

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31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570210

研究課題名（和文） ライブイメージングによるニワトリ胚中胚葉細胞の遊走機構の解明

研究課題名（英文） Live imaging of mesodermal cell migration during chick gastrulation

研究代表者

仲矢 由紀子 (NAKAYA YUKIKO)

独立行政法人理化学研究所・初期発生研究チーム・研究員

研究者番号：70415256

研究成果の概要（和文）：中胚葉は原腸陥入により形成され、その後、細胞移動を経て中軸、沿軸、中間、側板、胚体外の細胞系列に細分化されるが、この過程における細胞の移動様式や方向性の決定機構の詳細は明らかにされていない。本研究では、ニワトリ胚のライブイメージングを手法として、中胚葉細胞遊走の制御解明を目指し、以下の結果を得た。原条からの遊走を開始した直後の中胚葉細胞は、その経路を直線的というよりはランダムに移動することが、核のトラッキングより明らかになった。また、核とゴルジ器官の相対的位置関係に着目した結果、ゴルジ体が核の後方に位置する前後極性が形成されており、これを阻害すると細胞移動に影響する事がわかった。

研究成果の概要（英文）：During gastrulation, mesodermal cells migrate individually to become five lineage: axial, paraxial, intermediate, lateral and extraembryonic mesoderm. However, the precise cellular mechanism by which mesodermal cells migrate directionally toward their destination remained elusive. By in vivo imaging and tracking analysis with the gastrulating chicken embryo, we investigated the mode of cell movement and the positional relationship between nucleus and Golgi apparatus during migration. From this observation, we found that mesoderm cells move randomly and freely and show “nucleus front-Golgi back” polarity after they leave from the primitive streak. The perturbation of Golgi organization during migration resulted in the impaired movement of cells, suggesting that this front-back polarity is essential for mesoderm migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ライブイメージング、ニワトリ胚、中胚葉、細胞遊走、細胞極性

1. 研究開始当初の背景

細胞遊走は、発生期の器官形成のみならず、成体における創傷治癒、炎症やガンに関わる重要な現象であることから、その制御機構に関しては多大な知見の蓄積がある。しかしながら、それらの多くは *in vitro* の培養細胞からの報告であり、生きた個体における制御機構の解明は必須であった。中胚葉は、原腸陥入を経て形成され、その後、将来の血液、筋肉、骨、心臓などの多様な組織に分化するためにそれぞれの目的に向かって遊走する。このダイナミックな細胞移動に関して、方向性や移動時間を調節する機構や、後に起こる分化に対する影響は、個々の細胞レベルでは明らかにされていなかった。中胚葉細胞遊走は、上皮-間充織転換を伴い、ガンの浸潤・転移と共通した側面を持つ。その制御機構の解明は、発生現象のみならずヒトの疾病に対する理解や治療方針に繋がるものと期待された。

2. 研究の目的

ニワトリ胚では、原腸陥入時に中胚葉細胞が、原条の前後のそれぞれの位置から、からだの側方から前側に方向性を持って遊走する。これまでに、種々の増殖因子による遊走の制御が報告されてきたが、細胞がそれら因子に対してどのように応答して移動様式や極性を変遷させているのか、その機構は不明であった。これまでの予備実験において、中胚葉細胞を膜移行型GFPで標識し、30秒間隔でライブ観察した結果、原条から走り出す細胞の移動経路は決して直線的ではなく、ランダムに方向を変えながら移動することが明らかであった。本研究では、中胚葉細胞の移動様式の詳細を理解する目的で、核のトラッキングにより細胞の方向転換、静止や分裂などの挙動を詳細に観察し、異なった細胞系列を持つ中胚葉細胞間でこれらを比較した。また、細胞移動の方向は、前後極性に依存する。本研究ではさらに、ゴルジ体と核を同時に標識し、両者の相対的位置関係を細胞の前後極性の指標として用い、移動方向を決定する分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、同一細胞内の核とゴルジ体を同時に標識するために、pCAGGS-H2B 並びに、pCAGGS-H2B-mcherry-2A-Golgi-YFP 発現ベクターを作製し、エレクトロポレーションによりニワトリ原腸陥入胚の中胚葉細胞に導入した。その後、胚はnew cultureにより数時間培養し、ライブイメージングを行った

(詳細は後述する)。核のトラッキングは、画像解析ソフトMetamorphのtracking object機能により行った。また、各種薬剤の影響は、Newcultureで使用するアルブミンの中に任意の濃度で混入し、胚を5-6時間培養した後、ライブイメージングを行った。

4. 研究成果

1)ニワトリ原腸陥入胚のライブイメージング
ニワトリ原腸陥入胚は、外、中、内胚葉が層状に並ぶ扁平な組織である。中胚葉は、3-4層の細胞層からなる50 μ m程度の厚さの組織である。我々は、遺伝子発現ベクターをエレクトロポレーション法により中胚葉細胞に導入し核とゴルジ体をラベルした後、10倍あるいは20倍の対物レンズと高速共焦点スキャナユニットCSUを搭載した共焦点顕微鏡(CSU-X1,Yokogawa)によるライブイメージングを行った。このシステムでは、高速に画像取得が可能であり、かつZ分解能が良い。結果として、中胚葉組織を構成する複数の細胞層の核の動きを3次元で追跡し、定量的な解析に汎用できる解像度の画像を得ることができた。

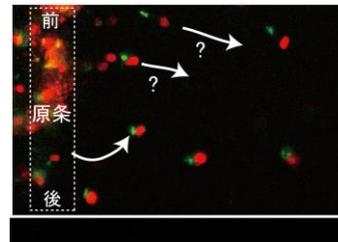


図1 中胚葉細胞の核とゴルジ体の標識

2) 中胚葉細胞遊走時のゴルジ器官と核の相対的位置関係

図1に示すように、self-cleaving-2A peptideで繋げたpCAGGS-H2B-mcherry-2A-Golgi-YFP発現ベクターの導入により、同一細胞内の核とゴルジ体を標識することができる。30秒間隔で60分間のライブイメージング観察を行い、動画撮影された画像から核の位置(座標)を求め、移動距離、ゆらぎなどを測定した。これまで、原腸陥入を経て中胚葉に分化した細胞は、原条のそれぞれの位置からからだの前方に向かって遊走すると考えられていたが、実際には、細胞の移動経路は直線的ではなく、本来の目的地に対して逆方向に離れていく細胞や側方に行く細胞も存在し、全体としてはゆらぎながら目的地に向かっていくことがわかった。この移動様式は、特に、原条後方に位置する胚体外

組織へ向かう細胞において顕著であり、前側の沿軸中胚葉になる細胞では、ゆらぎ度が少なく直線的に移動する傾向が認められた。また、遊走する細胞において、ゴルジ器官と核の位置関係を調べた結果、ゴルジ器官が常に核の後方に位置する前後極性が形成されており、これは原条から遊走するすべての細胞において認められた(図 1)。哺乳類において細胞が遊走する場合、リンパ球などの特定の細胞種を除いて、ゴルジ体が核の前方に配置され、その方向性(前後極性)の決定に関与すると考えられている。本実験で観察されたようなゴルジ体が核の後方で位置する現象に関して、その生物学的意義は大変興味深い。

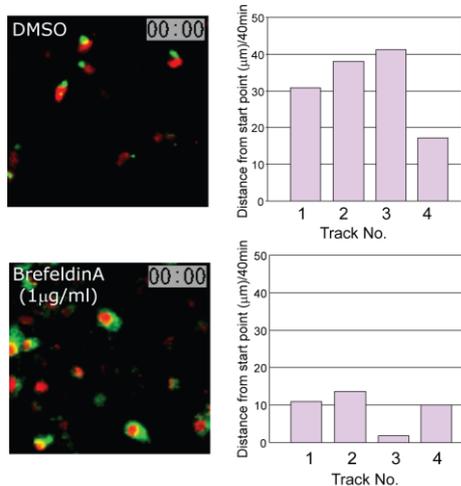


図 2 前後極性の崩壊は細胞の移動距離に影響する

一方、ゴルジ体の構造を Brefeldin A 処理により崩壊させ、核後方での局在化を阻害した場合、細胞の運動性に影響は認められなかったが、実質の移動距離が短くなった(図 2、上: コントロール胚、下: Brefeldin A 処理胚)。以上の結果より、中胚葉細胞のランダムな動きは核-ゴルジ体の前後極性が乱れた結果によるものではないこと、また、細胞の動きは、ゆらぎながらも強固に導かれ最終的には目的地に達する機構が存在することが示唆された。

3) TGFβシグナリングの影響

原腸陥入期のニワトリ胚では、種々の分子シグナリングが中胚葉細胞の遊走を制御することが報告されている。その中で、TGF-βシグナリングは中胚葉形成と上皮-間充織転換に影響を及ぼし、中胚葉分化と細胞遊走の関連性を考える上で非常に重要である。本実験では、pCAGGS-H2B-mcherry-2A-Golgi-YFP 発現ベクターを導入後、TGF-βシグナリング阻害剤 SB431542 (25μM) 存

在下あるいは非存在下でニワトリ胚を 6 時間培養し、その後、30 秒間隔で 60 分間のライブイメージングを行った。その結果、コントロール胚では、中胚葉細胞の移動方向に対してゴルジ体が核の後方に位置していたのに対して、SB431542 処理胚では、ゴルジ体が核の側方に位置する細胞が多く観察された。また、SB431542 処理胚ではコントロールと比較して、遊走中の細胞の分裂頻度が高かった。さらに、HH stage 3+ で薬剤添加し、その後 13 時間培養した胚の発生段階を比較した結果 SB431542 処理胚 (n=13) が HH stage 7-8 に達していたのに対して、コントロール (n=14) では HH stage 5 に留まる胚が多数見られ、TGF シグナリングと発生進行に何らかの関わりが示唆された。このシグナリングが、核とゴルジ体の位置関係に影響を持つことが、どのような細胞挙動(移動角度、分裂頻度、移動速度等)にリンクし、発生の進行に関わるのか、あるいは細胞骨格タンパク質の再編成を介して前後極性に影響を及ぼすのか、将来に繋がる非常に興味深い結果が得られた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件) (すべて査読付)

- ① Alev C, Wu Y, Nakaya Y, Sheng G. Decoupling of amniote gastrulation and streak formation reveals a morphogenetic unity in vertebrate mesoderm induction. *Development*, 2013 May 31. [Epub ahead of print]
- ② Nakaya Y, Sheng G. EMT in developmental morphogenesis. *Cancer Lett. Review*, 2013 May 31. [Epub ahead of print]
- ③ Bertocchini F, Alev C, Nakaya Y, Sheng G. A little winning streak: the reptilian-eye view of gastrulation in birds. *Develop Growth Differ.* 55:52-59, 2013
- ④ Kobayashi TJ, Kamimura, A. Theoretical aspect of cellular decision-making and information processing. *Adv Exp Med Biol.* 736:275-91, Review, 2012
- ⑤ Nagai H, Mak SS, Weng W, Nakaya Y, Ladher R, Sheng G. Embryonic Development of the Emu, *Dromaius novaehollandiae*. *Dev Dyn.* 240:162-75, 2011

- ⑥ Kobayashi TJ, Kamimura A. Dynamics of intracellular information decoding. *Phys Biol.* 8:055007, 2011
- ⑦ Koyama YM, Kobayashi TJ, Tomoda S, Hiroki R. Ueda. Perturbation analyses of intermolecular interactions. *Physical Review.* E84:046702, 2011
- ⑧ Kobayashi TJ, Atsushi Kamimura A. Dynamics of Intracellular Information decoding. *Physical Biology* 8:055007, 2011
- ⑨ Kobayashi TJ. Connection between noise-induced symmetry breaking and an information-decoding function for intracellular networks. *Physical Review Letters*, 106:0228101, 2011
- ⑩ Nakaya Y, Sukowati EW, Alev C, Nakazawa F, Sheng G. Involvement of Dystroglycan in Epithelial-Mesenchymal Transition during Chick Gastrulation. *Cells Tissues Organs.* 193:64-73, 2010
- ⑪ Harumoto T, Ito M, Shimada Y, Kobayashi TJ, Ueda HR, Lu B, and Uemura T, Atypical Cadherins Dachsous and Fat Control Dynamics of Noncentrosomal Microtubules in Planar Cell Polarity. *Developmental cell*, 19:389-401, 2010
- ⑫ Kobayashi TJ. Implementation of Dynamic Bayesian Decision Making by Intracellular Kinetics. *Physical Review Letters*, 104:0228104, 2010

[学会発表] (計 9 件)

- ① Nakaya Y et al. CLASP-mediated microtubule anchoring promotes the cell-basement membrane interaction through dystroglycan in EMT during gastrulation. 7th International Chicken Meeting, 2012, 11/14-18, Nagoya
- ② Nakaya Y et al. CLASP-mediated microtubule anchoring promotes the cell-basement membrane interaction through dystroglycan in EMT during gastrulation. Gordon Research Conference: Signaling by Adhesion

Receptors, 2012, 6/24-29, Waterville, ME, USA

- ③ Nakaya Y et al. CLASP-mediated microtubule anchoring promotes the cell-basement membrane interaction Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese/Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology 2012 5/28-31, Kobe
- ④ 仲矢由紀子、ニワトリ胚原腸陥入における EMT制御機構、大阪大学蛋白質研究所セミナー 幹細胞を制御する環境因子の分子基盤、2011、11/30-12/1、大阪大学(大阪)
- ⑤ Nakaya Y et al., CLASP-mediated microtubule anchoring promotes the cell-basement membrane interaction through dystroglycan in gastrulation EMT, 5th International Epithelial-Mesenchymal Transition meeting, 2011, 10/10-13, Singapore
- ⑥ Nakaya Y, Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Chicken Gastrulation: Molecular mechanisms of microtubule-based regulation of cell and basement membrane interaction, 第70回 日本癌学会学術総会, 2011, 10/3-5, 名古屋
- ⑦ 仲矢由紀子、鳥類の原腸陥入と上皮-間充織転換、日本動物学会 第82回旭川大会、2011、9/21-23、旭川
- ⑧ Nakaya Y, Involvement of Dystroglycan in Epithelial-Mesenchymal Transition during Chicken Gastrulation, Society for Developmental Biology, 2010, 8/5-10, Albuquerque (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲矢 由紀子 (NAKAYA YUKIKO)

独立行政法人理化学研究所・初期発生研究チーム・研究員

研究者番号：70415256

(3) 連携研究者

小林 徹也 (KOBAYASHI TETSUYA)

東京大学・生産技術研究所・講師

研究者番号：90513359