

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 (早稲田大学理工学術院先進理工学部物理学科、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

時弘グループによる決定論的数理モデルの確立に実験面から貢献するとともに、「血管伸長は根元からの細胞供給に依存する」というモデルからの帰結を、マウス大動脈片を用いた発芽血管新生モデルによって実験的に検証した。マウス膝ラ氏島微小血管由来内皮細胞株 MS-1 細胞を用いて血管新生を模する発芽形成を再現、マウス大動脈片によるアッセイと同様の細胞動態を認め、この細胞における2細胞間の基本動態の解析によって内皮細胞特有の協調運動が明らかになった。この基本動態に基づいた数理モデルの改良を検討している(時弘 G)。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転写因子と、その結合モチーフをエンハンサー領域にもち、かつ同様の発現変動パターンを示す遺伝子群を同定した。現在その機能解析を、細胞運動における役割を中心に進めている。

(2) 心臓発生における起源多様性と細胞動態の解析

心流出路に遊走して心臓形成に寄与する3つの細胞群について解析を進めた。①羊膜原基となる胚外体壁葉の中胚葉細胞が胚内に流入し、心筋細胞や血管内皮細胞に分化する可能性を明らかにした(論文投稿中)。②これまで前耳胞領域の頭部神経堤細胞が心臓内に流入し、冠動脈平滑筋に分化することを明らかにしてきたが、心臓内の神経堤細胞の単一細胞レベルでの遺伝子発現解析により、幹細胞様の細胞群を含む多様な細胞集団を形成していることが明らかになった。③冠動脈形成に大動脈起始部周囲のリンパ管細胞が重要な役割を果たしており、その制御に Semaphorin シグナルが関与していることを明らかにした。これらの細胞は心流出路において相互作用が考えられ、その心臓形成における意義についてさらに解析を進めている。

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、及び 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

血管新生において変動する遺伝子群の一つとして同定した転写因子について、既存抗体を用いた ChIP によって、直接結合して発現調節する遺伝子群の同定を試みた。Public database を用いて結合推定領域に primer を設計し、クロスリンク固定した MS1 細胞を転写因子抗体で ChIP-qPCR を行った。その結果、濃縮率の増加するゲノム領域を見出すことができた。この領域は、当グループが実施したクロマチン相互作用解析結果と比しても、遺伝子制御領域として妥当な領域であり、当該転写因子の結合可能性を支持している。また、この下流遺伝子候補は、単一細胞遺伝子解析において、転写因子と同様の変動パターンを示しており、実際に発現制御に関与している可能性がある。今後、Chromatin conformation capture (3C) によって転写開始点との距離を可視化、定量化すると同時に、網羅的解析を実施するために十分な細胞を調製する。詳細な経時的観察するためにはプロモーター、エンハンサー、転写因子結合領域などに設計した

primerを用いた capture Hi-C が効率的であり、今年度は、内皮細胞のヒストン修飾データに基づく primer を設計し Hi-C を実施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

栗原 G の実験解析で明らかになった、2細胞間の回転運動と見られる相互作用を取り入れ、これまでに構築した数理モデルの改良を行った。実験データとの比較によって、モデル内のパラメータを決定し、内皮細胞の1次元的な往復運動の再現を行った。その結果、摩擦項(速度に比例する制動の効果)がほとんどゼロであることがわかり、細胞運動では自己駆動能の重要性がわかった。また、実験との定量的な比較検討を行うためには、1次元的な相互作用だけではなく、少なくとも2次元の相互作用を考慮する必要があることがわかった。そのため、これまでの数理モデルを2次元に拡張し、媒質との相互作用を取り入れたものへの改良を行った。また、血管の管腔構造を生じる、幾何学的なトイモデルを構成し、初等的な解析を行った。

(2) 心筋拍動の数理モデル

昨年度構成した、不応期を持つ積分発火確率微分方程式モデルを、心筋細胞と拍動を生じない線維芽細胞との混合系に応用し、2~3細胞系で行われた実験データとの比較を行った。相互作用のパラメータを適切に選べば、ほぼ実験結果を再現することがわかった。ただし、このままでは *in silico* 実験には使えないため、安田 G の実験を待って、より適切なモデルに改良してゆく必要がある。また、多細胞系(数千程度の細胞)に対して、異種細胞の混合をパーコレーション理論によって解析することを試み、相転移現象と比較し検討を行った。

安田グループ

(1) 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

中間評価の助言に従って、今年度より、心筋細胞の同期研究については、今までの研究をまとめる範囲に留め、また、他のサブテーマについても論文化をすところまで進めてまとめる方向で整理を進め、本プロジェクト内では、血管新生に関する研究に集中することとした。この中で、まずは血管内皮細胞の相互作用を構成的に理解するため、従来の基板上的アガロース微細構造での課題を解決する新しい3次元での微細加工技術を模索し、2つの新しい手法の開発を推進した。

①アガロースの3次元加工技術の開発と、アガロース内部に細胞が足場となる分子を修飾する技術の開発:3次元微細加工は、水の吸収が無い 1064 nm 赤外集束光と数ミクロンの吸収領域を持つ微細マイクロニードルを用いることで自在なサイズでゲル中にトンネルを構築が可能となった。アガロース内壁面への細胞の接着性については、細胞接着性因子を表面に被覆したナノ粒子をアガロースに混合することで、このナノ粒子が足場として機能することを確認した。今後、足場となるナノ粒子の内壁面での面密度や足場物質の違いによる運動性の違いを定量的に計測することが可能となるように、さらに定量的な評価を進めている。

②ゼラチンの3次元微細加工技術の開発:アガロースに替えてゼラチンを用いた微細加工技術の開発にも取り組み、同様にゼラチンゲル中に3次元の微細構造を作る技術の基礎検討に成功した。

他方、ゼラチンにはアガロースと異なり微細加工後に構造が収縮して変化するという課題が新たに見出されたことから、これを解決する手法を検討している。

代表論文

1. 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.
2. Matsuya K, Yura F, Mada J, Kurihara H, Tokihiro T. A Discrete Mathematical
Model for Angiogenesis. SIAM J. Appl. Math. 76(6): 2243–2259, 2016.
3. Terazono H, Kim H, Nomura F, Yasuda K. Development of a
microprocessing-assisted cell-systematic evolution of ligands by exponential
enrichment method for human umbilical vein endothelial cells. Jpn J Appl. Phys55,
06GN03, 2016.