【論文】

マウス線維芽細胞の方向転換遊走時における 定性的 4 ステップの体系化

Qualitative 4 Steps Schematization of Veering Migration in Mouse Fibroblast Cell

菅原路子(正会員), 小倉章裕(非会員), 劉浩(非会員), 武居昌宏(非会員)

Michiko Sugawara, Akihiro Ogura, Hao Liu and Masahiro Takei

Abstract

Cell migration is believed to be a cyclic process of protrusion of the leading edge, adhesion to the substrate, and generation of traction to move the cell body forward. Actin stress fiber is one of the cytoskeletal structures inside the cell and it is known to be an important protein complex involved in this process. In this study, long-term observation of cell migration was performed by phase contrast microscopy, and we observed veering migration of the cell, i.e., change in direction during cell migration. Based on the time sequence of the cell outline and the trajectory of the centroid of the cell obtained from the time-lapse phase contrast images, mechanism of veering migration could be schematized into 4 steps in which expansion of the cell membrane perpendicular to the direction of migration was included. Such expansion step was not observed during directional migration. In order to understand the underlying molecular mechanism of veering migration, actin stress fibers were observed by laser confocal microscopy and alignment of stress fibers inside the cell in each schematized step of veering migration was discussed.

Key Words

Cell migration, Veering migration, Actin stress fibers, Phase contrast microscopy, Laser confocal microscopy

1. 緒言

動物成体において, 創傷治癒過程における線維芽細胞の移動¹⁾や癌細胞の転移²⁾などに代表される「細胞遊走」は, 生命活動を維持するうえで重要な役割を果たす. 従来, 細胞遊走は, 細胞膜先端部の前方への「突出」ステップ, 細胞膜と細胞外基質との「接着」ステップ, 細胞全体が前方へと移動する「退縮」ステップの 3 つのステップを繰り返すメカニズムであると説明づけられてきた³⁾. この「突出」ステップでは, 細胞骨格タンパクの一つであるアクチンタンパクが, 細胞膜直下に集合し, 数珠状に重合してアクチンフィラメントを形成する⁴⁾. 「接着」ステップでは, 細胞膜貫通型タンパク質であるインテグリン, およびそれに結合する 50 種類以上ものタンパク質が焦点接着斑を形成し, 細胞膜と細胞外基

質との接着を担う. 「退縮」ステップでは, アクチンフィラメントが架橋タンパクによって束化されたストレスファイバが, 細胞の進行方向後部に配向し, それが収縮することにより, 細胞が退縮し前方へと移動する^{5,6)}.

このような背景のもと, 著者のひとりらは, 位相差顕微鏡観察と共焦点レーザ顕微鏡観察を行うことにより, 細胞遊走には, 直進遊走だけではなく, 細胞が位置を変化させず方向転換を行う回転遊走, さらに細胞が進行と共に方向転換を行う方向転換遊走を含めた 3 つの遊走パターンが存在することを明らかにした. 特に, 方向転換遊走については, 詳細なステップの体系化を試みた⁷⁾. しかしながら, 方向転換遊走時には, どのステップがどのタイミングで生じるかについて明らかになっていない.

そこで本研究は, 方向転換遊走をする細胞に対し, 細胞輪郭の時間変化, 輪郭図心の軌跡, およびストレスファイバの配向との関係を明らかにし, 方向転換遊走時の各ステップの詳細を体系化することを目的とする.

2015 年 4 月 15 日受付

2015 年 8 月 12 日掲載決定

千葉大学大学院工学研究科, 〒263-8522 千葉県千葉市
稲毛区弥生町 1-33

Graduate School of Engineering, Chiba University, 1-33,
Yayoi-cho, Inage-ku, 263-8522, Chiba

2. 細胞試料・実験装置・方法

2.1 細胞

観察には、マウス線維芽細胞由来の株化培養細胞 (Swiss 3T3 albino, 理化学研究所バイオリソースセンター) を用いた。Swiss 3T3 albino の培養にあたり、継代培地には 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO) と抗生物質を添加した DMEM (GIBCO) を用い、37°C, CO₂ 濃度 5% の条件下で培養した。

2.2 位相差顕微鏡による細胞遊走のライブ観察

細胞遊走を観察するにあたり、九州大学木戸秋教授および久保木助教にゼラチンゲル基質⁸⁾をご提供いただいた。用いたゼラチンゲル基質の弾性率は、84 kPa から 260 kPa の範囲であり、培養細胞実験において一般に用いられるガラス基質 (一般に GPa のオーダー) に比較し、より生体環境に近い弾性率を有する基質である。このゼラチン基質に前述の細胞を播種した。その後、培養用 CO₂ インキュベータ内に約 3 時間静置し、細胞がゲル基質上に十分伸展したことを確認したうえで、観察を開始した。

細胞遊走を長時間観察する際は、試料を染色することなく、生きたままの像の明暗コントラストを利用し観察可能な位相差顕微鏡を用いた。Fig.1 に位相差顕微鏡観察の実験装置を示す。位相差顕微鏡は、位相差の小さな物体の検出に優れており、観察光波長のおおよそ 1/100~1/2 程度の位相差のある微細構造の観察に適する⁹⁾。観察では、開口数 0.50 の 10 倍対物レンズ (CFI Plan Fluor DLL10×, ニコン), CCD カメラ (RETIGA 4000R, 日本ローパー), および焦点自動調節機能を搭載した位相差顕微鏡 (Ti-E, ニコン) を用い、ゼラチンゲル基質上の遊走を 5 分間隔で最長 24 時間観察した。

2.3 共焦点レーザ顕微鏡によるアクチン細胞骨格の固定観察

細胞内部の構造体の一種である、アクチン細胞骨格を観察した。はじめに、蛍光アクチンの遺伝子導入によりゼラチンゲル基質上の遊走に伴うアクチン細胞骨格のライブ観察を試みたものの、特に細胞とゼラチンゲル基質の境界において、蛍光アクチンが不明瞭であった。そこで、アクチン細胞骨格の固定観察を行った。観察にあたり、ゼラチンゲル基質に細胞を播種し、24 時間後に 4% パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定した。その後、Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen) を用いて、アクチン細胞骨格を蛍光染色した。

アクチン骨格構造を観察する際は、共焦点レーザ顕微鏡を用いた。Fig.2 に、共焦点レーザ顕微鏡観察の実験装置を示す。観察では、開口数 1.40 の 60 倍対物レンズ (CFI Plan Apo VC60×H, ニコン) を搭載した共焦点レーザ顕微鏡 A1R (ニコン) を用い、固定細胞の底面近傍の蛍光アクチン画像を撮影した。

2.4 細胞輪郭と輪郭図心の抽出方法

本研究では、画像取得した細胞に対して、Fig.3 に示す通り、その輪郭を抽出した。Fig.3(a) の位相差顕微鏡画像に対し、Fig.3(b) に示す通り、細胞輪郭を手動で抽出し、細胞輪郭に囲まれる領域を細胞底面とした。さらに Fig.3(c) に示すように、二値化した底面像を作成した。得られた底面像から、式(1)に基づき細胞底面積 A を、また式(2)に基づき細胞底面の輪郭図心 $\vec{C}$ を求めた。

$$A = \sum_i m_i \quad (1)$$

$$\vec{C} = \sum_i m_i \vec{r}_i / A \quad (2)$$

ここに、 m_i は各ピクセルの輝度値であり、二値化した底面像においては、細胞輪郭に囲まれる領域は 1 (白)、その他の領域は 0

Fig.1 Observation by phase contrast microscopy

Fig.2 Observation by laser confocal microscopy

Fig.3 Image processing for extracting cell outline. (a) Phase contrast image (b) Extracting cell outline manually (c) Binarized image of the cell

(黒)である。また、 $\vec{r}_i$ は各ピクセルの座標である。

細胞遊走の時間変化を表す際は、細胞輪郭を 20 分間隔ないしは 60 分間隔で重ねて表示した。また、細胞輪郭に重ねて輪郭図心を描画する際は、輪郭図心を白丸および黒丸で表した。このとき、細胞輪郭を重ねて表示した時点の輪郭図心を黒丸、それ以外の時点の輪郭図心を白丸とした。また、輪郭図心を実線で結び、細胞遊走の軌跡とした。一連の解析は、MATLAB による自作プログラムにより行った。

3. 観察結果

3.1 方向転換遊走をする細胞

観察結果から、方向転換遊走をする細胞に着目し、ひとつの細胞サンプルの位相差観察結果を Fig.4(a)に、細胞輪郭の時間変化を 20 分間隔で Fig.4(b)に、輪郭図心の軌跡を Fig.4(c)に示す。また、Fig.4(d)に、(i) $t_0 = 0$ min から $t_1 = 100$ min まで、(ii) $t_1 = 100$ min から $t_2 = 200$ min まで、(iii) $t_2 = 200$ min から $t_3 = 360$ min まで、(iv) $t_3 = 360$ min から $t_4 = 420$ min まで、および(v) $t_4 = 420$ min から $t_5 = 600$ min までに分けて、細胞輪郭の時間変化および輪郭図心の軌跡を示す。なお、細胞輪郭の時間変化に着目すると、細胞図心移動方向に対し前方の細胞輪郭が同方向に突出する過程、同じく前方の細胞輪郭が同方向とは垂直な一二方向に伸展する過程、さらに細胞図心移動方向に対し後方の細胞輪郭で、それまで位置が変化せず接着していたと予想される点が移動する過程がみられた。そこで、それぞれを「突出」、「伸展」、および「退縮」と定義した。図において赤矢印、緑矢印、および青矢印はそれぞれ突出、伸展、退縮を示す。また、Fig.4(c)において、6 つの細胞底面像は、時間 t_0 から t_5 におけるそれに対応しており、各時間の輪郭図心を黒丸で表示した。

本細胞サンプルでは、Fig.4(d)より、撮影開始直後の t_0 から t_1 までの時間[Fig.4(d)(i)]、および 2 回方向を転換した後の t_3 から t_4 までの時間[Fig.4(d)(iv)]において、進行方向に突出と退縮がみられた。また、 t_4 から t_5 までの時間[Fig.4(d)(v)]では、主に退縮が生じた。しかし、第一回目の方向転換を行った t_1 から t_2 まで[Fig.4(d)(ii)]、および第二回目の方向転換を行った t_2 から t_3 までの時間[Fig.4(d)(iii)]では、退縮ステップに加え、細胞膜を移動垂直方向に伸展させる、伸展ステップがみられた。そこで、突出と退縮ステップがみられた Fig.4(d)(i)、伸展と退縮ステップがみられた Fig.4(d)(ii)および(iii)における細胞輪郭の時間変化をより具体的に観察した。その結果を Fig.5 に示す。

Fig.5(a)は、突出と退縮がみられた Fig.4(d)(i)の過程 ($t_0 = 0$ min から $t_1 = 100$ min) における、細胞輪郭の時間変化の詳細である。赤矢印は突出を、青矢印は退縮を示す。この図から、細胞は、 $t_0 = 0$ min から $t_1 = 100$ min にかけて、前方において突出を、後方において突出と同じ方向に退縮を行い、一方向に遊走したことがわかる。

Fig.4 Change in direction during migration. (a) Time-lapse phase contrast images of the cell (b) Time sequence of outline of the cell (c) Trajectory of the centroid of the cell (d) Protrusion, expansion and retraction of the cell

Fig.5 Time sequences of the outline of the cell. (a) Protrusion and retraction during migration (b) Retraction and expansion of the cell in the first process of change in direction during migration (c) Retraction and expansion of the cell in the second process of change in direction during migration

それに対し, Fig.5(b)および(c)に, 伸展と退縮がみられた Fig.4(d)(ii)の過程 ($t_1 = 100$ min から $t_2 = 200$ min) および Fig.4(d)(iii)の過程 ($t_2 = 200$ min から $t_3 = 360$ min) における, 細胞輪郭の時間変化の詳細を示す. 緑矢印は伸展を, 青矢印は退縮を示す. Fig.5(b)において, $t = 100$ min から 180 min にかけて, 細胞後方の一端が退縮した. それと同時に, $t = 100$ min から 120 min にかけて, 細胞は進行方向へ突出せず, それに対し垂直な上下二方向へ細胞膜の伸展が開始した. しかしその後, 下方向へは引き続き伸展したものの, 上方向への伸展は, $t = 180$ min で停止した. この過程において, 細胞は $t = 100$ min の時点での進行方向である右方向から, 進行垂直方向である下方向へと方向転換を行った.

また, Fig.5(c)においても同様に, $t = 220$ min から 360 min にかけて, 細胞後方が退縮した. それと同時に, $t = 220$ min から進行方向に対し垂直な左右二方向へ細胞膜の伸展が開始した. しかしその後, 右方向へは引き続き伸展したものの, 左方向への伸展は発達しなかった. この過程において, 細胞は $t = 200$ min における進行方向である下方向から, 進行垂直方向である右へと方向転換を行った.

以上より, 方向転換遊走をする細胞は, 細胞膜を進行垂直方向となる二方向に伸展させ, そのどちらか一方をさらに大きく伸展させ, 他方を退縮させることで方向転換を行うことがわかった. 本研究において, 従来の「突出」ステップ, 「接着」ステップ, 「退縮」ステップの他に, 方向転換遊走パターンにおいては, 「伸展」ステップも存在することが明らかとなった. 他の 4 つのサンプルも同様

であった. それ以外には, 突出の方向を変化させるのみで, 伸展を伴わずに方向転換する遊走パターンも同程度存在した.

3.2 直進遊走をする細胞

次に, 直進遊走をする細胞についても観察し, 方向転換遊走をする細胞と比較検討した. 直進遊走をするひとつの細胞サンプルの位相差観察結果を Fig.6(a)に, 細胞輪郭の時間変化を Fig.6(b)に, および輪郭図心の軌跡を Fig.6(c)に示す. なお, Fig.6(b)および Fig.6(c)において, 60 分間隔で細胞輪郭および輪郭図心を示す. Fig.6(a)より, この直進遊走をする細胞は, 撮影開始直後 $t_0 = 0$ min において, ゼラチンゲル基質との接着点を意味する後端の黒点が観察された. Fig.6(b)より, 後端の位置は $t_2 = 600$ min まで変化せず, 接着していることが推測された. $t_1 = 360$ min において細胞膜は, 移動垂直方向に伸展することなく直進遊走をした. このとき後端の黒点は移動せず, すなわち接着が外れず, それにより細胞後方が細く伸ばされた. それ以降の時相に関しても同様に, 突出した細胞膜が進行方向に遊走し, その移動垂直方向には伸展がみられなかった. 他の 3 つのサンプルも同様であった.

Fig.6 Directional migration. (a) Time-lapse phase contrast images of the cell (b) Time sequence of outline of the cell (c) Trajectory of the centroid of the cell

4. 細胞遊走パターンとストレスファイバとの関係

4.1 方向転換遊走をする細胞

本研究で観察された方向転換遊走において, アクチン細胞骨格の一形態であるアクチンストレスファイバの配向を観察し, 方向

転換遊走時の各ステップの詳細を体系化する。本研究に用いた細胞では、Fig.5 に示されるように、方向転換遊走の各ステップにおいて細胞輪郭が大きく変化した。そこで、各ステップの細胞輪郭と同様の特徴を有する細胞を固定細胞のサンプルから選出し、その蛍光アクチン画像と比較することにより、各ステップのアクチンストレスファイバの配向を検証した。

はじめに、Fig.5(a)に示す、方向転換前の突出ステップにおいて、 $t = 20 \text{ min}$ から 100 min における細胞形状、すなわち細胞の片側において細胞膜を広げ、反対側では細くなる形状を有する細胞の蛍光アクチン像を Fig.7(a)に示し、そのときの模式図を Fig.7(b)に示す。模式図において、赤矢印は突出を表す。Fig.7(a)から、進行方向前方の細胞膜内では、突出に対して垂直方向にドーサル・ストレスファイバ(dorsal stress fiber)が配向し、その一端が円弧状に配向するアーク・ストレスファイバ(arc stress fiber)と結合する様子が観察された。このようなストレスファイバの配向がみられる場合、ドーサル・ストレスファイバの細胞膜近傍の端点に焦点接着斑が形成され、突出と同時に接着も生じることが、これまでに報告されている¹⁰⁾。また後方では、細胞膜に沿って細胞の中央部から後方にかけて、ベントラル・ストレスファイバの配向がみられた。ベントラル・ストレスファイバにおいても、両端に焦点接着斑が形成されることが知られ、さらには細胞後端側が崩壊し、ストレスファイバの収縮に伴い細胞の退縮が生じる可能性を有する¹¹⁾。従って、突出ステップでは接着を伴い、また退縮が同時におこる可能性があると思われ、このような三種類のストレスファイバが配向する過程は、突出・接着・退縮ステップといえる。

次に、Fig.5(b)における時間 $t = 120 \text{ min}$ および Fig.5(c)における時間 $t = 220 \text{ min}$ のときの伸展ステップ初期における細胞形状、すなわち細胞輪郭全体が長く広がりとともに、退縮ステップに特徴的な細長い形状の輪郭を有する細胞の蛍光アクチン像を Fig.8(a)に示し、そのときの模式図を Fig.8(b)に示す。伸展ステップ初期では、細胞後方の退縮が行われると同時に、進行垂直二方向に細胞膜が伸展を開始し、細胞が伸長する。すなわち、細胞後端側の焦点接着斑が崩壊し、細胞中央部から後方にかけて配向するベントラル・ストレスファイバが収縮することにより細胞の退縮が行われる。また、アーク・ストレスファイバが発達し、そこに結合していたドーサル・ストレスファイバとともに、細胞進行方向に対し垂直に東化して配向する。このとき、ストレスファイバの両端には成長した焦点接着斑が存在することから、これはベントラル・ストレスファイバであるといえる¹¹⁾。また、ストレスファイバの東化発達に関わるシグナルは、細胞膜の突出を抑制する¹²⁾ことから、前述のステップにおける Fig.7(b)の赤矢印で表された突出が抑制されると推測される。それに代わり、前述の抑制を受けない部位、すなわち細胞の進行垂直二方向に細胞膜が伸展を開始する。

Fig.5(b)における時間 $t = 140 \text{ min}$ および Fig.5(c)における時間 $t = 280 \text{ min}$ から 320 min のときの伸展ステップ中期の細胞形状、すなわち前ステップと同様に細胞輪郭全体が長く広がりとともに、退縮ステップに特徴的な細長い形状がより短く、あるいは失われた輪郭を有する細胞の蛍光アクチン像を Fig.9(a)に示し、そのときの模式図を Fig.9(b)に示す。伸展ステップ中期では、細胞後方の

退縮がさらに加速し、完了する。また、二方向に伸展した細胞膜がさらに伸展する。このとき、退縮部に存在した2つのベントラル・ストレスファイバは、ストレスファイバどうしが連結するアニーリング¹³⁾によって1つのベントラル・ストレスファイバとなる。また、前述のステップにおいてみられたストレスファイバの東化発達、およびベントラル・ストレスファイバへの変化がさらに進行する。

最後に、Fig.5(b)における時間 $t = 180 \text{ min}$ および Fig.5(c)における時間 $t = 360 \text{ min}$ のときの伸展ステップ後期における細胞形状、すなわち前ステップにみられた細胞輪郭全体の長く広がる形状に非対称性がみられる輪郭を有する細胞の蛍光アクチン像を Fig.10(a)に示し、そのときの模式図を Fig.10(b)に示す。この図に

Fig.7 Protrusion step (a) Fluorescent actin image (b) Schematic of cell protrusion with actin stress fibers

Fig.8 The early stage of expansion step (a) Fluorescent actin image (b) Schematic of cell expansion with actin stress fibers

Fig.9 The middle stage of expansion step (a) Fluorescent actin image (b) Schematic of cell expansion with actin stress fibers

Fig.10 The later stage of expansion step (a) Fluorescent actin image (b) Schematic of cell expansion with actin stress fibers

示した通り、伸展ステップ終期では、例えば細胞内構造の非対称性により、二方向に伸展した細胞膜の一方が優位的に伸展する。このとき、細胞膜内にアーク・ストレスファイバおよびドーサル・ストレスファイバが成長し、細胞進行方向前方に特徴的なストレスファイバの配向形成が生じる。伸展が止まったもう一方には、ベントラル・ストレスファイバが偏って存在し、新たな細胞後端を形成する。

以上の考察より、方向転換遊走をする細胞には、4つのステップが存在する。その1段階目は、突出・接着・退縮ステップである。突出した細胞膜内にドーサル・ストレスファイバおよびアーク・ストレスファイバが形成され、突出およびそれに伴う接着が進行するとともに、細胞後方にベントラル・ストレスファイバが配向し、退縮も同時に生じる可能性がある。それに続く2段階目は、伸展初期ステップである。細胞後方の退縮が進行すると同時に、細胞前方ではストレスファイバの発達に伴い進行垂直二方向に伸展を開始する。さらに3段階目として、伸展中期ステップとなる。細胞後方の退縮が完了し、それと同時に、前ステップにて二方向に伸展を開始した細胞膜が、さらに伸展する。また細胞内に配向したベントラル・ストレスファイバが、さらに発達する。最後に4段階目として、伸展後期ステップとなる。二方向に伸展した細胞膜のどちらかが優位に伸展を継続し、新たに細胞膜内にアーク・ストレスファイバおよびドーサル・ストレスファイバが配向する。一方、後方の伸展は止まり、ベントラル・ストレスファイバの配向が偏り細胞後端を形成する。

また、Fig.4 および Fig.5 から、方向転換遊走をする細胞は、上述の4つのステップを順番に繰り返すだけではなく、組み合わせを繰り返すと考えられた。例えば Fig.4 に示す細胞では、Fig.4(d)(i)は突出・接着・退縮ステップであり、その後 Fig.4(d)(ii)において、伸展初期ステップ、伸展中期ステップおよび伸展後期ステップと続いた。しかし、その後突出・接着・退縮ステップに戻るのではなく、再度伸展に関わる3つのステップを繰り返すことにより、方向転換を2回続けて行い、その後再度突出・接着・退縮ステップとなった。従って細胞は、突出・接着・退縮ステップ、および伸展初期・中期・後期ステップを様々に組み合わせることにより、進行に伴い方向転換を繰り返す遊走を実現すると考えられた。

Fig.11 Directional migration (a) Phase contrast image (b) Fluorescent actin image (c) Schematic of the fluorescent actin image

4.2 直進遊走をする細胞

Fig.6 に示す観察結果から、直進遊走をする細胞は、細胞膜を進行方向に突出させ、移動垂直方向には伸展しなかった。また、後端は移動せず、時間経過とともに細胞後方が引き伸ばされるように細くなった。ここではそのメカニズムについて考察する。

Fig.11(a)に、直進遊走をする細胞の位相差像、(b)に蛍光アクチン像、および (c)に蛍光アクチン像の模式図を示す。Fig.13(b)と(c)の青線に示した通り、蛍光アクチン像において、細胞核横に前方から後方にかけて高輝度値を有する線状構造がみられたことから、強固なストレスファイバが配向することがわかる。また、突出した細胞前方の細胞膜は小さく、方向転換遊走をする細胞において Fig.7 から Fig.10 において観察された、ドーサル・ストレスファイバやアーク・ストレスファイバの発達が、Fig.11(b)からは認められなかった。この細胞核横に配向する強固なストレスファイバと、ストレスファイバが未発達な細胞前方に突出する小さな細胞膜のため、細胞膜は突出に伴い横に伸展することができず、進行方向にのみ突出し、その結果細胞は直進遊走したと思われる。

さらに、Fig.11(c)の赤点に示した通り、細胞後端に蛍光アクチン像の高輝度値の点が存在した。このような蛍光アクチン像の高輝度値の点と焦点接着斑の形成位置には関連があることが報告されており¹⁴⁾、Fig.11(b)においても、細胞後端に焦点接着斑が形成されたと推測され、細胞はその点において基質との接着を保つことが予想される。このとき、細胞膜は進行方向に突出するのに対し、後方は基質との接着を保ち続け、その結果細胞の形状が時間経過とともに引き伸ばされるように長くなったと考えられる。

5. 結言

本研究では、ゼラチンゲル基質上において、方向転換遊走をする細胞と直進遊走をする細胞について、位相差観察を行うことにより、細胞輪郭の時間変化と輪郭図心の軌跡を求めた。さらに、共焦点レーザー顕微鏡による固定細胞の蛍光アクチン観察を行うことにより、細胞内部構造体であるアクチンストレスファイバを観察し、次の結論を得た。

- (1) 本研究において、従来の突出・接着・退縮ステップの他に、方向転換遊走パターンにおいては、伸展ステップも存在することが明らかとなった。このような方向転換遊走をする細胞については、突出・接着・退縮ステップに加え、遊走進行方向に対し垂直二方向に細胞膜が伸展する伸展初期ステップ、

伸展が進むと同時に細胞後方の退縮が進行する伸展中期ステップ、および二方向の細胞膜の伸展から一方向のみ優位に伸展が進む伸展後期ステップの合計 4 つのステップに体系化することができた。突出・接着・退縮ステップと伸展初期・中期・後期ステップを組み合わせることにより、細胞は方向転換を繰り返す遊走を実現すると予想された。

- (2) 直進遊走においては、方向転換遊走にみられた伸縮初期・中期・後期ステップが観察されなかった。細胞膜は、進行方向のみに突出し、後端は移動せず、時間経過とともに細胞が細長い形状となった。蛍光アクチン像から、進行方向に対して細胞前方から後方まで長く配向するストレスファイバが観察され、また前方の突出する細胞膜は小さく、ドーサル・ストレスファイバやアーキ・ストレスファイバの発達が認められなかった。そのため細胞膜は進行方向に垂直な方向には伸展せず、前方のみに突出したと考えられた。
- (3) 細胞の進行方向前方における細胞膜内部のストレスファイバの配向、および細胞膜に沿ったストレスファイバの配向の違いにより、細胞遊走パターンが異なることが示唆された。

謝辞

本研究において用いたゼラチンゲル基質は、九州大学先端物質化学研究所 木戸秋悟教授および久保木タツサニーヤー助教によりご提供いただいた。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) A. J. Singer, R. A. Clark, Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746.
- 2) L. R. Berstein, L. A. Liotta, Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr Opin Oncol* 1994; 6: 106-113.
- 3) B. Alberts 他, *Molecular Biology of the Cell* 細胞の分子生物学. 第 4 版. 東京: ニュートンプレス, 2004.
- 4) T. D. Pollard, L. Blanchoin, R. D. Mullins, Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000; 29: 545-576.
- 5) J. V. Small, K. Rottner, I. Kaverina and K. I. Anderson, Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404: 271-281.
- 6) S. Pellegrin, H. Mellor, Actin stress fibres. *J Cell Sci* 2007; 120: 3491-3499.
- 7) M. Sugawara, H. Miyoshi, T. Miura, H. Tanaka, K. Tsubota, H. Liu, Dynamics of actin stress fibers and focal adhesions during slow migration in Swiss 3T3 fibroblasts: Intracellular mechanism of cell turning, submitting.
- 8) H. Y. Yoshikawa, T. Kawano, T. Matsuda, S. Kidoaki, Morphology and adhesion strength of myoblast cells on photocurable gelatin under native and non-native micromechanical environments. *J Phys Chem B* 2013; 117: 4081-4088.
- 9) 野島博, 改訂 顕微鏡の使い方ノート 初めての観察から高度な顕微鏡の使い方まで. 東京: 羊土社, 2003.
- 10) D. J. Webb, J. T. Parsons, A. F. Horwitz, Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E97-100.
- 11) L. P. Cramer, M. Siebert, T. J. Mitchison, Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: Implications for the generation of motile force. *J Cell Biol* 1997; 136: 1287-1305.
- 12) A. Katsumi, J. Milanini, W. B. Kiosses, M. A. del Pozo, R. Kaunas, S. Chien, et al., Effects of cell tension on the small GTPase Rac. *J Cell Biol* 2002; 158: 153-164.
- 13) D. B. Murphy, R. O. Gray, W. A. Grasser, T. D. Pollard, Direct demonstration of actin filament annealing in vitro. *J Cell Biol* 1988; 106: 1947-1954.
- 14) 三浦拓也, 菅原路子, 八木透, 坪田健一, 劉浩, 細胞運動の突出過程におけるアクチンダイナミクス解析, 電気学会論文誌 C 2014; 134: 177-182.