

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14358

研究課題名(和文)細胞弾性から読み解く血行性転移機構

研究課題名(英文)Cell stiffness and extravasation

研究代表者

齋藤 大介(Saito, Daisuke)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：90403360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：転移性ガン細胞などは血行性転移と呼ばれる遠隔組織への移動を行う。この機構の解明は血行性転移の制御法にも繋がり意義は大きい。研究代表者は鳥類胚の始原生殖細胞(PGC)が血行性転移を行うことに着目し、その機構の解明と、ガン細胞の血行性転移との相関有無の確認を目的として研究を進めた。PGCは特定の毛細血管叢で循環移動を停止してその直後血管壁を通過して間葉へ移行することから、PGCが毛細血管叢にて停止する機構について調べた。結果として、PGCにおいて細胞骨格因子であるActinが高弾性状態(硬い状態)を与えており、これによりPGCが狭い毛細血管叢に“挟まる”ことによって停止する可能性を突き止めた。

研究成果の概要(英文)：In avian species, Primordial germ cells (PGCs) use the vascular system to reach somatic gonads. PGCs are flowed by blood circulation and transmigrate from inside of blood vessel to mesenchyme through the wall of blood vessels like metastatic cancer cells. However, there is little understanding of the mechanism underling avian PGC extravasation. I found that PGCs stop circulation at the specific vascular plexus before extravasation. In this plexus, PGCs seemed to stop circulation as they were caught in narrow vascular spaces. raising the possibility that PGCs have high stiffness. Atomic microscopy analysis revealed that PGCs had much higher stiffness than that of other blood cells. I also found that PGC stiffness was mediated by cortical acto-myosin cytoskeleton. Acto-myosin disrupted PGCs did not stop the specific vascular plexus. Thus I conclude that acto-myosin mediated-cell stiffness is critical for avian PGC extravasation.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞移動 始原生殖細胞 胚内動態

1. 研究開始当初の背景

ガン細胞を始めとしたある種の細胞は血管内を移動路として遠隔まで到達する血行性転移を行う。血行性転移については生体内にてモニターすることが難しいこともあり、その機構は未解明のところが多い。

研究代表者は、鳥類胚の始原生殖細胞が転移性ガン細胞のように血流内を移動することに着目し、その移動機構について研究を進めてきた。鳥類胚は生きたまま血管内をモニターできる非常に優れたモデルである。研究代表者はこれまでに、鳥類胚血管内の始原生殖細胞が血流によって受動的に循環移動すること、特定の毛細血管叢にて循環移動を停止し、その直後に血管壁を通過して間充織(間葉)へと移動することを見出していた。始原生殖細胞はどのような仕組みで特定の毛細血管叢にて停止するか、この問題に対し、始原生殖細胞が高弾性(硬い)細胞であり、狭い毛細血管叢にトラップされる可能性を考慮した。実際に始原生殖細胞が高弾性であるかを原子間力顕微鏡にて測定すると、始原生殖細胞は約 1000 パスカルと高弾性であることがわかった。しかしながら、始原生殖細胞に高弾性性質を与える分子実体、および毛細血管叢にて停止することに高弾性状態が重要であるかについては不明であった。また、他に血行性転移を行う細胞、すなわちガン細胞の転移と高弾性の相関については不明であった。

2. 研究の目的

この背景のもと、鳥類胚の始原生殖細胞に高弾性状態を与える分子実体の解明、および毛細血管叢での停止に対する高弾性状態の重要性を検証することを本研究の目的とした。次にその知見をもとにガン細胞転移と細胞高弾性状態の相関を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

① 始原生殖細胞の細胞高弾性実体の探索

始原生殖細胞の高弾性実体として細胞骨格 Actin を想定し、鳥類胚始原生殖細胞に対してファロイジン染色を行った。

② 始原生殖細胞の培養と遺伝子導入

始原生殖細胞における Actin 機能を検証するために、引用文献①を参考に始原生殖細胞の培養を行った。その培養始原生殖細胞に対して、Actin 機能を阻害するプラスミド(ドミナントネガティブ Actin、C3 酵素、あるいはドミナントネガティブ RhoA)を導入した。

③ Actin を阻害した際の弾性状態の検証

Actin 阻害と弾性の関係を調べるために、培養始原生殖細胞に対し、ラトランキュリン A あるいはプレビスタチンを作用、あるいは先述の Actin 機能阻害プラスミドを導入し、原子間力顕微鏡にて弾性の測定を行った。

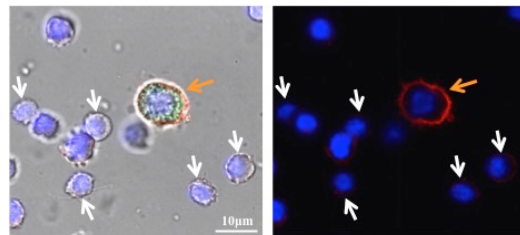
④ 変異始原生殖細胞の胚内動態解析

Actin 機能を阻害した始原生殖細胞が毛細血管叢にて停止するかを検証するために、Actin 機能阻害プラスミドを導入した培養始原生殖細胞を孵卵 54 時間のニワトリ胚血管内へ移植し、蛍光実体顕微鏡下で高速撮影を行った。

4. 研究成果

① 始原生殖細胞の細胞高弾性実体候補としての Actin

細胞高弾性実体として細胞骨格因子の可能性が高いと想定し、ファロイジン染色にて始原生殖細胞にて Actin を可視化したところ、cortical actin が発達していることが明らかとなった(図1)。



始原生殖細胞(緑)においてActin(赤)が発達していた。オレンジ矢印が始原生殖細胞、白矢印は血球。

図1

② 始原生殖細胞の培養と遺伝子導入法の確立

始原生殖細胞における Actin 機能を検証するためには、始原生殖細胞へ安定的に遺伝子導入できる実験系が必要であった。英国のグループがニワトリ胚の始原生殖細胞の培養に成功していたので(引用文献①)、まずその再現を行った。結果として培養の再現に成功した。この培養始原生殖細胞において遺伝子導入条件の最適化作業を行い、EGFP と共にドミナントネガティブ Actin 遺伝子、C3 酵素、あるいはドミナントネガティブ RhoA を薬剤依存的に発現できる始原生殖細胞株を確立することができた。

③ Actin が始原生殖細胞に高弾性を与える因子の一つである

Actin 阻害と弾性の関係を調べるために、Actin 重合阻害剤であるラトランキュリン A あるいはプレビスタチンを始原生殖細胞を含む培地に添加し、原子間力顕微鏡にて弾性を測定したところ、弾性が 200 パスカルまで低下することがわかった。さらに、ドミナントネガティブ Actin 遺伝子、C3 酵素、あるいはドミナントネガティブ RhoA を強制発現させ、Actin 機能を阻害した始原生殖細胞の弾性を測定するとやはり低弾性となった(図2)。これらの結果から、始原生殖細胞に高弾性を与えている実体の一つが Actin であることが明らかとなった。

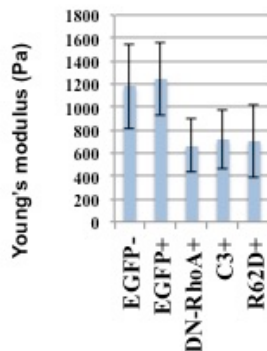


図2 変異始原生殖細胞における弾性

④ 始原生殖細胞の高弾性が毛細血管叢における停止に必要である可能性が高い

Actin 機能を阻害した始原生殖細胞が毛細血管叢にて停止するかを検証するために、EGFP のみを発現させた培養始原生殖細胞、および Actin 機能を阻害させた培養始原生殖細胞をニワトリ胚血管に移植し、特定毛細血管叢にて循環移動を停止できるかについての検証を進めた。結果として、Actin 機能を阻害した始原生殖細胞は毛細血管叢にて停止できなくなることがわかった。このことから、始原生殖細胞の Actin によってもたらされる高弾性が、毛細血管叢における停止に必要である可能性が示された。

本成果は今後速やかに学術論文として報告するとともに、以上の結果を踏まえ、今後ガン細胞における解析に進む。

<引用文献>

① Whyte, J., Glover, D. J., Woodcock, M., Brzeszczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., Kaiser, P. and McGrew, J. M.: FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal *Stem Cell Reports* 5: 1171-1182, 2015

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① **Saito, D.**, Tamura, K. and Takahashi, Y.: Early segregation of the adrenal cortex and gonad in chicken embryos. *Dev. Growth Differ.* 59: 593-602, 2017 査読あり
DOI: 10.1111/dgd.12389
- ② Matsubara, H., **Saito, D.**, Abe, G., Yokoyama, H., Suzuki T., and Tamura, K.: Upstream regulation for initiation of restricted Shh expression in the chick limb bud. *Developmental Dynamics* 246: 417-430, 2017 査読あり
DOI: 10.1002/dvdy.24493
- ③ Seki, R., Li, C., Fang, Q., Hayashi, S., Egawa, S., Hu, J., Xu, L., Pan, H., Kondo, M., Sato, T., Matsubara, H., Kamiyama, N., Kitajima, K., **Saito, D.**, Liu, Y., Gilbert,

M.T.P., Zhou, Q., Xu, X., Shiroishi, T., Irie, N., Tamura, K., and Zhang, G.: Functional roles of Aves class-specific cis-regulatory elements on macroevolution of bird-specific features. *Nat. Commun.* 8: 14229, 2017 査読あり

DOI: 10.1038/ncomms14229

- ④ Yoshino, T., Murai, H., and **Saito, D.**: Hedgehog-BMP signalling establishes dorsoventral patterning in lateral plate mesoderm to trigger gonadogenesis in chicken embryos. *Nat. Commun.* 7: 12561, 2016 査読あり
DOI: 10.1038/ncomms12561.
 - ⑤ Takahashi, T., Takase, Y., Yoshino, T., **Saito, D.**, Tadokoro, R. and Takahashi, Y.: Angiogenesis in the developing spinal cord: Blood vessel exclusion from neural progenitor region is mediated by VEGF and its Antagonists. *PLoS One* 10: e0116119, 2015 査読あり
DOI: 10.1371/journal.pone.0116119.
 - ⑥ Seki, R., Kitajima, K., Matsubara, H., Suzuki, T., **Saito, D.**, Yokoyama, H. and Tamura, K.: AP-2 β is a transcriptional regulator for determination of digit length in tetrapods. *Dev. Biol.* 407: 75-89, 2015 査読あり
DOI:10.1016/j.ydbio.2015.08.006.
 - ⑦ **Saito, D.** and Takahashi, Y.: Sympatho-adrenal morphogenesis regulated by the dorsal aorta. *Mechanism of Development* S0925-4773 (15) 30013-30017, 2015 査読あり
DOI: 10.1016/j.mod.2015.07.011.
- [学会発表] (計7件)
- ① **Saito, D.** Germ Cell Extravasation Mechanism in Avian Embryo. 14th International conference on flow dynamics, Sendai, Japan 1-3, November, 2017
 - ② **Saito, D.** Cell stiffness is critical for germ cell migration in avian embryo. International Forum on Avian Germplasm and Genome Editing 2017, Jeju, Korea 26-28, October, 2017
 - ③ 齋藤大介 「鳥類始原生殖細胞の血管内移動における細胞弾性の役割」日本動物学会第88回大会 (2017年9月21-23日・富山市) (口頭発表)
 - ④ **Saito, D.** The establishment of quail primordial germ cell culture system. 日本発生物学会第50回大会 (2017年5月10-13日・東京都)
 - ⑤ **Saito, D.** Avian primordial germ cell migration in the blood stream. 13th

International conference on flow dynamics,
Sendai, Japan 10-12, October, 2016

- ⑥ **Saito, D.** Avian primordial germ cell migration in the blood stream. "Cell- and tissue communication in organogenesis: cutting edge approaches" The Fondation des Treilles, Les Arcs-Dranguignan, France 21-26, September, 2015
- ⑦ **Saito, D.**, Takahashi, Y. Gonad and adrenal cortex derive from different origins within the coelom. 日本発生生物学会第48回大会 (2015年6月2-5日・つくば市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/tamlab/index.html>

<http://www.fris.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 大介 (SAITO, Daisuke)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・
助教
研究者番号：90403360

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()