

令和 2 年 3 月 24 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 721

氏 名 柳田 絢加

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ケンブリッジ大学 （国名：英国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
キメラ胚を用いたエピプラスト運命決定における細胞骨格因子の機能解析

3. 派遣期間：平成 30 年 2 月 27 日 ～ 令和 2 年 2 月 26 日

4. 受入機関名及び部局名

Wellcome -MRC Cambridge Stem Cell Institute, University of Cambridge

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

[研究の背景と目的]

報告者はこれまでに肝幹細胞移植やキメラ胚を作製した際、ホスト組織に注入した細胞が本来存在すべき場所へ行かず発生過程で排除されること、あるいはホスト個体が正常発生しないことを経験した。このことは、適切な細胞が、適切なタイミングで、適切な場所へ配置されることが胚発生に重要であることを示唆している。しかし、生体内での細胞の移動・分化メカニズムは未だ明らかでない。そこで少数の細胞(~150細胞)で構成され*in vitro*で発生過程を観察可能なマウス初期胚を用い、英国ケンブリッジ大学 Stem Cell Instituteの発生生物学者Prof Jennifer Nicholsと生物物理学者Dr Kevin Chalut、UCL大学の生物物理学者Prof Ewa Paluch指導のもと、内部細胞塊(ICM)細胞の分化、sorting機構の研究を行った。

初期胚は受精後、分裂を繰り返し胚盤胞へと発生する(図1A)。初期の胚盤胞は内部細胞塊と、胎盤の源である栄養外胚葉とで構成される。胚盤胞の発生に伴い、内部細胞塊は原始内胚葉(PrE)またはエピプラスト(EPI)に分化する。着床後、PrEは卵黄嚢などの胚体外組織、EPIは体へと分化する。EPI/PrEへの分化は、①内部細胞塊中にEPI/PrE前駆細胞がランダムに出現、②各EPI/PrE前駆細胞が移動、③構造的に異なる2つの組織に分かれ、EPIまたはPrEへ運命決定という流れで進む(図1B)。

正常な胚発生には適切なタイミングで、適切な場所に、適切な細胞が移動することが必要だが、EPI/PrEのsorting機構は明らかになっていない。EPI/PrEの分化にはFGFシグナルやNanogと

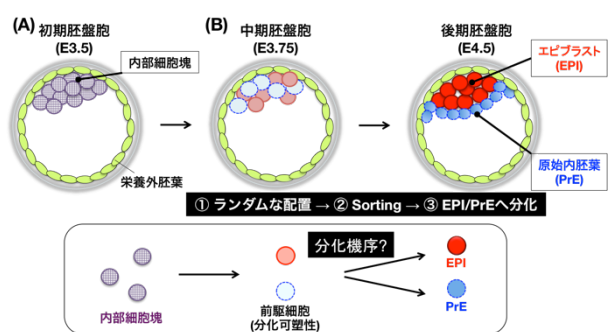


図1. 胚盤胞の分化過程

Gataの発現量バランスが関与するとされてきた[Chazaud et al., 2006, Nichols et al., 2009, Singh et al., 2007]。しかし、遺伝子欠損マウスを用いた解析や数理モデルにより、これらの現象だけではEPI/PrEへの運命決定を説明できないことが明らかになっている[Krupinski et al., 2011, Yamanaka et al., 2016]。近年、細胞の物理性状変化と初期胚発生の関与が報告されているが[Maitre et al., 2012など]、EPI/PrEの分化・sorting過程における物理性状の関与は明らかではない。そこで、報告者は初期胚における細胞骨格因子と細胞分化・sortingの関係性を物理性状の観点から解明することを目指し、本研究課題に取り組んだ。

[研究の成果]

(1) EPI/PrEの物理性状差の探索

・EPI, PrE間の物理性状差はいつ生じるか

胚盤胞の成熟過程において、EPI, PrE間に物理性状差がいつ生じるか明らかにする為、E3.75 EPI, PrEのシングルセル遺伝子発現解析を行った。既存のE3.5 ICM細胞、E4.5 EPI, PrE遺伝子発現データ[Mohammed et al 2017]と合わせ、EPI, PrEの遺伝子発現を比較した。その結果、E3.5, E3.75, E4.5胚のICM細胞間では、highly variable細胞骨格系遺伝子の数はE3.75胚で最も多く、EPI, PrE間で細胞骨格系遺伝子の発現差が見られるのは、E3.75以降であることがわかった(図2)。

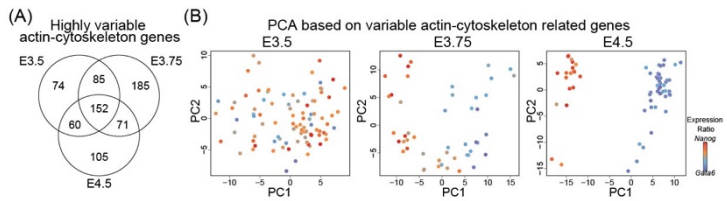


図2 EPI and PrE begin to segregate at E3.75.

(A) Venn diagram of the number of highly variable actin-cytoskeleton genes in E3.5, E3.75 and E4.5 ICM cells. (B) PCA plot of E3.5, E3.75 and E4.5 ICM cells based on the highly variable cytoskeletal genes (E3.5: $n = 371$, E3.75: $n = 493$, E4.5: $n = 388$, log₂ FPKM > 1, logCV² > 0.5) coloured according to the ratio of Nanog to Gata6 expression. Each dot represents a single cell of ICM cells.

・EPI/PrE sortingにおける細胞接着・細胞極性・細胞浸潤(migration)関与の検討

細胞のsortingには細胞接着、細胞極性、細胞浸潤が関与することが知られている。そこで、EPI/PrEのsortingにおけるこれらの関与を検討した。

胚盤胞で主に発現している接着因子はE-cadherinであるが、mRNA, タンパク質ともにE3.75 EPI, PrE間ではE-cadherinの有意な発現量差はみられなかった。また、E-cadherinはEPI/PrEのsortingには必要ではないことが近年報告された[Filimonow et al., 2019]。

細胞極性関連分子aPKCをノックダウンするとPrEのsortingに異常が起きることが報告されている[Saiz et al., 2013]。しかし、その詳細なメカニズムは未だ明らかでない。報告者はaPKCの発現(局在)はEPI/PrEのsortingがほぼ完了するE4.0以降に差が出ること、aPKC阻害剤(Go6983)をEPI, PrEに添加すると、両細胞ともにamoeboid様の突起を盛んに示すこと、aPKCをノックダウンしたES細胞は野生型のES細胞にくらべ、胚盤胞に注入した際より迅速にエピブラスト部位に移動(寄与)することを見出した。このことから、aPKCのノックダウンはPrEの極性形成(上皮化)のみならず、細胞の浸潤能に影響を及ぼすことで、sorting異常が引き起こすと考えられる。

UCLのDr Ireneとの共同研究により、3D confinement device [Bergert et al., 2015]を用い、EPI, PrEの浸潤能を測定した。その結果、EPI, PrEで浸潤能を示した細胞は5%以下であった。

以上のことから、細胞接着、細胞の極性、細胞浸潤はEPI/PrE sortingの制御機構ではないと示唆される。

・EPI, PrE間のcell-cell affinity比較

8細胞期胚では、各割球の細胞間親和力(cell-cell affinity)の違いが割球の移動(胚の内側に移動するか、外側に留まるか)を制御していることが知られている[Maitre et al., 2016]。そこで、EPI/PrEのsortingにもcell-cell affinity差が関与しているのではないかと仮説を立てた。Cell-cell affinityは3つの力、Cell adhesion, Cell surface tension, Interfacial tensionのバランスで成り立っている(図3A)。Cell adhesionの力は他の2つの力に比べ極めて小さいことが既に知られている[Amack et al., 2012]。そこで、EPI, PrE間でcell surface tension, interfacial tensionの違いがあるか検討した。

UCLのDr Cassaniとの共同研究により、原子間顕微鏡を用いシングル細胞レベルでEPI, PrEのcell surface tensionを測定した。しかし、EPI, PrE間に有意な差は見られなかった。

次に、EPI, PrE間でinterfacial tensionを比較したInterfacial tensionを直接計測することは困難である為、E3.75のPDGFRa::H2BGFPマウス胚盤胞[Hamilton et al., 2013] から免疫手術法によりEPI, PrEを単離し、EPIとEPI, PrEとPrEのダブルットを作りダブルット間の角度(contact angle)を比較した(図3A, B)。その結果、PrEダブルットはEPIダブルットよりもcontact angleが広いことを明らかになった(図3C)。Interfacial tensionが強い細胞は狭いcontact angleを、cell-cell affinityが弱い細胞は広いcontact angleを持つことから(図3B)、PrEはEPIに比べInterfacial tensionが弱いこと明らかになった。以上の結果から、cell adhesion, surface tensionにはEPI, PrE間で有意な差がないことから、PrEはEPIに比べcell-cell affinityが弱いことが明らかになった。

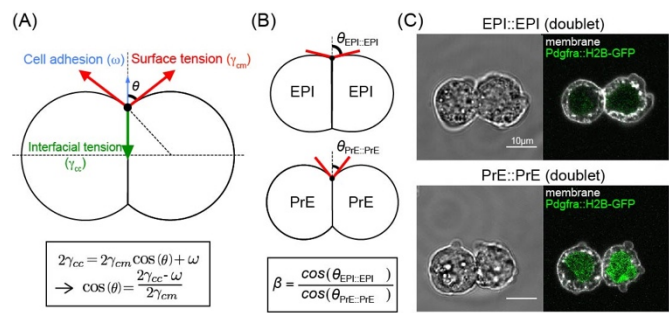


図3 Cell-cell affinity of EPI is higher than PrE (A) Schematic of two ICM cells forming a doublet. The shape of the doublet is determined by the balance of surface tensions γ_{cm} at the cell-medium interface, interfacial tension γ_{cc} at the cell-cell interface, and cell-cell adhesion force ω . Noting that ω is generally considered to be small compared to the surface tension, and can generally be neglected. (B) Schematic of pEPI or pPrE cells homotypic doublet showing how β is used as a measure for cell-cell affinity. $\theta_{EPI:EPI}$ shows the EPI::EPI external contact angle, and $\theta_{PrE:PrE}$ shows the PrE::PrE external contact angle. (C) Representative images of a EPI (EPI::EPI) and a PrE (PrE::PrE) homotypic doublet, formed by dissociated single cells from E3.75 *PDGFRa::H2B-GFP* blastocysts. PrE expressed *PDGFRa::H2B-GFP* at nuclei (green). Plasma membrane labelled with a membrane dye, CellMask Deep Red (false-coloured white).

・ EPI, PrE間におけるcell surface fluctuation差の発見と制御シグナル

報告者はEPIとPrEでは、細胞表面の動き (cell surface fluctuation) に違いがあることに気がついた。EPIとPrEの単一細胞及び、ICM塊のライブイメージングにより、PrEはEPIに比べ細胞表面が激しく突出と退縮 (blebbing) を繰り返すことを明らかにした(図4)。

ICM細胞からEPI, PrEへの分化・成熟にはFGFシグナルが関与することが知られており[Nichols et al., 2009, Yamanaka et al., 2010]、PrEではEPIに比べpERKが高発現している。そこで、FGFシグナルがcell surface fluctuationも制御しているのではないかと仮説を立て検証を行った。その結果、FGF2を短時間(<45分)添加したEPIではcell surface fluctuationの増加が、ERK阻害剤であるPD03を短時間(<45分)添加したEPI, PrEではcell surface fluctuationの減少が起こることを見出し、FGFシグナルがcell surface fluctuationを制御することを明らかにした。

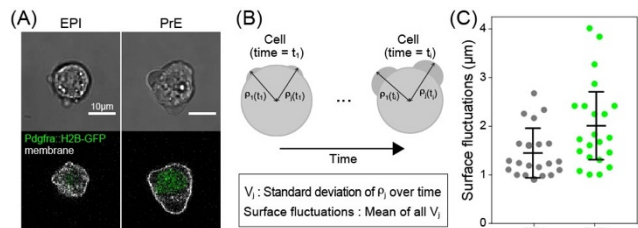


図4 PrE cells have higher FGF-mediated surface fluctuations than EPI. (A) Representative images of dissociated E3.75 EPI and PrE cells from *mTmG^{+/+}; PDGFRa^{+/+}; H2B-GFP^{+/+}* mice, showing that PrE typically exhibit more blebbing than EPI. PrE expressed *PDGFRa^{+/+}; H2B-GFP^{+/+}* at nuclei (green). Plasma membrane labelled with membrane dye, CellMask Deep Red (white). (B) Schematic showing how surface fluctuations are calculated. (C) Single E3.75 EPI and PrE surface fluctuations. The amplitude of surface fluctuations was calculated using images every ten seconds over a total of five minutes and normalised by the total mean of ICM cell surface fluctuations over all time points and conditions.

(2) コンピューターシミュレーションを用いたEPI/PrE sorting因子の検証

(1)の実験で得られた物理性状差がEPI/PrEのsortingを起こすか検証する為、Dr Revellとの共同研究によりコンピューターシミュレーションを行った[Revel et al., 2019]。 (1)で得られたEPIとPrE間のcell-cell affinity差、surface fluctuation差を数値化し、EPI/PrEのsortingをシミュレーションを行った結果、測定値で得られたcell-cell affinity差だけではEPI/PrEのsortingを完了できないことが分かった。しかし、cell-cell affinity差とsurface fluctuation差の両方があれば、測定値であっても、EPI/PrEのsortingを完了できることが明らかになった。このことから、EPI/PrEのsortingにはsurface fluctuation差が必要であることが示唆された。

(3) In vitro, ex vivo系を用いたcell surface fluctuationによるsortingの検証

シミュレーションで明らかになった現象が、実際に細胞レベルで起きるかES細胞を用いたin vitro sortingアッセイ系で検証した。Ezrinはアクチンフィラメントと細胞膜間の代表的な架橋タンパク質である。そこで、EPI, PrE間のcell surface fluctuation差を模倣する為、Doxycycline誘導型constitutive Active form Ezrin(CA-EZR)-mCherry強制発現ES細胞を作製した。野生型ES細胞と比べ、CA-EZR強発現ES細胞は細胞表面の動きが静かでEPI様の弱いcell surface fluctuationを、CA-EZR弱発現ES細胞は細胞表面の動きが激しくPrE様の強いcell surface fluctuationを示した。

そこで、野生型ES細胞とCA-EZR ES細胞を混ぜ細胞塊を作り、Doxycycline添加下で細胞のsorting起こるか検証した。その結果、CA-EZR強強発現ES細胞は細胞塊の内側に、CA-EZR弱強発現ES細胞は細胞塊の外側に、野生型ES細胞はその間にsortingすることが明らかになった。

ERM(Ezrin, Radixin, Moesin)をノックダウンした細胞はcortical tensionへの影響は殆ど見られないが、激しいcell surface fluctuationを示す[Diz-Muñoz et al., 2010]。そこで、野生型ES細胞、またはERMをノックダウンしたES細胞をE3.25-E3.5胚盤胞の腔に注入し、E4.0までキメラ胚を*in vitro*培養後、注入したES細胞が内部細胞塊の内側、胚盤腔側のどちらに位置するか観察した。その結果、野生型ES細胞に比べ、ERMをノックダウンしたES細胞では胚盤腔側に位置する細胞有意に多く見られた。これらの結果は、(2)のシミュレーション同様、surface fluctuation差が細胞のsortingを制御しており、cell surface fluctuationが激しい細胞が細胞塊の外側に位置することを示した。

(4) なぜPrEではEPIに比べ激しいcell surface fluctuationが起こるのか

Cell surface fluctuationは主に3つの要因で起こりうる。細胞膜とアクチンフィラメントの架橋(membrane tension)が局所的に弱く、細胞膜がcortexから離れ突出する。あるいは、cortical tensionが高い、またはアクチンメッシュワーク構造が不安定であるために、cortexに穴が空き細胞膜が突出する。報告者は(1)の計測でEPI, PrE間ではcortical tensionに有意な差がないことを既に見出している。そこで、残りの2つの要因について検討した。

UCLのDr Bellyとの共同研究でoptical tweezersを用いEPI, PrEのmembrane tensionを計測した。その結果、PrEはEPIよりも有意に高いmembrane tensionを持つことが明らかになった。また、EPIにFGF2を添加するとmembrane tensionの増加が見られた。通常、membrane tensionが低い細胞ほど、細胞膜の突出(blebbing)が多いと考えられており、報告者が得られた結果はこれまでの報告と食い違うように思われた。そこで、ES細胞を用い、長時間繰り返しmembrane tensionを計測したところ、blebbingの数とmembrane tensionのvariabilityには相関があることが明らかになった。

ケンブリッジ大学のDr Petersとの共同研究で、超解像度顕微鏡(STORM)を用いEPI, PrEのcortical actinの構造を調べた。その結果、PrEではEPIに比べ1細胞内におけるcortical actinの厚みに不均一性が見られることがわかった。しかし、FGF2の添加ではEPI, PrEともFGF2非添加に比べ、cortical actinの厚みの不均一性に有意な差は見られなかった。

これらの結果から、PrEでmembrane tensionの増加やアクチンメッシュ構造の不均一性が生じるために、EPI比べcell surface fluctuationが激しくなっていると考えられる。しかし、詳細な分子機構は今後さらに研究が必要である。

[結論]

本研究により、一細胞レベルでのEPIとPrEの様々な物理性状が明らかになった。その結果、PrEはEPIに比べ、cell-cell affinityが弱く、cell surface fluctuationが激しいことが明らかになった。コンピューターシミュレーション、cell surface fluctuationを遺伝子操作で変化させたES細胞、キメラ胚の観察などにより、cell-cell affinityとcell surface fluctuationの違いでひとたび内部細胞塊の外側に辿り着いた細胞が内側へと移動しにくく、そのまま胚盤腔側に留まりsortingが起こすことを明らかにした。PrEではEPIに比べFGFシグナルが活性化されており、FGFシグナルによるmembrane tensionの増加やPrEでのアクチンメッシュワークの不均一性によりPrEではEPIに比べcell surface fluctuationが増長していることが示唆された。以上のことより、今まで未解明であった、EPIとPrEのsortingメカニズム、FGFはEPI, PrEの分化だけではなくsortingにも関与していることが明らかになった。

[達成度]

多くの共同研究者に恵まれ、マウス胚をもちいた*ex vivo*解析、マウスES細胞を用いた*in vitro*解析、細胞の様々な物理性状の計測、コンピューターシミュレーションといった生物・物理・数学の分野横断型研究を実施できた。得られた研究成果は原著論文としてまとめ、現在リバイスのレビュー結果待ちである。