

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15002

研究課題名(和文)シグナル分子の光操作による上皮細胞集団遊走機構の解析

研究課題名(英文)Analyses on collective cell migration of epithelial cells by controlling signal molecules with light

研究代表者

稲葉 弘哲 (INABA, Hironori)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80791334

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)：本研究では光遺伝学の高い時空間分解能を生かしてシグナル分子の活性を制御し、上皮細胞の集団遊走の分子機序、特にリーダー細胞の形成機構とリーダー/フォロワー関係の維持機構の解明を目指した。新たな光遺伝学ツールとしてRhoAGAPのスイッチを作製した。リーダー細胞の形成にはPI3Kの活性化と、RhoAの適切な活性制御が重要であることが示唆された。一方で、リーダー/フォロワー関係の維持においてRhoAの高い活性が必要であるかについては明確な結果が得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
細胞の集団遊走は器官形成、創傷治癒、癌の浸潤転移など様々な生命現象において重要な現象である。これまでの研究手法では細胞集団の中の個別の細胞の機能を操作することは困難であった。本研究では光遺伝学を用いることでこの課題の解決を目指した。光照射の時空間的な制御によって個別の細胞の機能を操作するだけでなく、シグナルの活性化について時間的な制御も可能となった。また、本研究で作製した光遺伝学ツールは他の細胞生物学研究にも応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Optogenetics can control signaling molecules with high spatiotemporal resolutions. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of collective cell migration of epithelial cells, especially the mechanisms of leader cell formation and maintenance of the leader-follower relationship, using optogenetics. For this purpose, we developed a new optogenetic tool, opto-RhoAGAP. Our data suggested that activation of PI3K and proper regulation of RhoA activity are essential for the formation of leader cells. On the other hand, we could not obtain clear results about whether high RhoA activity is essential for leader-follower relationship.

研究分野：細胞生物学

キーワード：集団遊走 光遺伝学 細胞運動 RhoA PI3K 上皮

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞の集団遊走は、器官形成、創傷治癒、癌の浸潤・転移など様々な生命活動において重要な現象である。集団遊走において細胞群は集団の先頭に位置し、高い運動性を発揮するリーダー細胞と、それに追従するフォロワー細胞とに分かれる。一旦リーダー/フォロワーの関係が形成されると、フォロワー細胞は新たなリーダー細胞とはならず、この関係性が維持される。リーダー細胞では遊走方向に対してシグナル分子の濃度勾配が形成され、極性化する。その結果、細胞前部で突起伸長や基質接着が促進され、細胞遊走の駆動力が発揮される。このようなシグナル分子の顕著な活性化・極性はリーダー細胞のみで見られ、フォロワー細胞ではみられない。しかし、最初均一であった細胞集団の中からどのようにリーダー細胞が出現するのか、リーダー/フォロワー細胞の関係はどのようにして維持されるのか、については未解明な部分が多い。これは、既存の研究手法ではシグナル分子の局在観察などによって提示されたモデルを十分に検証できなかったためである。例えば、RNA 干渉法や阻害剤を用いると、細胞群全体に影響を与えてしまい、特定の細胞（例えばリーダー細胞）の機能を明らかにできなかった。

光遺伝学は光応答性タンパク質の特性を利用し、光照射によってシグナルの ON/OFF を可逆的かつ時・空間的に自在に操作できる技術である。この光遺伝学の特性を用いると、上記のようなこれまでの実験手法の課題点を解決できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、光遺伝学を用いることで以下の2点を明らかにすることを目的とした。(1) 細胞集団で1つの細胞が極性化し、リーダー細胞となる機序。(2) リーダー細胞とフォロワー細胞の関係を維持するための分子機序。

3. 研究の方法

(1) 集団遊走の観察系と光遺伝学の適用

イヌ腎臓尿細管上皮細胞(MDCK 細胞)を集団遊走のモデルに用いた。光遺伝学ツールは当初トランスフェクションで導入したが、導入効率が不十分であったため、レンチウイルスベクターを用いて導入し、薬剤選択によりクローニングした。基質の硬さにより細胞の遊走形式が異なるため、ガラスとコラーゲンゲル(Type I-A: 新田ゼラチン)の双方を試みた。ガラスの場合にはカルチャーインサート(Ibidi)を用い、コラーゲンゲルの場合には円柱状のプラスチックをゲル上に設置し、その内部に MDCK 細胞を播種し、単層でコフルエントにしたのちに障壁を除去することで接触阻止を解除し、外側の開いた空間への集団遊走を観察する系を立ち上げた。

(2) 光刺激によるリーダー細胞の形成誘導

リーダー細胞のみで高い活性化・極性が報告されているシグナル分子(PI3K, RhoA, Ca²⁺, integrin β 1 など)をリーダー細胞形成の誘導分子候補とし、それぞれの阻害剤を用いて遊走速度や、リーダー細胞の数を検討した。候補となる分子の光遺伝学ツールをそれぞれ作製し、接触阻止を解除後に、外周部の1細胞に青色光を照射することでリーダー細胞の形成を誘導できるかを検討した。

(3) リーダー細胞とフォロワー細胞の関係を維持するための分子機序

リーダー細胞における RhoA の高い活性がリーダー/フォロワー関係の維持に重要である(Raffay et al., Nat Cell Biol, 2014)という仮説の検証を試みた。まず、RhoA の不活性化因子 GTPase activating protein (GAP)の光遺伝学ツールを作製した。MDCK 細胞に導入し、接触阻止を解除後 48~72 時間後に形成されたリーダー細胞に青色光を照射し、リーダー細胞としての機能を失い、フォロワー細胞の中から新たなリーダー細胞が形成されるかを観察した。

4. 研究成果

(1) 1.6%のコラーゲンゲル上での MDCK 細胞の集団遊走における各種阻害剤の影響を調べた。その結果、Notch の阻害剤(DAPT)では影響がみられなかったが、TGF- β 阻害剤(SB431542)、PI3K 阻害剤(LY294002)、Rho-kinase(ROCK)阻害剤(Y27632)、ミオシン阻害剤(blebbistatin)、CDK1 阻害剤(R03306)ではいずれも濃度依存的に集団遊走能の低下がみられた。このうち CDK1 阻害剤については、細胞の分裂が抑制されることで細胞シートとしての広がりや抑制された結果と考えられ、遊走能に直接的な影響を与えたかは不明である。一方、興味深いことに TGF- β および PI3K の阻害剤では、低濃度条件下においてリーダー細胞の形成が顕著であった。顕微鏡下では、リーダー細胞が最終的にフォロワー細胞と離れてしまう事象がしばしば観察され、上皮間葉転換がある程度抑制されることで細胞間接着が保たれ、集団遊走が維持されるのではないかと考えている。ROCK 阻害剤とミオシン阻害剤ではリーダー細胞の形成は見られず、この RhoA-ROCK-myosin 経路はリーダー細胞の形成に必須であると考えられた。

(2) PI3K の光遺伝学ツールは既に研究室で作製されていたため、RhoA の GEF と GAP の光遺伝学ツールを作製した。PI3K のスイッチに倣い CRY2-CIBN の光照射によるヘテロダイマー形成の系を用いた。CIBN に K-Ras の CAAX モチーフを融合し、細胞膜に局在させ、CRY2 に GEF や GAP ドメインを融合した。これにより青色光の照射により GAP や GEF ドメインが細胞質から細胞膜へ

と局在変化し、細胞膜に局在する RhoA に対して機能する仕組みにした。CRY2-GEF(GAP)と CIBNcaax は 2A peptide によって連結したプラスミドとして作製した。ミオシン軽鎖のリン酸化およびアクチンの重合について、光照射後の経時変化を調べ、これらの光遺伝学ツールによって RhoA の活性を制御できることを確かめた。しかしながら、CRY2-CIBN の結合は暗所にしてからの乖離が遅い(半減期が 5 分程度)ため、局所的な活性化に向いていない、CRY2 の分子量が大きいためレンチウイルスを用いて感染させることは難しい、という問題点が生じた。そこで、よりサイズが小さく乖離も早い iLID の系に変更した。これは光依存的な iLID と SspB のヘテロダイマー形成のシステムである。PI3K のスイッチもこちらの系に移した。青色光による細胞膜への移行は CRY2-CIBN の系と比較するとやや弱いものの、局所的な活性制御も目的通り可能であった。

(3)(2) で作製した光遺伝学ツールをレンチウイルスを用いて MDCK 細胞に導入し安定発現株を作製した。ガラス基質上で wound healing assay を行なったところ、RhoAGEF の光スイッチでは、光照射量に依存した運動速度の低下がみられた。また、野生型の細胞と光スイッチ発現細胞とを 5:1 の割合で混合し、コラーゲンゲル上で障壁除去 48 時間後に形成されたリーダー細胞における光スイッチの発現の有無を調べたところ、RhoAGAP、RhoAGEF のスイッチでは光照射時にリーダー細胞となる割合が減少し、PI3K の光スイッチではリーダー細胞となる割合が増加した。これらの結果から、リーダー細胞の形成には PI3K の活性と RHOA の適切な活性制御が必要であることが示唆された。しかしながら、PI3K の光スイッチ発現細胞において、障壁除去後から特定の細胞にのみ青色光を照射し、リーダー細胞の形成を誘導できるか試みたが、有意な結果は得られなかった。

(4) RhoAGAP の光スイッチ発現細胞において、コラーゲンゲル上で 48~72 時間集団遊走させた後に、形成されているリーダー細胞に青色光を照射し、リーダー/フォロワー関係に及ぼす影響を検討した。その結果、遊走速度は有意に低下したがリーダー細胞としての能力を失うまでには至らなかった。RhoAGAP の安定発現株は、他のスイッチと比べて発現レベルが低かったことから、十分な RhoA の不活性化に至らなかった可能性が考えられた。そこで、光を照射した際にミトコンドリアへ局在する RhoAGEF のスイッチを作製した。これは、光照射なしの時には RhoA を活性化し、照射すると活性化がなくなるタイプのスイッチである。しかしながら、このスイッチを用いてもリーダー細胞としての能力を失わせることはできなかった。

本研究で必ずしも狙い通りの現象を引き起こせなかった原因として、光遺伝学ツールのバックグラウンドの問題が考えられた。すなわち、光遺伝学ツールの発現のみによって標的シグナルの活性が有意に変動していた。光の照射によってこれをさらに変動させることは出来ているが、野生型に近い状況を光照射前に再現できていないことが原因の 1 つと考えられる。最近、光遺伝学ツールのバックグラウンドを低減させる仕組みがいくつか報告されており、今後検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inaba Hironori, Yamakawa Daishi, Tomono Yasuko, Enomoto Atsushi, Mii Shinji, Kasahara Kousuke, Goto Hidemasa, Inagaki Masaki	4. 巻 498
2. 論文標題 Regulation of keratin 5/14 intermediate filaments by CDK1, Aurora-B, and Rho-kinase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 544 ~ 550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.03.016	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲葉弘哲、中田隆夫
2. 発表標題 光遺伝学を使ったRhoAによる細胞内カルシウムシグナル制御の解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----