

令和元年6月14日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06170

研究課題名（和文）細胞の収縮変形を操作して組織の変形機構を調べる

研究課題名（英文）Synthetic tissue deformation through manipulating apical constriction in epithelial cells

研究代表者

戎家 美紀 (Ebisuya, Miki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：00544933

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、哺乳類組織の変形を人工的に操作・再構成することを目指した。第1段階として、上皮細胞の頂端収縮を人工的に誘導し個々の細胞の形を変形させる分子ツールを開発した。光活性化転写因子を用いてShroom3という遺伝子の発現を誘導したところ、MDCK細胞において頂端収縮を誘導することができた。次に第2段階として、開発した分子ツールを用いて細胞シート内の特定の細胞集団で頂端収縮を誘導し、組織の変形を起こした。軟らかいゲルの上で形成したMDCK細胞シートにおいて、特定領域を光照射したところ、細胞の集団移動や細胞シートの小さな陥入を起こす様子が観察できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

形態形成は発生生物学の中心的課題であるが、哺乳類組織の変形を操作できる方法はほとんど存在しない。よって本研究で作成した光依存的な頂端収縮誘導法は汎用的な分子ツールになり得る。また、近年オルガノイド技術などの発展により、組織や器官を人工的に作ろうという試みが盛んになっている。オルガノイドは基本的に幹細胞の自己組織化能力をひきだすことで組織形成を目指すものであるが、本研究では頂端収縮を人工的に誘導することで組織変形をデザインすることを試みた。よって、本研究は組織や器官の人工的作製に向けたユニークなアプローチと言える。

研究成果の概要（英文）：The goal of this project is to manipulate and reconstitute the deformation of mammalian tissues. As the first step, we developed a molecular tool that induces apical constriction of epithelial cells and changes their shape in a photostimulation dependent manner: we induced the expression of Shroom3 with a photoactivatable transcription factor, successfully causing apical constriction in individual MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells. As the second step, we induced tissue deformation by using the developed molecular tool: we illuminated a specific area of an MDCK cell sheet, successfully observing convergent movement of cell population as well as small indentation of the cell sheet.

研究分野：合成生物学

キーワード：器官形成 頂端収縮 組織形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私達は、多細胞生物の発生原理を人工的に操作・再構成することで理解しようとしている。これまで主に、細胞集団が自発的に空間パターンを形成するしくみを培養細胞上に作製してきた。しかし、2次元のパターン形成だけでは生物の形作りに不十分なのは明白で、組織の3次元的な変形が必要である。よって次は組織変形の操作・再構成を目指す。その第一歩として、個々の細胞の収縮変形を制御し組織全体の変形を誘導する実験系の構築と解析を行う。

2. 研究の目的

現在までに知られている細胞の主要な変形機構は、頂端収縮 (apical constriction) である。頂端収縮とは、上皮細胞の頂端側 (apical 側) で Rho-ROCK-actomyosin 経路が活性化することによって、細胞の頂端部が収縮する機構である。頂端収縮を制御できれば、個々の細胞の形を台形に変えることができ、それによって組織全体の変形を起こすことができる。そこで、光依存的に Rho-ROCK-actomyosin 経路を活性化する手法を開発し、それをを用いて上皮組織に陥入などの変形を起こす。

3. 研究の方法

本研究計画の中で技術的に最も難しいステップは、光依存的に細胞の収縮変形を起こす手法の開発である。開発はたいてい理屈通りにいかないもので、異なる設計原理に基づいた複数のプランを並行して進め、うまくいったものを採用する。RhoA, ROCK, Shroom3, Myosin など異なる遺伝子をターゲットにするとともに、光を利用する方法も、光依存的なタンパク質結合、光活性化転写因子、光による Myosin 走行方向の変換など複数試す。

並行して、変形を起こすためのモデル組織の準備を進める。第一候補としては、哺乳類培養上皮細胞である MDCK 細胞の cyst の利用を予定しているが、その他の組織も検討する。

4. 研究成果

4-1. 光依存的に細胞の収縮変形を起こす手法の開発

5つ以上の異なるプランを試した結果、光依存的に Shroom3 遺伝子の遺伝子発現を活性化する手法が最も強い頂端収縮を起こせることがわかった。Shroom3 には、ROCK を頂端側に局在させる機能があり、強制発現させると個々の細胞で頂端収縮が起きると知られていた (Nishimura T & Takeichi M, Development, 135, 2008)。ただし、Shroom3 を用いて組織としての変形を起こした例はない。本研究では、Shroom3 の発現を光活性化転写因子 GAVPO (Wang X et al, Nat Methods, 9, 2012) を用いて誘導した。MDCK 細胞集団の一部の領域を光照射し Shroom3 の発現を誘導したところ、光照射された細胞が頂端収縮を起こし、周囲の細胞が光照射領域に向かって移動する様子が観察できた (図1)。

次点として、恒常的活性化型 RhoA を光依存的に細胞膜に局在させる方法も細胞の変形を引き起こしたが、頂端側の選択的な収縮というよりは細胞が丸くなるタイプの変形であり、組織の変形を引き起こすには、Shroom3 遺伝子の利用が最も適していると判断した。ただし、Shroom3 の転写誘導には、時間解像度や空間解像度が悪いという欠点もあり、この改良が今後の課題である。

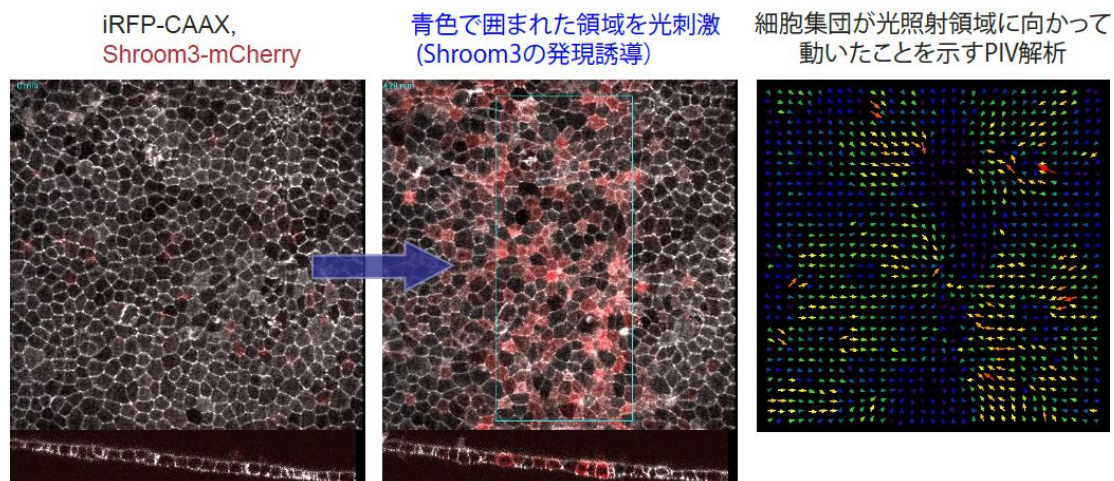


図 1

4-2. 大きな変形を起こすためのモデル組織の検討

4-1 で作成した手法を用いて、MDCK cyst(球状の3次元培養系)の変形を起こすことを試みた。しかし、MDCK cyst はある程度以上大きくならないため、球の曲率が大きすぎて、新たな陥入を作ることが難しかった。よって、2次元のMDCK細胞シートを使用することにしたが、硬い培養皿の上では細胞シートは変形することができない。そこで、柔らかいゲルの上に形成させたMDCK細胞シートを使用することにした。市販のマトリゲルやコラーゲンゲル上では、小さな陥入構造しか形成されなかったが、マトリゲルに化学的処理を加えて改良型にしたところ、頂端収縮依存的に細胞シートが大きく曲がる様子が観察できた(図2)。今後はこの改良型マトリゲル上の細胞シートと4-1で開発した光による頂端収縮操作手法を組み合わせ、より複雑な組織変形を作る予定である。また、異なったタイプの組織として、オルガノイドの形を操作するための実験準備を開始した。

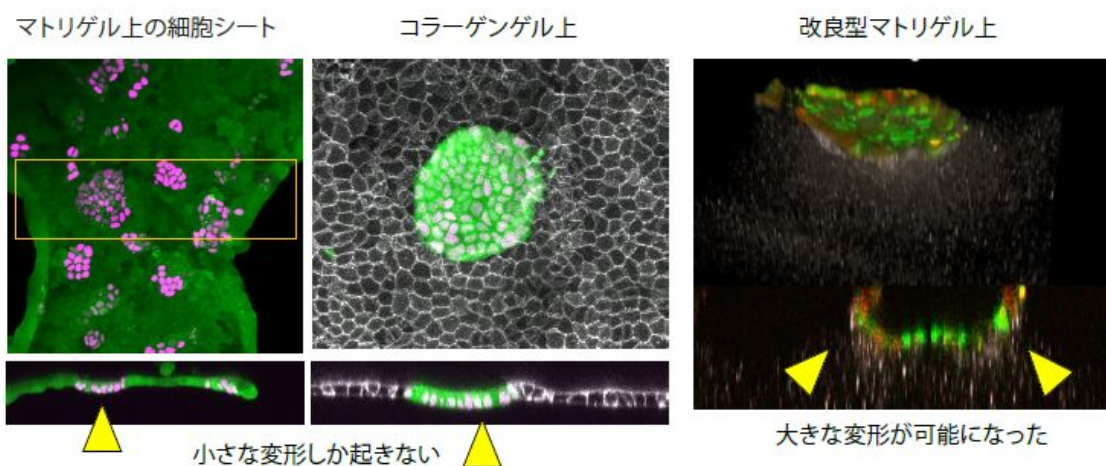


図 2

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Sekine R, Shibata T, **Ebisuya M.**

Synthetic mammalian pattern formation driven by differential diffusivity of Nodal and Lefty.
Nat. Commun., 9, 5456. doi: 10.1038/s41467-018-07847-x (2018). 査読あり

2. **Ebisuya M** & Briscoe J.

What does time mean in development?

Development, 145, doi: 10.1242/dev.164368 (2018). Review article 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 190325 RIKEN BDR symposium, Kobe

Ebisuya M.

Human time vs. Mouse time: in vitro segmentation clock as a model system

口頭発表 招待講演

2. 190317 EMBLEMO symposium: Synthetic morphogenesis, Heidelberg, Germany

Ebisuya M.

Human Time vs. Mouse Time with in vitro Segmentation Clock

オーガナイザー、口頭発表 招待講演

3. 181113 EMBO workshop: Molecular Mechanisms of Regenerative and Developmental Biology, Singapore

Ebisuya M.

Human Time vs. Mouse Time in the Segmentation Clock

口頭発表 招待講演

4. 180904 EMBO meeting: Size and shape, Bangalore, India

Ebisuya M.

Mouse time vs. Elephant time: in vitro segmentation clock as a model

口頭発表 招待講演

5. 180119 分子ロボティクス研究会 福岡

Ebisuya M.

人工遺伝子回路で発生現象を培養細胞上に再構成する

口頭発表 招待講演

6. 171214 バイオエンジニアリング講演会 京都

Ebisuya M.

発生現象を培養細胞上で再構成する

口頭発表 招待講演

7. 171127 Morphologic Engineering, Barcelona, Spain

Ebisuya M.

Reconstitution of developmental mechanisms with synthetic gene circuits

口頭発表 招待講演

8. 171019 細胞を創る会 京都

Ebisuya M.

発生現象を細胞「で」つくる

口頭発表 招待講演

9. 170314 aDVANCES IN SYSTEMS AND SYNTHETIC BIOLOGY, Lyon, France

Ebisuya M.

Synthetic cell-cell communications mimicking multicellular development

口頭発表 招待講演

〔図書〕(計 0件)

〔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

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：高山真美、Nuria Taberner
ローマ字氏名：Takayama Mami, Nuria Taberner

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。