

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770244

研究課題名(和文) 指の発生における PFR の細胞群の動的な作用機序の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of the PFR during digit development

研究代表者

鈴木 孝幸 (Suzuki, Takayuki)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40451629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究で、指が発生する時には指原器の先端の細胞群が重要であり、この細胞群に指間部からのシグナルが特異的に入る事が分かった。私はこの細胞群をPFRの細胞群と名付けた。指原器の先端に位置するPFRの細胞群は指間部からのシグナルのみ受け取って指の個性を決定する。そこで指間部の細胞がどのような位置情報由来の組織であるかを調べるために、肢芽全体の器官の変形パターンを3次元で解析できる実験系を新たに構築した。この手法を用いてPFRにシグナルを伝える指間部がどの部分に由来するのか逆写像の解析により初めて解明する事が出来た。本研究をまとめて論文に発表した(J. Theor. Biol., 2014)。

研究成果の概要(英文)：We found that the cells located distal to the digital lay received positional information from inter digit. These cells get BMP signaling from adjacent interdigit located at the posterior side. I named this region PFR. Surprisingly, PFR cells have unidirectional sensitivity which means PFR cells respond to BMP signaling coming from only posterior interdigit. In this study, we focused on the origin of the interdigit that sends positional information to the PFR. We have developed a novel method that combines snapshot lineage tracing with Bayesian statistical estimation to construct whole-organ deformation maps from landmark data on limited numbers of space-time points. We applied it to chick limb development. A quantitative tissue deformation map for St.23 and St.24 has been constructed, and its precision has been proven by evaluating its predictive performance. Thus, our method enables deformation dynamics analysis in organogenesis using practical lineage marking techniques.

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学&#8226;発生生物学

キーワード：肢芽 指 指間部 画像解析 定量化 シミュレーション 数理生物学

1. 研究開始当初の背景

ふと日常何気なく使っている手を見ると、とてもおもしろい形をしていることに気付く。われわれヒトは手足に5本の指を持っており、それぞれの指は前後軸上に沿って特徴ある形態をしている。このようにヒトを始め、多くの脊椎動物の指は一見一様に見えるが各々に個性がある。それではこのようなそれぞれの指の個性の違いというものほどのような分子メカニズムによって決まっているのであろうか。また、異なる指が枝芽の前後軸に規則正しく形成される基盤となる遺伝プログラムはどのようなものなのであろうか。

これまで指の形が決まるメカニズムとしては、枝芽の後側から分泌される Shh の濃度勾配や Hox 遺伝子群によって前後軸に沿った指のそれぞれの形が決まるのではないかと議論されてきた (reviewed McGlinn, Curr. Opin. Genet. Dev., 2006)。しかし、実際には Shh は指が形成されるときには発現していない。また、標的遺伝子破壊の結果から、Hox 遺伝子は指の形成自体には必要であるが、指のかたちを決める直接の因子ではないことが分かる。一方私が留学をしていた研究室より、指形成期の指間部が BMP シグナルを介して、その前側の指の個性を決定するという報告がされた (Dahn & Fallon, Science, 2000)。このため、それぞれの指の形を特徴付ける因子としては Shh、Hox、BMP 遺伝子を包括的に制御し、かつ指間部に特徴的に発現するマスターレギュレーターが存在が考えられた。

そこで私は指の個性を決定付ける候補因子の中から BMP シグナルに着目し、指間部において指原器に作用する BMP が量的に異なるためにそれぞれの指の個性の違いが生み出されることを発見した (Suzuki et al., PNAS, 2008)。さらに BMP シグナルは指原器の先端で選択的に受容されており、これらの細胞群は BMP1B, SOX9 は発現する特殊な細胞群で

ある事が分かった。私はこの細胞群を PFR (phalanx forming region) の細胞群と名付けた。

2. 研究の目的

指の個性が決定されるメカニズムはこれまで SHH シグナルによって直接特徴付けられると考えられてきた。しかしながら本研究では指間部に発現する分泌因子が指原器の先端の PFR の細胞群に位置情報を伝達しているという独自の研究成果を受けて、そのメカニズムを明らかにする事を目指した。

これまで考えられてきたメカニズムと本研究の接点を整理すると、SHH のシグナルは枝芽形成初期に作用して指の個性と枝芽の細胞群の数を維持するために働いているが、SHH のシグナルの濃度に依存して指間部に発現する BMP を含む分泌因子の位置情報が指の PFR の細胞群に伝達されるという仕組みを考えている。

そこで枝芽形成初期の SHH のシグナルがどのように将来の指間部の細胞になる場所で位置情報として伝達されているかを理解する必要があると考えた。

3. 研究の方法

将来指間部になる組織は枝芽形成初期にはどの部分であるのかを調べれば SHH のシグナルがどのようにその部分に作用しているのかを調べる事が出来る。そこで枝芽形成初期から時間を追って枝芽の器官全体がどのように変形していき、指原器と指間部の領域が出来るのか3次元における枝芽の fate map を作成することにした。まず DiI, DiO という2種類の蛍光色素をニワトリ胚枝芽の後肢にタングステン針を用いて多点でラベルを行い写真撮影を行った。その胚を12時間孵卵させてその後再び蛍光色素の位置を確かめるために写真撮影を行った。得られた蛍光色素の位置情報から組織の変形パターンをベイズ推定法を用いて器官全体に渡

って推定した。この解析を肢芽形成初期から指が出来るステージまで行った、指原器の位置から変形の逆写像を計算し、将来の指間部の位置を特定した。

4. 研究成果

(1) 2次元データにおける器官の変形パターンを定量的に理解する方法の確立

ニワトリ胚後肢に Dil/DiO を用いて多点のラベルをしたデータを図1に示す。



図1：蛍光色素でラベルされた肢芽の写真

この蛍光色素のデータと12時間後の蛍光色素のデータからラベルがされていない部分は滑らかに変形するものとして間を補完し、2次元における組織の fate map を作成した(図2)。

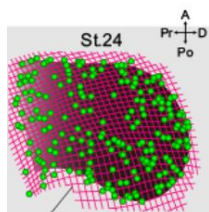


図2：肢芽の変形パターン(赤線)

この結果肢芽の変形パターンの全体像を把握する事が出来た。これまで fate map の作成は Dil/DiO の蛍光色素がどこにいくかで解析が行われてきた。しかしこの方法では数日後には蛍光色素でラベルされた部分が細胞増殖などにより広がり過ぎるため詳細な fate map を作成することは出来ず、定量性も低いものであった。本研究で開発した手法はこれらの問題を解決し、さらには定量的に器官全体の変形パターンを理解出来るものであり、今後肢芽以外の器官の形態形成を理解する上で大きなツールとなる事が期待される。さらに、本研究では共焦点顕微鏡でもはや解析出来ない大きな器官の形態形成を理解する事が出来る。この点についても新規性が高く、将来は臓器再生において大きな

目に見えて大きな器官を培養する時など本研究手法が生かされることを期待している。

(2) 厚み成分を含む3次元における器官全体の変形パターンの理解

(1)の解析により肢芽全体の背側から見た2次元 fate map を作成することが出来た。次に背腹軸方向の肢芽の厚さを測定し、2次元データ上に組み合わせる事で3次元における肢芽の変形パターンを理解したいと考えた。肢芽の厚みの測定を行うために東北大学加齢医学研究所が所持する OPT スキャナーを用いて肢芽の形を3次元でキャプチャーした。得られたデータを Avizo を用いて背腹軸方向の成分(肢芽の厚み)を抽出した(図3)。

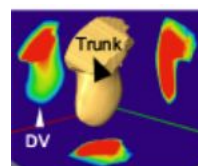


図3：OPT スキャナーによる肢芽の厚み成分の抽出(DVの図)

このデータを2次元の fate map に重ね合わせる事で3次元における器官全体の変形パターンを理解する事が出来るようになった。

この手法の正確さを調べるために新たに得られた蛍光色素のデータを fate map 上にプロットし、12時間後にどの位置に実際するか実測値と fate map から計算した場所を比較した。その結果誤差範囲は 10um 以内と非常に高い精度で再現良く実際の組織の変形を fate map で予想することが出来た。この結果より本解析手法は極めて高精度で3次元における器官全体の変形パターンを理解する事が出来る事が示された。

(3) 定量的な fate map から抽出された器官変形時の特徴量の抽出

(2)で得られたデータから、肢芽全体における各組織の変形パターンが得られた。次に各組織における変形時の体積の増加率、及び変形の異方性の特徴量 (Anisotropy) を計算により算出した。その結果 St.23 において単位時間あたりに最も組織が大きくなる部分として肢芽の後側端の細胞群を見いだした。

この細胞群には Shh が発現している事から SHH シグナルが時空間的に特異的にこの領域を増殖させている可能性が考えられた。また Anisotropy の特徴量を解析した結果驚くべき事に枝芽全体の組織が遠近軸方向に沿ってバイアスして伸長していることが明らかとなった。これまで枝芽の遠近軸に沿った組織の伸長には遠位側の細胞の増殖率が高かったり、遠近軸方向に沿って細胞が分裂するというモデルが報告されている。しかし、どの報告でも枝芽が一方向に伸長するというシンプルな現象は説明出来ていない。本研究では細胞レベルの視点をあえて無視し、組織レベルにおける細胞集団としての変形パターンを解析することにより、枝芽の細胞群は遠近軸に沿って全体的にバイアスして伸びるという結果を明らかにした。この結果は、将来的にマクロなレベルからミクロな細胞レベルの振る舞いを解析するための重要な表現型を見いだしたものであると言える。さらに Anisotropy の値は一番大きい所で 1.6 であったことから枝芽の細胞集団は前後軸より遠近軸に沿って 1.6 倍バイアスして伸長しているといえる (図 4)。これまでの共焦

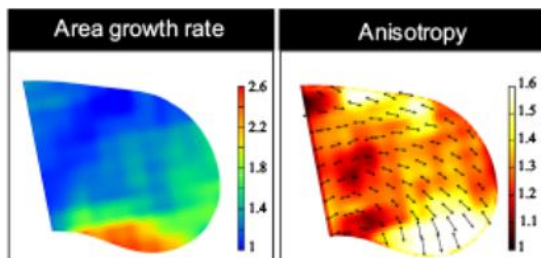


図 4 : 組織の増殖率 (左) と Anisotropy (右) 点顕微鏡を用いた解析ではこの 1.6 倍の違いを見いだす事は非常に難しく、マクロな視点からの解析により細胞集団の挙動を理解出来るようになった点として本手法の有用性を示す事が出来たと言える。

これらの結果をまとめて論文を発表した (J.Theo.Biol., 2014)

次に、PFR の細胞群に位置情報を送る指間部の細胞がどの部分に由来しているのか、また

そこで SHH のシグナルがどれくらい活性化しているのかを調べることにした。指原器が形成される St.26 において軟骨原器をピクトリアブルーで骨染色し、骨格パターンの詳細を 2 次元データとしてコンピューターに取り入れた。次に上記で解析した 2 次元の fate map データを用いて将来の PFR を含む指原器と指間部の領域の逆写像のデータを計算し、指間部領域に由来する組織の場所を特定した。現在これらのデータをまとめた論文を revise 中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Morishita Y. and Suzuki T.

Bayesian inference of whole-organ deformation dynamics from limited space-time point data. *J. Theor. Biol.* **14**, 2014

Huynen L., Suzuki T., Ogura T. Watanabe Y. Millar C. D. Hofreiter M., Smith C. Mirmoeini S. and Lambert D. M. Reconstruction and in vivo analysis of the extinct *tbx5* gene from ancient wingless moa (Aves: Dinornithiformes) *BMC Evolutionary Biology* **14**, 2014.

〔学会発表〕(計 4 件)

Takayuki Suzuki, Quantitative approach to understand whole organ morphogenesis, 第 46 回日本発生生物学会大会、くにびきメッセ、2013/5/28

Takayuki Suzuki, Yoshiyuki Matsubara, Ayumi Hattori, Toshihiko Ogura, Se-Jin Lee, Atsushi Kuroiwa, Expression timing of *Gdf11* reveals positional diversity of the hindlimb in vertebrates, 17th International Congress of Developmental Biology, Cancun, Mexico, 2013/6/14

鈴木孝幸、中野幹治、都築政起、松田洋一、黒岩厚、劣性遺伝で多指症を発症する HMM 変異体の発生学的解析、第 1 回ウズラ研究集会、名古屋大学、2013/12/10

Takayuki Suzuki, Yoshiyuki Matsubara, Ayumi Hattori, Toshihiko Ogura, Se-Jin Lee, Atsushi Kuroiwa, *Gdf11* の発現開始タイミングの違いが脊椎動物における

後肢の位置を決定する、数理生物学サマ
ーレクチャーコース、理化学研究所、
2013/7/30

〔図書〕(計1件)

鈴木 孝幸、SecondarySmad1/5/8-Dependent
Signaling Downstream of SHH Determines Digit
Identity、Springer、2014/3/31

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://bunshi5-bio-nagoya-u.businesscat
alog.com](http://bunshi5-bio-nagoya-u.businesscatalog.com)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 孝幸 (Takayuki Suzuki)
名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：40451629

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

森下 喜弘 (Yoshihiro Morishita)
理化学研究所・発生再生科学総合研究セン
ター・ユニットリーダー
研究者番号：00404062