

長期間派遣成果報告

タイトル	細胞集団の協調的運動の分子機構の解析：集団内における細胞の役割分担に注目して Analyses of the molecular mechanism of coordinated migration of cell groups: <i>THE DIFFERENTIATION AND ROLES OF "LEADER CELLS" AND "FOLLOWER CELLS"</i>
所属・氏名	マンチェスター大学 Healing Foundation Centre 松林 完 Healing Foundation Centre, University of Manchester Yutaka MATSUBAYASHI
派遣期間	2008年12月1日～2011年9月30日 December 1, 2008 – September 30, 2011
研究機関	Department of Biochemistry, University of Bristol University Walk, Bristol BS8 1TD, United Kingdom
研究指導者	Prof. Paul Martin

Summary

Collective cell migration is essential for a wide variety of physiological episodes including the re-epithelialisation component of tissue repair. However, it has been difficult to quantitatively investigate the behaviour of a large number of individual cells. To circumvent this problem, we have designed a novel and simple image analysis method with which we can visualise and quantify collective cell mobilisation in a “scratch wounded” monolayer of cultured epithelial cells. Using this technique, we revealed that actomyosin constriction negatively regulates cell mobilisation and that the advancement of cell sheets and the mobilisation of rows of cells behind their leading edges are independently regulated. We also found there to be a finite limit to the number of rows of cells mobilised after wounding. Moreover, our data suggest that enhancing cell mobilisation, by release from myosin II contractility, accelerates the healing of large wounds in the long term, thus raising the possibility that the cell mobilisation process might be a therapeutic target for improving wound healing. Finally, our pharmacological data suggest that upon wounding a uniform monolayer of epithelial cells, the cells “differentiate” into distinct “leader” and “follower” populations that might play specific roles in the coordinated movement of the entire cell sheet.

序論

創傷治癒、血管形成や神経管閉鎖など様々な生命現象においては、多数の細胞が集団として協調的に運動し、形態形成を行う[1-3]。また近年、ガン細胞が集団をなして転移しうること明らかにってきている[1, 4]。したがって細胞集団の運動の分子的機構の解明は多くの生理的・病理的現象の統一的理解につながり、かつ創傷治癒の促進、あるいはガン転移の抑制などの技術開発の基礎となりうる、基礎・応用両面において非常に興味深い課題である。しかしながら、マクロファージなど単一の細胞が運動する分子機構については今日までに多くの研究がなされてきたが、細胞集団の協調的運動の分子機構はほとんど不明である。その理由のひとつに、細胞『集団』の『協調的』運動を定量的に解析することの困難さがあげられる。既存の定量法としては、個々の細胞すべての運動を追跡しそれらの速度の相関を解析する方法[5]があるが、これは膨大な計算量と高度な情報処理技術を必要とするため容易に実行できるものではない。

細胞集団の運動において、運動しつつある細胞集団の前列に位置する細胞（「先導細胞」、leader cells と呼ぶ）と、後列に位置する細胞（「追従細胞」、follower cells と呼ぶ）の分化が重要である。これら先導細胞と追従細胞は、互いに構造や遺伝子発現パターンが相違するのみならず、細胞集団全体の運動においておのおの異なった役割を果たしていることが近年判明しつつある[6-9]。しかし、先導・追従細胞の分化の分子機構、両細胞において発現している遺伝子の差異、そして、両者の間でどのようなシグナルがやり取りされているかについてはほとんど分かっていない。

私は上記諸問題の解決、すなわち A) 細胞集団運動の簡便かつ強力な定量的解析法の開発と、B) その方法を用いた先導細胞・追従細胞の分化機構の解析、を目的として研究を開始した。具体的な研究対象として、創傷治癒における上皮細胞の「動員」(“mobilisation”)を取り扱った。

創傷治癒においては、傷の周囲に残された上皮細胞の集団が傷の中へ向かって協調的に運動し、破損部位を修復する。この集団運動に動員される細胞の数は、治癒すべき傷の大きさに従って厳密に制御されねばならない。たとえば傷に直接面した細胞だけが修復運動に動員されるとした場合、大きな傷を修復することは不可能である（細胞の直径は 10 μm のオーダーであるのに対し、しばしば我々は mm から cm オーダーの大きさを持つ傷を受ける）。一方、もしも小さな傷に対しても傷の周囲に残された上皮細胞すべてが動員される（たとえば手先の小さな切り傷を治すために頭から足まで全身の皮膚細胞が動く）とすれば、これは多大なエネルギーの浪費をもたらす。これらの問題を生じることなく適切な数の細胞が動員される機構は現在のところ不明である。また細胞集団の「動員」は医学的にも重要な課題である。皮膚における創傷の直径がおおよそ 2-3 cm よりも大きいとき、これを治療するためには皮膚移植が必要だが[10]、もしも傷の周囲において通常より多くの細胞が修復運動に動員されるように操作することができれば、大きな傷も移植なしで治癒できる可能性がある。

本研究において、我々は“scratch wound healing”の系を利用して細胞集団の動員機構を解析した。この系では、confluent になった培養上皮細胞層に傷をつけると、残った細胞が傷を埋めようと運動する様子が観察できる。我々はこの系と新たに開発した定量法を用いて、myosin が細胞の動員を負に制御していることを示唆する結果を得た。また、細胞集団の動員を促進することにより創傷治癒を促進できることが示唆された[11]。さらに、一様な細胞を用いた“scratch wound healing”の系においても「先導細胞」「追従細胞」の分化がおきていることを示唆する結果を得た。

結果と考察

我々は試験管内で集団運動をする能力を持つ細胞株 mIMCD3（マウス腎臓上皮由来）を用いて scratch wound healing assay をおこない、細胞の運動をタイムラプス観察した。この系を用いて細胞集団の「動員」を定量するために、我々は下記の方法を開発した。

タイムラプス画像データのうちの任意の 1 コマ **a** と、その 15 分後に撮影されたコマ **b** を選ぶ。**a** 中のあるひとつのピクセル **P** の輝度値を I_a 、また **b** 中の同じ位置の輝度値を I_b とする。これらを用いて、新しい画像 **c** を

$$\mathbf{c} \text{ 中のピクセル } P \text{ の輝度値 } I_c = | I_b - I_a |$$

となるように作製する。

このとき、細胞が動かなかった部分では $I_a = I_b$ であるから、 $I_c = 0$ 。従ってこの部分は画像 **c** 中では黒くなる。一方、細胞が動いた部分では $I_a \neq I_b$ となる点が多いため、白あるいはグレーのシグナルが現れる。

このことにより、細胞が動いていた部分を画像上で白く浮かび上がらせることができる。撮影された全てのコマについてこの操作をおこなうと、細胞が次々と集団運動に動員される様子が、細胞層内を伝播する「白い波」として観察できる (Fig. 1 および添付論文[11]参照)。

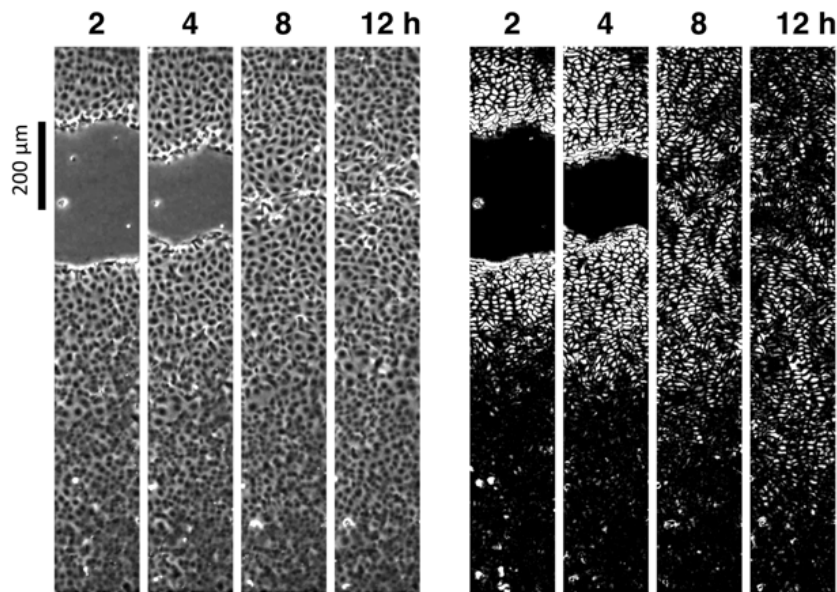


Fig. 1. A confluent monolayer of cultured epithelial cells was wounded and subjected to time-lapse imaging.

Left, Phase contrast images at each time point indicated.

Right, The moving cells are highlighted using our method. For detail, see the text and the attached paper [11].

この方法を用いて我々は下記の知見を得、添付した論文に発表した[11]

1. 細胞の動員には上限があり、「白い波」は有限な距離までしか伝播しないこと
2. ミオシンが細胞の動員を負に制御していること
3. 細胞層先端の前進と傷の後方における細胞の動員は独立の機構によって制御されていること
4. 細胞の動員を促進することで、大きな傷の治癒を促進できる可能性があること

さらに我々は、「白い波」の伝播パターンを変化させる薬剤の探索をおこない、下記の結果 (論文未発表) を得た。

1. タンパク質合成阻害剤 cycloheximide (CHX) で細胞を処理し細胞層の運動を撮影、「白い波」画像を作成すると、創傷作成後 1 時間までは「白い波」すなわち細胞の動員がコントロールと同程度におこり、傷から約 5 - 10 列程度の細胞が運動を開始したことが示される。しかしその後速やかに細胞層全体が黒くなる。これは一度運動を始めた細胞が停止することを示す。
2. 炎症抑制剤として使用されるが、創傷治癒を阻害する副作用を持つことが知られている薬剤 dexamethasone (DEX) で細胞を処理すると、創傷作成後 1 時間までは細胞の動員がコントロールと同程度におこる。その後「白い波」は消失しないものの、その伝播速度は顕著に減少する。これは新たな細胞の集団運動への動員が阻害されていることを示唆する。

以上の結果から、我々は次のモデルを考えている。

1. 細胞層に傷ができると、傷から 5 - 10 列程度の細胞が運動を開始する。この運動にはタンパク質の新規合成は不要であるが、これらの細胞がひとたび始めた運動を継続するため、及びさらに後列の細胞が運動を開始するためにはタンパク質の新規合成が必要である。
2. 上記 1 の運動で傷が塞がらない場合、より傷から遠い細胞の動員がおこり、これらの細胞が新たに集団運動に参加する。この動員は DEX によって阻害される。

このように「傷から 5 - 10 列までの細胞」と「それらよりも傷から遠い細胞」とでは薬剤に対する感受性が異なっており、傷をつける前には一様であった細胞が、創傷によって少なくとも 2 種の集団に「分化」したことが示唆された。我々は、前者が scratch wound healing における「先導細胞」、後者が「追従細胞」であり、両者間の情報伝達により、細胞層全体の運動が調整されているのではないかと考えている。

上記「追従細胞」の動員はDEXによって阻害されるが、DEXは複数の遺伝子の発現を阻害することが知られている[12]。DEXの標的遺伝子によってコードされるタンパク質が細胞層の運動において果たす役割を解析することで、今まで全く不明であった「先導細胞」と「追従細胞」のコミュニケーション機構および、それによって実現される細胞集団の協調的運動の基本メカニズムが明らかになるのではないかと期待される。

参考文献

1. Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *10*, 445–457.
2. Lecaudey, V., and Gilmour, D. (2006). Organizing moving groups during morphogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* *18*, 102–107.
3. Rorth, P. (2009). Collective Cell Migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *25*, 407–429.
4. Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C.S., and Sahai, E. (2009). Localized and reversible TGF beta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nature Cell Biology* *11*, 1287–1296.
5. Vitorino, P., and Meyer, T. (2008). Modular control of endothelial sheet migration. *Genes & Development* *22*, 3268–3281.
6. Somogyi, K., and Rorth, P. (2004). Evidence for tension-based regulation of *Drosophila* MAL and SRF during invasive cell migration. *Developmental Cell* *7*, 85–93.
7. Haas, P., and Gilmour, D. (2006). Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Developmental Cell* *10*, 673–680.
8. Valentin, G., Haas, P., and Gilmour, D. (2007). The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Curr. Biol.* *17*, 1026–1031.
9. Omelchenko, T., Vasiliev, J.M., Gelfand, I.M., Feder, H.H., and Bonder, E.M. (2003). Rho-dependent formation of epithelial “leader” cells during wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 10788–10793.
10. Singer, A.J., and Dagum, A.B. (2009). Current Management of Acute Cutaneous Wounds. *New England Journal of Medicine* *359*, 1037–1046.
11. Matsubayashi, Y., Razzell, W., and Martin, P. (2011). ‘White wave’ analysis of epithelial scratch wound healing reveals how cells mobilise back from the leading edge in a myosin-II-dependent fashion. *Journal of Cell Science* *124*, 1017–1021.
12. Stojadinovic, O., Lee, B., Vouthounis, C., Vukelic, S., Pastar, I., Blumenberg, M., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2007). Novel Genomic Effects of Glucocorticoids in Epidermal Keratinocytes. *J. Biol. Chem.* *282*, 4021–4034.