

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07352

研究課題名(和文)アクチン重合のターンオーバーによる臓器・個体サイズ制御機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of organ and body size regulation by actin polymerization

研究代表者

浅岡 洋一 (Asaoka, Yoichi)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10436644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 臓器構築過程でのYAPメカノホメオスタシスの理解のために、組織の力学特性を直接計測する系の立ち上げを試みた。メダカYAP変異体胚へ磁性流体の油滴を微量注入し、磁場を加えて変形させることで細胞組織の内部に力を加え、その応答を観察することで生体組織内部での硬さを計測する系が樹立できた。

(2) 成魚において組織の力学特性を長期にわたり計測する系の確立を試みた。ゼブラフィッシュ成魚の尾ヒレ再生系を用いて、長期タイムラプスイメージングを行うための麻酔液還流システムを樹立し、ヒレ組織に磁性流体の油滴を注入し磁場をかけてその変形を計測することで、生体組織における力学特性(粘弾性)の実測に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、力学恒常性の観点からの病因解明・治療法開発は遅れており、本研究成果を通して得られる力学恒常性の作動原理の理解は、組織の硬さというこれまでとは視点の異なる新しい標的を狙ったがん治療法にも応用できるという意義がある。がんの成立過程においては、粘弾性の他にも圧力や張力などさまざまな生体組織の力学特性を把握することが不可欠であり、組織の時空間的な力学特性の経時的計測技術を確立することも今後の必須の課題であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：(1) In order to understand the YAP mechanohomeostasis in the process of 3D organ/tissue formation, I tried to set up a system to directly measure the mechanical properties of organ/tissue. Applying the methods of the Campas et al. (Campas et al Nat. Methods 2014) for the quantification of mechanical forces during early embryogenesis, I was able to measure the physical properties of the medaka YAP mutant embryos.

(2) I tried to establish a system to measure the mechanical properties of tail fin in adult fish during a long period. By establishing a perfusion system of breeding water containing the anaesthetic for long-term time-lapse imaging, I succeeded in measuring mechanical properties (viscoelasticity) in regenerating tail fin.

研究分野：発生生物学、分子生物学

キーワード：YAP メカノホメオスタシス 臓器・個体サイズ制御 ゼブラフィッシュ メダカ 組織再生 力学計測系

1. 研究開始当初の背景

臓器サイズを制御する Hippo-YAP シグナル伝達系：臓器および個体サイズの精緻な制御は、生物の発生ならびに恒常性維持に必要不可欠であり、サイズ制御の破綻はがんなどの疾患の発症に直結する。近年、細胞外からの物理的な刺激により活性化した Hippo-YAP シグナル系が、メカノトランスデューサーとして細胞増殖や分化状態を調整し、臓器サイズを制御することが示された。本シグナル経路はショウジョウバエからヒトに至るまで進化的に保存されており、臓器サイズ制御において中心的な役割を担う。また、臓器サイズ制御の破綻はがんの発症に直結することから、Hippo-YAP シグナル経路は近年国内外から注目を浴びている。

3次元臓器を構築するメカニズムの発見：こうした背景のもと私たちは、臓器形成に異常を示すメダカ変異体のスクリーニングの過程において、体全体が扁平化する *hirame (hir)* メダカ変異体を見出した [Mech Dev. (2004)]。 *hir* 変異体の解析から、原因遺伝子 YAP が ARHGAP18 の発現を介してアクチオシンの活性を調節し、3次元臓器の構築に与することを世界に先駆けて明らかにした [Porazinski, Asaoka Nature (2015)] (図1)。

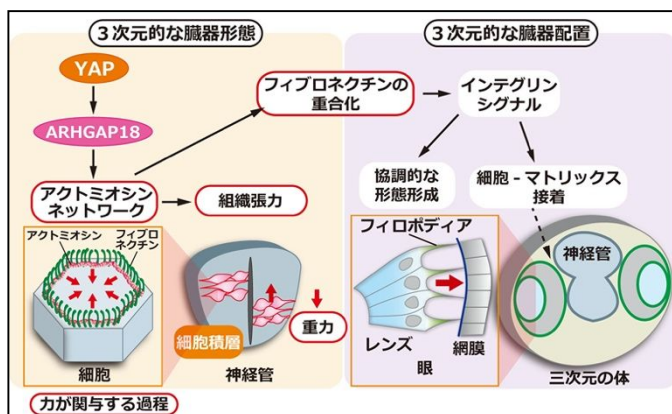


図1 YAPによる3次元臓器の構築機構

YAP メカノホメオスタシスの同定：

幹細胞からそれぞれの種類の細胞への分化は ECM の硬さに制御され、逆に、ある ECM の硬さにより分化した細胞は、同じ細胞であり続けるために ECM の硬さを維持・制御する (図2)。このような力学特性を介した ECM-細胞間の双方向の細胞分化・増殖の制御は、メカノホメオスタシスと呼ばれる。私たちはこの機構に YAP が

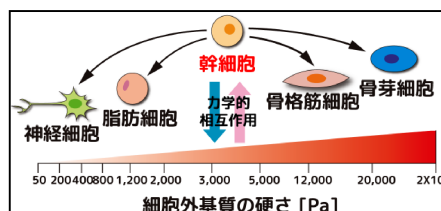


図2 ECMの硬さと幹細胞の分化

が必要であることを見出し、“YAP メカノホメオスタシス”を提唱した [Asaoka & Furutani-Seiki Curr Opin Cell Biol. (2017)] (図3)。しかし、「ARHGAP18をはじめその他の分子群がどのようにアクチオシンの活性を調節し、臓器および個体サイズの精緻な制御を実現しているのか」という問題については、現時点でも不明な部分が多い。

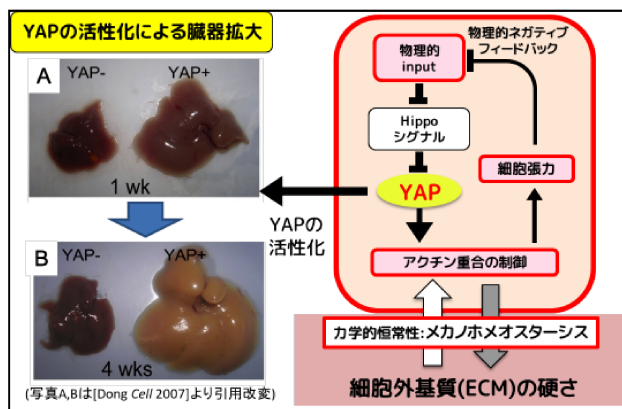


図3 YAP メカノホメオスタシスの概念図

2. 研究の目的

上記の問いを明らかにするには、臓器および個体サイズの制御・維持において、組織の力学特性を統御する YAP-アクチンシグナルの分子実体に迫るとともに、*in vivo*において組織内の個々

の細胞が生み出す力を直接計測することが喫緊の課題であるとの認識に至った。極性上皮細胞は常にたわみや湾曲など変形の場の中でその時々細胞間の張力変化を感知し、適切かつ巧みに細胞骨格を変化させる。こうした Hippo-YAP シグナル伝達系による細胞内張力の制御機構は、これまで2次元細胞培養モデルを用いて解析が行われてきた。しかしながら、組織内部に存在する応力分布や歪み分布など3次元的情報を捉えることが難しく、生体内の個々の細胞が「いつ」「どこで」力学的な微細環境を制御し、どのように最終的なマクロスケールの臓器サイズに反映させているのかについては知見が非常に乏しい。そこで本研究においては、**小型魚類を用いた臓器構築・再生過程の *in vivo* 力学計測系の確立**および YAP-アクチンシグナルによる臓器・個体サイズの制御機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

これまでに本学の有賀准教授と共同で、組織の力学特性を定量的に解析する系の樹立を進めてきた。本研究計画で着目している組織の硬さの計測に先立って、まずは近年国外で開発された、油滴の変形から生体組織の内部で細胞間に働く力を見積もる計測系を立ち上げた (Campas Nat. Methods 2014)。小型魚類の胚組織の内部に蛍光ラベルした油滴を埋め込み、細胞の生み出す力による油滴形状の変化を観察した。さらに外部磁場を加えて磁性流体を変形させることで細胞組織の内部に力を加え、その応答のイメージングを行った。

4. 研究成果

(1) 臓器構築過程での YAP メカノホメオスタシスの理解のために、組織の力学特性を直接計測する系の立ち上げを試みた。具体的にはメダカ YAP 変異体胚へ磁性流体の油滴を微量注入し、外部磁場を加えて変形させることで細胞組織の内部に力を加え、その応答を観察することで生体組織内部での硬さを計測する系が樹立できた。さらにアルギニンゲルをメダカ YAP 変異体胚へ微量注入し、組織内部の圧力変化を計測する系の立ち上げを進めつつある。

(2) 成魚において組織の力学特性を長期にわたり計測する系の確立を試みた。ゼブラフィッシュ成魚の尾ヒレ再生系を用いて、長期タイムラプスイメージングを行うための麻酔液還流システムを樹立し、ヒレ組織に磁性流体の油滴を注入し磁場をかけてその変形を計測することで、生体組織における力学特性(粘弾性)の実測に成功した。これらの計測手法の確立は、YAP-アクチンシグナルがどのように3次元立体臓器の構築・再生過程において組織の力学特性を統御しているのかという未知のメカニズムの解明につながる成果である。

現在、力学恒常性の観点からの病因解明・治療法開発は遅れており、本研究成果を通して得られる力学恒常性の作動原理の理解は、組織の硬さというこれまでとは視点の異なる新しい標的を狙ったがん治療法にも応用できるという意義がある。がんの成立過程においては、粘弾性の他にも圧力や張力などさまざまな生体組織の力学特性を把握することが不可欠であり、組織の時空間的な力学特性の経時的計測技術を確立することも今後の必須の課題であると考えられる。

<引用文献>

(1) Makoto Furutani-Seiki, Takao Sasado, Chikako Morinaga, Hiroshi Suwa, Katsutoshi Niwa, Hiroki Yoda, Tomonori Deguchi, Yukihiro Hirose, Akihito Yasuoka, Thorsten Henrich, Tomomi Watanabe, Norimasa Iwanami, Daiju Kitagawa, Kota Saito, Satoshi Asaka, Masakazu Osakada, Sanae Kunimatsu, Akihiro Momoi, Harun Elmasri, Christoph Winkler, Mirana Ramialison, Felix Loosli, Rebecca Quiring, Matthias Carl, Clemens

Grabher, Sylke Winkler, Filippo Del Bene, Ai Shinomiya, Yasuko Kota, Toshiyuki Yamanaka, Yasuko Okamoto, Katsuhito Takahashi, Takeshi Todo, Keiko Abe, Yousuke Takahama, Minoru Tanaka, Hiroshi Mitani, Toshiaki Katada, Hiroshi Nishina, Noboru Nakajima, Joachim Wittbrodt and Hisato Kondoh. A Systematic Genome-Wide Screen for Mutations Affecting Organogenesis in Medaka, *Oryzias Latipes*. *Mech Dev*. 121:647-658 (2004)

(2) Sean Porazinski#, Huijia Wang#, Yoichi Asaoka#, Martin Behrndt#, Tatsuo Miyamoto#, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S F Gabriel Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B Miesfeld, Brian A Link, Takeshi Senga, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina, Carl-Philipp Heisenberg and Makoto Furutani-Seiki. YAP Is Essential for Tissue Tension to Ensure Vertebrate 3D Body Shape. *Nature* 521:217-221 (2015) (#equally contributed)

(3) Yoichi Asaoka and Makoto Furutani-Seiki. YAP Mediated Mechano-Homeostasis - Conditioning 3D Animal Body Shape. *Curr Opin Cell Biol*. 49:64-70 (2017)

(4) Otger Campàs, Tadanori Mammoto, Sean Hasso, Ralph A Sperling, Daniel O'Connell, Ashley G Bischof, Richard Maas, David A Weitz, L Mahadevan & Donald E Ingber. Quantifying cell-generated mechanical forces within living embryonic tissues. *Nature Methods* 11:183-189 (2014)

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroaki Mano, Yoichi Asaoka, Daisuke Kojima and Yoshitaka Fukada	4. 巻 2
2. 論文標題 Brain-specific homeobox Bsx specifies identity of pineal gland between serially homologous photoreceptive organs in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0613-1	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 -

1. 著者名 Yoichi Asaoka, Hitoshi Morita, Hiroko Furumoto, Carl-Philipp Heisenberg, and Makoto Furutani-Seiki	4. 巻 1893
2. 論文標題 Studying YAP-Mediated 3D Morphogenesis Using Fish Embryos and Human Spheroids.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 167-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8910-2_14	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 Hirayama J, Alifu Y, Hamabe R, Yamaguchi S, Tomita J, Maruyama Y, Asaoka Y, Nakahama K, Tamaru T, Takamatsu K, Takamatsu N, Hattori A, Nishina S, Azuma N, Kawahara A, Kume K, Nishina H.	4. 巻 9
2. 論文標題 The clock components Period2, Cryptochrome1a, and Cryptochrome2a function in establishing light-dependent behavioral rhythms and/or total activity levels in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports.	6. 最初と最後の頁 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37879-8	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4件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅岡 洋一
2. 発表標題 小型魚類を用いた3次元臓器形成に不可欠な力学恒常性の解析
3. 学会等名 新学術領域「細胞ダイバース」第6回公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅岡 洋一
2. 発表標題 若手シンポジウム2 何が生物の「サイズ」を決めるのか? 「3次元臓器構築に不可欠なYAP-メカノホメオスターシス機構」
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅岡 洋一
2. 発表標題 小型魚類メダカを用いた3次元臓器形成機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅岡 洋一, 要 匡, 古谷-清木 誠
2. 発表標題 YAPとPTPN11の変異フィッシュを用いたNoonan症候群の発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 YAP阻害剤を有効成分とするIL-8遺伝子又はMHC class I I関連遺伝子の発現量の増強剤	発明者 白井睦訓, 清木誠, 浅岡洋一, 荻野英賢	権利者 山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-067200	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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			
英国	パース大学			