

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2012

課題番号：21247035

研究課題名（和文）器官ネットワーク形成における細胞の空間配置

研究課題名（英文）Spatial regulation of cells during organogenesis

研究代表者

高橋 淑子 (TAKAHASHI YOSHIKO)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：10183857

研究成果の概要（和文）：

組織や器官が正しく連携するためには、それらが体内で正しい位置に配置される必要がある。本研究では、組織や器官の体内配置の初期過程のしくみを明らかにすることを目的として、神経堤細胞（以下 NC 細胞とよぶ）をモデルとした解析を行った。特に NC 細胞がダイナミックに移動しながら目的のポジションに辿り着く制御機構に注目し、NC 由来の色素細胞と交感神経系細胞の挙動を解析した。遺伝子操作、組織移植、細胞移動ライブイメージングなどに関し多数の新規方法論を開発し、NC 細胞の移動には、非 NC 細胞との相互作用が極めて重要な役割を担っていること、またこれらの相互作用の破綻が各組織の空間配置を乱すことなどを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

During development, cell differentiation and tissue formation need to proceed at the right time and right space. The aim of this research is to understand how cells and tissues are correctly distributed in the developing embryo. We address such questions with a particular focus on neural crest cells, which undergo dynamic migration after emigrating from the neural tube. We found that neural crest cells intimately interact with non-neural crest cells, and also that complex molecular cascades are involved in such interactions. The cellular and molecular mechanisms revealed in this study are expected to be shared by other morphogenetic processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2010 年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2011 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2012 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
総計	35,200,000	10,560,000	45,760,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：器官ネットワーク、神経、血管、細胞挙動、空間配置

1. 研究開始当初の背景

一つの受精卵から始まる個体発生の過程では、細胞分化や組織構築など、複雑なステップが時空間的に正しく制御される必要があ

る。近年の分子発生生物学の発展により、細胞分化を制御する転写遺伝子の理解は大きく進んだ。そこでは *in vitro* での培養細胞およびノックアウトマウスを用いた研究が大

きな貢献をした。しかしながら、体の中で細胞がどのようなしくみで正しい空間配置をとるのかといった3～4次元的な観点からの研究は少ない。その理由の一つとして、個々の細胞の挙動を胚内で直接的に解析するモデル系が少なかったことが挙げられる。

NC細胞は発生初期に出現し、体内をダイナミックに移動しながらさまざまな細胞に分化する特殊な細胞群である。NC細胞の細胞系譜解析に関しては、ルドワランのグループが中心となって精力的な解析が進められてきた。一方で、NC細胞がどのようなしくみで体(胚)内を移動するかについての報告は少ない。というのも、NC細胞が移動する際、異なる多くの組織と相互作用すると思われるが、このような複雑系をモデル化する解析系がほとんど無かったからである。具体的には、NC細胞を特異的にかつ長期間にわたって遺伝子操作する方法が無かったこと一つの要因であろう。加えてNC細胞は、体の前後軸に沿って異なる細胞腫を生み出すため、体(胚)内の特定の領域に特化したNC細胞を対象とする解析方法が待たれていた。

2. 研究の目的

NC細胞の移動制御機構の理解が、体(胚)内における細胞の空間配置のしくみの理解に直結すると確信して、NC細胞移動に関わる組織間相互作用およびその分子制御機構の解明を目的とした。NC細胞の研究にはニワトリ胚が最強のモデル動物である。ニワトリ胚体幹部のNC細胞は、色素細胞、感覚神経、そして交感神経節などに分化することが知られている。いずれにおいても、それぞれ決まったルートを移動して、正しい細胞分化を遂げる。

NC細胞の移動機構の解析にあたり、以下の4つの課題を克服する必要があった。①NC細胞を長期的に遺伝子操作する方法論の確立。②NC細胞の移動の過程では、時間軸にそって次々と異なる細胞・組織と隣接する。これらの複雑系を理解するための、時期特異的な遺伝子操作法の確立。③NC細胞の移動の過程で隣接する非NC細胞(組織)との相互作用を知るために、NC細胞と非NC細胞との選択的な操作法の確立。④胚内における細胞移動を直接的に可視化し、そのダイナミズムを正確に理解するためのライブイメージング法の確立。

これらの4つの課題を克服して、主に色素細胞と自律神経系(交感神経系)の前駆細胞の胚内挙動に関して、下に述べる成果を得た。

3. 研究の方法

前述の課題①～④の解決のための方法を記す。

① NC細胞を長期的に遺伝子操作する方法

論の確立。

我々が体節中胚葉を用いてすでに確立していたTolトランスポゾン法(Sato et al., 2007, Dev. Biol)をNC細胞解析に適用した。その際、NC細胞特異的に発現するSox10のエンハンサーを組み合わせるなどの工夫をした。

② 時期特異的な遺伝子操作法の確立

我々が体節中胚葉を用いてすでに確立していたTet-on法(Watanabe et al., 2007, Dev. Biol)をNC細胞解析に適用した。

③ NC細胞と非NC細胞との選択的な操作法の確立。

色素細胞の解析にあたり、色素細胞の移動経路である表皮細胞を、レトロウイルス法を用いて特異的に操作した。交感神経系の移動経路に関しては、最初の移動ターゲットである背側大動脈の移植操作および血管特異的DNAトランスフェクションを行った。トランスフェクション法はすでに他のグループより報告があったが、本研究で効率のさらなる最適化を行った。

④ 胚内における細胞移動のライブイメージング法の確立

色素細胞に関しては、孵卵2日目胚のNC細胞にEGFP遺伝子をエレクトロポレーション法で導入・発現させ、それらを7～11日目胚まで発生させたのち、表皮組織を切り出して共焦点顕微鏡観察を行った。交感神経節は胚内の深い部位であるため、一旦培養皿に取り出して、共焦点顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

4-1: 色素細胞の空間配置解析

色素細胞の挙動研究は長い歴史をもつ。しかし、培養された色素細胞への遺伝子導入は特別な例をのぞきほとんど成功していない。(色素細胞特有の形質膜成分が原因と思われる)。そこで我々は、色素細胞の前駆細胞であるNC細胞にEGFP遺伝子を導入することで、色素細胞の遺伝的標識に初めて成功した。それらのライブイメージング解析を行ったところ、極めてダイナミックな挙動が観察された。7日目胚では細胞は非常に長い突起をもち、それらを伸長・退縮させながら表皮直下を移動する。また少し発生が進むと、色素細胞の形質膜は水疱状の形態を呈した。この様子は、培養された色素細胞では全く報告がない。さらに発生が進んで、色素細胞がメラノソームを放出する際には、形質膜が小胞としてちぎれるという瞬間を捉えることに成功した。

これら一連の過程で、色素細胞は胚内において均等配置することがみえてきた。このことは、一旦取り出したEGFP標識色素細胞を塊状にして再度宿主胚に移植しても、やがては均等に配置されることから確認された。細胞機能レベルでは、細胞が長い突起を出し

ながら、隣合う色素細胞との距離を測るような機構が考えられる。このような細胞間相互作用は色素細胞-表皮細胞の間には起こらないことから、同種細胞同士の反発作用が均等配置を可能にしていると思われる。現在はこれらの可能性の検証のため、種々の反発因子と均等配置との関係を解析中である。さらには、色素細胞の挙動と隣接する表皮細胞との相互作用を解析するために、これら両者を区別して遺伝子操作する方法を確立するなど、in vivo における色素細胞をとりまく組織間相互作用の研究に道を開くことができた。

色素細胞の挙動を直接的に可視化した研究は本研究が世界初であり、多くの新規知見が得られた意義は高い。

4-2 : 交感神経系の空間配置解析

トリ胚においては、18体節~24体節レベルのNC細胞は、交感神経節と副腎髄質に分化する。しかしこれらの分化は胚内を長距離移動したのちに起こるため、その仕組みは長年謎であった。両者の細胞は、初期移動の過程では共通の前駆細胞として移動し、背側大動脈に達した後に分離して、交感神経節は大動脈付近にとどまる一方で、副腎髄質細胞は腹側へと移動をつづける。我々は本研究をとおして、交感神経節-副腎髄質共通細胞の移動にはケモカインSDF1とNeuregulin1が誘引因子として働き、また後期の副腎髄質の腹側移動にはNeuregulin1のみが作用することを突き止めた。副腎髄質の移動における副腎皮質の関与に関しては、国際的に相対立する議論もあったが、我々の解析データはその議論にある一定の決着をもたらしたと考えている。というのも副腎髄質の移動には、副腎皮質と他の組織の両方が関与することがわかったからである。副腎皮質形成不全のノックアウトマウスの解析からでは、わかりにくかった知見である。

4-3 : その他

NC細胞を用いた解析と並行して、腎臓原基である腎管の伸長メカニズムの解析も行った。腎管が胚の前後軸にそった成長と同じスピードで伸長ことは以前より知られていたが、それがFGFを中心とするシグナルカスケードで制御されていることを突き止めた。胚全体の成長と、その中に形成される諸器官の成長とが協調されることによって、各組織の空間配置が保証されるという新規メカニズムが見えてきた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

①Atsuta, Y., Tadokoro, Y., Saito, D., Takahashi, Y.: Transgenesis of the Wolffian duct visualizes dynamic behavior of cells undergoing tubulogenesis in vivo. *Dev. Growth Differ.*, 2013, 査読有

DOI: 10.1111/dgd.12047

②Freeman, S., Chrysostomou, E., Kawakami, K., Takahashi, Y. and Daudet, N.: Tol2-mediated gene transfer and in ovo electroporation of the otic placode: a powerful and versatile approach for investigating embryonic development and regeneration of the chicken inner ear. *Methods Mol Biol.* 916:127-39, 2012, 査読有

DOI:10.1007/978-1-61779-980-8_10

③Saito, D., Takase, Y., Murai, H. and Takahashi, Y.: The dorsal aorta initiates a molecular cascade that instructs sympatho-adrenal specification. *Science (Report)*, 22, 1578-1581, 2012, 査読有

DOI:10.1126/science.1222369

④Macdonald, J., Taylor, L., Sherman, A., Kawakami, K., Takahashi, Y., Sang, HM. and McGrew, MJ.: Efficient genetic modification and germ-line transmission of pr imordial germ cells using *piggyBac* and *Tol2* transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109: 1466-1472, 2012, 査読有

DOI:10.1073/pnas.1118715109

⑤Yokota, Y., Saito, D., Tadokoro, R. and Takahashi, Y.: Genomically integrated transgenes are stably and conditionally expressed in neural crest cell-specific lineages. *Dev. Biol.*, 353(2), 382-395, 2011, 査読有

DOI:10.1016/j.ydbio.2011.02.001

⑥Shimokita, E. and Takahashi, Y.: Secondary neurulation: fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud. *Dev. Growth Differ.*, 53, 401-10, 2011, 査読有

DOI:10.1111/j.1440-169X.2011.01260.x

⑦Yoshino, T., Saito, D., Tadokoro, R. and Takahashi, Y.: In vivo gene manipulations of epithelial cell sheets: a novel model to study epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev. Growth Differ.*, 53, 378-388, 2011, 査読有

DOI:10.1111/j.1440-169X.2011.01252.x

⑧Wang, H., Bonnet, A., Delfini, MC.,

Kawakami, K., Takahashi, Y. and Duprez, D.: Stable, conditional, and muscle-fiber-specific expression of electroporated transgenes in chick limb muscle cells. *Dev. Dyn.* 240: 1223-1232, 2011, 査読有
DOI:10.1002/dvdy.22498

⑨Hou, X., Omi, M., Harada, H., Ishii, S., Takahashi, Y. and Nakamura, H.: Conditional knockdown of target gene expression by tetracycline regulated transcription of double strand RNA. *Dev. Growth Differ.*, 53(1), 69-75, 2011, 査読有
DOI:0.1111/j.1440-169X.2010.01229.x.

⑩Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y. and Miura, M.: Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with Tol2 transposon mediated gene transfer system. *Genes to Cells*, 15(5), 501-12, 2010, 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01397.

⑪Watanabe, T. and Takahashi, Y.: Tissue morphogenesis coupled with cell shape changes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(4), 443-447, 2010, 査読有
PMID:20677359

⑫Yoshida, A., Yamaguchi, Y., Nonomura, K., Kawakami, K., Takahashi, Y. and Miura, M.: Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with Tol2 transposon mediated gene transfer system. *Genes to Cells*, 15(5), 501-12, 2010, 査読有
DOI:10.1111/j.1365-2443.2010.01397.x.

⑬Ohata, E., Tadokoro, R., Sato, Y., Saito, D. and Takahashi, Y.: Notch signal is sufficient to direct an endothelial conversion from non-endothelial somitic cells conveyed to the aortic region by CXCR4. *Dev. Biol.*, 335, 33-42, 2009, 査読有
DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.08.010.

⑭Mejia-Pous, C., Vinuelas, J., Faure, C., Koszela, J., Kawakami, K., Takahashi, Y. and Gandrillon, O.: A combination of transposable elements and magnetic cell sorting provides a very efficient transgenesis system for chicken primary

erythroid progenitors. *BMC Biotechnology*, 9:81, 2009, 査読有
DOI: 10.1186/1472-6750-9-81.

⑮Watanabe, T., Sato, Y., Saito, D., Tadokoro, R., and Takahashi, Y.: Ephrin B2 coordinates the formation of a morphological boundary and cell epithelialization during somite segmentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(18), 7467-7472, 2009, 査読有
DOI: 10.1073/pnas.0902859106.

[学会発表] (12件)

- ①Takahashi, Y.: Neuro-vascular interactions during neural crest morphogenesis. Neuro-Vascular Wiring Symposium 2012, 11, 12, 奈良県新公会堂 (奈良県)
- ②Takahashi, Y.: Migration of neural crest cells is controlled by dorsal aorta. International Society of Differentiation Conference, "Stem Cells, Development and Regulation" 2012, 11, 6, Amsterdam, Netherlands
- ③Takahashi, Y., Takahashi, T., Murai, H., Takase, Y. and Saito, D.: Neuro-vascular interactions instruct morphogenesis during development. Neuroscience2012 The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2012, 9, 21, 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ④Takahashi, Y.: "Dynamic cell rearrangements during vascular development" Gordon Research Conference on Notch signaling in development, regeneration and disease, 2012, 8, 13, Lewiston, USA
- ⑤高橋淑子: 「生体内におけるメラニン輸送の可視化と制御機構」第36回日本小児皮膚科学会 2012, 7, 14, 前橋テルサ (群馬県)
- ⑥Takahashi, Y.: Neuro-vascular interactions during development: a study with neural crest cells. Division of Biology, General Biology Series - The firest, California Institute of Technology, Pasadena, 2011, 9, 27, Pasadena, USA
- ⑦Takahashi, Y., Murai, H., Zakai, K. -I. and Tadokoro, R.: "Live imaging of melanosome transfer in the developing skin" IPCC 2011, 2011, 9, 21, Bordeaux, France
- ⑧Takahashi, Y.: The dorsal aorta acts as a morphogenetic center for

neuro-vascular interaction. The 7th Aso International Meeting 2011, 2011, 7, 31, ホテルグリーンピア南阿蘇 (熊本県)

⑨高橋淑子、熱田勇士、下北英輔：動物の形作りと細胞達のつぶやき～管上皮構築をモデルとして～第54回日本腎臓学会学術総会, 2011, 6, 17, パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑩Takahashi, Y.: Secondary neurulation: Another type of neurulation by mesenchymal-to-epithelial transition 16th International Conference of the International Society of Differentiation "From Stem Cells to Organisms", 2010, 11, 15-18, 奈良県新公会堂 (奈良県)

⑪Takahashi, Y.: Neuro-vascular interactions: Dorsal aorta signals on morphogenesis of neural crest lineages. Society for Developmental Biology 69th Annual Meeting Jointly with the Japanese Society of Developmental Biologists 2010, 8, 5-9, Albuquerque, USA

⑫Takahashi, Y.: Switching of BMP signaling regulates migration and lineage segregation of neural crest cells. 2nd Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, 2010, 5, 26-28, Paris, France

〔図書〕 (計8件)

①齋藤大介, 高橋淑子：「自立神経系の形成における血管の役割」生体の科学 (医学書院) 63(6), 606-611, 2012

②高橋淑子：「トランスポーゼを用いた遺伝子発現」目的別で選べる遺伝子導入プロトコール 実験医学別冊 (羊土社) 110-111, 2012

③Takahashi, Y.: Rekindling Japan's Spirit. *Science, Editorial*, 332:1241, 2011

doi: 10.1126/science.1209050.

④高瀬悠太, 安江泰治, 高橋淑子：血管ワイヤリングにおける組織間相互作用. 細胞工学 (秀潤社) 29, 1087-1092, 2010

⑤高橋淑子：第22回高遠シンポジウム「生体制御の仕組み—限界への挑戦」 実験医学 (羊土社) 28, 3167-3170, 2010

⑥大畑絵美, 高橋淑子：「胚体内の初期血管パターンニングとガイダンス因子-Notch-ephrin シグナルが制御する細胞のふるまい-」 実験医学 (羊土社), 1697-1703, 2009

⑦渡邊忠由, 高橋淑子：「境界形成と Eph-Ephrin シグナル」 生体の医学 (医学書院), 第60巻 (第4号), 330-336, 2009

⑧田所竜介：ヤマトヒメミミズの生殖細胞の再生機構, 最新医学「幹細胞研究の最近の進歩 (後編) -組織幹細胞-」 (最新医学社) 第64巻6月増刊号, 1315-1327, 2009

〔その他〕

(新聞掲載)

個体発生過程における交感神経系の形成機構を解明 日刊工業新聞、京都新聞に掲載 2012.6

(ホームページアドレス)

<http://develop.zool.kyoto-u.ac.jp/takahashi.html>

(アウトリーチ)

講演

①高橋淑子：「動物の発生にみる遺伝子と細胞のドラマ」第2回出前授業, 2012, 12, 17 池田市

②高橋淑子：「卵の中をのぞいてみよう！体作りの不思議」第7回女子中高生のための関西科学塾 実験及び解説 京都大学 2012, 10, 21, 京都市

③高橋淑子：「細胞の声をきく：動物の体作りと細胞のコミュニケーション」明石生涯学習指導者会後期研修会 (明石市生涯学習センター), 2010, 11, 28, 明石市

④高橋淑子：「卵から体が出来上がる仕組み—細胞の社会—」学研都市6大学連携「市民公開講座」, 2010, 11, 27, 京都市

⑤高橋淑子：放送大学特別講義「細胞の声を聞く」2012年より放映

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 淑子 (TAKAHASHI YOSHIKO)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：10183857

(2) 研究分担者

齋藤 大介 (SAITO DAISUKE)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：90403360

(3) 連携研究者

なし