

オウ グンホウ

氏名	WANG JUNFENG		
学位の種類	博士（ナノメディシン科学）		
学位記番号	博第1062号		
学位授与の日付	平成28年12月21日		
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当 課程博士		
学位論文題目	アクチンと焦点接着斑のダイナミクスに関する研究 —基板接着過程を中心とした解析— (A study on actin and focal adhesion dynamics focusing on adhesion process of the cell)		
論文審査委員	主査	教授	築地 真也
		教授	山下 啓司
		教授	出羽 毅久
		教授	山中 淳平 (名古屋市立大学)
		教授	松本 健郎 (名古屋大学)

## 論文内容の要旨

細胞が正常に機能するためには、血球前駆体細胞やリンパ球などの稀な例を除き、細胞外基質に接着して一定の形態を保たなければならない。例えば、トリプシンで剥がした細胞をフィブロネクチンでコートしたガラス基板に播種すると、細胞は速やかに基板に接着し始め、伸展して大きくなる。基板上に大きく伸展して、安定的に付着した細胞では、細胞骨格のひとつであるアクチンフィラメント (AF) が張力を出して焦点接着斑 (FA) というタンパク質の複合体を介して基板に接着していることが明らかとなっている。このような安定付着状態での細胞内の AF と FA の形態、張力などは多くの研究で調べられている。しかし、剥離細胞が丸まった状態から基板に接着・伸展して安定になる過程において、細胞がどのようにして基板を認識して接着を始めるのか、接着後なぜ伸展して大きくなるのかという根本的な問題は未だに殆ど判っていない。このような間に答えるためには、基板付着時の AF や FA の動態を詳細に調べる必要がある。そこで本研究では、この接着伸展過程に着目し、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を対象として、基板接着に最も関連する AF と FA の形態や張力の時間・空間のダイナミクスを調べた。

本論文は6章で構成されている。

第1章は序論であり、本研究の基礎となる細胞の構造、細胞の基板接着過程、細胞張力の計測法について論じるとともに、本研究の目的と概要を述べた。

第2章では、基板接着過程におけるアクチンと細胞核の形態変化を付着開始後任意の時間で固定し

た試料で観察した。その結果、細胞の投影面積は播種後 24 時間までほぼ単調に増加したが、細胞の形態は 1 時間まで丸いままであり、その後、徐々に長細くなった。アクチンに関しては、最初 (0-3 h)、細胞核を均等的に覆った厚いアクチン層が時間と共に基板接着側から薄くなり、細胞上部のアクチン凝集塊 (actin aggregate, AA) と底部周辺の dense peripheral band (DPB) に変わった。上部の AA が徐々に小さくなって消失し、最終的に細胞上部の AF に変わり、下部の DPB が細胞底部の AF に変わると考えられた。この接着伸展過程で、細胞核の高さは時間と共に減少した。これは細胞の投影面積の拡大とともに DPB が伸展して細胞膜を牽引し、細胞膜からの圧縮によって核が圧迫されたためと考えられた。その後 (6-24 h)、細胞核の上の AF の本数が増え、核の高さが更に減少した。これは増加した AF がより大きな張力を出して細胞核を押し付けたためと考えられた。細胞形態が長細くなった理由も AF 本数の増加が関係している可能性を考えた。また、細胞核の上下の AF の形態、配向と本数に違いが見られたことから、細胞核上下の AF に機能上の違いがある可能性を指摘した。

第 3 章では、前章同様に固定細胞で基板接着過程における FA の形態変化を解析した。播種後 60 分まで細胞面積と FA の形態 (FA の大きさ、数、総面積) は連続的に増加した。その後も細胞面積は増加を続けたのに対し、FA 形態は複雑に時間変化し、大きさによる違いもあった。また、核直下の FA は核直下外と比べ、全期間に亙り小さかった。密度は 6 時間以降大きくなり、形態は 3 時間以降丸くなった。核直下の FA は主に核と基板を繋いでおり、核直下外の FA は細胞全体と基板を繋いでいると予想される。FA の応答の部位差は部位による FA の機能差によって生じた可能性を指摘した。

第 4 章では、生細胞で基板接着過程の張力変化を調べた。FRET 型細胞張力センサ Actinin-sstFRET-GR を細胞に発現させて経時観察し、基板接着過程の FRET ratio (acceptor と donor の蛍光輝度の比) を計算して細胞内の張力変化を調べた。その結果、播種後 3 時間にわたり細胞投影面積は単調増加するのに対し、細胞底部の張力は 10-120 分の間は減少し、120-180 分では増加した。細胞の周囲領域の張力は拡張しようとするときに高く、縮むときに低かった。細胞周囲の張力変化の程度は内部より大きいこともわかった。細胞周囲の大きな張力変化が細胞伸展の原動力であり、内部の安定した張力は細胞の安定的な接着に役目を果たすかもれない。また、細胞底部の張力は時間とともに減少するのに対し、上部の張力は 60 分まで減少し、その後増加した。これは AA が AF に変わるタイミングとほぼ一致しており、アクチン凝集塊がフィラメントに変わることで張力が上がった可能性が考えられた。

第 5 章では以上の結果を総括的に考察した。基板接着過程で細胞面積は単調増加するのに対し、AF と FA の形態は時空間的に複雑に変化すること、AF 張力の変化も AF の形態変化の特徴に一致していることを指摘し、これらの変化は細胞基板接着時の細胞内部の複雑な挙動を反映していると考えられ、今後は細胞種や基板などの実験条件を変え研究を進めることが必要であるとした。

最後に第 6 章では、本研究で得られた結果をまとめ、これらの成果は細胞の基板接着メカニズムの理解や細胞接着に関連するバイオマテリアルの開発などに役立つことが期待されると結論付けた。

## 論文審査結果の要旨

剥離細胞が丸まった状態から基板に接着・伸展して安定になる過程において、細胞がどのようにして基板を認識して接着を始めるのか、接着後なぜ伸展して大きくなるのかという根本的な問題は未だに殆ど判っていない。このような間に答えるためには、基板付着時のアクチンフィラメントAFや焦点接着斑FAの動態を詳細に調べる必要がある。そこで本研究では、この接着伸展過程に着目し、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を対象として、基板接着に最も関連するAFとFAの形態や張力の時間・空間のダイナミクスを調べており、学術的価値が高い。具体的内容は以下の6章から構成されている。

第1章は序論であり、本研究の基礎となる細胞の構造、細胞の基板接着過程、細胞張力の計測法について詳細に論じている。

第2章では、基板接着過程におけるアクチンと細胞核の形態変化を付着開始後任意の時間で固定した試料で詳細に観察している。その結果、まず細胞核を均等に覆った厚いアクチン層が時間と共に基板接着側から薄くなり、細胞上部のアクチン凝集塊と底部周辺のdense peripheral band (DPB) に変わることで、上部の凝集塊が徐々に小さくなって消失し、最終的に細胞上部のAFに変わり、下部のDPBが細胞底部のAFに変わると考えられること、その後、細胞核の上のAFの本数が増えることなどを見出している。また、細胞核の上下のAFの形態、配向と本数に違いが見られたことから、細胞核上下のAFに機能上の違いがある可能性を指摘している。これらの詳細な観察により、細胞付着過程の形態変化の詳細がかなり明らかとなり、今後の研究に少なからず寄与するものと期待される。

第3章では、固定細胞で基板接着過程におけるFAの形態変化を解析している。播種後60分まで細胞面積とFAの大きさ、数、総面積は連続的に増加したが、その後は、細胞面積は増加を続けたのに対し、FAの大きさなどは複雑に時間変化することを見出した。また、核直下のFAは核直下外と比べ、全期間に亘り小さいことを見出し、これは核直下のFAは主に核と基板を繋いでおり、核直下外のFAは細胞全体と基板を繋いでいるためではないかと予想している。本章の観察により細胞付着過程の形態変化の詳細が更に明らかとなったと言える。

第4章では、FRET型細胞張力センサを生細胞に発現させて経時観察し、基板接着過程のFRET ratioから基板接着過程の張力変化を詳しく調べている。播種後3時間にわたり細胞投影面積は単調増加するのに対し、細胞底部の張力は2時間までは減少しその後、増加すること、周囲領域の張力は拡張しようとするときに高く、縮むときに低いこと、細胞周囲の張力変化の程度は内部より大きいことなどを世界に先駆けて明らかにした。本章の観察により細胞基板付着過程の形態のみならず力変化のダイナミクスが明らかとなり、今後の細胞基板付着過程の理解に重要な知見が得られたと言える。

第5章では以上の結果を総合的に考察しており、基板接着過程で細胞面積は単調増加するのに対し、AFとFAの形態は時空間的に複雑に変化すること、AF張力の変化はAFの形態変化の特徴に一致していることを指摘し、細胞内の形態変化は内部の力変化をよく反映していることなどを指摘している。

最後に第6章では、本研究で得られた結果をまとめ、これらの成果は細胞の基板接着メカニズムの理解や細胞接着に関連するバイオマテリアルの開発などに役立つことが期待されると結論付けた。

以上、要するに、本論文は基板付着過程の細胞形態の変化や張力変化を世界に先駆けて詳細に調べた成果をまとめたものであり、博士論文として十分な価値を有すると判断される。