

# 研究終了報告書

## 「接着の偏在によるモザイク形成メカニズム」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：富樫 英

### 1. 研究のねらい

本研究者はこれまでに接着分子ネクチンに着目し、異なるネクチンを発現する細胞を混合すると、同じネクチン間のホモフィリックな結合よりも、異なるネクチン間のヘテロフィリックな結合のほうが強いという性質によって、細胞が自らモザイクパターンに並ぶ新しい細胞選別の基本原理を見出した。さらに、生体内で働く細胞選別メカニズムの破綻が生理機能の異常を引き起こし、疾患と関わることも見出している。感覚上皮組織における並び替えの過程を詳細に見ると、2種類の細胞はそれぞれ異なるネクチンを発現しており、同種と異種の細胞間の接着力の差が駆動力となって、細胞の割込みが引き起こされてモザイクパターンがつくられる。KOマウスや培養細胞を用いた実験から、感覚上皮のモザイク形成には感覚細胞と支持細胞間での細胞間の「接着力の違い」が重要であり、この接着力の違いは細胞接着分子ネクチンとカドヘリンによって作り出されることを示した。しかし、接着力の違いが細胞の運動に変換され、最終的なモザイクパターン形成に至るメカニズムについてはいまだわかっていない。

ネクチンはファミリー内の分子間でのホモフィリック(同種間)結合だけでなく、異なる分子間でヘテロフィリック(異種間)にも結合ができる。しかも、ネクチンのヘテロフィリックな接着はホモフィリックな結合よりも数倍強い。例えば、異なるネクチンを発現する2種類の細胞を混合培養すると、お互いに異なるネクチンを発現する細胞と強く結合することになり、両者は互い違いのモザイク様に並ぶ。培養細胞を用いて割込み過程のライブイメージングを行ったところ、ネクチンとカドヘリンは2つの同等な接着力を持つ接着面の中で、一方の細胞辺だけに強いという偏った局在を示した。しかし、細胞間の接着親和性に従わず偏った分子局在を示すメカニズムは不明であり、この偏りが割込みを介してモザイクパターンを形成するメカニズムも不明である。このメカニズムが解明されれば従来のモデルを覆す新たな基本原理につながり、形態形成の理解におけるブレイクスルーとなるだろう。以上のような背景のもとに、本研究ではネクチンのヘテロフィリックな相互作用がカドヘリンや細胞骨格の偏りを生み出し、割込みを引き起こしてモザイクパターンを形成するメカニズムを明らかにする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

#### ①新しい数理モデル「界面ネットワーク運動モデル」の創出

細胞パターン形成の過程を記述する新しい数理モデルを創出し、計算機上でシミュレーションをするための数値計算手法を開発した。実際の測定値に基づいた数値シミュレーションの結果、感覚器で見られる細胞パターンを再現することに成功した。このモデルによって、従来の数理モデルでは表現することが出来なかった曲線などの多様な形態を含む上皮構造を再現し、理解することが可能になる。マウス感覚上皮のモザイクパターン形成をモデルに、実験から得た接着力のパラメータを個々のモデルに代入することで得られた結果を実際の組織と比較すると、

パターン形成の特徴をよく近似できることがわかった。

## ② マウス聴覚上皮における市松模様の細胞パターンの生理的意義を解明

内耳蝸牛管の聴覚上皮では、音を伝達する有毛細胞は支持細胞とよばれる細胞によって有毛細胞どうしが決して接する事のないように隔てられており、2種類の細胞が市松模様に並ぶ。感覚上皮で見られるモザイクパターンは、進化上保存されて様々な生物種において見られるが、細胞がモザイクパターンに並ぶ生理的な意義については不明であった。本研究では聴覚上皮の市松模様が壊れるネクチン KO マウスをモデルに、聴覚上皮において細胞が市松模様に並ぶことが、正常な聴覚機能とともに有毛細胞の生存と機能に必要なことを示した。

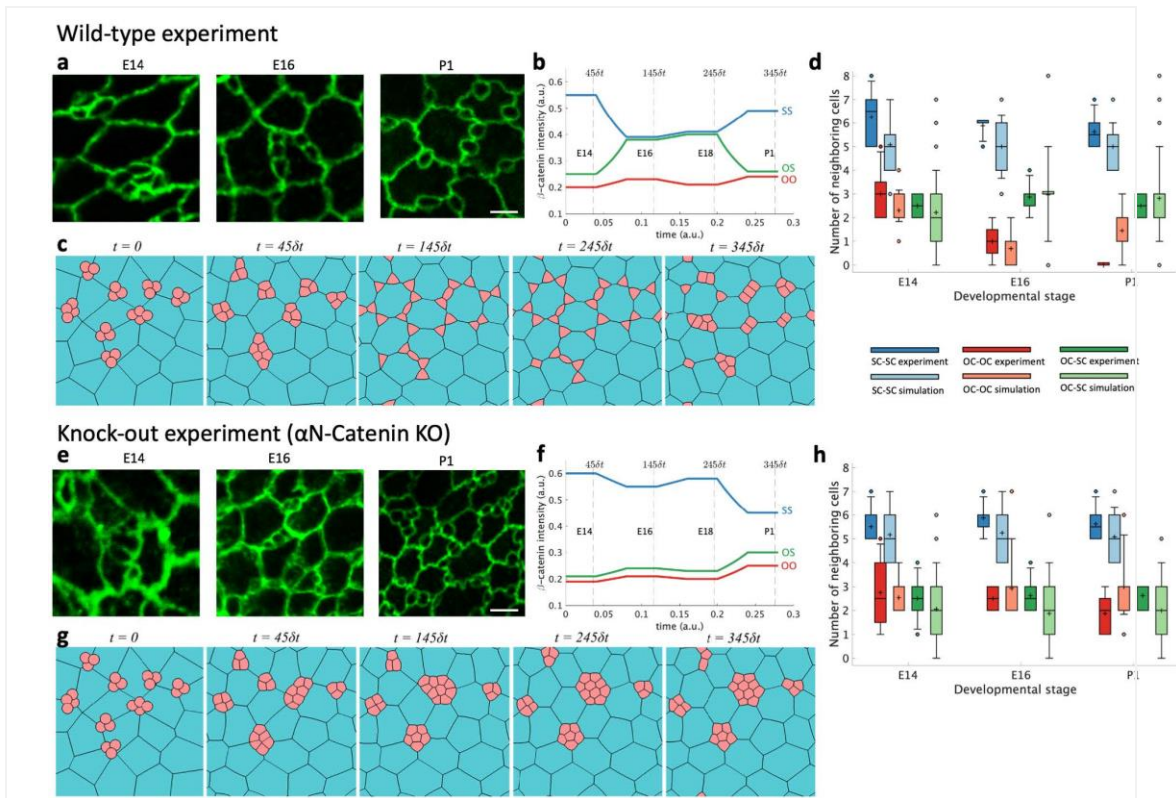
## ③細胞パターンの変化が毛包オルガノイド作製の効率を上昇させる

異なるさきがけ領域間の共同研究を行い、細胞パターンの制御により細胞分化の効率を変化させることができることを示した。毛包オルガノイドの形成には上皮系細胞と間葉系細胞を共培養することで行うが、そのままでは2種類の細胞が選別、分離してしまいオルガノイド形成効率が低いことがわかっていたが、細胞選別パターンを操作することで、毛包オルガノイドの形成効率が劇的に上昇することを示した。

## (2) 詳細

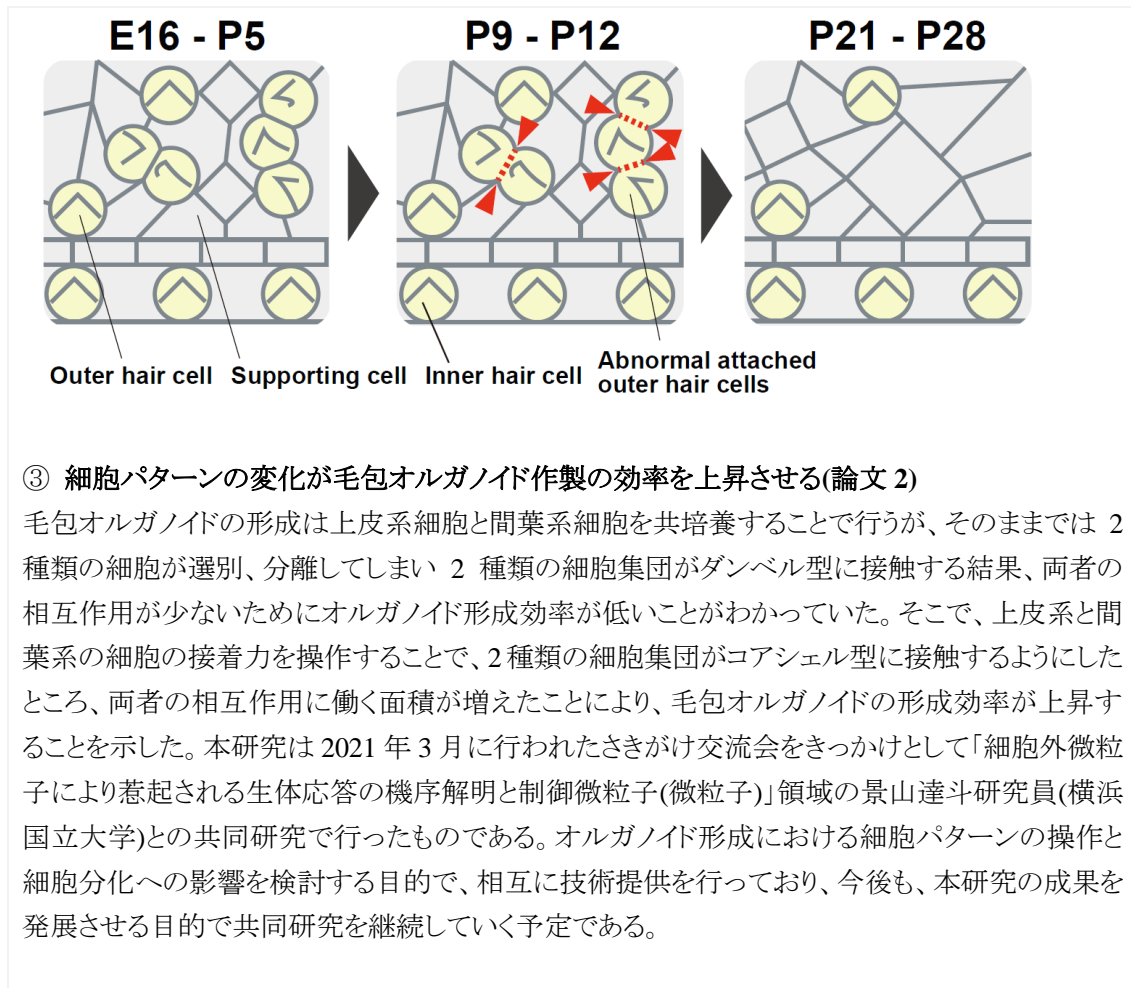
### ① 新しい数理モデル「界面ネットワーク運動モデル」の創出(論文1)

様々な組織形成を理解できる数理モデルをつくりたいと考え、数学者との協働によりモデル化を進めてきた。一般に上皮形態を扱うモデルとして、細胞頂点の動きに着目した Vertex dynamics model(以下、Vertex モデル)が有名であるが、このモデルは細胞境界を直線とみなし、細胞を多角形として近似するため、感覚上皮のように細胞境界に曲線が含まれる場合には適用が難しい。また、パラメータが多く、複数種類の細胞間相互作用を導入することも難しかった。そこで Karel Svadlenka 博士(京都大)、村川秀樹博士(龍谷大)とともに、これらを解決するための「界面ネットワーク運動モデル」(Interfacial network dynamics model)を創出した。このモデルは従来のモデルと違って界面張力(=接着力の逆数)を唯一のパラメータとして用いるため、非常にシンプルで、かつ原理をはっきりと見極めることができる特徴を持つ。そして、このモデルに実験から得たパラメータを導入したところ、他のモデルでは表すことの出来なかった嗅上皮や聴覚上皮の細胞の挙動や細胞の形態も良く近似出来ることがわかった。図では、マウス嗅上皮のパターン形成を実験から得た接着力のパラメータだけで嗅上皮の再配列過程を表現している(下図 a,b,c)。また、嗅上皮パターンに異常を示す  $\alpha$ N-カテニン KO マウスから得た接着力を代入することで、このパターンも再現することが出来た(下図 e,f,g)。モデリングで得られた結果を実際の組織と比較すると、嗅上皮のパターン形成の特徴をよく近似できることがわかった(下図 d,h)。本モデルを用いた解析結果により、感覚上皮における細胞パターン形成には、細胞間の接着力よりも界面張力が最も重要であることが示された。



## ② マウス聴覚上皮における市松模様の細胞パターンの生理的意義を解明(論文 3)

内耳蝸牛管の聴覚上皮では、音を伝達する有毛細胞は支持細胞とよばれる細胞によって有毛細胞どうしが決して接する事のないように隔てられており、2種類の細胞が市松模様に並ぶ。このような細胞パターンは様々な生物種で保存されている。このパターン形成には、細胞接着分子ネクチン-1 と-3 の相互作用が必要であることが、私達のこれまでの研究によりわかっている。市松模様は聴覚機能の発現に必要なと考えられているが、これまで検討されたことはなかった。私は、ネクチン-3 KO マウスの聴覚上皮における有毛細胞の生存と機能において、市松模様の細胞パターンが必須のものであることを明らかにした。ネクチン-3 KO マウスでは、有毛細胞どうしが接することでアポトーシスにより失われることで、進行性の難聴を示した。このアポトーシスは、本来接することのない有毛細胞間で密着結合(TJ)が正常に形成されないことによって生じていた。有毛細胞間の接着面からは TJ 形成に必須とされる ZO 分子やオクルディンやクローディンが消失していた。聴覚上皮では、細胞の頂端側に密着結合(TJ)が形成され、イオンを含む様々な分子が細胞間透過を制御するだけでなく、TJ 形成を担うクローディンやオクルディンの KO マウスでは有毛細胞が失われ、難聴になることが知られている。すなわちネクチン-3 KO マウスでは、細胞間の接着親和性が変化することにより本来接することのない有毛細胞間の接着が誘導されることで、有毛細胞間の TJ 形成が不全となることで細胞死が誘導される。その結果、難聴となるのである。本研究により、聴覚上皮の市松模様の細胞パターンが、蝸牛有毛細胞の生存と聴覚機能を確保するための構造基盤を提供していることが初めて明らかになった。



### 3. 今後の展開

①によって得られた数理モデルについては、感覚上皮の細胞パターン形成や細胞選別に働くメカニズムについて新たな示唆が得られたことから、これを実際に検証する研究を進めている。今後はモデルを 3 次元に拡張することで、様々な組織の形態形成を理解できるようにすることで、生物学の基本的な問題に答えていきたい。今回構築した新しい数値計算手法は一般に公開しており、他の生物学の諸問題の解決に役立つことにも期待している。

②によって得られた成果については、様々な波及効果が期待できる。聴覚や嗅覚のみならず、どのような感覚上皮でも感覚細胞と支持細胞の 2 種類の細胞が互い違いに並ぶモザイクパターンが必ず見られる。しかも、感覚器のモザイクパターンは、進化的に下等な生物から保存されていることから、機能的にも重要であると考えられてきた。本成果は感覚上皮におけるモザイクパターンの生理的意義を初めて示したものである。ネクチンが原因のヒトの疾患として知られるマルガリータ島症候群では、難聴を伴うことが知られており、これまで不明であった病態についても今後明らかにされるだろう。難聴の多くは、有毛細胞が傷害されて起こるが、有毛細胞はいったん分化すると生涯再生しないため、根本的な治療法がない。本研究の成果は組織や器官で細胞の配置の異常に伴う様々な疾患の理解にもつながり、再生医療への応用など社会的意義も大きい。

③の共同研究の成果については、今後、オルガノイド内での細胞パターンが細胞分化に及ぼす影響を検討する目的で細胞間相互作用のイメージングを行う予定である。さらに毛包オルガノイドを用いた創薬や再生医療等への応用が期待される。

#### 4. 自己評価

本研究課題の多くは、当初予定していた計画よりもコロナ禍の影響により遅れることになった。特に論文1と論文3は2020年度中に公表することを予定していたにも関わらず、実際には2021年度、および2022年度とそれぞれ遅れた。共同研究において、分野の近い場合はともかく、異分野間での共同研究については、対面での粘り強い議論が必須と感じた。一方、論文2の共同研究については、共同研究者どうしが一度も直接顔を合わせることなく、論文の公表まで行うことが出来た。これはオンラインミーティングが一般的になったことのメリットの一つであろう。本研究成果のほとんどは基礎的研究であるため、社会や経済への波及効果がすぐに現れることはないだろうが、さきがけの領域内外で培われた人的ネットワークにより、今後の共同研究が発展することで交流が活発になり、成果が共有されることで幅広い分野に影響が広がることを期待している。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:4件

<p>1. Rhudaina Z Mohammad, Hideki Murakawa, Karel Svadlenka, and <u>Hideru Togashi</u>. “A numerical algorithm for modeling cellular rearrangements in tissue morphogenesis” <i>Communications biology</i>, 2022, 5, 1-10</p>
<p>細胞パターン形成の過程を記述する新しい数理モデルを創出し、計算機上でシミュレーションをするための数値計算手法を開発した。実際の測定値に基づいた数値シミュレーションの結果、感覚器で見られる細胞パターンを再現することに成功した。このモデルによって、従来の数理モデルでは表現することが出来なかった曲線などの多様な形態を含む上皮構造を再現し、理解することが可能になった。</p>
<p>2. Tatsuto Kageyama, Riki Anakama, <u>Hideru Togashi</u>, and Junji Fukuda “Impacts of manipulating cell sorting on in vitro hair follicle regeneration” <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i>, 2022, In press</p>
<p>毛包オルガノイドを形成するにはマウスの上皮系細胞と間葉系細胞を共培養し凝集体を形成する必要がある。この凝集体における 2 種類の細胞集団の空間配置パターンを細胞選別のアイデアに基づいて制御することで高効率に毛包オルガノイドを誘導することに成功した。</p>
<p>3. Sayaka Katsunuma, <u>Hideru Togashi</u>, Shuhei Kuno, Takeshi Fujita, and Ken-ichi Nibu. “Hearing loss in mice with disruption of auditory epithelial patterning in the cochlea” <i>Frontiers in Cell and Developmental Biology</i>, In revision.</p>
<p>内耳蝸牛管の聴覚上皮では、2 種類の細胞が市松模様に並ぶ。感覚上皮で見られるモザイクパターンは、進化上保存されて様々な生物種において見られるが、細胞がモザイクパターンに並ぶ生理的な意義については不明であった。本研究では聴覚上皮の市松模様が壊れるネクチン KO マウスをモデルに、聴覚上皮において細胞が市松模様に並ぶことが、正常な聴覚機能とともに有毛細胞の生存と機能に必要なことを示した。</p>

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のもも含む)

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Dynamics of cellular interactions that regulate cellular patterning, Hideru Togashi,  
The 73rd Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology,  
“Epithelial dynamics that regulate tissue repair, inflammation and cancer” 2021 年  
(招待講演)
2. Asymmetric distribution of cadherin-catenin complex drives cell intercalations in nectin-dependent mosaic cellular pattern formation, Hideru Togashi,  
The 72nd Annual Meeting of the Japan society for cell biology, 2020 年 (招待講演)

3. Auditory function and the checkerboard-like cellular pattern of the auditory epithelium,  
Hideru Togashi,  
第3回京大-ハイデルベルグ大-理研ワークショップ「医学と数理」, 2022年, (招待講演)
4. 内耳の市松模様の細胞パターンは聴覚機能に働く, 富樫 英  
『科学』岩波書店, 第92巻, 11号, 2022年, (著作)
5. 令和3年度神戸大学学長表彰, 富樫 英, 2021年, (受賞)