

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06244

研究課題名(和文)脊椎動物胚の細胞にかかる力が予定運命に与える影響の検証

研究課題名(英文)The effect of physical force on cell fate determination in vertebrate embryos

研究代表者

道上 達男(MICHIUE, TATSUO)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：10282724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物初期胚の外胚葉領域の決定に、モルフォゲンの濃度勾配に加え物理的な力が関与するかを調べることを目的とした。これまでに、神経板のPCP形成における張力依存性を調べたところ、外胚葉片に伸展刺激を加えることでPCPが強められ、細胞破壊による張力緩和でPCPが弱められること、胚での異所的なMLC発現、細胞破壊、胚構造変化などにより外胚葉マーカー遺伝子の発現領域が変化すること、予定表皮、予定神経領外胚葉を伸展したところ、両者で水平方向の組織の伸展率が異なること、などを明らかにした。以上の結果から、外胚葉パターンニングの決定には細胞にかかる物理的張力が関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに細胞レベルで張力と遺伝子発現・タンパク質局在の変化を調べた研究は比較的多いが、胚全体のレベルにおいて領域の規定、あるいは領域の性質そのものに細胞張力が関与することを示した例は多くない。その点で、本研究の結果は学術的な意義がある。また本研究は、神経を含む外胚葉分化に細胞張力が関与する可能性も改めて示すものであり、実際研究代表者の予備的知見において神経分化と張力との関係を示唆するデータも得ているので、将来は臓器・組織再生の分野、ひいては再生医療への知見の応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate whether physical forces are involved in the determination of the ectodermal regions in vertebrate embryos. (1) the dependency of mechanical tension on Planer cell polarity was investigated. As a result, we found that PCP was strengthened by stretching ectodermal tissue, whereas PCP was weakened by tension relaxation due to cell ablation. (2) Expression patterns of ectoderm marker gene was changed by ectopic MLC expression, cell ablation and the change of embryonic morphology. Together with these results, it was strongly suggested that the mechanical force is involved with the determination of ectoderm patterning.

研究分野：発生生物学・分子生物学

キーワード：外胚葉パターンニング 細胞張力 アフリカツメガエル 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の初期発生においては、背腹や前後といった位置情報に基づいて胚の基本的な領域が決められる。ツメガエルでは、原腸胚～神経胚期において神経と表皮の区画が決められる。これまで外胚葉パターンの規定機構は、主に分泌因子の濃度勾配と、その情報を受容して変動する遺伝子発現によって説明されてきた。しかし原腸形成時、中・内胚葉のみならず胚の表面を覆う外胚葉でも、覆い被せ運動や神経管閉塞運動を初めとする多彩な細胞運動により組織そのものがダイナミックに変形している。このような観点から考えると、パターン規定機構を正確に理解するためには、細胞の運動、そしてその根拠となる細胞張力も考慮する必要があるだろう。これまで申請者らは FRET 現象を利用した張力プローブを用いてツメガエル胚全体の張力を非侵襲的に解析した結果、神経-表皮外胚葉間で明確な細胞張力の差があることが見出され、外胚葉の領域規定において何らかの物理的な制御が関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまで初期胚の外胚葉においては、主に神経管閉塞といったダイナミックな細胞運動・組織変形に着目した研究成果が報告されている。また、ある種の培養細胞(例えば間葉系幹細胞)では、培養時の足場の硬さによって分化方向が変化するという報告もある。しかし、胚における予定運命そのものを細胞張力の違いから論じる研究はほとんどされていない。そこで本課題では、外胚葉の予定運命決定プロセスに、細胞にかかる張力の違いが直接関与しているかどうかを明らかにすることを目的とし、研究を行うこととした。

3. 研究の方法

本課題では、主にアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の胚を用いて解析を行った。遺伝子の過剰発現系としては、発現ベクター(pCS2)に連結された遺伝子を鋳型に、SP6 RNA ポリメラーゼにより mRNA を invitro 合成し、2~8 細胞期胚に微量注入した。以下、個々の課題について説明する。

(1) 神経板における平面内細胞極性(PCP)に細胞張力が与える影響の解析

・PCP をモニターする系としては、Wnt シグナルに關する膜タンパク質である *prickle3* が各細胞の前方部分に局在することが知られているので、*prickle3-mcherry* を胚に微量注入することによって PCP をモニターした。

・張力を付与する系としては、シリコンチャンバー(ストレックス社製)を用いた。初期原腸胚期の外胚葉片を切り出し、あらかじめフィブロネクチンでコートしたチャンバーに静置し、1 時間程度静置して接着させた後にチャンバーを進展することで外胚葉片に進展刺激を加えた。

・張力緩和の効果を見るためには、レーザーアブレーション法を用いた。初期原腸胚期の胚の一部に、波長 400nm のレーザー光を照射し、約 10 細胞の領域に傷をつけ、周辺細胞の張力緩和を誘導した。

・胚のレオロジー測定には原子間力顕微鏡(AFM)を用いた。この実験については、実験協力者(研究代表者が主宰する研究室の大学院学生)が学振プログラムの一環で滞在了イギリス・ユニバーシティ・カレッジ・ロンドン大学において実施された。

・細胞形状の解析には、Matlab を使用した(形状プロファイル取得のプログラムは当研究室で記述したものをを用いた)。

(2) 細胞張力の変化による外胚葉パターンの変動の有無の解析

ツメガエル胚における張力変動の方法としては、以下の3つを行った。BMP 阻害因子として働くドミナントネガティブ BMP 受容体(tBR)を腹側に注入し、二次軸を誘導させた胚を用い、一次軸側にかかる力を変動させた。恒常活性型ミオシン軽鎖(caMLC)を着目する細胞の近傍に微量注入することで、アクトミオシンの形成を介した異所的かつ領域限定的な細胞張力の付与を行った。また、アクトミオシンの阻害による効果を見るため、初期原腸胚期に胚を 100uM プレピスタチン溶液に浸け、そのまま培養した。外胚葉の領域に傷をつけ張力を緩和する実験を行った。この実験においては、レーザーアブレーションではなく胚にタングステン針、もしくは小さく切ったカミソリで胚の一部に傷をつけ、外胚葉パターンの変化を各マーカー遺伝子の in situ hybridization、またはリアルタイム PCR によって調べた。

(3) 神経-表皮境界で力の歪みが発生する機構解明のため、神経・表皮両領域の水平方向の「硬さ」の違いを調べた。あらかじめ BMP 阻害因子 *chordin* または tBR を注入した胚(または非注入胚)からシート状に外胚葉を切り出し、チャンバーに接着させた後伸展させたときの外胚葉片の伸展率を測定した。

(4) 外胚葉細胞の細胞張力と細胞形状のとの関係を調べるため、研究代表者らによって開発した FRET 張力プローブ(ActTS-GR)を胚に微量注入し、神経胚期における FRET インデックスを計測するとともに、ドナー光の画像を用いて imageJ により頂端側からみた細胞の辺長を実測し、両者の相関を調べた。

4. 研究成果

(1) 神経板における平面内細胞極性 (PCP) に細胞張力が与える影響の解析

この実験では、ツメガエルの神経板領域に形成されている PCP が、細胞張力によって変動するかどうかを検討した。まず、初期原腸胚から切り出した外胚葉領域をシリコンチャンパーに貼り付け、初期神経胚期相当まで伸展刺激を加えた。その結果、伸展刺激を加えた外胚葉片では、伸展を行っていない組織片に比べて *prickle3* の細胞内局在を示す細胞の割合が増加した (図 1)。逆

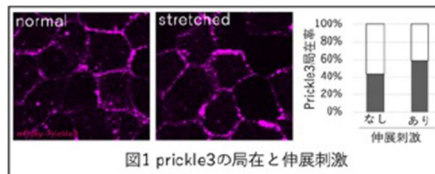


図1 *prickle3*の局在と伸展刺激

に、注目すべき細胞の近傍をレーザーアブレーションにより膜切断して細胞張力を緩和すると、細胞破壊領域の特に AP 側近傍において、*prickle3* の特異的な局在が失われる細胞の割合が増加した (図 2)。これらの結果は、細胞板の PCP 形成に細胞張力が関与していることを強く示唆する。次に、PCP 形成に関わる張力の方向依存性を検討した結果、注目する細胞の AP 軸近傍のレーザー破壊を行うと PCP 形成が大きく乱れるのに対し、ML (横) 軸近傍に行くと PCP 形成の大きな乱れは認められなかった。このことは、PCP 形成の張力の関与に関し、方向依存性があることを示唆する。また、神経板領域に伸展刺激を加えると PCP 形成に影響を生じるが、これについても伸展方向の依存性を調べたところ、AP 方向への伸展刺激では非刺激時と大きく変化はなかったが、ML 方向に伸展刺激を加えると、PCP 形成が乱れることを見いだした。以上の結果は、PCP の正しい形成には細胞張力が AP 方向に加わることが重要であることを示唆する。ただし、伸展刺激によって PCP の方向が大きく変動することはなかったことから、PCP は細胞に付与する力学的刺激のみで決定されているのではないことも同時に明らかになった。

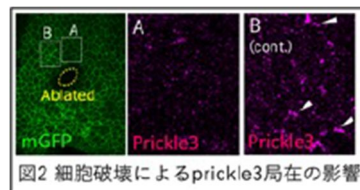


図2 細胞破壊による *prickle3* 局在の影響

さらに、AFM などを用いて神経板にかかる張力の実測を行い、PCP 形成と張力との関係について直接的な検証を行った。その結果、神経胚期において、神経板の前方領域では低いレオロジーを、後方領域では高いレオロジー (剛性) を示すこと、さらにこの前後軸に沿った勾配は発生が進行するに従って増加することを見出した (図 3)。一方で、PCP の形成そのものはこの勾配と相関関係は示さないことも明らかとなった。更に、細胞形状情報の取得を通し、数理的なアプローチによっても PCP 形成と力との関係を調べることとした。その結果、*prickle3* の局在は、それぞれの細胞の長軸方向と相関があることを見出した。一方で、上記のようにすでに形成された *prickle3* の局在方向は伸展刺激でも大きく変動することはないことを併せると、*prickle3* の局在に反映される PCP 形成の方向決定は、張力そのものというよりは細胞張力により変形した細胞形状が重要な要因になっていることを示唆する。本研究の成果は、現在論文投稿準備中である。

PCP の正しい形成には細胞張力が AP 方向に加わることが重要であることを示唆する。ただし、伸展刺激によって PCP の方向が大きく変動することはなかったことから、PCP は細胞に付与する力学的刺激のみで決定されているのではないことも同時に明らかになった。

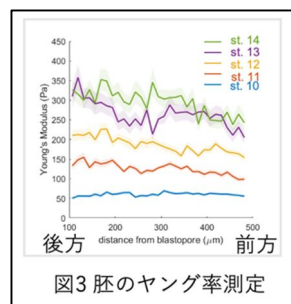


図3 胚のヤング率測定

(2) 細胞張力の変化による外胚葉パターンの変動の有無の解析
この解析では、遺伝子を異所的に発現させることで細胞にかかる張力を人為的に変化させたとき、外胚葉の予定運命が変化するかどうかを検証した。

まず tBR 注入胚において一次軸側のプラコード・神経堤領域にかかる細胞張力を変動させた際に、これらの領域が拡大・縮小するかどうかを *Sox3* の発現パターンを調べることで検証した。当初は二次軸形成に伴うパターンの変動は見られなかったが、注入条件の検討を行うことで、tBR 注入によるプラコード領域の拡張が観察された。

次に、恒常活性型ミオシン軽鎖 (caMLC)、及びドミナントネガティブ型ミオシン軽鎖 (dnMLC) の微量注入による異所的かつ領域限定的な細胞張力の付与を行った結果、caMLC 注入によってプラコード領域が拡大し、逆に dnMLC によって縮小することを見出した (図 4)。このことより、注入領域近傍の細胞に何らかの張力が付与されている可能性が示唆された。次に、胚をプレビスタチン処理した時のマーカー遺伝子の発現を調べたところ神経堤マーカーの発現の上昇が見られた。これは caMLC を用いた実験とは一見異なるが、胚全体でミオシン阻害を行ったことによる影響ではないかと考えている。

外胚葉の領域に傷をつけ張力を緩和した際のマーカー遺伝子発現を調べたところ、神経堤の発現領域が胚の切断領域近辺で縮小することを

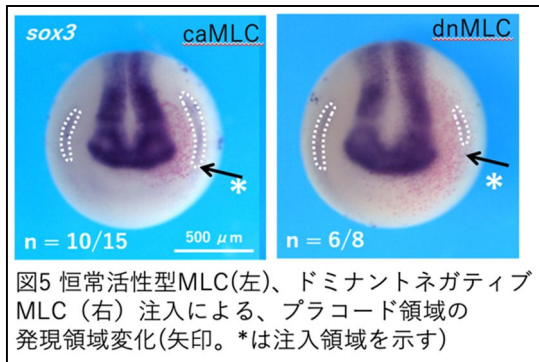


図5 恒常活性型MLC(左)、ドミナントネガティブMLC (右) 注入による、プラコード領域の発現領域変化(矢印)。*は注入領域を示す)

見出した(図5)。一方、神経板およびプラコード領域については、現在のところ胚の切断による大きな発現パターンの変化は見出せていない。以上三つの結果より、外胚葉のパターン形成は、細胞にかかる張力の影響を受けることが強く示唆された。

(3) 神経 表皮境界に力が生じるのは神経・表皮両領域の水平方向の「硬さ」の違いに起因するのではないかという仮説に基づき、外胚葉細胞シートに伸展刺激を加えた際の変形度が予定神経外胚葉、予定表皮外胚葉間で違いがあるかを調べた。その結果、BMP 阻害因子の導入により神経に予定運命を変化させた細胞シートは、表皮運命のシートより伸展度が小さいことを見いだした(図6)。この結果は、実際の胚における各領域の変形に何らかの影響を与えることを示唆している。次に伸展度の方

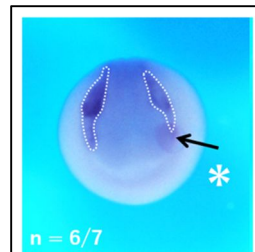


図5 胚切断(*)による神経堤マーカーの発現領域変化(矢印)
n = 6/7

向依存性があるかどうかを調べたが、現在のところ大きな差は見出せていない。また、この硬さの違いが何に起因するかについては、ファロイジン染色を行った胚の外胚葉表面を顕微鏡で観察したところ、神経領域と表皮領域で存在量の違いが見出された。また、胚にアクチンタンパク質を注入して同様に伸展度を調べたところ、非注入胚に比べてやはり伸展度が小さいことを見出した。以上の結果を併せ考えると、予定神経と予定表皮では細胞骨格の存在量の違いに起因して水平方向の硬さに違いがあることが示唆される。

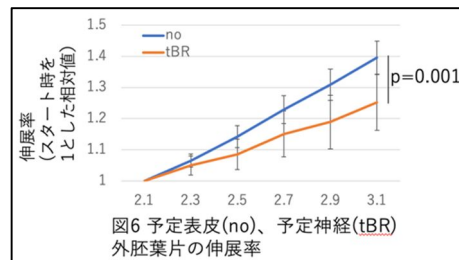


図6 予定表皮(no)、予定神経(tBR)外胚葉片の伸展率

(4) 張力付与による細胞内シグナルの変動

ストレッチチャンバーに接着させ伸展刺激を加えた外胚葉片において、BMP シグナルの変動をリン酸化 Smad 抗体を用いてウエスタンブロット解析で調べたところ、伸展刺激により pSmad1 の存在量がツメガエル外胚葉領域で増加することを見出した。また、同様の実験を qPCR 解析で調べたところ、axin2 の発現量も増加することがわかり、細胞にかかる張力が BMP、Wnt 両シグナル経路を活性化することが示唆された。

(5) FRET プローブを用い、外胚葉細胞シートに伸展刺激を加えた際の FRET 値の変化に方向依存性があるかどうか、また頂端面からみた細胞の“辺”長の変化度合いと張力の大きさとの関連を調べた。現在までの解析では、細胞の辺長が長いほど FRET 値が高い、すなわち細胞膜にかかる張力が弱いという相関が弱く見られるものの、より明確な結果を示すためには更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokote N, Suzuki-Kosaka MY, Michiue T, Hara T, Tanegashima K.	4. 巻 63
2. 論文標題 Latrophilin2 is involved in neural crest cell migration and placode patterning in <i>Xenopus laevis</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 29-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1387/ijdb.180184kt.	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 -

1. 著者名 Hirano S, Yamamoto T, Michiue T	4. 巻 62
2. 論文標題 FRET-based tension measurement across actin-associated mechanotransductive structures using Lima1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. J. Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 631-636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1387/ijdb.180110tm	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 -

1. 著者名 Watanabe T, Yamamoto T, Tsukano K, Hirano S, Horikawa A, Michiue T	4. 巻 145
2. 論文標題 Fam46a regulates BMP-dependent pre-placodal ectoderm differentiation in <i>Xenopus</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 pii:dev166710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.166710.	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17件（うち招待講演 4件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野咲雪、道上達男
2. 発表標題 一方向組織伸展による平面内細胞極性制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金島時、道上達男
2. 発表標題 機械的刺激によるツメガエルの外胚葉パターンニング制御
3. 学会等名 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻・卓越コロキウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚野皓平、道上達男
2. 発表標題 予定ブラコード形成におけるERK特異的リン酸化酵素Dusp6の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野咲雪、道上達男
2. 発表標題 力学的シグナルによる平面内細胞極性制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金島時、山元孝佳、道上達男
2. 発表標題 ツメガエル胚において機械的刺激が予定ブラコード分化を亢進する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上達男
2. 発表標題 ツメガエル胚の領域規定における細胞張力・細胞形状の関与
3. 学会等名 第五回幹細胞研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上達男
2. 発表標題 初期胚の神経領域規定における物理的な力の関与
3. 学会等名 第14回日本臨床ストレス応答学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上達男、金島 時、中桐悠一郎、山元 孝
2. 発表標題 ツメガエル初期発生の外胚葉パターンニングにおける物理的な力の関与
3. 学会等名 第90回日本動物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上達男
2. 発表標題 ツメガエル外胚葉パターンニングにおける物理的な力の関与
3. 学会等名 第13回日本ツメガエル研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野咲雪、道上達男
2. 発表標題 脊椎動物神経板でのPCP形成における力学的シグナルの解析
3. 学会等名 第13回日本ツメガエル研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金島 時、山元孝佳、道上達男
2. 発表標題 機械的刺激によりツメガエル胚の予定ブラコード分化が亢進される
3. 学会等名 日本動物学会関東支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上達男、渡邊朋子
2. 発表標題 胚パターンングにおけるFam46aのBMPシグナリング調節機構
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上達男
2. 発表標題 ツメガエルブラコード形成におけるSmad結合タンパク質Fam46aの役割
3. 学会等名 第四回次世代両生類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 道上達男
2. 発表標題 細胞の張力と形から胚発生を考える
3. 学会等名 第18回東京大学生命科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野咲雪、山元孝佳、道上達男
2. 発表標題 アクチン結合タンパク質Lima1を用いたFRET張力センサーの開発
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野咲雪、山元孝佳、道上達男
2. 発表標題 FRET張力センサーを用いたツメガエル神経胚の張力観察
3. 学会等名 第89回日本動物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚野皓平、道上達男
2. 発表標題 Erk特異的脱リン酸化酵素Dusp6の予定プラコード形成における機能解析
3. 学会等名 第89回日本動物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 東京大学教養学部（編）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 白水社	5. 総ページ数 11
3. 書名 知のフィールドガイド 生命の根源を見つめる	

1. 著者名 道上達男	4. 発行年 2019年
2. 出版社 裳華房	5. 総ページ数 180
3. 書名 基礎からスタート 大学の生物学	

1. 著者名 嶋田正和、上村慎治、増田建、道上達男（編）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 298
3. 書名 生物学入門 第三版	

〔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
研究分担者	山元 孝佳 (Yamamoto Takayoshi) (70724699)	東京大学・大学院総合文化研究科・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------