

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：63904

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22127007

研究課題名(和文)細胞形態・運動を基盤とした器官形成のロジック

研究課題名(英文)The logic of organogenesis based on cellular morphogenesis and cell motility

研究代表者

上野 直人(Ueno, Naoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・教授

研究者番号：40221105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 124,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経管形成に着目し、個々の細胞レベルでのどのような変化がそのダイナミックな組織リモデリングを可能にするのか、その背景を分子、細胞、組織レベルに加え、物理的な力の生成をも含めて理解することを試みた。

そして、神経管形成においては神経板内の細胞でアクチンおよび細胞接着分子の協同作用によって起こる頂端収縮、微小管の安定化・束化によって起こる細胞伸長が神経板の折りたたみに重要であることを明らかにした。加えて、神経板の外側(非神経外胚葉)では深層細胞が両側から積極的に背側正中線に向かって移動し、それにともない上層の細胞が背側に移動することが完全な神経管形成に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We focused on the neural tube formation and attempted to clarify how individual cells contribute to the 3D tissue remodeling during the important morphogenesis and investigated at the molecular, cellular, tissue-levels, and also considering the involvement of physical forces.

We demonstrated that apical constriction and cell elongation driven by actin dynamics and microtubule's stabilization and bundling are the essential processes for the "folding" of the neural plate of *Xenopus laevis*. In addition, we also showed that rather rapid migration towards the dorsal midline of deep cells of non-neural ectoderm of both lateral sides that does not normally contribute to the neural plate pulls overlying superficial layer to generate a force to bring two parallel neural folds and enhance the complete closure of neural tube.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 神経管形成 細胞接着 細胞運動 機械刺激

1. 研究開始当初の背景

初期胚や器官形成におけるダイナミックな形態形成は、「細胞増殖」、「細胞分化」に加え、細胞集団が胚内における位置を再配置させる「細胞運動」という時間的・空間的に厳密に制御されたプロセスの統合によって進行する。分子生物学の進歩によってこれらのプロセスを制御するしくみの分子的理解は大きく進展した。しかしながら、胚という閉じられた場でどのような力が発生しているのか、また細胞接着、細胞骨格リモデリング、細胞を取り巻く細胞外基質がどのように物理的環境を感知し、また同時に創り出しているかについては未知の部分が多く、細胞生物学、発生生物学との接点もあまりなかったといっても過言ではない。近年、この細胞の力学環境が細胞分化や組織リモデリング(器官形成)に及ぼす本質的な影響について注目が集まりつつある。例えば、幹細胞はその培養環境となる基質の弾性に依存して異なる分化運命をたどり、結果としてその形態や運動能を変化させる(Engler, A. et al. Cell, 2006)。また、神経管形成においても神経外胚葉に生じる自立的な力、非神経外胚葉の非自立的な力の寄与を予想させる知見が得られつつある。これらの事実は従来の液性因子によるシグナルインプット、細胞内シグナル伝達系の連鎖、そしてそのアウトプットとしての遺伝子の転写調節、細胞骨格の再編成という既存の概念を超えた、新しい生物学の展開を予感させるものであり、国際的な注目度も高まっている。我々は、原腸形成に寄与する中胚葉細胞の極性形成の研究から、細胞の極性化、ひいては形態形成における力の関与を強く確信し、器官形成における細胞骨格リモデリングと力の関係を解明する研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

発生は液性因子を介した細胞間相互作用

により高度に調節されているが、同時にさまざまな力学環境の影響を受けている。また、細胞自身の変形・運動が圧縮・伸展などの力を生む。しかし、器官形成において、細胞・組織のダイナミックな変形を可能にする「力」が生みだされるしくみや、力が組織をどのように変形させるかについては、現在ほとんど情報が無い。器官形成は「形」を生み出す過程であり、「力」に関する情報なしでそのしくみを理解することは不可能である。本研究では、神経系の形成にとって最重要イベントである神経管の形成を対象に選び、細胞や細胞集団が生み出す「力」に焦点をあてて解析することによって、器官形成原理の解明を目指す。

多くの脊椎動物では、胚の背側に位置する神経外胚葉が両側から隆起し、融合することによって神経管をつくる。このダイナミックな変形を生み出す力は、細胞骨格リモデリング・細胞の形態変化・組織の変形、という過程により起こるはずである。そこで、ライブイメージングや工学的手法を用い、それら素過程を観測・測定することによって、実際に起きる変形・運動の原理を理解しようというのが本研究の第一の目的である。さらに、分子・細胞生物学的な情報をも取り入れたシミュレーションを行うことで、器官形成現象の統合的な理解が得られるものと考え。器官形成における「力」の生物学的意義を明らかにすることで、将来に向けた人工的器官形成技術の確立にも寄与することに疑いの余地はない。すでに、直近の基盤研究(B)では極性形成における膜・タンパク質輸送の重要性について、また過去の基盤研究(A)の成果からは細胞極性形成における力の意義について予備的知見を得ているほか、力学的解析についても松本らとすでに具体的な共同研究も始まっており、本研究開始の機は熟している。

3. 研究の方法

神経管形成における組織リモデリングを理解するためには、その背景にある力学的寄与とそれを支える分子・細胞機構の両面から研究を行う必要がある。アフリカツメガエル、およびゼブラフィッシュ胚を用いて以下の研究を行う。

神経管形成における力学的寄与の解明

細胞変形が集団として起こることによって力を生んでいると予想される。計画班員松本と共同で神経管形成（閉鎖）時に神経褶隆起が正中線へ移動することによって発生する力を、実際に原子間力顕微鏡（AFM）などで測定し、神経外胚葉が生み出す自立的な力と非神経外胚葉が生む非自立的な力をレーザー消灼法などを用いて明らかにする。また、細胞変形・運動の寄与について明らかにするために、顕微鏡観察にもとづき、細胞変形（アスペクト比、非対称性）、細胞分裂パターンの定量化を行い、計画班員近藤の協力を得て数学的シミュレーションによって胚に発生する力を予測する。

細胞骨格リモデリング機構の解明

神経外胚葉細胞がくさび形に変形する際、頂端側にアクチンが集積するメカニズム、そして頂端側を起点として微小管アレイが束化し、細胞が頂底軸方向に伸長するメカニズムについて、蛍光標識した細胞接着分子、細胞骨格制御因子の動態についてレーザー共焦点顕微鏡、デジタルレーザースキャン型3次元顕微鏡（DSLIM）などを用いたライブ観察を行う。またこの二つの細胞骨格リモデリングの連携やそれを担う分子、およびメカニズムについて解析を行う。

4. 研究成果

H22年度

われわれヒトを含めた脊椎動物は、頭から体の背中側にかけて脳と背髄から成る中枢神経系を持っている。中枢神経系の形成は、

体の背中側にできる神経板と呼ばれる板状の組織が体の内側にくぼんで溝（神経溝）を作り、神経管と呼ばれる管状の構造に変形が引き金となっている。この神経管の形成運動はヒトからトリ、カエルに至る脊椎動物でほぼ同じように起こり、多くの脊椎動物に共通する、中枢神経系を作るための重要なステップであると考えられている。神経管形成時の神経板では、細胞の表層近くが大きく収縮してくさび形に変形する。この変形が個々の神経板細胞で起こることによって、神経板全体が体の内側にくぼんで神経溝を作る運動に変わる。本研究ではこの細胞形態の変化（細胞形態形成）の分子・細胞機能を明らかにし、神経管形成時に発生する力の予測をすることを目的とした。この細胞形態形成の過程では、アクチンタンパク質が頂端（表層）側に集積して、それが収縮することで神経板細胞がくさび形になると考えられている。本研究では、細胞膜上にある2種類の細胞接着タンパク質ネクチンとN-カドヘリンが相互作用すること、neネクチンとN-カドヘリンを同時に共発現させると本来頂端収縮が起こらない胚の腹側外胚葉でも頂端収縮を起こすこと、またそれらの協調によって神経板の細胞のアクチンが表層側に集積する仕組みを明らかにした（Morita et al., *Development*, 2010）。また、それ自身は神経にはならない非神経外胚葉の管形成における役割についても解析を行い、非神経外胚葉の深層の細胞集団の背側への移動が神経管閉鎖に重要であることを見出した。

H23年度

当該年度においても階層を超えた制御機構のしくみを明らかにするために、神経管形成という脊椎動物の中枢神経系の根幹をなすダイナミック形態形成運動をモデルとして、また管形成過程の観察が容易なアフリカツメガエルを用いて、細胞と組織・器官をつなぐ形態形成現象に着目して研究を進めた。

本年度得られた成果のひとつは神経管形成における細胞運動と器官形成の力学的相互作用である。神経管の形態形成（管形成）の主たる原動力は神経上皮細胞の形態形成、すなわち立方体の形状からくさび型への変化であると考えられている。しかしながら、この細胞形態変化を阻害しても管形成はかなり進化することを見出した。これはニワトリではすでに報告されていたことであるが、本年度我々はその背景となる管形成の原動力の存在を直接神経系にはならない非神経外胚葉に求め、それを検証する研究を行った。その結果、上層、深層の二層からなる非神経外胚葉の上層は速いスピードで背側正中線に向かって移動しており、その際に細胞形態が変化し背腹軸方向に著しく伸長することを見出した。さらに、この上層運動の原動力は深層細胞が背側に自立的に上層よりも速い速度で移動していることから、上層は細胞接着を介して深層によって背側に牽引されていることを示した。この際、上層が深層から力学的な影響を強く受けていることをレーザー焼灼法による引張力開放実験などによって明らかにした。これらの結果により深層細胞の「動く歩道」モデルを提唱することができた（Morita, H., Development 2012 に報告）。

H24 年度

神経板における細胞変形の引き金を探るために、細胞内カルシウム動態のライブイメージング観察を行った。具体的には、カルシウム結合時の蛍光変化が大きい遺伝子コード型プローブ GECO を用いて、脊椎動物のモデルとしてのアフリカツメガエル神経管閉鎖時の細胞内カルシウム動態を観察し、その動態と閉鎖運動に大きく寄与する神経上皮細胞の変形（細胞形態形成）との関連について研究した。その結果、細胞内カルシウム上昇と頂端側の細胞辺が短くなり頂端側の細胞表面積が縮小する頂端収縮の間には時空

間的に密接な相互相関があることがわかった。また、ケージド IP3 を胚細胞内に注入し、その後紫外線（UV）照射によるアンケーシングで IP3 を活性化させ、局所的に細胞内カルシウムを上昇させることによって、人為的に細胞表面積を縮小させることができることを確認した。これらの結果より、カルシウム動態は神経管閉鎖時の細胞変形と機能的連関があることを示すことができた。H24 年度はヴァーテックスモデルを用いてカルシウムによる細胞辺変形の数理的な力学モデルを構築することに注力し、細胞辺の長さ「ゆらぎ」を生じさせることによって、安定的に表面積が小さくなるという予備的知見を得た。また、実際の神経上皮細胞の観察においてもショウジョウバエの原腸形成で観察されているような細胞辺長のゆらぎと細胞表面積の一方向性の縮小を確認した。加えて、同じくアフリカツメガエル胚を用いて原腸形成において組織間に生じる力の定量化に成功し、陥入する中胚葉を先導する細胞集団が後方に連結する中軸中胚葉を牽引し、中胚葉内に引張力を生んでいること、この引張力は正常な脊索形成に必須であることなど、組織・器官形成に物理的力が重要な役割を担っていることが明らかになった。

H25 年度

H24 年度途中から開始した、基礎生物学研究所・小山宏史博士との共同研究によって構築されたヴァーテックス（Vertex）モデルを用いた数理モデルの妥当性について、実際の実験・観察結果との整合性を検証するとともに、実データを数理モデルに還元し、in vivo 現象を反映するより適切で、汎用性の高いモデルへ質を高めるための「観察データ-数理モデル循環」を目指して研究を進めた。H25 年度はアフリカツメガエル胚を用いた実験による観察データの収集を中心に実施し、細胞骨格、とくにアクチン動態に着目した研究を行った。その結果、細胞内カルシウムの一過

的上昇後、数分以内に細胞内の中央部にファイラメント上の F-アクチン (LifeAct で観察可能) が観察されることがわかった。また、細胞間接着とカルシウム伝播および細胞変形の関係について、モルフォリノによる E-カドヘリンのノックダウン実験を行った。このカドヘリン機能阻害により、カルシウム伝播および集合的細胞変形が阻害されたことから、F-アクチンの集積と同様に細胞間接着は細胞辺長に必須であることが分かった。現在、この F-アクチンダイナミクスを定量化し、数理モデルに取り入れることや、細胞接着の強度を変化させたシミュレーションを行っている。

H26 年度

細胞内カルシウム動態変化による頂端収縮 (apical constriction) の駆動メカニズムを解明するための研究を行った。H25 年度までに新規蛍光カルシウム検出プローブ GECO を用いて、蛍光強度と細胞収縮率との相関、Ca²⁺の伝播と細胞収縮との時空間的相関およびオシレーションパターン (振動数/波長) と細胞頂端収縮との関連などについても詳細に解析された。とくに、ATP 分解酵素を用いた実験から数十細胞にも広がる伝播性のカルシウム上昇には細胞外 ATP を必要とすることも明らかになった。とくにアフリカツメガエル胚内に顕微注入したケージド ATP を UV 照射によってアンケージすることによって、細胞内カルシウム上昇を時空間制御可能な誘導系を確立し、限られた細胞、あるいは細胞集団だけに頂端収縮を誘導することを可能にした。当該年度 (最終年度) はとくに、細胞内カルシウム上昇、細胞骨格ダイナミクス、細胞変形 (頂端収縮) の 3 現象の相関に着目した観察・解析を行った。具体的には については F-アクチンの蛍光プローブ LifeAct を用いて、アクチンのライブイメージングによる動態解析を行い、カルシウム伝播後に細胞内のとくに細胞中心部

に F-アクチンの集積が一過的に起こることを確認した。とくにこれらの現象を数理モデルに反映させるために、細胞辺の変化をパラメータに設定して、継続して行ってきたヴァーテックスモデルを用いたシミュレーションを行った。その結果、細胞膜各辺の収縮の揺らぎが時間的に集中して起こることが、効果的に頂端収縮を引き起こすことが明らかになった。本成果は細胞内で散発・集中する細胞内カルシウム上昇が、細胞膜収縮のオシレーションを引き起こし、その結果、神経管閉鎖に結びつく頂端収縮のメカニズムを明らかにするものであり、現在論文投稿準備中である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

Kai, M., Ueno, N. and Kinoshita, N. Phosphorylation-dependent ubiquitination of paraxial protocadherin (PAPC) controls gastrulation cell movements. *PLoS One* 10, e0115111 (2015) 査読有

DDI:10.1371/journal.pone.0115111

Hashimoto, M., Morita, H. and Ueno, N. Molecular and cellular mechanisms of development underlying congenital diseases. *Congenit. Anom.* 54,1-7 (2014) 査読有

DDI:10.1111/cga.12039

Yajima, H., Suzuki, M., Ochi, H., Ikeda, K., Sato, S., Yamamura, K., Ogino, H., Ueno, N. and Kawakami, K. Six1 is a key regulator of the developmental and evolutionary architecture of sensory neurons in craniates. *BMC Biol.* 12:40 (2014) 査読有

DOI:10.1186/1741-7007-12-40

Hara, Y., Nagayama, K., Yamamoto, T.S., Matsumoto, T., Suzuki, M. and Ueno, N. Directional migration of leading-edge

mesoderm generates physical forces:
Implication in *Xenopus* notochord
formation during gastrulation. *Dev.*
Biol. 382, 482-495 (2013) 査読有
DOI:10.1016/j.ydbio.2013.07.023
Takagi, C., Sakamaki, K., Morita, H.,
Hara, Y., Suzuki, M., Kinoshita, N. and
Ueno, N. Transgenic *Xenopus laevis* for
live imaging in cell and developmental
biology. *Dev. Growth Differ.* 55,
422-433 (2013) 査読有
DOI:10.111/dgd.12042
Suzuki, M., Morita, H. and Ueno, N.
Molecular mechanisms of cell shape
changes that contribute to vertebrate
neural tube closure. *Dev. Growth*
Differ. 54, 266-276 (2012) 査読有
DOI:10.1111/j.1440-169X
Tao, H., Inoue, K., Kiyonari, H.,
Bassuk, A.G., Axelrod, J.D., Sasaki,
H., Aizawa, S. and Ueno, N. Nuclear
localization of Prickle2 is required
to establish cell polarity during
early mouse embryogenesis. *Dev. Biol.*
364, 138-148 (2012) 査読有
DOI:10.1016/j.ydbio.2012.01.025
Morita, H., Kajiura-Kobayashi, H.,
Takagi, C., Yamamoto, T.S., Nonaka, S.
and Ueno, N. Cell movements of the deep
layer of non-neural ectoderm underlie
complete neural tube closure in
Xenopus. *Development* 139, 1417-1426
(2012) 査読有
DOI:10.1242/dev.073239
Morita, H., Kajiura-Kobayashi, H.,
Takagi, C., Yamamoto, T.S., Nonaka, S.
and Ueno, N. Cell movements of the deep
layer of non-neural ectoderm underlie
complete neural tube closure in
Xenopus. *Development* 139, 1417-1426

(2012) 査読有

<http://dev.biologists.org/content/139/8/1417.long>

Morita, H., Nandadasa, S., Yamamoto,
T.S., Terasaka-Iioka, C., Wylie, C. and
Ueno, N. Nectin-2 and N-cadherin

interact through extracellular
domains and induce apical accumulation
of F-actin in apical constriction of
Xenopus neural tube morphogenesis.

Development 137, 1315-1325 (2010) 査
読有 DOI: 10.1242/dev.043190

Suzuki, M., Hara, Y., Takagi, C.,
Yamamoto, T.S. and Ueno, N. MID1 and

MID2 are required for *Xenopus* neural
tube closure through the regulation of
microtubule organization. *Development*
137, 2329-2339 (2010) 査読有 DOI:

10.1242/dev.048769

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.morphologic.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上野 直人 (UENO, Naoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・
教授

研究者番号：40221105

(2)連携研究者

鈴木 誠 (SUZUKI, Makoto)

基礎生物学研究所・形態形成研究部門・
助教

研究者番号：10533193

野中 茂紀 (NONAKA, Shigenori)

基礎生物学研究所・時空間制御研究室・
准教授

研究者番号：90435529