

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2015～2019

課題番号：15H05859

研究課題名（和文）細胞集団の回転運動による3D形態形成のロジック

研究課題名（英文）Modeling of 3D morphogenesis through rotational and collective cell migration

研究代表者

武田 洋幸（Hiroyuki, Takeda）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授

研究者番号：80179647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 93,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ゼブラフィッシュ体節をモデル系（約200細胞集団が短時間変形）とし、組織の伸長がその方向に垂直な回転運動によって促進されるメカニズムを明らかにすることを目的とした。体節伸長の過程で背腹のコンパートメント境界を分ける特殊な境界細胞（Horizontal boundary cells）の発見、および伸長過程での個々の体節細胞の動態の追跡とバーチャルモデルによる伸長のロジックを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPSやES細胞など幹細胞の研究が進み、再生医療などへの応用が進んでいる。これらの幹細胞は試験管内で様々な細胞種へ分化誘導することが可能である。一方、成体を維持する器官や組織は、複数の細胞種で構成され、それらが特定の高次構造の下に配置されている。このような構造があつてはじめて器官は正常にかつ効率よく機能する。現在、分化した細胞から試験管内で3次元構造の組織構造を有するオルガノイドを作成する研究は進んでいるが、3次元構造を作るロジックは理解できていない。成体内の器官に近い、または任意の形のオルガノイドを作成するために、本研究の器官形成ロジックの理解は重要である。

研究成果の概要（英文）：3D tissue morphogenesis in animals accompanies massive cell proliferation, cell migration and compartmentalization of a cell population. To understand these processes, we examined cellular and molecular mechanisms underlying 3D morphogenesis of somites using medaka and zebrafish as models, focusing dorsoventral patterning and elongation along the dorso-ventral axis. We identified a subgroup of dermomyotomal cells called horizontal boundary cells (HBCs) as crucial players for compartmentalization of dorsal and ventral cells. Embryological and genetic analyses demonstrated that HBCs play crucial roles in the two major events of the process, i.e., refinement and maintenance. Furthermore, by tracking cell behavior of all cells in a somite, we elucidated a logic for somite tissue elongation, in which the regional difference in the speed of migrating cells in a somite facilitates cell rearrangement and promote elongation.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：ゼブラフィッシュ 体節形成 3次元 シミュレーション 形態形成

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生において、多数の細胞で構成される組織・器官は遺伝的に決められた 3 次元的形態を作り出す。この過程に参与する分子（転写因子、シグナル、細胞内外の因子など）は遺伝学、分子生物学的手法によりかなりの程度明らかになってきている。一方最近のイメージング・力学的力の測定技術の進歩により、個々の細胞の物理的な変化（力）の集積として細胞集団が 3 次元に変形する過程が捉えられるようになってきた。しかし観察とモデル化が容易な上皮性細胞シートの研究が多く、細胞が 3 次元に集まった組織の変形の理解は遅れている。実際、細胞の再配置による組織の伸長（インターカレーション）がほとんど唯一の 3 次元変形に対するモデルと言える（図 2）。

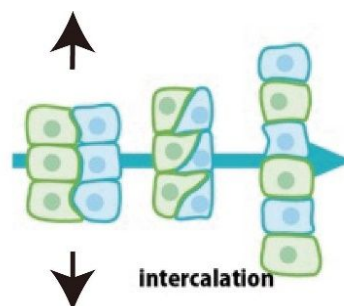


図 1. 細胞のインターカレーションによる組織の伸長

組織変形の基本である組織の伸長はインターカレーションだけでなく、細胞の回転運動が関連している報告がいくつかなされている。例えば、ショウジョウバエ卵形成過程で起こる卵細胞の球形から卵型へ伸長で、この過程で卵細胞の周囲を取り囲む一層の卵胞細胞層が 360 度回転することが必須であることが知られている（Haigo&Bildler, *Science*, 2011）。つまり外側の細胞層が雑巾を絞るような動きと力を発生することによって内部の卵細胞が伸長すると想像されている。また、細胞性粘菌や *in vitro* 培養細胞系において細胞が集合体や管構造を作る際にも細胞が回転運動を示すことが報告されている（Kellerman & McNally, *Dev. Biol.*, 1999；本研究領域芳賀グループによる計画研究）。このように、細胞の回転運動は組織の 3 次元形態形成によく用いられるメカニズムであるにもかかわらず、モデル化に必要な力学的考察はどの系においても行われていない。

2. 研究の目的

本研究はこの回転運動と組織の 3 次元形態の構築に焦点をあて、ゼブラフィッシュ胚の体節をモデルとした（図 2）。ゼブラフィッシュ体節は、約 200 個の細胞で構成される組織で、前方から一対ずつ 30 分毎に形成され、最終的に体幹部の筋節に分化する。形成直後は直方体に近い形をしていが、3 時間という短い時間で非常にはっきりした V 字型に伸長・変形する。この形態形成の過程で、回転を伴って組織が背腹方向に伸長する。研究代表者は、「秩序形成ロジック」の計画研究で、魚類体節（筋節）内のロバストな背腹境界の形成・維持機構のロジックを研究してきたが、その過程で体節内の細胞動態を詳細に解析する必要があり、この現象を研究する意義を見出した。これまでに魚類、両生類の体節は以前より、体節回転という現象が知られていたが（Hollway et al., *Dev. Cell*, 2007; Afonin et al., *Dev. Dyn.*, 2006）形態形成の全過程における 3 次元の細胞挙動の報告は断片的であった。魚類体節は、観察の容易さ（小型魚類の特徴と組織の位置）わずか 200 個の細胞で構成される組織、短時間のダイナミックな形態変化であり細胞分裂・体積変化を無視できる、ことなど理想的な解析対象であり、研究を通して回転運動と 3 次元組織構築の一般的原理を解明できると考える。

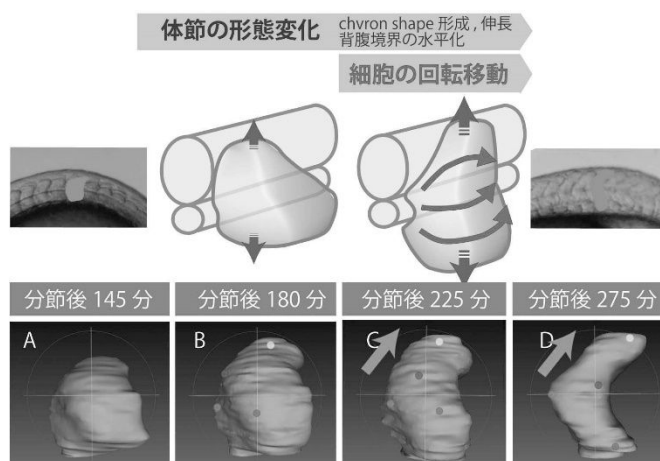


図 2. ゼブラフィッシュ胚の体節の形態変化と細胞の回転運動

これまで魚類、両生類の体節は以前より、体節回転という現象が知られていたが（Hollway et al., *Dev. Cell*, 2007; Afonin et al., *Dev. Dyn.*, 2006）形態形成の全過程における 3 次元の細胞挙動の報告は断片的であった。魚類体節は、観察の容易さ（小型魚類の特徴と組織の位置）わずか 200 個の細胞で構成される組織、短時間のダイナミックな形態変化であり細胞分裂・体積変化を無視できる、ことなど理想的な解析対象であり、研究を通して回転運動と 3 次元組織構築の一般的原理を解明できると考える。

3. 研究の方法

本研究で注目する体節の形態形成は、少数の細胞（200 個）短時間（3 時間）を特徴とするダイナミック伸長運動である。この特徴を活かして以下のような解析を行う。

- ・全細胞の観察・記録：共焦点顕微鏡とソフトウェアを駆使して、体節の形態変化の過程のすべての細胞の動態（核の位置、細胞形態の変化）をデジタルデータとして記録する。
- ・小型魚類の特徴を活かして、各種変異体、種々の摂動（シグナル障害、細胞移植、組織除去など）を加えることにより、モデルの検証を行う。

4. 研究成果

(1) 体節組織の背腹コンパートメントの分離メカニズムの解明

ライトシート顕微鏡を用いたゼブラフィッシュ体節の全細胞核のトラッキングの過程で、ダイナミックに移動する体節細胞が、決して背腹の境界を超えることはないことが判明した。即ち、体節は明瞭な背側と腹側のコンパートメントから成り立っている。このメカニズムを解析するために、体節背側が腹側の運命に変化する突然変異体が生産できるメダカを実験系として用いた。メダカ体幹部では、背側形態を制御する因子である *zic1* 及び *zic4* (*zic1/zic4*) の発現の有無によって背腹コンパートメントが特徴付けられ、背と腹は明瞭な *zic1/zic4* の発現境界によって仕切られている。この境界は一生涯正確に維持されている (Kawanishi et al., *Development*, 2013)。このようなロバストなコンパートメント境界はこれまで報告がなく、体節の形態において背と腹をロバストに形成・維持する上で重要な機構であると考えられる。そこで本研究はまず明瞭な *zic1/zic4* 発現境界により定義されるメダカ体節の背腹コンパートメント形成メカニズムを解析した。

その結果、コンパートメント境界では特殊な境界細胞 (Horizontal boundary cells, HBCs) が現れ、体節全体の形態に影響を与えていた。イメージング解析の結果、HBCs は、体節の深部、脊索に近いところで生まれ、体節細胞の回転運動に伴って、将来の背腹境界へ移動すること、そして、HBCs の一部は体節から由来する筋節の背側と腹側を物理的に分ける水平筋中隔へ分化することが判明した。したがって、HBCs は背腹を仕切る化学的かつ物理的なバリアとして機能している可能性が示された (図 3) (Abe et al., *Cell Rep.*, 2018)。

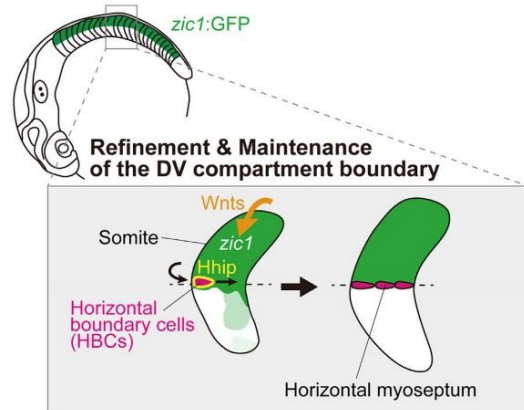


図 3. 体節内の境界細胞 (HBCs) の分化メカニズム

(2) 回転運動を介した体節伸長メカニズムの解明

ライトシート顕微鏡を用いてゼブラフィッシュ体節の全細胞核をトラッキングし、その3次元動態をもとにバーチャル体節を復元した。その結果ほぼすべての細胞は集団回転しつつ回転方向に互いにずれ合うことで体節全体が伸長することが分かった。素早い組織伸長を可能にする点で興味深い (図 4A)。

ではこのずれのどのような性質が体節の伸長を駆動しているのだろうか。回転方向の細胞移動速度を調べたところ、脊索に近く伸長方向への「ずれ」が大きい細胞ほど速度が大きく、反対に側方に位置する細胞ほど速度が小さかった。実際に、速い細胞が、前方の遅い細胞の背側にずれ上がる行動が観察された (図 4B)。さらに薬剤処理により細胞間の速度差を小さくすると体節の伸長が抑制された。

これらの実験結果を踏まえ、細胞の移動速度の違いが体節全体の伸長に与える影響をさらに検証するため、細胞を粒子と近似して3次元モデルを構築し、シミュレーションを行なった。その結果、体節全細胞を回転させる際に移動速度の異なる (遅い) 細胞を混ぜると、体節全体の伸長がより促進されることが分かった。

以上から、効率的な体節伸長には、移動速度の勾配を持った集団回転運動が重要で、単純な細胞のインターカレーションの現象ではないことが判明した。速度勾配は隣接組織などから分泌されるシグナル因子で比較的容易に制御できることから、このメカニズムが様々な形態形成過程において普遍的に使われている可能性は高い。本研究は秋山班員、井上班員との共同研究であり、緊密な議論を積み重ねて、バーチャル体節の構築と細胞運動の定量的解析、シミュレーションによる再現と摂動実験が実現できた。現在論文投稿準備中である。

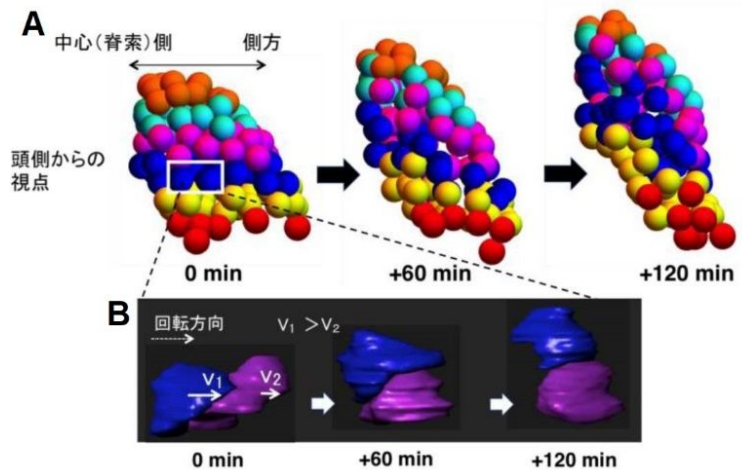


図 4 体節の伸長過程における細胞動態

- A: 0 minの時点で同じ水平面に位置する背側体節細胞核を色分けした。時間とともに各層がほぼ一様に傾くことで体節全体が伸長した。
- B: 速度が大きい細胞 (青) が遅い細胞 (紫) に接してズレ上がる行動が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yu Nakagama, Norihiko Takeda, Seishi Ogawa, Hiroyuki Takeda, Yoshiyuki Furutani, Toshio Nakanishi, Tatsuyuki Sato, Yoichiro Hirata, Akira Oka, Ryo Inuzuka	4. 巻 8(3)
2. 論文標題 Noonan syndrome-associated biallelic LZTR1 mutations cause cardiac hypertrophy and vascular malformations in zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 e1107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mgg3.1107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kota Abe, Atsuko Shimada, Sayaka Tayama, Hotaka Nishikawa, Takuya Kaneko, Sachiko Tsuda, Akari Karaiwa, Takaaki Matsui, Tohru Ishitani, Hiroyuki Takeda	4. 巻 27
2. 論文標題 Horizontal Boundary Cells, a Special Group of Somitic Cells, Play Crucial Roles in the Formation of Dorsoventral Compartments in Teleost Somite	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 928-939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.03.068.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe Kota, Kawanishi Toru, Takeda Hiroyuki	4. 巻 1046
2. 論文標題 Zic Genes in Teleosts: Their Roles in Dorsoventral Patterning in the Somite	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advances in experimental medicine and biology	6. 最初と最後の頁 141 ~ 156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-10-7311-3_8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 1件/うち国際学会 16件）

1. 発表者名 Heilig AK, Shimada A, Nakamura R, Kawanishi T, Wittbrodt J, Takeda H
2. 発表標題 Wnt11r is a myotome dorsalization factor during somite differentiation
3. 学会等名 The 26th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Kawanishi T, Takeda H, Megason S
2 . 発表標題 Coordinated growth of midline tissues in the zebrafish axis elongation
3 . 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Heilig AK, Shimada A, Nakamura R, Wittbrodt J, Takeda H
2 . 発表標題 Zic1/Zic4 mediate between canonical Wnt signaling and Wnt11r during somite differentiation
3 . 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Heilig AK, Nakamura R, Shimada A, Wittbrodt J, Takeda H
2 . 発表標題 Canonical and non-canonical Wnt signaling are linked by zic1/zic4 in dorsal somite patterning
3 . 学会等名 2nd JSDB-GfE Young scientist exchange meeting (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Tong Y, Kametani H, Shimada A, Akiyama M, Inoue Y, Takeda H
2 . 発表標題 Live-imaging and 3D analysis of zebrafish somite morphogenesis
3 . 学会等名 12th Gfe School 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Kawanishi T, Megason S
2. 発表標題 Coordinated tissue elongation in the zebrafish posterior body
3. 学会等名 Japan-Tronto Morphogenesis Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tong Y, Kametani H, Shimada A, Akiyama M, Inoue Y, Takeda H
2. 発表標題 Rotational cell migration: a new logic behind 3D somite morphogenesis
3. 学会等名 Japan-Tronto Morphogenesis Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tong Y, Kametani H, Shimada A, Akiyama M, Inoue Y, Takeda H
2. 発表標題 3D Cell behavior in zebrafish somite morphogenesis
3. 学会等名 Joint annual meeting of JSDB 51st & JSCB 70th (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kametani H, Tong Y, Shimada A, Takeda H
2. 発表標題 Role of rotational collective cell migration in somite morphogenesis
3. 学会等名 Joint annual meeting of JSDB 51st & JSCB 70th (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeda H
2. 発表標題 3D morphogenesis and dorsoventral patterning in zebrafish somites
3. 学会等名 3D morphogenesis Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Abe K, Tayama S, Tsuda S, Shimada A, Takeda H
2. 発表標題 Cellular and molecular mechanisms for the establishment of the lifelong dorsoventral compartment boundary in the teleost trunk
3. 学会等名 18th International Congress of Developmental Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tong Y, Kunifuji K, Iritani H, Kametani H, Shimada A, Takeda H
2. 発表標題 3D analysis of zebrafish somite morphogenesis
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Abe K, Tayama S, Tsuda S, Shimada A, Takeda H
2. 発表標題 Cellular and molecular mechanisms for the establishment of the dorsal and ventral compartments in the teleostsomite
3. 学会等名 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biolog (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeda H
2. 発表標題 Dorsoventral patterning and 3D morphogenesis of teleost somites
3. 学会等名 Austria-Japan joint meeting "Understanding the logic behind developmental dynamics" at IST Austria (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kametani H, Shimada A, Michiue T, Takeda H
2. 発表標題 Toward understanding of the mechanical force during tissue morphogenesis in zebrafish
3. 学会等名 The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Abe K, Tayama S, Shimada A, Takeda H
2. 発表標題 The establishment of the zic1-expression boundary that demarcates the dorso-ventral module in the medaka trunk throughout life
3. 学会等名 The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Shimada A, Abe K, Takeda H
2. 発表標題 Development of the zic-expressing dorsal compartment in fish and its implications for evolution of the vertebrate
3. 学会等名 The Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻動物発生学研究室
<http://www.bs.s.u-tokyo.ac.jp/~hassei/>

Virtual laboratory of 3D Morphologic
<http://www.3d-logic.jp/publication.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------