

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23748

研究課題名(和文)上皮細胞における運動と増殖の協調的制御機構の解明：細胞間の力学相互作用に着目して

研究課題名(英文) Mechanism for coordination of cell motility and proliferation in epithelial cells: role of intercellular mechanical interaction

研究代表者

平田 宏聡 (Hirata, Hiroaki)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：90414028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：上皮組織が正常に形成され機能するには、上皮細胞の運動と増殖の適切な制御が不可欠である。本研究では、単層培養した表皮細胞をモデルとして、運動と増殖の協調制御について調べた。多細胞協同運動は葉状仮足の形成により駆動されるが、葉状仮足のマスターレギュレーターであるRac1が表皮単層中で細胞の運動と増殖の両者を促進することが示された。一方で、細胞間接着であるアドヘレンスジャンクション(AJ)の形成を妨げると細胞運動と細胞周期進行の時間依存的協調が攪乱されたことから、AJは上皮組織を形作るとともに組織内の細胞の運動と増殖を協調させていることが明らかとなった。以上の結果は、iScience誌にて発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮組織の発生・機能・恒常性にとって上皮細胞の運動と増殖の両者が時空間的に協調して制御されることが必須であるものの、そのしくみは不明であった。本研究は、表皮多細胞系においてRac1が運動と増殖の共通の駆動因子であることを明らかにするとともに、アドヘレンスジャンクションを介した細胞間のコミュニケーションが運動と増殖を協調させるのに必要であることを解明した。これらの結果は、上皮組織という多細胞システムにおける動的挙動制御のメカニズムに重要な知見を与えるとともに、その破綻としてのがんにおける細胞の振る舞いを理解するのにも貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Development and function of epithelial tissues depend on optimal regulations of motility and proliferation of epithelial cells. In this study, using cultured monolayers of epidermal cells, we examined the mechanism for coordinated regulation of cell motility and proliferation. We showed that Rac1, a master regulator of lamellipodia formation which drives collective cell migration, promoted both cell motility and cell cycle progression in epidermal monolayers. Disruption of the cell-cell adhesion structure, adherens junction (AJ), disturbed time-dependent coordination of cell motility and cell cycle progression after seeding cells, indicating a crucial role of AJ in coordinating motile and proliferative abilities in monolayered epidermal cells. These results were reported in iScience.

研究分野：細胞生物学、生物物理学、メカノバイオロジー

キーワード：メカノバイオロジー 細胞協同現象 アドヘレンスジャンクション 葉状仮足 Rac1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮組織が正常に形成され機能するには上皮細胞の運動と増殖の適切な制御が不可欠であり、これらの細胞活動は上皮組織の生理的・病理的状況に応じて協調的に調節されている。しかしながら、上皮細胞の運動と増殖が時空間的に協調して制御される仕組みは不明であった。

上皮組織において上皮細胞は互いに接着して力をやり取りしている。研究代表者はこれまでに、細胞稠密化による増殖抑制(増殖の接触阻害)にはアクトミオシンの収縮に起因する引張力が細胞間接着部に作用することが必要であることを発見・報告してきた。一方で、胚発生時や創傷治癒時にみられる上皮細胞の協同運動は葉状仮足の突出により駆動されることが知られているが、葉状仮足の突出は細胞間に押力を与えることからアクトミオシン引張力による増殖抑制効果を減弱させると想像された。これらのことから、葉状仮足の形成が上皮組織において細胞運動と細胞増殖の両者を協調させて促進するとの仮説を得るに至った。

2. 研究の目的

本研究では上記仮説をもとに、上皮組織での細胞運動と増殖の協調制御における葉状仮足と細胞間接着の役割を明らかにすることを目的とした。特に、葉状仮足形成のマスターレギュレーターである Rac1 を中心に解析することとした。

3. 研究の方法

皮膚の上皮細胞である表皮細胞を用い、細胞周期進行と細胞運動の長時間ライブイメージングを行うための単層培養系を構築した。増殖期(S、G₂、M期)にある細胞を可視化するため Geminin Fucci 蛍光プローブを細胞に恒常的に導入するとともに、細胞単層における速度場を粒子画像流速計測法(PIV)により計測した。この系を用いた予備実験において、細胞播種後の時間に依存して表皮細胞単層での細胞周期進行と細胞運動が協調的に変化することを見出したため、この時間依存的協調制御について葉状仮足と細胞間接着の役割を解析した。

4. 研究成果

表皮細胞をコラーゲン基質上に単層培養すると、細胞播種後約 30 時間まで盛んな細胞周期進行と細胞協同運動が観察されたものの、30 時間を過ぎるとそれらの細胞活動は低下していき、播種後 50 時間ほどでほぼ消失した(図 1)。30 時間以降の細胞周期進行と細胞運動の低下は細胞を疎に播種した場合にはみられず、細胞密度依存적であった。一方で、細胞の播種密度を飽和レベルまで高めても播種後 30 時間までは細胞周期進行と細胞協同運動がみられたことから、播種後の経過時間に規定される制御機構の存在が明らかとなった。

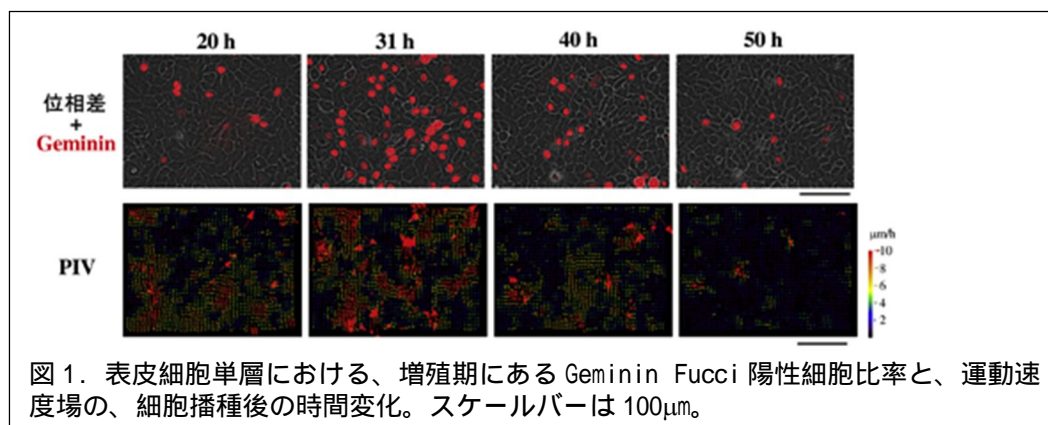
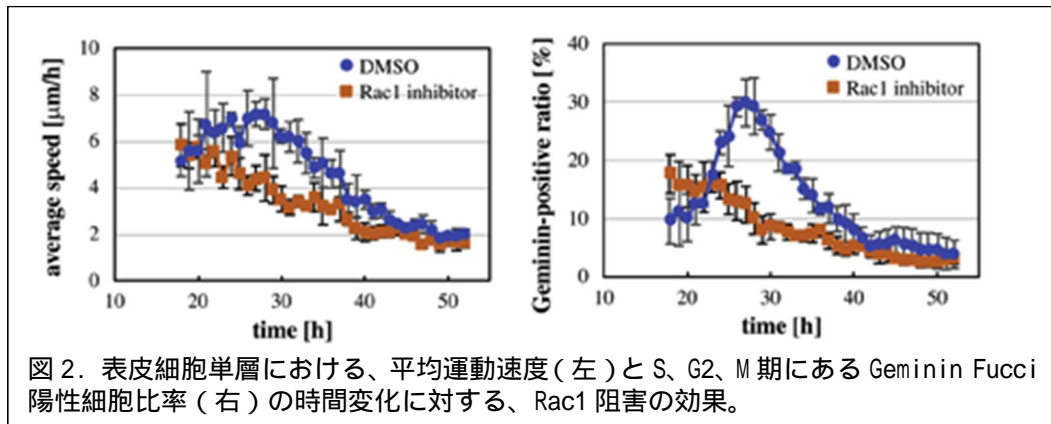


図 1. 表皮細胞単層における、増殖期にある Geminin Fucci 陽性細胞比率と、運動速度場の、細胞播種後の時間変化。スケールバーは 100 μ m。

表皮細胞単層における葉状仮足の形成を F アクチンの蛍光プローブ(蛍光タグ F-tractin)や葉状仮足マーカー分子(cortactin)の観察により評価すると、細胞周期進行や細胞協同運動とともに葉状仮足の形成も播種後 30 時間以降に低下した。また、Raichu バイオセンサーの FRET 計測およびプルダウンアッセイによる Rac1 活性の評価から、葉状仮足の形成を引き起こす Rac1 の活性も播種後 30 時間以降に低下し 50 時間までに基底レベルまで減少することが明らかとなった。そこで Rac1 による葉状仮足形成が播種後 30 時間までの細胞周期進行および細胞協同運動に関与しているか調べるため、Rac1 阻害剤存在下で細胞を播種・経時観察すると、細胞周期進行と細胞協同運動が協調的に抑制されることが観察された(図 2)。これらの結果から、表皮細胞単層において Rac1 による葉状仮足形成が細胞周期進行と細胞協同運動の両者を促進することが示唆された。



細胞周期進行と細胞協同運動の協調制御における細胞間接着の役割を調べるため、主要な細胞間接着構造であるアドヘレンスジャンクション(AJ)に介入した。AJの主要構成分子である α -カテニンの発現を shRNA によりノックダウンして AJ の形成を抑制すると、播種後 30 時間までの細胞周期進行は影響を受けないものの、30 時間以降の細胞周期進行の低下が抑制された。一方で細胞運動は、播種後 30 時間までにおいて大幅に亢進されたものの、30 時間以降では抑制され、50 時間までにはコントロール細胞と同等のレベルにまで低下した。このように、細胞周期進行と細胞協同運動の時間依存的協調は、AJ の形成阻害により攪乱された。同様に、細胞外 Ca^{2+} 濃度を低下させることで細胞間接着分子 E-カドヘリンの結合を抑制した場合も、細胞周期進行と細胞協同運動の協調が失われた。

以上の結果から、表皮細胞単層における細胞周期進行と細胞協同運動はともに Rac1 により駆動され、細胞間接着が両者を協調させていることが示された。これは、上皮組織において細胞運動と増殖がいかに協調され制御されているか、そのしくみの理解に重要な知見を与えるものである。今後は、Rac1 による葉状仮足形成がいかにして細胞増殖を引き起こすのか、そのメカニズム解明が重要課題である。特に、1) 葉状仮足の形成により細胞間接着部の力学状態はどのように変化するのか、2) 細胞間接着部の力学状態はいかにして細胞増殖を制御する分子シグナルに変換されるのか、ということをも明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hirata Hiroaki, Dobrokhotoov Oleg, Sokabe Masahiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Coordination between Cell Motility and Cell Cycle Progression in Keratinocyte Sheets via Cell-Cell Adhesion and Rac1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101729 ~ 101729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101729	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 Nonomura Keiko, Hirata Hiroaki	4. 巻 17
2. 論文標題 Cell mechanosensing underlies homeostasis of multicellular systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 100 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.BSJ-2020019	査読の有無 無
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 Sugimoto Wataru, Itoh Katsuhiko, Hirata Hiroaki, Abe Yoshinori, Torii Takeru, Mitsui Yasumasa, Budirahardja Yemima, Tanaka Nobuyuki, Kawauchi Keiko	4. 巻 7
2. 論文標題 MMP24 as a Target of YAP Is a Potential Prognostic Factor in Cancer Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 18 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering7010018	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 HIRATA Hiroaki, SOKABE Masahiro	4. 巻 60
2. 論文標題 Tension-dependent Generation of Biochemical Signals on Actomyosin Fibers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 089 ~ 093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.60.089	査読の有無 無
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 平田宏聡、Oleg Dobrokhotov、曾我部正博	4. 巻 38
2. 論文標題 細胞増殖の接触阻害における物理的因子の役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 93～99
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 無
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田宏聡、Oleg Dobrokhotov、砂川真輝、榎本篤、曾我部正博
2. 発表標題 表皮細胞増殖の接触阻害における細胞間引張力の役割と表皮がんでの破綻
3. 学会等名 第5回日本メカノバイオロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田宏聡
2. 発表標題 Molecular and biophysical bases for modulation of the focal adhesion-actin cytoskeleton system in response to extracellular substrate rigidity
3. 学会等名 第53回生物機械システム研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平田宏聡
2. 発表標題 細胞外基質硬度による焦点接着斑 アクチン骨格系調節の分子・生物物理基盤
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 ワークショップ「細胞基本機能を制御する細胞外硬度：感知の分子物理機構と応答シグナリング」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oleg Dobrokhotov, Masahiro Sokabe, Hiroaki Hirata
2. 発表標題 Tension at adherens junction inhibits proliferation and promotes differentiation of keratinocyte carcinoma cells
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Hirata, Oleg Dobrokhotov, Masahiro Sokabe
2. 発表標題 Tensile force at adherens junctions is responsible for contact inhibition of keratinocyte proliferation
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会 シンポジウム「細胞の力学受容による多細胞システム恒常性の発現」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川内敬子、伊藤功彦、杉本渉、取井猛流、岩根敦子、島本勇太、平田宏聡
2. 発表標題 DNA損傷応答における核内アクチンフィラメント構造に対するp53の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 ワークショップ「細胞内シグナル伝達のメディエーターとしての“細胞骨格分子を知る”」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oleg Dobrokhotov, Masahiro Sokabe, Hiroaki Hirata
2. 発表標題 RhoA activation induces cell cycle exit and differentiation of skin cancer cells
3. 学会等名 日本生物物理学会第57回年会 シンポジウム「静水圧刺激により生命機能を操作する」(招待講演)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------