

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2013

課題番号：22657048

研究課題名(和文) *In vivo*細胞イメージングモデル開発による集団細胞移動機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of collective cell migration by using zebrafish *in vivo* imaging

研究代表者

伊藤 素行 (ITO, MOTYUKI)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20377906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：集団細胞移動機構は“細胞間シグナル相互作用”を含めた解析が必要であるが、集団細胞挙動解析に適した可視化モデルは十分とはいえない。我々は、集団細胞移動のモデルとして *in vivo*での細胞挙動観察が容易なゼブラフィッシュの側線原基を利用し、細胞挙動可視化トランスジェニックラインを作製と細胞内シグナルおよび細胞骨格制御との相互関係の統合的解析を行った。さらに、ゼブラフィッシュでの遺伝子機能解析の新手法として、BNA/DNAキメラオリゴマーを用いたアンチセンス法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Collective cell migration plays a role in morphogenesis during development and cancer cell metastasis. However molecular mechanisms underlying its regulation remain uncertain. We used zebrafish lateral line system as a model for collective cell migration and established transgenic lines that express imaging reporters for actin and microtubule dynamics. Furthermore, BNA-modified antisense oligonucleotides was evaluated for their efficacy in gene knockdown in zebrafish. We show a potential application for BNA antisense oligos in the downregulation of specific gene expression in zebrafish.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動 アンチセンス

1. 研究開始当初の背景

細胞移動には二つのパターンがある。血球等は単独で移動する。一方で、他の細胞と接着を保ちながら、集団として移動する collective cell movement: 集団細胞移動という移動形式が存在する。この形式は、血管や肺などの器官形成時、組織修復時、ガン細胞の組織浸潤など広く見られる現象であるが、単独細胞での移動とは異なり、細胞集団内での接着・拡散シグナルによる細胞間相互作用が集団の同調した移動に重要である。従って、細胞集団移動機構は、単一細胞の細胞移動解析研究だけでは、解明することができず、異なったパラダイムである“細胞間シグナル相互作用”を含めた解析が必要となる (Montell, Science, 2008)。このように、細胞集団移動機構の解析では、必然的に in vivo モデルのニーズが高いが、解析に適した細胞挙動のモデルや可視化技術は十分とはいえないのが現状である。申請者らは、これまで、主にゼブラフィッシュをモデルとして、代表的な細胞間シグナルの一つである、Notch シグナルの機能について研究を行ってきた (Tsutsumi, M. & Itoh, M. Gene Expression Patterns (2007), Ishitani, T. et al. Nat Cell Biol, (2005), Itoh, M. et al. Developmental Cell, (2003), Itoh, M. et al. Mechanisms of Development (2001).) その過程で、感覚器官(耳の原始相同器官)である側線器官の発生様式が細胞集団移動の解析モデルとして有用であり、Notch シグナルが側線細胞集団移動に関与する事を見出した。このことは、Notch シグナルが細胞集団移動に重要な“細胞間シグナル”の一端を担っている可能性を示唆するが、そのメカニズムについては一切不明である。

他方、オリゴヌクレオチドは、個体の発生や恒常性を制御する分子メカニズムを研究するための有用なツールである。ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、およびウニなどの脊椎動物の胚においては、モルフォリンアンチセンスオリゴヌクレオチド(MO)が広く使用されている。MO は、ホスホロアミデート結合によって結合されたモルホリン環から構成されている合成 DNA 類似体であり、標的 mRNA と結合しその立体的阻害効果により、mRNA の翻訳を阻害する。MO は低いオフターゲット効果を有することが報告されている。ゼブラフィッシュ胚における遺伝子発現をロックダウンするために使用されている他の人工オリゴヌクレオチド類似体は、ヒドロキシプロリル-ホスホノペプチド核酸 (HypNA-pPNA) などがある。HypNA-pPNA の 18mer はゼブラフィッシュの MO 25mer に匹敵する効力を持ち、RNA に対するより高いハイブリダイゼーション親和性及び MO よりも厳格なミスマッチ識別能力を持つ。上記とは異なった人工オリゴヌクレオチドとして、これまでに 2', 4'-架橋核酸 (2', 4'-BNA (LNA と呼ばれる)

が報告されている。BNA 修飾は、ヌクレアーゼに対する耐性を付与する。さらに、BNA は、RNA との親和性が高い。また、MO や HypNA-pPNA と異なり、BNA/DNA キメラオリゴマーとすることで立体的阻害効果に加えて、リボヌクレアーゼ H を活性化させ、標的 mRNA 分子を分解できる特徴がある。最近では、修飾 BNA は、臨床応用へ向けた有望なアンチセンスオリゴヌクレオチド類縁体の一つとして開発されているが、ゼブラフィッシュへの応用例はこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

集団細胞移動機構は、単一細胞の細胞移動解析研究だけでは、解明することができず、異なったパラダイム“細胞間シグナル相互作用”を含めた解析が必要である。しかしながら、集団細胞挙動解析に適した可視化モデルは十分とはいえないのが現状である。本研究では、集団細胞移動のモデルとして in vivo での細胞挙動観察が容易なゼブラフィッシュの側線原基を利用する。他方、細胞挙動の可視化を選択的かつ高感度で行うための手段として、すべての組織器官での細胞移動観察にも利用可能な汎用性が高い、細胞挙動可視化トランスジェニックラインを開発する。また、集団細胞移動に必須の細胞間シグナル相互作用の一つが Notch シグナルである可能性を検討し、細胞内シグナルおよび細胞骨格制御との相互関係の統合的理解を通じて、脊椎動物に共通の集団細胞移動分子機構の解明を目指す。さらに、上記目的を進めるための新規手法の開発として、修飾 BNA をゼブラフィッシュ遺伝子機能解析への応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 側線原基細胞集団全体・細胞集団内単一細胞でのライブ観察技術開発

特定細胞 (側線原基集団やその中の単一細胞) で後述する可視化レポーターを発現させることによって、イメージングの感度、特異性の向上が期待できる。そのために、GAL4-UAS システムを利用する。GAL4-UAS システムは、酵母の転写因子 GAL4 とその標的配列である UAS を使った転写調節機構で、導入遺伝子を特定の部位で発現させることができる。本研究では、以下の 2 種類の特定細胞での Gal4 発現ラインの作製を行う。

(2) 細胞内・細胞間・細胞骨格挙動イメージングモデル開発

細胞内シグナルの可視化モデル動物の作製

細胞移動の際には、集団、単一を問わず重要なシグナルとしてケモカインシグナルが知られている。ケモカインシグナル活性化下流経路の一つとして、G タンパク共役受容体を介した細胞内の Ca²⁺濃度の上昇が知られている。細胞挙動の際の Ca²⁺ in vivo イメージング解析を行うため、UAS 配列下流に蛍光タンパク質 GCaMP を結合させたカルシウム濃

度可視化トランスジェニックモデルを作製する。GCaMP は GFP の構造の途中にカルモジュリンを挟み込んだ蛍光タンパク質である。カルシウム濃度に応じてカルモジュリンの形態が変化すると GFP の構造がゆがめられ、蛍光強度が変化するため、細胞内カルシウムレポーターとして利用できる。

細胞間シグナルの可視化モデル動物の作製

これまでに Notch の標的遺伝子として知られている Hes ファミリーのプロモータ活性が Notch 活性の指標として用いられているが、本研究ではより感度の高い Notch 応答性プロモータ配列として TP-1 プロモータ (Minoguchi, S. et al. Mol. Cell. Biol. 17, 2679-2687. (1997)) を用い、その下流に GFP 遺伝子をつなげたレポーターを持つトランスジェニックモデルを作製する。

細胞骨格挙動可視化モデル動物の作製
側線原基の移動において、細胞骨格が“いつ” “原基細胞内のどの細胞で” “どのように” 制御されているのか、時空間的に解析するためには、細胞骨格の挙動をライブで可視化する必要がある。そこで UAS 配列下流に F-Actin を認識するペプチド Lifeact や微小管に結合するタンパク質 MAP, EB1 など結合させた、細胞骨格挙動可視化トランスジェニックモデルを作製する。

(3)(1), (2) を用いた in vivo での細胞間シグナルによる集団細胞移動制御機構の解明
Notch 応答プロモータ GFP ラインを用いて、側線原基内での Notch シグナル活性を解析する。具体的には、発生のタイミングや原基細胞集団内での個々の細胞の位置(場所)に依存したシグナルの活性化状態を解析する。また、(1), (2) で作製したトランスジェニックラインを用いて、Notch シグナルを変化させた場合 (Notch 細胞内領域過剰発現による活性化、Notch シグナル変異体、モルフォリンアンチセンスオリゴによる Notch シグナル関連遺伝子群の機能阻害、gamma secretase 阻害剤など) に、側線原基細胞の細胞骨格挙動や細胞内シグナル活性化に変化が見られるかどうかを調べる。側線原基細胞集団全体と集団内個別細胞、両者を統合的に解析し、Notch シグナルによる集団細胞移動制御の仕組みを明らかにする。

(4) 2', 4'-BNA アンチセンスオリゴヌクレオチドによる遺伝子ノックダウンの有効性評価系

ケーススタディとしてゼブラフィッシュ tcf7l1a 遺伝子を使用する。tcf7l1a は Wnt シグナル伝達のリプレッサーとして、働き、Wnt シグナル伝達は、前後神経パターン形成に重要な役割を果たしている。従って tcf7l1a の阻害により、Wnt シグナル伝達が増強され、前頭部脳領域が失われ、後側脳領域の拡大の結果、目の構造が消失または縮小される表現型となり、遺伝子機能抑制が目視で容易に判断できる優れたモデル系である。

BNA/DNA キメラオリゴマーの効果と比較するため、既知の tcf7l1a に対する MO 注入による頭部形成および非特異的細胞毒性 (アポトーシス) の表現型の定量的解析を行う。

BNA/DNA キメラオリゴマーの設計と評価
標的配列として、開始コドン付近および複数の下流領域を設定した。リボヌクレアーゼ H を活性化するためには、2'-4'-BNA/DNA キメラオリゴマーのヌクレオチドの DNA ストレッチの数が 6 つ以上であることが必要である。そこで、各標的配列に対する BNA/DNA キメラ内の DNA の数や場所を複数設計し、合成を行った。これらの BNA/DNA キメラオリゴマーを 1-2 細胞のゼブラフィッシュ受精卵に注入し、頭部形成および非特異的細胞毒性 (アポトーシス) の表現型の定量的解析を行う。

BNA/DNA キメラオリゴマー非特異的細胞毒性の誘導メカニズム解析

MO 及び siRNA の一部は、ゼブラフィッシュや培養細胞において非特異的に、p53 を介したアポトーシスを誘導することが報告されている。2', 4'-BNA/DNA キメラオリゴにより誘導されるオフターゲット毒性が p53 によって媒介されるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 側線原基細胞集団全体・細胞集団内単一細胞でのライブ観察技術開発

側線原基細胞集団全体で発現する Gal4 ラインとして、ClaudinB プロモータ-下流で、Gal4 と赤色蛍光タンパク質 RFP の融合タンパク質発現させるトランスジェニックラインを複数作成したが、目的通りの側線原基での発現が見られるラインの確立には至っていない。一方、エンハンサートラップ法によって、Gal4 がランダムにゲノム中に挿入されたトランスジェニックラインから、側線原基の一部で Gal4 が発現するラインを複数得た。

(2) 細胞内・細胞間・細胞骨格挙動イメージングモデル開発

細胞内シグナルの可視化モデル動物の作製

国立遺伝学研究所川上浩一博士らにより、Ca²⁺濃度の変化に敏感である GCaMP の改良版、GCaMP-HS を用い、Gal4 の認識配列 UAS の制御下に GCaMP-HS 遺伝子発現させるトランスジェニックラインが確立された。この魚と (1) の Gal4 ラインを交配することで、側線原基で Ca²⁺濃度変化を観察できる方法を得た。

細胞間シグナルの可視化モデル動物の作製

TP-1 プロモータ下流に GFP 遺伝子をつなげたレポーターを持つトランスジェニックモデルを作製し、GFP の発現を発生過程で解析した。

細胞骨格挙動可視化モデル動物の作製

F-Actin を認識するペプチド Lifeact や微小管に結合するタンパク質 MAP, EB1 の融合蛍光タンパク質などを UAS 配列プロモータ支配下で発現するトランスジェニックライン、
UAS:Lifeactmcherry, UAS:EB1GFP,

UAS:MAPGFP を確立した。

(3) (1), (2)を用いた in vivo での細胞間シグナルによる集団細胞移動制御機構の解明

TP-1:GFP トランスジェニックフィッシュで Notch シグナルを阻害したところ、GFP の強度減少がみられ、TP-1:GFP が in vivo で Notch シグナルに反応することが明らかとなった。側線原基で細胞骨格挙動可視化を行い、Notch シグナル機能阻害や、変異体と交配を行った。Notch シグナルによる集団細胞移動制御の関与を明らかにした。

(4) 2',4'-BNA アンチセンスオリゴヌクレオチドによる遺伝子ノックダウンの有効性評価

ゼブラフィッシュ、受精卵に 240 または 600 fmol の tcf7l1a MO を注入した胚は、受精後 24 時間後頭部欠損の表現型を示した (70-90%)。形態的頭部欠損表現型は tcf7l1a MO の高用量によって増強されたが、同時に MO の非特異的オフターゲット効果のため、神経細胞死の割合 (20-50%) が増加した。

BNA/DNA キメラオリゴマーの設計と評価

tcf7l1aMO は、開始コドンを含む領域を標的とするオリゴヌクレオチドの 25 塩基配列である。まず、ゼブラフィッシュ胚における BNA 効果の研究のために tcf7l1aMO と同じ領域を選択した。2',4'-BNA /DNA キメラオリゴヌクレオチドとして、RNaseH 誘導活性を持つものと持たないものを複数個設計した。その中で、RNaseH 誘導活性を持つ

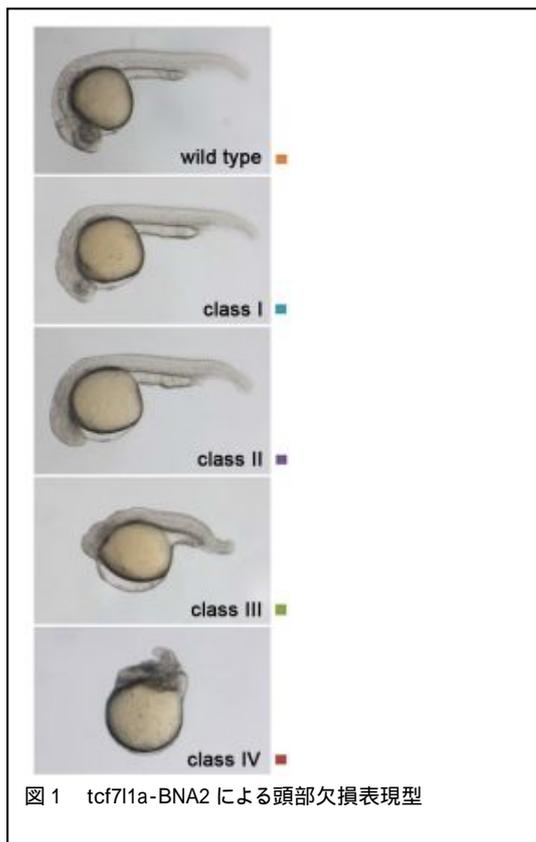


図 1 tcf7l1a-BNA2 による頭部欠損表現型

tcf7l1a-BNA2 は頭部欠損で最も高い表現型をもたらした(図 1)。

BNA/DNA キメラオリゴマー非特異的細胞毒性の誘導メカニズム解析

tcf7l1a-BNA2 は tcf7l1a 機能を非常に効率的に阻害したが、同時に非特異的な細胞死誘導が観察された。そこで、観察されたオフターゲット毒性が p53 によって媒介されるかどうかを検討した。受精卵に対照 MO または p53MO を注入した後、tcf7l1a-BNA2 を注入した。細胞死誘導された胚の割合は p53 機能阻害 MO の注入によって減少した。このことから、ゼブラフィッシュにおいて、p53 活性化が、2',4'-BNA/DNA キメラオリゴマーによる非特異毒性誘導の主要な原因であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Itoh M, Nakaura M, Imanishi T, Obika S. Target Gene Knockdown by 2',4'-BNA/LNA Antisense Oligonucleotides in Zebrafish. *Nucleic Acid Ther.* 2014 Jun;24(3):186-191 査読有

[学会発表](計 4 件)

Takamasa Mizoguchi, Satoshi Togawa and Motoyuki Itoh Neuronal versus sensory epithelial fate choice is controlled by Notch signaling in the zebrafish lateral line system

日本発生物学会 第 44 回大会 2011 年 05 月 19 日 沖縄コンベンションセンター

Takamasa Mizoguchi, Satoshi Togawa, Koichi Kawakami and Motoyuki Itoh Notch signaling regulates neuronal versus sensory epithelial fate choice in the zebrafish lateral line system

第 17 回小型魚類研究会 2011 年 9 月 8 日 東レ研修センター 三島

溝口貴正、伊藤素行 Mib regulates migration of the posterior lateral line primordium in zebrafish.

第 16 回小型魚類研究会 2010 年 9 月 18-19 日 埼玉プラザイースト

溝口貴正、伊藤素行 Mib is required for cell migration in zebrafish posterior lateral line

第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 8 日 神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/seika/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 素行 (ITOH, motoyuki)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号: 20377906

(3)連携研究者

川上 浩一 (KAWAKAMI, koichi)

国立遺伝学研究所・教授

研究者番号：70195048