

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0150

研究課題名(和文) マクロからミクロへ：トップダウンアプローチによる階層を超える形態形成の理解

研究課題名(英文) Morphogenetic mechanisms based on connecting cellular, tissue, and organ-level dynamics.

研究代表者

鈴木 孝幸 (SUZUKI, takayuki)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：40451629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ胚肢芽を用い細胞レベルから器官全体のレベルにおける変形の定量解析を行った。その結果、細胞の増殖や細胞集団における組織変形の異方性といった形態変化時の特徴量を定量的に取得する事に成功した。シミュレーションにより肢芽の形態形成には、肢芽全体に渡ってみられた組織変形の異方性が重要である事が分かった。これらの結果から、細胞-組織-器官の階層性を越えた統合的な器官全体の形態形成のメカニズムを理解するための方法論を構築出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでは脊椎動物の器官全体といった大きなスケールの形の出来方は研究する手法が無かった。今回我々は、細胞の動きや細胞の動きを制御しているメカニズム、また器官全体の形の変化をニワトリ胚の後ろ足の元になる肢芽(しが)という組織を用いて定量的に調べた。本研究成果は、今後試験管の中で器官全体を再生するときに、どのようにして形を制御してけば良いかを考えるための大きな一歩となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Tissue-level characterization of deformation dynamics is crucial for understanding organ morphogenetic mechanisms, especially the interhierarchical links among molecular activities, cellular behaviors and tissue/organ morphogenetic processes. We constructed tissue deformation maps for chick limb development with high precision, based on snapshot lineage tracing using dye injection. From the geometrical analysis of the map, we identified three characteristic tissue growth modes in the limb and showed that they are consistent with local growth factor activity and cell cycle length. We also found anisotropic tissue deformation along the proximal-distal axis. Morphogenetic simulation and experimental studies suggested that this directional tissue elongation, and not local growth, has the greatest impact on limb shaping. Our study marks a pivotal point for multi-scale system understanding in vertebrate development.

研究分野：発生生物学

キーワード：システムズバイオロジー 階層 発生 スケール 器官形成 定量

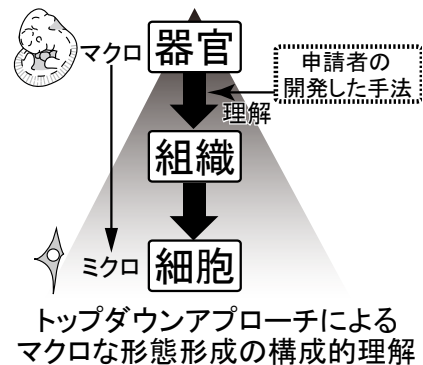
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の計測技術の急速な進展は、遺伝子発現や細胞内シグナルの時間変動、1細胞レベルでの細胞挙動を定量的に観測可能とした。そのため発生生物学の研究は、遺伝子の表現型を解析するだけでなく、形態形成における遺伝子の具体的な機能を探るための分子・細胞・組織・器官といった、対象とするスケールの階層間の動的関係性の理解へと研究対象が広がっている。しかしながら多くの脊椎動物の器官は大きく、全細胞の動態を一度に解析すること (Total cell recording) が難しいことから、器官全体の形態形成を細胞レベルの動態の観察から直接理解する事は未だに出来ない。このことは還元的手法を用いたボトムアップ型の階層上昇性の理解を目指すためには、新たなブレイクスルーが必要であることを示唆している。そこで我々は従来の共焦点顕微鏡を用いた観察ではもはや解析出来ない組織から器官全体のマクロな形態変化を解析する手法を構築したいと考えた。

2. 研究の目的

2014年に我々は、ニワトリ胚肢芽(手足の原器)の器官全体の形態形成をモデルとして用い、あえて細胞レベルの挙動を無視し肢芽を組織レベルの細胞集団の集合体として取り扱うことで単位時間当たりの肢芽全体の特徴的な変形パターンを定量的に抽出する手法の開発に成功した (Morishita and Suzuki, J. Theor. Biol., 2014)。この手法を用いると、形態形成過程で特に変形が大きく見られる領域 (モルフォジェネティックホットスポットと命名) が定量的に抽出でき、発生学的に詳細に解析すべき領域が明らかになる。そして注目すべき領域が明らかになれば、次にその部分のタイムラプス観察を行い細胞レベルの挙動を明らかにする。そこで本研究では、器官全体の形態変化を細胞レベルで理解するために、従来のミクロからマクロへの階層上昇性の理解を目指すのではなく、このようにマクロからミクロへのトップダウン的アプローチが有効であることを提案した (右図)。そこで我々は、次にモルフォジェネティックホットスポットに着目した肢芽の細胞レベルから器官全体のレベルにおける変形の定量解析を行う事で、細胞レベルから器官レベルの形態形成の理解をつなぎ、細胞-組織-器官の階層性を超えた統合的な肢芽の形態形成のメカニズムを理解したいと考えた。



3. 研究の方法

(1) ニワトリ胚後肢芽の成長過程において DiI と DiO の 2 種類の蛍光色素をランダムにタングステン針を用いてスポット上にラベルした。このスポットはおおそ 100 個程度の細胞集団をラベルする事が出来る。多点でラベルしたニワトリ胚をライカ FM802 蛍光実体顕微鏡を用いて写真撮影し、次にそのまま 12 時間再孵卵させ、もう一度写真撮影を行った。2 つの写真を比べて細胞集団の行き先を確認した。この操作をニワトリ胚後肢芽の長さが 500 μm の時から 12 時間おきに 7 回行い、指原器が見えるステージまでの細胞集団の行き先を確認した。1 つの肢芽の大きさにつき数個体同様に細胞集団のラベルを行い、コンピューターを用いて複数の個体のデータをまとめて各ステージにつき 1 つの肢芽のデータに集約してプロットを行った。

このデータを元に、コンピューター上で肢芽の内部を正方形の格子に区切り、ベイズ推定を用いて各場所における格子がどのように変形すれば 12 時間後のスポットの場所の変化を最も正確に説明出来るのか統計学的な解析を行った。この手法を 7 回行い、肢芽内部全体の変形パターンを定量的に解析した。

(2) (1) で得られたデータを元に、各位置における細胞集団 (格子) の 12 時間における増殖率と、どの方向にどれだけバイアスしてストレッチして変形したのか、という組織変形の異方性の 2 つの特徴量を計算した。次に得られたこれらの特徴量の肢芽全体の中でのスカラー値、もしくはベクトル量を計算し、値が高い場所をモルフォジェネティックホットスポットとして抽出した。

(3) 肢芽全体の細胞周期を調べるために BrdU と IddU の水溶液をニワトリ胚の直下に 1 mL のシリンジを用いて時間差で注入し取り込み実験を行った。その後、抗体を用いてそれぞれの薬剤が取り込まれた細胞の核を識別した。BrdU と IddU の水溶液の時間差から各組織の場所における細胞周期を計算により算出した。

(4) 肢芽の器官全体における細胞内シグナル伝達の値を定量的に評価するために SHH シグナル下流の転写因子である GLI3 の結合配列を不安定型エメラルドルシフェラーゼの遺伝子の 5' 上流に挿入したコンストラクトを作成した。この配列を RCAN ベクターに組み込みニワトリ胚にウイルスを感染させる方法を用いて遺伝子導入し、その後発光顕微鏡を用いて SHH の細胞内シグナル伝達の強さと場所を視覚化・定量化した。

(5) 肢芽内部における細胞内シグナル伝達を阻害するために、FGF シグナルの阻害剤である SU5402 及び SHH シグナルの阻害剤である Cyclopamine を吸着させたアクリルビーズをニワトリ胚肢芽にタングステン針を用いて移植した。その後孵卵を 24 時間行い (1) の手法を用いて移植した周囲の細胞増殖率と組織変形の異方性の 2 つの特徴量を定量的に計算した。

(6) 肢芽全体の形態形成に与える細胞の増殖率と組織変形の異方性の特徴量のどちらが形態形

成に重要であるのかを調べるために、シミュレーションを行った。Vertex モデルを用いて、細胞の増殖率を肢芽内部全体に渡って一定にし、組織変形の異方性の特徴量を測定した値を用いた場合と、細胞の増殖率を測定した値を用い、組織変形の異方性の特徴量を一定した場合の 2 つの条件において肢芽全体の形態がどのようになるのか解析を行った。

4. 研究成果

脊椎動物の各器官は大きく、器官全体の細胞の挙動を同時に解析することは共焦点顕微鏡を用いても不可能である。そこで我々はニワトリ胚の後肢芽を用いてあえてシングルセルレベルの細胞の挙動は追わず、細胞集団全体の変形過程を解析することでマクロな器官全体の形態形成過程を理解することを試みた。

まず研究の方法(1)で示した手法を用いて後肢芽の器官全体の細胞集団の変形過程を解析した(図1)。

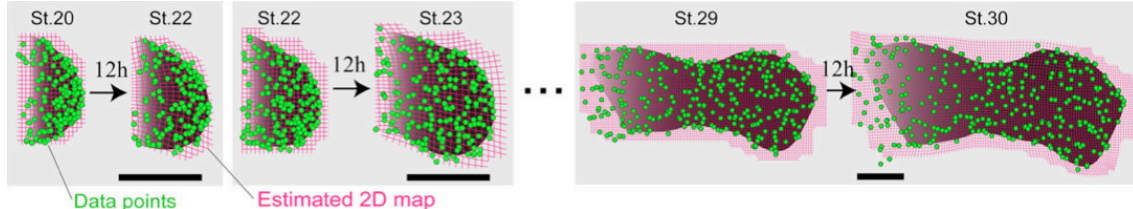


図1：複数の細胞集団の fate map をまとめて1つの図に表したもの

この結果、サイズ推定を用いて、ラベルされていない部分の細胞集団の変形過程を推定出来るようになった。またこの推定が正しい事は、実際に得られたデータセットの9割のデータを用いて格子の変形を推定し、推定に用いなかった1割のデータセットを用いて推定した変形が正しい事の評価を行い確認した。これらの結果から、肢芽全体の内部の細胞集団の変形過程を定量的に理解することができるようになった。

次に得られたデータを用いて各組織における細胞集団の増殖率を計算した(図2)

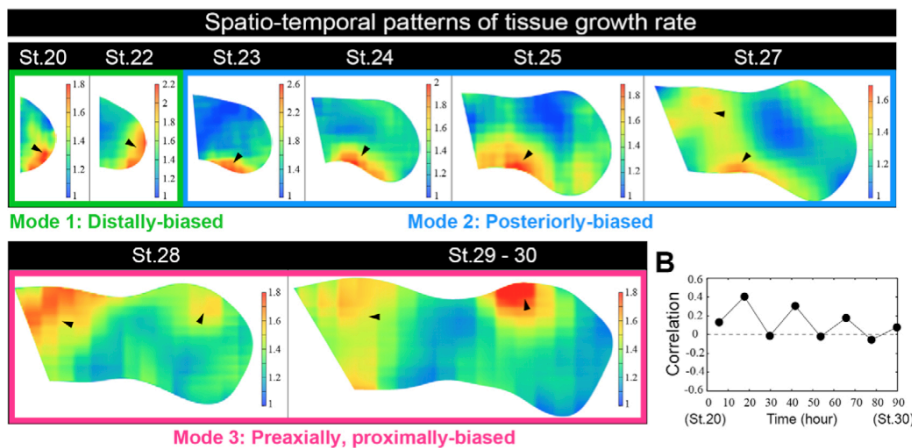


図2：各ステージにおける細胞集団の増殖率 B は遠近軸と前後軸で増殖率に相関はないことを示す。

その結果、細胞集団の増殖率が高くなる領域として3つの特徴的なモルフォジェネティックホットスポットの抽出に成功した。1つ目は緑色で囲まれた部分である後肢芽の形成初期に見られた先端に偏った増殖率が高い部分。2つ目は肢芽伸長期の後側に偏った増殖率の高い部分。そして3つ目は肢芽形成後期の親指の部分に偏った増殖率が高い部分である。これらの結果から、肢芽全体の細胞群は均一に増殖している訳ではなく、ステージによって異なる領域が偏って大きくなっていることが判明した。

図2で示した細胞集団の増殖率が高い部分は細胞周期が早く、細胞が分裂している割合が高い事が考えられた。そこで次に(3)の手法を用いて図2で見られたモルフォジェネティックホットスポットにおける細胞周期を定量化して算出した(図3)。その結果、細胞集団の増殖率は細胞周期の早さと相関があることが明らかとなった。このことから、細胞集団が大きくなる際には細胞外マトリックスの増大や、細胞自体が大きくなるのではなく、細胞自身の数が増える事が重要であることが明らかとなった。

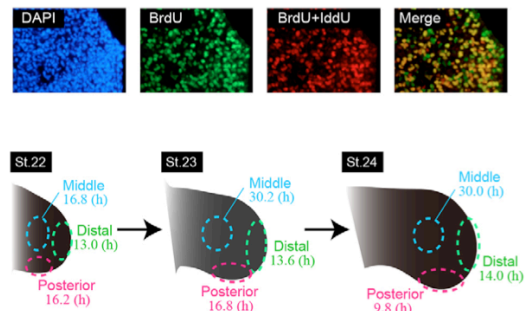


図3：細胞周期の定量化

次に、細胞集団の局所的な増殖率の増大がどのシグナルによってもたらされているのかを調べるために、図2の2つ目に示した肢芽の後側の部分で増殖率が高くなっている部分に着目し

た。この領域には細胞内にシグナル伝える伝達物質である分泌因子の SHH が発現していることが既に知られていた。そこで次に(4)の手法を用いて肢芽全体における SHH シグナル伝達の強度を *in vivo* で定量化する実験を行った。その結果、肢芽の後側の部分での SHH シグナル伝達強度は肢芽が形成され始めた時には弱く、ステージが大きくなるにつれて活性が強くなり、図 2 で示した 3 つ目の親指の領域に増殖率の増大部分が移った時には再び肢芽の後側で活性が弱くなっている事が判明した (図 4)。

この肢芽の後側の部分における SHH シグナルの強度と細胞集団お増殖率について相関があるのかを検討した結果、両者に強い相関関係が見られた。この結果から、肢芽の後側の細胞集団の増殖は SHH シグナルに由来したものである可能性が強く示唆された。

実際に肢芽内部において、肢芽の先端部分で発現している FGF のシグナルと、肢芽の後端で活性化している SHH のシグナルの活性を阻害剤を用いて阻害した結果、肢芽の後側部分の増殖率が SHH シグナルを阻害した時に有意に低下する事が判明した。これらの結果から、SHH シグナルが確かに肢芽の後側部分の細胞集団の増殖率の増加を誘導していることが明らかとなった。

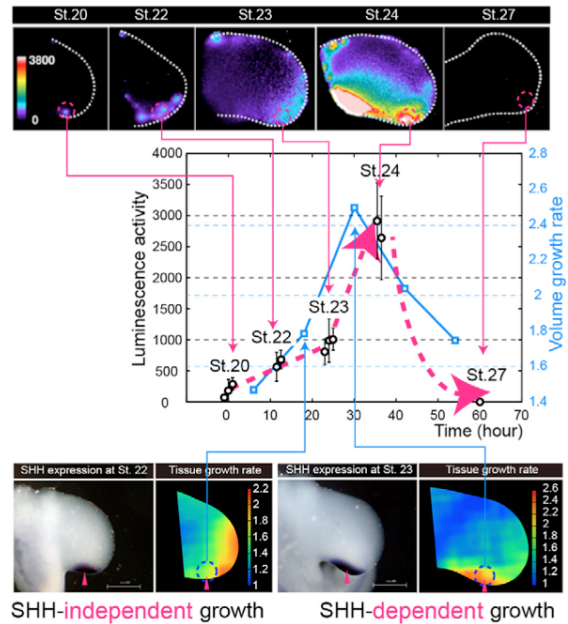


図 4: 肢芽における SHH シグナルの定量化

次に(1)の方法を用いて、肢芽全体における組織変形の異方性の特徴量を計算した。その結果、増殖率の結果とは異なり、ステージを通して組織変形の異方性が局所的に見られる領域は見つからなかった。しかしながら、我々は組織変形の異方性の方向が、全てのステージを通して、なおかつ肢芽全体に渡って遠近軸方向にバイアスしていることを発見した (図 5)。

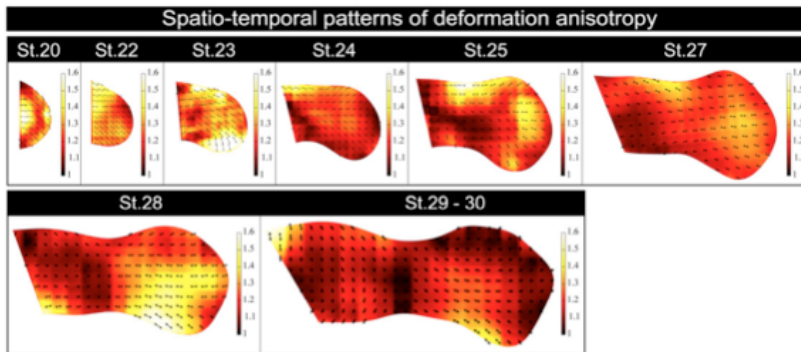


図 5: 各ステージにおける組織変形の異方性の値と方向

この結果は、肢芽全体の細胞集団が遠近軸方向にバイアスして伸長するために、肢芽が遠位方向にバイアスして伸長している可能性を強く示唆している。そこで次に、肢芽全体の形態形成に与える細胞の増殖率と組織変形の異方性の特徴量のどちらが形態形成に重要であるのかを調べるために(6)の方法を用いてシミュレーションを行った (図 6)。その結果、細胞の増殖率を肢芽内部全体に渡って一定にし、組織変形の異方性の特徴量を測定した値を用いた場合肢芽の遠近軸に沿った伸長はシミュレーションで再現されたが、細胞の増殖率を測定した値を用い、組織変形の異方性の特徴量を一定した場合肢芽の遠近軸に沿った伸長はシミュレーションで再現出来ず、肢芽が遠い方向に向かって伸長すると言う事はなかった。これらのシミュレーションの結果は、肢芽全体の遠近軸に沿った伸長には、細胞集団の増殖率ではなく、組織変形の異方性の特徴量が重要であると言う事を示している。

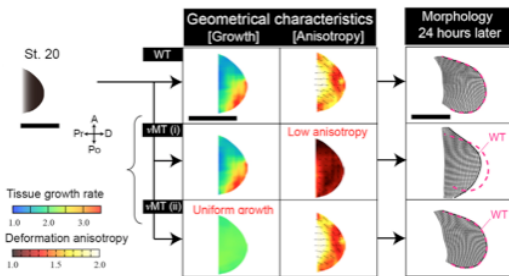


図 6: 特徴量を改変したシミュレーション

最後に、実際に細胞の増殖を阻害したときでも肢芽の遠近軸に沿った伸長が見られるのかを検討した。細胞増殖阻害試薬であるトリコスタチン A を処理した時に、組織変形の異方性が野生型と同様に保たれるかどうかを検討した。その結果、薬剤投与後 24 時間後でも肢芽は遠位方向に伸長し、組織変形の異方性も遠近軸方向に沿って見られる事が判明した。これらの結果は、組織変形の異方性には細胞増殖以外の要因が関わっている事を示唆している。

以上今回の研究により、私たちの手足は発生中の肢芽全体の組織が前後軸より遠近軸に沿ってバイアスして変形するために一方向に伸長することを明らかにした。この結果は、これまで報告されてきた細胞レベルの結果だけでは明らかにならなかった、細胞集団としてのマクロな挙動を解析した結果初めて明らかになった原理であった。これらの結果をまとめてDevelopment に発表した(Morishita et al., Development, 2015)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Suzuki T., Morishita Y. A quantitative approach to understanding vertebrate limb morphogenesis at the macroscopic tissue level. 査読有 Curr. Opin. Genet. Dev. 45, 2017, 108-114 doi: 10.1016/j.gde.2017.04.005.
- ② Morishita Y., Kuroiwa A., Suzuki T. Quantitative analysis of tissue deformation dynamics reveals three characteristic growth modes and globally-aligned anisotropic tissue deformation during chick limb development. 査読有 Development 142, 2015, 1672-1683 doi: 10.1242/dev.109728.

〔学会発表〕 (計 1 件)

- ① Kazuki Kawamura, Makoto Ono, Atsushi Kuroiwa, Yoshihiro Morishita, Takayuki Suzuki. Physical characteristics of epithelium during limb morphogenesis. 51st Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 2018 Tokyo

〔その他〕

ホームページ等

<https://animgenet.wixsite.com/avianbioscience/takayukisuzuki>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：森下 喜弘

ローマ字氏名：(MORISHITA, yoshihiro)

※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。