

令和元年6月14日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04322

研究課題名(和文)細胞集団形成と器官の形態・機能形成のしくみの統合的理解

研究課題名(英文) Relationships between cell assembly formation and functional organ formation

研究代表者

松井 貴輝 (Matsui, Takaaki)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：60403333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,340,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多細胞生物の器官形成において、どのように「ゆらぎ」を持つ細胞から「秩序」を持つ細胞集団が構築されるのかを理解することを目的とした。これを理解するため、研究代表者は、ゼブラフィッシュのクッペル胞、表皮、体節形成での細胞の形態、シグナル、物理的特性などを定量評価し、それを元に、数理モデルを構築したことで、細胞集団としての秩序がもたらされる時に、「ノイズキャンセル機構」が働くことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、研究代表者らのこれまでの研究を発展させた独創的なもので、生物の形づくりの原理、特に、環境対応、器官形成、発生制御、システムの柔軟性と堅牢性、ボディープランに対する理解を深めることが期待される。また、本研究で明らかにした細胞集団形成のロジックは、再生医療に必須な「細胞や細胞集団を自由に操る」技術開発への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand how “highly organized cell assemblies” are constructed from “fluctuating” cells within multicellular organisms. In order to understand this logic, we quantitatively evaluated the cell morphology, signal activities, physical characteristics of the cells within the Kupffer’s vesicle, epidermis, and somites in zebrafish embryos, and constructed a mathematical model using such quantitative data. We revealed the existence of the “noise canceling mechanism” when highly organized cell assemblies are formed from fluctuating cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 器官形成 ノイズ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過去の研究で研究代表者は、脊椎動物の形づくりを発生生物学的観点から理解することを目標として、様々な分子・シグナルの機能を解析し、器官前駆細胞が、移動し、細胞間コミュニケーションを発達させることが器官形成に不可欠であることを報告してきた。例えば、ゼブラフィッシュ胚の尾部にある内臓の左右非対称な配置を規定するクッペル胞 (Kupffer's vesicle) においては、キャノピー1 (Cnpy1) を介した繊維芽細胞増殖因子 (FGF) シグナルの正のフィードバックループが、クッペル胞前駆細胞の自律的な集団形成を制御し、しかも、その集団形成がその後のクッペル胞の形態・機能形成に不可欠であることを明らかにした (業績: Matsui et al., PNAS 2011, Matsui and Bessho, CMLS 2012)。さらに、転写後調節因子セルフ1 (Celf1) の機能によって内胚葉細胞が正中線方向へ適切に移動し、その後、正常な内胚葉細胞シートを形成することが、最終的な器官形成 (肝臓や膵臓など) に必須であることを報告した (業績: Tahara et al., IJMS 2013)。しかし、これらの結果の多くは、同種の細胞をすべて同一の情報を持つものとして捉え、遺伝子の発現量やシグナル活性の違いを固定胚で比較して得られたものなので、「細胞はすべて同一なのか?」、「シグナル活性などの細胞特性は時空間的に変化しないのか?」などの問題は考慮していなかった。また、細胞が集団を形成する時には、細胞間に物理的な力 (引っ張り、圧迫など) が加わることが明らかになりつつあるが、「物理的な力が細胞集団の形や振る舞いにどのような影響を与えているのか?」についても考慮していなかった。

最近、研究代表者は、これらの器官前駆細胞のライブイメージングや遺伝子発現の定量解析を行い、同種の細胞種であっても、細胞の大きさや遺伝子の発現量は異なり、その個性が時間変化していることを発見した。つまり、細胞は確率論的な「ゆらぎ」の要素を持っていたのである。これに対して、細胞が自律的に集まって構成された器官には、細胞集団としての形態や機能など普遍的な「秩序」がもたらされている。よって、器官形成過程で秩序が形成されるときには、細胞の持つゆらぎは邪魔になるので、ゆらぎは抑えられるか、逆に、利用される必要があるが、そのしくみは理解されていない。

2. 研究の目的

多細胞生物では、細胞が自律的に集まることでいろいろなパターンが生じ、高次機能を有する器官が形成される。器官形成などの生命現象では、これまで同種の細胞はすべて均一なものと考え、個々の細胞の個性・特性を無視してきたが、研究代表者の過去の研究によって、同種の細胞であったとしても、細胞の大きさや遺伝子の発現量が異なり、しかも、その個性が絶えず時間変化していることが明らかになった。そこで本研究では、生体内で個々の細胞が持つ「ゆらぎ」を観測し、その定量データを基に数理モデルを確立することによって、どのように「ゆらぎ」を持つ細胞から「秩序」を持つ細胞集団が構築されるのかを理解することを目的とした。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュ生体内で、個々の細胞の挙動を追跡すると同時に分子シグナル活性や物理的な力を計測する実験系を確立し、細胞の挙動、シグナル活性、力学特性などの変化を共焦点顕微鏡を用いてライブイメージングし、その変化を定量的に解析した。このライブイメージングを遺伝子やシグナルの機能不全操作を行った胚でも行うことで、器官形成において、個々の細胞のもつゆらぎと器官が形成されてもたらされた秩序の関係性を調べた。特に、クッペル胞、上皮シート、体節の形成に着目した。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュ胚の尾部にあるクッペル胞は、内臓の左右非対称な配置を規定するために必須な器官である。クッペル胞の形成は、原腸陥入期に20-30個のDorsal forerunner cellsと呼ばれるクッペル胞前駆細胞の集団の出現により開始される。その後クッペル胞前駆細胞の集団は、増殖しながら正中線上を植物極側へ移動し、最終的に100個程度の微繊毛 (シリア) を持つ上皮細胞から構成される球状の小器官 (クッペル胞) を構築する (Essner et al., Development 2005, Amack et al., Dev. Biol. 2007, Oteiza et al., Development 2008)。クッペル胞は、シリアを反時計まわりに回転させることで、ノード流と呼ばれる水流をつくり、その流れによって右と左にシグナルの差を引き起こすことが知られている。一方、クッペル胞前駆細胞が集団移動している原腸陥入の時期に、内胚葉細胞は、胚の側面にごま塩状に出現する。出現当初は、ランダムウォークしているが、正中線方向へ極性移動しながら細胞数が2倍程度に増加し、体節形成中期頃までに、正中線付近で内胚葉のシートを形成する。その後、腸管のチュー

ブ構造が形成され、その一部から腓臓や肝臓の原基が突出するように形成される。

本研究では、ゼブラフィッシュ胚のすべての細胞の F アクチンを蛍光標識する *Tg[ef1a:lifectRFP]*、クッセル胞細胞と内胚葉細胞の F アクチンを特異的に蛍光標識する *Tg[sox17:lifectGFP]*、*Tg[sox17:lifectRFP]* 系統を樹立した。樹立した *Tg[ef1a:lifectRFP]* と *Tg[sox17:lifectGFP]* を交配して、得られたダブル Tg 胚で、細胞の形状やアクチンの集積の時空間変化をタイムラプス解析したところ、原腸胚の時期は、lifectGFP 陽性の内胚葉細胞は、周囲の lifectRFP 陽性の中胚葉細胞と同じ細胞層に点在していたが、時間が進むにつれ、中胚葉の層から逸脱し、卵黄多核層 (YSL) に接するようになり、移動速度を速めながら正中線方向へ移動することを発見した。しかも、YSL に発現する接着因子を YSL 特異的にノックダウンすると、その移動遅延が起こり、腓臓や肝臓などの内胚葉由来器官の形成不全が起こることを突き止めた (Ishijima et al., 投稿準備中)。この発見は、一見ランダムにも見える細胞移動は、周囲の細胞・組織との相互作用を適切なタイミングや部位でスイッチしていくことで、秩序が生み出されていることを突き止めた点で重要である。

(2) また、*Tg[sox17: GFP]* 胚で、GFP 陽性のクッセル胞を構成する細胞の数と器官サイズを定量的に調べたところ、予想に反し、大きなばらつきがあることを発見した。同じステージの個体に存在するクッセル胞前駆細胞の数は、20-60 個で 3 倍程度、器官のサイズは、40,000-200,000 μm^3 の範囲で 5 倍程度違っていたのである。しかも、驚いたことに、大きさがバラバラにもかかわらず、全てのクッセル胞は正常な機能を持っていたため、心臓などの器官の左右非対称の配置は正常に起こることが明らかになった。また、*Tg[sox17:GFP]* 胚のクッセル胞前駆細胞をフェムト秒レーザーで 1 つ 1 つアブレーションして、機能を持つ器官を形成するために必要な最小細胞数、サイズを調べたところ、クッセル胞前駆細胞数が 13 個、器官サイズが 20,000 μm^3 の以下になると機能しなくなることがわかった (Ishikawa et al., 投稿準備中)。これらの事実は、クッセル胞には、細胞の数やサイズがある程度ばらついていてもそれを許容するシステムが備わっていることを示した点で重要である。

(3) フェムト秒レーザーを水中に照射すると、その集光点から広がるように衝撃力が伝わるということが知られている。このフェムト秒レーザーの誘起衝撃力は、細胞や組織に働く力を定量的に評価するために利用できる可能性が示唆された。研究代表者は、ゼブラフィッシュの器官形成の間に力学特性が変化している可能性を示唆するデータを得ていたため、本研究では、フェムト秒レーザーを利用して細胞や組織に働く力を定量評価する実験系を構築することを目指した。ゼブラフィッシュ胚は、多層の細胞層で形成されているため、胚の深い領域には、レーザーを集光させることが難しいので、ゼブラフィッシュの胚の表面にある上皮組織での力の定量法の確立を行った。上皮細胞の F アクチンを特異的に蛍光標識するため、*Tg[krt4:lifectGFP]* を作製し、共焦点顕微鏡で F アクチンの局在をライブイメージング

した。その結果、F アクチンの局在を指標として、上皮細胞の個々の細胞の形態をによって観察することに成功した。また、フェムト秒レーザーの照射によって、1-3 細胞をアブレートすることで、アクトミオシンリングの収縮がおこり、その死細胞が排除される過程を観察することにも成功した。しかも、アクトミオシンリングの中央にフェムト秒レーザーの誘起衝撃力を付与し、リングの収縮力と衝撃力を釣り合わせ、そのときのレーザー強度から、アクトミオシンリングの収縮力を定量したところ、約 3.7kPa の力が発生していることを明らかにした (図 1 ; 発表論文⑥)。この手法は、生物が内包する力学特性を解析する上での有用であり、その他の生命現象にも適用可能であることから、生体内力学特性を定量評価する技術として重要である。

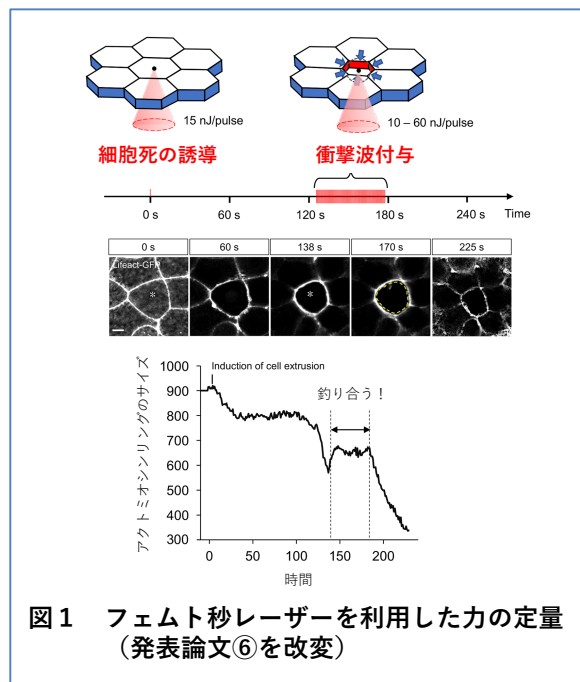
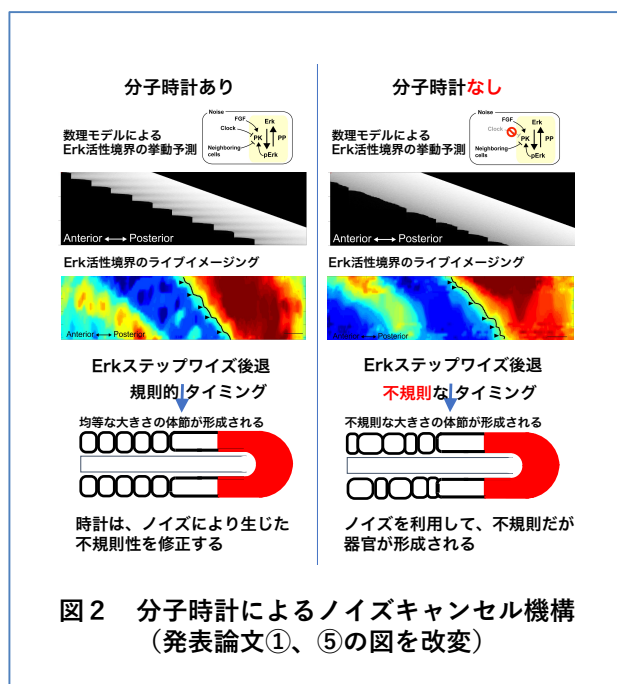


図 1 フェムト秒レーザーを利用した力の定量 (発表論文⑥を改変)

(4) 脊椎動物の体幹部の等間隔パターンを規定する体節は、胚の尾部に存在する未分節中胚葉が一定の間隔で分節することにより形成される。この体節形成には、時間的周期性の規定、位置情報による分節ポイントの決定が必須であり、この2つが統合されることで、分節境界の形成が繰り返し起こる。これまでの研究代表者の研究により、分子時計 (her1/her7) が作り出す時間的周期性が、位置情報を規定する Fgf シグナルを修飾し、時空間情報が統合されることで、同じ大きさの体節が繰り返し形成されることを明らかにしてきた (Akiyama et al., Development 2014) . この研究では、Fgf シグナルの活性を抗リン酸化 Erk 抗体を用いて調べていたため、本当に分子時計によって Fgf/Erk が修飾され等間隔パターンが規定されるのかは明らかになって



いなかった。そこで本研究では、Fgf/Erk の活性をゼブラフィッシュでライブイメージングすることができる実験系 (*Tg[efl1a:Erk biosensor-nes]*, *Teen*) を構築し (発表論文②)、体節形成時の Fgf/Erk の活性をライブイメージングしたところ、体節形成周期に合わせ、Erk の活性の前端が周期的に階段状にシフトすることを突き止めた (図2 ; 発表論文⑤)。さらに、動的な生命現象を理解するため数理モデルを作成し、不規則な体節形成には、細胞が常にさらされている「ノイズ」が利用されており、分子時計は、その不規則性を最小にすることで、均等な大きさの体節を規定するという新規システムの存在を提唱した (図2 ; 発表論文①)。これは、器官形成は、ノイズを利用して不規則に起こるが、生物は、そのノイズをキャンセルする分子機構を発達させ正確な大きさの器官を形成することができるようになったことを示唆した点で重要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Naoki H., Akiyama R., Sari DWK., Ishii S., Bessho Y., and Matsui T. Noise-resistant developmental reproducibility in vertebrate somite formation. PLoS computational biology 15, e1006579, 2019. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1006579 査読あり
- ② Wong KL., Akiyama R., Bessho Y., Matsui T., ERK Activity Dynamics during Zebrafish Embryonic Development. International journal of molecular sciences 20, 109, 2019. DOI: 10.3390/ijms20010109 査読あり
- ③ Matsui T. Cell adhesion and migration in the development of multicellular organisms. Frontiers in Cell and Developmental Biology 6: 142, 2018. DOI: 10.3389/fcell.2018.00142 査読あり
- ④ Ishimatsu K, Hiscock TW., Collins ZM, Kartika Sari DW., Lischer K., Richmond DL., Bessho Y., Matsui T. and Megason SG. Size-reduced embryos reveal a gradient scaling based mechanism for zebrafish somite formation. Development, 145, 161257, 2018. DOI: 10.1242/dev.161257 査読あり
- ⑤ Sari D., Akiyama R., Naoki H., Ishijima H., Bessho Y., and Matsui T. Time-lapse observation of stepwise regression of Erk activity in zebrafish presomitic mesoderm. Scientific Reports, 8: 4335, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-22619-9 査読あり
- ⑥ Yamada S., Iino T., Bessho Y., Hosokawa Y., and Matsui T. Quantitative analysis of mechanical force required for cell extrusion in zebrafish embryonic epithelia. Biology Open, 6, 027847, 2017. DOI: 10.1242/bio.027847 査読あり
- ⑦ Matsui T., Ishikawa H., and Bessho Y. Cell collectivity regulation within

migrating cell cluster during Kupffer' s vesicle formation in zebrafish. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3: 27, 2015. DOI: 10.3389/fcell.2015.00027 査読あり

〔学会発表〕（計 8 件）

招待講演のみ記載

- ① 松井貴輝 フェムト秒レーザー細胞制御による生体組織の治癒メカニズムの解明 第 89 回レーザー加工学会大阪, 2018.
- ② Takaaki Matsui A previously unidentified role of the segmentation clock in zebrafish somite patterning. TLL-NAIST Joint Symposium, シンガポール 2017.
- ③ Takaaki Matsui Size regulation of the laterality organ in zebrafish. International Meeting of the MSMBB & 23rd Scientific meeting of MSMBB, マレーシア 2016.
- ④ 松井貴輝 レーザーアブレーション法を用いたゼブラフィッシュ発生過程の細胞組織機能の解明. 新学術領域「植物の環境感覚」ワークショップ, 奈良 2015

〔図書〕（計 1 件）

- ① Matsui T., and Bessho Y. Analyzing ERK Signal Dynamics During Zebrafish Somitogenesis *Methods in Molecular Biology (ERK Signaling: Methods and Protocols)*, 1487, 367-378, 2017

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

https://researchmap.jp/taka_matsui/

<https://loop.frontiersin.org/people/190625/overview>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：別所 康全

ローマ字氏名：(BESSHO, Yasumasa)

研究協力者氏名：秋山 隆太郎

ローマ字氏名：(AKIYAMA, Ryutaro)

研究協力者氏名：山田 壮平

ローマ字氏名：(YAMADA, Sohei)

研究協力者氏名：細川 陽一郎

ローマ字氏名：(HOSOKAWA, Yoichiroh)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。