

News Release



University of California
San Francisco

令和2年10月16日

各報道機関文教担当記者 殿

細胞分化パターンを人工的に設計できる 細胞間シグナル伝達モデル「人工モルフォゲン」 の開発に成功！

金沢大学ナノ生命科学研究所の戸田聡助教，カリフォルニア大学サンフランシスコ校の Wendell Lim 教授らの国際共同研究グループは，任意のタンパク質を細胞間シグナル伝達分子へと変換する技術を開発し，細胞分化パターンを人工的に設計できる細胞間シグナル伝達モデル「人工モルフォゲン」を構築することに成功しました。

動物の発生過程では，細胞がタンパク質を分泌して，シグナルのやり取りを行うことによって，「胚の中のどこの細胞が将来，脳や目，血管などに分化するのか」が決まります。このようなシグナル分子はモルフォゲン（※1）と呼ばれますが，ある細胞がタンパク質を分泌して，別の細胞がそれを受け取るときに，細胞の分化を空間的に制御するためにはどのような仕組みが必要でしょうか？

本研究では，分泌タンパク質を介した細胞間シグナルを一から組み立てて，人工的に細胞分化パターンを形成することを目指しました。まず，哺乳細胞は本来持っていない緑色蛍光タンパク質 GFP を哺乳細胞間のシグナル分子として利用しました。さらに，GFP に特異的に結合する GFP nanobody（※2）を使って，GFP の受容と応答による新たな細胞間シグナル系を構築しました。分泌された GFP を細胞表面にトラップし，人工受容体により GFP を読み取って遺伝子発現へと変換することで，細胞の分化を制御するパターンを設計通りに作り出すことに成功しました。

本研究の知見は将来，人工モルフォゲンを用いた細胞の分化誘導により異種細胞の配置を制御して臓器機能をデザインすることや，病変組織から放出される疾患関連因子を認識して組織再生などの治療活動を出力する再生医療・細胞医薬の開発に活用されることが期待されます。

本研究成果は，2020年10月15日14時（米国東部時間）に米国科学誌『Science』に掲載されました。

【研究の背景】

動物の発生過程では、発生を誘導するオーガナイザーの役割を果たす細胞からシグナル分子が分泌され、胚の中を拡散し、周囲の細胞の運命決定を導く道標・位置情報として作用することが知られています。このような細胞間シグナル分子はモルフォゲンと呼ばれ、胚の中のどこの細胞が将来、脳や血管など、どの臓器の細胞に分化するかを制御しています。これまで、モルフォゲンが位置情報を形成するメカニズムについて多くの研究がなされてきましたが、さまざまな分子が相互作用する動物胚の中では、分泌されたモルフォゲンの挙動は複雑に制御され、その仕組みを逐一解析することは困難です。そこで、胚の中でのモルフォゲンによるパターン形成過程を解析する研究とは逆の発想で、本研究は、モルフォゲンとは無関係な分子、例えば、緑色蛍光タンパク質 GFP を用いて、GFP の受容と応答による人工的な細胞間シグナルを一から構築し、新たな細胞分化パターンを形成することを目指しました。

【研究成果の概要】

本研究では、マウス線維芽細胞株を用いて、GFP を分泌する細胞と、GFP nanobody と膜貫通ドメインを融合したアンカー分子を発現することで、GFP を受け取ることが出来る細胞を作製しました。さらに、ただ GFP を受け取るだけではなく、細胞にシグナルを入れて細胞分化を制御するため、近年、合成生物学（※3）分野で開発された人工受容体 synthetic Notch receptor (synNotch) を利用しました。synNotch は Notch 受容体をもとに作られたキメラ受容体で、隣り合った細胞間で、互いの遺伝子発現を制御する細胞間相互作用を構築することが可能です（図 1A）。例えば、GFP nanobody を細胞外に持つ抗 GFP synNotch は、隣接細胞が発現する膜貫通型 GFP（GFP と膜貫通ドメインの融合タンパク質）を認識すると、物理的な張力により構造変化を引き起こして活性化し、標的遺伝子を誘導することができます（図 1B）。しかし、分泌型 GFP は synNotch に結合しても構造変化を誘導できず、synNotch を活性化することはできません。そこで、分泌された GFP をアンカー分子により細胞表面にトラップし、それを synNotch が認識することで、分泌型 GFP による synNotch の活性化を実現しました（図 1B）。この拡散型 synNotch により、液中を拡散するタンパク質によって synNotch を活性化して遺伝子発現および細胞分化を誘導することが可能となりました。

分泌された GFP によるシグナルを観察するため、培養ディッシュ上に、GFP 分泌細胞から成る「POLE」領域と GFP を受容するアンカー細胞・synNotch 細胞から成る「BODY」領域を形成しました（図 2）。膜貫通型 GFP 発現細胞を POLE 領域に蒔いた場合、BODY 領域との境界のみでレポーター遺伝子（※4）が誘導されるのに対し、GFP 分泌細胞を蒔いた場合は、分泌型 GFP が拡散により長距離にわたって濃度勾配を形成し、レポーター遺伝子発現の勾配が誘導されました（図 2）。さらに、GFP に限らず、細胞が分泌したタンパク質は、細胞表面にトラップされて synNotch により認識されることで、モルフォゲンのように拡散して遺伝子発現を制御できることを見いだしました。そこで、このシステムを「人工モルフォゲン」と名付けました。さらに、人工モルフォゲンが形成するシグナル勾配の振幅や伝達距離は、アンカー分子の密度や人工モルフォゲン活性を阻害

する nanobody（阻害抗体）によって調節可能であることを見いだしました。

今回開発した人工モルフォゲンシステムは、

- ・人工モルフォゲンの受容体との親和性や発現量などさまざまなパラメーターを設計可能

・synNotch を用いて遺伝子発現を誘導するため、望みの標的遺伝子を誘導可能という非常に自由度の高いシステムであり、パラメーター探索によるシグナル勾配の制御に加えて、人工モルフォゲンを受容した細胞自身はそのシグナルを増強あるいは阻害するフィードバック回路を構築することも可能です。さらに、人工モルフォゲンおよび阻害抗体を用いることで、動物胚で見られる、胚の両極からモルフォゲンおよびモルフォゲン阻害分子が分泌されて形成される細胞分化パターンを培養ディッシュ上で再現することも可能です。以上の特徴を利用して、細胞間シグナル回路を構築することにより、異なる遺伝子発現を誘導する複数の組織区画を形成することに成功しました(図3)。

人工モルフォゲンは、内在的な細胞間シグナル経路には干渉しない独立したシンプルな細胞間シグナル系にもかかわらず、生体外においてシグナル勾配や組織区画を十分に形成することができました。よって、人工モルフォゲンを生体内に導入して細胞分化を空間的に操作するツールとしての応用が期待されます。実際に、フランシスクリック研究所 (Francis Crick Institute) の Jean Paul Vincent 博士らの研究グループは、モルフォゲン Dpp (Decapentaplegic) (※5) を人工モルフォゲン GFP と置換し、Dpp 受容体に GFP nanobody を融合して GFP を認識する人工受容体へと改変しました。その結果、分泌された GFP がショウジョウバエの羽の発生を誘導できることを見いだしました。このショウジョウバエを用いた生体内での人工モルフォゲン GFP の解析に関する研究も、同誌に「Patterning and growth control in vivo by an engineered GFP gradient」として同時掲載されました。

【今後の展開】

人工モルフォゲンは、内在的な細胞間シグナル経路に影響を与えることなく、さまざまなパラメーター（人工モルフォゲンの受容体との親和性や発現量、誘導する遺伝子など）を自在に設計可能です。よって、これまでに提唱されたパターン形成理論を実際に再構築して検証するツールとして有用であると同時に、組織内で新たな細胞分化パターンを形成し、異種細胞の配置を制御することで臓器機能をデザインする組織工学への応用が期待されます。さらに、任意のタンパク質を細胞間シグナル分子に変換することができるため、病変組織から放出される疾患関連因子を病変の位置を示すシグナルとして検出する細胞の作製が可能です。将来、細胞をロボットのように改変し、体内の病変組織を見つけ出して、必要な場所で必要な応答を出力する細胞医薬を開発することで、正確にプログラムされた再生医療の実現が期待されます。

本研究は、Human Frontiers of Science Program (HFSP), 千里ライフサイエンス振興財団, 加藤記念バイオサイエンス振興財団, 日本学術振興会科学研究費助成事業 (20K15828), 文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI) の支援を受けて実施されました。

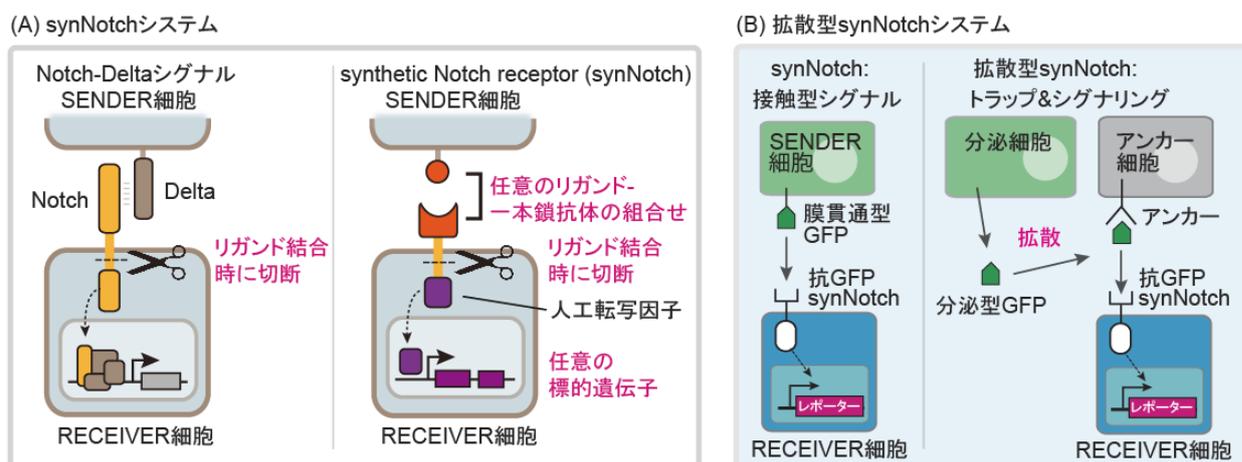


図 1. 従来の synNotch システムと拡散型 synNotch システムの開発

- (A) synNotch システム。細胞間シグナル伝達分子である Notch 受容体は、リガンドの膜タンパク質 Delta を認識すると、物理的な張力により構造変化し、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移行、遺伝子発現を誘導します。synNotch は、Notch 膜貫通ドメインを保持したまま、Notch 細胞外ドメインを任意の抗原・リガンドを認識する一本鎖抗体に置換し、さらに、細胞内ドメインを人工転写因子に置換したキメラ受容体です。これにより、synNotch は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、細胞の受容と応答を自在にプログラムすることができます。
- (B) 拡散型 synNotch システム。抗 GFP synNotch は膜貫通型 GFP によって活性化されますが、分泌型 GFP では活性化されません。そこで、分泌型 GFP をアンカー分子によって細胞表面にトラップし、GFP 上の異なるエピトープを認識する抗 GFP synNotch に提示することで、分泌型 GFP による synNotch 活性化が誘導されます。

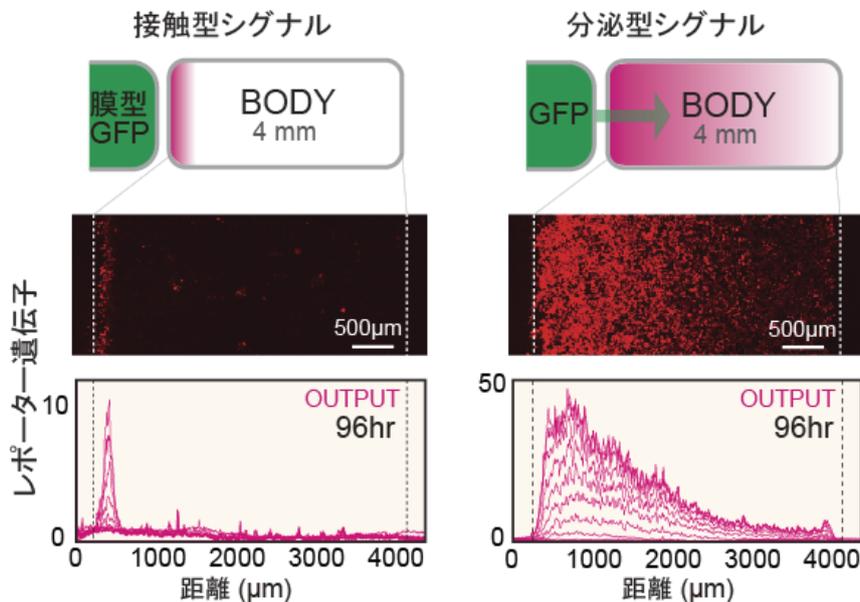
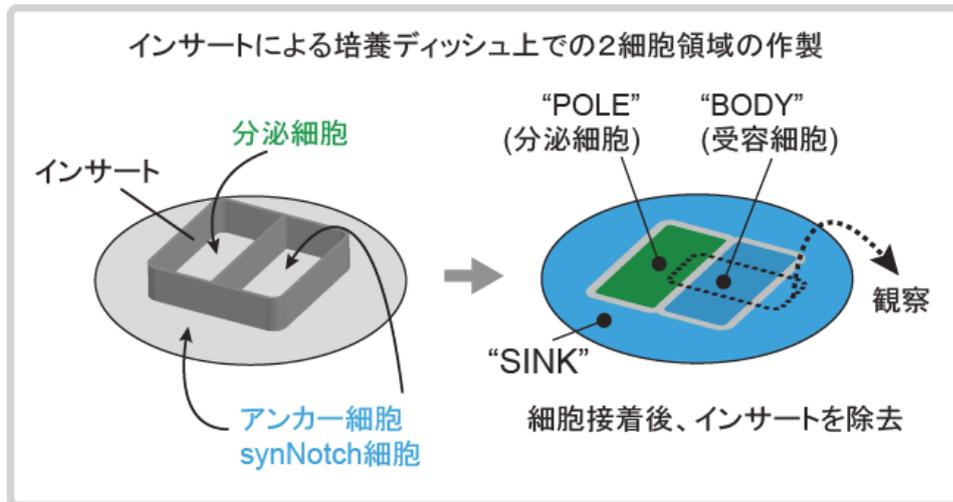


図2. 人工モルフォゲン GFP による遺伝子誘導のシグナル勾配の形成

培養ディッシュ上にインサートを置き、左側に GFP 分泌細胞、右側にアンカー細胞・synNotch細胞を蒔くことにより、GFPを分泌する「POLE」領域と GFPを受容する「BODY」領域を形成しました。膜貫通型 GFP 発現細胞を POLE 領域に蒔いた場合、領域境界上の細胞のみが活性化しましたが、分泌型 GFP 発現細胞を蒔いた場合、BODY 領域内を GFP が拡散して濃度勾配を形成することにより、遺伝子誘導のシグナル勾配が形成されました。グラフ内の各線は12時間毎のレポーター遺伝子の発現強度を示しています。

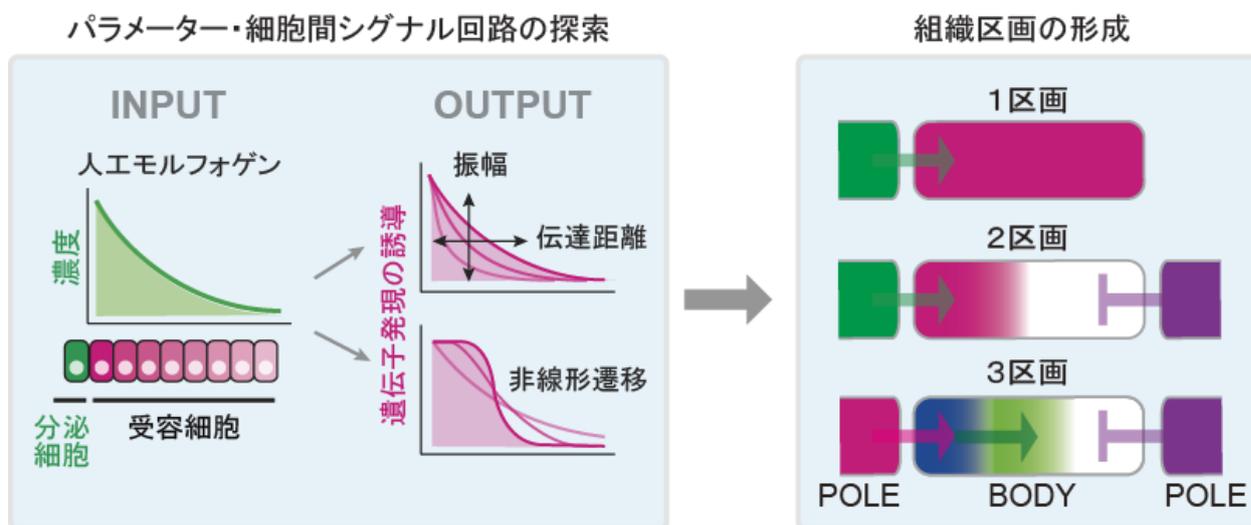


図3. 人工モルフォゲンシステムによる細胞分化の位置制御原理の探索および細胞分画の人工形成

人工モルフォゲンシステムでは、人工のシステムがゆえに、人工モルフォゲンと受容体の親和性や発現量などのパラメーターの網羅的な探索や、人工モルフォゲンに応答してそのシグナルを増強あるいは阻害する細胞間フィードバック回路の構築が可能です。これにより、モルフォゲンシグナル勾配の振幅や伝達距離の制御や、モルフォゲン濃度勾配を非線形に読み取る細胞間シグナル回路の構築など、細胞分化の位置制御原理の探索に利用できます。また、これらの知見を組み合わせることで、人工モルフォゲンを受容する **BODY** 領域において、異なる遺伝子発現を誘導する組織区画を形成することができます。

【掲載論文】

雑誌名：Science

論文名：Engineering Synthetic Morphogen Systems that Can Program Multicellular Patterning
(細胞分化パターンの設計が可能な人工モルフォゲンシステムの開発)

著者名：Satoshi Toda, Wesley L. McKeithan, Teemu J. Hakkinen, Pilar Lopez, Ophir D. Klein, Wendell A. Lim

(戸田 聡, Wesley L. McKeithan, Teemu J. Hakkinen, Pilar Lopez, Ophir D. Klein, Wendell A. Lim)

掲載日時：2020年10月15日14時(米国東部時間)にオンライン版に掲載

DOI：10.1126/science.abc0033

【用語解説】

※1 モルフォゲン

組織内の一部の細胞から分泌され、細胞の遺伝子発現および運命決定を制御する細胞間シグナル分子。分泌されたモルフォゲンは、細胞間基質や細胞膜などと相互作用しながら組織内を拡散して、自身の濃度勾配を形成する。周囲の細胞は、モルフォゲンの濃度に応じて異なる運命決定を行うため、モルフォゲン濃度勾配が細胞分化の位置情報として機能する。

※2 nanobody

抗原に特異的に結合する一本鎖抗体の断片。ラクダ科の動物によって作られる一本鎖抗体から抗原認識部位の cDNA を単離することで得られる。

※3 合成生物学

分子や細胞のネットワークを設計してその挙動を調べ、生命機能をつくり出すことを目指している分野。生命機能をつくり出す過程の試行錯誤から仕組みの理解を深める基礎の面と、つくり出した機能を医療や産業に利用する応用の面を併せ持つ。合成生物学の分野では、生物版ロボコンと呼ばれる世界大会 iGEM が毎年開催されている。

※4 レポーター遺伝子

本研究においては、synNotch の標的遺伝子として誘導される蛍光タンパク質を指す。synNotch 活性化による細胞運命決定を可視化するレポーターの役割を果たす。

※5 Dpp (Decapentaplegic)

ショウジョウバエの翅の発生に必要なモルフォゲンの一種。翅原基の中央部から分泌されて前後軸に沿った濃度勾配を形成し、翅のパターン形成と成育を誘導する。

【本件に関するお問い合わせ先】

■ 研究内容に関すること

金沢大学ナノ生命科学研究所 助教

戸田 聡 (とだ さとし)

TEL : 076-265-2739

E-mail : satoshi.toda@staff.kanazawa-u.ac.jp

■ 広報担当

金沢大学総務部広報室

上沼 孝平 (かみぬま たかひら)

TEL : 076-264-5024

E-mail : koho@adm.kanazawa-u.ac.jp

金沢大学ナノ生命科学研究所事務室

米田 洋恵 (よねだ ひろえ)

TEL : 076-234-4556

E-mail : nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp