

令和 5 年 5 月 4 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12596

研究課題名（和文）組織変形に应答した細胞増殖制御：細胞 基質接着と細胞 細胞接着の役割の分離同定

研究課題名（英文）Tissue deformation-dependent regulation of cell proliferation: distinct roles of cell-substrate and cell-cell adhesions

研究代表者

平田 宏聡 (Hiroaki, Hirata)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：90414028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：組織中の細胞増殖は組織の変形に应答して制御されていることが近年の研究により明らかにされてきた。組織の変形によって細胞 細胞外基質間および細胞 細胞間の接着構造にかかる力学的負荷は変化するが、これら接着構造の力学状態が組織変形時の細胞増殖制御に果たす役割の詳細は不明であった。本研究では培養単層上皮において、細胞増殖が組織の伸展変形に影響されないよう調節されていることを見出すとともに、この調節が細胞外基質との接着構造である焦点接着斑への引張負荷によるFAKを介した増殖促進効果と細胞間の接着構造であるアドヘレンスジャンクションへの引張負荷による増殖抑制効果との拮抗によっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、上皮細胞の増殖制御における焦点接着斑引張力とアドヘレンスジャンクション引張力の役割を、伸展変形時の単層上皮中で分離同定することができた。今後、それぞれの接着構造の力学状態を個別に操作する手法を開発できれば、上皮組織における細胞増殖の人為的コントロールが可能となり、再生医療に資する人工組織の効率的作製・培養法や上皮性がんの新規治療法の開発へつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Studies in recent years have revealed that cell proliferation in tissues is regulated by deformation of tissues. Tissue deformation alters mechanical loads at both cell-substrate and cell-cell adhesions. However, it remains unclear how changes in mechanical statuses of cell adhesion complexes affect cell proliferation in deformed tissues. In this study, we found that cell proliferation in an epithelial cell monolayer was not changed upon sustained uniaxial stretch of the monolayer, which was underlain by a balance between the FAK-mediated pro-proliferative effect of tension at focal adhesions and the post-proliferative effect of tension at adherens junctions.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：メカノバイオロジー 焦点接着斑 アドヘレンスジャンクション FAK

## 1. 研究開始当初の背景

生体運動や臓器活動、さらには外部環境からの力学負荷などにより生体内の組織は絶えず変形を受けている。近年の研究により、そのような変形に应答して細胞増殖や細胞死、細胞排除が誘導され、組織中の細胞数がコントロールされていることが明らかになってきた。上皮組織が伸展される場合、組織中の上皮細胞は伸展による力学刺激を主に「細胞外基質との接着構造」および「隣接細胞との接着構造」を介して受けると考えられる。しかしながら、これら異なる接着構造が上皮伸展時の細胞増殖の制御にそれぞれどのように関わっているのか、その個別の役割は不明であった。

## 2. 研究の目的

細胞は細胞外基質との間に焦点接着斑と呼ばれる接着構造を形成する。また、細胞間の代表的接着構造にアドヘレンスジャンクションがある。焦点接着斑とアドヘレンスジャンクションはいずれもその細胞質側にアクチンフィラメントとミオシンを含む収縮性の束構造（アクトミオシンファイバー）が連結しており（図1）、アクトミオシンの収縮に起因する引張力が内在的に焦点接着斑とアドヘレンスジャンクションにかかっている。研究代表者はこれまでに、まばらに培養した線維芽細胞を用いた研究で、焦点接着斑にかかる引張力の大きさに依存して増殖促進分子 ERK の活性が線形的に上昇することを見出している（Hirata et al., *EMBO Rep*, 2015）。一方で、稠密状態の上皮細胞において、アドヘレンスジャンクションにかかる引張力が細胞増殖を抑制することを示す結果も得ている（Hirata et al., *Sci Rep*, 2017）。すなわち、焦点接着斑の引張力は細胞増殖を「正」に、アドヘレンスジャンクションの引張力は細胞増殖を「負」に、それぞれ制御していると考えられた。そこで本研究では、培養単層上皮を伸展し、その際の上皮細胞の増殖における焦点接着斑およびアドヘレンスジャンクションそれぞれに生じる引張力の役割を分離して明らかにすることを目的とした（図1）。

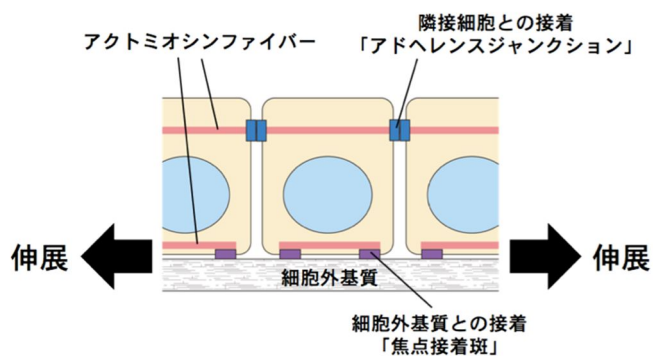


図1：上皮組織の伸展の模式図

## 3. 研究の方法

コラーゲンコートしたシリコン弾性膜上にヒト表皮由来細胞を稠密培養して単層上皮を形成さ

せ、弾性膜を一方に 20%引き延ばすことで単層上皮を伸展した。細胞増殖は、S 期における EdU の染色体 DNA への取り込みにより評価した。研究代表者は、焦点接着斑への引張り負荷に依存した増殖促進分子 ERK の活性化には焦点接着斑キナーゼ FAK の活性化が必要であることを既に見出している (Hirata et al., *EMBO Rep*, 2015)。そこで、FAK を阻害することで焦点接着斑への引張り負荷による ERK 活性化を抑制し、上皮伸展に対する細胞増殖応答への影響を調べた。また、アドヘレンスジャンクションの主要構成分子である $\alpha$ -カテニンのノックダウンや細胞を低密度培養することでアドヘレンスジャンクションの形成を抑制し、上皮伸展時の細胞増殖に対する影響を調べた。

#### 4 . 研究成果

単層培養した上皮細胞に持続伸展刺激を 6 時間加えたところ、細胞増殖に特に変化は見られなかった。この時の FAK の活性を調べると、持続伸展刺激に応答して焦点接着斑で FAK が活性化することが観察された。そこで、FAK を薬理的に阻害した条件下で同様の持続伸展刺激を加えたところ、細胞増殖が 25%程度抑制された。このことから、FAK 阻害下では伸展刺激によって細胞増殖が抑制されるものの、伸展刺激に応答した焦点接着斑での FAK 活性化はその抑制効果を打ち消すことが明らかとなった。

次に、FAK 阻害下での伸展依存的な細胞増殖の抑制について、細胞間接着の役割を解析した。細胞を様々な密度で培養し伸展刺激を加えたところ、細胞周長のうち隣接細胞と接している長さの比率が高い細胞ほど伸展刺激に応答して細胞増殖が抑制された。細胞間の接着構造であるアドヘレンスジャンクションの役割をより直接的に調べるため、アドヘレンスジャンクションの主要構成分子である $\alpha$ -カテニンの発現をノックダウン (KD) しアドヘレンスジャンクションの形成を抑制した。 $\alpha$ -カテニン KD 細胞では、FAK 阻害下での伸展刺激依存的な細胞増殖の抑制が見られなくなった。このことから、アドヘレンスジャンクションは伸展刺激に応答して細胞増殖を抑制すること明らかとなった。

以上の結果から、単層上皮中の細胞増殖は組織の伸展変形に影響されないようコントロールされており、これは焦点接着斑への引張り負荷による FAK を介した増殖促進シグナルの亢進と、アドヘレンスジャンクションへの引張り負荷による増殖抑制効果との拮抗によって実現されていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Dobrokhotov Oleg, Sunagawa Masaki, Torii Takeru, Mii Shinji, Kawauchi Keiko, Enomoto Atsushi, Sokabe Masahiro, Hirata Hiroaki	4. 巻 9
2. 論文標題 Anti-Malignant Effect of Tensile Loading to Adherens Junctions in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 728383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.728383	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, Dobrokhotov 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 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 Katsuta Hiroki, Okuda Satoru, Nagayama Kazuaki, Machiyama Hiroaki, Kidoaki Satoru, Kato Masashi, Sokabe Masahiro, Miyata Takaki, Hirata Hiroaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Actin crosslinking by $\alpha$ -actinin averts viscous dissipation of myosin force transmission in stress fibers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106090 ~ 106090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106090	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, Nakazawa Naotaka, Hirashima Tsuyoshi, Ravasio Andrea	4. 巻 11
2. 論文標題 Editorial: Multicellularity: Views from cellular signaling and mechanics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1172921 ~ 1172921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2023.1172921	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 該当する

[学会発表] 計8件(うち招待講演 6件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 平田宏聡、Oleg Dobrokhov, 曾我部正博
2. 発表標題 表皮細胞単層中での細胞周期進行と細胞運動の協調制御: 細胞間接着とRac1の役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田宏聡、Oleg Dobrokhov, 曾我部正博
2. 発表標題 角化細胞の増殖の接触阻害には接着結合の引張力が必須である
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会(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(招待講演)
4. 発表年 2020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 Oleg Dobrokhotov、曾我部正博、平田宏聡
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 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 Hiroaki Hirata
2. 発表標題 Intercellular force dictating proliferative abilities of epidermal cells
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勝田紘基、奥田覚、長山和亮、町山裕亮、木戸秋悟、加藤昌志、曾我部正博、宮田卓樹、平田宏聡
2. 発表標題 張力繊維に沿った力の伝達効率は $\alpha$ -アクチニンの架橋によって変化する機械的特性に依存している
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiroaki Hirata, Masahiro Sokabe	4. 発行年 2022年
2. 出版社 The Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 21
3. 書名 Material-based Mechanobiology, CHAPTER 4 Measurement and Manipulation of Cellular Forces Using Silicone Elastomers	

〔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
---------	---------