

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0107

研究課題名(和文) 管径の恒常性維持に働く細胞力覚システムの応答特性の解明

研究課題名(英文) Elucidation of response characteristics in cellular mechano-sensing system for maintaining tube diameter

研究代表者

平島 剛志 (Hirashima, Tsuyoshi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：10620198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞組織のかたちや大きさの自律的な制御に働く細胞のメカノレスポンス(力受容と応答)の仕組みの解明を目的とし、さまざまなマウス胎仔臓器の発生過程を題材とし、深部イメージングと数理モデルを用いて研究を進めた。精巣上体を用いることで、上皮管の円周方向に沿った細胞分裂に対し、周囲細胞が能動的に配置換えすることで管径を維持する機構を明らかにした。また、力に応じて活性化されるMAPキナーゼ/ERKに注目した。ERK活性を評価するためのFRET(蛍光共鳴エネルギー移動)イメージング計測を行うことで、肺や内耳の発生過程では、ERK活性化に伴う細胞のアクティブな運動が形態形成に寄与する仕組みを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞特有の「力を受容し力生成で応答する」メカノレスポンスと組織の形態形成を結びつけた本研究内容は、生物の自発的なかたち作りを理解する上で重要な成果である。また、上皮管腔構造は内臓に普遍的に見られる構造であり、その大きさやかたちの制御機構の解明の一端を担う本研究成果は、正常発生や病態疾患の理解につながる。たとえば、再生医療分野で注目されるオルガノイドの形態の品質管理に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of mechano-response (force reception and response) for the regulation of the morphology in multicellular tissues, we studied the developmental processes of various fetal murine organs using imaging techniques and mathematical models. Using the epididymis, we have revealed the mechanism by which the diameter of the epithelial tube is maintained by the active rearrangement of surrounding cells in response to cell division along the circumferential direction of the epithelial tube. We also focused on the force-responsive MAP kinase/ERK, and performed FRET (fluorescence resonance energy transfer) imaging measurements to evaluate ERK activity, revealing a mechanism by which dynamic behaviors of ERK-activated cells contribute to morphogenesis during lung and inner ear development.

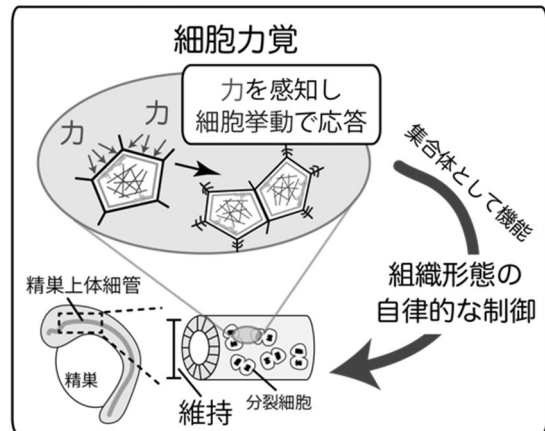
研究分野：発生生物学/生物物理学

キーワード：上皮管 ERK メカノバイオロジー 数理モデル ライブイメージング 精巣上体 肺 内耳

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞組織の形態(かたちや大きさ)が自律的に制御される仕組みのひとつに、細胞が力を受容し応答する機能 - 細胞力覚 - が挙げられる。たとえば、密度の高い組織では細胞の増殖能が低下するように、細胞は、周囲細胞群から受ける力に応答するように振る舞いを変えることで、組織形態を制御している。多細胞組織の形態制御は、細胞力覚を有する細胞が集合体として創成する仕組みに支えられており、この仕組みの解明には、多細胞組織中で細胞が受容する力を入力とし、応答を出力とみなすシステム - 細胞力覚システム - の特性を理解することが重要となる(図1)。

図1: 研究背景の概要



### 2. 研究の目的

本申請では、マウス胎仔の発生臓器(精巣上体、肺、内耳)を対象に、上皮管の形態形成に働く細胞力覚システムの応答特性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生体外培養環境下における二光子ライブイメージング

臓器深部の観察には、二光子顕微鏡を用いた。長時間のタイムラプスイメージングには、インキュベーター型多光子顕微鏡システムを用いた。

Cre-loxP 部位特異的組換え技術による蛍光レポーターマウスを用いて、精巣上体特異的に細胞膜を蛍光可視化した。

受ける力に応じて活性化するタンパク質として MAP キナーゼ/ERK に、細胞が生み出す力を制御するタンパク質として Rho キナーゼ (ROCK) に着目し、これらの分子活性を評価することができる FRET バイオセンサー<sup>1-3</sup> を用いて細胞の内部状態を測定した。ERK 活性や ROCK 活性を評価するための FRET バイオセンサーを全身で発現するマウス<sup>4,5</sup> から臓器を取り出し、二光子顕微鏡により分子活性および細胞の動態を測定した。

#### (2) 多細胞ダイナミクスを表現する数理モデル

パーテクスモデルおよびセルラーポッツモデル<sup>6</sup>を用いて、得られた分子活性や細胞動態のイメージングデータを基にシミュレーション解析を行った。また、多細胞運動の簡単な連続体モデルを構築し数理解析を行った。

### 4. 研究成果

胎生 15.5 日目の精巣上体細管の細胞の振る舞いを顕微鏡観察した結果、細胞分裂が円周方向に沿って起こる場合、細胞質分裂からおよそ 60 分後に細胞群が配置換え (T1 トランジション) を起こしやすいことがわかった(図2)。

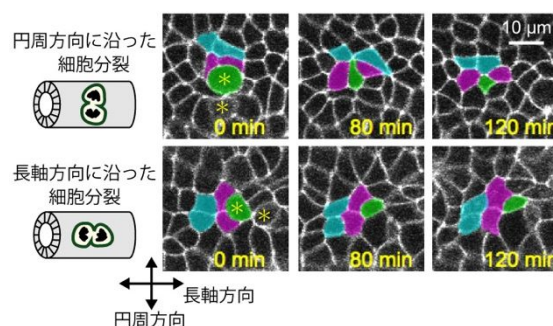


図2: 二光子顕微鏡による管上皮のライブイメージング像。米印は分裂後の娘細胞を示す。細胞配置の変化を見やすくするため、擬似色で細胞を色分けしている。円周方向に沿った細胞分裂後に、分裂細胞(緑)の隣の細胞群(シアン・マゼンタ)が配置換え(T1 トランジション)を起こす。

この結果より、精巣上体細管の細胞は、分裂細胞による圧縮力を受け取ると、速い時定数を有するリン酸化反応によりミオシンを活性化し、これに伴うアクトミオシンの収縮が細胞の配置換えを引き起こすという作業仮説を組み立てた。この概念的な「受容した力に対する細胞応答」の仕組みを、数理的に表現するために多細胞力学を表現するパーテクスダイナミクスモデルに組み入れ、増殖する管の形態形成シミュレーションを行った（図3）。

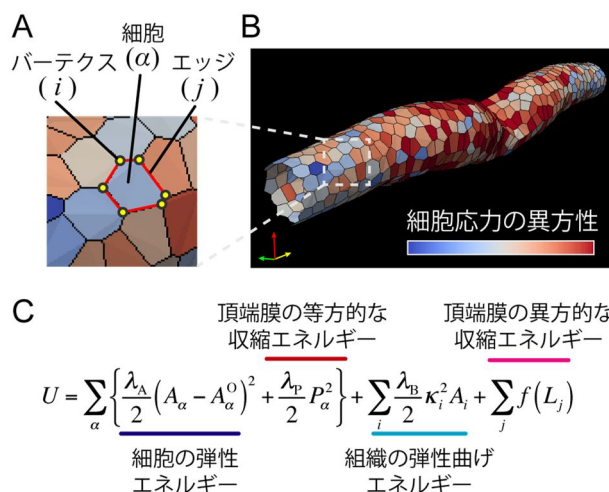


図3：パーテクスダイナミクスモデル。(A)細胞の頂端面を多角形で表現する。 $i, j$ はそれぞれ細胞、パーテクス、エッジのインデックス。(B)細胞の頂端面における細胞応力の異方性を色で表している。(C)エネルギー $U$ を構成する各エネルギー項。

シミュレーションの結果、力に対する細胞応答の仕組みがあることで、管腔の大きさが恒常的に維持できることがわかった。一方で、細胞が受ける力とは無関係にミオシン活性が亢進する仮想的な場合、不均一な太さを有する管構造が形成されることがわかった。さらに、実験検証を進めた結果、細胞は円周方向の力に応答するようにミオシン活性を亢進させる仕掛けを備えていることが明らかとなった。これらの研究成果を *Development* 誌にて報告した<sup>7</sup>。

また、肺や内耳蝸牛の上皮管の形態形成を司る細胞力覚システムについて、FRET イメージングと数理モデルにより調べた。その結果、細胞が、力学刺激を受けることで、MAP キナーゼ ERK を活性化することを明らかにした。さらに、ERK 活性によるアクトミオシンの集積促進により能動的な細胞運動が引き起こされ、上皮管の伸長や曲げに寄与することが明らかとなった（論文投稿中）。これらの結果の詳細な生物物理学的な機構は、培養細胞を用いて明らかにした<sup>8</sup>。

上皮管のサイズ制御機構の破綻は、嚢胞性疾患の一要因と指摘されており<sup>9</sup>、管腔の大きさが一定に保たれるメカニズムは医学的にも重要な課題である。本研究の成果は、発生生物学の基本的な問題である形態形成の新たな制御機構解明の一端を担うだけでなく、病理学の知見を深める基礎研究成果である。

#### 参考文献

1. Harvey, C. D. *et al.* A genetically encoded fluorescent sensor of ERK activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2008). doi:10.1073/pnas.0804598105
2. Komatsu, N. *et al.* Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4647–56 (2011).
3. Li, C. *et al.* A FRET biosensor for ROCK based on a consensus substrate sequence identified by KISS technology. *Cell Struct. Funct.* (2017). doi:10.1247/csf.16016
4. Kamioka, Y. *et al.* Live imaging of protein kinase activities in transgenic mice expressing FRET biosensors. *Cell Struct. Funct.* **37**, 65–73 (2012).
5. Komatsu, N. *et al.* A platform of BRET-FRET hybrid biosensors for optogenetics, chemical screening, and in vivo imaging. *Sci. Rep.* (2018). doi:10.1038/s41598-018-27174-x
6. Hirashima, T., Rens, E. G. & Merks, R. M. H. Cellular Potts modeling of complex multicellular behaviors in tissue morphogenesis. *Dev. Growth Differ.* **59**, (2017).
7. Hirashima, T. & Adachi, T. Polarized cellular mechano-response system for maintaining radial size in developing epithelial tubes. *Development* **146**, dev181206 (2019).
8. Hino, N. *et al.* ERK-mediated mechanochemical waves direct collective cell polarization. *Dev.*

- Cell in press*, (2020).
9. Karner, C. M. *et al.* Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis. *Nat. Genet.* **41**, 793–799 (2009).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Ihermann-Hella Anneliis, Hirashima Tsuyoshi, Kupari Jussi, Kurtzeborn Kristen, Li Hao, Kwon Hyuk Nam, Cebrian Cristina, Soofi Abdul, Dapkunas Arvydas, Miinalainen Ilkka, Dressler Gregory R., Matsuda Michiyuki, Kuure Satu	4. 巻 11
2. 論文標題 Dynamic MAPK/ERK Activity Sustains Nephron Progenitors through Niche Regulation and Primes Precursors for Differentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 912 ~ 928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.08.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 平島 剛志, 日野直也, 松田道行	4. 巻 2087
2. 論文標題 Cellular Potts Modeling for Mechanical Wave Propagation in Multicellular Migration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 RIMS講究録 (第14回生物数学の理論とその応用 - 構造化個体群ダイナミクスとその応用)	6. 最初と最後の頁 16-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuyoshi Hirashima and Taiji Adachi	4. 巻 146
2. 論文標題 Polarized Cellular Mechanoresponse System for Maintaining Radial Size in Developing Epithelial Tubes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.181206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 シグナル活性のライブイメージングと多細胞運動のコンピュータシミュレーションモデル
3. 学会等名 第15回生物数学の理論とその応用 次世代の数理科学への展開 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 肺上皮シートの分岐形態形成におけるERK活性を介したメカノ応答
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 パターン形成・形態形成のメカノバイオロジー
3. 学会等名 "第8回CSJ化学フェスタ JST特別企画 メカノバイオロジーと光科学、分子技術 ~ 未来を拓くトライアングル" (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 ERK活性を介したメカノ・ケミカルフィードバック制御による肺上皮の分岐形態形成
3. 学会等名 日本発生物学会 秋季シンポジウム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 ERK活性と上皮・組織変形のフィードバックループによる肺の分岐形態形成の制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 ERK活性を介したメカノ・ケミカルフィードバック制御による肺上皮の分岐形態形成
3. 学会等名 第9回定量生物の会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 肺上皮シートの形態形成におけるERKシグナルを介したメカノケミカルフィードバック制御
3. 学会等名 第52回日本発生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 Mechano-chemical coupling via ERK signal for repetitive branching morphogenesis of lung epithelial sheet
3. 学会等名 EMBL Symposium: Mechanical Forces in Development (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 MECHANO-CHEMICAL COUPLING IN EPITHELIAL TISSUES FOR COLLECTIVE DYNAMICS AND PATTERN FORMATION
3. 学会等名 4th Africa International Biotechnology & Biomedical Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 多細胞のパターン形成を支えるメカノケミカルフィードバックシステム
3. 学会等名 日本メカノバイオロジー研究会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平島剛志
2. 発表標題 メカノケミカルフィードバックによる多細胞体のパターン形成
3. 学会等名 生物数学の理論とその応用 (招待講演)
4. 発表年 2019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