

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03227

研究課題名（和文）足場の硬さ感知によるアメーバ細胞の移動方向決定

研究課題名（英文）Rigidity sensing of amoeboid cells for their directional migration

研究代表者

岩橋 好昭（Iwadate, Yoshiaki）

山口大学・大学院創成科学研究科 教授

研究者番号：40298170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,700,000円

研究成果の概要（和文）：接着性の細胞は自身が接着している足場の硬さを感じ取る（rigidity sensing）。代表者らは過去、速いタイプのアメーバが足場の柔らかい方向へ向かう新規の rigidity sensing を発見した。本研究の目的は、この分子メカニズムの解明であり、FアクチンへのミオシンIIの親和性の変化に着目した。本研究において、ミオシンIIを欠損させた細胞性粘菌アメーバはrigidity sensingを示さず、野生型の細胞の非走化性の運動時の細胞の振る舞いに違いがあること、GFP ミオシンIIは細胞の後端に局在するだけでなく細胞前端にも一時的に集積すること等が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞のアメーバ運動は、これまで主に、誘引物質に向かう走化性という見地から研究されてきた。走化性は、誘引物質が遠く離れると細胞が感知できない。一方、足場には必ず硬さが存在するため、rigidity sensing は常に機能している。rigidity sensingに基づき細胞の移動は、より根源的な移動のメカニズムと言える。医療応用の観点で、本研究の成果はがん細胞や傷修復を担う表皮細胞、好中球など免疫細胞などに対する薬剤を使わない非侵襲な新規の移動制御技術につながり、がんや創傷の新規治療法研究への発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Adherent cells sense the rigidity of their substrate (rigidity sensing). Previously, we found a novel rigidity sensing of fast amoebae towards softer area. The aim of this study was to elucidate this molecular mechanism, focusing on changes in the affinity of myosin II for F-actin. In this study, it was found that Dictyostelium amoebae lacking myosin II did not show rigidity sensing, that the cells showed different behaviour from wild-type cells during freely locomotion without chemoattractant cAMP, and that GFP myosin II not only localised at the posterior end of the cell but also accumulated transiently at the anterior end of the cell.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞遊走

1. 研究開始当初の背景

アメーバ運動は原生動物アメーバから神経組織の形成にまで見られる普遍的な細胞機能である。アメーバ細胞は培養液中に浮遊した状態では運動できない(図 1A)が、基盤に接着し基盤と力学的なやり取りを行える状態に置かれると前後極性を自ら創り運動し始める(図 1B)。この時、細胞が感知し得る情報は基盤との力学的な相互作用のみである(図 2)。

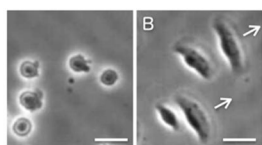


図1 魚類表皮細胞ケラトサイト。A) 培養液中に浮遊した細胞。球状で前後極性を持たない。B) 基盤に接着した細胞。ケラトサイトは基盤に接着すると前後極性を持ち、特徴的な半月形となって移動する。矢印; 移動方向。Bars; 20 μm 。

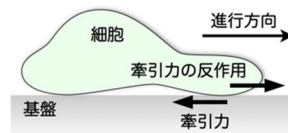


図2 細胞は基盤と力のやりとりができるようになると移動のための前後極性を生み出す。

細胞が足場の硬さを感知し、遺伝子発現や代謝、運動を変化せることを rigidity sensing と呼ぶ。幹細胞が足場の硬さに依存して異なる細胞に分化する分化誘導(Engler et al 2006 *Cell*)がよく知られている。アメーバ運動でも、線維芽細胞や平滑筋など遅く移動するタイプのアメーバ細胞が足場の硬い方向に向かって動く durotaxis (Lo et al 2000 *Biophys J*) が古くから知られている。好中球など速く移動する細胞の rigidity sensing は、我々の研究(Okimura et al 2018 *Phys Rev E*)によって初めて明らかになった。しかし本研究で題材とする速い細胞の rigidity sensing の分子メカニズムは不明なままである。

2. 研究の目的

細胞は足場の硬さを感知する(rigidity sensing)。幹細胞は硬い足場の上で培養されると骨芽細胞に分化し、柔らかい足場の上では神経細胞に分化する(Engler et al 2006 *Cell*)。アメーバ運動は原生動物アメーバからヒトの発生や創傷治癒に至るまで見られる普遍的な生命現象である。アメーバ細胞は、線維芽細胞や神経細胞など $1 \mu\text{m}/\text{min}$ ほどの速さでゆっくり動く細胞種と好中球や細胞性粘菌アメーバなど $10 \mu\text{m}/\text{min}$ ほどの高速で動く細胞種に大別される。遅いタイプのアメーバが足場の硬い方向へ向かうことが知られている(Lo et al 2000 *Biophys J*)。一方、速いタイプのアメーバの rigidity sensing は最近まで知られていなかった。代表者らは 2017 年度採択の基盤研究 C の中で、速いタイプのアメーバが足場の柔らかい方向へ向かう新規の rigidity sensing を発見した(図 3, Okimura et al 2018 *Phys Rev E*)。本研究の学術的な「問い」は速いタイプのアメーバがどうやって柔らかい方向に向かうのか? である。

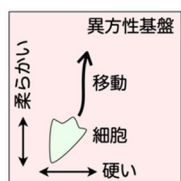


図3 速いアメーバの足場の硬さ感知。縦横で硬さが違う異方性基盤上で、粘菌アメーバや好中球様 HL-60 細胞は柔らかい方向に進む。

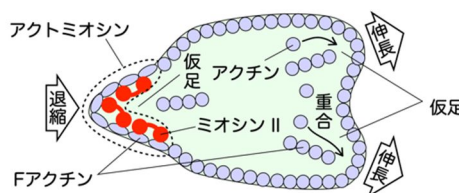
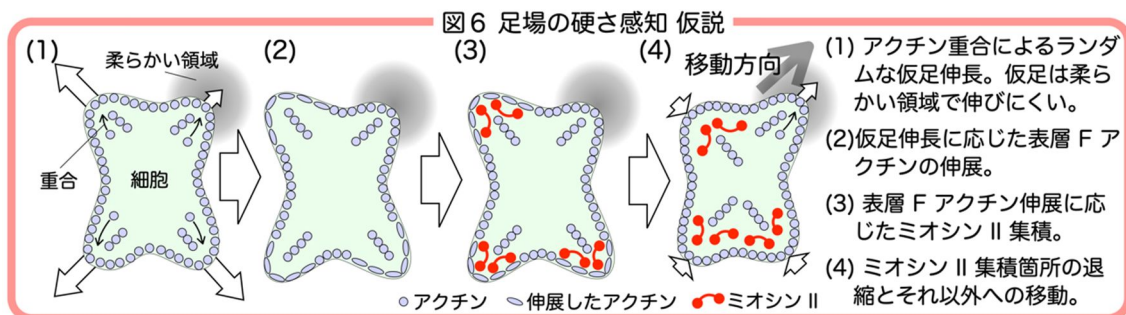
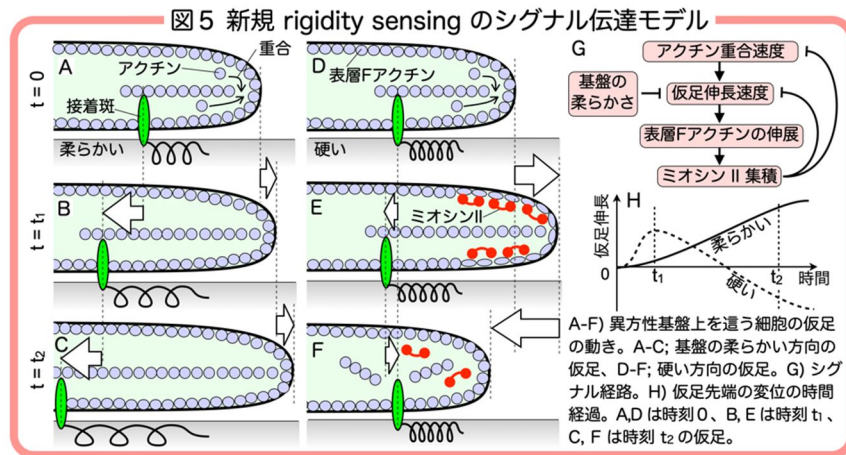


図4 アメーバ運動のメカニズム。

本研究の目的は、アメーバ細胞が足場の柔らかい方向へ向かう新規 rigidity sensing の分子メカニズムの解明である。一般に、アメーバ細胞の仮足はアクチンの重合で伸長し、アクトミオシンの収縮で退縮する(図 4)。アクトミオシンはアクチンフィラメント(F アクチン)と収縮の動力源であるミオシン II からなる。本研究では(1)アクチンの挙動を仮足中央と仮足表層とで分けて考え、(2)F アクチンへのミオシン II の親和性の変化に着目した新規 rigidity sensing のシグナル伝達モデル(図 5)を提案する。異方性基盤(図 3)上の細胞の仮足(図 5A-F)の中で、中央で重合するアクチンは仮足先端を前方に、接着斑を介して足場を後方に同じ力で押す。柔らかい方向を向いた仮足(図 5A-C)では、足場の変位が仮足先端の変位よりも大きい(図 5B,C 矢印)。一方、硬い方向を向いた仮足(図 5D-F)では、仮足先端の変位が足場の変位より大きくなり(図 5E 矢印)、表層 F アクチンが伸展する。伸展した表層 F アクチンへのミオシン II の親和性が増し、ミオシン II が結合・集積する。すると中央のアクチン重合が抑制され仮足も退縮する(図 5F 左向き矢印)。そして伸

展から回復した表層 F アクチンからミオシン II は解離し、中央の F アクチンは接着斑から離れ脱重合する(図 5F)。この一連の過程(図 5G)の結果、柔らかい方向のみ仮足が伸長し続ける(図 5H)。

シグナル伝達モデル(図 5)を土台に、速いタイプのアメーバが足場の柔らかい方向へ向かうメカニズムとして、足場の硬さ感知仮説(図 6)を本研究で新たに提案する。この仮説では細胞の各所で自律分散的に離合集散するミオシン II がその後の仮足の運動を決める。



3. 研究の方法

異なる硬さの基質上での細胞の運動の解析

細胞性粘菌アメーバが硬い基質に置かれた場合と、柔らかい基質に置かれた場合とで、細胞の振る舞いの違いを詳細に検討した。

細胞吸引

細胞の一部をマイクロピペットで吸引したときのミオシン II の集積を検討した。マイクロピペットによる吸引では引圧を定量的に正確に制御することが可能である。

微細トンネル内の細胞の運動

細胞の幅よりもやや太いトンネル内を細胞にはわせ、ミオシン II の局在の様子を詳細に記録し解析する。この方法では細胞の前後が明瞭に分離できるためミオシン II の様子を厳密に検討できる。

異なる硬さの基質上での仮足の伸縮とミオシン II の動態の同時記録と相関分析

硬い基質と、柔らかい基質上とでそれぞれ自律的に伸縮する仮足の伸縮と、ミオシン II の動態を同時に記録し、それらの関係を詳細に検討した。

4. 研究成果

異なる硬さの基質上での細胞の運動の解析

柔らかい基質上と硬い基質上に細胞性粘菌アメーバを這わせ自由運動させ、細胞形状をスケ

ルトン解析による違いを検討した。柔らかい基質上の粘菌アメーバは枝分かれの少ない細胞形状であったのに対し、硬い基質上の粘菌アメーバは枝分かれの多い形状となった。これは、硬い基質上のほうが柔らかい基質上よりも、粘菌アメーバが頻繁に仮足の伸長、退縮を繰り返していることを示唆する結果である。

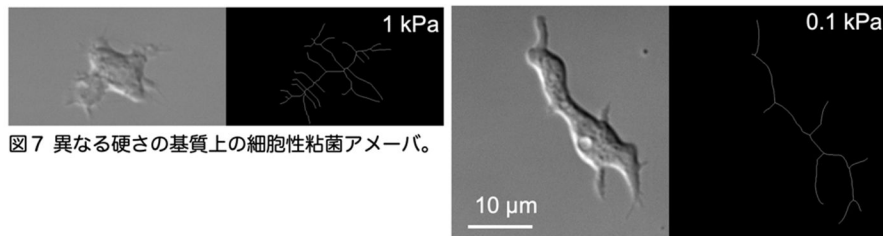


図7 異なる硬さの基質上の細胞性粘菌アメーバ。

細胞吸引

GFP-myosin II, GFP-3ALA myosin II, GFP-3ASP myosin II, GFP-E476K myosin II を発現した細胞性粘菌アメーバをカバーガラス上に自由運動させ、その移動中の細胞の側面をマイクロパイペットで吸引した。GFP-myosin II, GFP-3ALA myosin II, GFP-E476K myosin II はいずれも吸引箇所でも GFP の蛍光が観察された一方、GFP-3ASP myosin II では GFP の局在化はみられなかった。この結果は、ミオシン II は細胞（細胞骨格）の伸展により局在化すること、局在化には、ミオシン II のフィラメント化が必要なことを示唆している。

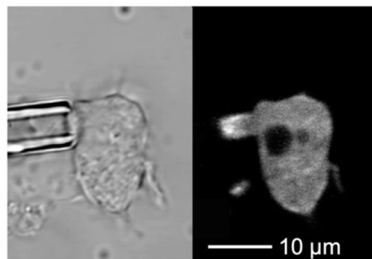


図8 細胞吸引による GFP-myosin II の局在。

微細トンネル内の細胞の運動

GFP-myosin II を発現した粘菌アメーバを微細トンネル内に這わせ、トンネル内に cAMP (粘菌アメーバの走化性誘引物質) の濃度勾配を形成させた。すると粘菌アメーバは cAMP の高濃度の方に向かって進んだ。予備実験で得られている通り、ミオシン II の集積は細胞の後端のみならず、前端でも時折観察された。GFP-3ALA myosin II, GFP-3ASP myosin II, GFP-E476K myosin II でのそれぞれの改変ミオシン II の局在の様子の観察は未実施で、現在、実験を計画している。

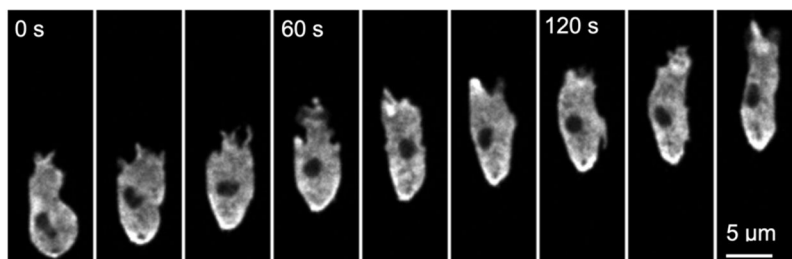


図9 微細トンネル内の粘菌アメーバの運動と GFP-myosin II の局在。

異なる硬さの基質上での仮足の伸縮とミオシン II の動態の同時記録と相関分析

GFP-myosin II を発現した粘菌アメーバを硬い基質と、柔らかい基質上それぞれで自由運動させた。自律的に伸縮する仮足と、ミオシン II の動態を同時に記録し、それらの関係を詳細に検討したところ、柔らかい基質上では仮足はゆっくりと伸長し続けるのに対し、硬い基質では、ミオシン II の集積を伴って、すぐに退縮した。仮足が伸長している時間は柔らかい基質上の方が長かった。

以上の結果は、図5のモデルと図6の仮説を指示するものである。今後これらのモデルと仮説の正しさを証明するため数理モデル等での評価を検討している。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Okimura Chika, Iwanaga Misaki, Sakurai Tatsunari, Ueno Tasuku, Urano Yasuteru, Iwadate Yoshiaki	4. 巻 119
2. 論文標題 Leading-edge elongation by follower cell interruption in advancing epithelial cell sheets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2119903119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2119903119	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 Okimura, C., Akiyama, S., Nishigami, Y., Zaitzu, R., Sakurai, T. and Iwadate Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Linear contraction of stress fibers generates cell body rotation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.01.03.522661	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 Imoto, D., Saito, N., Nakajima, A., Honda, G., Ishida, M., Sugita, T., Ishihara, S., Katagiri, K., Okimura, C., Iwadate, Y. and Sawai, S.	4. 巻 17
2. 論文標題 Comparative mapping of crawling-cell morphodynamics in deep learning-based feature space	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Computational Biology	6. 最初と最後の頁 e1009237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pcbi.1009237	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 Takagi T, Ueno T, Ikawa K, Asanuma D, Nomura Y, Uno S, Komatsu T, Kamiya M, Hanaoka K, Okimura C, Iwadate Y, Hirose K, Nagano T, Sugimura K and Urano Y	4. 巻 7
2. 論文標題 Discovery of an F-actin-binding small molecule serving as a fluorescent probe and a scaffold for functional probes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabg8585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abg8585	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 Fujikawa Ryosuke, Okimura Chika, Kozawa Satoshi, Ikeda Kazushi, Inagaki Naoyuki, Iwadate Yoshiaki, Sakumura Yuichi	4. 巻 122
2. 論文標題 Bayesian traction force estimation using cell boundary-dependent force priors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 4542 ~ 4554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2023.10.032	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10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Iwadate Y.
2. 発表標題 Cooperative but forcible promotion of follower cells to leaders in collective migration of fish keratocytes
3. 学会等名 第60回生物物理学学会年会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖村千夏, 秋山珠祐, 西上幸範, 櫻井建成, 岩楯好昭
2. 発表標題 機械モデルから導かれたケラトサイトのストレスファイバ直動回転変換機構
3. 学会等名 2023年 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩永美咲, 沖村千夏, 櫻井建成, 岩楯好昭
2. 発表標題 ケラトサイト集団を相似拡大させるリーダー細胞たちの綱引きの均衡
3. 学会等名 2023年 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩永美咲、沖村千夏、櫻井建成、上野 匡、浦野泰照、岩楯好昭
2. 発表標題 Breaking of actomyosin cables in keratocyte collectives and their role in the coordinated collective migration
3. 学会等名 第 6 0 回生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖村千夏, 秋山珠祐, 櫻井建成, 岩楯好昭
2. 発表標題 Linear contraction of stress fibers kicks the substratum for their rotation
3. 学会等名 第 6 0 回生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Okimura C, Akiyama S, Sakurai T and Iwadate Y
2. 発表標題 Conversion of linear contraction of stress fibers into rotation in migrating cells
3. 学会等名 第 5 8 回生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Iwanaga M, Okimura C, Sakurai T and Iwadate Y
2. 発表標題 Leading Edge Expansion in Migrating Cell Sheet by Follower Cell's Interruption
3. 学会等名 第 5 8 回生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水和真、沖村千夏、岩楯好昭
2. 発表標題 ケラトサイト集団同士の融合とアクトミオシンケーブルの消失
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議 2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西村紀彦、沖村千夏、岩楯好昭
2. 発表標題 生まれ変わる魚類ケラトサイト集団
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議 2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Okimura C and Iwadate Y
2. 発表標題 Demotion of leader cells to followers during the late stages of re-epithelialization in wound repair
3. 学会等名 第61回生物物理学会年会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	櫻井 建成 (Sakurai Tatsunari) (60353322)	武蔵野大学・工学部・教授 (32680)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	沖村 千夏 (Okimura Chika) (80895392)	山口大学・創成科学研究科・学術研究員 (15501)	

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