

令和元年6月3日現在

機関番号：84408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15408

研究課題名(和文) 周産期疾患発症における機械的力の関与の検討

研究課題名(英文) Studies on roles of mechanical forces in the pathogenesis of perinatal diseases

研究代表者

松尾 勲 (Matsuo, Isao)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・病因病態部門・部長

研究者番号：10264285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスを実験モデルに、組織間・細胞間で生じる機械的な力が異常になることによって、先天性疾患などの周産期疾患を発症するという仮説について検討した。神経上皮層が折れ曲がり、表皮によって包まれ、管状化する過程に異常が生じると神経管閉鎖不全を発症する。本研究では、この表皮細胞の物理的特性を解析した。神経管閉鎖不全を示すGrhl3遺伝子欠損変異胚と野生型胚を用いて、神経管閉鎖過程における表皮の物理的な強度を計測したところ、野生型に比べて脆弱になっていることが分かった。また、Grhl3を介した表皮の強靱化にはノンカノニカルWnt経路に依存していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性疾患の発症原因は、遺伝因子や環境因子とその両方の組み合わせによると考えられているが、半数近くは依然として不明である。今回の研究成果は、表皮の物理的強度が低下することで神経管閉鎖不全発症の原因となっている可能性を示唆するものである。更に、本研究結果は、神経管閉鎖障害以外の他の先天性疾患についても、組織や細胞の物理的な強度の異常が、病態発症に関与している可能性を示唆している。今後、本研究結果を基盤に研究を発展させることで、より一般化した仮説の検証を進めていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Neural tube defects (NTDs), one of the most common congenital disorders are thought to be caused by environmental factors during pregnancy, genetic factors, and the combination of both factors. However, the precise mechanisms underlying the pathogenesis of NTDs remain to be understood. The current project hypothesized that the "loss of robustness or strength in surface ectoderm against mechanical stress during neural tube closure is a primary cause of NTDs pathogenesis". The mechanical properties of surface ectoderm in wild-type and Grhl3 mutant mouse embryos showing NTDs were measured by atomic force microscopy and the mechanical strength of Grhl3-deficient embryos were shown to be decreased compared to that of wild-type embryos. In addition, Grhl3-induced mechanical strength of surface ectoderm was mediated by the noncanonical Wnt pathway including planar cell polarity genes.

研究分野：哺乳動物発生遺伝学

キーワード：発生・分化 先天性疾患 メカニカルフォース 神経管閉鎖不全 ノンカノニカルWnt 平面内極性 表皮 原子間力顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンスやプロテオーム解析の進展によって、遺伝子レベル、分子レベル、細胞レベルでのヒト疾患原因の解明が飛躍的に進んだ。生物現象は、生物固有の原理を支配する遺伝子や分子によって制御されているが、加えて物理学的な性質によって支配されていることも事実である。しかし、病態疾患発症に機械的な力がどのように関与しているのかほとんど解析されてこなかった。例えば、腫瘍組織が正常組織とは堅さ(弾性率)の点で大きく異なることは、腫瘍組織を摘出した外科医などによって直感的にも認識されてきたが、その学術的な意義についてはほとんど研究されてこなかった。10年位前になって、細胞外基質などによる力学的環境によって、間葉系幹細胞の分化運命が制御されているという仮説が提唱された。つまり、細胞は、それぞれ異なる物理的特性を持っていて、神経組織のように柔らかい細胞外基質上では、幹細胞は神経細胞へ、骨のように堅い基質上では軟骨へと分化することが示された。このように、従来まで発現する遺伝子によって制御されていると考えられてきた生命現象が、力学的な要素によっても制御されていることが示唆されはじめた。代表者等は、母体子宮側からマウス胚への力が、着床直後胚の発生進行(前後軸形成)に必須な機能を果たしていることを見いだした(図1)。この結果は、ほ乳類胚発生において、生化学反応だけでなく機械的な力が、直接的に基本的な発現現象を制御していることを示している。更に、この結果は、力学的性質が、その他の発現現象やその破綻による疾病にも関与している可能性を強く示唆している。

2. 研究の目的

ヒトを初めとするほ乳類は、母体子宮内で発生・成長する。現在までに、子宮側からの圧力や胚内の組織間・細胞間で生じる力が、ほ乳類胚の発生にどのような機能を担っているのかほとんど解析されていない。そこで、本研究課題では、マウスをモデル実験動物として使用し、組織間・細胞間で生じる機械的な力が異常になることが、先天性疾患の発症原因となっているという仮説の検証を行う。具体的には、マウス初期胚の神経管閉鎖過程における細胞・組織間にかかる力や物理的な特性を計測することで、機械的力の異常が神経管閉鎖不全症候群などの先天性疾患の病態発症を引き起こす要因となり得るか検討する。

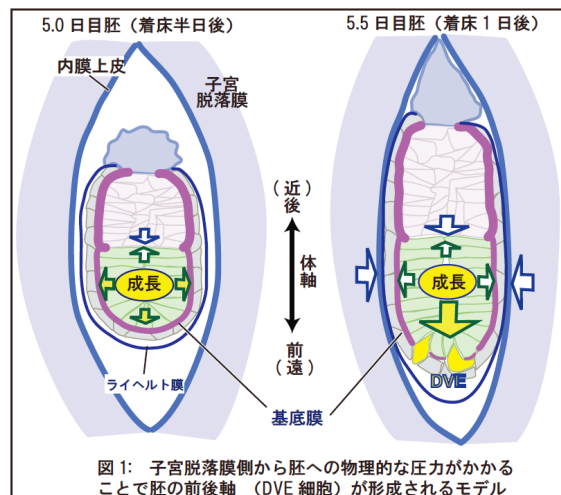


図1: 子宮脱落膜側から胚への物理的な圧力がかかることで胚の前後軸(DVE細胞)が形成されるモデル

3. 研究の方法

- (1)マウスの神経管閉鎖過程において、野生型胚及び神経管閉鎖不全を示すノックアウト胚を対象に特異的な分子マーカーを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションや免疫染色法を行った。又、ES細胞から表皮細胞への分化させる培養系を確立した。
- (2)神経管閉鎖過程における表皮細胞の機械的な強度が野生型胚と神経管閉鎖不全を示す変異胚との間で異なっているか、ガラスピペットを用いた牽引実験、原子間力顕微鏡を用いた弾性率計測を行った。
- (3)神経管閉鎖に必要な機械的な強度がどのような分子経路を介して生み出されているのか、マウス個体や細胞培養を用いた遺伝学的な解析を行った。

4. 研究成果

(1)神経管閉鎖過程における未分化前駆細胞の表皮分化機構の解析

神経管閉鎖過程においていくつかの幹細胞マーカー(KLF4, SSEA4, Oct3/4)を用いた発現解析を行うことで、神経管癒合時には表皮と神経の境界領域(背側中央部の外胚葉)だけが神経にも表皮にも分化していない前駆細胞の性質を持っていること、更に、この前駆細胞は、神経管閉鎖時に *Grhl3* 陽性の表皮細胞へと分化することを明らかにした。この背側中央部の表皮細胞の固有な弾性率が他の神経上皮細胞やその他の表皮細胞の弾性率とどのように異なるのか、またその力学的性質がどのように神経管閉鎖運動に関わっているのか明らかにするため、ES細胞から表皮細胞へ効率よく分化させる *in vitro* のES細胞分化系を樹立した(図2)。

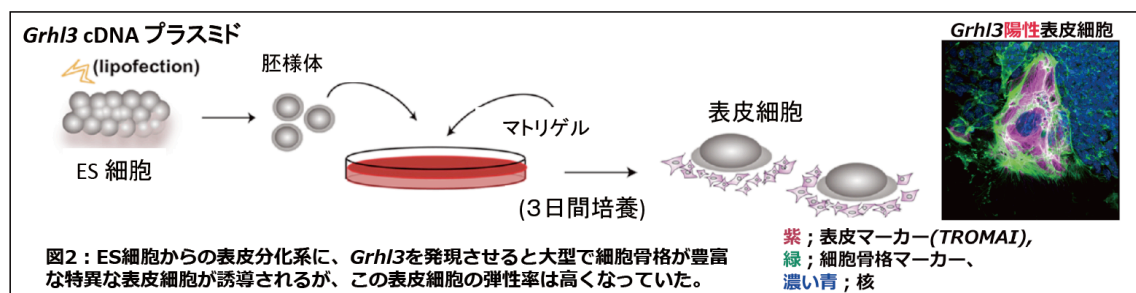
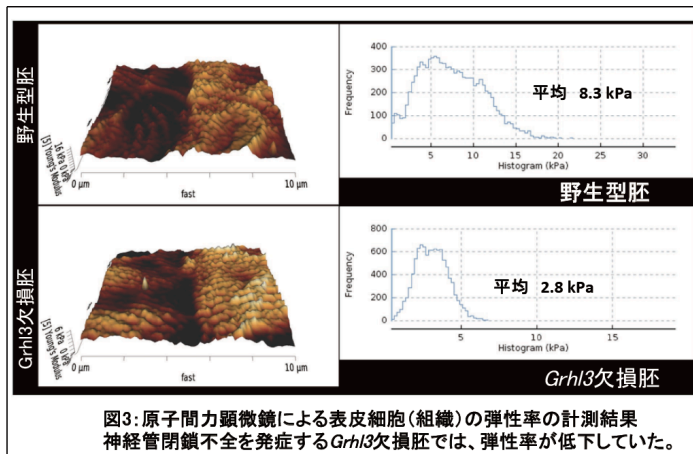


図2: ES細胞からの表皮分化系に、*Grhl3*を発現させると大型で細胞骨格が豊富な特異な表皮細胞が誘導されるが、この表皮細胞の弾性率は高くなっていた。

(2) 神経管閉鎖過程における表皮細胞の物理的な特性の同定

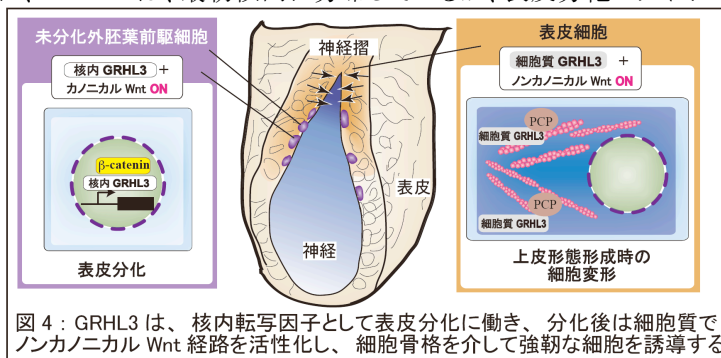
神経管閉鎖過程で背側正中線上に出現する特有な表皮細胞の物理的特性を計測するため、更に、表皮細胞を *in vitro* で ES 細胞から誘導後、細胞の硬さ(弾性率)を走査型プローブ顕微鏡を用いて計測する系を確立することに成功した。実際、神経管閉鎖に必須な *Grhl3* 遺伝子を発現させた表皮細胞と発現していない表皮細胞について原子間力顕微鏡を用いて細胞表面のヤング率を計測した。その結果、*Grhl3* 陽性の表皮細胞の方が陰性のそれと比べて高いヤング率を示した。次に、神経管閉鎖過程の表皮組織において、ガラスキャピラリーを用いた吸引実験を行った。結果、神経管閉鎖不全を発症する *Grhl3* ホモ変異マウス胚の表皮組織を吸引すると、正常胚の表皮組織に比べてより多くの組織が吸引されたことから、変異胚が変形しやすいことが分かった。これらの結果から、神経管閉鎖不全を発症したマウス胚では、より脆弱な表皮組織を持っていることが示された。

そこで、神経管閉鎖過程で背側正中線上の表皮細胞の物理的特性が異常になることで、神経管閉鎖不全を発症する可能性を検討するため、野生型マウス胚と神経管閉鎖不全を発症する *Grhl3* ホモ変異胚を対象に表皮部分のヤング率を原子間力顕微鏡を用いて直接計測した。その結果、野生型の表皮細胞表面のヤング率は、神経管閉鎖不全を示す *Grhl3* 欠損変異より大きいことが分かった(図 3)。つまり、神経管閉鎖不全胚では野生型胚に比べて表皮が脆弱になっていることが分かった。これらの結果から、表皮組織が脆弱化すると神経管閉鎖不全を発症することが強く示唆された。



(3) 表皮細胞の物理的強度に関わる分子経路の特定

Grhl3 がどのようなシグナル経路を介して強固な表皮細胞の形成することができるのかその分子経路の実体解明を進めた。ES 細胞から表皮への分化培養系に各種薬剤を添加することによって、*Grhl3* によって形成される強固な表皮細胞は、カノニカル Wnt とノンカノニカル Wnt 経路が同時に活性化されることで産生されることを明らかにした。具体的には、Wnt 活性化因子とノンカノニカル Wnt 活性化因子を同時に ES 細胞に添加した場合にのみ *Grhl3* によって形成される表皮細胞と同様な表皮細胞が形成されること、*Grhl3* に依存して形成される表皮は、カノニカル Wnt やノンカノニカル Wnt 経路の阻害剤によって形成されなくなることが分かった。また、*Grhl3* 欠損マウス胚では、ノンカノニカル Wnt 経路に働く分子の発現が低下していた。更に、GRHL3 は、最初核内に分布しているが、表皮分化のタイミングで細胞質へ移動して、平面極性シグナル分子群と共局在することでノンカノニカル Wnt 経路を活性化していることが示唆された。以上の解析より、GRHL3 は、細胞質で、ノンカノニカル Wnt 経路を介してアクチンネットワークなどを活性化することで、神経管閉鎖運動に耐えるような強固な表皮細胞を形成していることが強く示唆された(図 4)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Yu Kitadate, David J. Jörg, Moe Tokue, Ayumi Maruyama, Rie Ichikawa, Soken Tsuchiya, Eri Segi-Nishida, Toshinori Nakagawa, Aya Uchida, Chiharu Kimura-Yoshida, Seiya Mizuno, Fumihiro Sugiyama, Takuya Azami, Masatsugu Ema, Chiyo Noda, Satoru Kobayashi, Isao Matsuo, Yoshiakira Kanai, Takashi Nagasawa, Yukihiko Sugimoto, Satoru Takahashi, Benjamin D. Simons, Shosei Yoshida "Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche." *Cell Stem Cell* 24, 79-92 (2019) doi: 10.1016/j.stem.2018.11.013 (査読あり)

② Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Masa-aki Nakaya, Takeomi Mizutani, Isao Matsuo "Cytoplasmic localization of GRHL3 upon epidermal differentiation triggers cell shape change for epithelial morphogenesis." *Nature Communications* 9(1), 4059 (2018) doi: 10.1038/s41467-018-06171-8. (査読あり)

③ 松尾 勲 「マウス胚前後軸形成において力学的環境が果たす役割。」大阪母子医療センター雑

誌 34(1), 1-11 (2018) (査読あり)

④ Isao Matsuo, Ryuji Hiramatsu “Mechanical perspectives on the anterior-posterior axis polarization of mouse implanted embryos.” *Mechanisms of Development* 144 (PtA), 62-70 (2017) doi: 10.1016/j.mod.2016.09.002. (査読あり)

⑤ Hidenori Nishihara, Naoki Kobayashi, Chiharu Kimura-Yoshida, Kuo Yanc, Olga Grishinac, Qiong Dinga, Akiko Nakanishi, Takeshi Sasaki, Mika Hirakawa, Kenta Sumiyama, Yasuhide Furuta, Victor Tarabykin, Isao Matsuo, Norihiro Okada “Coordinately co-opted multiple transposable elements constitute an enhancer for wnt5a expression in the mammalian secondary palate.” *PLOS Genetics* (2016) 12(10):e1006380. doi: 10.1371/journal.pgen.1006380. (査読あり)

⑥ Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Kristina Ellwanger, Christof Niehrs, Isao Matsuo “Fate specification of neural plate border by canonical Wnt and Grhl3 is crucial for neural tube closure.” *EBioMedicine* 2, 513-527 (2015) doi: 10.1016/j.ebiom.2015.04.012. (査読あり)

[学会発表] (計 14 件)

① 上田 陽子、吉田 千春、爪 麻美、持田 京子、松尾 勲 「マウス着床後胚におけるライヘルト膜の力学的機能の解析」第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年

② 木村-吉田 千春、持田 京子、中谷 雅明、水谷 武臣、松尾 勲 「GRHL3 因子は核から細胞質へ局在を変えることで、機能的で弾性率に富んだ上皮細胞を誘導する」第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年

③ 大桑 良菜、大塚 瑞希、住吉 麻実、小河 穂波、木村-吉田 千春、松尾 勲、渡邊 利雄 「マウス Smap1, Smap2 二重欠損胚は原腸形成期において異常を示す」第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年

④ Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Takeomi Mizutani, Isao Matsuo “GRHL3 triggers epithelial morphogenesis from differentiation in uncommitted ectodermal progenitors during neural tube” International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells 2018, 2018 年

⑤ Mami Tsume, Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Yoko Ueda, Isao Matsuo “Regulation of cell fate via BET family proteins in mouse preimplantation embryos” International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells 2018, 2018 年

⑥ 爪 麻美、木村-吉田 千春、持田 京子、松尾 勲 「BET ファミリータンパク質を介したマウス着床前胚の細胞運命制御」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年

⑦ 木村-吉田 千春、持田 京子、水谷 武臣、松尾 勲 「神経管閉鎖時における *Grainyhead-like 3* 遺伝子発現表皮細胞の機能解析」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年

⑧ 大塚 瑞希、大桑 良菜、住吉 麻実、増田 成美、小河 穂波、木村-吉田 千春、松尾 勲、渡邊 利雄 「小胞輸送を制御する Arf GTPase 活性化因子 SMAP1 と SMAP2 の二重欠損胚におけるエンドサイトーシス経路の異常」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 2017 年

⑨ 松尾 勲、木村-吉田 千春 「マウス神経管閉鎖過程における *Grainyhead-like 3* の機能解析」Wnt 研究会 2017, 2017 年

⑩ Chiharu Kimura-Yoshida, Isao Matsuo “Surface ectoderm specification of uncommitted ectodermal progenitors in the neural plate border is crucial for neural tube closure” 50th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2017.

⑪ Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Kristina Ellwanger, Christof Niehrs, Isao Matsuo “Fate specification of neural plate border by canonical Wnt signaling and *Grhl3* is crucial for mammalian neural tube closure” 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年

⑫ Ryuji Hiramatsu, Isao Matsuo “Mechanical interaction among embryonic, extraembryonic and maternal tissues for the anterior-posterior axis formation in mouse embryos” EMBO work shop “Embryonic-Extraembryonic Interfaces” 2015 年

⑬ 渋川 幸直、山崎 奈津子、大門 江津子、木村-吉田 千春、持田 京子、松尾 勲、和田 芳直 「カルボニン3ノックアウトマウスの表現型解析」BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回

日本生化学会大会, 2015 年

⑭ 木村-吉田 千春、持田 京子、Kristina Ellwanger、Christof Niehrs、松尾 勲「神経管閉鎖過程におけるカノニカル Wnt 経路と *Grhl3* 遺伝子を介した未分化前駆細胞から表皮への細胞運命決定機構」BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会, 2015 年

〔図書〕(計 1 件)

① 松尾 勲

頭尾軸・背腹軸形成 pp.304-307

公益社団法人日本動物学会〔編〕『動物学の百科事典』

2018 年 9 月

平成 30 年 9 月 30 日発行 丸善出版

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.wch.opho.jp/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 吉田 千春

ローマ字氏名: Yoshida, Chiharu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。