces -from surfactants, cells to peacock's train- 2015.5.16 京都大学 (京都府京都市)
9. Motomu Tanaka, Physics Meets Clinical Medicine: Improvement of Acute Myeloid Leukemia Therapy Using Quantitative Readouts. International Mechanobiology Workshop (招待講演), 2015.4.16 東北大学 (宮城県仙台市)
 10. 田中求, 統計物理学と臨床医学. 革新的バイオマーカー創出と臨床応用講演会 (招待講演) 2015.1.30、大阪大学 (大阪府吹田市)
 11. Motomu Tanaka, Grazing Incidence X-Ray Diffraction and Scattering on Liquid Surfaces. Creation of Bio-Inspired, Non-Biological Mesoscale Hybrid Materials 2014.11.18-2014.11.19 京都大学 (京都府京都市)
 12. Motomu Tanaka, Extracting Information Behind Stochastic Cell Dynamics: What shape and Motion Talk. Japanese-German Mini-Symposium on "Quantitative Tools for the Analysis of Cancer Microenvironments" 2014.10.24 Heidelberg (Germany)
 13. Motomu Tanaka, Grazing Incidence X-Ray Diffraction and Scattering on Liquid Surfaces. International Symposium on Synthetic Two-Dimensional Polymers (招待講演) 2014.6.2-2014.6.3 Zurich (Switzerland)
 14. Motomu Tanaka, Life as Open Non-Equilibrium Systems (1,2). Kyoto Winter School for Statistical Mechanics, Frontiers in Statistical Mechanics: From Nonequilibrium Fluctuations to Active Matter (招待講演) 2015.2.4-2015.2.17 京都大学 (京都府京都市)
 15. Motomu Tanaka, What Shape and Motion Talk: Statistical Physics Meets Cancer. 8th IUPAP International Conference on Biological Physics (招待講演) 2014.6.18-2014.6.22 Beijing (People's Republic of China)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 培地用高分子ゲル、培地、細胞の培養方法及びキット
 発明者: 原田明、高島義徳、中畑雅樹、田中求、ホールニング・マルセル
 権利者: 同上
 種類: 特許

番号: 2016-148725
 出願年月日: 2016年7月28日
 国内外の別: 国内

名称: 検出方法及びデバイス
 発明者: 上野祐子、古川一暁、手島哲彦、田中求
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 2016-211569
 出願年月日: 2016年10月28日
 国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 求 (TANAKA, Motomu)
 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点教授
 研究者番号: 00706814

(2) 研究分担者

見学 美根子 (KENGAKU, Mineko)
 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授
 研究者番号: 10303801

(3) 連携研究者

鶴山 竜昭 (TSURUYAMA, Tatsuaki)
 京都大学・医学研究科・教授
 研究者番号: 00303842

吉川 洋史 (YOSHIKAWA, Hiroshi)
 埼玉大学・理工学研究科・助教
 研究者番号: 50551173

ホイザー ジョン (HEUSER, John)
 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点教授
 研究者番号: 40571815

吉川 研一 (YOSHIKAWA, Kenichi)
 同志社大学・生命医科学部・教授
 研究者番号: 80110823