

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07385

研究課題名（和文）ニワトリ中胚葉細胞の遊走をモデルとした3D細胞集団運動の定量的解析

研究課題名（英文）Quantitative measurements of mesodermal cell migration in the chick embryo

研究代表者

仲矢 由紀子（Nakaya, Yukiko）

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・研究員

研究者番号：70415256

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、単独で動く能力をもつ間充織性細胞が、集団秩序を形成して運動するしくみを明らかにするために、ニワトリ胚中胚葉細胞の遊走をモデル系とした細胞運動の定量解析を行った。その結果、10 - 20個の中胚葉細胞が、N-cadherinを介した3次元的な細胞間接着で繋がった網目様構造の集団を形成すること、さらにこの構造をダイナミックに再編成しつつも、向きを揃えて効率的に集団移動するという全く新しい遊走様式を見出した。また、これらの網目細胞集団における運動速度や協調した方向性は、N-cadherinの機能が阻害された場合に著しく低下し、中胚葉組織形成が遅延する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ライブイメージングとその後の定量的な画像解析系を発展させて、これまでに報告されていたstreamingやchain migrationとは全く異なる間充織細胞の新しい遊走様式を明らかにした。細胞が網目様にまとまって動く現象は、ある上皮性ガン細胞種の浸潤過程においても観察されている。今後、網目形成のメカニズムとその制御機構を分子的に明らかにすることにより、中胚葉の形態形成のみならず、ガン転移の制御メカニズムの研究にも応用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Collective cell migration is an important phenomenon for morphogenesis and cancer metastasis. However, little is known how migratory cells coordinate collectively in a living organism. In this study, we show the mechanism by which mesenchymal cells, which have an ability to move independently, move collectively using the chick mesodermal cells migration as a model. We found that mesoderm cells are organized as a meshwork by N-cadherin mediated cell-cell contact and cooperatively migrate as a group undergoing constant re-organization. Loss of N-cadherin function impairs the directionality of movement for each cell group and resulted in a decreased mean velocity of global migration of that group, leading to abolish the efficient mesoderm tissue expansion. We propose that the dynamic meshwork is a possible mechanism allow cells to be collective during mesoderm cell migration.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞集団運動 定量解析 ニワトリ 中胚葉

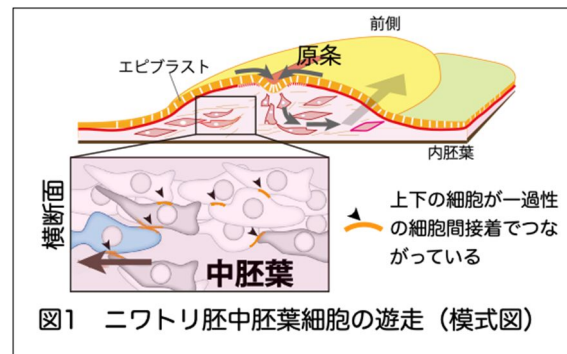
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物を構成する細胞の多くは、集団的に遊走する性質を持っている。これには、組織形態を保ちながら動く場合の sheet migration、ネットワーク様の構造を作る場合の sprouting や branching 等、様々な発生過程の場面において特異的な細胞集団の動態があるが、いずれも安定な細胞間接着が1つの重要なメカニズムであると考えられている。一方、個々で自由に動く能力を持つ間充細胞においても、生体内では、細胞間が点と点で繋がって集団的な遊走挙動を示す。しかし、これらの細胞遊走では細胞間の接着は決して安定しておらず、どのように集団的秩序が形成されるのか、また、それぞれが自由に動ける細胞が、なぜわざわざ大きいスケールの集団を形成して運動するのか等、不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

ニワトリ胚の中胚葉組織は、原条からからだの中に潜り込んだ間充細胞の群れが、エピプラストと内胚葉に挟まれた空間を、前側に向かって一斉に広がりながら移動し(図1)最終的には、骨や筋肉、体腔そして血管系等に分化する。この過程において、個々の中胚葉細胞は一見してランダムに動いているが、近隣の複数の細胞が、同じ運命を持ち、同じ場所を目指して遊走することが fate map の研究から推測されている。本研究では、この中胚葉細胞の遊走をモデルとして、3次元的な細胞の動き、細胞間の接着、様々な細胞挙動に関わる分子の機能などについて、定量解析を行う。さらに、この生物学的実験に加えて理論的考察を行い、1細胞のランダムな運動と集団としての移動がどのように両立し、形態形成に関与しているかについて明らかにする。



3. 研究の方法

(1) 様々な発生段階のニワトリ胚を用いて、各種免疫染色と透明化処理を施行し、広視野あるいは深さ方向に分解能を維持した画像を取得する。さらに、それらを3次元的に再構築し、中胚葉組織を構成する細胞の形態や細胞間の接着に関わる各種たんぱく質の発現を様々な角度から観察する。また、核の重心を求め、その座標から細胞の密度や分布を定量解析する。

(2) 野生型あるいはGFPを発現したトランスジェニック(TG)-ニワトリ胚(名古屋大鳥類バイオサイエンス研究センター)において、中胚葉細胞の核をエレクトロポレーション法によりラベルし、倒立型2光子顕微鏡によりライブイメージングを行う。単一細胞レベルで細胞の動きを追跡し、速度や方向、直進性、平均2乗変位(MSD)、細胞分散性などの様々な細胞運動のパラメーターに関して定量解析を行う。また細胞間の相互作用として、接着や接触阻害(CIL)について検証する。

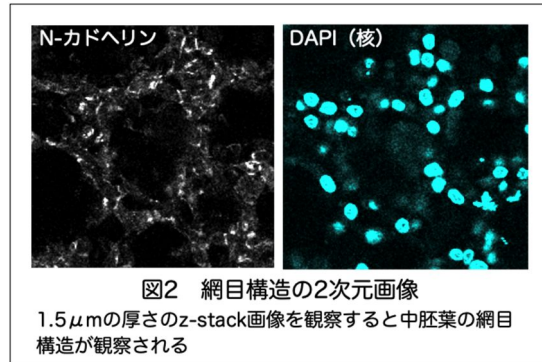
(3) (1)と(2)の方法により、N-cadherinなどの接着分子やアクチンなどの機能解析を行い、細胞集団運動への影響を検証する。

(4) 実験と協働する数理モデルを構築し、間充細胞の集団運動を理論的に明らかにする。

4. 研究成果

(1) 中胚葉細胞による網目構造の形成

本研究では、3次元的に広がる中胚葉組織内における各細胞の空間分布を定量するために、中胚葉形成の初期にあたる HH stage4 のホールマウント胚を用いて、N-cadherin および核染色を行い、さらに透明化処理を施した。中胚葉は、エピプラストと内胚葉の間を埋める2~4層の細胞層から構成されている(図1)。



Z-section およびタイリング機能を使って取得した画像を3次元構築して、ボリュームレンダリング(立体的に観察)すると、中胚葉細胞の並び方にはこれといった特徴的な規則性は認められなかった。しかし、厚さ1.5 μ mのZ-section(水平面の光学切片)で観察すると、複数の細胞が繋がった網目様構造が観察された。またそれぞれの細胞は、N-cadherinを介した細胞間接着で繋がっていることがわかった(図2)。次にこの網目構造を定量的に示すために、パーシステントホモロジーの手法に基づく位相的データ解析を行った。核染色画像(図2)から網目1つ分の大きさ、それを構成する細胞数などを定量した結果、平均して18個の細胞からなる網目が形成されていることがわかった。以上の結果より、中胚葉組織内では、一見してランダムに細胞が配置されているが、実は、網目構造という形態的な秩序が潜在している可能性が考えられた。

(2) 遊走する中胚葉細胞のダイナミックな網目形成とN-cadherinの役割

次に、実際に中胚葉細胞が動く際に、網目構造が維持されて集団運動するかどうかについて、GFP-TG ニワトリ胚を用いて検討した。2光子顕微鏡でライブ観察した結果、中胚葉細胞は、固定サンプルで観察されたものと同様の網目の集団を形成し、その形成と離散を繰り返しながら、協調して移動することがわかった。そこで、蛍光ラベルされた核のトラッキングを行い、核の重心座標を使った4次元的位置情報(フレームごとのXYZ座標)から、細胞運動を定量する解析系を構築した。これにより、(1)で定量した網目の大きさ相当の1000 μ m²を1つの細胞集団とみなして平均し、正常細胞とN-cadherin機能阻害細胞の挙動を細胞集団レベルで比較した。その結果、正常細胞は進行方向を揃えて集団移動するのに対し、N-cadherin機能阻害細胞では、集団内において運動方向は揃わず、直進性も著しく低下した。また、移動の速度も正常細胞と比較して1/2にまで低下した。次に、網目形成のメカニズムを明らかにするために、細胞膜を可視化して、隣接する細胞間の挙動を詳細に観察した。その結果、網目を形成する正常細胞では、ある一定の時間内で細胞間の接着と解離を繰り返しながら連なって遊走するペアが多く観察されたが、N-cadherinの機能が阻害されたペアでは、1度離れると互いに無方向性に運動し、2度と両者が接着することはなかった。以上より、N-cadherinを介した細胞間の持続的な相互作用は、網目を伴う細胞集団運動に重要であると考えられた。

(3) まとめ

これまでの縦横の組織切片から、ニワトリ胚の中胚葉では、細胞が高密度でランダムに配置されていると理解されていた。また組織がどのように伸展し、その過程に細胞運動がどのように関わっているかについてはあまりよく研究されていなかった。本研究では、胚の透明化技

術、GFP-TGニワトリ胚、1細胞レベルでのイメージングといった最先端のテクノロジーを駆使することにより、一見してランダムな複雑な動きの中胚葉細胞が、網目構造という秩序を作って集団的に移動することを見出した。この遊走様式は、別の間充織性の細胞である神経堤細胞が示す Streamingとは異なった新しいメカニズムである。今後、実験結果と協働する数理モデルを構築して網目形成のメカニズムを理論的に明らかにし、自由に動ける細胞が、大きいスケールの集団を形成して運動することの生物学的な意義を追究したい。

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 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hamidi Sofiane, Nakaya Yukiko, Nagai Hiroki, Alev Cantas, Kasukawa Takeya, Chhabra Sapna, Lee Ruda, Niwa Hitoshi, Warmflash Aryeh, Shibata Tatsuo, Sheng Guojun	4. 巻 147
2. 論文標題 Mesenchymal-epithelial transition regulates initiation of pluripotency exit before gastrulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 184960-184978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.184960	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 Hamidi S, Nakaya Y, Nagai H, Alev C, Shibata T, Sheng G.	4. 巻 4
2. 論文標題 Biomechanical regulation of EMT and epithelial morphogenesis in amniote epiblast.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physical Biology	6. 最初と最後の頁 041002-041011
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1478-3975/ab1048	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yukiko Nakaya, Sohei Tasaki and Tatsuo Shibata
2. 発表標題 Mesoderm cells collectively migrate in the form of dynamic meshwork during chick gastrulation
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposium: Mechanical Forces in Development（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Nakaya, Sohei Tasaki, Ayako Matoba and Tatsuo Shibata
2. 発表標題 Mesoderm cells collectively migrate through a dynamic meshwork during chick gastrulation
3. 学会等名 The 9th EMT International Association Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Nakaya and Tatsuo Shibata
2. 発表標題 Let's see the mesoderm formation in chicken
3. 学会等名 53rd annual meeting of the JSDB (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Nakaya, Sohei Tasaki, Ayako Matoba and Tatsuo Shibata
2. 発表標題 Mesoderm cells collectively migrate through a dynamic meshwork during chick gastrulation
3. 学会等名 53rd annual meeting of the JSDB
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Nakaya and Tatsuo Shibata
2. 発表標題 Mesoderm cells collectively migrate through a dynamic meshwork during chick gastrulation
3. 学会等名 43rd annual meeting of the MBSJ (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲矢由紀子、田崎創平、磯村綾子、柴田達夫
2. 発表標題 ニワトリ初期胚の中胚葉細胞が移動中に織りなす網目構造の謎にせまる
3. 学会等名 日本発生学会 秋季シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲矢由紀子、田崎創平、磯村綾子、柴田達夫
2. 発表標題 中胚葉細胞集団が移動中に織りなす網目構造の謎にせまる
3. 学会等名 文科省科研費 新学術領域研究「細胞ダイバース」第二回若手ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Nakaya, Sohei Tasaki, Ayako Isomura and Tatsuo Shibata
2. 発表標題 Roles of N-cadherin mediated cell-cell contact in collective cell migration during chick mesoderm formation
3. 学会等名 52nd annual meeting of the JSDB
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Nakaya, Ayako Isomura and Tatsuo Shibata
2. 発表標題 Collective cell migration in chick mesoderm formation
3. 学会等名 CDB symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲矢由紀子
2. 発表標題 ニワトリ胚中胚葉細胞の遊走をモデルとした3D 細胞集団運動の定量的解析
3. 学会等名 定量生物の会
4. 発表年 2017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
連携研究者	柴田 達夫 (Shibata Tatsuo) (10359888)	国立開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・ チームリーダー (82401)	