

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291050

研究課題名(和文) チューリングではなく一方向阻害モデルによる指の個性と本数の決定原理の解明

研究課題名(英文) Developmental mechanisms that specify digit identity and patterning

研究代表者

鈴木 孝幸 (Suzuki, Takayuki)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40451629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞の発生は、最初に組織学的に一である未分化中胚葉の細胞集団の中から前軟骨凝集塊と呼ばれる一部の細胞集団の接着性が高まる部分が形成されることで形成が始まる。したがって、前軟骨凝集塊の発生する場所の謎を解明することができれば、骨格の構造を解明出来ることになる。本研究では、ニワトリ胚肢芽を用いて、肢芽全体の3次元の形態の中で軟骨パターンがどのように自立的に形成されて行くのか研究を行った。その結果、肢芽の3次元の形態形成を定量的に解析する新規の手法を構築出来た。

研究成果の概要(英文)： Our skeletal pattern is derived from pattern of chondrocyte development. Therefore, studying first developmental step of chondrocyte should give us the most valuable information about positional information of skeletal pattern. In this study, we used chick hindlimb bud as a model system and performed how chondrocyte position is specified in the autopod. We succeeded to establish new quantification method to understand 3-dimentional structure of developing organ, especially limb bud in this study.

研究分野：発生生物学

キーワード：パターン形成 軟骨 ニワトリ 形態形成 肢芽 手足

1. 研究開始当初の背景

私たちの体の骨格を形成する骨は、ほとんどが軟骨内骨化と呼ばれる軟骨細胞が硬骨に置き換わることで形成される。これまでの研究では軟骨細胞の分化メカニズムや形成された骨の恒常性維持に関わる遺伝子が数多く報告されて来た。しかしながら、何故軟骨細胞がそこに発生するのか？と言う軟骨パターン形成の最も初期のメカニズムについては全く分かっていない。この原因としては、マウスやゼブラフィッシュを用いた遺伝学的解析では軟骨パターン形成初期のイベントだけに関わる遺伝子のスクリーニングが未だに出来ないことが一因であると考えられる。軟骨細胞の発生は、最初に組織学的に均一である未分化中胚葉の細胞集団の中から前軟骨凝集塊と呼ばれる一部の細胞集団の接着性が高まる部分が形成されることで形成が始まる。したがって、前軟骨凝集塊の発生する場所の謎を解明することができれば、骨格の構造を解明出来ることになる。近年、標的遺伝破壊マウスの表現型から指の本数はチューリングモデルによって説明出来るという考えが広まって来た。これは *Hoxd13* と *Gli3* の両方の機能を阻害すると指の本数が10本になり、さらには指が均等に放射状に分かれて形成されるというパターンから予想されている軟骨パターン形成の原理である。しかしながら申請者はこれまでの自分自身の実験結果からチューリングモデルでは解明出来ない現象があり、それを含めて指の本数の謎を解明するには、新たなモデルが必要である事を示唆している。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ニワトリ胚肢芽(手足の原器)をモデルとして用い、指の軟骨原器が発生する場所の発生学的、分子生物学的基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まずは、軟骨原器が形成される場所を詳細に明らかにするために、パラフィン切片を用いて横断切片を作成後、核の場所を指標に細胞の位置を観察した。その結果細胞の密度が変化するという現象を発見した。そこで次に肢芽全体の細胞群がどのように変形して指が出来る自脚領域を形成していくのか、肢芽全体の形態の定量を行う事にした。これにより自脚領域の限られた3次元空間の中でどのように細胞密度が変化していく領域が形成されるのか理解しようと試みた。肢芽全体の形態変化の定量化過程は次のような方法を用いた。

ニワトリ胚の後肢芽に、DiI/DiO という蛍光色素を用いてランダムに多点でラベルを行いライカ M205FA 蛍光実体顕微鏡を用いて写真撮影を行った。この顕微鏡は電動ズームにより正確に測長が可能であることからこの顕微鏡を用いた。次にニワトリ胚を12時間孵卵させ、再度写真撮影を行った。この

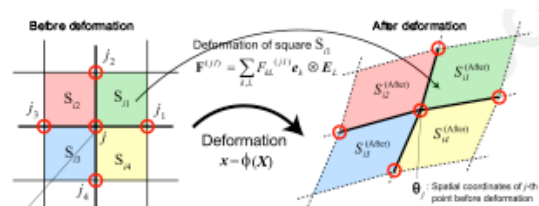
ような胚をニワトリ胚の各ステージごとに数個体集め、12時間における細胞集団の位置の対応関係のデータを収集した。得られたデータを集め、赤池ベイズ情報量基準を用いてこれらの細胞集団の位置の変化が12時間当たりに最も正確に説明出来るような肢芽全体の組織の変形パターンをシミュレーションにより推定した。得られたシミュレーションの結果から肢芽全体がどのように変形して形態が変化して行くのかマクロな形態変化を解析した。

4. 研究成果

自脚領域を含む肢芽全体のマクロは形態がどのように形作られて行くのか理解するためには内部の情報を知る必要がある。ニワトリ胚の肢芽は多くの脊椎動物の器官がそうであるように細胞数が非常に多く、さらに厚みを大きいことから共焦点顕微鏡を用いても肢芽全体の細胞の挙動を一度に解析することが出来ない。そこで、本研究では、あえて細胞レベルの情報を捨て、肢芽を細胞集団の集合体として捉えることとした。このアイデアは熱力学の概念と一致する。熱力学ではたとえある空間内の分子のすべての挙動を理解出来ても空間全体の温度を理解することは出来ないことから、分子の挙動を無視して空間全体におけるモル濃度の分子全体の振る舞いを取り扱う。本研究でも、同様の木(細胞)を見て森(器官)を見ずの考えから森(肢芽)を林(細胞集団)の集まりと考えることにした。このようなアイデアはこれまでの生物学の概念からは生まれにくかった物理学の概念を取り入れたものであり、本学術領域が物理・工学・数理学の分野との連携であることから生み出された成果である。

得られた多細胞集団の位置の変化から、細胞集団の位置の変化を変形テンソルとして図1の様に定義した。

図1: 位置変化を表す変形テンソル



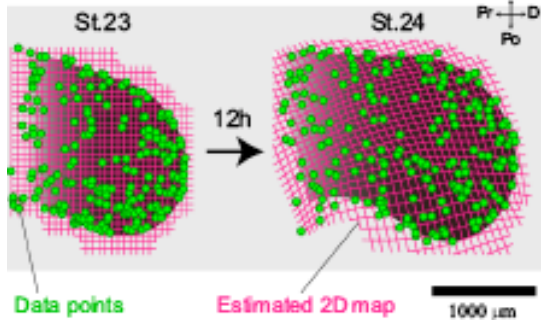
この時12時間の変形過程において細胞集団は滑らかに変形すると仮定した。この条件はその後のシミュレーションにおける唯一の過程であるが、cross variation法を用いてシミュレーション結果を吟味することにより肢芽内部の変形過程は滑らかに変化していることを確認した。

次に赤池ベイズ情報量基準を用いて、細胞集団間の変形過程のシミュレーションを行った。その結果、St.23 から St.24 において肢芽全体の組織が図2のように変形して形態変化を起こしたことが明らかとなった。図

2 : 肢芽全体の变形過程

この手法をまとめて論文を発表した (Morishita and Suzuki, *J. Theor. Biol.*, 2014)。本手法は世界で初めての、定量的に細胞集団から器官全体の形態形成を理解するための手法の報告となった。

次に、開発した手法を用いて肢芽が膨らみだした直後から内部の骨格パターンが形成されるまでの間の肢芽全体のマクロな形態



変化の過程を解析することにした。この時3次元における肢芽全体の变形過程を解析するために OPT スキャナーを用いて肢芽全体の形をスキャンし、Avizo というソフトを用いて背腹軸方向の厚み成分の情報を抽出した。この情報を上述した背側から見た肢芽全体の变形過程のデータと照合し、3次元の形態変化の情報を計算した。

得られた肢芽全体の細胞集団の变形過程のデータからどの場所が形態形成時に大きく変化しているのか明らかにしたいと考えた。ここで、“組織の増殖率”と“組織変形の異方性”の2つの特徴量を抽出した。組織の増殖率 (図3) は単位時間当たり各場所でどれだけ面積・体積が増加したか、組織変形の異方性 (図4) は变形後の細胞集団の形態を解析し、長軸/短軸で求めた。

図3 : 組織の増殖率のヒートマップ

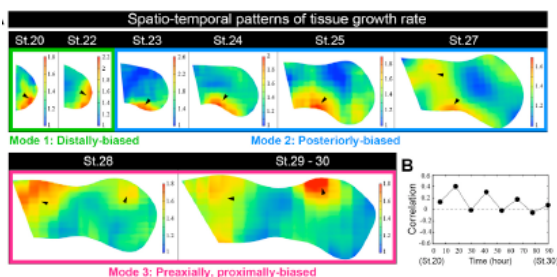
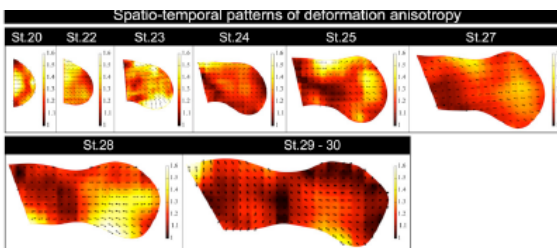


図4 : 組織変形の異方性のヒートマップ



この結果から、肢芽全体の変化の過程の中で特徴的な3つの増殖率の大きなパターンがあることが分かった (図の赤い部分に相当)。まず増殖率の大きい部分が肢芽の先端に現

れ、次に肢芽の後側に増殖率の高い部分が現れ、そして軟骨パターンが形成される時には親指の部分に増殖率の高い部分が見られる。さらに変形の異方性には特徴的なパターンが見られないと思われたが、FGF や SHH などのモルフォゲンが作用していない領域においても肢芽全体の組織が遠近軸方向にバイアスしてストレッチしていることが分かった。この結果は、これまで肢芽の伸長過程では遠位側に増殖率の高い部分があり、そこが肢芽の伸長を誘導すると考えられていた。本研究により、肢芽全体の組織が遠近軸方向に沿ってバイアスして伸長していると言う事実は初めての報告となった。

このように単位時間当たり大きく変化する細胞集団領域を本研究で“Morphogenetic hot spot”と命名した。この領域は“組織の増殖率”と“組織変形の異方性”の2つの特徴量を定量的に計算することによりシステムチックに求めることが出来る。そして、次に“Morphogenetic hot spot”により明らかになった注目すべき領域において領域を絞ってタイムラプス観察を行い、細胞集団の変形を誘導する細胞レベルの動態を観察する、という流れがスケールの階層を超える形態形成メカニズムの理解につながると考えられる。本研究では、従来のマイクロからマクロへの階層上昇性の理解を目指すのではなく、むしろこのようなマクロからマイクロへのトップダウンアプローチがスケールの階層を超える形態形成の理解に有用であることを提唱している。

次に、肢芽の細胞増殖と、細胞集団の変形の異方性の特徴量のうち、どちらがマクロな形態形成に重要であるのかをシミュレーションを用いて解析を行った。それぞれの特徴量を変化させて Vertex dynamics model における肢芽の形態変化をシミュレーションした。その結果、細胞集団が単位時間当たりどれだけ変形するのかがマクロな肢芽の形態形成に非常に重要であることが分かった (Morishita et al., *Development*, 2015)。

このように本研究では、まず細胞集団から器官全体のマクロな形態変化を解析するための方法論を構築し、次にこの手法をニワトリ胚肢芽に適用して形態変化の過程を解析した。本研究は、これまで特に手つかずであったマクロな形態形成の理解に取り組むための先駆的な例を示すことが出来たと考えられる。現在このデータを元に引き続き自脚領域の中のどの部分で細胞密度が変化しているのか定量的な解析を行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

1. Morishita Y., Kuroiwa A., Suzuki T. Quantitative analysis of tissue deformation dynamics reveals three characteristic growth modes and globally-aligned anisotropic tissue deformation

during chick limb development. 2015, *Development*, 142:1672. 査読有

2. Matsubara Y., Sakai A., Kuroiwa A., Suzuki T. An efficient embryonic culture method for the Japanese striped snake, *Elaphe quadrivirgata*, and its early developmental stages. 2014, *Dev. Growth Differ.*, 56, 573. 査読有

3. Morishita Y., Suzuki T. Bayesian inference of whole-organ deformation dynamics from limited space-time point data. 2014, *J. Theor. Biol.*, 357, 74. 査読有

4. Huynen L., Suzuki T., Ogura T., Watanabe Y., Millar C. D., Hofreiter M., Smith C., Mirmoieni S., Lambert D. M. Reconstruction and in vivo analysis of the extinct *tbx5* gene from ancient wingless moa (Aves: Dinornithiformes). 2014, *BMC Evol Biol.*, 75, 1471. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

① 第 3 回 萌える生物学 (大阪)
鈴木孝幸「脊椎動物における後肢の位置の多様性を生み出す分子メカニズム」2015.9.21

② 第 5 回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting (東京)
鈴木孝幸「肢芽全体の形態形成の定量的解析方法と位置の多様性を生み出す分子メカニズム」2015.8.12

③ Biological time and biological space, NIBB (岡崎)
Takayuki Suzuki 「Quantification of spatial and temporal deformation dynamics to understand whole organ development」2014.8.27

④ 第 4 6 回 日本発生生物学学会大会 (島根)
招待講演
Takayuki Suzuki 「Quantitative approach to understand whole organ morphogenesis」2013.5.28

〔図書〕(計 1 件)

① Secondary Smad1/5/8-dependent signaling downstream of SHH determines digit identity. Suzuki T. *New Principles in Developmental Processes* Eds. Kuroiwa A., Kondo H., Springer (2014)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://bunshi5-bio-nagoya-u.businesscatalyst.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木孝幸 (SUZUKI Takayuki)
名古屋大学・理学研究科・講師
研究者番号：40451629

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

森下喜弘 (MORISHITA Yoshihiro)
理化学研究所 QBiC・ユニットリーダー
研究者番号：00404062