

51. 細胞張力可視化プローブを用いた 3D 組織構築機構の解明

仁科 博史

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

Key words : YAP, 細胞張力, 物理的力

緒言

地球上の生物は常に重力の影響を受けていながら、その力に抗って複雑な三次元 (3D) 臓器を形成し、維持している。また生体内の細胞は、血管拡張/収縮に起因する進展刺激や血流によるせん断応力 (シェアストレス)、膜張力などの力を受けている。これら力学的ストレス (メカニカルストレス) は、細胞の増殖・分化・移動といった細胞応答に影響を与え、正常な臓器形成に重要である。現在、メカニカルストレスを感知するメカノセンサーの探索や生理学的シグナルに変換するメカノトランスダクション機構の解明が盛んに行われている。転写共役因子 Yes-associated protein (YAP) は、細胞増殖や細胞死などの多様な細胞応答を制御し、新たにメカニカルストレスに応答する分子として機能することが明らかになった。また我々は、YAP が細胞や組織の張力を制御することにより、3D 臓器の形成・維持に関与することを見出した。さらに、細胞外基質の硬化に伴う YAP 活性化が、乳がんやリンパ管機能不全、肺や肝臓の線維化にも関与することが示唆された。これらの報告から、YAP は、メカノトランスダクション機構の主要な構成分子の一つとして注目されている。本研究では、YAP が制御する物理的力の探索と、本物理的力を可視化可能なプローブの開発を研究目的とした。

方法および結果

1. 活性型 YAP 依存的な細胞突出誘導

我々は初期胚形成不全メダカ変異体のスクリーニングによって体全体が扁平化する hirame (hir) メダカ変異体を見出し¹⁾、その原因遺伝子産物である転写共役因子 YAP が細胞張力の制御に関与することを報告した²⁾。そこで YAP が制御する物理的力の探索として、最近注目されている細胞競合現象における YAP の役割を検討し、YAP 誘導性の物理的力について検討した。哺乳動物培養細胞を用いた細胞競合実験系を使用した (図 1a)。イヌ腎尿細管上皮細胞の MDCK を使用し、ドキシサイクリン依存的に活性型 YAP (5SA) を発現する細胞を樹立した。活性型 YAP (5SA) 発現細胞を赤色でラベル後、親株 MDCK を 50 : 1 となるよう混合播種し、ドキシサイクリン処理後の赤色細胞の動態を観察した³⁾。その結果、活性化 YAP 依存的、モザイク状態依存的に YAP 発現細胞が頂端面に排除されることが観察された (図 1b と c)。

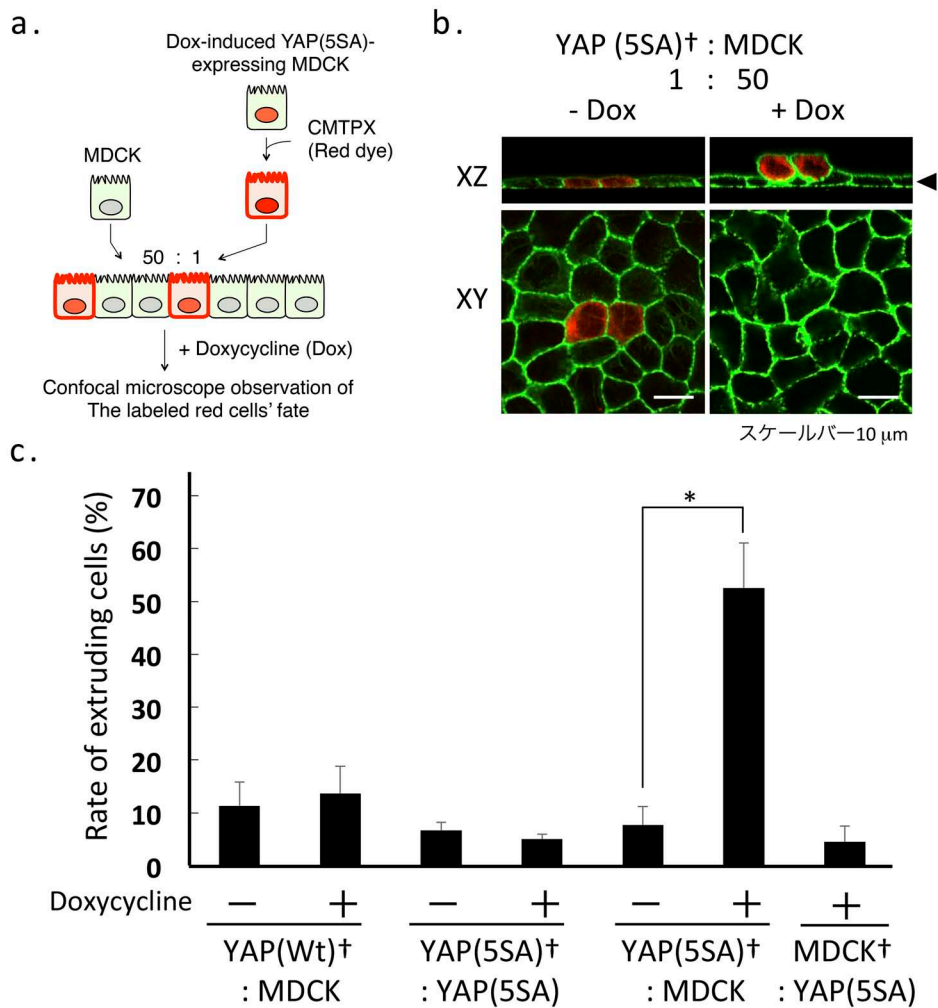


図1. 活性型 YAP 発現細胞は正常 MDCK 細胞との混合培養依存的に細胞突出する

a) 哺乳動物培養細胞を用いた細胞競合実験系を示した。ドキシサイクリン (Dox) 依存的に YAP の活性型である YAP (5SA) を発現する MDCK 細胞を樹立し、赤色素 (CMTPX) でラベル後、親株である正常 MDCK 細胞と YAP (5SA) 発現細胞が 50:1 の割合となるようコーゲンコートしたガラスベースディッシュに混合播種した。細胞播種から 24 hr 後に Dox を添加し、添加から 24 hr 後の赤色の YAP (5SA) 細胞の動態を評価した。b) Dox 未処理 (左) と Dox 処理 (右) の結果を示した。それぞれ xz および xy 軸における共焦点顕微鏡像を示す。† は赤色素でラベルした細胞を示す。赤: CMTPX、緑: Phalloidin。c) 突出した赤色細胞を総赤色細胞で割った割合を細胞突出割合として算出し、定量的に評価した。p < 0.01, Student's t test.

2. 周辺細胞の細胞骨格依存的な細胞突出誘導

次に周辺細胞からの物理的力の関与を検討するために、アクチンフィラメントの形成に深く関わる Filamin および中間径フィラメントである Vimentin の関与を shRNA ノックダウン法で検討した。その結果、周辺細胞でビメンチンまたはフィラミンを発現抑制した場合には突出が抑制されることが示された (図2)。以上の結果は、YAP (5SA) 細胞の突出には周辺細胞における filamin や vimentin の発現が重要であり、物理的圧力が細胞排除に必要なことを示唆する。

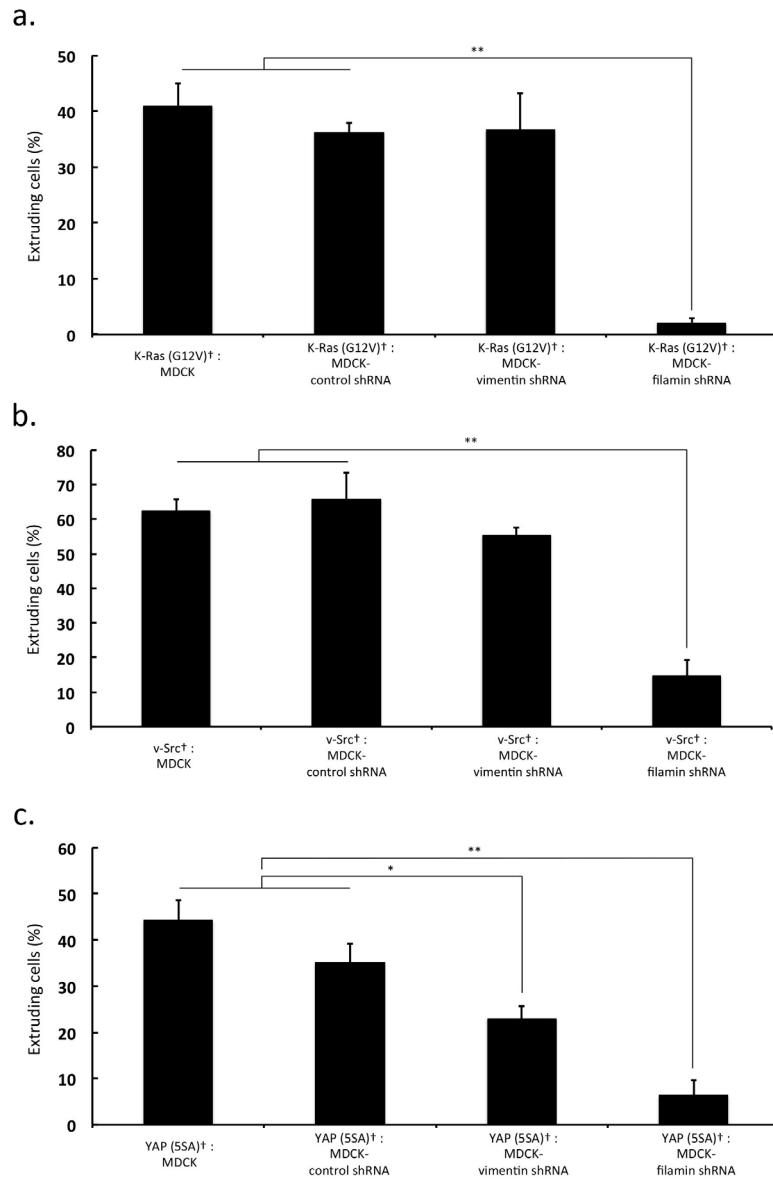


図2. YAP (5SA) 発現細胞の細胞突出には、周辺細胞における Filamin および Vimentin の発現が必要である

細胞突出において周辺細胞における Filamin と Vimentin の発現が重要であることが報告されている。そこで YAP (5SA) 発現細胞の突出にも必要であるのか調べるため、Dox 依存的に control shRNA または Filamin shRNA、Vimentin shRNA をそれぞれ発現する MDCK 細胞を樹立した。正常 MDCK 細胞と上記の細胞を周辺細胞とした場合の、YAP (5SA) または K-Ras (G12V)、v-Src 発現細胞の細胞突出割合を定量的に評価した。†は赤色素でラベルした細胞を示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. スチューデントの両側 t 検定。a) K-Ras (G12V) 発現細胞の細胞突出割合を示した。b) v-Src 発現細胞の細胞突出割合を示した。c) YAP (5SA) 発現細胞の細胞突出割合を示した。

3. 周辺細胞の状態依存的な細胞突出誘導

本細胞排除現象には周辺環境が関与することから、正常 MDCK 細胞、活性化 K-Ras (G12V) 発現 MDCK 細胞、v-Src 発現 MDCK 細胞、YAP (5SA) 発現 MDCK 細胞間での動態の変化を検討した。その結果、YAP (5SA) 発現細胞は正常 MDCK 細胞を周辺細胞取り囲まれた場合、細胞排除された。一方、Ras (G12V) あるいは v-Src 発現細胞を

周辺細胞とした場合には、細胞突出が生じなかった (図 3a)。これらの結果をまとめたのが図 3b である。興味深いことに細胞排除が誘導される場合は、周辺細胞内の Filamin の集積が観察された (図 3c)。これらの結果は、細胞排除には周辺細胞からの圧力が必要であることが示唆される。現在、これら物理的力の可視化に適切なプローブを検討している。

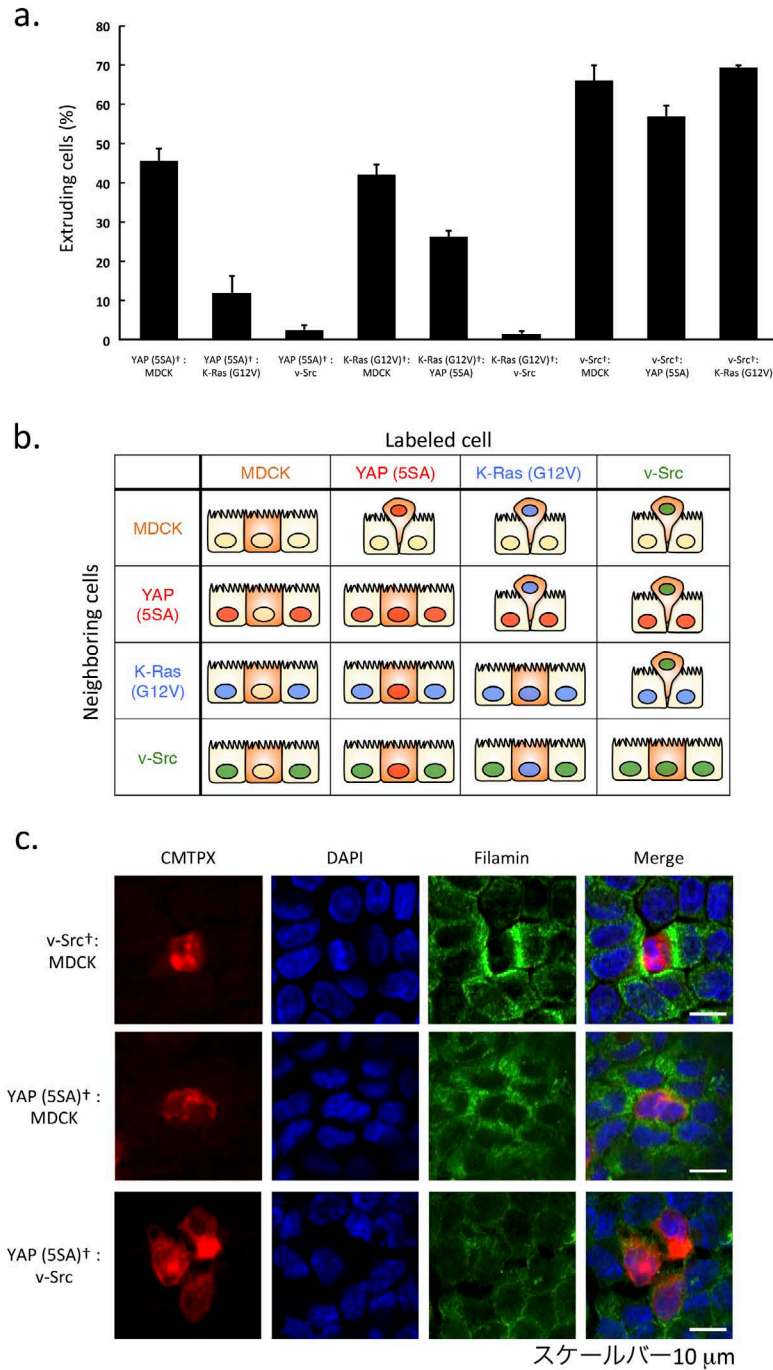


図 3. YAP (5SA) 発現細胞の突出は、周辺環境に依存している

正常 MDCK 細胞または K-Ras (G12V) 発現細胞、v-Src 発現細胞、YAP (5SA) 発現細胞を用いて、それぞれ異なる組み合わせで混合播種した。†は赤色素でラベルした細胞を示す。a) 細胞突出割合を定量的に評価した。b) a) の結果を図に示した。縦軸は周辺細胞、横軸は赤色素でラベルした細胞を示す。c) 細胞突出と Filamin の集積における相関を調べるため、細胞を DAPI および Filamin で染色し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

考 察

YAP は細胞数を調節し、臓器のサイズおよび発がんを制御するシグナルである。最近の研究から、YAP はメカニカルストレスに応答すること、また、細胞張力の制御を担うことが報告された⁴⁾。本研究では、YAP が隣接細胞に圧力を誘導する能力があることを示唆する。興味深いことに、この培養細胞 MDCK 細胞を用いた細胞排除現象と類似の現象がマウス肝臓においても観察された⁵⁾。これらの結果は、YAP はストレスセンサーとして機能し、障害細胞の排除を誘導し、組織や器官の恒常性維持の制御に関与することを示唆する。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学難治疾患研究所発生再生生物学分野の千葉恭敬および石原えりか、宮村憲央である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Watanabe T, Asaka S, Kitagawa D, et al. Mutations affecting liver development and function in Medaka, *Oryzias latipes*, screened by multiple criteria. *Mech Dev.* 2004;121(7-8):791-802. doi:10.1016/j.mod.2004.04.004. PubMed PMID:15210186.
- 2) Hogan C, Dupré-Crochet S, Norman M, et al. Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nat Cell Biol.* 2009;11(4):460-7. doi: 10.1038/ncb1853. PubMed PMID:19287376.
- 3) Chiba T, Ishihara E, Miyamura N, et al. MDCK cells expressing constitutively active Yes-associated protein (YAP) undergo apical extrusion depending on neighboring cell status. *Sci Rep.* 2016;6:28383. doi: 10.1038/srep28383. PubMed PMID:27324860.
- 4) Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1287-312. doi: 10.1152/physrev.00005.2014. PubMed PMID:25287865.
- 5) Miyamura M, Hata S, Itoh T et al. YAP determines the cell fate of injured mouse hepatocytes in vivo. *Nat. Commun.* 2017;8:16017 doi: 10.1038/ncomms16017. PubMed PMID:28681838.