

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23112005

研究課題名（和文）上皮管腔形成過程における細胞動態と機能分子動態の3次元イメージング解析

研究課題名（英文）Live-cell 3D imaging analysis of the dynamics of epithelial cells and functional molecules in epithelial tubular formation

研究代表者

大橋 一正（Ohashi, Kazumasa）

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：10312539

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 75,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、低分子量G蛋白質Rhoファミリーの活性化因子Rho-GEFであるFarp1とSoloの上皮細胞の管腔形成過程における機能を解析した。Farp1は、乳腺上皮細胞のインテグリンを介した接着依存的な増殖に寄与することを発見した。また、Soloは単層上皮特異的な中間径フィラメントであるケラチン8、ケラチン18に結合し、ケラチン8/18繊維の細胞内ネットワークの形成、維持に寄与することを発見した。また、Soloは細胞間接着からの張力に応答して機能すること、さらに、上皮細胞の集団移動速度の制御に寄与すること、上皮細胞の管腔形成において管腔の内腔の大きさの制御に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the roles of Rho-GEFs, Farp1 and Solo, which are involved in mechanoresponses, in the ordering and the tubule formation of epithelial cells. We found that Farp1 facilitates the adhesion-dependent growth of mammary epithelial cell through integrins. We found that Solo binds to a simple epithelium-specific intermediate filament, keratin8 and keratin18, and Solo is required to organize and maintain of the keratin8/18 network in epithelial cells. We also showed that Solo is required to activate RhoA and to generate the resistance force in response to tensile-force application. Furthermore, we showed that knockdown of Solo accelerates the velocity of collective cell migration of MDCK cells, and enlarges the lumen area of HGF-induced tubule of 3D-cultured MDCK cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：上皮細胞 上皮管腔組織 アクチン骨格 RhoGEF Rho メカノシグナル イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

上皮管腔組織が形成される過程において、個々の上皮細胞は三次元的な位置情報を認識し、協調的に極性化して管腔を形成する。これらの過程が円滑に進行するためには、細胞内シグナル伝達機構によって細胞骨格再構築、細胞-基質間、細胞間接着、極性形成を時空間的に厳密に制御しなければならない。これまで、二次元培養下における上皮細胞の極性化や細胞-基質間、細胞間接着の役割や分子機構は徐々に明らかとなってきたが、三次元環境下の細胞集団において細胞骨格の再構築やシグナル伝達分子の活性化状態の時空間的な変化が管腔の形成と伸長、分岐に果たす役割は不明であった。特に、このような管腔形成における細胞の形態形成、極性形成、細胞集団の運動といった現象には、細胞内アクチン骨格の時空間的な再構築制御が重要であり、また、細胞集団が秩序化して極性化し、管腔の形状を制御するために、細胞-基質間、細胞間接着から機械的刺激に対する応答(メカノストレス応答)が重要な役割を持つことが明らかとなりつつある。私たちは、細胞内アクチン骨格の再構築制御のシグナル伝達機構とその役割について生化学的な解析とイメージング技術を用いて解析してきた。これらの技術をもとに、上皮細胞集団が秩序化して管腔形成を行う過程で引き起こされるメカノストレス応答とそれによるアクチン骨格の再構築の時空間的制御機構の解明を行うことができるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、管腔組織の形成・維持過程において上皮細胞が外環境を感知し、アクチン骨格を中心とする細胞骨格、細胞接着、機械的力負荷、細胞極性、細胞分裂を時空間的に制御する分子機構をイメージング解析と分子の探索、機能解析によって解明することを目的とする。特に、上皮細胞集団が秩序化し極性化していく過程における外環境からメカノストレス応答に注目し、外環境の硬さや細胞間にかかる力によるアクチン骨格の再構築に参与する分子の網羅的探索を行いその制御機構を分子レベルで解明する。また、細胞-基質間、細胞間にかかる力を可視化するプローブの開発を行う。さらに、上皮管腔組織形成における三次元的な細胞集団の運動や形

態の制御におけるメカノストレス応答の関連分子の役割を解明する。本研究は上皮組織形成過程の基本的な細胞の動きや応答、また、その破綻による癌の悪性化の機構を理解するものであり、医療における基盤研究となることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 乳腺上皮細胞の細胞外基質の硬さ依存的な形質転換に關与するRho-GEFの探索  
正常乳腺上皮MCF10A細胞を1 mg/ml (約100 Pa)と3 mg/ml (約250 Pa)で重合させたコラーゲンゲル内で10日間培養し、3 mg/mlのコラーゲンゲルで細胞が大きなコロニーを形成すること確認した。DblファミリーのRho-GEF分子のほぼ全てに対するshRNA発現プラスミドを各々導入したMCF10A細胞を用いて同様の検討を行い、形成されたコロニーの大きさを測定して各々のRho-GEFの発現抑制の効果を評価した。

### (2) Soloの結合蛋白質の探索

Haloタグを付加したSolo (Halo-Solo)、Haloタグのみを恒常的に発現させた乳腺上皮由来のMCF7細胞を樹立し、その細胞より、Haloリガンドを固相化した磁気ビーズを用いてHalo-Solo、Halo蛋白質を沈降させ結合蛋白質をSDS-PAGEにより分離した。Haloタグのみの結合蛋白質と比較し、Halo-Solo特異的に共沈する分子を検出した。検出したSolo結合蛋白質をゲルより抽出し、質量分析によって蛋白質を同定した。

### (3) 細胞への張力負荷によるRhoAの活性化の検出

ファイブロンectinをコートした磁気ビーズと、IgG-Fc領域とE-カドヘリンの細胞外ドメインを融合した可溶型カドヘリンをプロテインA固相化磁気ビーズに結合させたものをMDCK細胞に接着させ、培養ディッシュの上から永久磁石を乗せることで、細胞に接着した磁気ビーズに張力を負荷した。直後に細胞を溶解し、RhotekinのRhoA結合ドメインとGSTの融合蛋白質により活性型RhoAを沈降させ、沈降した活性型RhoAをWestern blotにより検出しその量を測定した。

### (4) MDCK細胞の集団移動モデルの確立

1.6 mg/mlで重合させたコラーゲンゲル上に内径6 mmのクローニングシリンダーを置き、その中にMDCK細胞を細胞シートになる密度で播種した。細胞が接着した後、クロー

ニンゲシリンドーを取り除き、細胞シートの辺縁から突出する集団移動を5分毎でタイムラプス観察した。個々の細胞の移動の軌跡を追跡し、細胞集団の速度を計測した。

#### (5) 3次元培養下のMDCK細胞のHGF依存的な管腔形成モデルの確立

2 mg/mlで重合させたコラーゲンゲルの上に0.1 mg/mlのコラーゲンゲルに懸濁したMDCK細胞を播種し、硬いゲルと軟らかいゲルの境界面に細胞を置き培養した。HGFを50 ng/mlで添加してMDCK細胞の管腔形成を促進させた。2日から3日培養後、細胞を固定し、アクチン骨格を蛍光染色して観察し、管腔の形状、内腔の形状と大きさを測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 上皮細胞の基質への接着依存的な増殖におけるFarp1の機能解析

乳腺上皮細胞の細胞外基質の硬さ依存的な増殖に関するRho-GEFの網羅的探索を行い5種類のDblファミリー分子を同定することに成功した。その中でN末端にFERMドメインを有するFarp1に注目して研究を進めた。FERMドメインはIntegrinの細胞内ドメインと結合することが報告されていたことから、Integrinとの結合を解析した結果、Integrin  $\alpha 8$ と結合することが明らかとなった。さらに、Farp1の基質への結合依存的な細胞増殖に対する機能を解析するために、乳腺上皮MCF10A細胞においてFarp1の発現抑制を行い検証した。その結果、コラーゲン上への接着刺激によるMAPキナーゼの活性化においてFarp1が寄与することが明らかとなった。さらに、Farp1の発現抑制は、Hela細胞の細胞外基質への接着による細胞の広がりを抑制することが明らかとなった(論文準備中)。

#### (2) Soloの結合蛋白質としてのケラチン8/18の同定

これまでに、メカノストレスの一つである繰り返し伸展刺激による血管内皮細胞の配向に寄与するRho-GEFの網羅的探索を行い、Soloを同定することに成功した。Soloは、血管内皮細胞だけでなく、広い組織に発現しており、上皮細胞におけるメカノストレス応答にも寄与することが予想されたため、乳腺上皮由来のMCF7細胞からSoloの結合蛋白質をプロテオミクス解析によって探索した。その結果、Soloは単層上皮特異的なケラチン8と

ケラチン18によって構成される中間径フィラメントに結合していることが明らかとなった(図1)。

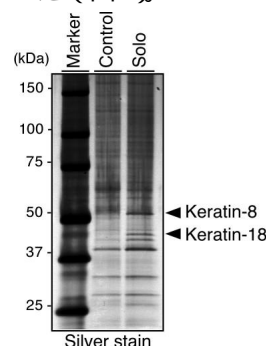


図1. プロテオミクス解析によるSolo結合蛋白質の検出。Haloタグのみ、または、Halo-Soloを発現させたMCF7細胞からHaloリガンドによりHalo蛋白質を沈降させ、共沈物をSDS-PAGEにより分離した。ゲルを銀染色して共沈した蛋白質を染色した。Halo-Solo特異的な蛋白質ケラチン8、ケラチン18を質量分析により同定した

#### (3) Soloの上皮細胞のケラチン線維構造に対する機能解析

Soloがケラチン8/18線維に結合することから、細胞内のケラチン8/18ネットワーク構造にSoloが何らかの役割を持つことが示唆された。これを検証するために、イヌ腎上皮由来のMDCK細胞にYFP-ケラチン8を恒常的に発現させ、細胞内のケラチン8/18線維を可視化できる細胞株を樹立した。この細胞に対して、Soloの発現抑制を行った結果、ケラチン8/18線維の細胞周囲への広がりが抑制され、そのネットワーク構造が大きく乱れることが明らかとなった(図2)。逆に、Soloを過剰発現させた場合、Soloは、細胞の基底部分や細胞間接着部位に集積し、その部位にケラチン8/18線維が集積することが明らかとなった。また、この過剰発現の効果は、SoloのGEF活性に依存していることがGEF活性の不活化型変異体を用いた解析から明らかとなった。これらの結果から、Soloは、RhoAの活性化によるアクチン骨格の再構築を介してケラチン8/18ネットワーク構造の形成、維持に寄与していることが明らかとなった(文献1)。

#### (4) Soloのデスモソーム構造の形成における機能解析

Soloは、細胞の基底膜付近に集積すると共に細胞間接着部位にも集積し、ケラチン8/18線維に結合することから、中間径フィラメントが結合する細胞間接着構造であるデスモソーム構造に対しても何らかの機能を持つことが考えられた。そこで、MDCK細胞におけるデスモソーム構造をデスモソームに局在するプラコグロビンを抗体染色し検討した。その結果、Soloの発現抑制によって細胞間に局在するプラコグロビンの量が有意に減弱することが明らかとなった(文献1)。こ

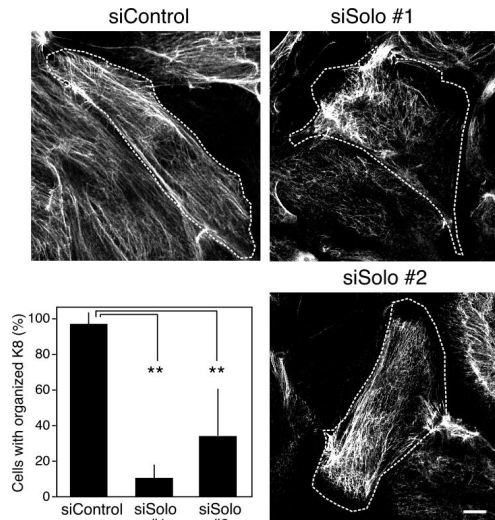


図2. Soloの発現抑制によるケラチン8/18ネットワーク構造への影響。YFP-ケラチン8発現MDCK細胞に対して、Soloの発現抑制を行い、細胞内のケラチン8/18線維の構造をYFPにより可視化し、正常な構造の細胞の割合を定量した。Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . \*\* $P < 0.01$ . 文献1より改変。

の結果から、Soloは、ケラチン8/18線維のデスモソーム構造への連結に寄与し、デスモソーム構造の形成と維持に寄与する可能性が強く示唆された。

#### (5) 上皮細胞に対する張力負荷によるRhoAの活性化におけるSoloとケラチン8/18ネットワーク構造の機能解析

Soloは張力によって活性化されることが示唆された。これを検証するために、MDCK細胞にfibronectinをコートしたビーズを接着させ、磁気によってビーズと共に細胞に張力を負荷した際に引き起こされるRhoAの活性化を指標に検討を行った。Soloを発現抑制した場合、又は、ケラチン18を発現抑制してケラチン8/18ネットワーク構造を乱した場合どちらも、張力の負荷によるRhoAの活性化が抑制されることが明らかとなった(文献1)。これらの結果から、MDCK細胞に対するインテグリンを介した細胞-基質間接着からの張力の負荷が、Soloを活性化しRhoAを活性化することが明らかとなった。この結果から、Soloは、上皮細胞集団が3次元環境で秩序化して形態形成を行う上で機械的な力の調節に重要な機能を持つことが示唆された。

#### (6) Soloの上皮細胞の集団移動における機能解析

Soloの上皮細胞集団の秩序化における機能を解析するために、細胞集団の秩序化のモデルとして集団移動を対象に検討を行った。MDCK細胞がコラーゲンゲル上を集団で移動する実験方法を確立し、Soloの発現抑制に

よる影響を解析した。その結果、Soloの発現抑制細胞は、細胞単独の移動速度には影響しなかったが集団移動の速度が有意に速くなった(図2)。ケラチン8/18の発現抑制も細胞の集団移動の速度が速くなることが報告されており、Soloの発現抑制が細胞間を結びつけるデスモソーム構造を減弱させ、細胞間にかかる張力を弱めることで集団移動時の移動速度の抑制が弱くなり、移動速度が速くなったことが示唆された。

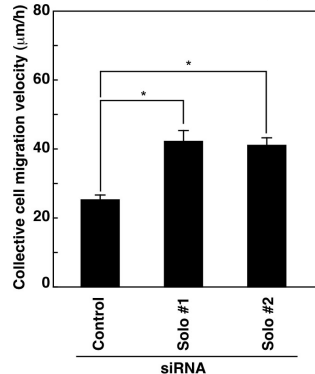


図3. MDCK細胞の集団移動の速度に対するSolo発現抑制の効果。MDCK細胞にコントロール、又は、Soloに対するsiRNA 2種を導入し、コラーゲンゲル上での集団移動の速度をタイムラプス解析により測定した。\* $P < 0.05$ .

#### (7) Soloの管腔形成における機能解析

Soloは、上皮細胞集団の秩序化と形態形成においてメカノストレス応答を制御して寄与することが考えられたため、コラーゲンゲル内の3次元環境におけるMDCK細胞のHGF依存的な管腔形成のモデルを作製し、Soloの機能解析を行った。Soloを発現抑制したMDCK細胞は、管腔形成における極性形成には影響せず、内腔の大きさの割合が有意に大きくなる傾向があることが明らかとなった(図4)。また、管腔の形状が伸長せず、球に近

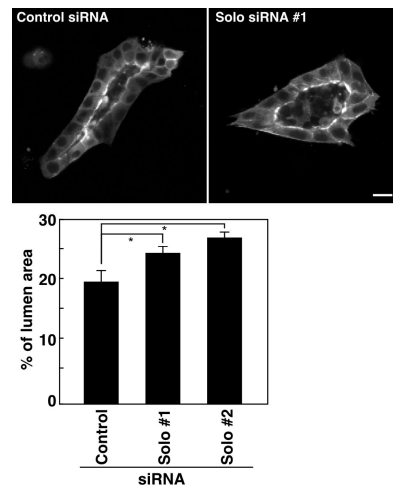


図4. MDCK細胞の管腔形成におけるSoloの発現抑制の効果。(上)コントロールsiRNA、又は、SoloのsiRNA 2種を導入したMDCK細胞をHGFを含むコラーゲンゲル内で3日間培養した。固定後、アクチン線維を染色し、内腔の最も面積の大きな部分を示した。Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ 。(下)内腔が最も広く見える断層像において、管腔全体の面積に対する内腔の比率を示した。\* $P < 0.05$ .

い状態になる傾向があることが明らかとなった。これらの結果から、Soloは、細胞間、細胞-基質間からのメカノストレスに応答して、内腔の大きさと管腔に形状を制御する機能を担うことが強く示唆された。

#### 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14件)

Fujiwara, S., Ohashi, K., T. Mashiko, Kondo, H., Mizuno, K.: Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for force-induced stress fiber reinforcement., **Mol. Biol. Cell**, 27, 954-966, 2016, DOI: 10.1091/mbc.E15-06-0417 (査読有)

Abiko, H., Fujiwara, S., Ohashi, K., Hiatari, R., Mashiko, T., Sakamoto, N., Sato, M., and Mizuno, K., Rho-guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch induced reorientation of vascular endothelial cells., **J. Cell Sci.**, 128, 1683-1695, 2015, DOI: 10.1242/jcs.157503 (査読有)

Ohashi, K., Roles of cofilin in development and its mechanisms of regulation., **Develop. Growth Differ.**, 57, 275-290, 2015, DOI: 10.1111/dgd.12213 (査読有)

Homma, Y., Kanno, S., Sasaki, K., Nishita, M., Yasui, A., Asano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Insulin receptor substrate-4 binds to Slingshot-1 phosphatase and promotes cofilin dephosphorylation., **J Biol Chem.**, 289, 26302-26313, 2014, DOI: 10.1074/jbc.M114.565945 (査読有)

Ohashi, K., Damnacanthal, an effective inhibitor of LIM-kinase, inhibits cell migration and invasion., **Mol. Biol. Cell**, 25, 828-840, 2014, DOI: 10.1091/mbc.E13-09-0540 (査読有)

Ohashi, K., Mizuno, K., A novel pair of split venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays., **Methods in Mol. Biol.**, 1174, 247-262, 2014, DOI: 10.1007/978-1-4939-0944-5\_17

Hou, X., Katahira, T., Ohashi, K., Mizuno, K. Sugiyama, S, and Nakamura, H., Coactosin accelerates cell dynamism by promoting actin polymerization., **Dev. Biol.**, 379, 53-63, 2013,

DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.04.006 (査読有)  
Saito, A., Miyajima, K., Akatsuka, J., Kondo, H., Mashiko, T., Kiuchi, T., Ohashi, K., and Mizuno, K., CaMKII -mediated LIM-kinase activation plays a crucial role in BDNF-induced neuritogenesis., **Genes Cells**, 18, 533-543, 2013, DOI: 10.1111/gtc.12054 (査読有)

Hayashi, A., Hiatar, R., Tsuji, T., Ohashi, K., and Mizuno, K. : p63RhoGEF-mediated formation of a single polarized lamellipodium is required for chemotactic migration of breast carcinoma cells., **FEBS Lett.**, 587, 698-705, 2013, DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.043 (査読有)

Ikeda, M., Chiba, S., Ohashi, K., Mizuno, K., Furry Protein Promotes Aurora A-mediated Polo-like Kinase 1 Activation., **J. Biol. Chem.**, 287, 27670-27681, 2012, DOI: 10.1074/jbc.M112.378968 (査読有)

Ohashi, K., Kiuchi, T., Shoji, K., Sampei, K., Mizuno, K., Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments., **Biotechniques**, 52, 45-50, 2012, DOI: 10.2144/000113777 (査読有)

大橋一正、辻 拓史、水野健作：Wntの細胞内平面極性シグナルによる Rhoファミリーの活性化とアクチン細胞骨格制御機構、**生体の科学**、63 巻 3 号 177-182、2012 (査読無)

Ohashi, K., Fujiwara, S., Watanabe, T., Kondo, H., Kiuchi, T., Sato, M., Mizuno, K., LIM-kinase has a dual role in regulating lamellipodium extension by decelerating the rate of actin retrograde flow and the rate of actin polymerization., **J. Biol. Chem.**, 286, 36340-36351, 2011, DOI: 10.1074/jbc.M111.259135 (査読有)

Kiuchi, T., Nagai, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Measurements of spatiotemporal changes in G-actin concentration reveal its effect on stimulus-induced actin assembly and lamellipodium extension., **J. Cell Biol.**, 193, 365-380, 2011, DOI: 10.1083/jcb.201101035 (査読有)

[学会発表](計12件)

藤原 佐知子、安彦 日和、大橋一正、増子寿弥、近藤 洋志、佐藤 正明、水野 健作、Rho-GEF Soloによる細胞骨格の制御と力覚応答における機能、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学大会、2015.12.1-4、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

大橋一正、The role of Solo, a Rho-GEF involved in mechanotransduction, in the dynamical ordering of epithelial cell populations、The Second International Meeting for Epithelial Tubulology、2015.8.22-23、北海道大学医学部 学友会館フラテホール(北海道・札幌市)

大橋一正、藤原佐知子、増子寿弥、安彦日和、佐藤正明、水野健作、RhoA/RhoC特異的GEFであるSoloの力覚応答における役割、第67回日本細胞生物学会、2015.6.30-7.2、タワーホール船堀(東京都・江戸川区) Mashiko, T., Fujiwara, S., Kondo, H., Abiko, H., Sato, M., Ohashi, K., Mizuno, K., Identification and functional analysis of Rho-GEFs involved in cyclic stretch-induced cell orientation of vascular endothelial cells, 第37回日本分子生物学会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

梶紀子、萱場敦子、高橋将太、大橋一正、水野健作、Farp1はインテグリンを介した細胞接着に関与する、第66回日本細胞生物学会、2014.6.11-13、奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

高橋将太、大橋一正、北谷佳那恵、直塚萌、佐藤圭一、阿部彰子、萱場敦子、梶紀子、水野健作、細胞外基質の硬さ依存的な乳腺上皮細胞の形質転換におけるFarp1の機能、第36回日本分子生物学会、2013.12.3-6、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市) 藤原佐知子、増子寿弥、近藤洋志、安彦日和、佐藤正明、大橋一正、水野健作、細胞の力覚応答に関わるRho-GEFとして同定したSoloの機能解析、第36回日本分子生物学会、2013.12.3-6、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Ohashi, K., Hayashi, A., Hiatari, R., Tsuji, T., and Mizuno, K., p63RhoGEF is required for chemotactic migration of breast carcinoma cells by forming a single polarized lamellipodium., 第65

回日本細胞生物学会大会、2013.6.19-21、ウインク愛知(愛知県・名古屋市)

Kaji, N., Takahashi, S., Kayaba, A., Ohashi, K., and Mizuno, K., Farp1 is involved in ECM stiffness-induced transformation of mammary epithelial cells., 第65回日本細胞生物学会大会、2013.6.19-21、ウインク愛知(愛知県・名古屋市)

高橋将太、大橋一正、北谷佳那恵、直塚萌、佐藤圭一、阿部彰子、萱場敦子、梶紀子、水野健作: DblファミリーRho-GEFであるCDEPは乳腺上皮細胞の細胞外マトリックスの硬さ依存的な形質転換に関与する、第85回日本生化学会大会、2012.12.14-16、福岡コンベンションセンター(福岡県・福岡市)

Kondo, H., Ohashi, K., Abiko, H., Hiatari, R., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K., Identification of Rho-GEFs Involved in Cyclic Stretch-induced Mechanosensing of Vascular Endothelial Cells., 第35回日本分子生物学会、2012.12.11-14、福岡コンベンションセンター(福岡県・福岡市)

Kitatani, K., Naotsuka, M., Sato, K., Abe, S., Ohashi, K., Mizuno, K., Identification of Rho-GEFs involved in ECM rigidity-induced transformation of mammary epithelial cells., 第34回日本分子生物学会、2011.12.13-16、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

[その他]

ホームページ等

[http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/ts\\_oohashi/](http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/ts_oohashi/)

[http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno\\_lab/](http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大橋 一正(Ohashi Kazumasa)

東北大学・大学院生命科学研究所・准教授

研究者番号: 10312539