

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「生体恒常性維持・変容・破綻機構のネットワーク的理解に基づく最適医療実現のための技術創出」研究領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 個体における組織細胞定足数制御による恒常性維持機構の解明
(英語) Mechanisms of homeostatic maintenance by quorum control of the tissue in whole body

研究開発担当者 (日本語) 大学院薬学系研究科・教授・三浦 正幸

所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences. Professor. Masayuki Miura

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 個体における組織細胞定足数制御による恒常性維持機構の解明

開発課題名： (英語) Mechanisms of homeostatic maintenance by quorum control of the tissue in whole body

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 発生で器官形成がおきる時期は、細胞増殖と分化とがともに進行する特徴的な時期である。胚発生がこの時期を通過することは進化的に保存されており系統典型的時期として知られている。この時期以降、組織特異的な細胞が分化するとともに、増殖に徐々に制動がかかることで個々の組織は適正なサイズに調節される。系統典型的時期には、その後の組織形成過程を規定する胚全体としてのスイッチ機構があると考えられるが、本研究ではエネルギー代謝のスイッチに注目した。
- ・ ショウジョウバエでは胚から幼虫へと変化する時期が系統典型的時期にあたり、解糖系およびペントースリン酸経路が促進されることが知られている。マウスにおける系統典型的時期は神経管形成期 (または漿尿膜分岐期) に相当する。この時期は、神経系形成に必要な急激な細胞数の増加と神経系細胞の分化とが同時進行することに加え、大量

の細胞死が神経上皮でおこる。漿尿膜分岐期（胎生 8.5-10.5 日）は、引き続き生じる漿尿膜胎盤の形成（～胎生 12 日目）に先んじて母体と胚との間のガスや栄養供給形式が大きく変化するステージである。以上のことから、この時期のあいだに急激な代謝スイッチが生じると予想された。

- マウスの漿尿膜分岐期に生じる代謝産物プロファイルの変化を網羅的に解析（メタボローム解析）した結果、胚のグルコース代謝経路が再編成される様式が明らかになった。具体的には、この時期に解糖系代謝酵素である PFK-1 および Aldolase の活性が全身性に抑制され、その下流の代謝産物量が大幅に減少する一方で、解糖系経路から分岐し、核酸合成や細胞の酸化還元状態の維持に重要な役割を果たすペントースリン酸経路を迂回して代謝されるグルコースが増加することが明らかとなった。また質量分析法を用いた分子イメージング技術を用いることで、胚体内における代謝産物の空間分布の可視化にも成功し、解糖系代謝産物である乳酸、および TCA 回路の代謝産物であるクエン酸の分布が神経管周辺で高いことも明らかになった。発生タイミング制御に関わるとされる RNA 結合蛋白質 Lin28a の遺伝子発現がこのグルコース代謝経路の再編成が生じる時期に一致して減少することから、その一過的な過剰発現を行ったところ上記グルコース代謝経路の再編成が乱され、出生直後に致死にいたることが明らかになった。これらの結果から、漿尿膜分岐期に生じるグルコース代謝経路の再編成が個体の生存に重要な役割を担う可能性が示唆された。母体糖尿病に伴う高グルコースなど、細胞の代謝状態を攪乱するような因子に胎児がさらされると神経管閉鎖過程等に異常を示すが、本研究はそのような非遺伝学的要因により引き起こされる先天異常の発症機構解明にも役立つと期待される。

- Developmental stage when organogenesis begins is unique because proliferation and cell differentiation concomitantly are accelerated. This stage is conserved evolutionally and named as phylotypic stage. After this stage, cell proliferation gradually decreases to establish the tissue quorum, and cell differentiation dominates to generate mature tissues. To support the organogenesis, energy metabolism must be coordinated.

Phylotypic stage of *Drosophila* is the transition stage from embryo to larva, and acceleration of glycolysis and pentose phosphate pathway has been reported. Phylotypic stage of mouse is the stage accompanying neural tube closure and chorioallantoic branching (CB) to establish proper maternal-fetal exchange of gases and nutrients. To understand the coordination of these developmental events with energy metabolism, we examined metabolic state of mouse embryos during CB stage.

We conducted metabolic profiling of CB (E8.5-10.5) using capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS) and this profile suggested the remodeling of the glycolysis and enhancement of TCA cycle during CB. Expression and activity of glycolytic enzyme PKF-1 and aldolase were reduced. Metabolite analysis by ion chromatography connected to a Fourier transform orbitrap mass analyzer (IC-MS) and a ¹³C-glucose tracing revealed developing embryos redirected glucose carbon flow into the pentose phosphate pathway during CB. Imaging mass spectrometry demonstrated that the dorsal or posterior neural tube contains high amount of lactate and citrate, suggesting enhancement of both glycolysis and TCA cycle in developing central nervous system. Furthermore, we found that suppressing down-regulation of a heterochronic gene Lin28a during CB disrupted the remodeling of glycolysis and resulted in perinatal lethality. Thus lin28a could act as

a regulator of the metabolic changes observed during CB. Thus, our work demonstrates that developing embryos rewire glucose metabolism following CB for normal development. Metabolic state to extracellular environment may underlie the vulnerability of embryos during CB to perturbation of the intrauterine environment, including diabetes-induced hyperglycemia.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4件、国際誌 5件)

1. Shinoda N., Obata, F., Zhang, L., and Miura, M.: *Drosophila* SETDB1 and caspase cooperatively fine-tune cell fate determination of sensory organ precursor. *Genes to Cells* 21, 378-386, 2016. doi: 10.1111/gtc.12348
2. Sakuma, C., Saito, Y., Umehara, T., Kamimura, K., Maeda, N., Mosca, T.J., Miura, M., Chihara, T.: The Strip-Hippo Pathway Regulates Synaptic Terminal Formation by Modulating Actin Organization at the *Drosophila* Neuromuscular Synapses. *Cell Rep.* 16, 2298-2297, 2016. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.066.
3. Doura, T., Kamiya, M., Obata, F., Yamaguchi, Y., Hiyama, TY., Matsuda, T., Fukamizu, A., Noda, M., Miura, M., and Urano, Y.: Detection of *LacZ*-positive cells in living tissue with single-cell resolution. *Angewandte Chemie* 55, 9620-9624, 2016. doi: 10.1002/anie.201603328
4. Miyazawa, H., Yamaguchi, Y., Sugiura, Y., Honda, K., Kondo, K., Matsuda, F., Yamamoto, T., Suematsu, M., and Miura, M.: Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching. *Development* 144, 63-73, 2017. doi:10.1242/dev.138545 (this issue で紹介)
5. Kashio, S., Obata, F., and Miura, M.: How tissue damage MET metabolism: Regulation of the systemic damage response. *FLY* 11, 27-36, 2017 doi:10.1080/19336934.2016.1221549
6. 勝山朋紀、三浦正幸 : 発生、組織修復、再生におけるアポトーシスの役割、*実験医学* 34, 1026-1031, 2016
7. 劉霆、三浦正幸、山口良文 : アポトーシスとパイロトーシスのイメージング、*実験医学* 34, 1203-1209, 2016
8. 三浦正幸 : S-アデノシルメチオニン代謝と全身性傷害応答、*実験医学* 34, 2430-2436, 2016
9. 三浦正幸 : S-アデノシルメチオニン代謝は寿命延長の鍵、*医学のあゆみ* 258, 801-802, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Miura, M.: Metabolic control of animal development in neural tube closure stage. University of Cambridge and University of Tokyo joint retreat. 2017. 2.1, Hakone, Japan
口頭発表、国内
2. Miura, M.: Biology of cell destruction: active roles of cell death in development and organismal homeostasis. The 17th RIKEN Center for Developmental Biology Lecture. 2017.1.30, Kobe, Japan
口頭発表、国外
3. Miura, M.: Metabolic control of tissue repair and homeostasis in *Drosophila*. International Symposium "Cell competition, apoptosis and cancer", 2016. 10. 25-26, Madrid, Spain
口頭発表、国外
4. Miura, M.: Systemic damage response through S-adenosyl-methionine metabolism. International Symposium "Pharmacology of 7TM-receptors and downstream signaling pathways", 2016.9.21-22, Bonn, Germany
口頭発表、国外
5. Miura, M.: Tissue damage response through systemic regulation of S-adenosyl-methionine metabolism. International Symposium on Transcription and Metabolism, 2016.2.17, Tokyo, Japan
口頭発表、国内
6. 三浦正幸: 発生と組織恒常性における細胞死機能の多様性、第 21 回 分生研シンポジウム、2016. 12. 21、東京、口頭発表、国内
7. Miura, M.: Coordination of cell death and proliferation in tissue quorum control. Symposium in New biological principles emerged from cell-cell communications. The 68th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, 2016.6.17, Kyoto, Japan
口頭発表、国内
8. 三浦正幸: 組織形成における細胞死機構、第 121 回日本解剖学会シンポジウム、2016. 3. 29、郡山、口頭発表、国内
9. Katsuyama, T., Kashio, S., Zhou, M., and Miura M.: Determining molecular mechanisms for tissue non-autonomous responses to disc damage in *Drosophila melanogaster*. The 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016.9.9-11, Tokyo, Japan
口頭発表、国内
10. Tsuda-Sakurai, K., Obata, F., Yamazaki, T., Nishimura, K., and Miura, M.: S-adenosylmethionine governs *Drosophila* intestinal homeostasis. The 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016.9.9-11, Tokyo, Japan
口頭発表、国内
11. 松本雄大、濱地美里、吉田裕樹、山口良文、三浦正幸: アポトーシスによる哺乳類中脳蓋板の形成制御機構の解明 第25回日本Cell death学会学術集会、2016. 9. 9-10、東京、口頭発表、国内
12. 西村桂、小幡史明、三浦正幸: 局所的なネクロシスは、血中の新規プロテアーゼを介して全身性に自然免疫Toll経路を活性化する 第 2 5 回日本 Cell Death学会学術集会、2016. 9. 9、東京、口頭発表、国内
10. Yamaguchi, Y., Matsumoto, M., Hamachi, M., Nonomura, K., Shinotsuka, N., Miura, M.: Elimination of the boundary cells by apoptosis in the dorsal midline of the midbrain after the neural tube closure, Gordon Research Conference "Cell Death", 2016.7.3-8, Girona, Spain. ポスター発表、国外

11. Kashio, S., Obata, F., Zhang, L., Katsuyama, T., Chihara, T., and Miura, M.: Systemic influences of methionine metabolism in fat body for *Drosophila* imaginal disc repair. 57th ANNUAL DROSOPHILA RESEARCH CONFERENCE, 2016.7.13-17, Orlando, FL, USA ポスター発表、国外
12. Kashio, S., Obata, F., Zhang, L., Katsuyama, T., Chihara, T., and Miura, M.: Fat body methionine metabolism remotely affects regenerative response in *Drosophila* imaginal disc. The 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016.9.9-11, Tokyo, Japan ポスター発表、国内
13. Zhou, M., Katsuyama, T., and Miura, M.: Establishing a system for investigating cellular reprogramming process during disc regeneration in *Drosophila melanogaster*. The 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016.9.9-11, Tokyo, Japan ポスター発表、国内
14. Fujisawa, Y., Chihara, T., and Miura, M.: To investigate the mechanism of crowding-induced cell elimination. The 12th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2016.9.9-11, Tokyo, Japan ポスター発表、国内
15. Kondo, K., Miyazawa, H., Saito, N., Yamaguchi, Y., and Miura, M.: Investigation of the effect of energy metabolic modulation on differentiation of embryonic stem cells to neural stem cells, 第39回日本分子生物学会、2016.11.30-12.2、横浜、ポスター発表、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 三浦正幸：感受性の高さの研究、2016.6.4 鎌倉学園、鎌倉、国内
鎌倉学園中学・高校における K-Labo Forum 2016 「研究って何？研究者ってどんな人？」にて講演をし、座談会を行った。

(4) 特許出願

無し