

令和元年6月18日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18537

研究課題名（和文）這いまわる細胞の「進む」と「曲がる」の間をつなぐルールの解析

研究課題名（英文）Analysis of the steering in cell migration

研究代表者

中島 昭彦（Nakajima, Akihiko）

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：90612119

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまで個別に調べられてきた細胞の這い回り運動を包括的に理解するため、マイクロ流路を用いて、細胞外環境の精密操作実験系、およびハイスループット観察実験系を構築した。粘菌アメーバと好中球にこの実験系を適用し、刺激のパターンに応じた運動様式が選択されることや、同一細胞集団中に複数の特徴的な運動様式が存在していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したマイクロ流路実験系は、今回使用しなかった様々な細胞種、リンパ球等の免疫細胞やガン細胞、多細胞組織といった対象に適用することができ、発生や医学的な知見を得ることに利用できる。また、本研究で見出された細胞の遊走の知見は、細胞の免疫応答やガンの浸潤の制御といった医学工学的応用にも役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：We constructed an experimental system for precise manipulation of the extracellular environment and a high-throughput observation experimental system. These were applied to the analysis of chemotactic migration of the slime mold amoeba and neutrophil-like cell line HL60. We found that, for the direction switch of chemoattractant gradient, HL60 cells showed two migration mode; one was the reorientation by making a U-turn and the other was a new leading edge formation. From the analysis of a high-throughput imaging analysis, it was found that there were several migration modes in the population and the stability of cell polarity was dependent on cell size.

研究分野：生物物理

キーワード：細胞運動 走化性 細胞極性 微細加工 マイクロ流路 ライブイメージング ハイスループット 深層学習

1. 研究開始当初の背景

走化性に関して、這いまわる細胞のモデル系である免疫細胞や粘菌細胞を中心に多くの知見が得られてきた。勾配の向きを読み取って細胞が「進む」メカニズムとして、主に2つのモデルが提案され、支持されている。一つは、局所活性-大域抑制モデル (Local Excitation Global Inhibition (LEGI) model) で、もう一つは仮足伸長・選択モデルである。LEGI モデルは濃度の高い向きをよみとり (方向検知) それに従って仮足が形成されると考える、いわば「シグナル中心主義」であるのに対し、仮足伸長・選択モデルは、自発的な仮足や極性形成がより本質的で、濃度勾配はそのプロセスを確率的にバイアスすると考える「仮足中心主義」ないし「極性中心主義」である。これらはそれぞれ這いまわる細胞の一端を捉えていると考えられるが、いまだ統一的理解には至っていない。しかしながら、最近の研究で、細胞極性が方向検知に影響を及ぼすことや、細胞の速度と方向検知の正確さが両立しづらいことが示唆されたり、様々な細胞種に共通する、細胞極性と移動速度の間関係性が示されてきている。その一方で、申請者らが主に扱ってきた細胞性粘菌は、誘因物質サイクリック AMP (cAMP) の進行波によって集合、多細胞化するが、波の前面と背面で cAMP 濃度の勾配が逆転するため、勾配に対する走化性から一方向的な運動が出現することは大きな謎であった。申請者らは、マイクロ流路内の濃度勾配の動的制御と、細胞動態の定量的解析により、細胞には濃度の時間変動を読み取る「整流作用」があることを明らかにし、波に対する一方運動を理解した。この結果は主に LEGI モデルを支持していたが、這いまわる細胞の時空間的情報処理の普遍性を探るため、粘菌に加えて免疫細胞の動的勾配下での運動を調べ、比較する中で、刺激が動くと、細胞の方向検知と細胞極性の間にずれが生まれることや、「進む」ことと「曲がる」ことが細胞の異なる2つのモードを切り替えている傍証が得られてきた。これらの結果から、這いまわる細胞の極性や移動速度(「進む」と方向転換(「曲がる」)の間には何らかのルールがあることが期待され、新規に開発する流路系を駆使することで、その詳細な解析が可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、微小流路系をもちいて誘引物質濃度とその勾配の向きを高精度に制御し、細胞の方向転換の様子の定量的動態解析と数理的解析を駆使して、細胞の方向転換機構を理解する。さらに、さまざまなタイプの這いまわる細胞をもちいて先導端形成・消失の動態観察することから、極性の強さや移動速度と方向転換能の間に潜むルールを明らかにし、這いまわる細胞の普遍性にせまる。細胞の移動速度や極性と、方向転換時の仮足の生成・消失の間にあると期待している関係性に注目し、這いまわる細胞の異なる描像(「シグナル中心主義」と「仮足中心主義」)を統一して理解する視点を提示する。

3. 研究の方法

フォトリソグラフィ技術を用いて、走化性誘引物質環境を制御するマイクロ流路を作成した。CAD ソフトウェアを用いて、流路のデザインを作成し、それを元にフォトマスクを作成した。フォトレジスト SU8 を塗布したシリコン基盤にフォトマスクを重ね、UV 照射することによって、パターンを転写したのち、現像することで SU8 モールドを作成した。透明なシリコン PDMS を SU8 モールドにキャストし、熱重合させたのち PDMS を切り出した。切り出した PDMS ブロックとカバーガラスをプラズマ処理によって結合させ閉流路を作成した。

細胞遊走を誘起する誘引物質の勾配の向きの操作を、新規マイクロ流路をもちいて、勾配の向きを変化させながら、細胞の方向転換の動態や細胞内シグナル分子動態を共焦点レーザー顕微鏡下でタイムラプス観察した。

取得した細胞動態データを ImageJ や MATLAB を用いて画像処理し、細胞の移動した軌跡、移動速度、細胞形態、細胞内分子の局在や時間応答について解析し評価した。

4. 研究成果

這いまわる細胞の細胞極性や移動速度(「動く」こと)と方向転換(「曲がる」こと)との間にある関係性を明らかにするために、まず、細胞の方向転換についての詳細な実験を可能とするマイクロ流路実験系である、“Microfluidic-lighthouse”を開発した。これまでは困難であった、層流と濃度勾配の方向を 360° 任意の向きに提示、制御して動的な細胞刺激場を作り出すことが可能になった。この新規実験系を用いて、ヒト好中球様細胞に異なる向きの勾配をある一定時間で切り替えて提示した際の方向転換動態を解析し、細胞の方向転換には、U ターンと極性の作りかえという異なる運動モードが、刺激の方向変化率の違いに応じて選択されることを明らかにした。

走化性細胞の極性形成や方向転換能の解析を進めるにつれ、遺伝的背景が同一の細胞で、かつ同一の環境下においても、細胞の運動速度や走化性能に大きなばらつきが見られるこ

とがわかってきた。走化性能に関する個々の細胞の特性をより詳細に調べるため、高さ、幅が共に $5\ \mu\text{m}$ 程度に制限されたマイクロチャンネルをアレイ化したマイクロ流路を作成し、1 回の実験で、細胞の形態や運動、走化性シグナル分子の細胞内局在動態を高解像度で数百細胞分取得できるハイスループットライブイメージング計測系を構築した。これまでの細胞遊走の先行研究の多くでは、せいぜい 10 から数十細胞分の遊走動態を解析していたのに対して、本計測系では、1000 を超える細胞についての膜変形や細胞内分子動態解析が実現された。その結果として、大量の生細胞動態の画像処理が必要になるという新たな問題が生じたため、そのボトルネックを解消することを目的に、深層学習を利用した細胞輪郭の自動検出を実現し、大量の画像処理を自動的に行えるようになった。それらから、粘菌アメーバと好中球様培養細胞株 HL 60 の移動速度と細胞極性動態が細胞サイズに依存することを見出した。細胞サイズが中程度の場合、移動速度と細胞サイズは正の相関を示し、F-actin の細胞局在動態から評価した細胞極性は単一の方向、誘引物質濃度の高い方向に安定していた。ある一定サイズを超えた大きい細胞では、細胞サイズが大きくなるにつれてむしろ移動速度は減少し、細胞は誘引物質濃度の高い側のみならず低い側に先端端を形成し双極的な極性を示した。細胞サイズが小さくなると、先端端が一方に安定せず誘引物質の高濃度側と低濃度側の間を振動し、その結果、方向的移動が見られなくなった。細胞の誘引物質刺激への応答性と極性動態の関係をさらに調べるため、マイクロ流路を用いて誘引物質方向の時間反転実験系を構築し、誘引物質方向を反転させた場合の方向転換動態解析を現在進行中である。現時点で、誘引物質方向反転に対する細胞極性の誘引物質方向への追従性についても細胞サイズ依存性が見られるという予備の結果を得ており、今後、アクチン関連分子についての薬剤阻害や遺伝子欠損株を用い、さらに解析していく予定である。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- Fujimori T., Nakajima A., Shimada N., Sawai S. (2019) Tissue self-organization based on collective cell migration by contact activation of locomotion and chemotaxis, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 116 (10) 4291-4296
- Kamino, K, Kondo, Y., Nakajima, A., Honda-Kitahara M., Kaneko, K., Sawai S. (2017) Fold-change detection and scale-invariance of cell-cell signaling in social amoeba. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 114 (21), E4149-E4157, doi: 10.1073/pnas.1702181114
- Nakajima, A., Ishida, M., Fujimori, T., Wakamoto, Y., & Sawai, S. (2016). The microfluidic lighthouse: an omnidirectional gradient generator. *Lab on a Chip*, 16(22), 4382-4394. doi:10.1039/C6LC00898D
- Fukujin, F., Nakajima, A., Shimada, N., & Sawai, S. (2016). Self-organization of chemoattractant waves in Dictyostelium depends on F-actin and cell-substrate adhesion, *J. R. Soc. Interface.*, 13: 20160233.

[学会発表] (計 13 件)

- Nakajima A. (2019) Search strategy in fast-migrating cells: direction sensing, memory, and polarity, Reinforcement Learning & Biological Intelligence: Learning from biology, 2019 年 3 月、駒場 II キャンパス、招待講演
- Nakajima A. (2017) " 走化性細胞遊走の時空間情報処理特性 "、応用数理学会年会、数理医学サブシンポジウム、2017 年、招待講演
- Nakajima A. (2016). " Generality and specificity in chemotaxis response of immune cells in dynamic gradients of chemoattractant, " the 54th annual meeting of the biophysical society of Japan., symposium " Physical Immunology. "
- Nakajima A. (2016). " Delineating temporal and spatial sensing in migrating cells: chemotactic wave paradox and rectification of the leading edge response, " the 54th annual meeting of the biophysical society of Japan、招待講演
- 中島 昭彦 (2016) 「細胞の走化性における時間空間センシング」、第 6 回日本細胞性粘菌学会、招待講演
- Nakajima A, Ishihara S, Ishida M, Imoto D and Sawai S. Delineating temporal and spatial aspects of directional sensing in migrating cells, Winter Q-bio conference, Hawaii, USA, February 2016 (selected talk)

[図書] (計 2 件)

- 中島昭彦、澤井哲 (2018) 這い回る細胞の走化性に関する定量生物学、定量生物学 第 6 章 (小林徹也編)
- 中島昭彦、石原秀至、澤井哲 (2016) 「動く細胞が読み取る時間と空間：走化性のパラドクスと整流作用」生物物理 (生物物理学会誌) 56 (2) p. 98-101. (カバーイラストに選

出)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：流体流制御装置及び流体流制御方法

発明者：澤井哲、中島昭彦

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 JP2017/155594

出願年：2016

国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし