

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：82401

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：22111007

研究課題名（和文）上皮細胞の動態を制御する場としての力の発生とその応答

研究課題名（英文）The role of forces and the cellular responses to them as a mechanism for epithelial morphogenesis

研究代表者

林 茂生（Hayashi, Shigeo）

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー

研究者番号：60183092

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 39,800,000円

研究成果の概要（和文）：上皮の形態形成機構を、細胞の力学的性質とそのゆらぎに留意して追求した。まず細胞球形化による上皮陥入の力学に関してライブイメージングと遺伝解析により気管原基をタイミングよく陥入させるために必要な3つの要素：EGF-ERKシグナルとその下流で働くミオシン、細胞の分裂に先立つ細胞球形化、および中胚葉から作用するFGFによる細胞遊走運動を同定した。気管陥入は三重の補償機構に守られた攪乱に強い極めてロバストなしくみであることが示された。また管腔形成においてはアピカル細胞外基質が細胞の拡張力、伸長力のばらつきを均一化する役割を担うことで過剰なゆらぎを抑制し、適切なサイズ調節を可能にすることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We studied the mechanical basis of epithelial movement and its interaction with extracellular environment. Our main research focus is the tracheal system in the Drosophila embryo, a network of tubular epithelium used as a respiratory organ. Epithelium is stabilized by cell-cell adhesion and cell-matrix adhesion. Breaking this stability is essential for initiating morphogenetic movement. We found that prospective tracheal primordium is under negative tension (pressurized). Anisotropic redistribution of tissue tension and timely mitosis initiates local mechanical instability that leads to tissue invagination movement. We also studied the tube lumen size control and found that extracellular matrix in the luminal space coordinates random movement of individual tubule cells to form coherent tissue architecture.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞生物学 形態形成 上皮 イメージング 力学 遺伝学 ショウジョウバエ 細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

上皮では個々の細胞の動きは接着している周囲の細胞によって拘束を受けるが、個々の細胞の動きが同調すれば上皮全体を変形させる大きな力を生み出す。細胞の動きに見られる不確定な「ゆらぎ」は単にシステムの乱れなのか、それとも細胞の協調性に積極的に関わる要因なのかは不明であった。これまでは上皮を多角形が敷き詰められた二次元平面として近似することで研究がすすんできたが、上皮の三次元的な形態変化を促す力学的要因に関する知見は三次元構造上皮を扱う適切な解析系が乏しいこともあって理解は遅れていた。

2. 研究の目的

発生中の胚において細胞を子細に眺めると不確定な「ゆらぎ」を伴って動いていることがわかる。これは単に上皮システムの乱れなのか、それとも細胞の協調性と形態形成に積極的に関わる要因なのか？これが研究開始時点におけるわれわれの疑問であった。そこで組織の形成単位としての上皮の形態形成機構を、細胞の力学的性質とそのゆらぎに留意して追求した。ライブイメージングに適したショウジョウバエ胚を材料として用い、上皮のシートが管に転換する過程と管の構造安定性を維持する生物物理学的法則の解明をめざした。

3. 研究の方法

気管原基の陥入の三次元的な細胞動態を記載し、陥入の位置とタイミングを規定するシグナル経路を同定するためにショウジョウバエ胚におけるライブイメージングの技術を蓄積し高速度、高空間解像度のイメージングとそのデータ解析システムを開発した。これらの蓄積を生かして陥入プロセスにおける細胞形態を定量的かつ網羅的に記載した上で、陥入時に作用する主要な力を同定する

ことを試みた。更にこれらの知見を統合し、組織の力学的動態を合理的に説明する力学モデルの開発を試みた。

4. 研究成果

(1) 細胞球形化による上皮陥入の力学(発表論文 4, 7, 9)

陥入は上皮シートが上皮性を保ちつつ折れ曲がり、体内に落ちこむことで新たな器官を生み出すプロセスである。ショウジョウバエの気管原基は柱状の上皮細胞が密に充填され肥厚した上皮であり、外力に対して頑強である。ライブイメージングと遺伝解析により気管原基をタイミングよく陥入させるために必要な3つの要素を同定した。気管上皮内で活性化されるEGF-ERKシグナルとその下流で働くミオシンの平面内収縮が陥入点の位置を決定する(1)。陥入前の気管細胞は細胞周期の間期で停止しているが、陥入点近傍の細胞は他に先駆けて分裂期に入り、陥入を促す。細胞の分裂に先立つ細胞球形化が陥入を加速する引き金となることがわかった(2)。柱状上皮の中で起きる局所的な細胞球形化は上皮の機械的安定性を著しく損ない、ミオシンに駆動された組織変形を促進すると考えられた。この報告は細胞球形化による局所的な構造ゆらぎが組織の変形を促すことを示した最初の実例である。更にEGFシグナルと細胞分裂が欠損し、陥入が遅延した際には、中胚葉から作用するFGFが気管原基細胞を体内に移動させる遊走運動を促す(3)。EGFシグナル、FGFシグナル、細胞分裂の三つの要素のうち一つでも残存する場合、不完全ながらも陥入は起きるが、三つのすべてが抑制された胚では気管陥入は起きない。従って気管陥入は三重の補償機構に守られた攪乱に強い極めてロバストなくみであることが示された。

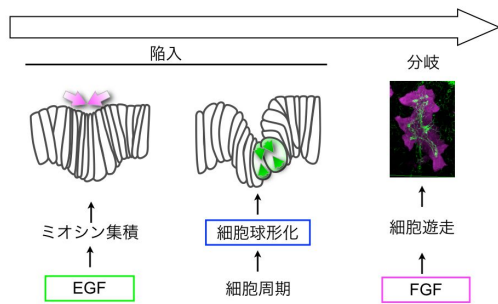


図1 . 気管原基陥入を促す三要素。正常発生においてはEGFシグナルと細胞球形化によって上皮が不安定化し、陥入が誘導される。その後活性化されるFGFシグナルは補償的な役割を果たす。

(2)アピカル細胞外基質による気管ジオメトリの力学的制御 (発表論文 2, 3, 6, 8,10)

細胞からなる管が循環器として機能するためには長さが体のサイズに一致し、流量に適した内径が全長に渡って均一に揃うことが必要である。個々の気管細胞は組織、個体レベルでの長さとおさの情報をどのようにして検知し、形態を調節するのだろうか？我々は発生中の気管の内腔を充填するアピカル細胞外基質(aECM)が組織スケールのサイズ情報を細胞に伝達する媒体として働くことを見出した。aECMの主要成分キチンの修飾酵素Serpの欠損や、アピカル細胞膜の過剰生産を促す変異体では気管は過剰に伸長し、湾曲する。この現象は細胞膜の伸長力に対してaECMの弾性が拮抗してバランスとする物理モデルで説明することができた。過剰に伸長した気管は構造不安定性を示し、湾曲した。

またキチン合成が欠損する変異体では気管内腔の拡張が不完全で直径が不均一になる。ライブイメージング解析によりこの不均一性は管腔面を収縮させるミオシンの活性がランダムに、さまざまな場所で上昇することに由来することが示された。正常胚では管腔面を取り囲むように細胞内にアクチン繊維が数十本の束となりリングを構成する。ミオシンは

このアクチン環を収縮させることで管腔からの拡張圧力に拮抗していると考えられた。通常は多数の各アクチン束にかかる収縮力が管全体にわたって均一の収縮力を与えることで管の内径を均一に保つ。キチン欠損条件ではアクチン束の配向が乱れ、ミオシンの活性も不均一になり管腔内径の構造不安定性が露呈した。これらの結果はaECMの異常は長さ方向、および直径方向の構造不安定性——ゆらぎ——を引き起こすことを示している。

< 研究の意義・展望 >

我々の研究は上皮組織における構造的ゆらぎの二面的な役割を明らかにした。陥入においては細胞球形化によるゆらぎが組織を積極的に変形させるために利用されている。一方でいったん管状化した管が適切な長さとおさを獲得するプロセスにおいては aECM が細胞側に存在する拡張力、伸長力のばらつきを均一化する役割を担っている。つまり aECM は過剰なゆらぎを抑制することで適切なサイズ調節を可能にするのである。今後も発生におけるさまざまな局面での構造的ゆらぎの役割を追求することで細胞組織における細胞運動の役割の理解を深めたい。

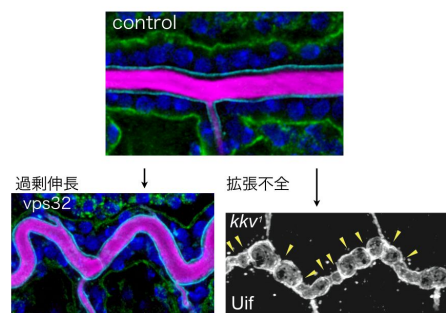


図2 . 気管の長さとおさの制御。気管の内腔にはアピカル ECM(マゼンタ)が充填され、拡張する。vps32 変異体ではアピカル細胞膜(シアン)の過剰生産が管の過剰伸長と座屈による折れ曲がりを引き起こす。キチン合成酵素の変異体(kkv)では内腔の拡張が不十分でアピカル細胞膜に不規則なくびれが生じる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

1. Otani T., Oshima K., Kimpara A., Takeda M., Abdu U., Hayashi S. A transport and retention mechanism for the sustained distal localization of Spn-F-IKK during *Drosophila* bristle elongation. *Development* 142, 2338–2351 (2015). 査読有
2. Hannezo, E., Dong, B., Recho, P., Joanny, J.-F. & Hayashi, S. Cortical instability drives periodic supracellular actin pattern formation in epithelial tubes. *PNAS* 112, 8620–8625 (2015). 査読有
3. Dong, B. & Hayashi, S. Shaping of biological tubes by mechanical interaction of cell and extracellular matrix. *Curr Opin Genet Dev* 32, 129–134 (2015). 査読有
4. Kondo, T. & Hayashi, S. Mechanisms of cell height changes that mediate epithelial invagination. *Development, Growth & Differentiation* 57, 313–323 (2015). 査読有
5. Miao, G. & Hayashi, S. Manipulation of gene expression by infrared laser heat shock and its application to the study of tracheal development in *Drosophila*. *Dev Dyn* 244, 479–487 (2015). 査読有
6. Dong, B., Hannezo, E. & Hayashi, S. Balance between apical membrane growth and luminal matrix resistance determines epithelial tubule shape. *Cell Rep* 7, 941–950 (2014). 査読有
7. Kondo T, Sakuma T, Wada H, Akimoto-Kato A, Yamamoto T, Hayashi S. TALEN-induced gene knock out in *Drosophila*. *Development, Growth &*

Differentiation 56, 86–91 (2014). 査読有

8. Dong, B., Miao, G. & Hayashi, S. A fat body-derived apical extracellular matrix enzyme is transported to the tracheal lumen and is required for tube morphogenesis in *Drosophila*. *Development* 141, 4104–4109 (2014). 査読有
9. Kondo, T. & Hayashi, S. Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination. *Nature* 494, 125–129 (2013). 査読有
10. Dong, B., Kakihara, K., Otani, T., Wada, H. & Hayashi, S. Rab9 and retromer regulate retrograde trafficking of luminal protein required for epithelial tube length control. *Nature Communications* 4, 1358 (2013). 査読有

[学会発表](計9件)

1. India-Japan Workshop: National Centre of Biological and RIKEN
開催時期、場所 2012年1月、バンガロール、インド
主催機関 理研
タイトル Cell and tissue morphogenesis in *Drosophila*
2. CDB Symposium 2012, Quantitative Developmental Biology
開催時期、場所 2012年3月26日-28日、発生・再生科学総合研究センター、神戸市、兵庫県
主催機関 理研
タイトル Conversion of Epithelial Sheet into Three-dimensional Tubule
3. EMBO Conference, The Molecular and Developmental Biology of *Drosophila*
開催時期、場所 2012年6月24日-30日、

コリンバリ、ギリシア

主催機関 EMBO

4. Asia-Pacific Developmental Biology Conference

開催時期、場所 2012年10月5-8日、台北市、台湾

主催機関 APDBN

タイトル Homeogenetic mechanism of segment regeneration in polychaete

5. Swiss Japanese Developmental Biology Meeting

開催時期、場所 2012年11月5-8日、京都ガーデンパレス、京都市、京都府

主催機関 理研

タイトル Active role of mitotic cell rounding in epithelial morphogenesis

6. The 23rd CDB Meeting Building multicellular systems from Cellular Cross-Talk

開催時期、場所 2013年1月22日-23日、発生・再生科学総合研究センター、神戸市、兵庫県

主催機関 理研

タイトル Shaping Epithelial Sheet into Three-dimensional Organ

7.

The 2nd Asia-Pacific Drosophila Research Conference

開催時期、場所 2013年5月13日-16日、ソウル、韓国

タイトル The role of mitotic cell rounding and mechanical instability in

8. 2nd International Picobiology Institute Symposium Development and Destruction

開催期間、場所 2014年10月9日-10月10日、兵庫県立大学、赤穂市、兵庫県
主催機関 兵庫県立大学

タイトル Mechanical stability and instability in epithelial tube morphogenesis.

9. The 62nd NIBB Conference "Force in Development".

開催期間、場所 2014年11月17日-19日、基礎生物学研究所、岡崎市、愛知県

主催機関 基礎生物学研究所

タイトル Mechanical stability and instability in epithelial tube morphogenesis

〔その他〕

ホームページ等(7件)

1. 2016年4月21日

理化学研究所

細胞をドーナツ型に変形させる力の源

- 上皮細胞のトポロジーを変換するメカニズムを解明 -

http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160421_1/

2. 2015年6月23日

理化学研究所

細胞伸長の司令塔を配置する仕組みを解明

- 細胞内の物流システムの調節に新たな発見 -

http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150623_1/

3. 2014年5月2日

細胞外マトリクスの形態形成における新たな働きの発見

- 伸びる上皮細胞と細胞外マトリクスの弾性が気管の長さや形状を決める -

<http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140>

502_1/digest/

4. 2013年1月16日

ショウジョウバエの気管の長さを決める仕組みを発見

http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130116_1/digest/

5. 2013年1月14日

組織形成における細胞分裂の新しい役割の発見

http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130114_1/digest/

6. 2013年5月8日

ゴカイが持つ無限の再生能力の仕組みを解明

http://www.riken.jp/pr/press/2013/20130508_1/digest/

7. 2011年5月6日

ミトコンドリアに細胞を形作る「骨格」機能を発見

<http://www.riken.jp/pr/press/2011/20110506/digest/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 茂生 (HAYASHI SHIGEO)

国立研究開発法人 理化学研究所

多細胞システム形成研究センター

チームリーダー

研究者番号：60183092

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

本多久夫 (HONDA HISAO)

神戸大学, 医学研究科, 研究員

研究者番号：10289118