

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860215

研究課題名(和文) 上皮集団遊走において先端細胞に高い運動性を与える分子機構

研究課題名(英文) Molecular insight into the motile phenotype of the leader cells in epithelial collective migration

研究代表者

栗栖 修作 (Kurusu, Shusaku)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・助教

研究者番号：40525531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞が集団遊走する際、どのようにして個々の細胞が連携をとり、集団として統率された運動をするのかについて詳細な解析を行った。集団遊走のモデル実験系を確立し、高倍の共焦点顕微鏡下で遊走のライブイメージングを行うことで遊走先端の細胞が運動性を増して集団全体を牽引する過程を記録することができた。また、この過程で必須となるタンパク質複合体(IRSp53/Eps8複合体)も同定するに至り、本研究は集団遊走の分子レベルでの理解の一歩となったと考える。

研究成果の概要(英文)：In a collectively migrating cohort of epithelial cells, how each cell in the collective communicates with its neighbor and what mechanism drives these cells to move in one direction were unsolved questions. To understand epithelial collective migration precisely, I established a model cell-culture system that can be observed under time-lapse confocal microscopy at high resolution. Using this system, I succeeded to capture dynamic motion of each cell within a moving cluster of epithelial cells: a subset of cells, namely the leading cells, initiate to move by extending pseudopodia into the surrounding extracellular matrix and the rest of cells follows them without forming obvious pseudopodia. I also identified a key protein complex called IRSp53/Eps8 complex is essential for formation of pseudopodia in the leading cells. The results of this study would benefit to understand the epithelial collective migration at the molecular level.

研究分野：細胞生物学

キーワード：集団遊走 ライブイメージング Eps8 IRSp53

1. 研究開始当初の背景

細胞の遊走現象は主として単一細胞で研究されてきた経緯があり、近年その分子機構について多くのことが分かってきた。しかし我々の体を構成する上皮細胞や血管内皮細胞は多くの細胞が塊となって集団的に遊走する。この集団遊走は遊走先端を構成する一部の細胞(リーダー細胞)が性質を変え、高い遊走能を獲得することで全体を牽引すると考えられているものの、詳しいメカニズムは分かっていない。特になぜ先端細胞だけが選択的に高遊走能を獲得できるのかについて全く未解明の状態であった。集団遊走は三次元的に多数の細胞が協同して起こる現象であり高倍率の顕微鏡下でその動態を捉えることが難しい。このことが集団遊走の研究を困難にする一つの要因であった。

2. 研究の目的

本研究では、培養細胞株を用いて上皮細胞の集団遊走のモデルとなる実験系を確立し、それを高倍率の共焦点顕微鏡で生細胞のまま観察することを最初の目標とした。そしてリーダー細胞が集団から選別され高遊走能を獲得していく過程の形態上の特徴を詳細に記述すること、および、種々のマーカータンパク質を用いた免疫染色からリーダー細胞とそれに続く細胞群(フォロ細胞)の分子レベルでの違いを明らかにしていく。さらに、得られた知見からリーダー細胞が高遊走能を獲得するメカニズムについて仮説を立て、それを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 共焦点顕微鏡によるライブイメージング: 集団遊走は主に生体内の観察から見出されてきた現象である。例えば多細胞生物の胚発生や形態形成、およびがん細胞の浸潤過程での報告が特に多い。そのため高倍率の顕微鏡で生きたまま観察された例は少なく、詳細な解析がなされていなかった。本研究では腎上皮のモデル細胞株である MDCK 細胞と LLC-Pk1 細胞を用い、「コラーゲンフィルム培養法」(図1)によ

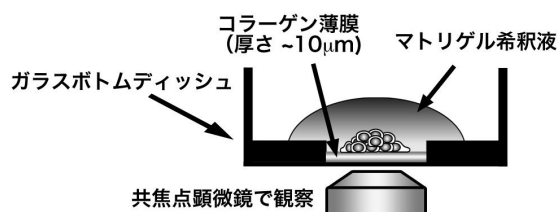


図1 コラーゲンフィルム培養法

て集団遊走を共焦点顕微鏡下でライブイメージングすることを試みた。この培養法では三次元環境を維持しながらも下面のガラス面に平行にリーダー細胞が遊走することが期待されるため、Zスタックの取得枚数を大きく削減することができるよう工夫がなされている。

(2) リーダー細胞とフォロ細胞の違い: 上皮細胞は、上述の培養法のように三次元的な培養環境下に置くと立体的な管腔構造を形成し、個々の細胞は内腔側に頂端膜を配した上皮極性を示す。ここに Hepatocyte Growth Factor (HGF) などの成長因子を添加して集団遊走を誘導する。この時、上皮極性のマーカーや遊走に関わるタンパク質の細胞内分布を経時的に観察することで、リーダー細胞とフォロ細胞の微細構造の違いや、そこで働く分子の違いが見出せると期待された。

(3) 集団遊走のメカニズムの仮説と検証: 上述の観察結果からリーダー細胞に特異的な変化を見せるタンパク質を同定する。またそのタンパク質の結合タンパク質や制御タンパク質などの働きを調べ、集団遊走の分子メカニズムを解明する。

4. 研究成果

(1) リーダー細胞の形態的特徴: MDCK 細胞や LLC-Pk1 細胞はコラーゲンフィルム培養法で非刺激時には管腔構造を形成し、どちらも HGF 刺激によって再現よくフィルム上に沿ってリーダー細胞が出現し、集団遊走することが分かった。詳細な解析を行うためこの2つの細胞株でそれぞれ細胞膜移行性 GFP、および Lifeact-mCherry(線維状アクチンを認識する蛍光タンパク質)を安定発現する細胞株を樹立した。これらの観察からリーダー細胞のみが線維状アクチンに富んだ浸潤仮足を伸展しフォロ細胞を牽引すること、リーダー細胞は E-Cadherin による上皮性の細胞間接着構造は保つものの頂端膜構造を持たないことが示唆された。特にこの観察は興味深く、リーダー細胞は上皮細胞としての性質を「中途半端に」失ったような特性を持つことを意味している。

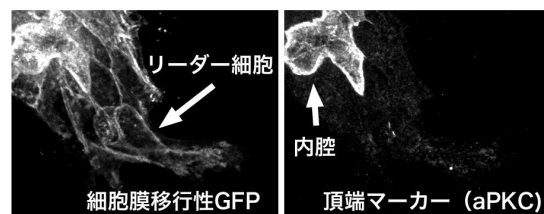


図2 MDCK リーダー細胞の頂端膜欠損

(2) リーダー細胞とフォロー細胞の分子レベルでの違い：上の結果を受けて集団遊走を誘導した細胞を種々の抗体で免疫染色し、各分子の時間変化を追跡した。その中で頂端膜マーカーである atypical protein kinase C (aPKC) はフォロー細胞では頂端膜構造に濃縮し、リーダー細胞では細胞質に分散していた。すなわち、分子レベルでもリーダー細胞は頂端膜を欠失していることが確認された(図2)。また、アクチン依存性の仮足形成に関わる WAVE2 や IRSp53 はリーダー細胞では予想通り仮足先端に濃縮していたが、フォロー細胞では意外なことに IRSp53 が頂端膜に強く濃縮していた(図3)。

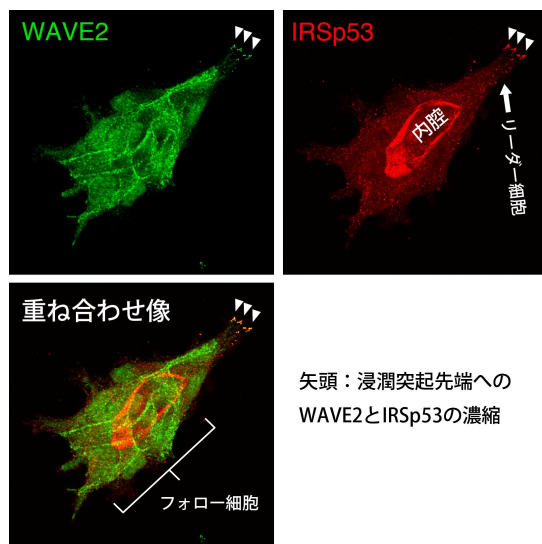


図3： IRSp53 の頂端膜への濃縮

(3) 頂端膜の存在とリーダー細胞の関係：上述の観察結果から、次のような仮説を立てた。頂端膜の存在自体がリーダー細胞となることを抑制しているのではないかとすなわち、頂端膜には細胞遊走に関わるシグナル分子が「トラップ」されていて、フォロー細胞では頂端膜が存在するため遊走性が抑えられているのではないかと。

この仮説におけるシグナル分子の第一候補は IRSp53 であり、まずは IRSp53 がリーダー細胞の遊走能に必要かどうか確かめた。IRSp53 のノックダウンを行うとリーダー細胞は仮足を形成できなくなり、集団遊走を強く抑制した。次に人為的に頂端膜構造を乱すことでリーダー細胞が増加するかどうか検討した。頂端膜の構成タンパク質である NHERF1 や myosin-1A のノックダウンを行ったところ HGF 刺激存在下でのリーダー細胞の遊走能が亢進し、リーダー細胞の数も有意に増加した。この時 IRSp53 は頂端膜から離れ、細胞質や浸潤仮足へと移行していた。ただし HGF を加えない場合は、集団遊走は起こらずリーダー細胞も出現することはなかった。このことはリーダー細胞が生じるには複数の要因が必要で

あることを示唆している。上記の結果から、刺激非存在下の上皮管腔では IRSp53 などのシグナル分子が頂端膜にトラップされ、それが細胞質へと移行することがリーダー細胞出現の一つの必要条件になっていることが判明した。

(4) 結果の考察、および今後の展望：今回、上皮細胞の集団遊走を共焦点顕微鏡下でライブイメージングすることに成功し、リーダー細胞の特徴をサブミクロンレベルで観察できた。世界的に見て、集団遊走のライブイメージングは報告例が少なく本研究が貴重な一例となることが期待される。特に静止状態から集団遊走を開始する過程を記録したものはほとんどなく、この実験系を通して更に研究が進むものと考えている。今回はリーダー細胞がほぼ 100% の頻度で頂端膜構造を失うことが観察されたが、これは世界的に見ても新たな発見であり、低倍の顕微鏡では分かり得なかった事実である。

本研究では頂端膜に遊走を促進するシグナル分子がトラップされることで上皮細胞の遊走を抑制するとの仮説を検証した。確かに IRSp53 は頂端膜が喪失したリーダー細胞で機能し、遊走を促進する働きを持っていた。また、IRSp53 の結合タンパク質である Eps8 も同様に頂端膜にトラップされる遊走因子であった。このようなシグナル分子は他にもいくつかあると考えられ、「頂端膜の形成」と「細胞の遊走性」は上皮細胞では二極的な細胞形質であるようだ。この仮説は更なる検証が必要ではあるが、本研究を通してはじめて提唱された概念である。

しかし、HGF の下流で何が引き金となって頂端膜構造が失われるのか、あるいはなぜ一部の細胞のみがリーダー細胞になり他の細胞はフォロー細胞として上皮性を保ち続けるのか、といった疑問は依然解決されなかった。また今回用いた細胞は腎上皮細胞株であるが、他の臓器由来の細胞では全く異なる遊走パターンを示すことも考えられる。生体内で見られる集団遊走は様々であり、リーダー細胞の数や細胞形態がケースによって大きく異なることが知られている。今回の腎細胞で分かったことが他のケースにも当てはまるのか違うのか、検証する必要がある。

多くのがんは上皮細胞に由来し、浸潤様式として集団遊走を示すものが多い。したがって、集団遊走の理解は新たながん治療を開発する上で礎となるものであり、本研究はその一助となったと考える。今回頂端膜の構造を乱す目的でノックダウンの標的とした NHERF1 や myosin-1A はがん抑制遺伝子として知られている。これらの遺伝子がなぜがん化と関係するのか解明されておらず、本研究で提唱した「頂端膜によ

る細胞遊走能の抑制」というメカニズムが背景にある可能性も考えられ、今後の研究が待たれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Fukumoto M*, Kurusu S*, Yamada T, and Takenawa T. (*equal contributions)
α-Actinin-4 enhances colorectal cancer cell invasion by suppressing focal adhesion maturation.

PLOS ONE, 10(4), e0120616. (2015)
査読あり

Suetsugu S, Kurusu S, and Takenawa T.
Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins.

Physiol. Rev., 94, 1219-48. (2014)
査読あり

[学会発表](計 4 件)

Kurusu S, Itoh T and Takenawa T.
Microvillar tip-localized interaction between IRSp53 and PI(4,5)P₂ drives brush border assembly in kidney epithelial cells.
2014 ASCB/IFCB annual meeting, Philadelphia (USA), Dec. 9, 2014.

栗栖修作, 伊藤俊樹, 竹縄忠臣.
I-BAR ドメインの膜変形活性による腎刷子縁の形成メカニズム.
第 5 6 回日本脂質生化学会大会, 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府), 2014 年 6 月 6 日.

栗栖修作, 竹縄忠臣.
IRSp53 family of I-BAR domain proteins regulates microvillius morphogenesis by sculpting the apical plasma membrane.
第 6 5 回日本細胞生物学会大会, ウィンクあいち(愛知県), 2013 年 6 月 20 日.

栗栖修作, 竹縄忠臣.
IRSp53 ファミリータンパク質は I-BAR ドメインの膜変形活性により微絨毛の形態形成を制御する.
第 4 6 回日本発生生物学会大会, くにびきメッセ(島根県), 2013 年 5 月 29 日.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗栖 修作 (KURISU, Shusaku)
神戸大学・バイオシグナル研究センター・特命助教
研究者番号: 40525531