



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on three dimensional morphogenesis of epithelial cells on the viscous substrata : Involvement of substrate deformation induced by cellular traction forces [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	今井, 美沙子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12055号
Issue Date	2015-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60589
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Misako_Imai_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 今 井 美 沙 子

審査担当者	主 査	教 授	芳 賀 永
	副 査	教 授	綾 部 時 芳
	副 査	特任教授	佐々木 直 樹
	副 査	助 教	水 谷 武 臣

学 位 論 文 題 名

Study on three dimensional morphogenesis of epithelial cells on the viscous substrata:

Involvement of substrate deformation induced by cellular traction forces

(培養基質の粘性が上皮細胞集団の 3 次元形態形成に与える影響に関する研究:

基質把握力による培養基質の変形の関与)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

上皮細胞集団 (以下, 細胞集団) の 3 次元形態形成は, 様々な生命活動において重要な現象である. *In vivo* における 3 次元形態形成は, シート状の細胞集団が変形することによって進行する. 例としては, 脳にみられるしわや小腸の絨毛などが挙げられる. 発生学や幹細胞研究の進歩により, 組織再生を視野に入れた多細胞集団の形態形成に関する研究が多く行われている.

細胞外基質 (以下, ECM) の物理的な性質 (以下, 物性) が, 細胞集団の 3 次元形態形成に重要な因子であることが報告されている. ECM の物性とは, 粘弾性や次元のことをいう. 芳賀らは, 細胞集団を軟らかいコラーゲンゲル基盤上で培養すると, 一方向へと協調的に運動することを明らかにした (Haga *et al.*, 2005). ゼブラフィッシュの発生過程における形態形成には, 基底膜の弾性が重要であることも知られている (Fidler *et al.*, 2014). また近年, ECM の弾性だけでなく, 粘性の重要性も報告されている. ECM の弾性よりも粘性の影響が大きいとき, 細胞集団の一方向への集団運動が促進されることが明らかになった (Murrell *et al.*, 2011). さらに, 粘性をもつ基質に取り囲まれた細胞集団は, 3 次元形態が変化するということがコンピュータシミュレーションにより明らかとなった (Okuda *et al.*, 2014). しかしながら, 生細胞を用いた研究において, 3 次元形態形成と基質の粘性との関連はほとんどわかっていない. そこで本研究では, 基質の粘性と細胞集団の 3 次元形態形成との関連を調べることを目的とした. 細胞試料にはイヌ腎尿細管上皮細胞 (MDCK 細胞) を用いた. また, 粘性をもつ培養基質としてマトリゲルを用いた.

まず, 3 種類の異なる粘度をもつマトリゲルを作製した. マトリゲルの粘性を変化させるためにアミノ酸の架橋剤であるゲニピン (GP) を用いた. 我々は, マトリゲルに含まれるタンパク質のアミノ酸残基同士を架橋することによって, マトリゲルの粘性を上昇させることができると仮定した. ゲニピン溶液をゲル化前のマトリゲルに以下の濃度 (0, 0.25, 0.50 mM) で混合し, ゲ

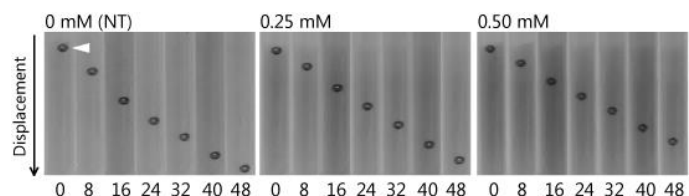


図 1. ステンレスボール落下実験の経時観察

下の数字は観察開始時を 0 分としたときの相対時間を表す.

白矢尻はステンレスボールを表す.

と仮定した. ゲニピン溶液をゲル化前のマトリゲルに以下の濃度 (0, 0.25, 0.50 mM) で混合し, ゲ

ル化させた（以下、NT-Matrigel, 0.25-GP-Matrigel, 0.50-GP-Matrigel）。

マトリゲルの粘性を測定するために、マトリゲルにステンレスボールを落下させる実験（ステンレスボール落下実験）をおこなった。マトリゲル中を移動するステンレスボールの移動量を経時観察により観察し（図 1），計算によって粘性係数を求めた。その結果，0.25-GP-Matrigel と 0.50-GP-Matrigel の粘性係数は，NT-Matrigel と比較してそれぞれ 1.18 倍，1.86 倍高かった。これらの結果より，マトリゲルの粘性がゲニピンの濃度依存的に上昇することが明らかとなった。

次に細胞集団を粘性の異なるマトリゲル上で培養し，免疫蛍光染色法を用いて細胞形態を観察した。その結果，NT-Matrigel 上ではチューリップハット様の 3 次元形態を形成することが明らかとなった。また，粘性の上昇とともに平らなシート様の形態を示すこと，細胞周辺にあるマトリゲルの変形が小さくなることが分かった。この結果より，粘性をもつ基質上における 3 次元形態形成には，周囲の基質の変形が必要であることが示唆された。

このマトリゲルの変形は，細胞が生み出す力（基質把握力）によるものであると考えた。基質把握力は，アクチン細胞骨格とミオシン II モータータンパク質からなるストレスファイバーの収縮力によって生じる。ミオシン調節軽鎖（MRLC）のリン酸化が亢進するほど，細胞はより大きな収縮力を生み出すことが知られている。そこで NT-Matrigel 上の細胞に，ミオシン II の活性阻害剤である Blebbistatin と，MRLC のリン酸化キナーゼの阻害剤である Y-27632 を作用させて基質把握力を抑制し，細胞集団とマトリゲルの形態変化を調べた。その結果，細胞集団は平らなシート様の形態を示し，基質の変形は抑制された。

次に基質把握力の分布を観察するために，一重もしくは二重リン酸化 MRLC（それぞれ 1P-MRLC, 2P-MRLC）の局在を免疫蛍光染色法により観察した。観察の結果，1P-MRLC および 2P-MRLC はともに細胞塊の外縁部に局在していた。また，Y-27632 を添加することによって，これらの局在は消失し，細胞集団の形態は平らなシート様を示した。これらの結果から，細胞シートの外縁部へのリン酸化 MRLC の局在は，マトリゲル上における 3 次元形態形成に必須であることが示唆された。

以上の結果より，基質把握力によって引き起こされる粘性基質上の 3 次元形態形成に関してモデルを提案する（図 2）。マトリゲルのような粘性をもつ基質上において，細胞集団はチューリップハット様の形態を示した。さらに基質の粘性が上昇すると，平らなシート様の形態を示した（図 2a）。このとき，タンパク質の架橋構造の多さが基質の粘性に寄与することもわかった（図 2a，■）。また，細胞シートの外縁部において基質把握力が発揮されていた（図 2b，●）。この細胞塊の中心に向かって発揮される基質把握力によってマトリゲルは変形し，その結果細胞集団は 3 次元形態を形成した。したがって，細胞集団の 3 次元形態形成には，1) 基質の粘性，2) 基質が変形すること，そして 3) MRLC のリン酸化によって生じる基質把握力が重要であることが示唆された。

これを要するに，筆者は，細胞集団の 3 次元形態形成を制御するパラメーターとして粘性という要素を発見したものであり，再生医療における生体外での組織形成に対して大きく貢献するものがある。

よって筆者は，北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。

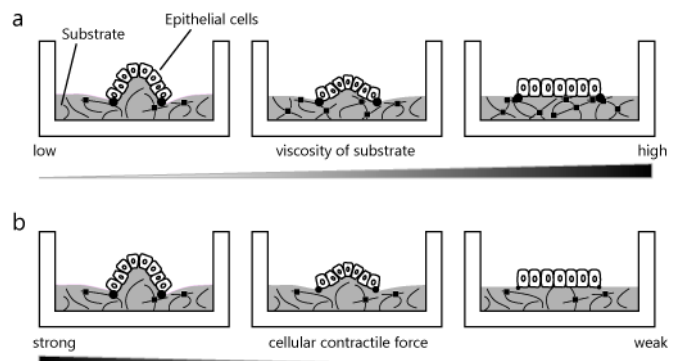


図 2. 3 次元形態形成に関するモデル

(a) 基質の粘性と細胞形態との関係，(b) 基質把握力と細胞形態との関係。黒線は基質に含まれるタンパク質の繊維を表す。

●は基質把握力，■は繊維の架橋点を示す。