

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：63904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2017

課題番号：17H07332

研究課題名(和文)メカノセンサーチャネルPiezoによる組織形態形成の制御

研究課題名(英文)Regulation of tissue morphogenesis by mechanosensor channel Piezo1

研究代表者

田中 恵子(野々村恵子)(Tanaka, Keiko)

基礎生物学研究所・初期発生研究部門・助教

研究者番号：70799246

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文):機械的な力が生体にどのような影響を及ぼしているのかについてはまだあまりわかっていない。研究代表者は、近年同定された機械刺激開口チャネルPiezoに着目し、Piezoが組織の正常な形態形成に必須であることを見出した。本研究課題では、タンパク質であるPiezoと細胞の集合である組織の形態がどのように関係にあるのかを明らかにするために、培養した細胞にてPiezo下流で起こる変化を探索した。その結果、細胞骨格と細胞接着に特定の変化が起こることが判明した。また生体内や培養細胞にてPiezoの活性化を検出するための系の検討を行った。

研究成果の概要(英文):It remains obscure how mechanical forces affect phenomena in vivo. I have been focusing on Piezo channels, which were identified as mechanosensor proteins several years ago. I have found that Piezo is required for proper tissue morphogenesis. In this research project, in order to clarify the relationship between Piezo protein and tissue morphology consisting of many cells, I have looked for changes induced by Piezo activation in these cells by immunostaining. I observed changes in the amount and/or localization of proteins for cytoskeleton and cellular adhesion. In addition, I have been setting up systems to detect Piezo activity in vivo and in vitro.

研究分野：発生生物学

キーワード：Piezo 機械的な力 組織形態形成

1. 研究開始当初の背景

多くの生物種で全ゲノム配列の同定が終了しているが、この情報だけでは生体内の細胞や器官の挙動を理解するには不十分である。言い換えれば、我々の体に備わった器官の複雑かつ機能的な構造を作り出すためには、モルフォゲンの濃度勾配やそれに応じた遺伝子発現の変化だけでは説明がつかない。生体内の個々の細胞が周囲の機械的な力を読み取り、この情報に基づいて応答(形態・配置の変化、遺伝子発現の変化)をすることで組織や器官の正常な形態形成に寄与する、というのは一つの魅力的な仮説である。しかしながら細胞の機械刺激受容の分子メカニズムが明らかでない場合も多い。このため、組織や器官の形態形成に対する機械的な力の寄与についてもはっきりしていない部分が多く残されている。

近年、哺乳類で機能するメカノセンサーチャネルとして Piezo1/2 が、研究代表者がポスドク研究員として所属していた米国・スクリプス研究所・Patapoutian 研究室により同定された。Piezo チャネルは一量体あたり最大 38 個の膜貫通領域を持つ巨大なタンパク質で、3 量体にて  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  を透過する非選択性的カチオンチャネルとして機能する。これまでに培養細胞にて細胞外の液流、細胞膜の陰圧伸展および陽圧伸展が Piezo を活性化することが示されている(図 1)。Piezo が機械刺激-細胞内シグナル変換器そのものであることは、Piezo1 タンパク質のみを人工脂質二重膜に埋め込んだ場合にも、機械的な変動により開口することから確認された。哺乳類でメカノセンシングに関わるとされているチャネルは多数あるが、機能的な証明がされたものは現在のところ Piezo の他数種類のみである。Piezo タンパク質が細胞膜の張力変化にどのようにして応答するのかについては、巨大な膜貫通領域が細胞膜と何らかの相互作用をすると推測されており、現在も Patapoutian 研究室で解析が行われている。

哺乳類では Piezo1 と 2 があり、発現パターンが異なる。感覚神経の一部は Piezo2 を発現している。これまでに Piezo2 が皮膚触覚と固有感覚の主要なメカノセンサーであること、また呼吸の制御に必要なことを研究代表者ら Patapoutian 研究室のメンバーや他のグループが報告した。肺は常に機械的な刺激に晒されている器官であり、肺に投射

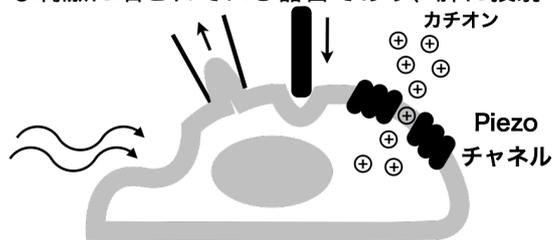


図 1. Piezo は細胞膜に存在し機械刺激により開口するカチオンチャネルである。

矢印; Piezo を活性化する機械刺激。左から液流、陰圧あるいは陽圧による細胞膜の進展。

する神経の中には肺の膨張により発火するものが含まれることは知られていた。しかしながら、神経束の切除など従来の手法では化学受容体と機械受容体の効果を分離することが難しかったため、これまで呼吸におけるメカノセンシングの生理的な意義ははっきりしていなかった。研究代表者は Piezo2 の生体内での役割を探るために、Piezo2 の全身ノックアウトマウスの解析を行った。このマウスは出生 24 時間以内に致死となり、その際血中酸素濃度の低下や吸気頻度の低下といった呼吸の異常が観察された。呼吸に関わる組織における Piezo2 の発現パターンを調べ、それに基づき細胞種特異的な Piezo2 ノックアウトマウスを作成したところ、神経堤細胞由来の感覚神経が責任細胞であることが明らかとなった。興味深いことに、成体マウスでは上述の感覚神経と由来が異なる Nodose 迷走感覚神経に発現する Piezo2 が、吸気時の肺の膨張を検出するメカノセンサーとして働いており、平常時の呼吸の一回あたりの換気量の抑制、肺の膨張により引き起こされる無呼吸反射に必要なことが分かった。一方、新生児にて、どのような機械的な力が Piezo2 により検出され、どのような神経回路で呼吸の制御しているのかについては今後の解析が待たれる。出生前の哺乳類胎児は胎盤を介して酸素を母体から得ているが、出生後には速やかに肺呼吸へ移行し、酸素を得る必要がある。この移行が速やかに行われることは哺乳類新生児の生存に極めて重要であり、呼吸不全は新生児や乳児の主たる死亡原因の一つである。これに対し、哺乳類の新生児が出生直後に呼吸を適切に開始するメカニズムはほとんど分かっていない。研究代表者により得られた結果は哺乳類新生児の出生直後の呼吸の成立に対するメカノセンシングの寄与を初めて実験的に示したものである。

一方 Piezo1 については、リンパ浮腫や胸水といったリンパ系の機能不全が観察されたヒトの患者において、Piezo1 の機能減弱変異が見つかった。リンパ管は心臓、動脈、静脈に並んで体液の全身循環に必要な管であり、リンパ液が体内を効率的に循環するためには多数の弁が必須である。また、リンパ管では血管と比べて液流が遅く、管を取り巻く平滑筋が少ないため変形しやすいなどの機械的な特性を持つ。脈管系のうち、血管では組織形態や生理機能に対するメカノセンシングの寄与の研究が進んでいるが、リンパ管では非常に遅れている。近年、脳や心臓という生体にとって重要な器官におけるリンパ管の果たす役割が見直されつつある。このような状況のもと、研究代表者は、Piezo1 がどのようにリンパ系の機能に関わるのかを明らかにするために、細胞種特異的な Piezo1 コンディショナルノックアウトマウスを作成し解析してきた。この内の 1 系統で、胸水というヒト患者に類似したリンパ系の機能

不全が確認された。しかしながら Piezo1 というタンパク質の活性化が組織レベルの変化にどのようにつながるのかわかりませんでした。そこで、本研究課題では、特に細胞の形態や接着などに着目し Piezo1 依存的に起こる変化の探索を行った。また、生体組織における Piezo1 活性化の時空間的パターンを解析するための系の作成に取り組んだ。

## 2. 研究の目的

Piezo1 の活性化と組織形態形成の関係を明らかにするために、Piezo1 下流でどのような細胞レベルの変化が起こるか検討する。特に、細胞形態に関わる細胞骨格因子、細胞間接着因子、細胞-細胞外基質接着因子に着目して解析を行う。また Piezo1 の活性化を生体組織あるいは培養細胞で検出するための系の検討を行う。

## 3. 研究の方法

研究の対象となるリンパ管組織の初代培養細胞にて、Piezo1 活性化化合物 Yoda1、Piezo1 siRNA を利用して、Piezo1 の活性化依存的に起こる細胞の形態や接着の変化を抗体染色等により探索した。また同様の系を用いて、Piezo1 の活性化を検出する色素を探索した。その後、生体組織への色素の取り込みについて検討した。並行して、GCaMP トランスジェニックマウスの組織を生体イメージングするための観察系について検討した。顕微鏡とカメラは基礎生物学研究所初期発生研究部門に設置されていたものを用いた。また脈管系のうち、腸間膜のリンパ管と血管について、異なる固定条件のもとで固定と染色を行い、組織の形態を共焦点顕微鏡により観察した。これによりこれらの形態や機械特性の違いについて検討した。

## 4. 研究成果

まず、初代培養細胞に Yoda1 を添加した場合にどのようなタイムスケールで細胞形態に変化が生じるかを調べるために、細胞膜や細胞骨格を GFP や RFP で標識したタンパク質をコードするプラスミドをトランスフェクションし、Yoda1 を添加後の変化をタイムラプスライブイメージングにより観察した。その結果 Yoda1 添加 30 分から 1 時間以内に細胞形態や位置に変化が起こることを確認した。続いて、この際に細胞骨格系、細胞間接着、細胞-細胞外基質接着にどのような変化が生じるかを詳しく調べるために、それぞれの構造の主要なタンパク質に対し抗体染色を行なった。Yoda1 添加時間は 1 時間とした。またその変化が Piezo1 依存的であるかどうかを確かめるために、Piezo1 siRNA 添加群と control siRNA (標的となる mRNA が存在しない) 添加群を比較した。siRNA はリポフェクタミン RNAiMax により 3 日間トランスフェクションした。実験の結果、細胞骨格因子、細胞間接着因子、細胞-細胞外基質接着因子につ

いていくつかの項目について量あるいは分布が Piezo1 活性化剤 Yoda1 により変化し、これが siRNA による Piezo1 のノックダウンにより抑制された。この結果に基づき、今後、Piezo1cK0 マウスの組織に対し同様のタンパク質に対する抗体染色を行い、組織の形態形成過程にて Piezo1 依存的に起こる現象を調べる予定である。

次に生体組織あるいは培養細胞における Piezo1 の活性化の検出について検討した。Piezo1 はカチオンチャンネルであるため、カチオンの細胞内への流入等を調べることにより Piezo1 活性化を検出できると予想した。そこで陽イオン性の色素 Z (名称伏す) と細胞内カルシウム濃度を反映する緑色蛍光タンパク質 GCaMP トランスジェニックマウスの検討を行った。まず色素 Z について初代培養細胞、Piezo1 活性化化合物 Yoda1、Piezo1 siRNA の組みあわせにより調べた。初代培養細胞への色素 Z の取り込みは Yoda1 により亢進し、これは Piezo1 siRNA 処理により抑制された。このことから色素 Z の細胞への取り込みにより Piezo1 活性化を検出できることが判明した。続いて、色素 Z を生体リンパ組織へ取り込ませることができるとかを検討した。腹腔内注射、皮下注射、胃への注射を試したが、いずれも生体リンパ組織への移行は不十分であった。そこで、生体での Piezo1 活性化を検出するためには、遺伝的にコードされたインディケータの方が適切であろうと判断し、細胞内カルシウム濃度により蛍光輝度が変化する GCaMP トランスジェニックマウスの検討を行った。GCaMP トランスジェニックマウスは RIKEN バイオリソースセンターより入手した。生後数日の腸間膜を観察したところ、リンパ組織の特定の部位にて強いシグナルを観察した。蛍光画像の取得は Olympus BX50 顕微鏡、Olympus DP72 カメラの組み合わせにより行なった。このシグナルが Piezo1 の活性化を反映したものであるかを確認するために、現在 Piezo1cK0 マウスとの掛け合わせを行なっている。Piezo1 の活性化を反映したものであることが確認された後、生体ライブイメージングを行う。一方色素 Z については初代培養細胞にて液流などの機械的な力を添加した場合に Piezo1 の活性化や細胞に生じる変化との関係を調べる際に用いることとした。

先行研究により、液流とリンパ組織の発生の関係、特に流れの向きが変化する液流と細胞の転写因子や形態変化の関係が報告されている。このような向きが変化する液流と Piezo1 の活性化の関係を調べるために、液流の向きを変化させることができる流路を作成し、その際の初代培養細胞における色素 Z の取り込みの検討を行なった。流路とシリンジポンプをチューブで直接繋いだ場合には、シリンジポンプにて吐出と吸引を切り替えてから流路内の液流の向きが実際に変化するまでにタイムラグが生じてしまい、このタ

イムラグを実験ごとに揃えることが難しいことがわかった。そこで、静水圧を利用した流路の使用に切り替えた。この流路では細胞を播種した流路の両側に、シリンジを改造した筒を立て、この筒内の水面の高さをポンプで任意に変化させることで、細胞周囲の液流の向きを変化させた。この流路を用い、 $\pm 3.5$  dyne/cm<sup>2</sup> の液流を5分毎に向きを切り替え4時間以上維持することが可能になった。この系にて色素Zの取り込みを調べたところ、液流を加えた場合は液流を加えなかった場合に比べ初代培養細胞への色素Zの取り込みが亢進することが確かめられた。今度、液流とPiezo1活性化の関係についてさらに調べていく。

またリンパ組織の形態や機械特性について、異なる固定条件の組織の観察により解析した。まず出生前後のマウスの腸間膜リンパ管を複数の方法で固定し、観察したところ、固定が弱い(灌流固定をしなかった)場合にはリンパ管のほとんどが円柱構造を保てず、潰れていた。並走する血管では、弱い固定の場合でも円柱構造が維持されていた。リンパ管では血管に比べ平滑筋が少ないことが知られており、このような組織の硬さの違いが円柱構造の維持のしやすさの違いをもたらしていると推測される。また強い固定(灌流固定)でも、リンパ管内には円柱構造が保たれている部分と潰れて平坦になっている部分があった。このことから生体内でもリンパ管形態の変化は起こりやすい可能性が示唆された。このような管の変形が起こる場合には、折りたたまれる部位に位置する細胞には変形が起こると予想される。このような組織レベルでの構造的な特性や力の変化の他にも細胞間接着に関わる Celsr1 タンパク質がリンパ組織の形態形成に関わることが報告されているが、Piezo1 との関係は不明である。これらの機械的な力と Piezo1 活性化の関係について、今回検討した色素Zと GCaMP トランスジェニックマウスを用いた検討を開始しており、引き続き解析を行うことで、リンパ組織における Piezo1 を活性化する機械的な力を明らかにできると期待している。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

①野々村 恵子、Viktor Lukacs、Stuart Cahalan、蟹江朱美、Ardem Patapoutian、藤森俊彦、Contribution of mechanosensor channel Piezo1 to the lymphatic vascular development、ポスター発表、第70回日本細

胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会 2018年6月5-8日(予定)、船堀タワー

②野々村恵子、リンパ管形成に働く物理的刺激、2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、フォーラム(口頭発表)、2017年12月6日(水)~9日(土)、神戸ポートアイランド

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
基礎生物学研究所初期発生研究部門 ホームページ、<http://www.nibb.ac.jp/embryo/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

田中 恵子、(野々村 恵子)  
(Keiko Tanaka, (Keiko Nonomura))  
基礎生物学研究所・初期発生研究部門・助教  
研究者番号：70799246

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

Ardem Patapoutian (Ardem Patapoutian)

アメリカ・スクリプス研究所・ドリス神経  
科学センター・教授