

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18155

研究課題名（和文）前脳固有の形態形成に必須な方向依存的細胞集団運動を力学制御するシグナル経路の解明

研究課題名（英文）Elucidation of signal pathways that mechanically regulate direction-dependent collective cell motion essential for forebrain morphogenesis

研究代表者

大塚 大輔 (Ohtsuka, Daisuke)

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・上級研究員

研究者番号：40632865

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：これまでの研究により、前脳形態形成には方向性をもった細胞集団の再配列による異方的な組織の伸長が重要であることを明らかにしてきた。では、これらの方向性はどのように決定されているのか？これを明らかにすることが本研究課題の目的である。方向性を決定する因子として、モルフォゲンであるSHHと器官形状に由来する組織内応力が方向性決定に関与しているのではないかと仮説をたて、単離した前脳組織に力学刺激を与えられる系を確立し、それらを用いて検証を行った。その結果、器官形状に由来する組織内応力が方向情報を生み出し、SHHは力学刺激に対する応答能を細胞に付与してい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

本研究課題の達成は、正常発生過程の理解だけに止まらず、遺伝子異常による先天性奇形の理解にも繋がることと予想される。例えば、SHHシグナル経路の異常は全前脳胞症を引き起こす主要な原因の一つであることが明らかとなっている。これまで全前脳胞症の形態異常は正中組織の形成不全により起こっていることが想定されてきたが、申請者らの各階層動態の定量計測および解析により形態異常は応力検知能の異常による細胞集団運動方向の消失が原因であることが明らかとなった。このように方向性を持った細胞集団運動と形態異常がリンクすることはこれまで想定されていなかったため、治療法の開発等に関して新たな視点を提供できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our previous studies have revealed that anisotropic tissue elongation by directional cell rearrangement is important for forebrain morphogenesis. Then, how are these directions determined? The purpose of this research is to clarify this. As a factor that determines the directionality, we hypothesized that SHH, which is a morphogen, and tissue stress derived from organ shape might be involved in the directionality determination. To verify this, we artificially applied an external force to tissue pieces taken from a developing neural tube. As a result, the tissue was elongated in the direction perpendicular to the external force through cell rearrangement. On the other hand, in the presence of SHH inhibitor, these responses did not appear and the tissue was hardly deformed. Taken together, we can conclude that SHH confers mechanical response on cells.

研究分野：発生生物学

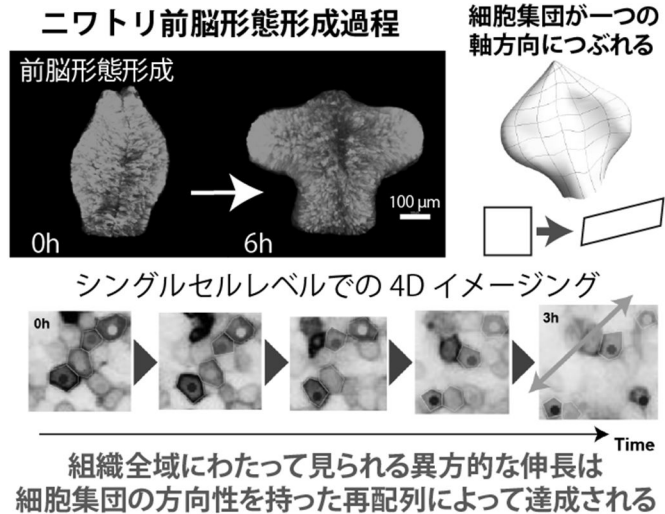
キーワード：形態形成 力学応答 細胞動態 4D計測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む脊椎動物の形がどのように作られるかという問題は長年未解決な、生物学における究極的な課題の1つである。この問いに答えるためには、形態学が行ってきた表現型(外形)の定性的な記述や分子生物学による関連遺伝子の同定のみでは不十分であった。形態ができる過程そのものに具体的に踏み込むためには、組織変形動態の解明: 器官固有の3次元形態が作られる過程で、いつ・どこで・どの程度、組織が成長・変形したか、そのすべてを数値的に明らかにすること。組織力学の定量解析: 物体の変形を引き起こす直接的な原因は力であり、器官固有の変形を引き起こす組織内応力分布・細胞物性の異方性、及びそれを引き起こす分子・細胞動態を明らかにすることが必須である。申請者はこれまでニワトリ初期脳形態形成過程を対象として解析を行ってきた。まず、多光子顕微鏡を用いて前脳領域全体に渡る4D計測を行い、組織変形動態の定量解析を行った。その結果、初期脳発生過程における大きな形態変化(特に眼胞形成過程)には、領域依存的な細胞増殖ではなく、組織全体にわたって見られる異方的な変形がその主因子であることが明らかとなった[Morishita*,...,Ohtsuka*, *Nature communications* 2017, *: equal contribution] (図1参照)。さらに、この論文を公表後、一細胞レベルでのタイムラプスイメージングの観察系を立ち上げることに成功し、組織レベルでの異方的伸長が、細胞間の方向性を持った再配列によって完全に説明されることを明らかにした。

図1: 前脳の形態形成に必須の細胞集団運動を発見



Morishita, Ohtsuka, 2017 Nat Commun

2. 研究の目的

上述のように、前脳固有の形態は方向依存的な細胞集団の再配列を通じた組織変形により実現されていることが明らかとなった。では、これらの形態形成過程において、「何が細胞に方向情報を与え、その運動はどのように制御されているのだろうか?」。一般に、細胞・組織は様々な極性(方向情報)をその内部に有することが知られている。上皮組織に関しても、極性を持って分布している配向分子は多数同定されている。しかし、その上流因子に関しては拡散性のモルフォゲン分子や力学的なシグナルが想定されているが決定的な証拠は提出されていない。また、それらの方向情報を与える因子がどのように細胞集団の動態を制御しているのかも明らかとなっていない。そこで本研究では、初期前脳領域で発現し、形態形成に必須であることが知られている SHH (初期脳の腹側に局限して発現し、その変異体では眼の組織が正中線上で癒合する全前脳胞症の表現型となる)を起点とし、これらのシグナルが力学情報のセンシングと応答にどのように関与するかその伝達経路を明らかにするとともに、アウトプットとして細胞の集団運動へどう寄与するかを定量的に明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) リン酸化ミオシンの局在解析

上皮の形態形成機構に関与することが報告されている phosphorylated myosin regulatory light chain (pMLC: リン酸化ミオシン) の局在パターンと SHH シグナルの関係性について免疫染色法を用いて解析を行った。

(2) 前脳の背腹切除実験

上記の局在解析から前脳腹側組織においてリン酸化ミオシンが特異的に配向することが明らかとなった。そこで、リン酸化ミオシンの腹側組織での局在が形態形成に与える影響を明らかにする目的で、背腹組織の物理的切除実験を行なった。

(3) 組織内応力を検出するためのレーザーアブレーション実験

発生過程の前脳組織内に異方的な応力が存在するのかを検証するために、高出力の短パル

スレーザーを用いて、レーザーアブレーション実験を行った。

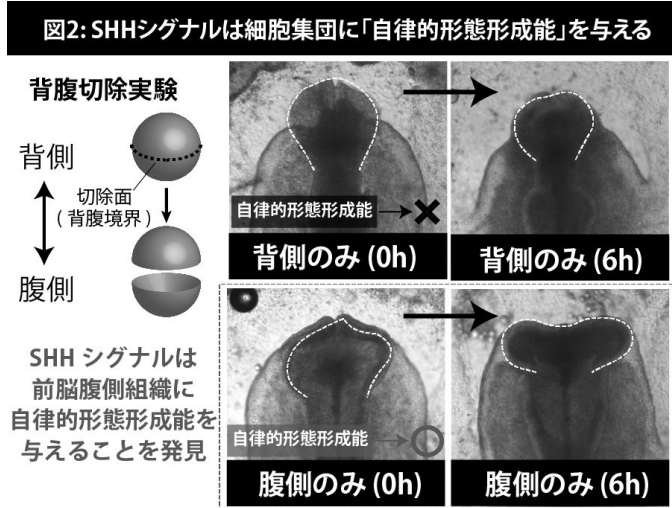
(4) 外力負荷装置を用いた組織内方向場決定機構の解析

組織内応力が細胞集団運動の方向性や分子の配向（方向場の決定）に関与するのかを実験的に検証するために、外力負荷装置を用いて解析を行った。具体的には、任意の方向に外力を負荷し、リン酸化ミオシンの配向性および細胞集団運動の計測を行うことで評価した。

4. 研究成果

(1) 前脳形態形成過程における SHH シグナルの役割の発見:細胞集団の自律的形態形成能

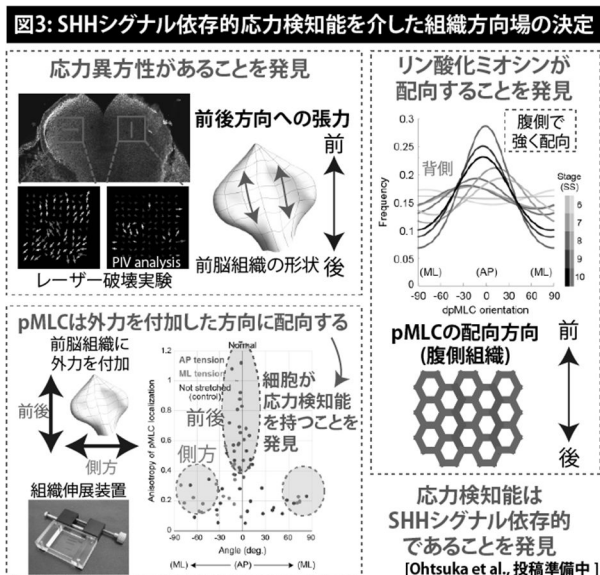
これまでの研究から、SHH は眼胞の伸長に関与することが明らかとなっていたが、どのように細胞集団運動に関与するのかは明らかになっていなかった。そこで、申請者らは上皮の形態形成機構に関与することが報告されている phosphorylated myosin regulatory light chain (pMLC: リン酸化ミオシン) の局在パターンと SHH シグナルの関係性について調査した。その結果、正常時の前脳腹側組織においては組織の伸長方向と垂直にリン酸化



ミオシンが強く配向することがあきらかとなった。一方、SHH シグナルの阻害条件ではリン酸化ミオシンの配向性が消失した。この腹側組織での pMLC の配向性は形態形成にどのように影響するのか？この問いに答えるために、申請者らは前脳背腹組織の切除実験を行った (図2 参照)。背側または腹側領域を切除し、その後の形態形成を調査したところ、驚くべきことに腹側組織は単独でも側方への組織伸長が見られ、それらは方向性を持った細胞集団運動により達成されること (自律的形態形成能) が明らかとなった。一方、背側組織では腹側組織で見られるような組織伸長はおこらなかった。さらに、SHH シグナルの阻害により、腹側組織で見られた自律的形態形成能は消失することも明らかとなった (Ohtsuka et al., 投稿準備中)。

(2) SHH シグナル依存的応力検知能を介した組織内方向場の決定機構を発見

前脳組織内に異方的な組織応力が存在するのかをレーザーアブレーション法を用いた実験的なアプローチにより調査したところ、前後軸方向に引張応力が存在することが明らかとなった (図3 参照)。この組織応力の異方性は、上皮組織において力学刺激に応答することが報告されているリン酸化ミオシンの配向性と一致していることも明らかとなった。次に、SHH シグナルと組織応力の関係性を実験的に証明するために、切り出してきた組織断片に外力を負荷できる装置 (STREX) を利用し、組織内応力方向依存的に細胞集団運動が決定されているのかを検証した。その結果、発生過程で存在する組織内応力方向に力学刺激を与えると、通常の胚発生でみられるリン酸化ミオシンの配向性および細胞集団運動が確認された。さらに、SHH シグナルの阻害条件ではこれらの応力検知能が消失することもあきらかとなった。これらのことから、組織内応力が方向情報を生み出し、SHH は力学刺激に対する応力検知能 (リン酸化ミオシンの方向性を持った局在および細胞集団運動の方向性) を



さらに、SHH シグナルの阻害条件ではこれらの応力検知能が消失することもあきらかとなった。これらのことから、組織内応力が方向情報を生み出し、SHH は力学刺激に対する応力検知能 (リン酸化ミオシンの方向性を持った局在および細胞集団運動の方向性) を

細胞に付与していることが明らかとなった (Ohtsuka et al., 投稿準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daisuke Ohtsuka, Yoshihiro Morishita
2. 発表標題 Failure of directional cell rearrangement due to loss of stress-response ability causes cyclopia-like morphological anomaly in SHH-deficient embryo
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Ohtsuka, Yoshihiro Morishita
2. 発表標題 Quantitative analysis of tissue and cellular dynamics during optic vesicle formation
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----