トピックス

自己組織化により生じる多細胞からなる構造の人工的な形成

戸田 聡

Department of Cellular and Molecular Pharmacology, Center for Systems and Synthetic Biology, University of California San Francisco

1. はじめに

多細胞生物の体は1つの受精卵からはじまり、細胞が多様な細胞種へ分化し、増殖や細胞死、パターン形成などを繰り返すことで、体を構成する組織や臓器が自律的に形成される。複雑な構造をした組織や臓器を形成するために必要な遺伝プログラムは、各細胞のゲノム DNA 上に記録されている。近年のモデル生物を用いた遺伝学や発生生物学の研究により、発生時に機能する遺伝子や細胞の動態が明らかにされてきた。細胞が臓器などの巨視的な構造を自律的につくり出すためのアルゴリズムを理解するためには、上述の研究に加え、人工的な遺伝プログラムを設計し、実際に細胞による組織形成過程をつくり出して検証する必要がある。

細胞は、受容体を通して周囲の環境を感知すると、細胞内分子によるシグナル伝達を介して、新たな遺伝子発現や形態変化をアウトプットすることができる。ある細胞のアウトプットを別の細胞がインプットとして感知することにより生じる細胞間コミュニケーションは、細胞が集団行動をとり多細胞構造を形成するために重要である。しかし、どのような細胞間コミュニケーションを行えば、どのような形状の組織構造が形成されるのか、については不明確なままであり、またこの問いを体系的に検討する手法もなかった。そこで、私たちの研究室では、細胞間接触によるシグナル伝達を行う Notch 受容体を改変し、インプットとして認識する分子とアウトプットとして発現する遺伝子を自在にプログラムすることができる人工受容体“synthetic Notch receptor (synNotch)”を開発した(図 1A)¹⁾。本研究では、synNotch 受容体を用いて人工的な細胞間コミュニケーションを設計し、細胞に自律的に複雑な構造を形成させることをめざした^{2),3)}。

2. 人工的な細胞間コミュニケーションの設計

synNotch を発現する“Receiver 細胞”は、synNotch のリガンドを発現する“Sender 細胞”と接触すると、synNotch が活性化され、特定の遺伝子の発現を誘導することができる。そこで、本研究では、synNotch を用いた細胞間コミュニケーションにおいて、3 種類の

図 1
(A) synNotch システム。Notch 受容体は膜タンパク質 Delta と結合すると、張力により構造変化を起こし、細胞膜付近でプロテアーゼにより切断され、細胞内ドメインが核へと移行し遺伝子の転写を引き起こす。synNotch は、Notch 受容体の細胞外ドメインを任意のリガンドを認識する配列（一本鎖抗体など）に置き換え、細胞内ドメインを特定の転写因子に置き換えることにより、任意のリガンドを認識して任意の遺伝子の発現を誘導することができる。(B) synNotch システムを用いた人工の細胞間コミュニケーションの設計。細胞接着による細胞の配置換えや新たな synNotch リガンドの誘導により、新たな細胞間シグナル伝達を引き起こす。

Synthetic Morphogenesis: Programming Self-organizing Multicellular Structures Using Engineered Cell-cell Signaling Cascades

Satoshi TODA

Department of Cellular and Molecular Pharmacology, Center for Systems and Synthetic Biology, University of California San Francisco

アウトプット: ①細胞の空間配置換えを引き起こす細胞接着分子カドヘリン^{4), 5)}, ②細胞タイプを示す蛍光タンパク質, ③新たなシグナル伝達を引き起こす synNotch リガンド, を誘導することにより, 細胞が高次構造へ自己組織化するプログラムを設計した (図 1B)⁶⁾. このプログラムをもとと特定の構造を形成する能力をもたないマウス線維芽細胞株 L929 に導入した. L929 細胞は, 超低接着性表面の丸底ウェル上では, 細胞どうしが中央に集まり, ゆるく結合した細胞塊 (スフェロイド) を形成する. そこで, L929 細胞が人工的な形態形成プログラムによりどのような構造を形成するかを共焦点蛍光顕微鏡により観察した.

3. 対称および非対称な多層構造の作製

まず, Sender 細胞が synNotch を介して Receiver 細胞に Eカドヘリンおよび GFP の発現を誘導する細胞間コミュニケーションを設計した (図 2A 上). L929 細胞はもともと CD19 を発現していないため, Sender 細胞にはリガンドとして CD19 を発現させ, Receiver 細胞には CD19 を認識する synNotch を用いた. これらの細胞を 100 個ずつ共培養したところ, Receiver 細胞は Eカドヘリンを誘導して互いに強く結合し, スフェロイドの中心部に GFP を発現するコアを形成した. 一方, カドヘリンを発現しない Sender 細胞はコアの周辺に押し出され, 最終的に 2 層構造が形成された (図 2A 下).

より複雑な構造を形成するため, 最初の細胞間シグナルで 2 層構造を形成した後に, おくれて Receiver 細胞から Sender 細胞へシグナル伝達が起こるシグナルカスケードを設計した (図 2B 上). まず, Sender 細胞が CD19 を介して, Receiver 細胞の synNotch を活性化し, 高発現の Eカドヘリンおよび GFP リガンド (GFP と膜貫通ドメインの融合タンパク質) の発現を誘導する. その後, 誘導された GFP リガンドが Sender 細胞上の synNotch を活性化し, 低発現の Eカドヘリンと mCherry を誘導する. その結果, 最初のシグナル伝達により, Eカドヘリンおよび GFP リガンドが誘導された Receiver 細胞がコアを形成し, Sender 細胞は外層を形成した. おくれて GFP リガンドによる 2 段階目のシグナル伝達により, コアに接する Sender 細胞のみが活性化され, Eカドヘリンと mCherry を発現した中間層が形成された. 最終的に, Sender 細胞および Receiver 細胞の 2 種類の細胞から, コア, 中間層, 外層からなる 3 層構造が自己組織化された (図 2B 下).

動物の発生過程においては, 体軸の形成など, 極性をもった非対称な胚構造が自発的に形成される. そこで, 非対称構造を作製するため, 3 層構造を形成する

図 2

(A) Eカドヘリンの発現の誘導による 2 層構造の自己組織化. (B) 異なる発現量のカドヘリンを段階的に誘導するシグナルカスケードによる 3 層構造の形成.

細胞間コミュニケーションにおいて, 発現量の異なる Eカドヘリンの代わりに異なる種類のカドヘリンを誘導した. Nカドヘリンと Pカドヘリンの組み合わせは, 同種親和性は強いが異種親和性が弱いいため, Nカドヘリン発現細胞と Pカドヘリン発現細胞を共培養すると, 水と油が分離するように細胞集団の分離を引き起こす. 上述のシグナルカスケードでこれらのカドヘリンを順に誘導し, 細胞集団の分離を引き起こすことで, 非対称で多様な形態の 3 層構造が形成された⁶⁾.

以上の人工的に作製した自己組織化過程の観察から, 「細胞間でのシグナル伝達→細胞接着による細胞の配置換え→新たに隣接した細胞間でのシグナル伝達」のサイクルにより, 細胞種類の増加をとまなう複雑な構造の形成が可能になると結論した. また, 創傷治癒などでみられるように, 多くの場合, 組織は物理的な損傷を受けた後に再生可能である. そこで, 人工的に作製した 3 層構造 (図 2B) を物理的に切断し, その後どのように形態変化するかを観察した. マイクログロチン⁷⁾ と呼ばれるマイクロ流路系を用いて 3 層構造を真半分に切断したところ, 切断直後はコアを形成している GFP 陽性の細胞が切断面において外部へ露出していたが, 時間とともに mCherry 陽性の中間層によって再び包み込まれ, 24 時間後には 3 層構造が再生可能であることが示された⁶⁾.

synNotchを用いた側方抑制回路

図 3

E カドヘリンの発現を制御する側方抑制シグナル回路による 1 種類の細胞からの 2 層構造の形成。CD19 の発現および synNotch の活性化をモニターするため、CD19 は mCherry、リプレッサーは GFP とともに誘導される。

4. 1 種類の細胞から 2 層構造の作製

動物の胚発生初期において、受精卵は細胞分裂を繰り返した後、細胞運命が枝分かれし、内部細胞塊と栄養膜からなる胚盤胞を形成する。そこで、均一な細胞集団が 2 種類の細胞に枝分かれして形態形成する過程を人工的につくり出すことをめざした。側方抑制と呼ばれる細胞間シグナル回路は、均一な細胞集団から相反する 2 種類の細胞の状態を生じさせることが知られている⁸⁾。たとえば、隣接する細胞間で互いに Notch を介して Delta の発現を抑制する側方抑制回路を導入すると、均一な細胞集団が Delta 陽性かつ Notch 不活性の細胞と Delta 陰性かつ Notch 活性化の細胞に二極化する⁹⁾。そこで、CD19 を認識する synNotch が CD19 の発現を抑制するリプレッサーを誘導する側方抑制回路を L929 細胞に導入し、さらにこの synNotch が CD19 の抑制に加え E カドヘリンを誘導する回路を設計した (図 3)。その結果、細胞は、CD19 陽性細胞と、CD19 陰性かつ synNotch 活性化かつ E カドヘリン陽性細胞に自発的に二極化した。後者の細胞は E カドヘリンにより互いに強く結合してコアを形成し、CD19 陽性細胞は外層に押し出され、最終的に 1 種類の均一な細胞集団から 2 層構造が自己組織化された。

5. おわりに

本研究では、細胞接着を制御する人工的な細胞間コミュニケーションにより、外部からの制御を必要としない自己組織化、段階的にプログラムされた形態形成過程、細胞種類の増加、非対称構造の形成、物理切断後の再生といった、動物の発生でみられる重要な特徴を再現することができた。さらに今後は細胞接着に加え、動物の発生過程で重要な因子であるモルフォゲン、細胞増殖や細胞死、細胞の分化転換などの新たな要素を細胞間コミュニケーションに導入することで、より複雑で巧みな人工組織を作製することが期待される。発生過程を人工的につくり出し、細胞を特定の構造へ自己組織化させる手法の開発は、単細胞生物が多細胞生物へと進化するための十分条件の探索や自己修復する生体材料の開発、改変細胞による組織修復をめざした再生医療などに有用である。

文 献

- 1) Morsut, L. *et al.* (2016) *Cell* **164**, 780-791. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.012.
- 2) Elowitz, M., Lim, W. A. (2010) *Nature* **468**, 889-890. DOI: 10.1038/468889a.
- 3) Rubenstein, M. *et al.* (2014) *Science* **345**, 795-799. DOI: 10.1126/science.1254295.
- 4) Nose, A. *et al.* (1988) *Cell* **54**, 993-1001. DOI: 10.1016/0092-8674(88)90114-6.
- 5) Vendome, J. *et al.* (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, E4175-E4184. DOI: 10.1073/pnas.1416737111.
- 6) Toda, S. *et al.* (2018) *Science* **361**, 156-162. DOI: 10.1126/science.aar0271.
- 7) Blaich, L. R. *et al.* (2017) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 7283-7288. DOI: 10.1073/pnas.1705059114.
- 8) Collier, J. R. *et al.* (1996) *J. Theor. Biol.* **183**, 429-446. DOI: 10.1006/jtbi.1996.0233.
- 9) Matsuda, M. *et al.* (2015) *Nat. Commun.* **6**, 6195. DOI: 10.1038/ncomms7195.

戸田 聡

戸田 聡 (とだ さとし)

カリフォルニア大学サンフランシスコ校博士研究員

2014 年京都大学大学院医学研究科を修了後、同年同博士研究員を経て 2015 年より現職。

研究内容: 細胞を用いたものづくり

連絡先: Genentech Hall Room N414, 600 16th Street,

San Francisco, CA 94158, USA

E-mail: satoshi.toda@ucsf.edu

URL: <http://limlab.ucsf.edu/index.html>