

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12054

研究課題名(和文)複雑な器官形態を実現する細胞集団運動方向のスイッチング機構-力学応答の観点から-

研究課題名(英文) Directional switching mechanism of collective cell behaviour for complex organ morphology

研究代表者

大塚 大輔 (Ohtsuka, Daisuke)

大阪公立大学・大学院理学研究科・特任研究員B

研究者番号：40632865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SHH遺伝子欠損で起こる先天性奇形の代表例として左右の眼組織の融合が見られる単眼症が挙げられる。本研究では形態異常を引き起こす物理的なプロセスを明らかにすることを目指した。まず、形態形成に関与する細胞極性について調査を行なった結果、SHHシグナル依存的に細胞は極性を持つことが明らかとなった。さらに、SHHシグナル阻害時には細胞集団運動の方向性がランダム化されることも明らかとなった。最後に、細胞集団運動の方向性決定と細胞の力覚の関係性について調査したところ、SHHシグナル阻害時の単眼症様の形態異常は細胞の力覚能の欠損による細胞集団運動方向の異常により引き起こされていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではSHHシグナル経路の形態形成における新規の役割を明らかにすることができた。SHHシグナルは細胞に力覚能(組織にかかる力を感じて、細胞の応答を変化させる能力)を付与することで細胞集団運動の制御に関与することが明らかとなった。近年、形態形成研究分野においては組織にかかる力が細胞増殖や細胞分化状態に影響することが明らかとなっているが、形態形成に重要な役割をもつモルフォゲンとの対応関係についてはほとんど明らかとなっていなかった。本研究成果はモルフォゲンと力を繋ぐ知見を提供できたと考えている。また、形態異常が生じる機構を理解できたことで、将来的な治療のための基盤となりうると考えている。

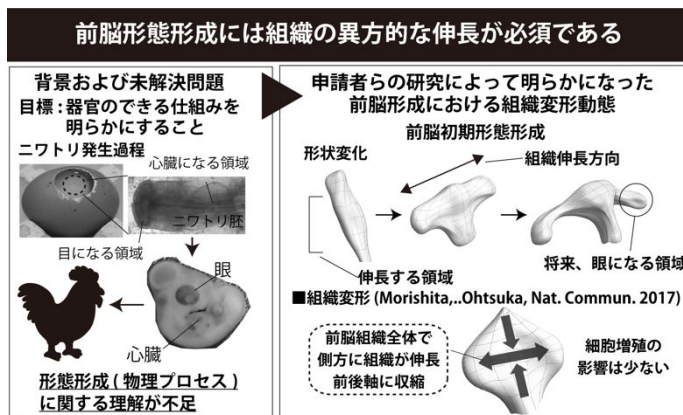
研究成果の概要(英文)：Holoprosencephaly (HPE) is a typical example of a malformation associated with SHH gene deficiency, and severe cases of HPE have cyclopia. It is not clear what kind of cellular movements form the malformation. In this study, we aimed to elucidate the pathogenic mechanism of cyclopia. First, we investigated the localization of phosphorylated myosin (pMLC), which is involved in epithelial morphogenesis. We found that pMLC was oriented perpendicular to the direction of optic vesicle (OV) elongation in SHH dependent manner. Furthermore, SHH inhibition suppresses the OV elongation by causing cells to lose the polarity in their movement. Finally, we examined the relationship between the directional decisions of cell motion and mechanosensation. Taken together, cyclopia-like phenotype is formed by randomization of the direction of collective cell motion due to a defect in mechanosensation.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 4Dイメージング

1. 研究開始当初の背景

生物が持つ複雑な形状を有する器官は一方向的な組織の伸長だけでは達成されず、伸長方向が時と場所に応じて切り替わることで、固有の形態が形成される。これまでの多くの研究では特定の短い phase に着目することで、単一方向への伸長などの細胞集団運動の分子・細胞機構が明らかとなってきた。しかし、伸長方向が切り替わらなければ、単純な構造が形成されるのみで、複雑な器官形状は形成されない。



よって器官形態形成機構を明らかにするためにはある方向性を持った集団運動がどのように終了し、次のイベントへと遷移あるいはスイッチするのか、つまり集団運動方向のスイッチング機構を明らかにすることが必須である。こうした背景の下、本研究ではニワトリ胚神経管形成過程を具体例に細胞集団運動方向のスイッチング機構の解明を目指す。申請者はこれまで、ニワトリ前脳形態形成過程（主に眼胞の形成と伸長に着目）を対象に、多階層動態の定量解析を行ってきた。その結果、前脳領域固有の形態は脳の組織全体が側方方向 (medio-lateral: ML) に伸長し、その垂直方向には収縮するという異方的な変形のみ(増殖には非依存)によって実現されていること、さらにそれが細胞集団の方向特異的な再配列によって実現されていることを明らかにしてきた (Morishita\*,...,Ohtsuka\* (\*equally contributed), *Nature communications*, 2017)。

では、上記の細胞集団運動の方向性はどのように決定されているのか？ 申請者らは器官形状に由来する組織内応力が細胞集団運動の方向性を決定しているとの作業仮説をたて、研究を進めてきた。まず、有限要素法を用いた力学シミュレーション（閉じた神経管内部には脳脊髄液が満たされているため、等方的に静水圧がかかることを仮定している）により組織内の応力方向を計算した。その結果、前脳組織全体において前後軸方向に異方的な組織応力が存在することが明らかとなった。レーザーアブレーション法を用いた実験的なアプローチからも、前後軸方向に引張応力が存在することが明らかとなった。さらに、上皮組織において力学刺激に応答することが報告されているリン酸化ミオシンの配向性は組織応力の方向性と一致していることも明らかとなった。作業仮説を実験的に証明するために、前脳組織を切り出し、任意の方向に外力を付加できる実験系を構築し、組織内応力方向依存的に細胞集団運動が決定されているのかを検証した。その結果、器官形状から予想される組織内応力方向に力学刺激を与えると、通常の胚発生でみられるリン酸化ミオシンの配向性および細胞集団運動が確認された。これらのことから、眼胞の伸長過程における方向性決定には器官形状に由来する組織応力が必須であることが示唆された。面白いことに、この「眼胞の形成と伸長」の一つ前のイベントである「神経管の伸長と閉鎖」では、眼胞の伸長方向とは直交する方向(前後軸方向)に組織は伸長し、さらにリン酸化ミオシンの配向性や細胞の再配列の方向も眼胞形成時のそれとは直交することが知られている (Nishimura *et al.*, 2012, *Cell*)。このような細胞集団運動方向のスイッチング機構を分子、細胞、組織の各階層動態の定量計測・解析から明らかにすることは、普遍的な器官形態形成機構を理解するための良い対象となるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

3次元的な器官形態形成と細胞の集団運動方向の関連性、また運動方向のスイッチ機構に注目する動機は、申請者がこれまでに行ってきた各階層での動態の定量解析に基づいており、前脳初期発生過程を理解する上での本質を捉えていると考える。これは従来の定性的な分子・細胞生物学的アプローチとは大きく異なり、本研究提案の最も独創的な点である。また、他の器官においても伸長方向の変化という現象（例えば肺発生では前後方向へ伸長する前腸から肺芽が腹側方向に突出する）は多く見られるため、普遍的な形態形成機構を理解する上で重要な知見となりうる。

### 3. 研究の方法

#### (1) SHH シグナル経路の阻害

SHH シグナル経路の阻害はサイクロパミンという化合物をニワトリ胚に添加することにより行った。サイクロパミンの存在下で発生させ、その後の形態を観察し、正常発生時のニワトリ胚の形状との比較を行った。

#### (2) 細胞形状およびリン酸化ミオシンの極性の解析

上皮の形態形成機構に関与することが報告されている phosphorylated myosin regulatory light chain (pMLC: リン酸化ミオシン) の局在パターンと SHH シグナルの関係性について免疫染色法を用いて解析を行った。

#### (3) 細胞集団運動の解析

蛍光タンパク質遺伝子を有するプラスミド DNA をエレクトロポレーション法によって、ニワトリ神経上皮細胞に導入し、細胞核または細胞膜をラベルした。二光子顕微鏡を用いて、蛍光ラベルされた細胞を持つニワトリ胚に対してシングルセルレベルでのタイムラプスイメージングを行い、細胞軌道のデータを取得した。これらのデータから研究協力者（森下喜弘チームリーダー、理研 BDR）の協力を得て、細胞動態の定量解析を行った。

#### (4) 外力負荷装置を用いた組織内方向場決定機構の解析

組織内応力が細胞集団運動の方向性や分子の配向（方向場の決定）に関与するのを実験的に検証するために、外力負荷装置を用いて解析を行った。具体的には、任意の方向に外力を負荷し、リン酸化ミオシンの配向性および細胞集団運動の計測を行うことで評価した

### 4. 研究成果

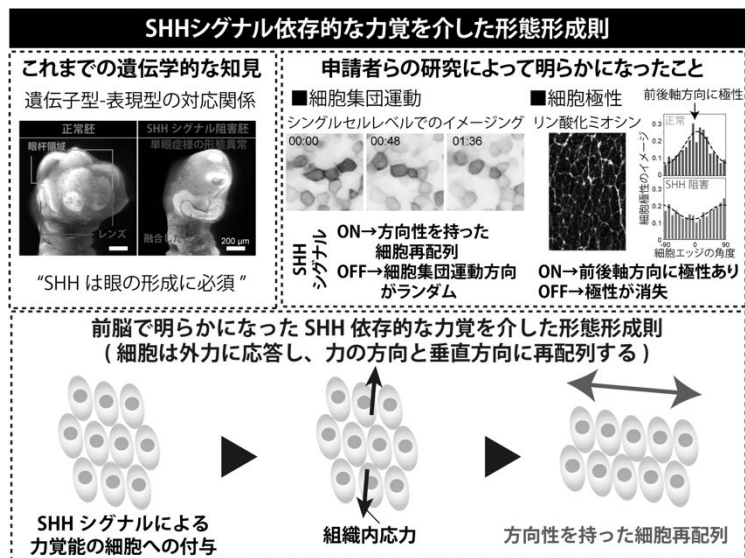
本研究の究極的な目標としては普遍的な形態形成機構を分子・細胞レベルで明らかにすることである。具体的な研究課題として取り組んだこととしては申請者がこれまでに明らかにしてきた前脳の形態形成に必須の方向性を持った組織伸長および細胞の再配列がどのようなメカニズムによって達成されるのかを明らかにする研究である。モルフォゲンのひとつである SHH 遺伝子の欠損は前脳の形態異常（左右の目が融合して単眼症様の形態となる）を示すことが明らかとなっていたが、物理的なプロセス、特に方向性を持った組織伸長や方向性を持った細胞再配列にどのように影響するのかが明らかになっていなかった。そこで、本研究課題では前脳形態形成過程における SHH シグナルの役割に着目し研究を行い、その結果をまとめて論文として発表した (Ohtsuka et al., 2022 Science Advances)。

以下では具体的な成果について項目ごとに記述する。

#### (1) 前脳形成における SHH シグナルが影響するステージの特定

SHH シグナルが前脳形成のどのステージに最も影響を示すのかを明らかにするために、阻害剤の添加実験を行った。その結果、発生の初期から SHH シグナルを抑制し続けると、神経管の形成や眼胞原基の形成は正常に起こるが、眼胞の伸長が著しく阻害され、最終的に顔の中央で左右のレンズが融合し、単眼症様の表現型となった。次に、眼胞が十分に伸長した後に SHH シグナルを抑制すると、左右のレンズ間距離は正常胚に比べて若干短くなるものの、レンズの融合は起きなかった。これらのことから、眼胞伸長期に SHH シグナルが抑制されることが単眼症の発症には十分であることが明らかとなった。

#### (2) SHH シグナル依存的な細胞極性の形成



以下では具体的な成果について項目ごとに記述する。

#### (1) 前脳形成における SHH シグナルが影響するステージの特定

SHH シグナルが前脳形成のどのステージに最も影響を示すのかを明らかにするために、阻害剤の添加実験を行った。その結果、発生の初期から SHH シグナルを抑制し続けると、神経管の形成や眼胞原基の形成は正常に起こるが、眼胞の伸長が著しく阻害され、最終的に顔の中央で左右のレンズが融合し、単眼症様の表現型となった。次に、眼胞が十分に伸長した後に SHH シグナルを抑制すると、左右のレンズ間距離は正常胚に比べて若干短くなるものの、レンズの融合は起きなかった。これらのことから、眼胞伸長期に SHH シグナルが抑制されることが単眼症の発症には十分であることが明らかとなった。

#### (2) SHH シグナル依存的な細胞極性の形成

近年、SHH は上皮の形態形成機構に関与することが報告されている phosphorylated myosin regulatory light chain (pMLC: リン酸化ミオシン)を制御することが報告されてきた。前脳では、脊索前板およびその直上の神経管の腹側で SHH が発現し下流因子を制御していることが知られている。そこで、まず、pMLC と SHH シグナルの関係性について調査した。その結果、正常時の前脳腹側組織においては組織の伸長方向と垂直にリン酸化ミオシンが強く配向することがあきらかとなった。一方、SHH シグナルの阻害条件ではリン酸化ミオシンの細胞のエッジへの局在自体は見られたが、配向性のみが消失した (ランダムな局在となった)。この腹側組織での pMLC の配向性は形態形成にどのように影響するのか? この問いに対する答えとして、申請者らは興味深いことを発見した。前脳領域の腹側または背側を切除した時に、細胞動態が大きく異なっていた。驚くべきことに腹側組織は背側組織が切除された状態であっても側方への組織伸長 (および前後軸方向への収縮) が見られ、それらは方向性を持った細胞集団運動により達成されること (自律的形態形成能) が明らかとなった。さらに、SHH シグナルを阻害すると、この方向性を持った細胞集団運動と自律的な組織変形は消失した。一方、SHH シグナルを受けない背側組織では腹側組織で見られるような組織伸長はおこらなかった (細胞自体の運動が消失したわけではなく、運動の方向性に関する配向が弱いためと考えられる)。

### (3) SHH シグナルは細胞に力覚を与える

では、細胞集団運動の方向性はどのように決定されるのか? 最近研究が進んでいるメカノバイオロジーの分野では、ミオシン活性や細胞運動と、その細胞が位置する組織内の「力」との関連が注目されている。そこで、神経上皮組織に対して人工的に力を加えたときに、細胞内のミオシン活性の局在や細胞の運動にどのような影響があるかを調べた。具体的には神経管の前脳領域腹側組織を切り取り、組織伸展装置に貼り付けて、組織を引っ張ることで、組織内に特定方向の引張応力を発生させ、細胞の力学応答を観察した。その結果、正常な組織では、ミオシン活性は力と平行な方向の細胞エッジに強く局在した。つまり、細胞は力の方向を感じ取ることができることがあきらかとなった。さらに驚いたことに、各細胞の運動方向は、組織全体 (細胞集団) が力と垂直方向に伸長するように調節されていた。これらの外力負荷実験の結果から、SHH シグナルは、細胞に力覚 (周囲からの力を感じ応答する能力) を付与することで、細胞が力の方向を認識し自身の運動方向の決定を可能にするという、SHH シグナルの新しい機能を発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohtsuka Daisuke, Kida Naoki, Lee Sang-Woo, Kawahira Naofumi, Morishita Yoshihiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Cell disorientation by loss of SHH-dependent mechanosensation causes cyclopia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abn2330	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚大輔
2. 発表標題 SHH signaling regulates the directional cell motion through cellular mechanosensation
3. 学会等名 55th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists in Kanazawa
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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