

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月27日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01350

研究課題名(和文)細胞形状の時空間制御に伴う細胞骨格・小器官のダイナミクスと細胞遊走機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of cell migration associated with dynamics of cell cytoskeleton and organelles by spatiotemporal control of cell shape

研究代表者

菅原 路子 (Sugawara, Michiko)

千葉大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30323041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、紫外光照射による光応答性培養基板を用いて細胞形状を遊走時に見られる二等辺三角形にパターンングし、免疫蛍光染色により微小管および中心体の局在と細胞核の位置を観察した。その結果、細胞形状が極性を有する場合、パターンングしない場合と比較し、中心体が細胞下部に局在することが明らかとなった。その後、微小管分解・再形成後において中心体の局在に変化がみられなかったことから、微小管分布ではなく細胞形状極性が、中心体の細胞高さ方向における位置に影響を及ぼすといえた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞が基質上を這い回る細胞遊走の制御は、再生医療支援を始めとする次世代の医工学分野における基幹技術であり、その確立のためには遊走メカニズムの解明は必要不可欠である。特に、細胞形状の非対称性、すなわち細胞極性の形成や、核と微小管形成中心を結ぶ軸が細胞遊走と関連することは知られていたものの、それらを理論立てて裏付ける研究は皆無であり、細胞遊走メカニズムの全容解明には程遠い状況であった。そのため、これからの医工学分野において本研究成果の学術的意義および社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, the cell shape was micro-patterned into a triangle seen during migration using a photoresponsive culture substrate by UV light irradiation, and the localization of microtubules and centrosomes and the location of cell nuclei were observed by immunofluorescent staining. As a result, it was revealed that the centrosome localized in the lower part of the cell when the cell shape had polarity compared with the case where it was not patterned. After that, no change was observed in the localization of the centrosome after microtubule dissociation and reassembling, so it can be said that cell shape polarity, not microtubule distribution, affects the position of the centrosome in the cell height direction.

研究分野：細胞遊走に関するバイオメカニクス

キーワード：細胞遊走 細胞内小器官局在 光応答性培養基板 細胞形状制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

次世代の医工学応用分野では、例えば再生医療において幹細胞から目的の組織・臓器を作るにあたり異質な細胞を取り除き純化するソーティング手法として、またドラッグデリバリーシステムにおける能動的ターゲティングのためのキャリアとして、細胞遊走機能を制御する手法の開発は必要不可欠である。細胞遊走は、主にアクチン骨格の自己再構築と焦点接着斑と呼ばれる足場の形成・解離の繰り返しにより実現し、細胞形状の非対称性、すなわち形状極性が遊走方向と関連するとの報告がある。その一方で、古くから、核と微小管形成中心(MTOC)を結ぶ nuclear-centrosomal axis (NC axis)もまた、細胞遊走方向と関連することが言われてきた。さらに近年の研究では、細胞遊走に伴い形成される焦点接着斑には、アクチン骨格のみならず微小管もリクルートされること、アクチン骨格および微小管ともに核膜に結合可能な分子構造を有することが報告されている。しかし、アクチン骨格および焦点接着斑に加え、核-MTOC-微小管の再配置も考慮した細胞遊走メカニズムの本質的解明の試みは皆無である。

これまでの研究成果の内容 申請者はこれまで、形状極性の変化に伴い方向転換遊走する細胞において、アクチン骨格および焦点接着斑の時空間ダイナミクスに基づき、そのメカニズムを世界に先駆け提唱した。その研究過程において、形状極性の形成は細胞遊走の継続に必要不可欠であることを見出した。そこで、形状極性の形成と細胞内小器官、特に NC axis との関連を調べるべく光応答性培養基板を用い、細胞接着領域を時空間に制御可能なマイクロパターニング手法により、三角形に形状制御した細胞の遊走方向観察を試みた。その結果、過去の研究報告と同様に細胞は三角形の底辺側に遊走することを示したのみならず、過去には着目されなかった NC axis のダイナミクスも同時観察し、HeLa 細胞 (ヒト子宮頸部由来の株化培養ガン細胞) では、MTOC が核よりも三角形の頂点側に位置する場合、細胞がより遊走を開始しやすいことを世界ではじめて見出した。また、このような特性は細胞種依存であり、NIH 3T3 細胞 (マウス線維芽細胞様の株化培養細胞) では、MTOC と核の位置関係は反対になることを、事前実験において明らかにしている。これらのことから、従来のアクチン骨格および焦点接着斑に着目するだけでは細胞遊走メカニズムの解明に十分ではなく、それらと核-MTOC-微小管の関係を明らかにしてはじめて、細胞遊走の本質的理解につながるとともに、そのメカニズムを利用した細胞遊走の制御技術を確立できるといえる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、まず、光応答性培養基板を用い、高効率に細胞形状のマイクロパターニングを行う実験系の構築を行う。本研究を効率的に進めることを考慮すると、これまでの形状一つ一つを高精細にパターニングする技術のみでは十分ではなく、効率性を高めることがその後の実験遂行のカギを握ると言える。その上で、核、MTOC および微小管を同時観察可能な観察・定量解析系を確立し、細胞遊走時にみられる形状極性を有する細胞において、核-MTOC-微小管系の関係を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高効率な細胞形状のマイクロパターニング

現有の蛍光・位相差顕微鏡では、高精細なパターニング手法はすでに確立しているものの、今後の実験の高効率性を考慮すると、同時大量パターニング、および電動ステージ制御による同時大量観察の実験系を確立することは重要である。そこで、購入し、現有の蛍光・位相差顕微鏡に電動ステージセットを組み込むことにより、パターニングにおける効率良い多点紫外線照射を可能とすると同時に、広い視野から観察に適した細胞を選別し観察する多点タイムラプス観察を可能とする実験系を構築した。

実験では、構築した図 1 に示すシステムを用い、細胞形状を遊走時を模した二等辺三角形にマイクロパターニングした。

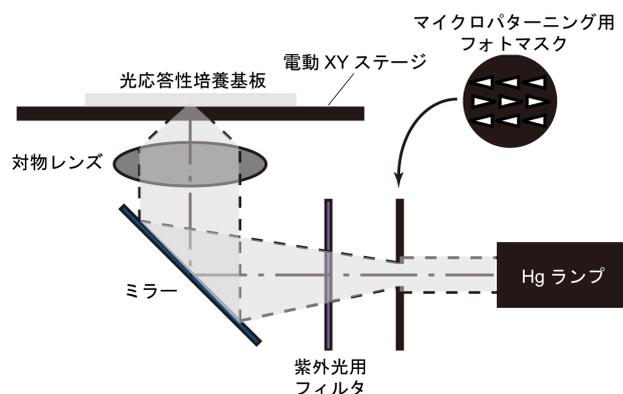


図 1 紫外線照射のための光学系の概略図。次ページの図 4 に詳細を示す光応答性培養基板は、フォトマスクを通した紫外線照射により、細胞接着領域を変化させることが可能である。

#### (2) 微小管、微小管形成中心(MTOC)および核の観察・定量解析

免疫蛍光染色法により、細胞内の微小管、MTOC および核を蛍光標識した試料を作製し、顕微鏡下にて蛍光観察・撮影した。撮影画像を画像解析することにより、各器官の局在を定量的に求めた。また、微小管の影響を検討するために、Nocodazole を用い、微小管脱重合実験を行なった。その際の MTOC および核の観察・定量解析を前述と同様に実施した。さらにその後、Nocodazole を除去し微小管を再形成させ、再び細胞内の微小管、MTOC および核の局在を定量的

に求めた．

#### 4．研究成果

はじめに，パターンニングした細胞の微分干渉像を図1(a)に，微小管と中心体の蛍光染色画像を図1(b)に示す．XY平面上における，細胞を播種してから9時間後の核の面積中心と中心体の距離  $d$  の分布を求めたところ，90%以上の中心体は核の面積中心から  $10\ \mu\text{m}$  以内の領域に位置していた．ここで，HeLa細胞において，核の半径は  $10\sim 20\ \mu\text{m}$  であるため，中心体は核と重なって位置していることとなる．しかし，核膜内には中心体および中心体を構成するタンパク質が存在しないことから，中心体は細胞底面近傍のみならずZ方向に分布しているのではないかと考えられた．

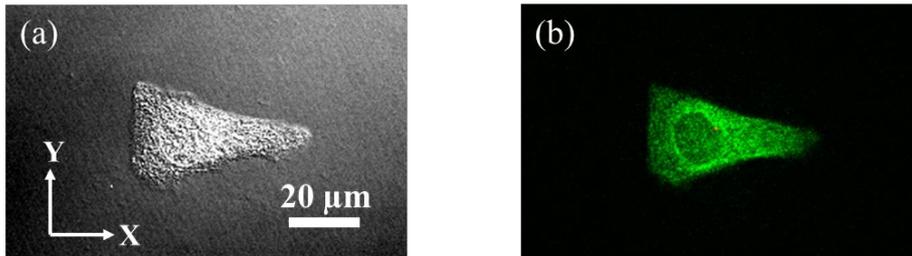


Fig. 1 Example of a cell image. (a) Differential interference contrast image. (b) Merged fluorescence image of microtubules (green) and centrosome (red).

そこで，図2(a)に示すように共焦点レーザー顕微鏡で取得した画像に対して三次元的に再構成し，中心体を通るXZ断面で切断した．そのときの観察結果を図2(b)に示す．ここで，中心体のZ座標を解析により定量化した．各細胞の高さを1としたときの相対的な中心体高さ  $Z_{rel}$  ( $=C_z/Z_{all}$ ) を図3(a)に示すように定義し，その分布を図3(b)に示す．中心体の高さは蛍光スライス画像のうち，一番鮮明に中心体が観察された面と定義した．その結果，中心体は  $Z_{rel} = 0\sim 0.2$  と  $0.4\sim 0.6$  を中心に，全体的に局在していることがわかった．中心体の高さが，底面近傍の  $Z_{rel} = 0\sim 0.2$  のみならず， $0.4\sim 0.6$  までにも局在していたひとつの要因として，中心体から伸びる微小管の配向が関係していると考えられる．そこで，細胞内における微小管の分布を求めた．

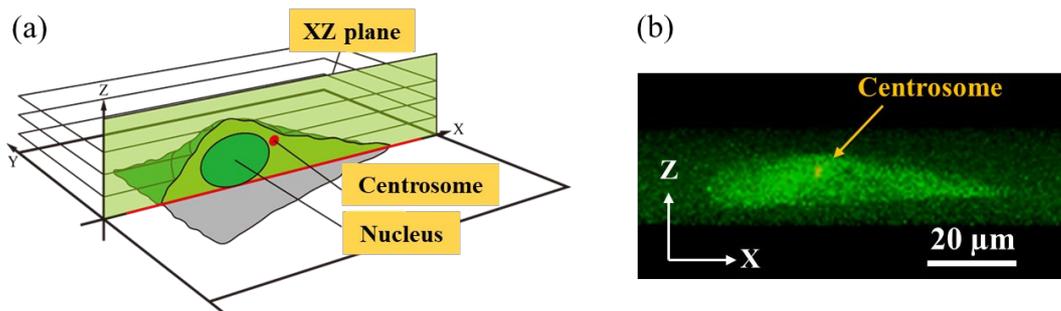


Fig.2 Analysis of three dimensional centrosome position. (a) Schematic diagram of HeLa cell on XZ plane. (b) Image of HeLa cell on XZ plane.

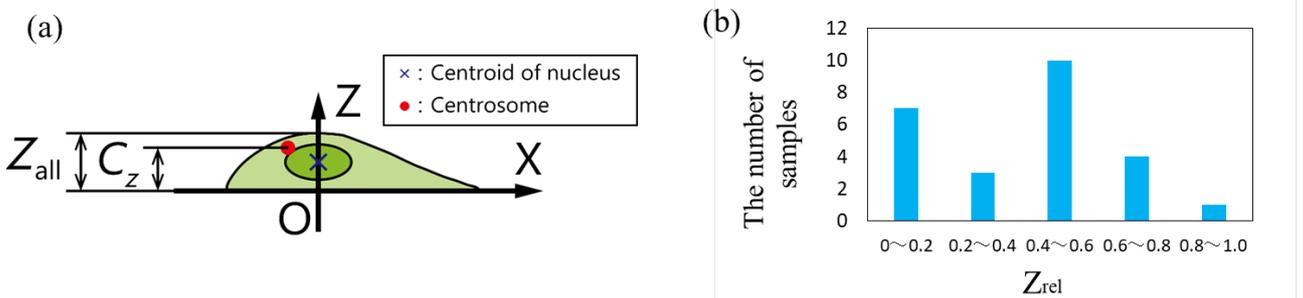


Fig. 3 Results of three dimensional centrosome position (a) Definition of cell total height and centrosome height. (b) Distribution of centrosome height.

中心体が細胞下面に位置する場合において，細胞下面と上面，それぞれの微小管の輝度値の合計を面積で除した平均輝度値を求めた結果を図5(a)に示す．グラフより，微小管の平均輝度値には有意差が見られた．これに対し，中心体が細胞上面に局在している場合において，同

様に微小管の平均輝度値を求めた(図 4 (b))が、微小管の平均輝度値には有意差は見られなかった。そこで、微小管がどのように分布し、核や中心体といった内部構造と影響し合うかを考察した。中心体が細胞下面に局在しているとき、微小管は図 5 (a) のように細胞下面に高密度に分布していると考えられる。これに対し、中心体が細胞上面に局在しているとき、微小管は図 5 (b) のように上面を中心に分布しながらも、細胞下面にも分布する傾向があると考えられる。これは、細胞が二次元平面上に接着しており、運動するために必要な焦点接着斑やアクチンといった内部構造は細胞底面を中心とした細胞下面に集中することから、細胞上面に中心体が局在していても細胞下面に向けて微小管が配向したためであると予想される。

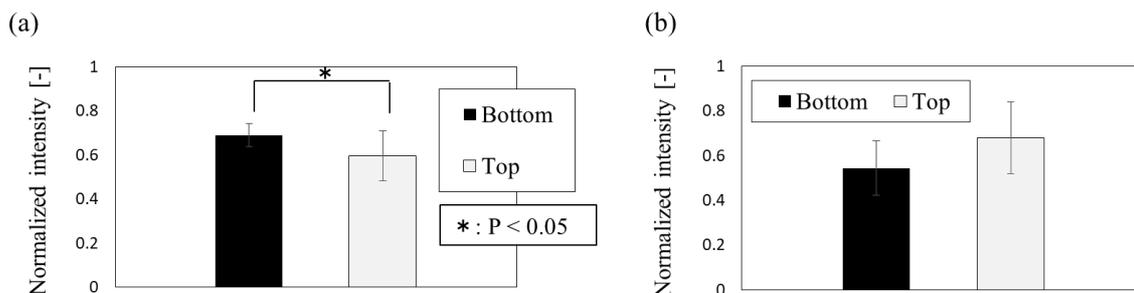


Fig. 4 Normalized intensity of microtubules. (a) The centrosome is on the bottom of the cell. (b) The centrosome is on the top of the cell

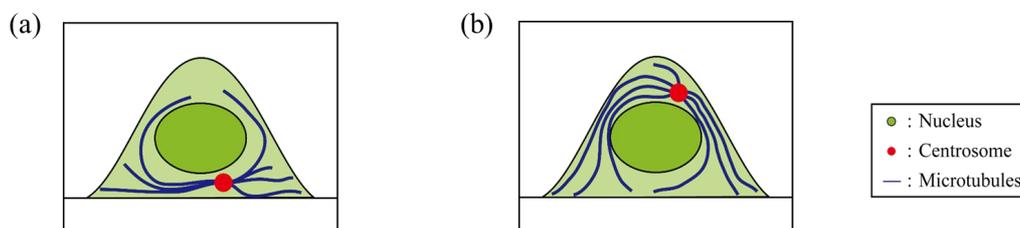


Fig. 5 Schematic diagram of distribution of microtubules. (a) The centrosome is on the bottom of the cell. (b) The centrosome is on the top of the cell

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Michiko Sugawara\*, Hiromi Miyoshi, Takuya Miura, Hiroto Tanaka, Ken-ichi Tsubota, Hao Liu, "Dynamics of actin stress fibers and focal adhesions during slow migration in Swiss 3T3 fibroblasts: Intracellular mechanism of cell turning", *BioMed Research International*, 2016 (2016), 5749749, 査読有り

〔学会発表〕(計 5 件)

Kazuki Yoshida, Kazuya Okawa, Hao Liu, Michiko Sugawara, "Three-dimensional analysis of Shape change associated with movement of fibroblasts", *International Workshop on Effective Engineering Education (IWEEE)*, Kisarazu, Japan, July 2016

Michiko Sugawara, Hiromi Miyoshi, Ken-ichi Tsubota, Hao Liu, "Change in cell shape during slow migration in Swiss 3T3 fibroblasts", *The 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics SJB2017*, Zermatt, Switzerland, September 2017

吉田一樹, 中西淳, 菅原路子, 細胞形状拘束に伴う細胞骨格・小器官再形成の解析, 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会(京都) 2017 年

半澤拓海, 深山達也, 野々村真規子, 中西淳, 菅原路子, MDCK 細胞を用いた円形制限領域における集団細胞遊走解析, 日本機械学会第 28 回バイオフロンティア講演会(徳島) 2017 年

瀧上颯太, 小祝穂高, 吉田一樹, 山口和夫, 中西淳, 菅原路子, 細胞形状拘束下における微小管および細胞内小器官の分布に関する研究, 日本機械学会第 31 回バイオエンジニアリング講演会(郡山) 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：中西 淳，長山和亮

ローマ字氏名：Jun Nakanishi, Kazuaki Nagayama

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。