

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681043

研究課題名(和文)細胞が集団としての社会性を獲得するメカニズム

研究課題名(英文)Cell society formation during vertebrate organogenesis

研究代表者

松井 貴輝(Matsui, Takaaki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：60403333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：器官形成において、細胞は自律的に集まって機能的な細胞集団、すなわち「細胞社会」を構築する。しかし、in vitroで細胞を寄せ集めても、集団としての社会性は獲得されない。いったい、どのように社会性は獲得されるのだろうか？これは現代科学の未解決な問題の一つである。本研究では、ゼブラフィッシュ胚を脊椎動物の発生モデルと捉え、内胚葉由来器官、クッペル胞、体節形成過程に起こる細胞社会の構築メカニズムを解析し、細胞が社会性を獲得するためには、「適切な数」の細胞が適切に「移動」し、「集まる」ことが必要であることを見いだした。さらに、その社会性を生み出すための分子機構の一端も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：During vertebrate organogenesis, cells are autonomously gathered and make a functional cell cluster called a cell society. However, even though cells are put together in vitro, cells are not able to generate the cell society. How cell society is generated during organogenesis remains largely unknown. We have used zebrafish organogenesis (for instance, formation of endoderm-derived organs, Kupffer's vesicles and somites) as a model for cell society formation, and found several factors which are necessary for generating the cell society during organogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生・分化

1. 研究開始当初の背景

器官形成において、細胞は自律的に集まって機能的な細胞集団、すなわち「細胞社会」を構築する。しかし、*in vitro* で細胞を寄せ集めても、集団としての社会性は獲得されない。いったい、どのように社会性は獲得されるのだろうか？これは現代科学の未解決な問題の一つである。

社会性構築のためには、細胞が移動し、結合する(接着)ことが関与すると考えられる。例えば、脊椎動物のモデル系であるゼブラフィッシュ胚では、膵臓や肝臓などの内臓器官のもととなる内胚葉細胞は、原腸陥入の時期に、胚の全体に点在して出現し、個々の内胚葉細胞が正中線上へ移動してくっつくことで、内胚葉シートを形成し、その後の管状の構造を生み出していくことが知られている。

内臓器官は左右非対称に配置させるのだが、その非対称性を規定するクッペル胞と呼ばれる器官では、20-30個のクッペル胞前駆細胞が集団で出現し、胚の赤道付近から植物極まで移動し、そこで、内腔をもった球状の器官(クッペル胞)を構築することが知られている。

脊椎の等間隔パターンのもととなる体節では、尾部に存在する未分節中胚葉細胞の1つ1つが分子時計をもち、複数の細胞でその情報が同期することで、体節の大きさや形成周期が制御されると考えられている。

我々は本研究の開始以前に上記した内胚葉由来器官、クッペル胞、体節形成の過程で、細胞の社会性が生み出されていることを見いだしていた。

2. 研究の目的

内胚葉由来器官、クッペル胞、体節形成をモデル系として用い、細胞の社会性が生み出されるしくみを理解する。

3. 研究の方法

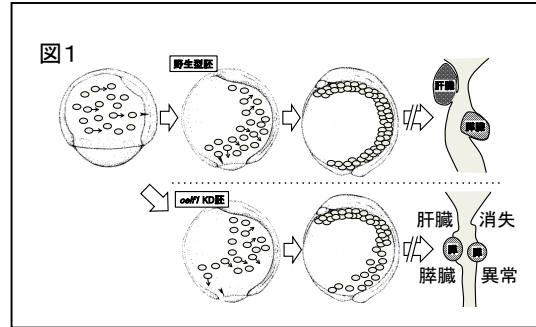
分子生物学、発生生物学、遺伝学などの手法に加えて、ライブイメージング、数理モデリングを行うことで、遺伝子、細胞、器官、個体レベルのデータを取り、細胞社会性の構築メカニズムを統合的に理解する。

4. 研究成果

(1) 内胚葉細胞由来器官の形成モデルでの成果

内胚葉細胞は原腸陥入期にごま塩状に出現したのち、増殖しながら正中線方向へ移動、体節形成中期頃までにシート状の内胚葉組織を形成する。その後、シートの前端から、肝臓、膵臓原基が出芽し、最終的に、腸管の左側に肝臓、右側に膵臓が形成される。

我々は、RNA結合タンパク質 *cellf1* の脊椎動物の発生過程での役割を解析したときに、*cellf1* が内胚葉由来器官の形成に関与することを発見した。



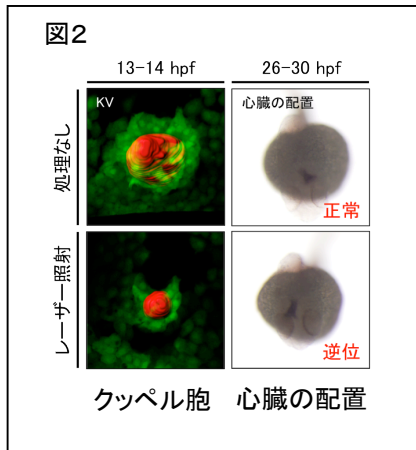
すなわち、*cellf1* のノックダウン(KD)胚において、肝臓の消失、さらに膵臓の過剰形成など消化器形成に欠損が見られた(図1)。内胚葉細胞をGFPで標識する *Tg[sox17:GFP]* を用いて内胚葉細胞の挙動をタイムラプスなどによって解析したところ、*cellf1* KD胚では、細胞死の頻度に変化したのではなく、細胞増殖頻度が低下したことで、内胚葉細胞の数が減少し、個々の内胚葉細胞の移動速度が低下したことで、正中線付近に細胞が集合できないことが明らかになった。以上の結果は、内胚葉が集まってシートを形成する際に、前駆細胞の移動および細胞数が適正であることが細胞社会性の構築に重要であることを示している。

(2) クッペル胞形成モデルでの成果

脊椎動物の器官/臓器は、体内の決まった空間に収まるように、左右非対称に配置される。ゼブラフィッシュのクッペル胞(KV)は左右非対称性を決定するための器官として知られている。受精後6時間で20~30個のKV前駆細胞が出現し、その前駆細胞は植物極側へ移動しながら集合、分化、内腔形成を経て、受精後12時間で尾の先端において球状のKVを形成する。KVの内腔にはシリアと呼ばれる微繊毛が形成され、シリアの一定方向の回転が反時計回りの水流(ノード流)を生み出し、左側での遺伝子発現を変化させることで臓器/器官の左右差を規定している。

我々は、キャノピー1(Cnpy1)を介した繊維芽細胞増殖因子(FGF)シグナルの正のフィードバックループが、KV前駆細胞の自律的な集団形成を制御し、しかも、その集団形成がその後のKV器官の形態・機能形成に不可欠であることを明らかにした(開始以前の成果: Matsui et al., *PNAS* 2011)。しかし、集団を形成する細胞の数にはばらつきがあり、細胞社会の大きさがその後の器官形成にどのように関与するかは分かっていなかった。そこで、遺伝子を操作せずに、細胞の数だけを制限したときKVの形態・機能がどのように変化するかを解析するために、細胞1つレベルで細胞除去を行えるレーザー工

学の技術を活用した。



その結果、KV の細胞数は、30-100 個と 2-3 倍程度ばらついていても、KV の左右差を規定する機能、および、球状の形態は正常であることが明らかになった (図 2 ; 上段)。しかし、KV 細胞が 20 個以下になり、その細胞で作出す内腔の大きさが  $20,000\mu\text{m}^3$  以下になると、KV の機能が失われ、心臓逆位が起こることが明らかになった。以上の結果から、器官は、細胞の社会の大きさのばらつきを許容するメカニズムを持つが、それが閾値以下 (KV の場合は、20 個) になると機能不全が誘導されることが明らかになった (図 2 ; 下段) (Ishikawa et al. in preparation)。また、FGF シグナルの制御因子の活性、相互作用を微分方程式で表し、細胞集団形成を誘導するための数理モデルをすでに構築していたが、上記の結果が得られたため、現在、空間情報の追加を行っている。

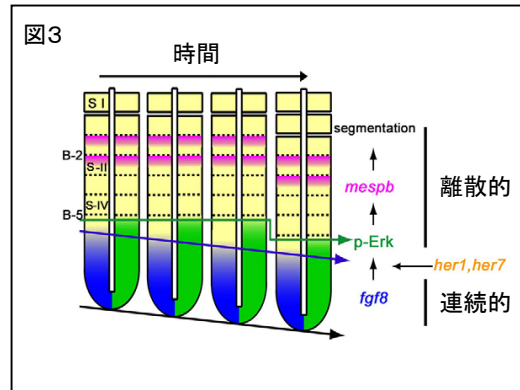
### (3) 体節形成での成果

ゼブラフィッシュでは 30 分、マウスでは 2 時間周期で体節は括れされる。この時間的周期性は、分子時計として機能する Hes ファミリーに属する転写因子 (ゼブラフィッシュでは、*her1/her7*、マウスでは *Hes7*) の発現が振動することで規定されると報告されている。しかし、脊椎動物やナメクジウオの体節は前半と後半で形成される体節形成周期が異なるとの報告もあったが、その真偽は不明であった。我々は、ゼブラフィッシュの体節形成過程を詳しくライブイメージングし、前半と後半の体節の形成周期の違いは、体節境界の形成がオーバーラップ率の違いに依存することを発見した。このオーバーラップ率の違いは、レチノイン酸 (RA) シグナルによって制御されており、この RA シグナルの破綻は特異的な頸椎の消失につながることを明らかにした。

また、体節の分節化は、分子時計のみでは体節の大きさを規定することができないため、体節の大きさを計る「分子定規」が存在することが仮定されていた。過去の国内外の研究によって、FGF シグナルの濃度勾配がこ

の分子定規としての役割を果たすことが示唆されていた。しかし、モルフォゲンの濃度勾配からシャープな分節境界を作るためには、濃度勾配の傾きを変化させる必要があるが、その機構は不明であった。

我々は、ゼブラフィッシュの体節原基において、FGF の下流の主な制御因子である Erk の活性を抗リン酸化 Erk 抗体を用いた免疫染色法で解析したところ、体節原基の中央付近に、FGF/Erk シグナルのオン/オフ境界が存在することを発見した (図 3 ; Akiyama et al., Dev 2014 に用いた図を改変)。免疫染色したサンプルの体節数と体節原基の長さから、時間情報を予測することで、Erk のオン/オフ境界の位置は体節境界から一定の位置に維持されており、新しい体節が分節化したのと同様に、体節 1 つ分の大きさで、胚の後方へシフトすることを突き止めた。Erk の脱リン酸化を阻害する実験やタイムラプスによって、Erk のオン/オフ境界が予定体節境界となることを発見した。



この成果は、一様な体節原基 (シート) の中で、境界という特異線が決まり、それが一定の周期で、一定の距離離れたところに出現することで、体節形成が起こることを示している。しかも、細胞レベルで考えると、この離散的なパターンを作るときには、隣接する細胞群 (おおよそ、ゼブラフィッシュの体節 1 つの中にある細胞、横 10 個 x 縦 5 個 x 高さ 3 個 = 150 個くらい) で、Erk の活性が瞬時にオンからオフへ変換されることが必須であることから、体節形成過程では、体節原基内で 150 個程度の細胞ごとにプレパターン (細胞社会のもと) が構築されており、そのすべてが同調して振る舞うことが必須であると考えられる。現在、シグナル活性のライブイメージング、数理モデル構築を行っており、そのしくみの理解を目指している。

### (4) 成果のまとめ

本研究では、ゼブラフィッシュ胚を脊椎動物の発生モデルと捉え、内胚葉由来器官、クッセル細胞、体節形成過程に起こる細胞社会の構築メカニズムを解析し、細胞が社会性を獲得するためには、「適切な数」の細胞が適切に「移動」し、「集まる」ことが必要である

ことを見いだした。さらに、その社会性を生み出すための分子機構の一端を解明することに成功した。今後、これらの発見をより詳細に解析することで、「多細胞の挙動が統合され、集団としての社会性が生まれる機構」を今までよりも深く理解することを目指すとともに、再生医療等への応用を視野に研究を展開していきたいと考えている。

#### 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)

[雑誌論文] (計 7 件)

(1) Takeshi Fujimuro, Takaaki Matsui, Yasuhide Nitanda, Tatsuro Matta, Yuichi Sakumura, Michiko Saito, Kenji Kohno, Yasukazu Nakahata and Yasumasa Bessho (2014) Hes7 3'UTR is required for somite segmentation function *Scientific Reports*, 4: 6462 (査読あり) DOI: 10.1038/srep06462

(2) Ryutaro Akiyama, Miwa Masuda, Shoichiro Tsuge, Yasumasa Bessho and Takaaki Matsui<sup>1</sup> (2014) An anterior limit of FGF/Erk signal activity marks the earliest future somite boundary in zebrafish (<sup>1</sup>Corresponding author) *Development*, 141: 1104-1109 (査読あり) DOI: 10.1242/dev.098905

(3) Bambang Retnoaji, Ryutaro Akiyama, Tatsuro Matta, Yasumasa Bessho, and Takaaki Matsui<sup>1</sup> (2014) Retinoic acid controls proper head-to-trunk linkage in zebrafish by regulating an anterior-posterior somitogenetic rate difference (<sup>1</sup>Corresponding author) *Development*, 141: 158-165 (査読あり) DOI: 10.1242/dev.097568

(4) Yasuhide Nitanda, Takaaki Matsui, Tatsuro Matta, Aya Higami, Kenji Kohno, Yasukazu Nakahata, and Yasumasa Bessho (2014) 3'UTR-dependent regulation of mRNA turnover is critical for differential distribution patterns of

cyclic gene mRNAs *FEBS Journal* 281: 146-156 (査読あり) DOI: 10.1111/febs.12582

(5) Naoyuki Tahara, Yasumasa Bessho and Takaaki Matsui<sup>1</sup> (2013) Celf1 Is Required for Formation of Endoderm-Derived Organs in Zebrafish (<sup>1</sup>Corresponding author) *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 18009-18023. (査読あり) DOI: 10.3390/ijms140918009

(6) Takaaki Matsui<sup>1</sup>, Akihiro Sasaki, Naoko Akazawa, Hifumi Otani and Yasumasa Bessho (2012) Celf1 regulation of dmrt2a is required for somite symmetry and left-right patterning during zebrafish development (<sup>1</sup>Corresponding author) *Development*, 139: 3553-3560. (査読あり) DOI: 10.1242/dev.077263

(7) Takaaki Matsui「筆頭著者」兼「責任著者」 and Yasumasa Bessho (2012) Left-right asymmetry in zebrafish. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 3069-3077. (査読あり) DOI: 10.1007/s00018-012-0985-6

[学会発表] (計 8 件)

#### 招待講演

- 松井貴輝、岡本仁、別所康全: ゼブラフィッシュの左右非対称性を規定するクッペル胞の形成メカニズム 第153回 日本獣医学会学術集会 (2012/3/27) 大宮ソニックシティ (埼玉県大宮市)
- 松田達朗、作村論一、別所康全、○松井貴輝: ゼブラフィッシュのクッペル胞形成に必須な前駆細胞のクラスタリング 第65回 日本細胞生物学会大会 (2013/6/20) ウィンクあいち (愛知県名古屋市)
- Takaaki Matsui: Proper assembly

- formation of organ progenitor cells. 6<sup>th</sup> Asia Oceania Zebrafish Meeting (2014/1/20) HKUST, Hong Kong
4. ○Tatsuro Matta, Naoyuki Tahara, Hisaya Kakinuma, Yoshikazu Hirate, Hitoshi Okamoto, Yasumasa Bessho, Yuichi Sakumura, **Takaaki Matsui**: Cell clustering required for proper organogenesis 第18回 小型魚類研究会 (2012/9/22) (英語口頭) 京都大学 (京都府京都市)
  5. Bambang Retnoaji, Ryutaro Akiyama, Tatsuro Matta, Yasumasa Bessho and ○ **Takaaki Matsui**: A possible mechanism which adjusts differences between anterior- and posterior-somitogenesis in zebrafish 第18回 小型魚類研究会 (2012/9/22) (ポスター) 京都大学 (京都府京都市)
  6. Ryutaro Akiyama, Dini Sari, Shoichiro Tsuge, Miwa Masuda, Yasumasa Bessho and ○ **Takaaki Matsui**: An ON-OFF boundary of FGF/Erk signal activity marks the earliest future somite boundary in zebrafish. 第47回 日本発生生物学会年会 (2014/5/29) (英語口頭) ウィンクあいち (愛知県名古屋市)
  7. ○Hiroshi Ishikawa, Sohei Yamada, Naoyuki Tahara, Tatsuro Matta, Eri Sumino, Yasumasa Bessho Yoichiro Hosokawa, and **Takaaki Matsui**: How organ size is determined in zebrafish Kupffer's vesicle? 第47回 日本発生生物学会年会 (2014/5/27) (口頭+ポスター) ウィンクあいち (愛知県名古屋市)
  8. ○Naoyuki Tahara, Yasumasa Bessho, **Takaaki Matsui**: Celf1 is required for formation of endoderm-derived organs in zebrafish. 第47回 日本発生生物学会年会 (2014/5/27) (口頭+ポスター) ウィン

クあいち (愛知県名古屋市)

[図書] (計 2 件)

1. **松井貴輝**「筆頭著者」兼「責任著者」, 岡本 仁, 別所康全 羊土社(2012) Canopy1 を介した FGF シグナルの活性制御機構 細胞工学 **31** : 416-420. (査読なし)
2. **松井貴輝**「筆頭著者」兼「責任著者」羊土社(2014) ゼブラフィッシュ胚クッペル胞を作る自律的な細胞集塊形成 細胞工学 **33** : 598-601. (査読なし)

[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  
 松井貴輝 (Takaaki Matsui)  
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号 : 60403333

(2) 研究分担者  
 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
 ( )

研究者番号 :