

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2017～2020

課題番号：17KT0021

研究課題名(和文) 1細胞遺伝子発現・力学動態の統合アプローチによる1個体発生原理の構成的理解

研究課題名(英文) Toward understanding of the principle of embryogenesis by an integrated approach of single-cell genomics and mechanics

研究代表者

近藤 武史 (Kondo, Takefumi)

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：60565084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞運命決定から細胞・組織の形態変化をつなぐ制御システムの大部分はまだまだブラックボックスのままである。これらの問題を解決するためには、発生過程の胚を対象として、(I)胚三次元空間に対応した1細胞トランスクリプトーム、(II)各細胞の変形に関する定量的情報と変形に寄与する応力状態、を明らかにし、両者の関係を理解する必要がある。本研究では、領域ごとに多様な形態形成運動を示すショウジョウバエ原腸胚をモデルとして、1細胞レベルの空間解像度を持つ全遺伝子発現カタログを構築した。さらに、上皮組織の三次元構造とその内部における力学状態の数値モデリングのための理論基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ショウジョウバエ原腸胚の1細胞レベルの全遺伝子発現空間プロファイルを、これまでにない精度で明らかにした。このデータを基盤として、データ駆動的も取り入れた研究をさらに進めることにより、細胞分化、遺伝子制御ネットワーク、形態形成といった発生メカニズムの仕組みについての理解がさらに深まり、さらに複雑な発生システムに存在する基本的な法則の解明へと繋がるのが期待できる。発生制御の基本メカニズムは動物種で広く保存されていると考えられることから、ショウジョウバエに限らず動物の発生メカニズムをより深く理解するための重要な情報基盤となることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Regulatory systems linking cell fate determination to cell and tissue morphogenesis still remain a black box. In order to solve these problems, it is necessary to clarify (I) the single-cell transcriptome corresponding to the three-dimensional position in embryos, (II) quantitative information on the deformation of each cell and the stress state contributing to the deformation, and to understand the relationship between them in the developing embryo. In this study, we constructed a whole gene expression catalog with single-cell spatial resolution using the *Drosophila* gastrula as a model, which shows diverse morphogenetic movements in each region. In addition, we clarified the theoretical basis for mathematical modeling of the three-dimensional structure of epithelial tissues and their internal mechanical states.

研究分野：発生生物学

キーワード：胚発生 ショウジョウバエ 上皮形態形成 1細胞RNA-seq 応力推定 イメージング

1. 研究開始当初の背景

動物の発生過程では、一層の細胞シートからなる上皮組織が秩序だって成長と変形を繰り返すことにより機能的な器官を作り上げていく。この上皮組織動態を制御する仕組みを理解することは各器官の成り立ちを理解する上で必須であり、器官再生の技術や幹細胞から人工器官を製作する技術を確立する際にも必要な基礎的な知見となる。

上皮組織の変形は、各細胞の形態変化が協調的に作用することによって作り上げられる自己組織化現象である。各細胞の形態変化は、①組織空間における位置情報の獲得と細胞運命の決定、②遺伝子発現制御、③物理的状态の変化、により規定される。代表者はこれまでに、ショウジョウバエ胚を用いて細胞運命の制御機構や、細胞変形により駆動される上皮組織形態形成の新規メカニズムを解明してきた (Kondo et al., *Science* (2010), Kondo & Hayashi, *Nature* (2013))。また近年の研究により、上皮細胞は細胞骨格やモーター分子、接着分子といった普遍的に発現する共通因子をうまく使い分けることで変形を制御していると考えられるようになってきている。

しかしながら、細胞運命決定から細胞・組織の形態変化をつなぐ制御システムの大部分はまだまだブラックボックスのままであり、一群の細胞集団が集合して自己を組織化し、器官を構築するシステムの解明にはいまだほど遠い。具体的には、①上皮組織の変形過程において、分化状態に応じて個々の細胞がどのような遺伝子発現状態を確立しているのか、②この遺伝子発現の組み合わせパターンがどのようにして細胞骨格やモーター分子など共通因子の使い分け、細胞の形態変化、さらには組織形態形成を規定しているのか、といった問題についてはほとんど理解が進んでいない。これらの問題を解決するためには、発生過程の胚を対象として、(I)胚三次元空間に対応した1細胞トランスクリプトーム、(II)各細胞の変形に関する定量的情報と変形に寄与する応力状態、を明らかにし、両者の関係を理解する必要がある。

2. 研究の目的

これまでの研究手法では、これらの情報を取得することは非常に困難であった。しかし、遺伝学・発生学を専門とする代表者とバイオメカニクス・力学モデリングを専門とする分担者はそれぞれショウジョウバエ胚原腸陥入期を対象とした1細胞 RNA-seq 技術と上皮組織の4次元画像データから細胞応力情報を推定する技術を新たに確立していた。そこで、本研究ではこれらの技術を基盤として、細胞がゲノム情報の発現状態を計算処理し、自身の形態変化をコントロールする規則を明らかにするためのより大規模かつ高精度な基盤情報および、より発展させた解析技術の構築を目指した。

3. 研究の方法

3.1: ショウジョウバエ原腸胚の三次元空間に対応した全遺伝子発現カタログの構築

1細胞 RNA-seq 法を用いて、ショウジョウバエ原腸胚の1細胞ごとのトランスクリプトーム情報の取得を行った。サンプル調製には、Fluidigm 社 C1 システムのハイスループット IFC による手法と、10x Genomics 社の Chromium システム (10x Chromium) による手法を用い、その解析結果の比較も行った。取得したデータについては、主に Seurat v3 を用いて解析し、低クオリティ細胞データのフィルタリング、データの標準化、教師なしクラスタリング、文献データを加味したアノテーションにより、各細胞データの特徴を抽出した。そして、クラスタごとに詳細なサブクラスタリング解析を行い、それらのマーカー遺伝子からアノテーションや胚三次元空間への対応付けを行った。さらに、Gene ontology データベースや Gene List Annotation for *Drosophila* (GLAD) データベースを用いて、どのような遺伝子群が細胞の特徴表現により強く寄与しているかについて解析した。また、胚前方の細胞運命が後方化する *bcd* ノックダウン胚の1細胞 RNA-seq を行い、コントロール胚と比較することにより、パターンニング・細胞運命決定と細胞・組織動態の関係性についての解析を進めた。

3.2: 1細胞 RNA-seq データの空間位置推定手法の開発

3.1 の空間対応づけでは、各細胞データを胚の空間的な分割領域に紐付けることはできたが、1細胞レベルの空間解像度で全遺伝子発現を再構成することはできない。そこで、すでに公開されている、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 解析により構築された 84 遺伝子の空間発現定量データを参照データとして、各1細胞 RNA-seq データの元の空間位置を高精度に推定し、それを元にして全遺伝子発現の細胞レベルでの空間パターンを再構成することを行った。そのための数理解析手法はこれまでも報告されていたが、その推定精度は必ずしも十分でなかった。これまでの手法の問題点の一つは、遺伝子発現を ON/OFF の状態に二値化することであった。そこで本田直樹博士との共同研究として、遺伝子発現を連続値のまま扱うことができる、生成モデルを基盤とした新規手法 Perler を開発した。そして、3.1 で新たに取得した1細胞 RNA-seq データと Perler を組み合わせることにより、より精度の高い細胞レベルでの全遺伝子発現の空間再構成を行った。

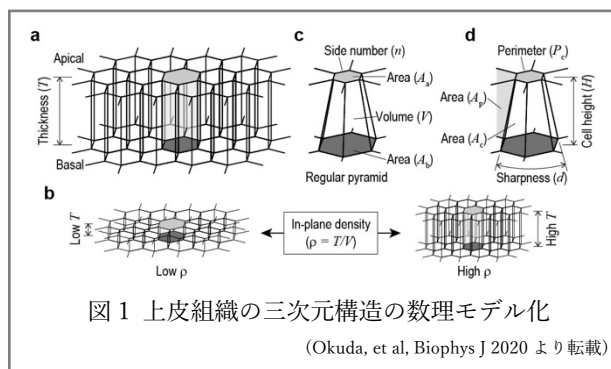
3.3: 上皮組織の三次元構造とその内部における力学状態の数理モデリング

顕微鏡観察により得られた画像データから、組織内部における細胞レベルの力学状態を予測するためには、組織を構成する上皮組織の三次元構造について、その内部の力学状態がどのようなものであるかを明らかにする必要がある。そこで、三次元空間における上皮組織の力学状態を1細胞レベルから解析した。

上皮組織は、パッキング構造と呼ばれる泡状の三次元構造を有する。上皮細胞は通常、頂端面と基底面の極性を有しており、これらの極性に沿った機械的な力が組織の三次元構造の維持に役立っている。この組織内部における力のつり合いが失われると、一部の細胞が先端面または基底面を失い、組織の外へ脱離することにより、組織の三次元構造は失われる。したがって、胚組織内部の力学状態を予測するためには、細胞の脱離を引き起こさずに上皮組織の三次元構造がどのように維持されているのかについて、1細胞レベルの力学的な解析が求められる。

本研究では、三次元頂点モデルを用いた上皮の三次元構造内部における力のつり合い状態を記述し、上皮組織の単層構造が維持されるための条件を探った。まず、着目する1細胞とその近傍の細胞が均質な力学的特性を持つ場合を考え、エネルギーランドスケープを解析的に計算することによって、上皮組織の機械的性質、細胞密度、トポロジーのそれぞれがその構造の力学的な安定性に及ぼす影響を検討した。次に、遺伝子発現の変化に従って、着目する細胞の頂端面、側面、基底面に能動的な力が発生する状況を検討した。

さらに、上皮組織の三次元構造として単純な幾何モデルを構築した。この幾何モデルでは、均一な厚さ T (>0) の平面状のシートの中に、平均体積 V (>0) の多面体で記述された細胞が埋まっている (図 1a)。この T をパラメータとして、シート内の細胞の面密度 ρ (>0) を定義した (図 1b)。シート内の個々の細胞の有効面積は V/T で与えられるので、細胞の面密度は $\rho = T/V$ となる。細胞の面密度は細胞のアスペクト比に対応しており、柱状 ($\rho \gg V^{-2/3}$)、立方状 ($\rho \approx V^{-2/3}$)、扁平状 ($\rho \ll V^{-2/3}$) のいずれかの状態をしている。簡略化のため、頂端面と基底面が平面内に拘束されていると仮定し、シート内の特定の細胞と第一隣接細胞のみを考慮し、他の細胞の位置は固定したままとした (図 1c, d)。この近似では、面内の細胞密度 ρ は、周囲の細胞の影響 (すなわち力学的環境) を反映している。



4. 研究成果

4.1.1 ショウジョウバエ原腸胚の1細胞RNA-seq解析

ショウジョウバエ原腸胚の1細胞トランスクリプトームを明らかにするために、まず C1HT を用いて1細胞RNA-seq解析を行い、1,243細胞分のデータを取得した。細胞あたりの UMI 数の中央値は 152,279 で、検出遺伝子数の中央値は 4,500 であった。このデータをクラスタ解析すると、12のクラスタが見出された。また、先進ゲノム支援のサポートを受けて、10x Chromium による解析も行い、7,314細胞のデータを取得した。細胞あたりの UMI 数の中央値は 22,506 で、検出遺伝子数の中央値は 3,222 であった。10x データのクラスタ解析では、19のクラスタに分類された。10x ではより多くの細胞のデータを取得できているが、細胞あたりのデータ深度は低い。つまり、細胞あたりの解像度が高いデータを取得するよりも、より多くの細胞データを取得する方が、細胞分類には重要であることが明らかになった。これは、最近の知見とも一致する (Zhang et al., Nat. Commun. (2020))。一方で、レア細胞の理解のためには深度の高いデータが必要であるとも言われており (Torre et al., Cell Syst. (2018))、両データをうまく組み合わせることによって、各細胞の理解が深まることが期待される。

この二つのデータの解析をさらに進めたところ、一部の Notch 標的遺伝子の発現が想定されるパターンとは異なることがわかった。その原因を解析したところ、胚から1細胞ごとに分離する過程でのトリプシン処理に起因することが明らかになった。Notch シグナルは発生制御における重要なシグナル伝達系の一つであり、この人為的な発現変動は今後のデータ解析・解釈に不具合を生じさせる可能性が高いと考えられたため、次にこの問題の克服を行った。

これまでの先行研究により、Cold Active Protease (CAP)を用いて低温下で細胞分離を行うことにより、人為的な遺伝子発現変動を抑制できることが報告されている (Adam, M., et al., Development (2017))。そこで、この手法のショウジョウバエ胚への適用を試みた。その結果、CAPによりショウジョウバエ胚から細胞を単離できること、Notch 標的遺伝子発現の人為的変動が抑えられることが明らかになった。さらに、CAPで単離した細胞を用いて 10x Chromium により 6,180細胞 (細胞あたりの UMI 数の中央値は 37,610 で、検出遺伝子数の中央値は 4,053) のデータを取得した。また、クラスタ解析では 21のクラスタが見出され、トリプシンデータよりもより細かな分類が可能であった。CAP データは本来の遺伝子発現を保持していると判断し、以降の解析にはこのデータを用いた。

4.1.2 各細胞の遺伝子発現特徴の抽出

上述の通り、10x CAP データに対して Seurat v3 を用いて SNN グラフを基にしたクラスタリング解析を行ったところ 21 のクラスタが見出された。さらに細かな分類を行うために、各クラスタのサブクラスタリング解析を行った。それにより、最終的に 65 の細胞種に分類することに成功した。これは、これまでに報告されているものよりも細かな分類を達成できており、新規に取得した 10x CAP データはより解像度の高い情報を含んでいると考えられた。各サブクラスタのマーカー遺伝子発現と既知の空間発現パターンとの関係を解析すると、各サブクラスタは胚の空間位置に対応することが明らかになった。

続いて、細胞間で発現のばらつきが大きい遺伝子(HVG)を 1,500 抽出し、GO エンリッチメント解析を行ったところ、核に局在する転写制御関連遺伝子と、細胞膜関連遺伝子が濃縮していた。さらに 1,500 の HVG を、GLAD データベースを基準にしてセット 1: 転写制御関連遺伝子群(TF)、セット 2: 細胞膜関連遺伝子群、セット 3: それ以外の細胞質遺伝子群に分割し、各遺伝子群がどの程度細胞種を分類する情報を持っているのか検討した。その結果、セット 1 では将来の三胚葉運命に対応した情報よりも胚空間位置に強く関連した情報が存在すること、セット 2 は三胚葉運命に加えて、各胚葉内で細胞種をより詳細に分類する情報を保持しているが、1 のような空間位置に関連した分類はされないことが明らかになった。また、セット 3 のみでも細胞を将来の三胚葉運命に区別するのに十分な情報が備わっていることもわかった。ショウジョウバエ原腸胚では、前後軸・背腹軸に沿ったモルフォゲン勾配に従って各細胞が位置情報を獲得し、それにより特定の転写制御因子の発現が始まる。そして、転写因子の作用により下流の遺伝子発現状態が決まり、その後の細胞分化や形態形成が進行すると考えられている。本解析の結果は、転写制御因子群の階層では、上流の空間勾配情報が残っており、空間勾配情報を分離した将来の細胞運命の方向へと変換する中間状態であることが示唆された。そして、各細胞で特異的に発現する転写制御因子の組み合わせ作用により、非線形的に、三胚葉分離を含む将来の細胞運命に対応した下流遺伝子群の発現様式へ変換されることによって、細胞分化および形態形成のパターンが制御されていると考えられた。

4.1.3 *bcd* ノックダウン胚の 1 細胞 RNA-seq 解析

上流の位置情報は遺伝子調節ネットワークを介して細胞分化や形態形成を規定する。上流シグナルの異常により、ある細胞型から別の細胞型への変換が誘導され、形態形成のパターンも変化する。しかし、このような細胞運命の転換は、TF をコードするいくつかのマーカー遺伝子の発現の変化によって評価されており、細胞が全トランスクリプトームのレベルで変換したかどうかは明らかではない。例えば、ショウジョウバエ *bcd* 変異体では胚前方が後方化する。しかし、この後方化は限られたマーカー遺伝子でのみ評価されており、この形質転換がトランスクリプトームのレベルで起こるかどうかはまだ不明である。また、*bcd* 変異体の前部のマーカー遺伝子発現履歴は最元の後部領域とは異なっているため、この履歴の違いはトランスクリプトームレベルでの最終状態に影響を与える可能性があり、前部と後部の両方の性質の混合状態である細胞が存在する可能性がある。

この点を明らかにするために、*bcd* ノックダウン胚の 1 細胞 RNA-seq 解析を行い、細胞種の構成およびそれらのトランスクリプトームを野生型胚と比較した。*bcd* ノックダウン胚では、頭部外胚葉や中胚葉、前方内胚葉のような野生型胚の前部領域に属する細胞型が同定できなかった。次に、*bcd* ノックダウン胚データを野生型データと統合し、解析を行ったところ、*bcd* ノックダウン胚では野生型胚には存在しないような新規細胞型は存在しなかった。そして、*bcd* ノックダウン胚における後方クラスタに割り当てられた細胞の比率は、野生型胚におけるそのほぼ 2 倍であった。以上から、*bcd* ノックダウン胚の前部領域はトランスクリプトームのレベルで完全に後方化しており、混合状態の細胞は存在しないことが示された。そして、*bcd* ノックダウン胚の前方領域は、本来の後方領域の遺伝子発現パターンをトランスクリプトームレベルで獲得することによって、後方領域の形成運動を行うことができると考えられた。

4.2.1 細胞 RNA-seq データから遺伝子発現空間パターンを再構成する新規手法の開発

1 細胞 RNA-seq では細胞を一度ばらばらに分離するため、取得した各細胞のデータには胚における空間情報は残されていない。4.1.2 での解析結果から、各細胞データの元の空間位置を 65 の領域のレベルで推定することはできたが、ショウジョウバエ原腸胚を構成する約 6,000 細胞のトランスクリプトームを、空間位置と対応させて 1 細胞レベルの解像度で再構成することはできていない。そこで、本田直樹博士との共同研究として新たな機械学習手法 Perler を開発した。アプローチとしては、in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 解析により明らかになっている 84 のランドマーク遺伝子の発現空間パターンを参照データとして、1 細胞 RNA-seq データの元の位置を推定し、全遺伝子の空間発現パターンを 1 細胞レベルで再構成するというものである。これまでにも同様の手法は開発されていたが、Perler による再構成結果は、その精度で他を上回るものであった。さらに、ISH データと 1 細胞 RNA-seq データはわずかにサンプリングの発生タイミングが異なっており、いくつかのランドマーク遺伝子はその発現パターンが異なっているが、Perler を用いると ISH データに過適合せずに、1 細胞 RNA-seq の時間情報を保持したまま遺伝子発現の再構成を行うことができることも明らかになった。これは、他の手法とは異

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 1件）

1. 著者名 Okuda Satoru, Kuranaga Erina, Sato Katsuhiko	4. 巻 116
2. 論文標題 Apical Junctional Fluctuations Lead to Cell Flow while Maintaining Epithelial Integrity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1159-1170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2019.01.039	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 -

1. 著者名 Okuda Satoru, Fujimoto Koichi	4. 巻 118
2. 論文標題 A Mechanical Instability in Planar Epithelial Monolayers Leads to Cell Extrusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 2549 ~ 2560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2020.03.028	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 -

1. 著者名 Yasushi Okochi , Shunta Sakaguchi , Ken Nakae , Takefumi Kondo, Honda Naoki	4. 巻 -
2. 論文標題 Model-based prediction of spatial gene expression via generative linear mapping	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 (in press)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shunta Sakaguchi, Chiharu Tanegashima, Osamu Nishimura, Mitsutaka Kadota and Takefumi Kondo
2. 発表標題 Toward understanding the relationship between transcriptome profiles and cell behaviors underlying epithelial morphogenesis
3. 学会等名 The 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shunta Sakaguchi, Chiharu Tanegashima, Osamu Nishimura, Mitsutaka Kadota and Takefumi Kondo
2. 発表標題 上皮形態形成におけるトランスクリプトームと細胞挙動の関係の理解に向けて
3. 学会等名 定量生物学の会 第9回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunta Sakaguchi, Chiharu Tanegashima, Osamu Nishimura, Mitsutaka Kadota and Takefumi Kondo
2. 発表標題 Toward understanding the relationship between transcriptome profiles and cell behaviors underlying epithelial morphogenesis
3. 学会等名 Kyoto University the 17th International Student Seminar
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥田覚
2. 発表標題 細胞脱離を引き起こす上皮シートの力学不安定性に関する解析的理論
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥田覚
2. 発表標題 1 細胞統合モデリングによる三次元組織形成の予測
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	奥田 覚 (Okuda Satoru) (80707836)	金沢大学・ナノ生命科学研究所・准教授 (13301)	

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
---------	---------