

研究報告書

「指の個性の決定メカニズムの定量発生生物学による解明」

研究期間：平成 20 年 10 月～平成 24 年 3 月

研究者：鈴木 孝幸

1. 研究のねらい

私たちの体は胎児期における複雑な遺伝子のネットワークが協調的に機能する事によって形作られています。近年の発生生物学の手法は、主として遺伝学的に標的遺伝子を破壊したり、トランスジェニックの手法を用いて遺伝子を過剰発現する手法が用いられています。これらは個々の遺伝子の発生期における機能を解析する上で、多くの知見を与えてくれました。しかしながら、遺伝学的解析から得られた表現型は、遺伝子があるかないかを反映した一局面の結果であり、モルフォゲンとしての分泌因子の濃度勾配がどのように時空間的に組織に作用して似て非なる組織や器官が出来るのかなど、動的な知見はこれまでほとんど報告されていませんでした。本研究では、細胞外シグナルの受け手側の細胞内応答を luciferase(ルシフェラーゼ)の発光を用いた *in vivo* イメージングシステムを用いて組織レベルで解析することにより、時空間的な細胞群の応答のメカニズムから生物のかたち作りのシステムを個体レベルで生化学的に定量化・分析する、“定量発生生物学”を樹立する事をねらいとしました。具体的にはニワトリ胚後肢の発生をモデルシステムとして用い、動的な形態変化の定量化、特徴的な形態変化を誘導するシグナルの解析、発光イメージング法の確立と形の変化との関係を調べ、私たちの体がなぜこのような形をしているのか明らかにする新しい解析方法の樹立を試みました。

2. 研究成果

アクチビンや Sonic hedgehog(SHH)、Bone morphogenic protein(BMP)に代表される分泌因子は発生期において Morphogen(モルフォゲン)と呼ばれ、これらの分泌因子の濃度依存的に様々な異なった組織・器官が作られます。手足(肢芽)の発生においては *Shh* が肢芽の後側だけに偏って発現し、肢芽の前側に拡散する事で、SHH の濃度依存的に指の前後軸に沿った形の違いが産まれると考えられています。*Shh* の発現が全くない標的遺伝子破壊マウスでは親指しか指が形成されません。この結果は SHH があるかないかを反映した all or nothing の表現型であり、どれだけの量の SHH がどのくらい時間的に作用した結果それぞれ異なる 5 本の指の形の違いが生まれるのか、と言った動的な発生システムは明らかに出来ません。ヒトの疾患においても、このように機能するタンパク質の量的な違いによる疾患の表現型の差異が様々な見られる事から、今後の発生生物学・薬理学においては all or nothing の表現型に加えて、時空間的に細胞群がどれだけのシグナルを受け取っているか、という動的なダイナミズムを解析する必要があります。これを解析する為に、私はニワトリ胚後肢の発生における形態変化を定量的に解析することから研究を始めました。

ニワトリ胚後肢を用いた理由は、前肢と比べて全体の形が3次元的に複雑ではなく、さらには内臓器官のように体の中にあるのではなく外から観察が出来るという利点からです。これまで組織の細胞群が将来的にどの領域になるのかという Fate map の作成は、炭や蛍光色素を局所領域にインジェクションし、何日か後にラベルされた細胞群がどの領域に分布するのかを調べて来

ました。この方法の場合、ラベルされた領域が細胞増殖が激しい場所では広がりすぎて Fate map の精度が悪いという欠点がありました。また時間的に2点間だけの Fate map ではその間の細胞の挙動が分かりませんでした。本さがけ研究では理化学研究所発生再生科学総合研究センターの森下喜弘博士との共同研究で、数学的手法を用いて肢芽の細胞群の変形を解析する新しい手法を構築しました。

まず、従来までの発生のステージ表による発生段階を用いずに、肢芽の遠近軸の長さを測定し、絶対的な長さによるステージングを肢芽の長さが $500\text{ }\mu\text{m}$ の時から 12 時間おきに行いました。次に各大きさにおけるニワトリ胚後肢の肢芽に Dil/DiO の蛍光色素をタングステン針を用いてランダムに数十個単位の細胞集団をラベルし、写真撮影を行いました。そして 12 時間孵卵させた後、再び写真撮影を行いました。次に統計推定学的手法を用いて 12 時間における蛍光色素の行き先が最も説明出来る様な肢芽の組織の変形パターンを推定しました(図1)。その結果肢芽全体の変形パターンを解析出来る様になりました。この手法を用いて指原器が発生するまで解析を次々と行い、ダイナミックに変化していく肢芽の変形パターンを取得しました。背腹軸に沿った肢芽の厚み成分の情報は OPT スキャナーを用いて肢芽の3次元像を定量解析し、厚み成分の情報のみを Avizo を用いて抽出しました。このデータと2次元における肢芽の変形パターンのデータを合わせて肢芽の3次元における組織の変形パターンを定量的に解析しました。これまでの共焦点顕微鏡を用いた解析では見る事の出来ない超多細胞集団の組織の動的な変形パターンが解析出来たのは世界で初めての事です。

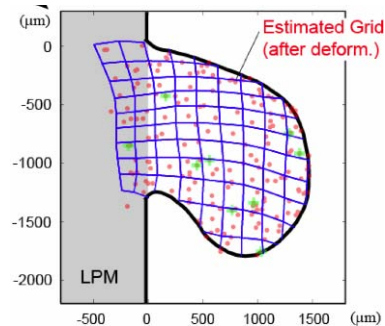


図1. $500\text{ }\mu\text{m}$ 時の肢芽の変形パターン

本解析からこれまで分からなかった様々なことが明らかになりました。まず肢芽の組織が伸長して行く時には、大別して3つの領域が時空間的に成長率が高い事が分かりました。特に小指の部分形成する肢芽の後側の領域は後述する SHH のシグナルが最も強く活性化する時期と領域で変形が大きくみられることが分かりました。このような解析手法を用いることで今後肢芽だけではなく他の組織や器官の形成過程が3次元で明らかになると期待されます。

次に遠近軸に沿った肢芽の成長パターンを見てみると、これまでは肢芽の先端部分の領域が特異的に細胞増殖が起こって伸長していくと考えられて来ましたが(プログレスゾーンモデル)、そのようなことはなく肢芽全体が均一に遠近軸に沿って伸長している事が分かりました。この結果は今まで考えられて来た学説を修正する必要があることを示しており、定量的に発生生物学を研究する意義の重要性を改めて認識できます。

本解析結果から、時空間的に肢芽の伸長には3つの特徴的な領域があることが分かりました。そこで次にそれぞれの肢芽の変形時にどのようなシグナルが必要であるかを調べるために FGF と SHH の阻害剤をアクリルビーズに吸着させ肢芽に移植する実験を行いました。その結果 FGF シグナルは肢芽の先端部分と後側の部分の増殖に必須である事が分かりました。また SHH シグナルは肢芽の後側の部分の増殖にのみ必須であることが分かりました。このようにこれまでの遺伝学的解析から肢芽の伸長に必要と言われていたシグナルが実質的に時空間的には限られた領域とタイミングで肢芽の特徴的な形を誘導していることが明らかとなりました。組織の特徴的

な変形パターンを抽出し、それに必要な細胞内シグナルの時空間的必要性を解析することは、今後脊椎動物の種による特異的な形の解明や、新生児の奇形のメカニズムの解明に繋がると期待されます。

次に FGF シグナルと SHH シグナルが実際に特徴的な形態変化が起こる時にどの領域で働いているのか調べました。FGFシグナルが細胞内で活性化するとErk1/2が活性化する事が知られています。そこでリン酸化 Erk1/2 の活性化を認識する抗体を用いた抗体染色を行いました。その結果肢芽の先端部分の領域の変形が大きいタイミングではリン酸化 Erk1/2 の活性化状態が強い事が分かりました。

そこで SHH シグナルについても同様に検討を行いたかったのですが、SHH シグナルの活性化を検出出来る抗体はこれまでの所ありませんでした。さらに SHH の受容体である Ptc1, Ptc2 や転写因子の Gli1,2,3 は肢芽内で非常に不均一に発現しており、SHH の分泌状態を抗体染色で観察するだけでは SHH シグナルがいつ何処でどれくらい活性化しているのか予測することさえ難しいことが分かりました。そこで私はこのような問題点を一気に解決するために転写因子 Gli1,2,3 の結合配列の下流にエメラルドルシフェラーゼを連結させたベクターを構築しました。これを用いると SHH シグナルが活性化された細胞だけエメラルドルシフェラーゼタンパク質ができ、基質のルシフェリンを加えることで細胞が発光します。またこの値を補正する為に CMV プロモーターの下流に赤色ルシフェラーゼを連結させたベクターも作成しました。これらの遺伝子をニワトリ胚の後肢に電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、上述した肢芽の長さにおいて SHH の活性化の状態を発光顕微鏡を用いて肢芽内で可視化・定量化する実験系を構築しました(図2)。その結果 SHH シグナルは肢芽が伸長するに従って細胞内での活性化量が大きくなる事が分かりました。さらには小指が出来る肢芽の後側の領域の成長率が大きい時にシグナルの活性化量も大きい事が分かりました。このように本システムを用いることにより生体内において特定の細胞内シグナル伝達の強度を可視化・定量化出来る様になりました。このシステムは赤色ルシフェラーゼで厚み成分の細胞量も補正しているため異なるサンプル間での比較が出来るのが大きな利点です。

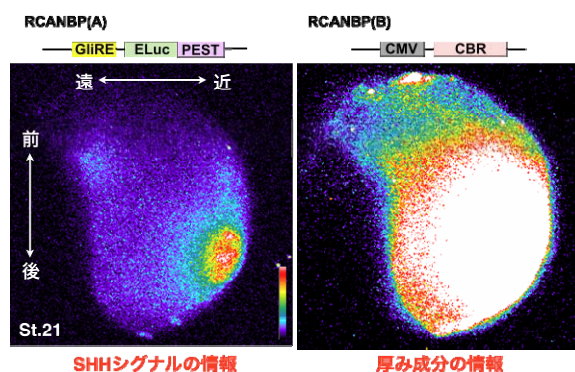


図2. 肢芽における SHH のシグナルの活性化量と厚み成分の情報を含む赤色ルシフェラーゼの発光量

以上の様に本さがけ研究で構築した、動的な形態変化を定量化する新しい手法と、形態変化を誘導する生化学的シグナルの可視化・定量化技術は、今後は肢芽だけではなく組織再生など特定の組織を正しい大きさや形に成長させるための研究にも応用される事が期待されます。現段階で形態変化が生化学的なシグナル伝達の強度でどれくらい説明出来るかさらに解析中です。

SHH のシグナルが正しい時期に正しい場所で働かないと、新生児の奇形につながる事が知られています。前側多指症は親指になる領域に本来は発現しない SHH が異所的に発現した結果2本の親指が形成されてしまう新生児の奇形です。本さがけ研究の間に、ニワトリの一種である烏骨鶏がこの SHH のプロモーターに1塩基のポイントミューテーションがあり、このため親指が1本多い前側多指症のニワトリであることを明らかにしました(図3)。烏骨鶏は古来より中国の王宮で不老不死の源である霊鳥として食されて来ました。現代においても高血圧や生活習慣病の漢方薬として用いられています。本研究で烏骨鶏の特徴である多指のメカニズムが明らかになった事は、烏骨鶏が他のニワトリと異なる仕組みを解明する手がかりとなる事が期待されます。

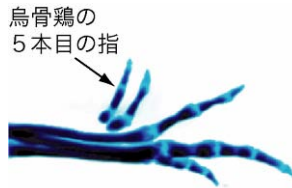


図3. 烏骨鶏の5本目の指

さらに、東京工業大学の半田宏先生、伊藤拓水先生との共同研究により新生児の手足に重篤な奇形を誘導するサリドマイドのターゲットタンパク質 CRBN の機能解析を行い発表しました。この研究によりサリドマイドは肢芽の伸長時に FGF10 の発現を低下させて伸長阻害を誘導することが明らかとなりました。

3. 今後の展開

本さがけ研究で構築した、動的な形態変化を定量化する新しい手法と、形態変化を誘導する生化学的シグナルの可視化・定量化技術は、今後は肢芽だけではなく組織再生など特定の組織を正しい大きさと形に成長させるための研究にも応用される事が期待されます。

今後はまずニワトリ胚の前肢についても同様の解析を行い、似て非なる組織である前肢と後肢の違いがどのような発生システムの違いで生み出されるのか解析します。また肢芽だけでなく、脳や内臓など他の組織についても本解析手法を応用したいと考えています。このような基礎データは将来的に試験管内で特定の臓器だけ培養して大きくしたり、その時に形を制御して行く上での判断材料になることが期待されます。

4. 自己評価

本さがけ研究を始める時に予定していた発光イメージングシステムの構築と形態形成の定量化の手法について構築出来ました。またこの解析を行っている時に遠近軸形成の仕組みや将来の指原器の形成位置など新たな発見が多数ありました。これは当初の予想を超えるものでした。最終的に解析しなかった SHH シグナルが各指の指原器になる細胞群でどれだけ受け取るシグナルの量が異なっているのかについて、研究期間内に解析するには至りませんでした。この点だけ予定期間内に出来ませんでしたが、データの取得は行ったので、今後の解析で各指原器がどれだけモルフォゲンとしての SHH のシグナル量を需要しているのか計算したいと思っています。

5, 研究総括の見解

実験発生学的手法と統計学的手法を組み合わせ、超多細胞集団の動的な形の変化を3次元で定量的に計測する新しい独自の手法を構築し、定量発生生物学の進展に貢献したことは高く評価出来る。また、共同研究からサリドマイドは肢芽の伸長時に FGF10 の発現を低下させて伸長阻害を誘導することを明らかにしたことは、基礎研究の成果から社会への貢献へとつながりよい事例となっている。さらに、社会への還元を意識して、定量発生生物学を進展させることを期待している。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Suzuki T. et al "Identification of spontaneous mutations within the long-range limb specific Sonic Hedgehog enhancer (ZRS) that alter Sonic Hedgehog expression in the chicken limb mutants oligozeugodactyly and Silkie Breed "Developmental Dynamics, 240 巻 1212-1222 (2011).
2. Ito T, Ando H, Suzuki T., Ogura T, Hotta K, Imamura Y, Yamaguchi Y, Handa H. "Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity."Science 327 巻 1345-1350 (2010)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

【主要な学会発表】

1. 2011 年 3 月 4 日 細胞システムコロキウム:理論生物学にて、「組織変形による肢芽形成」の演題で、発表した。
2. 2010 年 7 月 14 日 11th International Conference of Limb Development and Regeneration, College of William and Mary, USA にて"Quantification of Morphogen activity in the developing chick limb bud"の演題でポスター発表した。
3. 2010 年 6 月 22 日 International Society for developmental biology, 京都市にて"Quantification of Morphogen activity in the developing chick limb bud"の演題で発表した。
4. 2010 年 4 月 15 日 Fallon Symposium, Madison, USA にて"Role of GDF11 during hindlimb field determination"の演題で発表した。
5. 2009 年 9 月 7 日 第16回国際発生生物学会・エジンバラ(イギリス)にて"Molecular profile and functional role of the PFR to specify each digit identity"の演題でポスター発表した。
6. 2009 年 1 月 31 日 Suzuki T., Ogura T. "Electroporation into the limb: beyond misexpression" Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology, p85-p97(2009)

【受賞】

1. 2011 年 2 月 23 日 手島精一記念研究賞「サリドマイドによる催奇性の主要な標的分子の同定」東京工業大学 (受賞者氏名: 伊藤拓水、安藤秀樹、鈴木孝幸、小椋利彦、堀川健太郎、今村佳正、山口雄輝、半田宏)