

# 科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料 〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025  
課題番号：21H05038  
研究課題名：哺乳類初期発生の時空間的ゆらぎと自己組織化機構の解明  
研究代表者氏名（ローマ字）：柘 卓志 (HIRAGI Takashi)  
所属研究機関・部局・職：京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：00512477

## 研究の概要：

生命システムには、空間と時間の情報にゆらぎが存在する。一方で、生命システムはゆらぎに頑強であり、全体として自己組織化して機能を発揮する、ロバストネスを備えている。本研究では、哺乳類の初期胚をモデルに、ゆらぎとロバストネスの共存の原理と、ゆらぎの持つ役割を明らかにする。さらに、一定のタイミングで一定の姿かたちへと発生するための、時空間情報を統合する機構を解明する。

研究分野：発生生物学

キーワード：ロバストネス、ゆらぎ、自己組織化、哺乳類初期発生、サイズ制御

## 1. 研究開始当初の背景

生命システムには、細胞の形や細胞分裂のタイミングなどの空間と時間の情報にゆらぎが存在する。ここでゆらぎとは平均値の確率論的なばらつきを指す。胚発生には、ゆらぎを乗り越えて、一定のタイミングで一定の姿かたちをとるロバストネスが存在するが、その原理は長年の根源的な課題である。研究代表者は、哺乳類の初期発生が、卵割の様式や細胞の系譜決定、遺伝子発現などにゆらぎを抱えていることを明らかにしてきた。そして、一早く物理学を取り入れ、ゆらぎにも関わらず、発生がロバストに進む鍵として、細胞や組織の力学を含むフィードバック制御を同定した。これらをもとに、分子から組織までの階層をまたぐフィードバックが、多細胞システムの自己組織化の基本原則であるという説を提唱している。

## 2. 研究の目的

本研究では、胚発生の空間情報と時間情報におけるゆらぎに着目し、胚がロバストに発生する原理を解明する。胚のパターン形成などの空間制御と、タイミングなどの時間制御との連関を明らかにし、空間と時間を統合する発生プログラムを同定する。マウスに加えて、よりヒトに近縁なカニクイザルを新たな哺乳類発生学のモデルとし、ゆらぎやロバストネスにおける種間で保存された、あるいは霊長類に特有の機構を見出す。これにより、ヒトの発生や哺乳類の進化の理解にもつながる革新的な手がかりを得る。

## 3. 研究の方法

研究代表者がこれまでの研究で築き上げてきた学際的手法を発展させ、1) 計測と操作可能な実験系の開発、2) 先端顕微鏡や物理、数学を駆使したゆらぎの定量計測、3) 計測データにもとづく仮説、数理モデルの構築、4) ゆらぎの操作による仮説の検証を繰り返す。具体的には以下の通りである。

- 1) 課題に合わせてマウスやカニクイザル初期胚の培養とライブイメージングの条件を最適化する。
- 2) ライブイメージングデータから、細胞の形や配置、分裂や分化のタイミングを定量解析する。
- 3) トポロジー論などを取り入れ、表面エネルギー最小化などの物理理論により機構仮説を立てる。
- 4) 遺伝学や薬理学、あるいは胚操作などの物理的手法により、ゆらぎを操作し仮説を検証する。

生物の持つゆらぎの研究には、実験上の誤差をできる限り排除できる堅牢な実験系と統計処理に資する大規模データの解析が必要である。研究代表者が共同開発した光シート顕微鏡 InVi-SPIM (Strnad et al. 2016 *Nat Methods*) や機械学習を用いた自動画像解析 (Ichikawa et al. 2022 *Dev Cell*) などの独自の技術により、本研究は世界で類を見ない形で実施可能である。

## 4. これまでの成果

研究代表者の近年の研究により、胚の空間構造の自己組織化についての理解が進んできた。一方で、時間の制御については未解明の部分が多いため、まずは細胞ごとの時間情報のゆらぎについて調べることにした。マウス初期胚をライブイメージングし、細胞のトラッキングにより、4細胞期から64細胞期までの系譜図を作成した（図 A）。これにより、各卵割時の細胞分裂のタイミングにばらつきがあり、この分散が卵割の回を追うごとに線形に増大することがわかった。胚に様々な実験操作を加えても、細胞分裂に能動的な同調も脱同調も見られなかった。これらのことから、細胞間に分裂タイミングの協調はなく、個々の細胞の自律的な周期に依存して、分裂の非同調が進むことが明らかになった。

次に、空間構造の変化を調べるため、8細胞期における空間情報を数学的に表現する Morphomap を作成した (図 B)。ここでは細胞膜シグナルの三次元自動領域分割により、各細胞の輪郭を抽出し、スプライン曲線を使ってフィッティングをする。8細胞から504次元のデータが得られ、2次元平面に投影することで、8細胞期中の空間構造の変化を示すことができる。Morphomap とトポロジー解析により、8細胞期の開始から終わりまでに、胚の細胞は最密なトポロジー、特に40%の胚で D<sub>2d</sub> と呼ばれる最安定トポロジーへと収束することを見出した。さらに、このトポロジーの遷移は、細胞の自由表面における皮質張力と、それによる胚のコンパクションによって促進され、表面エネルギーの最小化理論によって説明ができた。

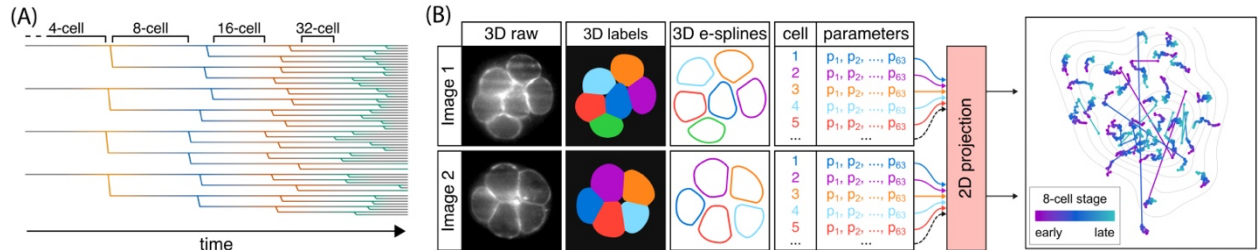


図 (A) 細胞の系譜図は分裂タイミングのズレを示す。(B) Morphomap は空間構造の変化を表現する。

このトポロジー収束の、後に続く発生への影響を調べたところ、16細胞期の内外パターン形成に影響することがわかった。すなわち、8細胞期の終わりに最密充填であれば、16細胞期に胚の内側に来る細胞数が多くなり、内部細胞塊 (ICM) になる細胞が増える。驚くべきことに、細胞分裂を薬剤処理により同期させた胚では、コントロールに比べて、内側の細胞数が減少し、胚の外側由来の栄養芽細胞 (TE) が増加した。これらのことから、細胞分裂のタイミングのズレが、最密構造への収束とそれに伴う内外パターン比の正確性に寄与することを明らかにした。

同様の解析をウサギやサル胚でも行い、サルでは分裂タイミングのズレがマウスより非常に大きいこと、コンパクションを起こさないにも関わらず、8細胞期の初期から D<sub>2d</sub> などの最密構造で存在していることがわかった。このことから、分裂タイミングの大きなズレによって、ロバストなパターン形成を可能にしていると考えられ、タイミングのズレが哺乳類進化の過程で選択された特性である可能性を示唆している。空間のロバストネス獲得に時間のゆらぎが必要であるという、生物学の常識を大きく変革する本内容をプレプリントとして発表し (Fabrèges et al. 2023 *bioRxiv*)、現在査読中である。

## 5. 今後の計画

これまでの研究をさらに発展させ、16細胞期以降の自己組織化に着手する。時間、空間のゆらぎに加えて、遺伝子発現のゆらぎ、それに伴う分化運命が関与することを見出しつつあり、空間の変数の観点からも、より複雑な系に挑戦する。また、胚を倍加や半分したときのサイズの修正が着床期に活性化する結果を得つつある。これに取り組むための実験系が整っており (Ichikawa et al. 2022 *Dev Cell*, Bondarenko et al. 2022 *bioRxiv*)、サイズの逸脱という空間情報を感知して、発生の時間軸を修正する機構を解明する。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. \*Fabrèges, D., \*Corominas Murtra, B., Moghe, P., Kickuth, A., Ichikawa, T., Iwatani, C., Tsukiyama, T., Daniel, N., Gering, J., Stokkermans, A., Wolny, A., Kreshuk, A., Duranthon, V., Uhlmann, V., \*Hannezo, E. and \*Hiiragi, T. Temporal variability and cell mechanics control robustness in mammalian embryogenesis. *bioRxiv* (2023) doi.org/10.1101/2023.01.24.525420, 査読なし。2023年1月24日投稿。
2. Bondarenko, V., Nikolaev, M., Kromm, D., Belousov, R., Wolny, A., Rezakhani, S., Hugger, J., Uhlmann, V., Hufnagel, L., Kreshuk, A., Ellenberg, J., \*Erzberger, A. \*Lutolf, M. and \*Hiiragi, T. Coordination between embryo growth and trophoblast migration upon implantation delineates mouse embryogenesis. *bioRxiv* (2022) doi.org/10.1101/2022.06.13.495767, 査読なし。2022年6月16日投稿。
3. Ichikawa, T., Zhang, H. T., Panavaite, L., \*Erzberger, A., Fabrèges, D., Snajder, R., Wolny, A., Korotkevich, E., Tsuchida-Straeten, N., Hufnagel, L., Kreshuk, A. and \*Hiiragi, T. An *ex vivo* system to study cellular dynamics underlying mouse peri-implantation development. *Developmental Cell* (2022) 57, 373-386.e9., 査読あり。2021年12月23日受理。
4. Kim, E. J. Y., Sorokin, L. and \*Hiiragi, T. ECM-integrin signalling instructs cellular position-sensing to pattern the early mouse embryo. *Development* (2022) 149(1), 1-12., 査読あり。2021年12月3日受理。

## 7. ホームページ等

ホームページ <https://ashbi.kyoto-u.ac.jp/lab-sites/hiiragi/>