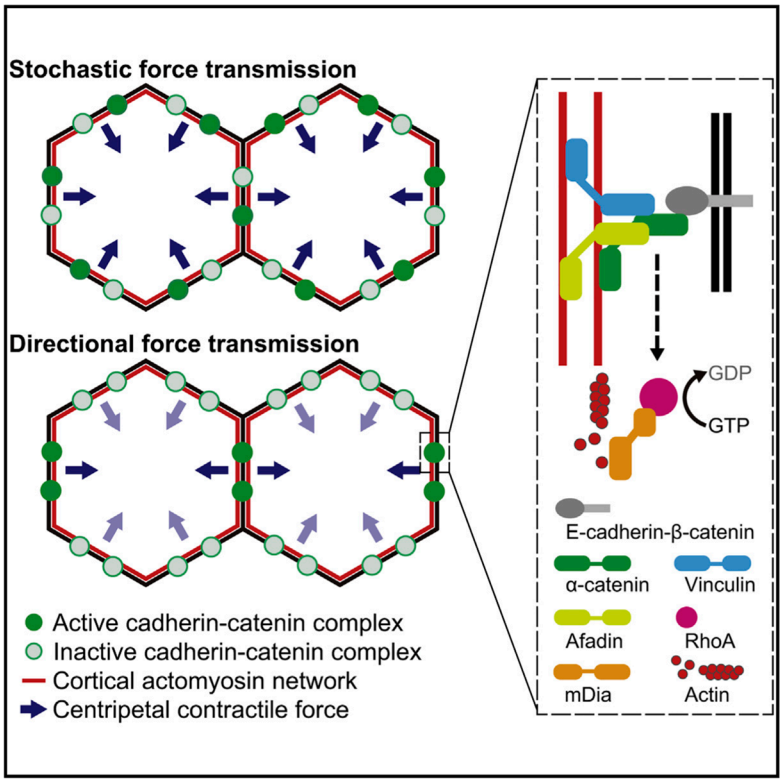
176　細胞間張力を基軸とした細胞集団の運動機構の解明	松沢　健司

【目的】上皮細胞や血管内皮細胞などから形成される接着性組織では、細胞間で絶えず張力が発揮されており、組織内の個々の細胞には変化する力に適切に応答する能力が求められる。近年の研究から、がん細胞が集団を維持したまま効率良く運動する背景には、細胞接着装置を介して、細胞同士が引っ張り合い、細胞接着部位にかかる力に応じて柔軟に細胞内部の構造を協調的に変化させる能力が重要であることが明らかになった。しかしながら、細胞集団の協調性を裏付ける分子メカニズムの理解は不十分である。本研究では、細胞接着装置の構成分子であるα-カテニンの張力依存的な構造変化に着目し、集団細胞運動における役割を実験観察と数理モデリングを通して調べた。

【方法】α-カテニンの張力依存的な構造変化の役割を調べるために、構造解析の結果に基づいて、常に張力を受けた状態の構造を維持するα-カテニン変異体を設計し、これを安定的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いイメージング解析や生化学シグナルの解析を行なった。

【結果】本研究により、α-カテニン張力依存的な構造変化が、RhoA の活性を亢進することによりアクチン細胞骨格の重合化を局所に限定することで、細胞間接着における収縮力を調節し、効率的な集団細胞運動に寄与することを明らかにした。また、数理モデリング通して、偏りのあるα-カテニンの張力依存的な構造変化が、不均衡な張力分布をもたらし、上皮細胞単層の協調的な遊走を可能にすることを実証した。

集団細胞運動における上皮細胞接着の可塑性は細胞間張力により制御されている



176. 細胞間張力を基軸とした細胞集団の運動機構の解明

松沢　健司

九州大学 大学院理学研究院 生物科学部門

Key words：上皮細胞接着，集団細胞運動，細胞骨格，シグナル伝達

緒　言

正常組織への浸潤および転移はがん細胞の特徴である。最近の研究により、集団性の細胞移動が扁平上皮がんなどの接着性組織に由来するがんの進行過程で特に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。しかしながら、このようながん細胞の集団的な運動現象はその分子メカニズムが十分に解明されていない。歴史的には、侵襲性の細胞が単独で移動するメカニズムの解明に研究が注がれてきた。この現象は、上皮細胞が細胞極性や接着などそれの特性を失い、膜ブレブと呼ばれる移動様式を用い新しい組織に浸潤する上皮間葉転換（EMT）として知られている。その一方、実際の病理組織ではがん細胞が集団を形成したまま一つの構成単位として移動する様子、いわゆる集団細胞運動、が多く観察される［1］。しかしながら、このようながん細胞の集団運動現象はその分子メカニズムが十分に解明されていない。がん細胞が集団で移動する際には、細胞集団の先端に位置するリーダー細胞が後続のフォロワー細胞を牽引する。リーダー細胞による牽引力は細胞間に働く張力を介して、フォロワー細胞の運動方向や運動速度を制御し、集団としての細胞の振る舞いを協調させる働きがあることが明らかになった（図 1）［2］。では、細胞間に働く張力は、どのようにリーダーからフォロワーへ、そしてさらに後続のフォロワー細胞へ伝わるのであろう？

カドヘリンを基盤とする接着接合（AJ）は、細胞間接着を制御するタンパク質複合体であり、その構成分子は多く同定されている。AJ を構成する分子の一つα-カテニンは、細胞間にかかる張力の強弱に応じて、閉じた不活性型構造と開いた活性型構造との間を可逆的に転換し、張力変化を感知することが知られている（図 2）［3］。したがって、α-カテニンの張力依存的な構造変化が AJ の質的変化をもたらすことで、細胞間の張力伝播を制御し、移動する細胞集団を統率することが考えられる。しかしながら、細胞間接着部位にかかる細胞間の張力による機械的シグナルと細胞内情報伝達の生化学シグナルが、α-カテニンの構造変化に伴いどのように制御され、変動するのかは未解明である。本研究では、α-カテニンの構造変化に着目し、細胞間の力がもたらす細胞接着の可塑性、すなわち量的・質的変化を明らかにし、接着性細胞の集団的振る舞いを制御する分子機構を力学と生化学の視点から解明することを目的とした。

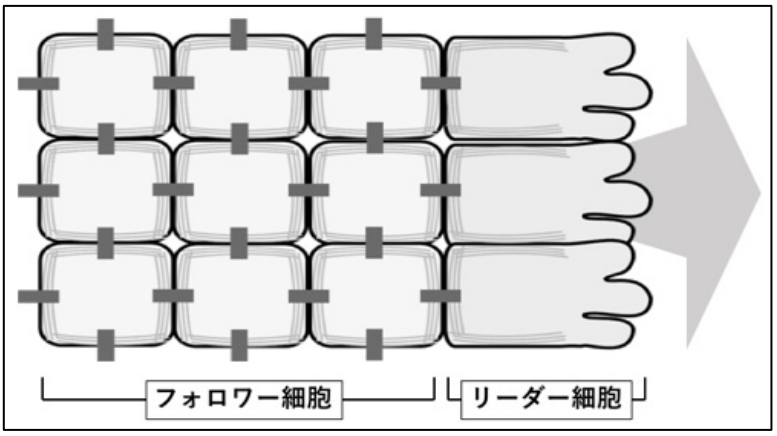


図 1. がん細胞などの集団細胞運動

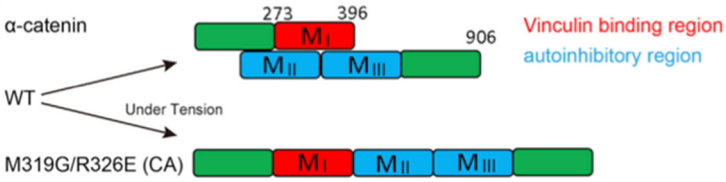


図 2.　α-カテニンは張力依存的に構造変化する

方法および結果

1.　遊走する上皮細胞単層の細胞接着部位において、張力依存的に構造変化したα-カテニンは偏りを持って分布する

前述した通り、α-カテニンは細胞接着部位にかかる張力依存的にその立体構造を変化させることが報告されている。そこでまず、遊走する上皮細胞単層の低細胞密度/遊走状態の周辺細胞領域と高細胞密度/静止状態の中央細胞領域におけるα-カテニンの構造変化を比較した。低細胞密度および高細胞密度の細胞領域を同じ単層内に同時に再現するために、シリコン製の鋳型内にイヌ腎臓由来上皮細胞である MDCKⅡ細胞をコンフルエントで播種し、48 時間遊走させた（図 3A）。α-カテニンの張力依存的に構造変化した立体構造を認識するモノクローナル抗体α18 で染色すると、周辺細胞領域の細胞接着部位において偏りのある局在を示した（図 3B 左上パネル）。対照的に、中央細胞領域の細胞接着部位では、細胞全周にわたって一様に局在した（図 3B 左下パネル）。これより、α-カテニンは周辺細胞領域の細胞接着部位では偏りを持って構造変化する一方、中央細胞領域の細胞接着部位では全周にわたって一様に構造変化することが明らかになった。また、アクチン結合タンパク質 vinculin や afadin はα-カテニンに結合し、カドヘリン・カテニン複合体を裏打ちするアクチンフィラメントとの結合をより強固なものにするが、細胞接着部位における vinculin、afadin およびアクチンフィラメントの局在は、α18 の局在と同様に、周辺細胞領域において偏りがあり、中央細胞領域において一様であった（データ割愛）。これらの結果は、遊走状態の周辺細胞領域では、細胞接着部位にかかる張力が不均衡であることを示唆する。加えて、α-カテニンが張力の増強に応答し構造変化することは、AJ の可塑性をも制御することが示唆された。

2.　α-カテニンの張力依存的な構造変化は Rho-formin シグナルの活性化を誘発する

前項の結果は、α-カテニンの張力依存的な構造変化による AJ の変質がアクチン細胞骨格の再構築を調節し、細胞間の張力を生成する分子機構の存在を示唆する。そこで、AJ の可塑性制御におけるα-カテニンの役割を調べるために、報告されたα-カテニンの構造解析の結果に基づいて、常に張力を受けた状態の構造を維持するα-カテニン変異体設計し、これを安定的に発現する細胞株をα-カテニンのノックアウトの背景で樹立した（M319G/R326E、以下 GFP-α-catenin-Cares）（図 2）[4]。同様に、野生型のα-カテニンを発現する細胞株も樹立した（以下 GFP-α-catenin-WTres）。GFP-α-catenin-WTres 細胞と GFP-α-catenin-CAres 細胞のα-カテニンの発現レベルおよび局在は、MDCKII 親株における内在性のα-カテニンと同等であった（データ割愛）。また、MDCKII 親株と GFP-α-catenin-CAres 細胞を共培養し免疫染色を行なったところ、GFP-α-catenin-CAres 細胞では細胞接着領域においてα18 の染色が増強し、vinculin、afadin およびアクチンフィラメントの集積が増加することが確認できている（データ割愛）。

先行研究で、アクチン核形成因子である formin ファミリータンパク質 mDia が、カドヘリン接着依存的に AJ に集積し、アクチン細胞骨格の再構築とアクトミオシンの安定化を促進することが報告されている［5］。そこで、mDia がα-カテニンと相互作用するか調べた結果、mDia がα-カテニンに結合し、その相互作用がα-カテニンの構造変異体で増加した（図 4A）。mDia は活性型の RhoA と結合することで、活性化される。そこで、GFP-α-catenin-CAres 細胞では RhoA の活性が変動しているかを調べた。活性型 RhoA は、GFP-α-catenin-WTres と比べて GFP-α-catenin-CAres 細胞において有意に増加した（図 4B、C）。RhoA の活性化はミオシンの収縮を介して circumferential ring による張力を増加させることが知られている。そのため、GFP-α-catenin-CAres 細胞の AJ では張力が増加していると考えられる。面白いことに、遊走する MDCKⅡ細胞単層を全般的な formin の阻害剤である SMIFH2 で処理すると、周辺細胞領域におけるα18 の偏りのある局在が失われた（図 4D）。これは、収縮性アクトミオシンネットワークが正のフィードバック機構によって AJ の可塑性を制御することを示唆する。

以上の結果より、α-catenin の張力依存的な構造変化が、Rho 媒介性アクトミオシン収縮性を介して AJ で張力を生成し、張力依存的に構造変化したα-カテニンを安定化することが明らかとなった。

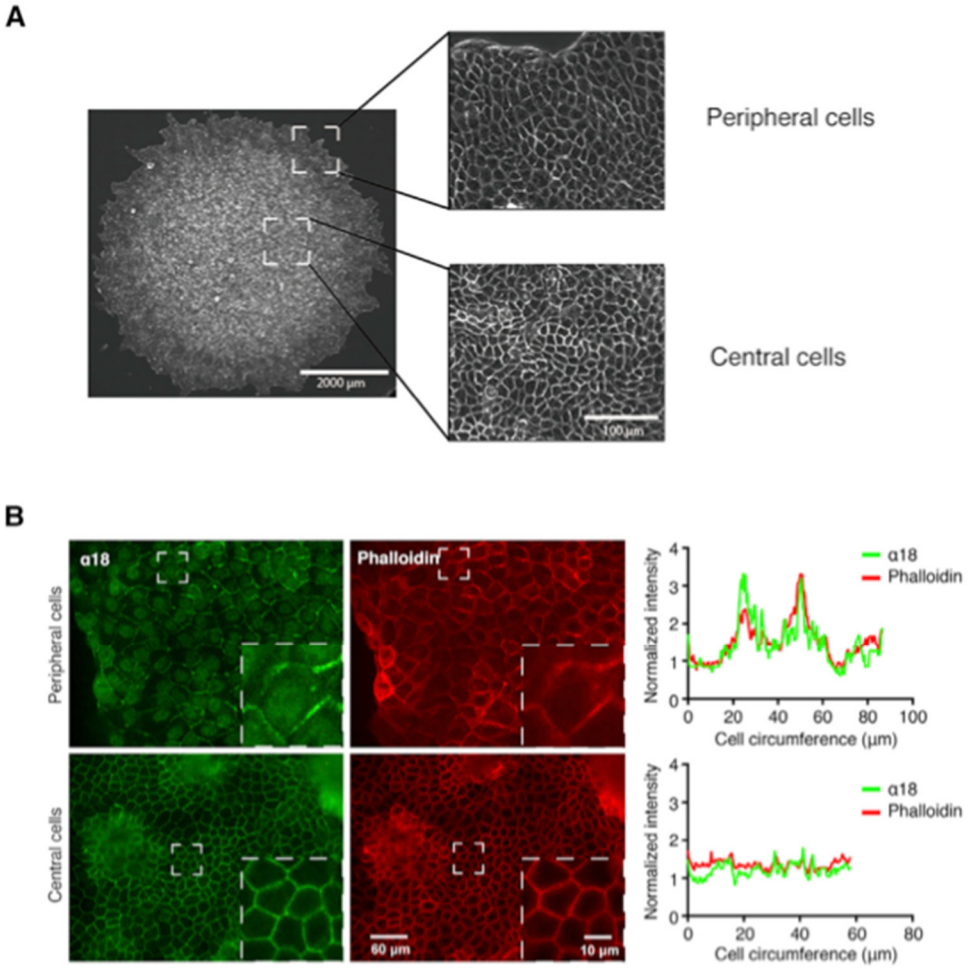


図 3. 遊走する上皮細胞単層の細胞接着部位において、張力依存的に構造変化したα-カテニンは偏りを持って分布する

A. 遊走する MDCKⅡ細胞単層の位相差画像。周辺細胞領域は細胞密度が低く遊走状態である（上パネル）。中央細胞領域は細胞密度が高く静止状態である（下パネル）。

B. 遊走する MDCKⅡ細胞単層の周辺（上パネル）と中央（下パネル）細胞領域のα18 と phalloidin の免疫染色画像。細胞接着部位における両方の分布は、周辺で偏りがあり、中央で細胞全周にわたって一様であった。インサートは、各領域の代表的な細胞を示している。右パネルに細胞接着部位の蛍光強度のプロフィールを示す。
スケールバー ＝60μm、インサート ＝10μm。。

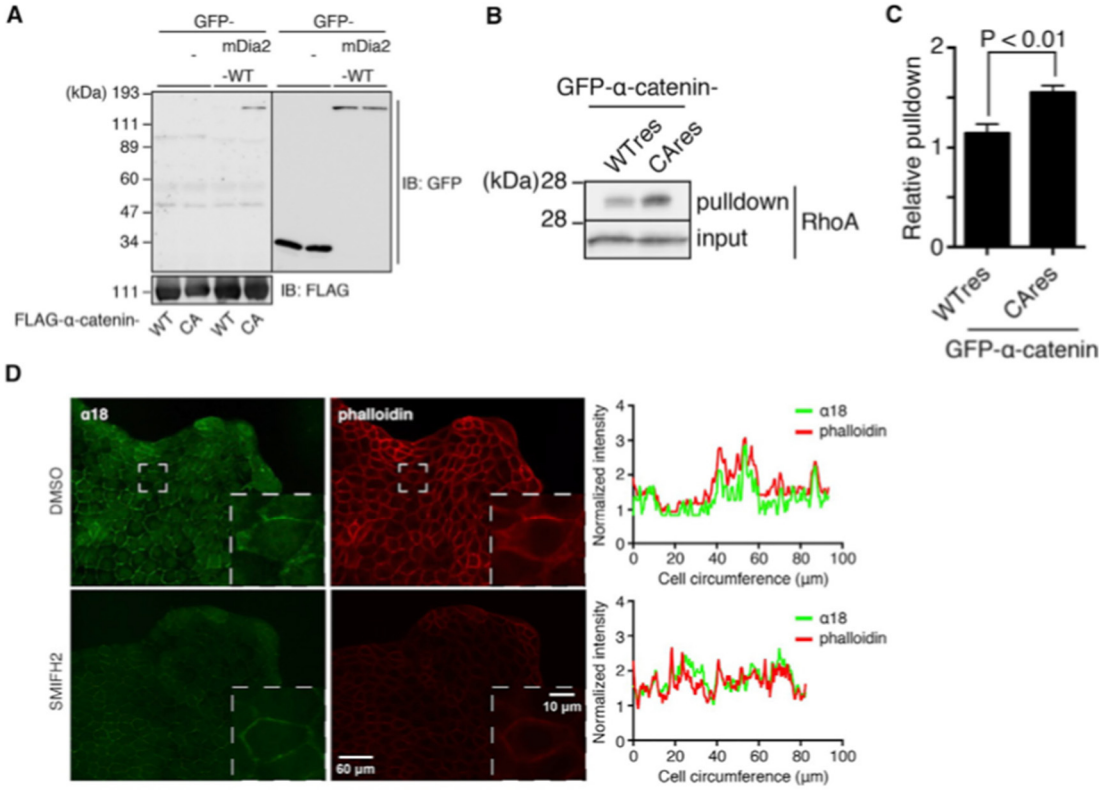


図 4.　α-カテニンの張力依存的な構造変化は集団細胞運動において隣接する細胞同士の協調性を制御する

A.　Formin ファミリータンパク質 mDia2 はα-カテニンと構造変化に依存して相互作用する。HEK293 細胞に FLAG-α-catenin-WT または FLAG-α-catenin-CA と GFP-mDia2-WT を同時にトランスフェクションし、lysate を FLAG 抗体で免疫沈降した。Input および elution を示された抗体で免疫ブロットした。データは 3 つの独立した実験の代表である。

B.　RhoA の pulldown assay。RhoA 活性は GFP-α-catenin-CAres 細胞において優位に増加する。活性型 RhoA は、GFP-α-catenin-WTres および GFP-α-catenin-CAres 細胞からの lysate を、RhoA エフェクターである Rhotekin の Rho 結合領域と GST の融合タンパク質と共にインキュベートすることによって pulldown した。input および elute を RhoA についてウエスタンブロットした。データは 3 つの独立した実験の代表である。

C.　**B** の定量。N = 3 ; p < 0.05。RhoA 活性は GFP-α-catenin-CAres 細胞において優位に増加する。

D.　遊走する MDCKⅡ細胞単層における周辺細胞領域のα18 と phalloidin の免疫染色画像。Formin の阻害は、遊走する MDCKⅡ細胞単層の辺縁部におけるα18 と phalloidin の偏りのある分布を解消する。固定前に vehicle（DMSO;上パネル）または全般的な formins 阻害剤（SMIFH2 : 100μM ; 下パネル）で MDCKⅡ細胞単層を処理し、示された抗体で免疫染色を行った。インサートは、各領域の代表的な細胞を示している。右パネルに細胞接着部位の蛍光強度のプロフィールを示す。スケールバー = 60μm、インサート = 10μm。

3. α-カテニンの張力依存的な構造変化は集団細胞運動において隣接する細胞同士の協調性を制御する

続いて、集団細胞運動におけるα-カテニンの張力依存的な構造変化の意義を調べるためにライブイメージング観察を行なった。その結果、GFP-α-catenin-CAres 細胞は GFP-α-catenin-WTres と比べて細胞集団前縁の遊走速度が優位に遅れた（図 5A、B)。次に、GFP-α-catenin-CAres 細胞の前縁の遊走速度の低下が、単細胞レベルの固有の遊走能から生じた違いか、または細胞集団としての振る舞いから生じた違いかを調べた。隣接細胞間の遊走方向性の相関を調べるため、単層内の個々の細胞の遊走方向をマッピングする粒子画像速度測定法（Particle image velocimetry, PIV）を使用した（図 5C)。遊走開始初期は GFP-α-catenin-WTres 細胞と GFP-α-catenin-CAres 細胞共に、隣接細胞間の遊走方向の協調性を欠いていたが、GFP-α-catenin-WTres 細胞は、5 時間までに単層全体で遊走方向の協調性を確立した（図 5D 左パネル)。対照的に、GFP-α-catenin-CAres 細胞は、遊走開始後 11 時間後においても隣接細胞間で遊走方向が協調しなかった（図 5D 右パネル)。以上の結果から、α-カテニンの張力依存的な構造変化およびそれに伴う AJ の質的変化は、隣接細胞の遊走方向を協調させることで、効率的な集団細胞遊走を達成するために必須であることが考えられる。

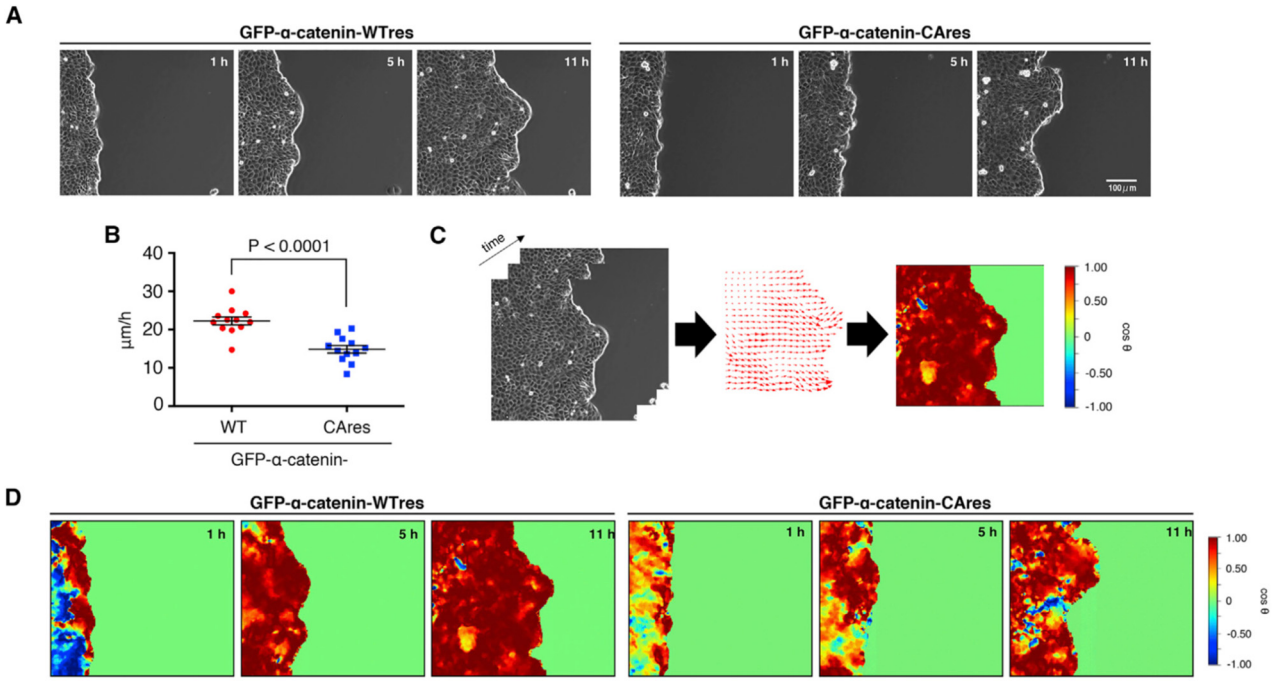


図 5. α-カテニンの張力依存的な構造変化は集団細胞運動において隣接する細胞同士の協調性を制御する

A. 表記の細胞を ibidi 細胞培養インサートに播種し、インサートの除去によって集団細胞遊走を開始した。示された時間における代表的な細胞の位相差画像が示されている。画像は、3 つの独立した実験を代表するものである。スケールバー = 100 μm。

B. 細胞集団前縁の遊走速度の定量化。N = 10、p <0.0001。

C. 粒子像速度測定（PIV）分析の概略図。ベクトルマップに基づいて、2 次元極座標パラメータ $\cos\theta$ を計算した。細胞の遊走方向が、遊走開始前の細胞境界に垂直で外側に向いているとき $\cos\theta = 1$、内側向いているとき $\cos\theta = -1$、細胞境界と平行なとき $\cos\theta = 0$ である。赤は進行方向に遊走していることを示し、青は進行方向とは逆に遊走していることを示す。隣接細胞同士が同じ色の時、協調して遊走していることを示す。

D. **A** に示す画像に対応する PIV 分析のヒートマップの代表図。GFP-α-catenin-WTres 細胞に比べて GFP-α-catenin-CAres 細胞の方が 11 時間後でも隣接細胞同士が同じ色を示さないことから、協調して遊走していないことがわかる。

考　察

本研究ではα-カテニンの張力依存的がvinculinのAJへの集積だけでなく、AJの全体的な構造にも影響を及ぼすことを明らかにした。また、α-カテニンの構造変化に依存してα-カテニンへ結合するafadinおよびmDia2の2つの重要なAJ制御因子を同定した。また、α-カテニンの構造変化は、AJを構成する分子群の質的および量的変化をもたらすと同時に、AJにおける機械的シグナルから細胞内のRhoAの活性化という生化学応答への変換を媒介することを明らかにした。また、本報告書では割愛しているが、GFP-α-catenin-CAres細胞で観察された方向性の協調性の低下が、数学的シミュレーションによって再現された。このように、実験観察と数学的シミュレーションを組み合わせることで、集団細胞遊走する上皮細胞単層において、α-カテニンの張力依存的な構造変化によるAJの可塑性制御が、隣接細胞間の協調性の確立に必須であることを実証した［6］。

謝　辞

本研究は九州大学理学研究院生物科学部門代謝生理学研究室の池ノ内順一教授並びに大学院システム生命科学府の樋本拓也、理学部生物学科の望月優輝らの多大な協力のもと行われた。

文　献

1） Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. Classifying collective cancer cell invasion. Nat Cell Biol. 2012 Aug; 14(8):777-83. PMID: 22854810 DOI: 10.1038/ncb2548

2） Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009 Jul;10(7):445-57. PMID: 19546857 DOI: 10.1038/nrm2720

3） Yonemura S, Wada Y, Watanabe T, Nagafuchi A, Shibata M. alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. Nat Cell Biol. 2010 Jun;12(6):533-42. PMID:20453849 DOI:10.1038/ncb2055

4） Maki K, Han SW, Hirano Y, Yonemura S, Hakoshima T, Adachi T. Mechano-adaptive sensory mechanism of α-catenin under tension. Sci Rep. 2016 Dec;6:2478. PMID: 27109499 DOI: 10.1038/srep2478

5） Acharya BR, Wu SK, Lieu ZZ, Parton RG, Grill SW, Bershadsky, AD, Gomez GA, Yap AS. Mammalian Diaphanous 1 Mediates a Pathway for E-cadherin to Stabilize Epithelial Barriers through Article Mammalian Diaphanous 1 Mediates a Pathway for E-cadherin to Stabilize Epithelial Barriers through Junctional Contractility. Cell Rep. 2017 Mar;18(12):2854-2867. PMID: 28329679 DOI: 10.1016/j/celrep.2017.02.078

6） Matsuzawa K, Himoto T, Mochizuki Y, Ikenouchi J. α-catenin controls the anisotropy of force distribution at cell-cell junctions during collective cell migration. Cell Rep. 2018 Jun;23(12):3447-3456. PMID: 29924989 DOI: 10.1016/j.celrep.2018.05.070