

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15828

研究課題名(和文)細胞間コミュニケーションの設計による組織サイズの制御機構の解明

研究課題名(英文)Tissue size control with synthetic cell-cell signaling

研究代表者

戸田 聡 (Toda, Satoshi)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・助教

研究者番号：20738835

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)：本研究は、細胞集団が組織構造を自律的に形成・維持する仕組みを解析するため、緑色蛍光タンパク質GFPを細胞間シグナル分子として用いた細胞間シグナル伝達モデルを構築した。このシステムでは、細胞がGFPを分泌し、液中のGFPを人工受容体によって認識して細胞の遺伝子発現を誘導することで、GFPがまるで細胞間シグナル分子であるモルフォゲンのように機能する。このシステムを培養細胞に導入し、パラメータ探索やフィードバック回路構築、細胞増殖などの細胞応答の誘導により、分泌物質による多細胞動態の制御原理を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体組織内におけるシグナル分子の分布や個々の細胞の状態をすべて把握することは困難であるため、本研究では、培養皿上でシグナル分子が細胞動態を制御する仕組みそのものを再構成し、細胞集団が自律的に多細胞組織を形成・維持する原理を解析した。細胞間シグナルを人工構築する技術は、細胞の分化を空間的に制御して人工組織を構築する組織工学分野や、体内の必要な場所へ細胞を送り込む細胞医薬開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：To test how cell-cell communications generate and maintain multicellular structures, we constructed an original model system where green fluorescent protein (GFP) works as an artificial intercellular signaling molecule. In this system, a cell secretes GFP and another cell binds secreted GFP to the cell surface with a synthetic receptor to induce target gene expression. By introducing this system into cultured cells, we artificially reconstructed a signal gradient formation in the population of GFP-receiving cells, suggesting that we successfully made GFP function like a morphogen, a diffusible cell-cell signaling molecule. Using this synthetic morphogen model, we explored the basic principles to regulate multicellular dynamics by manipulating model parameters such as an expression level of synthetic receptors and cellular responses such as feedback circuits and cell proliferation.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 細胞間コミュニケーション モルフォゲン パターン形成 細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

動物の発生過程では、細胞同士がシグナルをやり取りして、互いの増殖や分化を制御することで、正しくオーガニズされた組織や器官が形成、維持される。例えば、モルフォゲンと呼ばれる細胞間シグナル分子は、胚発生時において一部の細胞から分泌され拡散し、組織内に濃度勾配を形成する。そして、周囲の細胞はその濃度勾配に従って増殖や分化を誘導する。また、環境変動による細胞の過増殖には細胞死が誘導され、組織損傷時には細胞増殖が誘導されることで、組織サイズの維持や組織再生が行われる。しかし、生体組織内におけるモルフォゲンや増殖因子の分布、個々の細胞の状態変化などをすべて把握することは難しく、細胞がどのようにコミュニケーションすれば、頑強な多細胞パターンを形成し、その形態やサイズを恒常的に維持することができるのかはよくわかっていない。

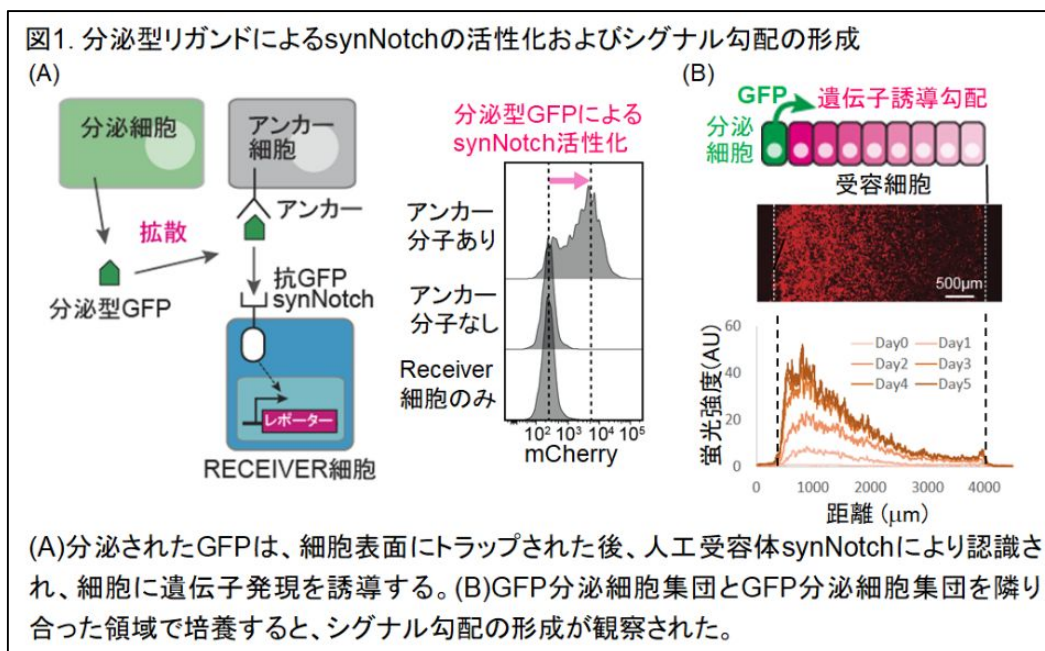
2. 研究の目的

本研究では、細胞間シグナルを人工的に構築したモデルシステムを開発し、細胞から分泌されたシグナル分子がどのように多細胞パターンを形成、制御するかを明らかにすることを目的とする。さらに、人工的な細胞間シグナルに対する応答として細胞増殖を誘導することで、細胞集団が自身のサイズを一定に維持するための条件を探索する。

3. 研究の方法

本研究では、分泌されたシグナル分子が組織内で多細胞パターンを形成、制御する仕組みを解明するため、培養皿上でモルフォゲンシステム、つまり、分泌物質を介した細胞間相互作用を再構成することを試みた。具体的には、生理作用のない緑色蛍光タンパク質 GFP を細胞間シグナル分子として利用し、ある細胞が GFP を分泌して、別の細胞が液中の GFP を細胞表面に結合、認識する細胞間シグナルを構築する。このとき、GFP を細胞表面に結合するだけでは、細胞の状態を変化させるシグナルを入れることができないため、GFP を認識すると活性化して遺伝子発現を誘導する人工受容体 (synthetic Notch receptor (synNotch)) を利用した。synNotch 受容体は、認識する分子と、分子を認識後に誘導する標的遺伝子を自由に指定することができる人工受容体であり、本実験では、GFP を認識する抗 GFP synNotch 受容体を用いた(図 1A)。これにより、細胞から分泌された GFP を細胞の遺伝子発現を制御するシグナル分子として機能させることができる。そこで、マウス線維芽細胞株を用いて、培養皿上に GFP を分泌する細胞の領域および GFP を受容する細胞の領域を作製し、さらに、GFP の分泌量や GFP を認識する受容体の発現量などのパラメータを変えることで、シグナル分子 GFP が GFP 受容細胞領域内にどのようなパターンを形成するか解析した。また、GFP を受容した細胞が、シグナル強度を変化させるフィードバック応答を誘導することで、細胞集団が自律的にパターンのサイズや動態を制御することができるか検証した。

また、GFP を介した人工的な細胞間シグナルにより細胞の増殖を制御するため、GFP 受容細胞において、タンパク合成阻害剤 puromycin への耐性遺伝子の発現を誘導した。これにより、通常、puromycin 存在時に細胞は増殖せずに死ぬが、GFP を添加することで細胞の生存・増殖を誘導できるかを検証した。この系を用いて、細胞の生存・増殖を誘導する細胞間コミュニケーション

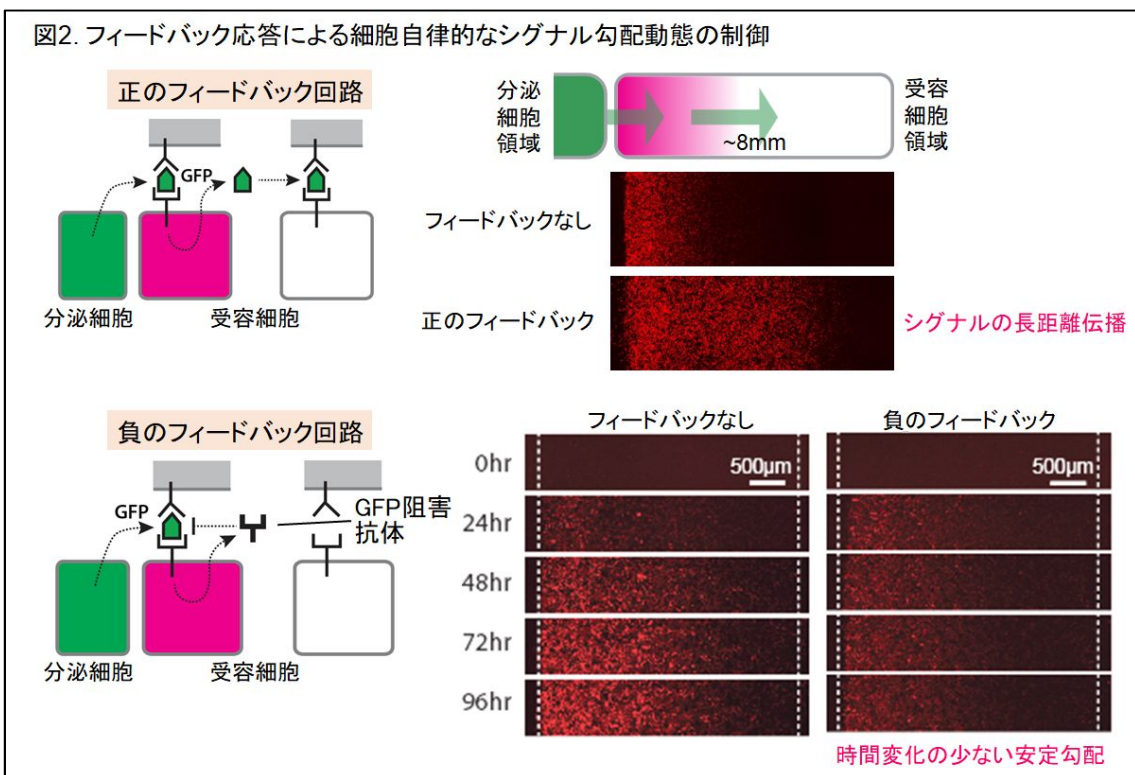


ンを構築することで、多細胞パターンや細胞集団サイズをどのように制御することができるか

解析した。

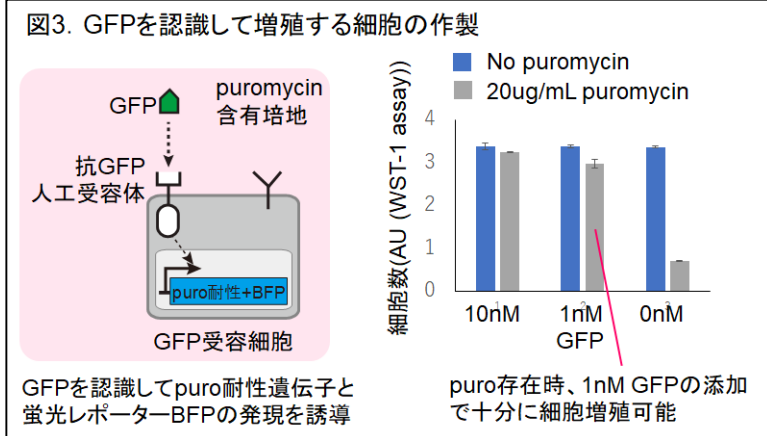
4. 研究成果

GFP の分泌と受容によるモルフォゲンシグナル再構成系を構築するため、培養皿上に GFP 分泌細胞集団の領域と、その隣に GFP 受容細胞集団の領域を作製したところ、GFP の拡散によって GFP 受容細胞集団内に遺伝子発現のシグナル勾配が形成された (図 1B)。そこで、このシグナル勾配の形状を決めるパラメータ条件を探索したところ、勾配の傾きは GFP を受容する分子の密度によって決まることがわかった。また、GFP を受容した細胞が、さらなる GFP を産生する正のフィードバック回路を構築したところ、細胞の活性化領域が時間とともに広がり、シグナルの長距離伝播が観察された (図 2 上)。一方、GFP を受容した細胞が GFP の阻害分子 (高親和性の抗 GFP 抗体) を産生する負のフィードバック回路を構築すると、初めの短時間で弱いシグナル勾配が形成された後、誘導された阻害分子が以降のシグナルをブロックした。その結果、負のフィードバック細胞は、時間変化の少ない安定なシグナル勾配を形成した (図 2 下)。これまでの胚におけるパターン形成過程の解析により、モデルフォゲンシグナルのフィードバック制御は、発生過程での安定した勾配形成に重要であることが提唱されており、モルフォゲン再構成系においても同様のモルフォゲン勾配の制御原理を実証することができた。



次に、液中の GFP を認識した細胞に増殖を誘導するため、puromycin 存在下において、GFP を受容した細胞に puromycin 耐性遺伝子の発現を誘導することで、GFP 依存的な細胞の生存・増殖が可能か検証した (図 3 左)。まず、液中に GFP を添加し、puromycin 存在下における細胞数の変化を解析したところ、GFP により活性化した細胞の増殖が観察されたが、通常環境における細胞増殖に比べて増殖速度は低下していた。また、この GFP 受容細胞と GFP 分泌細胞を共培養した場合、細胞が分泌する量の GFP では十分な細胞増殖を誘導できないことが明らかになった。

そのため、本システムで細胞増殖を制御するには、システムを改良して、GFP をより高い感度で認識して puromycin 耐性遺伝子を強く誘導する細胞を構築する必要があることがわかった。そこで、人工受容体の GFP 認識部位をより高親和性の GFP 抗体へと置換したところ、細胞がより低濃度の GFP に対しても強く活性化し、puromycin 存在下において、通常環境での細胞増殖とほぼ同等の増殖速度を誘導することに成功した (図 3 右)。



そこで、GFP により細胞の生存・増殖を制御するシステムを用いて、分泌シグナルが細胞増殖を誘導することでどのような多細胞パターンを形成できるかを現在解析している。また、多細胞パターンの形成に加えて、組織サイズの制御原理を解析するため、GFP の分泌と受容を同時に行う細胞や、GFP を受容して増殖すると同時に GFP 阻害分子を分泌する細胞を作製している。そして、これらの細胞を puromycin 存在下で様々な比率で共培養することで、細胞集団全体のサイズがどのように時間変化するか、また、それぞれの細胞種がどのように空間配置されるかを解析する。以上の解析により、今後、細胞集団が自発的に組織形態やサイズを制御するために必要な条件が明らかになることが期待される。本研究で開発したシステムは、内在的なシグナル伝達経路に影響を与えることなく、細胞間の増殖シグナルを構築することができ、細胞間相互作用がどのように細胞集団の挙動を生み出すか解析するモデルシステムとして有用である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 1件）

1. 著者名 水野 皓介, 戸田 聡	4. 巻 53
2. 論文標題 人工モルフォゲンによる多細胞パターンのデザイン	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 54, 57
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 戸田 聡, Wendell A. Lim	4. 巻 39
2. 論文標題 細胞分化パターンの操作を可能とする人工モルフォゲンシステムの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 939, 942
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 Toda Satoshi, McKeithan Wesley L., Hakkinen Teemu J., Lopez Pilar, Klein Ophir D., Lim Wendell A.	4. 巻 370
2. 論文標題 Engineering synthetic morphogen systems that can program multicellular patterning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 327 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abc0033	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 Toda Satoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Synthetic tissue engineering: Programming multicellular self-organization by designing customized cell-cell communication	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 42 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bsj-2020002	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 戸田聡	4. 巻 38
2. 論文標題 人工受容体技術を用いた細胞医薬のデザイン	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学増刊号	6. 最初と最後の頁 85～91
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9件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 戸田聡
2. 発表標題 細胞間コミュニケーションの操作による多細胞組織のデザイン
3. 学会等名 大阪大学先導的学際研究機構生命医科学融合フロンティア研究部門シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田聡
2. 発表標題 細胞間コミュニケーションの設計による多細胞パターンのデザイン
3. 学会等名 第3回東京理科大学合成生物学研究部門シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田聡
2. 発表標題 Programming Multicellular Pattern Formation with Synthetic Cell-cell Signaling
3. 学会等名 The SPIRITS International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸田聡
2. 発表標題 細胞間コミュニケーションを設計して細胞に自律的にパターン形成させる
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸田聡
2. 発表標題 細胞間コミュニケーションの設計による多細胞パターンのデザイン
3. 学会等名 第4回和光-精神神経懇話会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸田聡
2. 発表標題 Programming multicellular patterns with synthetic cell-cell signaling
3. 学会等名 20th HFSP AWARDEES MEETING (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸田聡
2. 発表標題 Engineering synthetic morphogen systems that can program multicellular patterning
3. 学会等名 Wnt研究会2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸田 聡
2. 発表標題 組織内位置情報の操作を可能とする人工モルフォゲンシステムの開発
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞分化パターンを人工的に設計できる細胞間シグナル伝達モデル「人工モルフォゲン」の開発に成功！
<https://nanolisi.kanazawa-u.ac.jp/achievements/achievements-13345/>

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