

栗原 裕基

東京大学大学院医学系研究科  
教授

細胞動態の多様性・不均一性に基づく組織構築原理の解明

## § 1. 研究実施体制

### (1) 栗原グループ

- ① 研究代表者: 栗原 裕基 (東京大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目: 発生過程の細胞動態解析による組織構築原理の解明
  - ・ 心臓を形成する細胞の多様な起源の解明と動態解析
  - ・ in vitro 新生血管のライブイメージングによる細胞動態の解析

### (2) 和田グループ

- ① 主たる共同研究者: 和田 洋一郎 (東京大学アイソトープ総合センター、教授)
- ② 研究項目: クロマチン構造変化に基づく組織構築原理の解明
  - ・ 血管内皮細胞における単一細胞レベルでの遺伝子発現動態解析

### (3) 時弘グループ

- ① 主たる共同研究者: 時弘 哲治 (東京大学数理科学研究科、教授)
- ② 研究項目: 細胞動態の数理モデル化による組織構築原理の解明
  - ・ 血管新生の数理モデル構築とシミュレーション
  - ・ 心筋細胞の同期現象の集団効果に関する数理モデルの構築

### (4) 安田グループ

- ① 主たる共同研究者: 安田 賢二 (東京医科歯科大学学生体材料工学研究所、教授)
- ② 研究項目: 細胞集団のダイナミクス解析による組織構築原理の解明
  - ・ 心筋細胞の集団化による同期現象のオンチップ解析
  - ・ 血管内皮細胞の細胞識別精製技術の検討
  - ・ 血管内皮細胞の1細胞レベルダイナミクスの構成的解析のための技術支援

## § 2. 研究実施の概要

### 栗原グループ

#### (1) 血管新生における細胞動態の解析

マウス大動脈片組織培養による *in vitro* 血管新生のタイムラプスイメージングからの実験データを基盤とした確率論的数理モデルから、個々の細胞の自律的運動と細胞間相互作用との組み合わせによって、血管伸長過程での追い越し現象や速度変化などを伴う複雑な細胞動態が説明できることを明らかにした (Sugihara et al. *Cell Rep.* 2015)。また、時弘グループによる決定論的モデルの確立に実験面から貢献するとともに、その細胞動態の基本となる2細胞間の動態相関について検討し、多種細胞と異なる内皮細胞特有の性質を見出した。さらに、和田グループと共同で、同種内皮細胞株で通常培養とゲル内血管新生モデル形成過程で単一細胞レベルでの遺伝子発現パターンをC-1(Fluidigm 社)を用いて比較し、血管新生過程で変動する遺伝子をいくつか同定し、その機能解析を進めている。

#### (2) 心臓発生における起源多様性と神経堤細胞動態の発生学的解析

心臓発生においては、これまで頭頸部の骨格形成に寄与していると考えられてきた前耳胞領域の頭部神経堤細胞が心臓内に流入し、冠動脈平滑筋への分化とともに *c-Kit* 陽性の幹細胞様細胞群を含む細胞集団を形成することを見出した。さらに、鰓弓近傍の新たな領域から流入する細胞群をも見出し、これらの多様な細胞がどのように相互作用して心臓形成に貢献しているかを検討している。一方、神経堤細胞関連で頭部骨格形成に関する理研の倉谷滋博士らとの共同研究が進展し、哺乳類と単弓類(爬虫類、鳥類)の鼓膜は進化の過程でそれぞれ独立に獲得されたという進化生物学上の仮説を実験発生学的に証明することができた。

### 和田グループ

#### (1) 血管新生で変動する遺伝子発現のクロマチンダイナミクス解析

血管新生における、個々の内皮細胞は遺伝子発現パターンを変化することによってその役割をはたすが、これに先立ち変動する遺伝子を含む領域のクロマチン構造変化が生じる。このクロマチン立体構造を明らかにするため、活性型 RNA ポリメラーゼ II 抗体を樹立して、3C(Chromatin Conformation Capture)に基づく網羅的相互作用解析 (Chromatin interaction analysis with paired end tag sequencing, ChIA-PET) や、Hi-C を行った。

#### (2) 細胞集団のシグナル受容と遺伝子発現の同期性・不均一性の解析

単一内皮細胞の挙動を明らかにする為、内皮細胞の分化誘導系において条件検討を行った。内皮細胞の分化段階を代表する、定量 PCR プライマーを設計し、経時的に観察したところ、内皮細胞への分化誘導刺激にともなって、内皮マーカーを強発現する細胞の割合が増加する様子を確認できることが判ったので、単一細胞における遺伝子発現を網羅的に測定する手法によって、不均一性の実体を明らかにするための準備を行った。

## 時弘グループ

### (1) 血管新生の数理モデル

昨年度、西山-栗原らによる血管新生の実験に基づき構成した、血管新生の伸長と分岐の離散数理モデルについて、数学的な解析を行った。その結果、血管の伸長が、時間とともに $2/3$ 乗のべきで伸びてゆくスケール則が得られ、このスケール則を連続極限における非線形反応拡散方程式系を用いて証明した。また、このモデルにおいて、周期振動する厳密解を与えた。さらに、より広範囲のパラメータに対して数値シミュレーションを行い、分岐によって生じる分岐の統計的分布が指数分布であることを見出した。一方、この離散モデルの連続極限で得られた微分方程式モデルに対しても、外部要因、細胞分裂の効果、VEGF の影響、血管の再結合などを含むモデルに改良し、パラメータ変化による影響などについて議論した。

### (2) 心筋拍動の数理モデル

統計力学の基本定理の一つである揺動散逸定理をもとに、不応期を持つ積分発火モデルに確率過程と細胞間相互作用を取り入れた 2 細胞モデルを構成した。モデルの本質的なことは確率過程と細胞間相互作用が揺動散逸定理で結ばれていることである。このモデルで数値シミュレーションを行ったところ、実験的にも例外であった一例を除いて実験値と理論値が定量的に極めてよい一致をあたえ、安定な細胞に同期する現象の理論的根拠が揺動散逸定理であることを示すことができた。この数理モデルは *in silico* 実験に十分使えるため、数十個の細胞のシミュレーションを行い、揺らぎの変化が早い段階で  $1/2$  乗則から外れることを示した。

## 安田グループ

### (1) 心筋細胞の集団化による同期現象のオンチップ解析

心筋細胞の拍動同期化現象との相関を明らかにするため、細胞間興奮伝導についての心筋細胞ネットワーク解析を推進した。心筋細胞と線維芽細胞を混在させた細胞ネットワークを用いてその興奮伝導の解析を開始し、同じ伝導経路でありながら、伝導方向の正逆によって伝導速度が異なるという現象を見出した。

### (2) 内皮細胞特異的に結合する DNA アプタマーのスクリーニング等の細胞識別精製技術の検討

独自に開発した Cell Selex 法を用いて、内皮細胞に特異的に結合する DNA アプタマー候補の選定とその各候補の特異性の検証を前年に引き続き推進しアプタマーの採取に成功した。

### (3) 血管内皮細胞の 1 細胞レベルダイナミクスの構成的解析のためのマイクロ加工技術を用いた技術支援

血管内皮細胞の相互作用を構成的に理解するため、テフロンナノ粒子を基板上にパターニングして固定することで細胞の空間配置を制御する技術の原理開発に成功した。現在、これを加工装置技術として実用化できるように開発を継続している。

### (4) 神経細胞ネットワーク間の相互評価のための神経細胞配置制御技術の開発

神経細胞ネットワークの配置技術についても開発を開始し、神経細胞ネットワークのレイヤーを酵素処理を行うことなく剥離して重ね合わせる技術を開発した。さらにアガロース加工技術を海馬 1 細胞培養系に適用して、神経突起に他細胞のシナプスが接触したときにスパインが形成されるどうかを検証する手法を開発した。

代表論文

1. Kitazawa T, Takechi M, Hirasawa T, Adachi N, Narboux-Nême N, Kume H, Maeda K, Hirai T, Miyagawa-Tomita S, Kurihara Y, Hitomi J, Levi G, Kuratani S, Kurihara H. Developmental genetic bases behind the independent origin of the tympanic membrane in mammals and diapsids. *Nat. Commun.* 6:6853, 2015.
2. Sugihara K, Nishiyama K, Fukuhara S, Uemura A, Arima S, Kobayashi R, Köhn-Luque A, Mochizuki N, Suda T, Ogawa H, Kurihara H. Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical modeling. *Cell Rep.* 13(9):1814-1827, 2015.
3. 血管新生の数理モデル. 間田潤, 松家敬介, 由良文孝, 栗原裕基, 時弘哲治. 日本応用数理学会論文誌. 26(1):105-123, 2016.