

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04800

研究課題名(和文)多細胞システムを構築する集団細胞移動の動作原理

研究課題名(英文)Principle of collective cell migration to construct multicellular systems

研究代表者

倉永 英里奈 (Kuranaga, Erina)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90376591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵から体が形成される過程では、上皮細胞が集団移動することで複雑な器官を作り上げる。しかし細胞同士の接着を保ったまま、どのように移動できるのか、その仕組みの多くは謎だった。この仕組みを理解する為にショウジョウバエ蛹期の雄性生殖器の回転形成に注目した。この回転形成は、個々の上皮細胞が左右非対称につなが替わって集団移動することで進行する。本研究により、つなが替えを引き起こす、細胞接着面に局在したアクトミオシンが、接着解離した両細胞側で新しく出来た細胞接着面を伸長することに寄与することを見いだした。加えてこの現象には、3細胞接着結合の局在タンパク質であるsidekickが関与していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

・本研究で発見した上皮細胞を集団で動かす仕組みは、上皮としての特性を維持しながら細胞を自律的かつ協調的に動かし組織を変形させる新しい知見として、発生・再生の原理を理解し、操作する上で多に役立つことが期待できる。
・上皮細胞のつなが替えを連続してスムーズに起こす仕組みは、創傷治癒などの上皮修復メカニズムの理解に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：During the formation of the body from a fertilized egg, epithelial cells migrate collectively in the same direction to create a complex organism. However, how epithelial cells can migrate while maintaining cell-to-cell adhesion remains largely a mystery. To understand this mechanism, we focused on the looping morphogenesis of the male genitalia (genitalia rotation) during the Drosophila pupal stage. This genitalia rotation occurs when individual epithelial cells are interchanged asymmetrically and migrate collectively. In the present study, we found that actomyosin, which is localized on the cell adhesion and causes junction remodeling (contraction of the cell adhesion), contributes to the elongation of the newly formed cell adhesion surface on both sides of the dissociated cell. In addition, we show that sidekick, a localized protein of tri-cellular junction (three cell adhesion bond), is involved in this phenomenon.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞移動 細胞接着 上皮細胞 細胞陥入

1. 研究開始当初の背景

集団細胞移動は、初期胚の原腸陥入や血管形成、乳腺分岐の形成など発生過程において重要な役割を示す一方で、上皮性がんやメラノーマなどの浸潤や転移の過程においても観察され、生命活動の様々な局面に関与している。集団細胞移動が個別の集団移動と異なる点は、カドヘリンやギャップ結合によって細胞間接着を保持したまま集団で一方方向に移動していくという点であるが、どうやって集団性を維持したまま移動できるのか、どうやって複数の細胞の方向性を同期させるのか、*in vivo* におけるそのメカニズムは明らかでない。そこで本研究では、個体の中で安定的に集団細胞移動のプロセスを解析可能な、ショウジョウバエ雄性生殖器の回転形成に注目した。ショウジョウバエの雄性外生殖器は、蛹期、その発生過程に 360 度時計回りに回転することが知られており (Zeitschrift f. wissenschaftliche Zoologie, 1936)、左右非対称な器官形成を行うため、その回転異常は左右軸異常のモデルとして解析されてきた (Nature 440, 2006)。これまでの報告や研究代表者の研究から、外生殖器の正常回転には増殖・移動・細胞死の関与が示唆されているが、それら細胞のふるまいが、どこで、どのようにして器官形成に関与しているのかは明らかでなかった。研究代表者は、ショウジョウバエを生かしたまま、この生殖器が 360 度回転する過程を単一細胞レベルで可視化することに成功し、この回転は、生殖器官をとりまく上皮組織が円周状に移動することにより引き起こされることを明らかにした (Development 138, 2011)。

外生殖器を取り囲むリング状の構造をした単層の上皮組織 (A8a 組織: 腹部第 8 体節前部) には、600 個以上の上皮細胞が含まれており、互いに接着性を保ったまま集団で移動する様子が観察された。集団細胞移動のメカニズムとしては、移動方向からの誘引物質受容が報告されているが、リング状の組織であり典型的なリーダー細胞が観察されない本ケースでは、新たな集団細胞移動のモデルを提示する必要がある。研究代表者は、移動する上皮細胞集団のアピカル(頂端)面に左右非対称な平面極性(キラリティ)があることを見出し、それに準ずる細胞接着面のつなぎ替えと細胞間張力の揺らぎによって、細胞同士が斜めにならずにずれ続けることで、接着性を保った細胞移動が成し遂げられることを、実験・計測・理論を組み合わせた研究により明らかにした (Nat Comm, 2015)。これまでの研究成果から、A8a 上皮組織の細胞が個々に左右非対称につなぎ替えすることで、集団として細胞移動を誘導し、生殖器回転形成を成立させることが示された。一方で、それらを制御するメカニズムは明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝学的操作、*in vivo* ライブ解析、力学的計測、数理モデル予測を駆使して、個々の細胞を集団として秩序だてて動かすメカニクスと、それを制御する分子メカニズムを明らかにする。本研究によって、組織を形づくる細胞の動的制御機構と、それらを協調・統合させる普遍的作動原理の提示を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、生殖器を回転させる上皮細胞の集団移動に注目し、個々の上皮細胞を秩序だてて移動・停止させるメカニズムを明らかにする。上皮細胞の細胞自律的な移動を制御する

プロセスとして、(1)左右非対称性の獲得、(2)速度の維持に焦点を絞り、遺伝学的操作、*in vivo* ライブ解析、力学的計測などを駆使して解析を行った。

4. 研究成果

(1) 左右対称な上皮細胞の対称性を破壊する時空間的制御メカニズムの解析

対称性の破れは形態形成過程において最も重要なプロセスの一つである。心臓は体の正中線に対して少し左側にずれたところに位置し、形は決まった方向にねじれている。同様に、ショウジョウバエにおいても左右非対称性が認められる。初期胚の後腸はいつも左向きにねじれ、前述の通り、雄性外生殖器はいつも右回りに360度回転する。後腸のねじれと雄性外生殖器の回転では、その方向性を決める共通の分子が報告されている。I型ミオシン(Myosin II)の変異体では後腸は右向きにねじれ、外生殖器は左回りに回転することが報告された(Nature 440, 2006)。研究代表者らは外生殖器を回転させるA8a細胞において細胞平面キラリティが存在することを確認し、さらにMyosin IIがそのキラリティの方向性と回転方向を規定していることを報告した(Nat Comm, 2015)。このキラリティは、アクチンミオシンの左右非対称な局在およびつなぎ替えと関連することが示唆された。一方で、Myosin IIがどのようにして細胞平面キラリティを確立するのか、どのようにしてアクチンミオシンのキラルな局在を確立するのかについては未解明であった。線虫胚の一細胞期では、アクチン細胞骨格のキラルな流れにより決まった方向にトルク(物体を回転させるための力)が発生しており、それらが細胞動態の左右非対称性に関与するとの報告がある。そこで、細胞骨格が内在的にトルクを発生している可能性を検証するために、移動する細胞のアピカル側でのアクチン動態をライブイメージングにより観察した。その結果、細胞質に向かうアクチンファイバーの流れが観察された。しかしながら、そのシグナルは検出限界に近く、詳細な観察・解析・検証を行っていくには、既存の顕微鏡システムでは解析が困難であった。超解像顕微鏡などを用いた微細構造の高感度検出システムの導入が不可欠である。アクチンフローの解析が困難であったため、次に、より直接的に左右非対称性に関わるMyosin IIの機能を解明することとした。本研究にてショウジョウバエMyosin IIにvenusをノックインしたMyosin II::venus系統を作製し、細胞が左右非対称性を確立する時期におけるMyosin IIの動態観察を行った。その結果、左右非対称性を確立する際に、細胞の頂端部側にMyosin IIの特徴的な構造体が観察されることが明らかになった。この構造体はアクチンやミオシンを含んでおり、細胞の力学的反応性に関与する可能性が示唆された。Myosin IIの構造が左右非対称の確立に必要なかどうか、検証していく必要がある。

(2) 集団細胞移動の速度を維持する細胞機能

研究代表者らは、生殖器を回転させる上皮細胞の移動が、接着結合(adherence junction: AJ)に集積したアクチンミオシン(アクチン・ミオシン II 複合体)の生成する収縮力によるAJのつなぎ替えが連続的に起こることで駆動されることを、実験と数理モデルにより示した(Sato et al., 2015)。一方で、細胞陥入の際には、AJのつなぎ替えにより接着面が90度回転されるため、一旦逆のキラリティに変化してしまう。連続的な一方向の細胞陥入を維持するためには、AJのつなぎ替えと、その後のキラリティ修正を瞬時に起こすメカニズムの存在が推察される。そこで研究代表者らは、細胞陥入プロセス(接着面の収縮・消失・新規形成と伸長)における関連分子の動態を詳細に解析した。その結果、収縮の際に接着面に集積していたミオシン II は、接着面が消失した後もAJに蓄積し

続けており、特に新規接着面の両端に位置する AJ の 3 細胞接着結合 (tricellular AJ: tAJ) へ強く集積していた。この tAJ 上のミオシン II を局所的に不活性化するために、Chromophore-assisted laser inactivation (CALI) 法を用いた。この CALI 法とは、光刺激により Reactive oxygen species (ROS) を産生する蛍光タンパク質を、不活性化させたいタンパク質に融合させて発現させることで、光特異的にタンパク質を不活性化させるものである。研究代表者らは、CALI に最適な蛍光タンパク質として報告された SuperNova を、CRISPR/Cas9 法を用いて、ショウジョウバエミオシン II の C 末端側配列にノックインで挿入し、ミオシン II::SuperNova というショウジョウバエシステムを作製した。このシステムを用いて、tAJ に局在しているミオシン II::SuperNova を特異的に、光刺激により不活性化すると、新規接着面の伸長が阻害された。このことから、接着面の AJ で収縮を駆動していたアクトミオシンが、AJ の消失により tAJ に再構築されて、速やかな新規接着面の伸長に寄与することが示唆された。

tAJ におけるアクトミオシンを集積する細胞膜タンパク質としては、Sidekick (Sdk) を候補分子として挙げた。Sdk は、YFP 融合タンパク質の局在観察から、ショウジョウバエ初期胚の上皮細胞のトリセルラージャンクションに位置することだけ報告されていたが、その機能は不明であった。研究代表者らは、Sdk が周辺上皮細胞の tAJ に局在していること、Sdk のノックダウンによって、新規接着面の伸長が阻害されることを明らかにした。また、AJ がつなぎ替わった後に現れる tAJ と新規接着面にはカドヘリンが希薄であったが、その希薄な箇所には相補的に Sdk が局在している様子も、ライブイメージングにより明らかにした。この Sdk はカドヘリンと比較して接着力が弱く、AJ のつなぎ替えが起きたすぐ後にカドヘリンよりも早くジャンクションに局在して、アクトミオシンをつなぎ止め、ジッパーの様に tAJ を移動しやすくすることで、新規接着面の速やかな伸長を支持していると考えられる。以上の結果は 2019 年 5 月に *Developmental Cell* に accept となり、8 月号に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Hiraiwa Tetsuya, Wen Fu-Lai, Shibata Tatsuo, Kuranaga Erina	4. 巻 11
2. 論文標題 Mathematical Modeling of Tissue Folding and Asymmetric Tissue Flow during Epithelial Morphogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Symmetry	6. 最初と最後の頁 113 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/sym11010113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuboi Alice, Ohsawa Shizue, Umetsu Daiki, Sando Yukari, Kuranaga Erina, Igaki Tatsushi, Fujimoto Koichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Competition for Space Is Controlled by Apoptosis-Induced Change of Local Epithelial Topology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2115 ~ 2128.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2018.05.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujita Sosuke, Kuranaga Erina, Nakajima Yu-ichiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Cell proliferation controls body size growth, tentacle morphogenesis, and regeneration in hydrozoan jellyfish <i>Cladonema pacificum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e7579 ~ e7579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7717/peerj.7579	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uechi Hiroyuki, Kuranaga Erina	4. 巻 50
2. 論文標題 The Tricellular Junction Protein Sidekick Regulates Vertex Dynamics to Promote Bicellular Junction Extension	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 327 ~ 338.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2019.06.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Umetsu Daiki, Kuranaga Erina	4. 巻 45
2. 論文標題 Planar polarized contractile actomyosin networks in dynamic tissue morphogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr Opin Genet Dev.	6. 最初と最後の頁 90 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gde.2017.03.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uechi Hiroyuki, Kuranaga Erina	4. 巻 74
2. 論文標題 Mechanisms of collective cell movement lacking a leading or free front edge in vivo	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Mol Life Sci.	6. 最初と最後の頁 2709 ~ 2722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-017-2489-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima Yu-ichiro, Kuranaga Erina	4. 巻 24
2. 論文標題 Caspase-dependent non-apoptotic processes in development	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Death Differ.	6. 最初と最後の頁 1422 ~ 1430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/cdd.2017.36	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiraiwa Tetsuya, Kuranaga Erina, Shibata Tatsuo	4. 巻 5
2. 論文標題 Wave Propagation of Junctional Remodeling in Collective Cell Movement of Epithelial Tissue: Numerical Simulation Study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2017.00066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuboi Alice, Umetsu Daiki, Kuranaga Erina, Fujimoto Koichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Inference of Cell Mechanics in Heterogeneous Epithelial Tissue Based on Multivariate Clone Shape Quantification	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2017.00068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uechi H, Kuranaga E, Iriki T, Takano K, Hirayama S, Miura M, Hamazaki J, Murata S.	4. 巻 38
2. 論文標題 Ubiquitin-Binding Protein CG5445 Suppresses Aggregation and Cytotoxicity of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked TDP-43 in Drosophila.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 e00195-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamoto Y, Nakajima YI, Kuranaga E.	4. 巻 17
2. 論文標題 Apoptosis in Cellular Society: Communication between Apoptotic Cells and Their Neighbors.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E2144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms17122144.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uechi H, Kuranaga E.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Mechanisms of collective cell movement lacking a leading or free front edge in vivo.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Mol Life Sci.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-017-2489-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Hiroyuki Uechi, Erina Kuranaga
2. 発表標題 The tricellular junction protein Sidekick regulates vertex dynamics to promote bicellular junction extension
3. 学会等名 EDRC 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Erina Kuranaga
2. 発表標題 Collective cell movement during epithelial morphogenesis
3. 学会等名 Asia-Pacific Drosophila Research Conferenece 4 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Erina Kuranaga
2. 発表標題 Mechanical perspective of collective cell movement in looping morphogenesis
3. 学会等名 EMBO workshop "Dynamics of living systems" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Emi Maekawa, Hiroyuki Uechi, Ayako Isomura and Erina Kuranaga
2. 発表標題 The sexually dimorphic regulation of extracellular matrix contributes to looping morphogenesis in Drosophila
3. 学会等名 25th European Drosophila Research Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 倉永 英里奈
2. 発表標題 時計回りの組織形成を支える集団細胞移動とその作動原理
3. 学会等名 第6回HiHAワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Erina Kuranaga
2. 発表標題 Collective cell movement in looping morphogenesis
3. 学会等名 Crete EMBO conference (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Erina Kuranaga
2. 発表標題 Collective cell movement in looping morphogenesis
3. 学会等名 75th SDB & 19th ISD joint meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Erina Kuranaga
2. 発表標題 Collective movement of epithelial cells regulated by left-right asymmetric cell polarity in clockwise morphogenesis
3. 学会等名 第89回生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Erina Kuranaga
2. 発表標題 mechanical perspective of collective cell movement in looping morphogenesis
3. 学会等名 CDB Retreat 2016 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Erina Kuranaga
2. 発表標題 in vivo analysis of spontaneous competitive apoptosis in Drosophila epidermis
3. 学会等名 2nd International Symposium of Cell competition, apoptosis and cancer (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Erina Kuranaga
2. 発表標題 Collective movement of epithelial cells regulated by left-right asymmetric cell polarity in clockwise morphogenesis
3. 学会等名 22nd International Congress of Zoology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Erina Kuranaga
2. 発表標題 Chiral cell intercalation drives directional collective cell movement in looping morphogenesis
3. 学会等名 MBSJ 2016 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 倉永英里奈
2. 発表標題 時計回りの器官形成を支える集団細胞移動
3. 学会等名 東京大学薬学部遺伝学教室セミナー「直観から紐解く生命現象の理解」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Erina Kuranaga
2. 発表標題 collective cell movement in looping morphogenesis
3. 学会等名 Joint meeting of GfE and JSDB (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考