

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960517

氏名 川上 巧

川上 巧

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：シンガポール（国名：シンガポール共和国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

組織造形のための「アポトーシス力」：力の発生・伝播のメカニズム解明

3. 派遣期間：令和元年 5 月 13 日～令和 3 年 4 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名：National University of Singapore

部局名：Mechanobiology institute

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

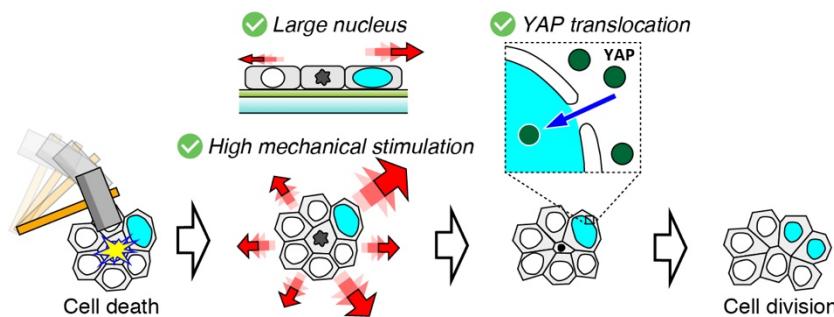
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

研究成果の概略

生体には、細胞死と細胞分裂のバランスを調節することで、組織内の細胞数を一定に保持する仕組みが備わっている。もし、細胞数の調節が崩壊すると癌のような病的な状態を引き起こす可能性がある。細胞が死ぬと、死細胞は組織外へ排除されるとともに、組織内の細胞数を維持するために、その周囲細胞を刺激して細胞分裂を促す。その結果、失われた細胞のスペースは新たに誕生した細胞に置き換わり、組織が修復される。この仕組みは「代償性増殖」と呼ばれており、40年以上も前に報告されている。代償性増殖は組織の発生、再生、創傷治癒、および癌の制御において広く利用されている。

細胞死によって失った細胞を補うには少数の細胞分裂で十分である。しかし、分裂する細胞をどのように限定しているのか不明であった。本研究では、組織内で不均一に起こる代償性増殖が、Yes-Associated Protein (YAP) を介したメカノトランスダクションの空間的な不均一性に起因していることを見出した (Fig. 1)。このメカノトランスダクションの不均一性は、組織が元々持つ細胞核サイズの不均一な分布と、細胞死が起きる時に発生する機械的な力の不均一な伝播パターンによって規定される。力学的な観点からの本研究の発見は、現在までの代償性増殖に対する生化学的な理解を補足しつつ、組織の恒常性を正確に維持するためのメカニズムに新たな視点をもたらした。本研究の成果は日本発生生物学会 (The JSDB 53rd meeting, 2020/5/21)、From Molecules to Organs: The Mechanobiology of Morphogenesis (2020/10/28-30) にて報告した。また現在、論文投稿中にある。

Figure 1



研究の背景

生体内には、不必要的細胞や、歳をとった細胞、ダメージを受けた細胞などを排除するアポトーシスと呼ばれるプロセスが存在する。このプロセスは組織や臓器の機能を正常に維持するために機能する。例えば、上皮組織は内部組織を外界から保護し、透過物質の取捨選択をするなどのバリア機能を担う (Marchiando et al., 2010)。その機能を確実に維持するために、正常に機能しない細胞をアポトーシスにより取り除き、続いてその周辺細胞の分裂を促す。これにより、不要になった細胞は新たな細胞へと置き換わり、組織内の正常な細胞数と構造が回復することで上皮組織のバリア機能が保持される。

アポトーシスの後に周辺細胞で起こる細胞増殖は、アポトーシス誘導性の「代償性増殖」と呼ばれ (Fan, Bergmann, 2008; Kondo et al., 2006; Perez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004)、最初に Haynie と Bryant によって発見された (Haynie & Bryant, 1977)。彼らはショウジョウバエの成虫原基が X 線のダメージにどのように反応するか調べた。幼虫の羽原基へ X 線を照射したところ、60% の細胞が死んだにも関わらず、その後、残った羽原基は細胞数を回復し、羽は正常な形とサイズまで成長した。これは、失った細胞を補うために、細胞増殖を促すメカニズムが存在することを示唆している。それ以来、代償性増殖のメカニズム、特にアポトーシス細胞からの分泌性の増殖シグナルの役割に関して調査されてきた (Fogarty & Bergmann, 2015)。例えばその分泌分子として、ショウジョウバエでは Dpp や Wg (Fan & Bergmann, 2008; Morata et al., 2011; Pérez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004; Smith-Bolton et al., 2009)、マウスや哺乳類の培養細胞では caspase-3 活性によって生産される炎症誘発性の代謝物が発見され (Castellone et al., 2009; Li et al., 2010)、そのどれもが細胞増殖を誘導した。

しかしながら、代償性増殖への生化学シグナルの寄与には不明瞭な点が残されている。組織内の細胞数を一定に保つために、代償性増殖はごく少数の細胞にしか起きないが、本質的に均一に伝達される生化学シグナル (Janmey & Miller, 2010) ではこの空間的に不均一な細胞増殖の仕組みを説明しきれていない。生化学シグナルに加えて、増殖する細胞数を限定するための仕組みが他に存在する可能性がある。本研究では、アポトーシスのもうひとつの側面である機械的なプロセスに焦点を当て、空間的に不均一な代償性増殖の起源について調査した。

研究結果

(1) アポトーシス後に起こる周辺細胞への力学刺激の伝播

アポトーシスは組織に力を発生させるアクティブなプロセスでもある。よく特徴付けられている現象として、上皮組織によるアポトーシス細胞の組織外への押し出しが挙げられる (Rosenblatt et al., 2001; Teng et al., 2017)。この時に、アポトーシスが周辺細胞へ力学的にどのような影響を及ぼすのか調べるために、MDCK 細胞株 (Madin-Darby Canine Kidney cells) を培養した単層上皮を用いて (Fig. 2A, B)、牽引力顕微鏡技術により組織の力学環境の変化を定量した。近年、細胞-細胞外マトリックスを介した機械的シグナル伝達の重要性が示唆されており (Janmey and Miller, 2010)、その力を計測する牽引力顕微鏡が広く利用されている。本研究では、変形可能な polydimethylsiloxane (PDMS) ゲルで構成される基質の上に蛍光ビーズを塗布し、その上で MDCK の上皮組織を培養し、任意の細胞に UV レーザーを当てることでアポトーシス性の細胞の押し出しを誘導した (Fig. 2A)。アポトーシス誘導後、基質の変形がビーズの変位として波状に伝播される様子が観察された。基質上のビーズの動きを Particle image velocimetry (PIV) で解析した結果、最初、ビーズの動きは死細胞から外向きに向かい (Fig. 2C, t=5min)、死細胞に最も近い細胞はより大きいビーズの変位を経験することが分かった (Fig. 2H)。その後、外向きの伝播に加えて、死細胞の付近で内向きのビーズの変位が発生する。

基質の変形を定量的に理解するために、放射方向のビーズの変位を示すカイモグラフをプロットした (Fig. 2D)。外向きと内向きの動きの間に一時的に静的な領域が存在し (Fig. 2D, 白色)、この領域は時間の経過とともにアポトーシス細胞から離れる。静的領域を基質変形のひとつの特徴として規定し、1 時間で静的領域が死細胞から半径約 20 μm 以上も進むことが分かった (Fig. 2G)。

基質の変形の原因を探るために、組織を Rac1 阻害剤の NSC23766 で処理して、葉状仮足のクローリングを阻害した。アポトーシスが起きると、隣接細胞で葉状仮足が形成され、クロールを伴う細胞移動により死細胞の押し出しを促進する。この時、細胞移動とは反対方向に基質を変形させることが知られている (Kocgozlu et al., 2016)。当初は NSC23766 により基質の変形が抑えられると考えたが、予想に反して、アポトーシス時の基質の変形は増加し、静的領域は 1 時間で半径約 40 μm に達した (Fig. 2E-G)。明視野画像から組織の変形を調べた結果、基質の変形と同様に NSC23766 処理の有無に関わらず、周辺細胞は死細胞から離れる方向へ変形した (Fig. 2I-J)。これらの結果から、アポトーシス細胞周辺の基質と組織の外向きの変形は、死細胞の押し出しのために起こる周辺細胞の移動ではなく、上皮組織のプレテンションの解放に起因すると推測した。上皮組織内の細胞同士はタイトに接着しており、互いを引っ張り合うプレテンションが常に存在する。これまでの研究で、アポトーシス後のショウジョウバエ上皮 (Teng et al., 2017) および MDCK 細胞 (Thomas et al., 2020) で、カスパーゼ-3 が活性化された後、細胞間結合分子の E-カドヘリンがアポトーシス細胞と隣接細胞との間の接合部の解離、および組織のプレテンションの解放を引き起こす (Teng et al., 2017)。

死細胞の周辺組織の弛緩は上皮組織のプレテンションの解放に起因するのか検証した。NSC23766 処理の有無の条件下で、細胞間の結合部をレーザー切断し、結合部にかかるプレテンションを比較した (Fig. 2M)。NSC23766 で処理した上皮組織の方が、処理していないものより組織の接合部の張力が高かった。この結果は、NSC23766 処理で波の伝播が拡大したことと一致しており (Fig. 2C-J)、より大きなプレテンションを持つ組織はより大きな組織変形を引き起こすポテンシャルを持つことを意味している。また、波の発生時に、細胞接着班と基質上のビーズの相対位置が劇的に変化する事はない。これは組織が基質上を滑らないことを意味している。以上より、アポトーシス時に死細胞と近隣細胞の結合部が乖離して組織内のプレテンションがリリースされることで、死細胞から組織が離れる（外向きの変位）と考えられる。

放射方向のビーズの変位を示すカイモグラフは、死細胞へ向かう内向きの動きも示した (Fig. 2C-F, 青色)。この現象は、周辺細胞のアクトミオシンケーブルの収縮と変形が一部関与すると予想される。アポトーシス時に死細胞において、収縮性のアクトミオシンケーブルが隣接細胞との境界面に形成され、細胞が収縮し、隣接細胞に張力が作用する。その後、隣接細胞において死細胞との境界面にアクトミオシンケーブルが形成され、巾着が閉まる要領でアポトーシス細胞の押し出しが起きる (Kuipers et al., 2014; Rosenblatt et al., 2001)。ビーズの内向きの動きは外向きの動きが最初に観察されてから約 5–10 分範囲内で発生し、このタイミングはアクトミオシンケーブルの形成と収縮開始と一致する (Teng et al., 2017)。死細胞に対するビーズの内向きと外向きの動きは同時期に存在するため、周辺細胞はその双方向の力によりストレッチされている可能性がある。アポトーシスが起きてから 30 分後の細胞の歪みを計測すると、死細胞に最も近い細胞は 15 % 以上ストレッチされており、死細胞から遠い細胞と比較して顕著に大きな変化を示した (Fig. 2K-L)。以上より、死細胞の周辺細胞は組織の弛緩（外向き）とアポトーシス性のアクトミオシンケーブルの収縮（内向き）により引張ストレッチを受けると考えられる。

(2) アポトーシス後に少数の周辺細胞が YAP の核移行と細胞周期の進行を示す

近年、機械的な力を感知した細胞は生化学的なプロセスを介して細胞増殖を誘導することが発見されている。Hippo 経路のエフェクターである Yes-Associated Protein (YAP) はその仲介役となる因子の一つである (Dupont et al., 2011)。機械刺激により、活性型の非リン酸化 YAP は細胞核へ移行

し、細胞増殖を含む下流の転写プログラムを促進する（Elosegui-Artola et al., 2017）。本研究において、周辺細胞のストレッチがさらなる生化学シグナルに影響するか調べるために、YAP-GFP を安定的に発現する MDCK 細胞を用いて YAP の局在を調べた。その結果、少数の周辺細胞において、アポトーシスから 1~2 時間以内に YAP の核移行が観察された (Fig. 3A-B)。この結果は、周辺細胞において細胞増殖を促す可能性のある YAP がアポトーシス後に活性化されたことと、その活性が組織内において空間的に不均一であることを示している。

アポトーシス性の YAP の活性化をさらに理解するために、MDCK-FUCCI 細胞で構成される上皮組織を用いて、周辺細胞の細胞周期の進行をイメージングした。全ての細胞の細胞周期を G1 期に同期させた状態から実験を開始した。アポトーシスが観察されてから 6-7 時間で少数の周辺細胞が G1 期から S 期へ移行し (Fig. 3C-E)、16-18 時間経過して細胞分裂を起こした (Fig. 3H)。また、死細胞から最も近隣の細胞とその次に近い細胞は高い分裂の確率を持ち、それよりも遠くにある細胞は低い確率を示した (Fig. 3C-G)。これらの特徴はアポトーシスが発生していない領域における細胞分裂の特徴とは異なる (Fig. 3F-H)。

(3) 力の伝播と核のサイズの空間的な不均一性が周辺細胞の細胞分裂を限定する

細胞分裂の空間的な不均一性を何が規定するのか明らかにするために、2 つの要因に着目した。1 つ目は、ビーズ変位（基質変形）の空間的な不均一性である (Fig. 2C, 4A)。ビーズの変位が大きく、よりストレッチされた細胞は結果として細胞分裂を起こす可能性が高まることを発見した (Fig. 4A, 4D)。このことから、アポトーシス後の周辺細胞の細胞周期の進行と、ビーズ変位の程度に相関があることが示唆される。2 つ目は、組織内に存在する細胞核のサイズが空間的に不均一なことがある。アポトーシス開始時に、大きな核を持つ細胞がその後に細胞分裂を優先して起こす傾向にあることを発見した (Fig. 4B)。

不均一に発生する代償性増殖には、ビーズの変位と核のサイズの不均一性の両方が関与するのか明らかにするために、ビーズ変位と核サイズと YAP の分布を同時に観察した。大きな核を持ち、大きなビーズ変位を経験した細胞のみが YAP の核移行を示した (Fig. 4C-D)。対照的に、大きな核を持つ細胞が小さなビーズ変位を経験した場合や、ビーズの変位に関係なく小さな核を持つ細胞の場合は YAP の核移行が観察されなかった。さらに、細胞の歪みと核サイズと細胞周期進行の関係を MDCK-FUCCI 細胞を用いて計測した結果、大きな核を持ち、大きな歪みを経験した細胞が優先して細胞分裂を起こす傾向にあることを発見した (Fig. 4E)。

細胞の歪みと核のサイズが YAP の核移行と細胞増殖にどのように関与するのか理解するために、核膜孔複合体 (NPC) に着目した。NPC は張力依存的に YAP を細胞質から核へ移送する構造物として知られている (Elosegui-Artola et al., 2017)。異なるサイズの核に対して NPC の数を計測したところ (Fig. 4F-G)、核のサイズに伴って NPC の数が増加することを発見した。核が大きいことで、機械的なストレッチによる YAP の核移行を助けていることが予想される。以上より、アポトーシス細胞周辺の空間的に不均一な細胞増殖は、空間的に不均一なプレテンションのリリース（これは細胞の歪みを誘導する）と、空間的に不均一な核サイズにより規定されると結論づけられる。

(4) 代償性増殖は基質を介した力学伝播を要する

これまでに、代償性増殖にはアポトーシス細胞からの生化学シグナルが寄与することが示されてきたが (Fogarty & Bergmann, 2015)、それに加えて機械的な力がどの程度の役割を果たすのか理解する必要がある。アポトーシス細胞と周辺細胞との間の生化学的な相互作用を変化させることなく、力の伝播の度合いを変化させることで、機械的な力の役割を検証した。まず、組織内のプレテンションを減少させるために、マイクロコンタクトプリンティング技術を利用してミニ組織を作成した (Fig. 5A)。理論的に、組織のサイズが小さくなると、細胞同士が引っ張りあう力の総和が減少し、組織内のプレテンションは小さくなる。100 μm 径のミニ組織でビーズ変位が極小になり (Fig. 5B-C)、この状況下で、死細胞の周辺細胞において、核のサイズに関係なく YAP の核移行は観察されなかった (Fig. 5D-F)。

さらに、生化学的な相互作用を変化させない条件下で、基質の変形を極小にするために、基質がガラスディッシュに強く結合する APTES 処理を施した (Fig. 5G)。線形弾性理論 (Lou et al, 2021)に基づく理論モデルは、基質とガラスディッシュの結合を強くすることで力の伝播を抑えると予測している。ミニ組織の結果と同様に、ビーズ変位が極小になり (Fig. 5H-I)、死細胞の周辺細胞において核のサイズに関係なく、YAP の核移行は観察されなかった (Fig. 5J-L)。さらに、周辺細胞の細胞周期の進行も観察されなかった (Fig. 5M-N)。以上の結果から、基質を介した周辺細胞の機械的な力の作用が、YAP の核移行、細胞周期の進行、細胞分裂に必要であると結論づけられる。

議論

本研究は、組織中の細胞数の恒常性を維持するために、なぜ、アポトーシス細胞の周辺にある少数の細胞だけが分裂するのかという長らく疑問とされた問題を明らかにした (Fig. 1)。アポトーシスのプロセスに反応して起こる空間的に不均一な細胞分裂は、YAP の核移行で特徴付けられる不均一なメカノトランスダクションが関係しており、細胞の歪みの程度と核サイズの組み合わせに起因する。さらに、周辺細胞におけるメカノトランスダクションが代償性増殖に必要かどうかは、大きな問題のひとつであった。細胞間の生化学的な相互作用を変化させることなく機械刺激を抑制することで、メカノトランスダクションと細胞分裂が消失した (Fig. 5A-N)。これらの結果は、代償性

増殖において、これまで見過ごされてきた基質を介した力の伝播が重要な役割を果たすことを示した。近年、組織への力学的な影響が細胞増殖に影響することが発見され (Streichan et al., 2014; Uroz et al., 2018)、なかでも、上皮組織全体の細胞間および細胞-細胞外マトリックスを介した機械的シグナル伝達の重要性が示唆されている (Janmey and Miller, 2010)。実際、培養上皮組織をモデルに用いた研究で、細胞を播種した基質ごと上皮組織を伸展すると細胞増殖が増加し、それとは逆に組織を圧縮すると細胞周期が停止することが発見されている (Streichan et al., 2014)。さらに、組織に発生する力を測定し細胞周期との関係を調査した研究で、細胞間および細胞-細胞外マトリックス間に発生する張力が細胞周期の進行を予測する良い因子であることが発見された (Uroz et al., 2018)。このように機械的な力が細胞増殖の調節に関与していることが分かってきた。

代償性増殖において、以前に示されたようにアポトーシス細胞から分泌された増殖促進シグナルは重要な役割を果たす (Fan & Bergmann, 2008; Morata et al., 2011; Pérez-Garijo et al., 2004; Ryoo et al., 2004; Smith-Bolton et al., 2009; Castellone et al., 2009; Li et al., 2010)。本研究の発見は、アポトーシス誘発性の代償性増殖に対する現在の生化学的な理解を補填するものであり、組織がその恒常性を正確に維持するメカニズムにさらなる洞察をもたらした。こういったアポトーシス誘発性の代償性増殖は乳がんやメラノーマ、グリオーマ細胞などの癌で広く発見されている (Donato et al., 2014; Kurtova et al., 2015; Mao et al., 2013)。機械的な力に焦点を当てた本研究の新たな提案は恒常性だけでなく腫瘍病理学の理解に貢献できると期待される。

Figure 2

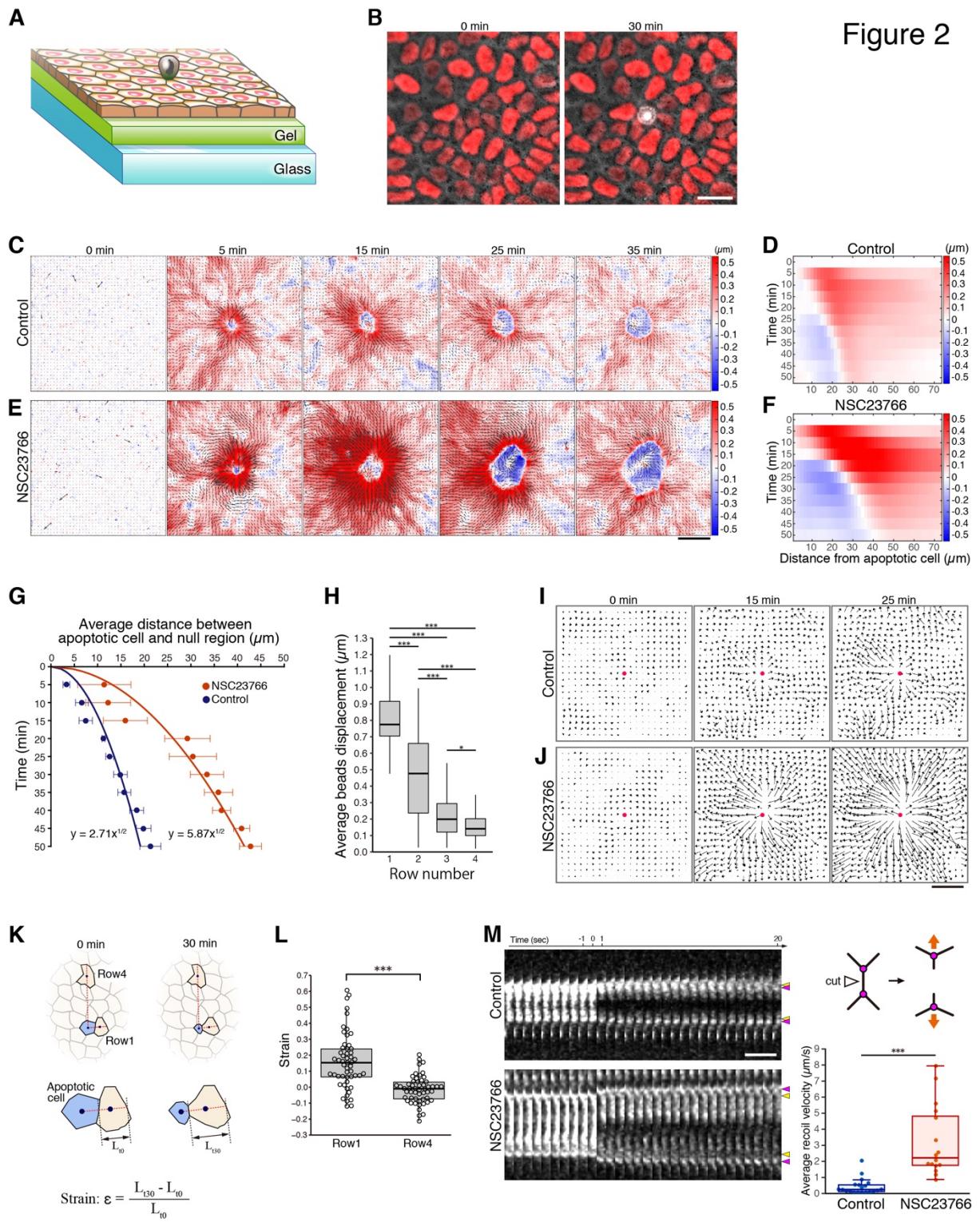


Figure 3

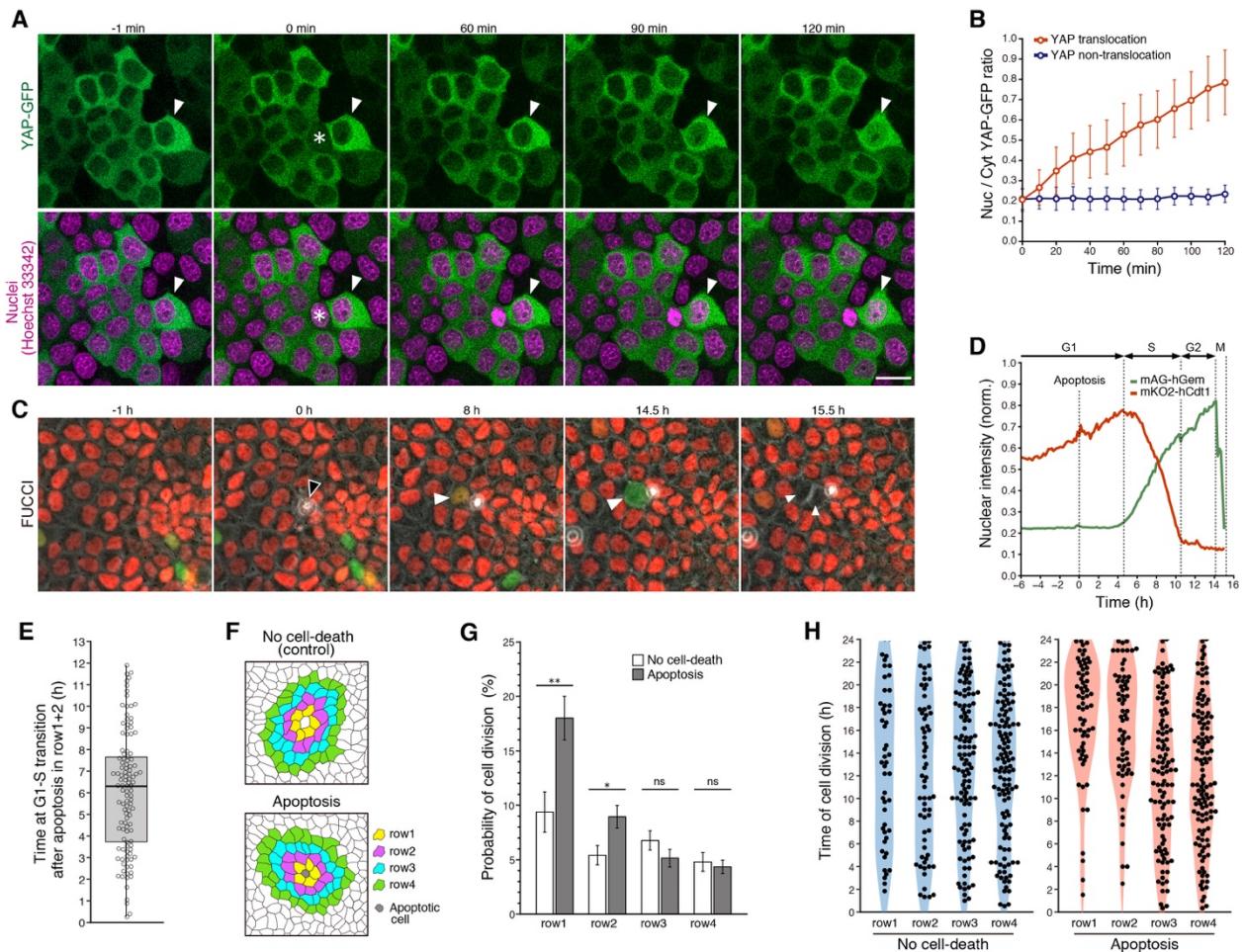


Figure 4

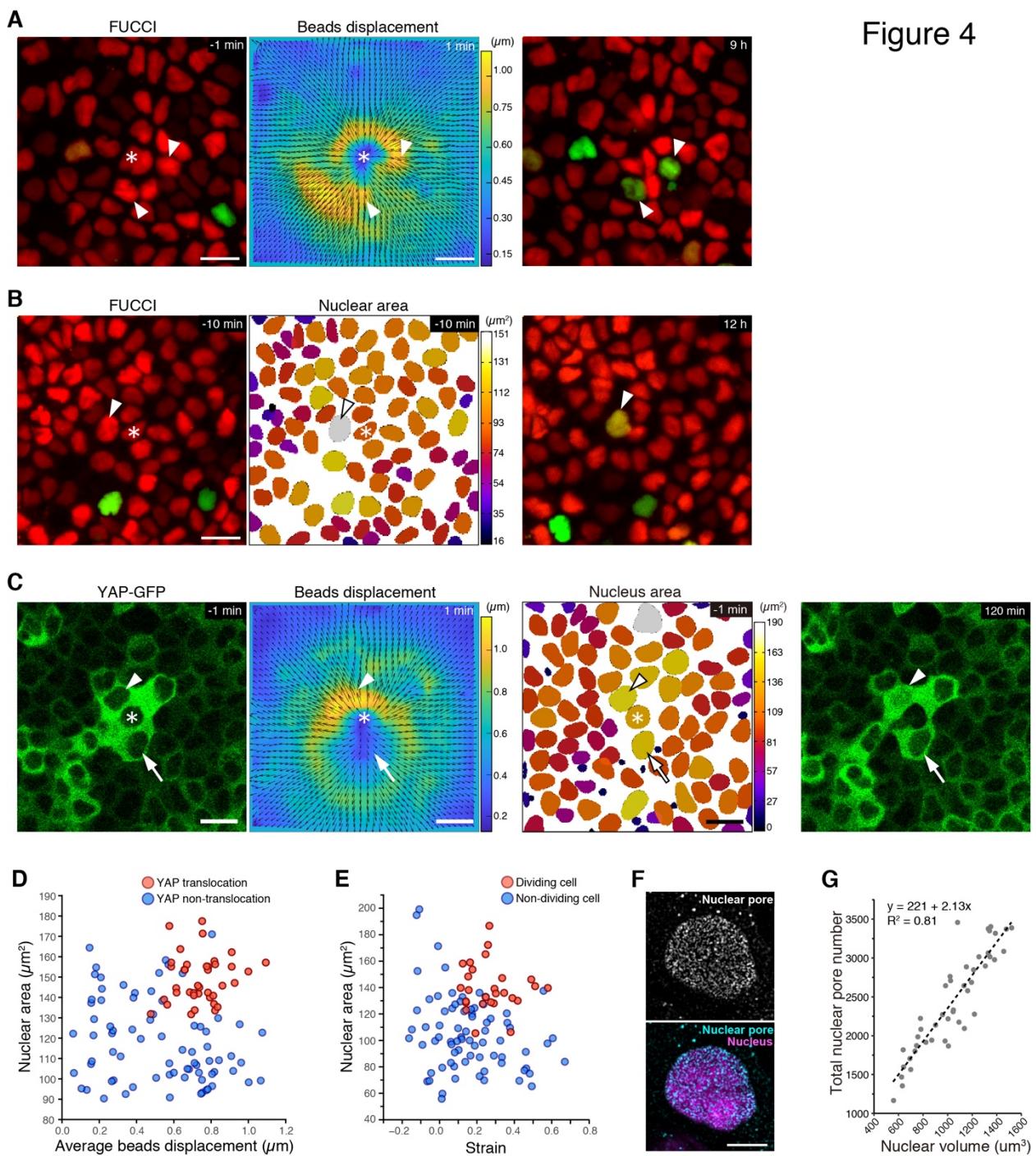


Figure 5

