

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590240

研究課題名(和文) 新たな視点で解明する原腸胚形成のしくみ

研究課題名(英文) Study for clarifying mechanisms of amphibian gastrulation from a new perspective.

研究代表者

高野 和敬 (TAKANO, Kazuhiro)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：80364769

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)：原腸胚形成は多細胞動物の形づくりにおいて極めて重要な現象であるにもかかわらず、そのメカニズムの実質的な解明が進んでいない。本研究課題では、この時期に単離した両生類の胚細胞がみせる振る舞いの解析を通して、原腸胚形成のしくみを明らかにする目的で研究を行った。その結果、予定外胚葉細胞と予定中胚葉および内胚葉細胞では、それぞれ異なるカルシウムシグナル系を介した細胞骨格の再構築により、胚葉特異的かつ自律的な細胞運動が行われていることが明らかとなった。このような胚葉特異的なカルシウムシグナル系の発達は、原腸胚形成運動の開始と維持において重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gastrulation is one of important steps for morphogenesis during multicellular animal embryogenesis. However, little is known about their mechanisms. In this study, we investigated the mechanisms and roles of autonomous cell movements in embryonic cells isolated from amphibian gastrula of Japanese newt. Isolated presumptive ectodermal cells carried out mainly circus movement that is based on plasma membrane blebbing. Isolated presumptive mesodermal and endodermal cells, on the other hand, carried out mainly vermiform movement that is based on elongation of cellular body. Their two types of autonomous cell movements in the isolated gastrula cells are regulated by different systems of intracellular calcium signaling and cytoskeleton reassembly. These findings suggest that development and formation of calcium signaling mechanisms depending on a type of germinal layers play an important role in the initiation and execution of morphogenetic cell movements during gastrulation.

研究分野：発生生物学・解剖学

キーワード：初期発生 形態形成 細胞運動 原腸胚 カルシウムイオン 細胞骨格 両生類 イモリ

1. 研究開始当初の背景

「原腸胚形成」は多細胞動物の「形づくり」において極めて重要な現象であるにもかかわらず、現在までそのメカニズムの実質的な解明が進んでいない。その理由は、原腸胚形成が細胞間接着・細胞-基質間接着・細胞変形・細胞運動・細胞分化などの現象の時間的・空間的に複雑に絡み合った複合現象であることが要因となっている。それ故に、原腸胚形成は通常の分子遺伝学的研究手法のみでは解明することが不可能なため、現在では原腸胚形成に携わる研究者はほとんどいない状況となっている。

原腸胚形成においてとりわけ重要な現象は、胚表面に存在する予定中胚葉細胞の胚内への潜り込み、すなわち「原腸陥入」である。この原腸陥入が起きる時期に両生類胚を分離して胚細胞を単離すると、「胚葉特異的な自律的な細胞運動」が観察されることが50年以上前に報告されている。しかしながら、それ以降この現象について詳しく調べた報告はほとんどなく、現在では忘れ去られた現象といっても過言ではない。しかし、両生類イモリ原腸胚から単離した胚細胞を用いた申請者のこれまでの研究から、原腸胚形成を解明するための糸口となるいくつかの新たな知見を得た。すなわち、単離外胚葉細胞は大きな硝子様仮足を形成し、その仮足が細胞周囲を回転する自律的な細胞運動を行うこと、単離中胚葉および内胚葉細胞は硝子様突起をもつシリンダー状の形態をしており、原形質流動および細胞表面の波打ち運動によって一方向に伸長する自律的な細胞運動を行うこと、外胚葉細胞にみられる自律的な細胞運動は、ジヒドロピリジン受容体(電位依存性L型Ca²⁺チャネル)とリアノジン受容体による細胞内部からのCa²⁺の放出により制御されていること、中胚葉および内胚葉細胞にみられる自律的な細胞運動は、おそらく細胞内部からのCa²⁺の放出により制御されている可能性を見出した。

申請者が見出したこれらの現象を統一的に説明するためには、原腸胚細胞の胚葉特異的な自律的な細胞運動は、細胞内Ca²⁺調節機構による細胞内ストアからのCa²⁺動員によって制御されており、アクトミオシン系を主とした細胞骨格の再構築により運動が行われている、との着想を得るに至った。

2. 研究の目的

原腸胚期の両生類胚から胚細胞を単離すると、胚内でおこなわれているものと同様な胚葉特異的な自律的な細胞運動が観察されるが、「胚葉特異的な自律的な細胞運動が起きるしくみ」、「胚葉特異的な自律的な細胞運動が原腸胚形成に果たす役割」という本質的な問題は依然として未解明である。本研究では、原腸胚形成の研究対象として、哺乳類胚

では不可能なりアルタイムで胚発生過程を観察することが可能な両生類イモリ胚を用い、この2点について細胞内Ca²⁺調節機構の視点から解明することを目的とした。

なお、本研究で実施する具体的な研究目標を以下のように設定した。

- (1) 胚葉特異的な自律的な細胞運動の運動特性の解析
- (2) 胚葉特異的な自律的な細胞運動と細胞内遊離Ca²⁺の関係性の解明
- (3) 胚葉特異的な自律的な細胞運動における細胞内Ca²⁺調節機構の役割の解明
- (4) 胚葉特異的な自律的な細胞運動における細胞骨格の配置とその役割の解明
- (5) 胚葉特異的な自律的な細胞運動が原腸胚形成に果たす役割の解明

3. 研究の方法

研究目的で掲げた研究目標を達成するため、それぞれについて具体的な研究計画を立てて研究を実施した。

- (1) 胚葉特異的な自律的な細胞運動の運動特性の解析

両生類のアカハライモリの原腸胚から各胚葉(外胚葉・中胚葉・内胚葉)に属する細胞を単離して、タイムラプスビデオ撮影により運動様式および胚領域(予定外胚葉、予定中胚葉、予定内胚葉)・発生段階による差異などについて解析した。

- (2) 胚葉特異的な自律的な細胞運動と細胞内遊離Ca²⁺の関係性の解明

細胞運動には細胞外からのCa²⁺の流入は必要なのか、それとも、細胞内にストアされているCa²⁺の放出のみで賄われているのかを、細胞外Ca²⁺の除去、および、thapsigargin(小胞体Ca²⁺ポンプ阻害薬)を用いて、タイムラプス撮影を行うことにより解析した。また、細胞運動時における細胞内でのCa²⁺濃度の変化について、細胞内Ca²⁺濃度測定装置を用いて解析した。

- (3) 胚葉特異的な自律的な細胞運動における細胞内Ca²⁺調節機構の役割の解明

細胞運動に関与するCa²⁺チャネルの種類、局在様式、および、その調節機構の発達について解析した。具体的には、原腸胚細胞に各種Ca²⁺チャネルの調節薬(開口促進あるいは阻害)を投与した場合の細胞内Ca²⁺濃度の変化、および、それに伴って細胞運動がどのよ

うに変化するのかを細胞内 Ca^{2+} 濃度測定装置により解析した。また、各種 Ca^{2+} チャネルに特異的に結合する蛍光標識化合物を用いて、原腸胚全体および単離した胚細胞における各種 Ca^{2+} チャネルの発現および局在様式の発達について解析した。

(4) 胚葉特異的な自律的な細胞運動における細胞骨格の配置とその役割の解明

細胞骨格は細胞の変形・運動と密接な関係を持つので、微小管、アクチンなどの細胞骨格構造について、特異的な蛍光マーカー等を用いて配置構造を解析した。さらに、微小管重合阻害薬、アクチン重合阻害薬などの細胞骨格重合阻害薬を用いて、細胞骨格タンパク質の重合阻害により細胞変形運動がどのような影響を受けるか、タイムラプスビデオ撮影により解析した。

(5) 胚葉特異的な自律的な細胞運動が原腸胚形成に果たす役割の解明

以上の実験結果を踏まえて、無傷の原腸胚に各種 Ca^{2+} チャネルの調節薬(開口促進あるいは阻害)を投与した場合の原腸胚形成運動への影響を解析することで、胚葉特異的な自律的な細胞運動が原腸胚形成に果たす役割について考察した。

4. 研究成果

(1) 胚葉特異的な自律的な細胞運動の運動特性の解析

単離胚細胞の細胞変形運動は、中期胚期から発現して初期原腸胚期に活発になることがわかった。初期原腸胚期に単離された予定外胚葉細胞は大きな硝子様仮足(プレップ)を形成し、時間経過とともにこの仮足が細胞周囲を周転する自律的な細胞運動を行うことが明らかとなった。一方、単離された予定中胚葉細胞や予定内胚葉細胞は、硝子様仮足を伴ったシリンダー状の形態をしており、長軸方向への原形質流動と細胞表面の波打ち運動を行い、時間経過とともに細胞が長軸方向に伸長する自律的な細胞運動を行うことが明らかとなった。

(2) 胚葉特異的な自律的な細胞運動と細胞内遊離 Ca^{2+} の関係性の解明

原腸胚から単離した予定外胚葉細胞、予定中胚葉および予定内胚葉細胞にみられる自律的な細胞運動は、細胞外から Ca^{2+} を除去した条件下でも阻害されなかったが、小胞体 Ca^{2+} ポンプの阻害薬であるタプシガルジンを投与することで完全に阻害された。さらに、細胞内 Ca^{2+} 濃度画像解析装置による経時解析を行ったところ、予定外胚葉細胞では、プレ

ップ領域で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた。また、予定中胚葉および予定内胚葉細胞では、硝子様仮足と細胞表面の収縮部位で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた。これらの結果より、原腸胚形成時にみられる予定外胚葉細胞、予定中胚葉および予定内胚葉細胞の自律的な細胞運動は、細胞内からの局所的な Ca^{2+} の放出により制御されていることが明らかとなった。

(3) 胚葉特異的な自律的な細胞運動における細胞内 Ca^{2+} 調節機構の役割の解明

初期原腸胚から単離した胚細胞について、各種 Ca^{2+} チャネルの促進薬および阻害薬が細胞運動に与える影響の解析、組織化学的染色による各種 Ca^{2+} チャネルの局在解析、細胞内 Ca^{2+} 濃度のリアルタイム解析、および、透過型電子顕微鏡による形態解析などを行った結果、以下の知見が得られた。

予定外胚葉細胞では、原腸胚形成の開始に伴って細胞膜に発現した Ca^{2+} チャネルのジヒドロピリジン受容体が、細胞内の小胞体に発生初期から原腸胚期にかけて発現が増加する Ca^{2+} チャネルのリアノジン受容体と結合して、ペリフェラルカップリング構造(細胞膜と小胞体が約 12nm の距離で近接する構造)を形成することが確認された。それに伴い、ジヒドロピリジン受容体とリアノジン受容体を介した小胞体からの Ca^{2+} の放出を行う CICR(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, Ca^{2+} 誘導 Ca^{2+} 放出)機構が発達することが確認された。そして、この CICR 機構により予定外胚葉細胞の自律的な細胞運動の出現と活性化が制御されていることが明らかとなった。

予定中胚葉細胞および予定内胚葉細胞では、細胞内の小胞体に発生初期から原腸胚期にかけて発現が増加する Ca^{2+} チャネルの IP_3 (イノシトール 3 リン酸)受容体とリアノジン受容体を介した、小胞体からの Ca^{2+} 放出機構が発達することが確認された。特に、小胞体からの Ca^{2+} の放出機構では、 IP_3 受容体が主要な働きを果たしており、リアノジン受容体と共同して Ca^{2+} の放出を行っている。そして、この IP_3 受容体とリアノジン受容体を介した小胞体からの Ca^{2+} 放出機構の発達により、予定中胚葉細胞および予定内胚葉細胞の自律的な細胞運動の出現と活性化が制御されていることが明らかとなった。

(4) 胚葉特異的な自律的な細胞運動における細胞骨格の配置とその役割の解明

初期原腸胚から単離した予定外胚葉細胞では、プレップ以外の細胞膜直下に豊富なアクチン線維の存在が認められた。また、予定中胚葉および予定内胚葉細胞では、細胞表面の収縮部位の細胞膜直下にアクチン線維が細胞の長軸と直交する向きで細胞を取り囲んでいることが確認された。これら単離胚細

胞にみられる胚葉特異的な自律的な細胞運動は、各種 Ca^{2+} チャネル阻害剤およびアクチン重合阻害剤により阻害され、微小管重合阻害剤では阻害されないことから、細胞内カルシウムシグナリングを介したアクトミオシン系の再構築により制御されていることが明らかとなった。

(5)胚葉特異的な自律的な細胞運動が原腸胚形成に果たす役割の解明

本研究で実施した上記の解析結果から、原腸陥入が起きる時期に両生類の胚細胞を単離すると、予定外胚葉細胞では自律的なブレップ形成と、その周転運動がみられ、予定中胚葉および予定内胚葉細胞の多くは自律的にシリンダー状に細長く伸長すること、および、それらがカルシウムシグナルを介した細胞骨格(アクトミオシン系)の再構築により制御されていることが明らかとなった。さらに、無傷の初期原腸胚に対してリアノジン受容体の阻害薬投与を行った結果、予定外胚葉の伸展覆いかぶせ運動(予定中胚葉を原口に押し込むドライビングフォースとなる)が阻害された。また、 IP_3 (イノシトール3リン酸)受容体の阻害薬投与を行った場合は、予定外胚葉の伸展覆いかぶせ運動は阻害されず、予定中胚葉の胚内への陥入および移動運動が阻害された。

これまでの全ての解析結果を統合すると、予定外胚葉細胞でみられる細胞運動は、ジヒドロピリジン受容体とリアノジン受容体によるカルシウムシグナルを介した細胞骨格(アクトミオシン系)の再構築により、胚表面での外胚葉組織の覆い被せ運動に関与し、また、予定中胚葉および予定内胚葉細胞でみられる細胞運動は、 IP_3 受容体とリアノジン受容体によるカルシウムシグナルを介した細胞骨格(アクトミオシン系)の再構築により、中胚葉および内胚葉組織の胚内への陥入運動に関与していることが示唆された。

本研究により、原腸胚形成における胚葉特異的なカルシウム動員機構の発達が、細胞骨格(アクトミオシン系)の再構築を介して細胞運動および原腸陥入の開始と維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、単に原腸胚形成のしくみの解明にとどまらず、癌転移機構の解明、神経管形成機構の解明、iPS細胞などの幹細胞から三次元構造を有する組織や器官の形成法の確立など、複数の研究分野の問題解明に有用な情報を提供できるものと思われる。

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)

[学会発表](計13件)

高野和敬, 小畑秀一, 増本美香, 浅島誠, 永島雅文. 原腸陥入時における予定内胚葉細胞の運動を制御するカルシウム動員機構. 日本解剖学会 第121回総会・全国学術集会, ビックパレットふくしま(福島県・郡山市), 2016.3.28 ~ 2016.3.30.

小畑秀一, 豊嶋源太, 駒崎伸二, 高野和敬, 門谷裕一. イモリ神経胚の形態形成における細胞配置換えと細胞接着. 日本解剖学会 第121回総会・全国学術集会, ビックパレットふくしま(福島県・郡山市), 2016.3.28 ~ 2016.3.30.

Kazuhiro Takano, Shuichi Obata, Mika Masumoto, Makoto Asashima, Masabumi Nagashima. Mechanisms and roles of autonomous cell movements in embryonic cells during amphibian gastrulation. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会 第92回日本生理学会大会 合同大会, 神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市), 2015.3.21 ~ 2015.3.23.

増本三香, 佐藤知宏, 高野和敬, 駒崎伸二, 天野春菜, 森山俊介, 小畑秀一, 浅島誠. イモリ原腸胚から単離した中・内胚葉細胞の伸長と運動に対する細胞内カルシウムイオン動員機構. 日本動物学会第85回大会, 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市), 2014.9.11 ~ 2014.9.13.

高野和敬, 小畑秀一, 増本美香, 浅島誠, 永島雅文. 原腸胚細胞にみられる自律的な細胞運動と細胞骨格. 日本解剖学会第119回総会・全国学術集会, 自治医科大学(栃木県・下野市), 2014.3.27 ~ 2014.3.29.

小畑秀一, 高野和敬, 駒崎伸二, 増本三香, 加藤智美. 脊椎動物胚の形態形成におけるアドヘレンスジャンクションの役割の再検討. 日本解剖学会 第119回総会・全国学術集会, 自治医科大学(栃木県・下野市), 2014.3.27 ~ 2014.3.29.

Shuichi Obata, Kazuhiro Takano, Shinji Komazaki, Mika Masumoto, Tomomi Kato and Makoto Asashima. Development of Ca^{2+} signaling mechanisms and cell motility in ectodermal cells during gastrulation of amphibian embryo. The American Society for Cell Biology 2013 Annual Meeting, New Orleans, Louisiana (USA), 2013.12.14 ~ 2013.12.18.

小畑秀一, 増本三香, 加藤智美, 高野和

敬, 駒崎伸二, 浅島誠. イモリ胚の形態形成過程における細胞間接着構造の変化. 日本動物学会 第 84 回大会, 岡山大学 (岡山県・岡山市), 2013.9.26 ~ 2013.9.28.

高野和敬, 小畑秀一, 増本美香, 駒崎伸二, 浅島誠, 永島雅文. 原腸胚細胞にみられる自律的な細胞運動と細胞内カルシウムシグナリング. 日本解剖学会 第 118 回総会・全国学術集会, サポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県・高松市), 2013.3.29.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高野 和敬 (TAKAN0, Kazuhiro)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 8 0 3 6 4 7 6 9