

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04380

研究課題名(和文) 集団的細胞運動における細胞ダイナミクス

研究課題名(英文) Cellular dynamics during collective cell migration

研究代表者

上野 直人 (Ueno, Naoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・教授

研究者番号：40221105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：移動する細胞集団の力場を定量することによって、組織としての運動様式を理解することを目的とした。原腸形成時に移動する中胚葉を再現するためにSDF-1を用いた実験系を確立した。また、細胞膜や核の標識から個々の細胞の形態変化、相対的位置関係を、さらに牽引力顕微鏡を用いて移動する細胞集団の力場測定にも成功し、細胞が集団的に移動する際には、組織内での細胞の相対的位置が大きく変わり、また特定のLEM細胞だけが移動に必要な牽引力を産み出していることを明らかにした。また、カルシウム動態やその結果起こる膜突起形成、そしてそれによって生じる牽引力などを数理モデルに導入して、集団的細胞移動を理解する準備が整った。

研究成果の概要(英文)：We aimed to understand the physical background of collective cell migration through the measurement of force field using *Xenopus* mesoderm undergoing gastrulation. We first established the culture system in which mesoderm tissue migrate mono-directionally depending on the concentration gradient of a chemo-attractant SDF-1. Second, we visualized cell morphology and change in relative position of cells by labelling cell membrane and nucleus with GFP and measured force field by the traction force microscopy. Using these methodologies, we have been able to show that cells dynamically changes their positions in the collectively migrating tissue and that only a limited population of cells in the tissue generates force required for cell migration. Furthermore, by imaging intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics which leads to the formation of cell protrusions such as lamellipodia, which in turn mediates force generation, has enabled to introduce those multiple parameters into mathematical models.

研究分野：発生生物学

キーワード：胚葉形成 原腸形成

## 1. 研究開始当初の背景

【集団としての運動を理解することの重要性】

個体を構成する細胞がダイナミックに動き、その結果組織として大きな変化を生み出す細胞運動・移動は動物の体づくりに見られる特徴的な生物現象であり、その動的な姿は初期発生、再生（創傷治癒）そしてがんなどの病的状態において顕著に見られる。とくに、個体発生においては、細胞が集団として動くことは個体や器官の形づくり、すなわち形態形成の基本原理ともなっている。なかでも原腸形成は三胚葉からなる単純な胚から、決められた場所にしかるべき器官をつくり出すための組織リモデリングであり、個体発生のなかでも最も重要な現象である。原腸形成の際、細胞は将来の頭部に向かって集団的に移動する。これは、化学誘引物質の濃度勾配を検知した細胞が極性化し、それに応答することによって組織として前方（頭部）に向かって移動することによる。移動する個々の細胞に着目すると、この細胞運動の際、細胞は進行方向に向かって細胞突起を形成・伸展し、接着班（focal adhesion）を介したいわゆる「クロウリング」によって前進することが知られており、また接着班を構成する多くの分子が同定されているが、細胞が集団として細胞がどのように協調して移動するのかについては全く分かっていない。器官形成、ひいては個体発生のメカニズム解明には、こうした細胞集団、すなわち組織としての運動原理を理解することが重要であると考えられる。

【細胞移動原理に関する研究は主に単一細胞のメカニクスに注目して行われてきた】

細胞運動・移動の解析は粘菌や継代培養したさまざまな細胞株を用いて行われてきたが、最近では生体から播種した細胞を用いた研究も盛んに行われるようになった。これらの細胞を用いた実験系として化学走化性（chemotaxis）試験がある。走化性は SDF-1 といったタンパク性因子や cAMP といった低分子化学物質の濃度勾配を感知し細胞が方向性を持った移動能を獲得するというもので、その分子細胞メカニズムは、基質表面に形成された分子の濃度勾配に依存する走触性（haptotaxis）とともに詳細に解析されている。また、基質の硬さ勾配を感知して移動能を獲得する durotaxis も現象としては古くから知られており、細胞の機械受容（メカノセンシング）が関わることを示唆されている。これらの研究は主に培養細胞を用いるだけでなく、その解析は個々の細胞動態に着目したものであり、残念ながら多細胞を扱う研究においても、その集団性、統合性について配慮された実験系ではなかった。それは多数の培養細胞を同時に扱う創傷治癒試験においても同様であり、創傷（細胞剥離）後一定時間の空間充填率を観察することが主たる目的であって、細胞集団の統合性について注目した解析ではない。これを実現するため

には培養細胞が個体内での集団としての振る舞いを再現できる実験環境を整え、集団としての移動様式の詳細な解析を行うことが重要であると考えた。また、細胞集団は同一の振る舞いをする個々の細胞の総和ではなく、同一種細胞であっても、集団内の役割分担を含めた不均一性がある。単一細胞の運動原理を多細胞から構成される組織へ単純に外挿することは不可能であり、組織としての運動様式を力場計測などで理解することで初めて、細胞集団としての運動原理が導かれるものと考えられる。

【集団的細胞移動の研究が注目され始めた】

しかし、近年にわかにこの細胞の集団性、統合性を加味した集団的細胞移動（collective cell migration）の研究に注目が集まっている。集団的細胞移動は発生過程のさまざまな場所で見られる現象であり、脊椎動物の神経提細胞、セブラフィッシュなど魚類の側線ニューロン、ショウジョウバエ卵巣のボーダー細胞などの移動様式がそれに当たる。これらの集団的細胞移動を詳細に観察すると、集団の中の位置によって区画化されるサブグループの役割は異なるが、サブグループ間の相対的位置関係は変化しないもの（側線ニューロン）、個々の細胞の位置が大きく入れ替わっているように観察されるもの（ボーダー細胞）があり、組織によって多様性があるものと考えられる。申請者らは、以下のふたつの独自の観察事実から組織における個々の細胞の挙動の理解が、集団的細胞移動の原理解明に重要であると考えている。1) アフリカツメガエルの原腸形成時に中軸中胚葉(axial mesoderm, AM) を先導する細胞集団（leading edge mesoderm, LEM）を培養し蛍光標識した核の動きを追跡したところ、個々の細胞の相対的位置関係が大きく変化し、まるで組織内で対流して流動的に位置を変化させている興味深い動態が観察されたこと。2) 実際に LEM 組織が生み出す力を測定したところ、その値（20-40 nN）(Dev. Biol., 2013) は細胞ひとつが生み出す力に単純に細胞数を乗じた値よりかなり小さいことから、組織の一部の細胞が力の原動力となっているものと予想したこと。これらは、集団的細胞移動の原理解明には、細胞の個々ではなく、組織としての力の生成を定量することの重要性を示唆している。

## 2. 研究の目的

個体を構成する細胞がダイナミックに動き、その結果、組織として大きな変化を生み出す細胞運動・移動は動物の体の特徴であり、その動的な姿は初期発生、再生（創傷治癒）そしてがんなどの病的状態において顕著に見られる。とくに、個体発生においては、細胞が集団として動くことは個体や器官の形づくり、すなわち形態形成の基本原理ともなっている。従来、細胞移動のメカニズムは、細胞骨格ダイナミクスなどに生化学的変化

に焦点を当て、主に培養細胞を用いて精力的に研究されてきたが、本研究は細胞集団として協調した運動を可能にしている力学的プロセスに着目し、細胞集団内に発生する接着力を含めた力場を物理的手法によって定量することによって、組織としての運動様式を理解することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、細胞運動を基盤とする組織としての移動を力学的に理解するために、1) 移動する胚組織の移動を *in vivo* に近い環境で再現する実験系の確立、力学的摂動実験、機能分子の阻害など分子生物学的ツールを用いた実験によるフィードバック (研究分担者: 基礎生物学研究所、鈴木誠)、2) 細胞-基質間接着の定量的制御と弾性率を精密制御可能な基質モデルの確立 (連携研究者: 京都大学、田中求)、3) 多細胞系での牽引力顕微鏡を用いた力場の定量解析の確立 (連携研究者: 東京大学、佐野雅己)、4) 数理モデルによる運動解析 (連携研究者: 基礎生物学研究所、小山宏史) によってダイナミックな組織運動の作動原理を形状変化と力学場の相関から明らかにする。

### 4. 研究成果

平成 27 年度は計画通り、牽引力顕微鏡を用いた力場測定に適した胚組織の培養と組織移動の観察方法の確立を行った。市販のフィブリノーゲンでコートしたポリアクリルアミドゲル上に、LEM の内在誘引物質の一つであるアフリカツメガエル SDF1 を強制発現させた胚の一部を配置することで、LEM の集団的移動を牽引力顕微鏡観察システムにおいて安定的に再現することができた。さらに実際、確立したこの観察システムにおいて、LEM が集団的移動する際に産み出す牽引力を測定することができた。この観察の結果、LEM が集団的に移動する時に生じる牽引力の分布がダイナミックに変化していること、また集団内で特定の LEM 細胞が移動に必要な牽引力を産み出していないことを明らかにした。平成 28 年度には椎動物における原腸形成時の細胞運動のメカニズムを再現するために、原腸形成を *in vitro* で再現する実験系の最適化に取り組んだ。アフリカツメガエル初期原腸胚の原腸陥入を先導する中胚葉 Leading Edge Mesoderm (LEM) を切除し、スライドガラスまたはゲル上で培養することによって数百細胞数の LEM を一定方向に移動させるために、原腸形成時に重要とされるケモカイン SDF-1 を発現する組織片を移動方向に置くなどの試みを行い一定の成果を得た。さらにゲル中に微小な蛍光ビーズを含ませることで、細胞集団の移動時の組織内での力場測定を可能にした。平成 29 年度は、細胞移動、力場測定など細胞運動の物理量の定量化のため、マイクロ流路を作製し、精製した市販品 SDF-1 を用いて

既知濃度溶液をリザーバーから拡散させ厳密な濃度勾配を形成させ、それにより細胞集団を移動させる実験系の確立を目指した。蛍光色素による確認では、定量的解析を可能にする理想的な濃度勾配が形成されたため、その後精製 SDF-1 を用いて実験系の最適化を進めた。その結果、細胞数が 50 程度の集団については移動を確認することができたが、マイクロ流路のサイズをより大きくして、100-200 細胞にまでスケールアップを試みている。他方、蛍光カルシウムプローブ GCaMP6 を用いて移動中の細胞集団のカルシウム動態を観察するなど、細胞移動を支えるシグナルについての研究も進み、LEM 細胞集団の先端端で一過的な細胞内カルシウムの上昇が観察され、阻害剤などを用いた実験から細胞内カルシウムの上昇は細胞移動を促し、カルシウムの枯渇は移動を阻害することを明らかにした。さらに、カルシウムは低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性化によって細胞突起 (ラメリポディア) の形成を促進することを示した。

### 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 10 件)

Hayashi, K., Yamamoto, T.S. and Ueno, N. Intracellular calcium signal at the leading edge regulates mesodermal sheet migration during *Xenopus* gastrulation. *Sci. Reports* 8(1):2433 (2018) DOI: 10.1038/s41598-018-20747-w 査読有

Tanaka T., Ochi, H., Takahashi, S., Ueno, N., and Taira, M. Genes coding for cyclin-dependent kinase inhibitors are fragile in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 426(2):291-300 (2017) DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.06.019 査読有

Suzuki, M., Sato, M., Koyama, H., Hara, Y., Hayashi, K., Yasue, N., Imamura, H., Fujimori, T., Nagai, T., Cambell, R.E., and Ueno, N. Distinct intracellular  $Ca^{2+}$  dynamics regulate apical constriction and differentially contribute to neural tube closure. *Development* 144(7):1307-1316 (2017) DOI: 10.1242/dev.141952 査読有

Tokue, M., Ikami, K., Mizuno, S., Takagi, C., Miyagi, A., Takada, R., Noda, C., Kitadate, Y., Hara, K., Mizuguchi, H., Sato, T., Taketo, M.M., Sugiyama, F., Ogawa, T., Kobayashi, S., Ueno, N., Takahashi, S., Takeda, S., and Yoshida, S. SHISA6 confers resistance to differentiation-promoting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in mouse spermatogenic stem cells. *Stem Cell Reports* 14 8(3) 561-575 (2017) DOI:

10.1016/j.stemcr.2017.01.006 査読有  
Nagasaka, A., Shinoda, T., Kawaue, T.,  
Suzuki, M., Nagayama, K.,  
Matsumoto, T., Ueno, N., Kawaguchi,  
A. and Miyata, T. Differences in the  
Mechanical Properties of the  
Developing Cerebral Cortical  
Proliferative Zone between Mice and  
Ferrets at both the Tissue and  
Single-Cell Levels. *Front Cell Dev.  
Biol.* 4:139 (2016) DOI: 10.3389/  
fcell.2016.00139 査読有

Inoue, Y., Suzuki, M., Watanabe, T.,  
Yasue, N., Takeo, I., Adachi, T. and  
Ueno, N. Mechanical roles of apical  
constriction, cell elongation, and cell  
migration during neural tube  
formation in *Xenopus*. *Biomech. Model  
Mechanobiol.* 15(6): 1733-1746 (2016)  
DOI: 10.1007/s10237-016-0794-1 査読  
有

Negishi, T., Miyazaki, N., Murata, K.,  
Yasuo, H. and Ueno, N. Physical  
association between a novel  
plasma-membrane structure and  
centrosome orients cell division. *eLife*  
e16550 9:5 (2016) DOI: 10.7554/eLife.  
16550 査読有

Suzuki, M., Takagi, C., Miura, S.,  
Sakane, Y., Suzuki, M., Sakuma, T.,  
Sakamoto, N., Endo, T., Kamei, Y.,  
Sato, Y., Kimura, H., Yamamoto, T.,  
Ueno, N. and Suzuki, K.T. In vivo  
tracking of histone H3 lysine 9  
acetylation in *Xenopus laevis* during  
tail regeneration. *Genes Cells* 21(4)  
358-369 (2016) DOI: 10.1111/gtc.12349  
査読有

Miyagi, A., Negishi, T., Yamamoto, T.S.,  
and Ueno, N. G protein-coupled  
receptors Flop1 and Flop2 inhibit  
Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and are  
essential for head formation in  
*Xenopus*. *Developmental Biology.*  
407(1) 131-144 (2015) DOI: 10.1016/  
j.ydbio.2015.08.001 査読有

Sakamaki, K., Iwabe, N., Iwata, H.,  
Imai, K., Takagi, C., Chiba, K.,  
Shukunami, C., Tomii, K., and Ueno,  
N. Conservation of structure and  
function in vertebrate c-FLIP proteins  
despite rapid evolutionary change.  
*Biochemistry and Biophysics Report*  
3:175-189 (2015) DOI: 10.1016/j.bbrep.  
2015.08.005 査読有

[学会発表](計 8件)

上野直人 “A Novel Membrane  
Invagination Controls Oriented Cell  
Division in Ascidian Embryo.” 18th

International Congress of Develop-  
mental Biology (2017)

上野直人 “A unique membrane  
structure that determines the orien-  
tation of cell division.” Japan-Austria  
joint meeting “Understanding the logic  
behind developmental dynamics”  
(2017)

上野直人 「動物発生のバイオメカニク  
ス」日本機械学会 第29回バイオエンジ  
ニアリング講演会 (2017)

上野直人 “Membrane dynamics of  
ascidian embryo controls the orien-  
tation of cell division.” Japan-Austria  
joint meeting “Understanding the logic  
behind developmental dynamics”  
(2016)

上野直人 “Measurement of force field  
during the collective cell migration of  
*Xenopus* embryonic cells.” 16th  
International *Xenopus* Conference  
(2016)

上野直人 「器官形成におけるカルシウム  
ダイナミクス」第13回糖鎖科学コンソ  
ーシアムシンポジウム (2015)

上野直人 “Cell and Tissue Dynamics  
of Neural Tube Formation.” iCeMS  
International Symposium (2015)

上野直人 “Calcium Dynamics Shapes  
the Neural Tube.” The 3rd Asia-Pacific  
Developmental Biology Conference  
(2015)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上野 直人 (UENO, Naoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・教授

研究者番号：40221105

### (2) 研究分担者

鈴木 誠 (SUZUKI, Makoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・助教

研究者番号：10533193

### (3) 連携研究者

小山 宏史 (KOYAMA, Hiroshi)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・助教

研究者番号：10530462

佐野 雅己 (SANO, Masaki)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：40150263

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