

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570231

研究課題名(和文)伸長運動を制御する諸要因についての解析

研究課題名(英文)Analyses of controlling factors in elongation movements

研究代表者

二宮 裕将(NINOMIYA, Hiromasa)

東京大学・総合文化研究科・学術研究員

研究者番号：40514237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：組織極性による収斂伸長運動制御の原理に多様性がどの程度あるかについて検討した。ツメガエル脊索組織と同様に、ツメガエル神経・体節およびヒト背側中胚葉の細胞塊は均一な分化状態(=組織極性のない状態)では球状の形態に留まるのに対し、偏りのある分化状態(=組織極性のある状態)では、その分化極性の方向に伸長した。組織極性自体は組織ごとに異なるシグナルの組み合わせで誘導された。結果より、1)「組織極性が様々な脊椎動物背側組織の収斂伸長に働いている」ことと、2)「組織極性を誘導するシグナルは多様である」ことが解明された。

研究成果の概要(英文)：I have studied about whether there are varieties in mechanisms of convergent extension regarding to cell directing role of tissue polarity. *Xenopus* neural, somitic and human dorsal mesoderm cell masses remained spherical shape in uniform differentiation states (= differentiation without tissue polarity), whereas the tissues elongated into direction of the polarity in biased differentiation states (= differentiation with tissue polarity). These results were consistent with previous experiments in *Xenopus* notochord tissue. Different combinations of signals induced the tissue polarity in different tissues. These results indicated that 1) "Tissue polarity is directing on convergent extension of the various vertebrate dorsal tissues" and 2) "Tissue polarity is induced by various combinations of signals".

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 細胞運動 組織分化

1. 研究開始当初の背景

細胞再配置による組織形成

- 代表的モデルとしての収斂伸長

組織・器官が正常に機能するためには、構成する細胞の正確な位置取りが欠かせないが、それは胚発生時の形態形成運動により作り出される。動物の形態形成過程を観察すると、細胞間の位置を相対的に変えることにより組織の形が正確に作り出される。一見すると、そこには何か特殊な原理が働いているように思える。しかし複雑な生物の形態形成も、根本をたどれば単純な機械的原理の組み合わせで説明できるはずである。複雑な胚の形態形成も、比較的単純な細胞運動パターンの組み合わせからできている。たとえば球や平板状の組織形態を効率的に細長く伸張させる細胞運動様式として、組織中の細胞を伸長軸に対して垂直な方向に挿入させる収斂伸長がある(図1、Wallingford et al., 2002,)。



図1. 収斂伸長運動の模式図。左から右に収斂伸長の経時的変化を示す (Wallingford et al., 2002 より)。

2. 研究の目的

組織極性による収斂伸長の方向決定は一般的な仕組みか？

様々な組織で見られる収斂伸長運動は形態形成研究のモデル系であり、その細胞運動に関する多くの遺伝子群が報告されているが、運動全体を制御する仕組みについては理解されていない。例えば planar cell polarity (PCP) シグナルは脊索組織の収斂伸長時の細胞運動に必要なものであるが、細胞運動を伸長軸(前後軸)に対して方向付けるのに必要な組織レベルの制御については、分かっていなかった。私は脊索組織の伸長が Activin, Nodal による分化誘導シグナルの方向に起こり、均一に分化した組織は伸長しないことを明らかにした(図2、Ninomiya et al., 2004)。誘導シグナルの方向性は、その軸に沿った強度の違いから、組織内に遺伝子発現量や細胞選別能の差異、すなわち「組織極性」を生じさせ、この極性が細胞運動の方向を決定する。

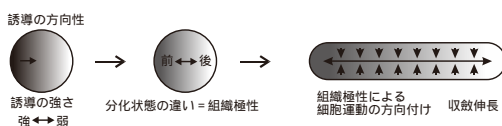


図2. 前後組織極性の形成と収斂伸長運動の方向決定。

一方、同様に分化の組織極性の働きが示唆されているショウジョウバエ胚帯の収斂伸長には別の遺伝子群が多く働いており、組織極性の仕組みに多様性がどの程度あるかについては検討の余地がある。

本研究では脊椎動物の様々な組織伸長に組織極性が働くのか、また働くとすればどのようなシグナルが極性を誘導するのか、について解析し、ツメガエル脊索と比較した。研究から、組織極性による組織伸長運動方向制御の仕組みに多様性がどの程度あるかについて明らかにした。

3. 研究の方法

組織極性の有無 収斂伸長の検定

まず、組織極性のない組織を in vitro で調製する方法を確立した。極性のない組織は1分化している胚組織を取り出し細胞解離・再会合により組織内の細胞の位置関係をランダムにする、もしくは2未分化な細胞を集めて均一な誘導処理を施す、ことにより調製した。次に極性のない組織の組み合わせにより、極性のない組織(同種組織の組み合わせ)と極性のある組織(異種組織の組み合わせ)を作り出し、それぞれの組織の伸長運動を検定した。これらの方法により伸長運動と組織極性の関係を解析した。

4. 研究成果

組織極性による伸長運動制御の仕組みの多様性について検討するため、a ツメガエル胚細胞から in vitro で神経と体節組織を調製し、またbヒト iPS 細胞より背側中胚葉を誘導した後、それらの系における伸長運動と組織極性の関係を解析した。

a ツメガエル神経・体節の伸長と組織極性

まず胚組織の伸長における組織極性の働きを調べた。1 脊索組織と同様に、胚より切り出された神経・体節組織は組織極性を喪失させると伸長運動を示さなかった(図3)。それに対し、前方・後方の組織の結合により極性を再構築させると、極性の方向への伸長運動が引き起こされた。このことより、神経と体節でも組織極性が伸長制御に働くことが示された。

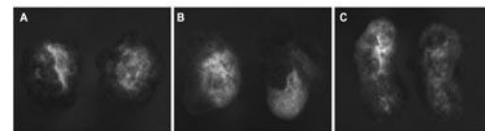


図3. 組織極性が胚組織伸長には必要である。前方(A)および後方(B)神経細胞塊同士の組み合わせは球形だが、前後の組み合わせ(C)は極性の方向(上下)に伸長する。

組織極性のない神経・体節組織は2未分化外胚葉細胞をそれぞれ BMP シグナル阻害剤、Activin で均一処理することによっても得ら

れた。どのシグナルが組織極性形成に働くのかを調べるため、さらに追加のシグナル処理を加えた細胞を組み合わせ、伸長を検定した。

Activin シグナル極性が働くツメガエル脊索組織とは異なり、誘導された神経組織は FGF シグナルの極性が、体節では Activin と BMP シグナルの極性が伸長を引き起こした。また FGF シグナルを均一に加えた神経組織では、Wnt と BMP シグナルの極性もそれぞれ伸長運動を誘起した。さらに FGF シグナルによる神経組織伸長について、1. 「FGF タンパクの不均一な作用は伸長を引き起こす」こと、2. 「伸長運動には FGF シグナルの最適強度ではなく、異なる強さを受けた細胞間の相互作用が働いている」ことを証明した。

in situ hybridization による遺伝子発現解析により、神経分化を Sox2 発現で、中胚葉分化を Brachyury 発現で確認した。また、初期分化時の後方神経遺伝子である HoxB9 や体節遺伝子である MyoD の発現が微弱でも組織は伸長しており、これらの遺伝子発現と伸長運動を切り離し得ることが示された。

最後に細胞ラベルにより運動の様式を解析し、収斂伸長に特徴的な細胞再配置により組織が伸長することを確認した(図4)。

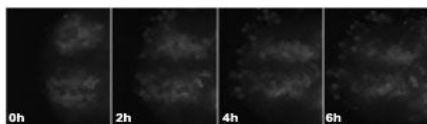


図4. 誘導された組織は収斂伸長により形態を変化させる。FGF シグナルで極性を持たせた神経組織の一部細胞をラベルし、経時的に観察。細胞群は上下に収束しながら左右(極性の方向)に伸びている。この細胞移動様式は収斂伸長に特徴的である。

b ヒト中胚葉の伸長と組織極性

ヒト胚細胞を使うことはできないが、未分化なヒト iPS 細胞を Wnt 作動薬で均一に処理することにより、Brachyury を発現する中胚葉細胞を誘導することに成功した(主な発表論文1、Ninomiya et al., 2015)。

組織極性の伸長運動への働きを調べるため、追加のシグナル処理を加えた中胚葉細胞を組み合わせ、伸長を検定した。その結果、Activin や BMP シグナルの極性で伸長が引き起こされるツメガエル背側中胚葉とは異なり、Wnt シグナルの違いが伸長を誘起した(図5)。

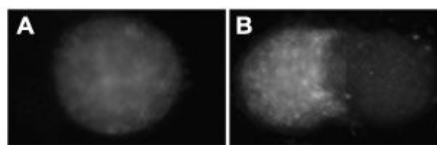


図5. ヒト中胚葉細胞塊の組織極性による伸長。同じ Wnt 作動薬処理を受けた同種細胞塊の組み合わせ(A、細胞は混じりあう)は球形のままである。一方、異種細胞塊の組み合わせ(B)は極性の方向(左右)に伸長を引き起こす。

Brachyury と Oct4 (未分化マーカー)で分化を検定すると、Wnt 作動薬処理の違いにより細胞分化状態の変化が見られた。このことから、ヒト中胚葉組織でも組織極性は伸長運動に必要であるが、極性の誘導には Wnt シグナルが働いていることが示唆された。

さらに伸長の細胞運動に働くと考えられている PCP シグナルの下流因子である RhoA の阻害剤処理により、伸長は抑えられることから、ツメガエル組織と同様に、ヒト中胚葉組織の伸長に PCP シグナル因子が働くことが示された。

まとめ

脊索組織と同様に、ツメガエル体節・神経およびヒト中胚葉の組織塊は均一もしくはランダムな分化状態(=組織極性のない状態)では球状の形態に留まるのに対し、偏りのある分化状態(=組織極性のある状態)では、その分化極性の方向に伸長した。極性形成に関係する誘導シグナルについては、組織ごとに別々のシグナルの組み合わせが働いていた。

これらより、1)「組織極性による収斂伸長運動制御の仕組みが様々な脊椎動物背側組織において働いている」ことと、2)「組織極性形成に関係するシグナルについては組織により異なる」ことが解明された。この研究は脊椎動物組織形態形成の仕組みに関し、大枠では共通であるが、その途中で働く因子に多様性があることを示した。これは脊椎動物組織の形態形成運動の何が一般的な要素かを明らかにした。研究結果が今後、創薬・再生医療等の応用へ貢献すると期待される。

<引用文献>

Ninomiya, H., Elinson, R. P. and Winklbauer, R. (2004). Antero-posterior tissue polarity links mesoderm convergent extension to axial patterning. *Nature*, 430, 364-367.

Wallingford, J.B. Fraser, S.E., and Harland, R.M. (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Developmental Cell*, 2, 695-706.

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Ninomiya, H., Mizuno, K., Terada, R., Miura, T., Ohnuma, K., Takahashi, S., Asashima, A. and Michiue, T. (2015). Improved efficiency of definitive endoderm induction from human induced pluripotent stem cells in feeder- and serum-free culture system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 査読有, 51, 1-8.
doi:10.1007/s11626-014-9801-y.
2. Yasuoka, Y., Suzuki, Y., Takahashi, S., Someya, H., Sudou, N., Haramoto, Y., Cho, K.W., Asashima, M., Sugano, S., Taira, M. (2014) Occupancy of tissue-specific cis-regulatory modules by Otx2 and TLE/Groucho for embryonic head specification. *Nature Communication*, 査読有, 5, 4322.
doi:10.1038/ncomms5322

[学会発表](計12件)

1. 二宮裕将(2014年11月28日)「ツメガエル後方神経組織の伸長運動は前後組織極性により方向付けられる」第9回XCIJ-MA・第8回ツメガエル研究会ジョイント研究集会、北里大学相模原キャンパス(神奈川県・相模原市)
2. 二宮裕将(2014年9月11日)「ツメガエル後方神経組織の伸長運動における前後組織極性の働き」第85回日本動物学会大会、東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)
3. Hiromasa Ninomiya (2014年8月26日) “Elongation movement of *Xenopus* posterior neural tissue is directed by anteroposterior tissue polarity” 15th International *Xenopus* Conference, Pacific Grove, USA.
4. Hiromasa Ninomiya (2014年5月28日) “Role of anteroposterior tissue polarity in elongation movement of *Xenopus* posterior neural tissue” 第47回日本発生生物学会大会、ウインクあいち(愛知県・名古屋市)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

二宮 裕将(NINOMIYA, Hiromasa)
東京大学・総合文化研究科・学術研究員
研究者番号：40514237

(2)研究分担者

高橋 秀治(TAKAHASHI, Shuji)
広島大学・理学系研究科・特任准教授
研究者番号：90447318

(3)連携研究者

()

研究者番号：