

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16144

研究課題名（和文）器官発生における楕円体の形成と機能発現

研究課題名（英文）Formation and function of ellipsoids in organogenesis

研究代表者

秋山 隆太郎 (Akiyama, Ryutaro)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：00790403

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではゼブラフィッシュの左右差決定器官クッペル胞（KV）の楕円体形成をモデルとして、器官の楕円体形成と機能（ノード流・左右差）を定量的に解析・理解することで、器官形成における3次元構造と機能との相互作用を明らかにすることを旨とした。研究の結果、KVの3次元構造を解析するためのトランスジェニック系統を樹立した。また、機械刺激により活性化されるシグナルが楕円体構造の構築に関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、動物が器官のかたちをどのように作り上げるのか、その仕組みを考える上で重要な知見と成り得る。また、本研究による器官の三次元形態の制御機構に関する理解は、再生医療に必須な「器官のかたちを自由に操る技術」などの応用面への展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to quantitatively analyze and understand the ellipsoid formation and function of the organ, and to clarify the interaction between three-dimensional structure and function in organogenesis employing the Kupffer's vesicle (KV) as a model organ. In this study, we established a transgenic line to analyze the 3D structure of KV. Furthermore, our data suggested that the signal activated by mechanical stimuli is involved in the construction of the ellipsoid structure of KV.

研究分野：発生生物学

キーワード：器官形成 楕円体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の器官は、その機能に応じた様々な 3 次元構造をとる。例えば肺泡や腎臓のボーマン嚢にみられる球形もその基本構造の一つである。生体内において器官が実際に示す球状形態は、各組織での機能発現に適した半球や楕円体に調節されていると考えられるが、そのしくみはよくわかっていない。

本研究では、ゼブラフィッシュの左右差決定器官クッセル胞 (KV) の楕円体形成をモデルとして、器官の楕円体形成と機能 (ノード流・左右差) を定量的に解析・理解することで、器官形成における 3 次元構造と機能との相互作用を明らかにすることを目指した。発生過程では 100 個程度の KV 細胞が楕円体の内腔を形成し、内腔面の微繊毛の回転によって反時計回りの水流 (ノード流) が発生することで、内臓の左右差が規定される。したがって KV は、楕円体 (KV 内腔の形態) とその機能 (ノード流・左右差) を定量・評価するのに適した実験系である。

予備実験において KV の 3 次元形態を解析する中で、KV 形成の初期の内腔は真球に近いが、ノード流が形成される時期までに楕円体に変形すること、KV の高さ比が大きく真球に近い胚では左右差異常が多くなることを示唆する結果が得られていた。さらに、薬剤処理により変形後の KV で膨張を促進すると、内腔の楕円体が真円状に戻り、正常なノード流が失われた。この KV 内腔の 3 次元形態 - 機能の相関関係をもとに、本研究では以下の 2 つの仮説 1) KV 内腔の 3 次元変形が、正常なノード流の生成に必要である、2) ノード流が KV 内腔の 3 次元形態を制御している、を立てその検証を試みた。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュの左右差決定器官クッセル胞 (KV) の楕円体形成をモデルとして、器官の楕円体形成と機能 (ノード流・左右差) を定量的に解析・理解することで、器官形成における 3 次元構造と機能との相互作用を明らかにすること

3. 研究の方法

本研究では当初、予備実験から得られた以下の仮説 1) KV 内腔の 3 次元変形が、正常なノード流の生成に必要である、2) ノード流が KV 内腔の 3 次元形態を制御している、の検証を通じて、クッセル胞における楕円体構造とその機能との相互作用を明らかにすることを目指した。そのために、まず内腔変形および個々の KV 細胞の形態変化を定量するためのトランスジェニック (Tg) ゼブラフィッシュ樹立を行い、KV の内腔面の形態変化を定量評価する方法について検討を行うこととした。同時に、内腔の扁平度や曲率を操作し、KV 機能 (ノード流・左右差) を測定することで、楕円体のどの要素が KV 機能に必要であるかを明らかにすることとした。

4 . 研究成果

(1) 内腔変形および個々の KV 細胞の形態変化を定量するためのトランスジェニック (Tg) ゼブラフィッシュ樹立を試みた。KV 細胞は、sox17 のプロモータ配列 (5.2kb) を用いてラベルできる。sox17 プロモータ下で Lifeact-RFP を強く発現する系統を作出することで、細胞の形態変化・収縮動態を観察することが可能となった。現在、この Tg 胚でタイムラプス画像を取得し、KV が楕円体へ変形する際の内腔面の曲率やその時間変化の算出方法について検討している。今後、内腔面の変形をより詳細に捉えるため、上皮細胞で頂端側に局在する Podocalyxin または Clic5b のシグナル配列を結合した GFP を同様に導入して可視化を試みる予定である。

(2) KV に外力を加えて内腔の変形を操作し、同一胚でノード流・左右差を測定することを試みた。具体的には、生体内で薬剤を徐放させるために開発された経皮吸収ゲル基剤であるプルロニックゲルを、KV の近傍に注入する方法を検討した。低温で液体のプルロニックが胚に注入後すぐにゲル化して KV を圧迫・変形することで、周囲組織の物理的変形を介した間接的な形態操作を期待したが、これまでのところ目的の変形を引き起こすことはできていない。予備実験ではゼブラフィッシュ胚をアクリル樹脂で挟み込むことで胚組織全体を変形させることができおり、今後この手法による KV 形態への影響を調べる予定である。

(3) 上記の取り組みと並行して、KV 内腔の三次元形態がどのような分子によって制御されているのかについて検討した。内腔内部の水流や内腔外部の周囲組織に由来する物理的な力が KV 細胞の変形に関与しているのではないかと予想し、機械刺激の受容を担ういくつかの分子を薬理的に阻害して KV 内腔の形態への影響を評価した。その結果、機械刺激等の物理刺激で活性化される TRP チャンネルの一つを阻害すると、内腔の楕円体構造構築が障害され、左右差異異常が引き起こされることを見出した。今後どのような機序で TRP チャンネルおよび下流シグナルが KV 内腔の三次元形態を調節しているのか調べる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tahara Naoyuki, Akiyama Ryutaro, Wang Justin, Kawakami Hiroko, Bessho Yasumasa, Kawakami Yasuhiko	4. 巻 472
2. 論文標題 The FGF-AKT pathway is necessary for cardiomyocyte survival for heart regeneration in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 30~37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2020.12.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeuchi Y, Narumi R, Akiyama R, Vitiello E, Shirai T, Tanimura N, Kuromiya K, Ishikawa S, Kajita M, Tada M, Haraoka Y, Akieda Y, Ishitani T, Fujioka Y, Ohba Y, Yamada S, Hosokawa Y, Toyama Y, Matsui T, Fujita Y	4. 巻 30
2. 論文標題 Calcium Wave Promotes Cell Extrusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 670~681.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2019.11.089	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hodaka Yamamoto, Akari Karaiwa, Sohei Yamada, Ryutaro Akiyama, Yoichiro Hosokawa, Yasumasa Bessho, and Takaaki Matsui
2. 発表標題 An effect of surrounding tissue morphology on directional collective migration of the posterior lateral line primordium in zebrafish
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------