

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21411

研究課題名（和文）波動性細胞収縮力と細胞間コミュニケーションの統合的理解

研究課題名（英文）Integrated understanding of intercellular communication and contraction forces

研究代表者

藤田 恭之（Fujita, Yasuyuki）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50580974

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞層中に、性質の異なる変異細胞が出現した時、周りの正常細胞と異常な細胞との間で互いに生存を争う「細胞競合」という現象が起きる。しかし、細胞競合を制御する分子メカニズム、特に物理的プロセスの関与については、ほとんど明らかでなかった。本研究では、変異細胞に隣接する正常細胞で一過性の細胞内カルシウムの増大が観察された。我々はこの現象をカルシウムスパークと命名した。さらに様々な物理的パラメーターを解析することによって、変異細胞に隣接する正常細胞には圧縮力がかかり、形質膜における聴力が増加することによって、メカノセンシティブカルシウムチャンネルを介したカルシウムスパークが発生することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、変異細胞に隣接した正常細胞では、様々な物理的、化学的な変化が生じ、その結果、変異細胞の上皮細胞層からの排除を促進していることが明らかになった。これまで、細胞競合における細胞の物理的な変化については、ほとんど報告がなく、細胞競合研究分野に新たな見地を与える研究成果であると高く評価できる。また、これらのデータは、これまでブラックボックスであったがんの超初期段階で起こるプロセスの一端を明らかにするものであり、今後のがんの予防的治療薬の開発にもつながり得る研究成果であると言える。

研究成果の概要（英文）：When an oncogenic mutation occurs within a monolayer of epithelial cells, cell competition occurs between normal and the newly emerging transformed cells. However, the molecular mechanisms of cell competition still remain largely unknown. In this study, we have demonstrated that a transient upsurge of intracellular calcium occurs in normal cells neighboring transformed cells, which is termed 'calcium spark'. In addition, by analyzing various physical parameters, we have found that compressive forces are imposed onto normal cells neighboring transformed cells, which induces the increased membrane tension. The increased membrane tension then leads to the occurrence of calcium sparks mediated by mechano-sensitive calcium channel.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：細胞競合 収縮力 牽引力顕微鏡 カルシウムスパーク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は独自に確立した哺乳類培養細胞系を用いて、正常上皮細胞と変異細胞の境界で両者が生存を争う現象(細胞競合)が生じることを世界に先駆けて明らかにしてきた。例えば、がんタンパク質 Ras 変異細胞や Src 変異細胞を正常上皮細胞と共培養すると、変異細胞が正常上皮細胞層からはじき出されるように管腔側へと排出される(Hogan et al., Nat. Cell Biol., 2009 など)。これまでに得られたデータから、正常上皮細胞と変異細胞が互いの存在を何らかの機序で認識し、それぞれの細胞内シグナル伝達経路を制御することによって、正常細胞が変異細胞を上皮細胞層から駆逐していることが分かってきた。しかし現在のところ、正常細胞と変異細胞間の認識メカニズムについてはほとんどが未解明のまま残されている。研究代表者は、「リガンド/レセプター/シグナル伝達」のような化学的な認識機構ではなく、『未探索の物理的な細胞間認識機構があるのではないか』と考え、今回の研究の構想に至った。

2. 研究の目的

上皮細胞層において、各々の細胞は隣接する細胞と様々なコミュニケーションを取り合うことによって、協調的な細胞社会を形成している。一方、細胞層中に、性質の異なる変異細胞が出現した時、周りの正常細胞と異常な細胞との間で互いに生存を争う「細胞競合」という現象が起こることが、申請者らの研究によって明らかになってきた(Hogan et al., Nat. Cell Biol., 2009; Kajita et al., Nat. Commun., 2014; Kon et al., Nat. Cell Biol., 2017 など)。しかし、上皮細胞同士がどのようにして隣接する細胞の「同質」性あるいは「異質」性を認識しているのか、その細胞間認識機構については、未解明のまま残されている。これまでの研究によって、いくつかの膜タンパク質が細胞間認識機構に関わる分子として提唱されてきたが(Fujita, Nature, 2019 など) いずれも細胞競合を含む多彩な細胞間コミュニケーションを普遍的に制御するものではなく、まだ同定されていない細胞間認識機構の存在が想定されている。これまで本研究領域では、リン酸化などの化学的なシグナル伝達を制御する分子群の関与について、研究が進められてきた。一方、『物理的なパラメーターが細胞間認識機構に関与している』という可能性については、研究はほとんど進展してこなかった。本研究では、細胞間の認識機構や細胞競合を制御する下流の分子メカニズムを探索するため、制御因子のスクリーニングを行うとともに、物理的パラメーターを様々な物理的手法を用いて計測することによって、細胞間コミュニケーションや細胞競合を物理生物学的な側面から理解するという新たな研究領域の開拓を目指した。

3. 研究の方法

正常上皮細胞と変異細胞間に生じる細胞競合を制御する物理的駆動力を様々な手法を用いて調べた。具体的には、牽引力顕微鏡(Traction Force Microscopy: TFM)を用いて上皮細胞層の基底側に生じる contractile force (収縮力)を経時的に測定した。細胞の形態(細胞のxz方向の高さ、area(細胞のサイズ)、細胞・核の長短径比などを計測した。さらに、形質膜の伸展状況を調べるために膜張力センサーを用いた解析を行った。また、細胞に物理的变化をもたらす上流の化学的な変化についても、その本質を理解するために、細胞学的解析を進めた。

4 . 研究成果

(1) 正常上皮細胞と変異細胞間に生じるカルシウムスパークの発見

細胞に物理的变化をもたらす上流の化学的な変化について、様々なシグナル伝達経路や代謝変化を網羅的に調べた。その結果、正常上皮細胞と変異細胞の混合培養条件下で、一過性のカルシウムの上昇が頻回に正常細胞側で起こることを細胞内カルシウム蛍光センサー-GCaMP6s を用いて明らかにした。この正常細胞側で一過性に生じるカルシウムの爆発的な上昇をカルシウムスパーク calcium spark と名付けた。このカルシウムスパークの頻度がメカノセンシティブカルシウムチャンネルの阻害剤 GsMTx の投与により、強く抑制されることが分かった。そこで、正常細胞で様々なメカノセンシティブカルシウムチャンネルの shRNA によるノックダウンの効果を検証したところ、transient receptor potential (TRP) C1 が重要な役割を果たしていることが分かった。実際に、TRPC1 をノックダウンした細胞と Ras 変異細胞を混合培養するとカルシウムスパークの頻度が下がるのみならず、Ras 変異細胞の上皮層からの排除が抑制された。また上皮細胞層を伸縮性のある polydimethylsiloxane (PDMS)膜の上で培養し、stretching したところ、カルシウムスパークが生じた。これらのデータは、Ras 変異細胞に隣接する正常細胞では形質膜が伸展し、その結果、TRPC1 を介した細胞内へのカルシウムの流入が亢進することによって、Ras 変異細胞の正常細胞層からの排除を促進することを示している。

(2) 変異細胞に隣接する正常細胞に生じる様々な物理的变化

正常細胞と変異細胞の混合培養条件下で生じるカルシウムスパークについての分子メカニズムを探索するため、次に、細胞の形態変化を解析した。その結果、変異細胞に隣接する正常細胞の xz 方向の高さが増大するとともに、核の長短径比が変化することを見出した。またこれらの形態上の変化は Cdc42 阻害剤添加によって、抑制された。またタイムラプス顕微鏡を用いて、細胞の形態変化を経時的に調べたところ、カルシウムスパークの前後で核と細胞の長短径比がダイナミックに変化することが分かった。

次に、TFM と Bayesian inversion stress microscopy (BISM)を用いて細胞層に生じる等方性応力を計測した。すると、単独培養条件と比べて、Ras 変異細胞との混合培養条件では、正常細胞層にかかる isotropic stress が低下することが分かった。これは、混合培養条件下で、正常細胞に compressive force (圧縮力)がかかることを示唆している。

さらに、形質膜にかかる力を測定するために、膜張力の蛍光センサーである Flipper-TR を用いて解析を行った。Flipper-TR は形質膜に挿入される低分子であり、その蛍光寿命が形質膜にかかる張力を反映する。解析の結果、混合培養条件下で Ras 変異細胞に隣接する正常細胞の形質膜の Flipper-TR の蛍光寿命が増加することが分かった。このデータは、変異細胞に隣接する正常細胞では、形質膜の張力が増大することを示している。

本研究によって、変異細胞に隣接した正常細胞では、様々な物理的、化学的な変化が生じ、その結果、変異細胞の上皮細胞層からの排除を促進していることが明らかになった。これまで、細胞競合における細胞の物理的な変化については、ほとんど報告がなく、細胞競合研究分野に新たな見地を与える研究成果であると高く評価できる。また、これらのデータは、これまでブラックボックスであったがんの超初期段階で起こるプロセスの一端を明らかにするものであり、今後のがんの予防的治療薬の開発にもつながり得る研究成果であると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maruyama Takeshi, Sasaki Ayana, Iijima Sayuri, Ayukawa Shiyu, Goda Nobuhito, Tazuru Keisuke, Hashimoto Norikazu, Hayashi Takashi, Kozawa Kei, Sato Nanami, Ishikawa Susumu, Morita Tomoko, Fujita Yasuyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 ZAK Inhibitor PLX4720 Promotes Extrusion of Transformed Cells via Cell Competition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101327 ~ 101327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101327	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Moriuchi Yuta, Iwagawa Toshiro, Tshako Asano, Koso Hideto, Fujita Yasuyuki, Watanabe Sumiko	4. 巻 61
2. 論文標題 RasV12 Expression in Microglia Initiates Retinal Inflammation and Induces Photoreceptor Degeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 34 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.61.13.34	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Ogawa Motoyuki, Kawarazaki Yosuke, Fujita Yasuyuki, Naguro Isao, Ichijo Hidenori	4. 巻 31
2. 論文標題 FGF21 Induced by the ASK1-p38 Pathway Promotes Mechanical Cell Competition by Attracting Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1048 ~ 1057.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.11.052	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Itoh Yoshifumi, Ng Michael, Wiberg Akira, Inoue Katsuaki, Hirata Narumi, Paiva Katiucia Batista Silva, Ito Noriko, Dzobo Kim, Sato Nanami, Gifford Valentina, Fujita Yasuyuki, Inada Masaki, Furniss Dominic	4. 巻 97
2. 論文標題 A common SNP risk variant MT1-MMP causative for Dupuytren's disease has a specific defect in collagenolytic activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Matrix Biology	6. 最初と最後の頁 20 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matbio.2021.02.003	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Jebri Imen, Tsujita Kazuya, Fujita Yasuyuki, Itoh Toshiki	4. 巻 543
2. 論文標題 Non-cell-autonomous migration of RasV12-transformed cells towards the basal side of surrounding normal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 15~22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.031	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yan Lu, Tsujita Kazuya, Fujita Yasuyuki, Itoh Toshiki	4. 巻
2. 論文標題 PTEN is required for the migration and invasion of Ras transformed MDCK cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	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) 10.1002/1873-3468.14053	査読の有無 有
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4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤田恭之
2. 発表標題 哺乳類上皮の癌化における細胞競合
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田恭之
2. 発表標題 正常細胞と変異細胞間に生じる細胞競合
3. 学会等名 第45回日本医用マススペクトル学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田恭之
2. 発表標題 細胞競合で考える放射線発がん
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第63回大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田恭之
2. 発表標題 細胞競合による生体制御とがん(Cell competition in development and cancer)
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会哺乳類上皮の癌化における細胞競合 (招待講演)
4. 発表年 2020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