



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	筋分化過程の連続的な観察を実現する、分化度ライブイメージングシステムの開発とその応用 [全文の要約]
Author(s)	麓, 佳月
Description	配架番号 : 2921 この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16429号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95862
Type	doctoral thesis
File Information	FUMOTO_Yoshizuki_summary.pdf



学位論文（要約）

筋分化過程の連続的な観察を実現する、分化度
ライブイメージングシステムの開発とその応用

(Development and application of a live
differentiation imaging system for continuous
observation of the myogenic differentiation
process)

2025 年 3 月

北海道大学

麓 佳月

背景と目的

細胞分化は、細胞集団が秩序だった組織を形成すると同時に、その組織の構成要素である個々の細胞に適切な機能が付与され時空間的に制御されたプロセスである。しかし、これら細胞分化のマクロな側面(細胞集団レベルの制御)とミクロな側面(遺伝子発現レベルの制御)がどのように互いに影響を及ぼしあっているのかは、依然として生物学上の中心的課題である。特に、多細胞集団が形成する空間パターンから個々の細胞の遺伝子発現制御に及ぼす影響に関しては、定量的な解析が難しく、定性的な報告に限られてきた。そこで筆者は、正常マウス筋芽細胞株 C2C12 を用い、筋管細胞に至る筋分化度と細胞集団が形成する空間パターンの関係に注目し、スケールを跨いだ筋芽細胞分化のメカニズム解明に挑んだ。C2C12 細胞は、培地から血清を除去するという比較的均質な操作によって筋管細胞に分化する。分化誘導は均一な操作であるが、筋分化は C2C12 細胞集団内で不均一に進行する。この不均一性の起源を探るため、我々は液晶に関する物理学の理論を用いて、細胞集団が形成する空間パターンと筋分化の関連を解析した。

材料と方法

Myogenin 最小プロモーター領域を活用し、筋分化度をライブイメージングにより可視化することが可能な実験系を作成し、そのシステムを導入した正常マウス筋芽細胞株 C2C12 を樹立した。また、C2C12 に発現する内在性の筋分化マーカーの発現変化と比較することで、開発したシステムの精度検証を行った。C2C12 細胞集団が形成する巨視的な空間パターンと筋分化度の同時観察を行い、取得した画像を解析した。C2C12 細胞集団が形成する空間パターンは、極性を持たない棒状の構成要素が密に集まった時に現れるネマチック構造として解析した。特に、ネマチック構造内に現れる向きが定義できない特異点であるトポロジカル欠陥に注目し、筋分化度との関連を解析した。また、この空間パターン形成と筋分化度の時間的因果関係を明らかにするために、空間パターンの収束速度と筋分化度の時間発展の関係を解析した。トポロジカル欠陥を含む空間パターンの収束速度を定量するために、細胞集団が形成する空間パターン内の配向の分布を調べた。分化誘導後 48 時間後の配向分布とその他の時刻の類似度を **Zero-mean normalized cross-correlation** を用いて計算した。空間パターンと筋分化の因果関係を検証するために、ポリジメチルシロキサン (PDMS) シートをレーザー加工することでマイクロパターンを作製し、このパターン内で細胞培養を行うことで特定の種類のトポロジカル欠陥を特定の位置に誘導可能な実験系を樹立した。

結果

Myogenin 最小プロモーター領域を活用した筋分化度可視化システムにより評価した分化度は分化マーカーである内在性 *myogenin*、*myosin heavy chain* の発現量と正の相関を示し、特に *myosin heavy chain* 発現細胞を検出する精度が高く、筋分化過程のうち終末分化移行期にある C2C12 細胞の筋分化度の観察に適していることが明らかになった。このシステムを用いて C2C12 細胞集団が形成する空間パターンと筋分化の関係を解析

したところ、筋分化度は $-1/2$ トポロジカル欠陥近傍に比較して、 $+1/2$ トポロジカル欠陥近傍で高いことが明らかになった。次に、この欠陥の種類による分化度の違いは分化誘導後のいつから出現したのかを確かめるべく、欠陥近傍領域の分化度の時間発展を解析した。 $+1/2$ トポロジカル欠陥近傍と $-1/2$ トポロジカル欠陥近傍間の筋分化度の差は分化誘導初期から生じていたのではなく、分化誘導後の時間発展に伴い次第に形成されていたことが明らかになった。また、この欠陥の種類に応じた分化度時間発展の違いは欠陥の種類に依り生じたのか、それとも分化度時間発展の違いが異なる種類の欠陥を生じさせたのか、欠陥を含む空間パターン形成と分化度時間発展の因果関係を解析した。もし空間パターンの形成が分化度の違いの原因であるならば、空間パターンの形成とその安定化が分化度の時間発展よりも先に収束する必要がある。この時間的因果関係を解析したところ、配向分布の類似度を用いた解析により、トポロジカル欠陥を含む空間パターンは筋分化に先行して収束することが示された。また欠陥の持つ数学的性質を利用し、欠陥の位置を制御するマイクロパターンを用い、任意の場所に特定の種類の欠陥を生じさせることで筋分化度の空間分布を予測する実験を行い、空間パターンの形成と分化度の因果関係をさらに検証した。マイクロパターンを用いた実験系により、マイクロパターンの特定の位置に $-1/2$ トポロジカル欠陥を生じさせ、筋分化度の低い領域を誘導することができた。

考察

本研究では、これまで定量的な議論が困難であった細胞集団が形成する空間パターンと分化の関係について新たな知見を得ることができた。特定の形の閉空間に閉じ込めたうえで分化誘導を行った先行研究などから、巨視的な組織構造が細胞の運命決定に関与する可能性が議論されてきた。一方、巨視的な空間の中でも分化に影響を及ぼすのはどのような場所なのか、空間パターンのどのようなパラメータがどのような原理で細胞運命決定に影響するのかは不明であった。またトポロジカル欠陥の持つ性質と細胞集団の関係を明らかにした研究は、細胞の離合集散や、細胞の押出など形態形成に主眼を置いたものが多く、分化など高次な生命現象に対する知見は限定的であった。本研究は、筋分化の過程を時間と空間の連続性を損なうことなく観察できる実験系を確立したことで、時間的因果関係と巨視的空間パターンと同時に分化進度の分布を定量的に評価した。本研究の結果から、筋分化は均質な分化誘導操作にもかかわらず、空間的に不均一、かつ秩序立って進行することが明らかになった。また、その秩序立った細胞集団の空間パターンは、分化の進行よりも早く収束することが明らかになった。その巨視的な空間パターンを予測可能な形に制御することで、分化の程度を位置に対して予言できる可能性も示唆することができた。これらの結果は、巨視的な空間パターンのもつ分化駆動力すべてを説明はしないが、空間パターンが分化の原因となり得るという因果関係を示唆することはできたと考える。

本研究では *Myogenin* プロモーター活性を分化度の指標 (Diff index) として使用した。内在性の *myogenin* の発現量の変化よりも Diff index の変化は遅く、より筋分化の超初

期を観たい場合などは、採用する蛍光タンパク質やプラスミドの設計を工夫し直す必要がある。Diff index が内在性の myogenin の発現変化に遅れた理由として考えられる可能性は、使用した *Myogenin* プロモーターが最小プロモーターであること、蛍光タンパク質 tdTomato の成熟速度の影響が挙げられる。

トポロジカル欠陥は物理的に定義された空間構造であり、その形の非対称性から異方的な力学的負荷がその周辺に発生し得る。細胞レベルの力学的な負荷が分化に関与するという先行研究からも、トポロジカル欠陥が持つ物理的性質から空間と分化の関係を紐解くことも可能であろうと考えられる。今後、トポロジカル欠陥がもたらすどのような因子が分化に関与するのかを明らかにする必要があると考える。

結論

本研究の結果から、筋分化における細胞集団が形成するマクロな空間パターン形成と、ミクロな遺伝子発現制御の関係を定量的に示すことができた。今後、細胞分化の文脈における、マクローミクロ間の支配関係、及び両者のバランスは如何に決定されているのか、という新たな問題の解決に取り組むべきであると考ええる。