

課題番号 22

肢芽をモデルとした器官発生の形態変化を 定量的に解析する新しい手法の開発

[1] 組織

代表者：鈴木 孝幸
(名古屋大学大学院理学研究科)
対応者：舟橋 淳一
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：河村 和輝 (名古屋大学大学院
理学研究科)

研究費：物件費 42,505 円，旅費 256,970 円，
その他 525 円

[2] 研究経過 (以下10.5ポイント)

近年の分子生物学の進展により、私たちの体の器官の発生に必須の重要な遺伝子のほとんどが明らかになって来た。しかしながら“何故私たちの体や器官がこのような形をしているのか？”と言った器官全体の形が出来上がる仕組みを説明することは未だに全く出来ない。これは細胞レベルの解析から器官全体の形を理解するために大きなギャップがあるからである。本共同研究では、加齢医学研究所が所持する OPT スキャナーを用いて3次元で器官の形を測定することにより、細胞集団 (組織レベル) から3次元で器官全体の形態変化を解析する新しい手法の開発を目指して研究を行った (図1)。

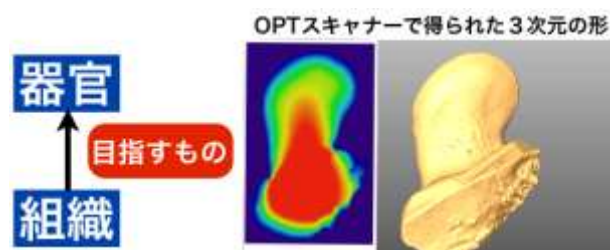


図1：研究の目標と OPT スキャナーで得られた胎児の足の3次元画像

以下、研究活動状況の概要を記す。

加齢医学研究所の共通実験機器室が所持している OPT スキャナーは日本で3台しかない3次元で発生期の胚の3次元画像を取得出来る装置である。本研究では、研究代表者と同じくニワトリ胚を実験に用いている加齢医学研究所の舟橋淳一先生の研究室で OPT スキャナーで撮影するための試料の準備を

行い、共通実験室で撮影を行った。事前に舟橋先生と実験についての打ち合わせを綿密に行い、名古屋大学で胎児の採取、固定を行い加齢医学研究所に持参した。舟橋先生には試料の作成に必要な試薬を準備して頂き、実験室で試料の OPT スキャナーの台座への取り付け及び透明化処理を行った。分担者の河村と2回加齢医学研究所に伺い、OPT スキャナーでの撮影、Avizo ソフトウェアを用いてデータの解析を行った。実験結果は舟橋先生に報告し、ディスカッションをして頂いた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、胎児の発生過程において3次元での定量的な変形を解析する手法の構築に成功した。これまで形態形成の研究は写真で撮影した2次元の画像を元に議論がされて来た。この中で細胞集団の場所は DiI などの蛍光試薬を組織に注入し、その軌跡がどの場所に移動するかで議論がされて来た。しかしこの方法では3次元の器官の一部の細胞群の変化の情報しか得られない。そこで本実験では、ニワトリ胚の肢芽に蛍光色素を多点に注入し、器官全体の変形を理解することを試みた。ラベルがされていない細胞集団は赤池ベイズ推定法という統計学的情報量基準を用いて推定し、補完した。この補完方法が正しいかどうかは新たな細胞集団の変形が、補完した情報と正しいか検定を行い、数学的に極めて確かであることを検定した。さらに OPT スキャナーのデータから得られた組織の厚み成分の情報を、共通機器室にある Avizo というソフトを用いて計算し、抽出した。このデータから器官全体の中の3次元のある最終集団がどのように変形していくのかを定量的に理解することが出来る様になった (図2)。

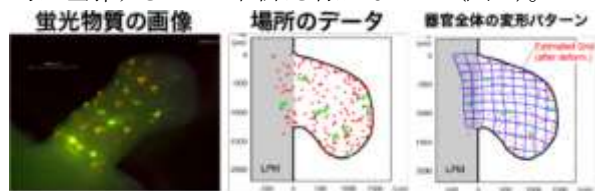


図2：細胞集団から器官全体の变形パターンを解析

する方法

第2に、3次元の器官の形態変化が時系列で明らかになったことからこれまで未解明だった指原器の形成メカニズムが明らかになった。私たちの指は胎児期に指原器と呼ばれる軟骨凝集塊が形成され、その後指間部が細胞死を起こして消滅し、5本の独立した指が出来る。指が作られる時に指原器の細胞集団が膨らんで大きくなって出来るのか、また指間部の部分の厚みがなくなり、結果として指原器の細胞集団が集まって軟骨凝集塊を形成している様に見えるのかは明らかではなかった。今回、名古屋大学で採取したニワトリ胚後肢の指原器をOPT スキャナーを用いて解析した。Avizo のソフトを用いる事により、3次元画像の重ね合わせが出来るため、指間部の領域がどのように変形して行くのかを時系列データを重ねて表示する事が出来た(図3)。

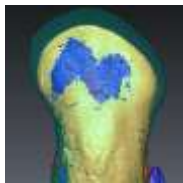


図3：指間部の3次元での形態変化
紫色が最も若い後肢、黄色が少し大きくなった後肢、青い部分が露出しており若い後肢の方が厚いことが分かる。

この結果、指原器が一番最初に作られて行く時の細胞集団の挙動は後者であることが明らかとなった。これは、これまで切片などを作成した組織学的解析からは明らかに出来なかったことである。

第3に、劣性遺伝で多指症を発症するウズラの変異体である HMM 変異体が3次元的にどのように野生型と異なるのかを明らかにすることが出来た。HMM 変異体は現段階で原因遺伝子不明の自然変異型のウズラの家系である。この家系では胎児期に手足が形成され始めた直後から野生型と比べて手足が大きく、最終的には指の軟骨形成が異常になる。この変異体ではいつでもどのような形態変化が最初に誘発されるのか全く分かっていなかった。今回 OPT スキャナーを用いて解析した結果、HMM 変異体の手足は、前後軸の幅が大きくなるのと同時に背腹軸報告に肢芽全体が膨らむことが分かった。この結果は HMM 変異体の肢芽では細胞増殖が異常活性化しておりあらゆる方向に細胞が増殖していることを示唆している。Avizo ソフトを用いて野生型の肢芽と形態を比較した結果、将来の指が出来る領域では前後軸に2倍以上の幅になっていることが判明した。以上の形態変化の結果を総合すると HMM 変異体では SHH と呼ばれる分泌因子のシグナル伝達が正常に行われていないマウスの変異体と表現型が似ている事が判明した。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、これまで全く解析方法のなかった

器官全体の形態形成を3次元で定量的に解析出来る手法を考案したものであり、今後他の生物や器官の解析への応用が大きい期待出来る。

このように器官全体がどのように構築されて行くのかと言う3次元のデータは将来器官再生などの再生医療時に試験管内の臓器をどのように育てて行くのか研究する時の基礎データとなることが予想され、今後の発展が期待される。現段階で一つの臓器や器官の細胞集団がどのように変化して形をつくるのか定量的に解析出来た報告はない。このような観点からも本研究は発生学の研究における新しいブレイクスルーをもたらしたと言える。

本共同研究から得られたデータを元にさらに研究が進展し、現在理化学研究所の森下善弘博士と他の臓器の定量的な形態形成についての新しい研究に発展した。また第1回ウズラ研究集会で本研究成果を発表し、多くの研究者から興味を持って頂いた。さらには名古屋大学鳥類バイオサイエンス研究センターと共同研究を開始し、HMM 変異体の機能解析にも着手しはじめた。

指研究においては、心臓に次いで2番目に多い新生児の形態異常である手足の先端の領域形成のメカニズムの解明が進展することが期待される。新生児においては多指や合指は1/1000-2000の確率で見られる突然変異であるがその発症機構は分かっていないものが非常に多い。今回の3次元解析から得られた HMM 変異体の情報は、今後の多指研究に役立つ重要な結果であると考えられ、今後の発展が期待される。

このように3次元の器官全体の形を定量的に解析出来る OPT スキャナーは日本に3台しかないのと、現段階で購入出来る会社がないことから加齢医学研究所が所持する機器は日本国内において極めて貴重な実験機器であると言える。海外の研究グループは OPT スキャナーを利用して胎児の3次元画像のアトラスを作ろうと言う動きがあり、日本国内においては3次元画像の研究への取り込みが遅れているのが現状である。各学会においても OPT スキャナーを用いた器官全体の形を見ている研究は本共同研究しかなく、日本の学術研究においても本研究のインパクトは大きいと考えられる。

[4] 成果資料

現段階で、論文投稿中のものが2本、論文作成中のものが1本あり掲載が決まり次第ご報告致します。