

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で仮定している細胞間相互作用の距離依存性と、モデルから帰結される発芽伸長の細胞供給依存性について、時弘グループと共同で血管新生過程での細胞計測データに基づく検証を行った。この発芽伸長を可能にする血管内皮細胞の集団的運動特性を明らかにするため、マウス腭ラ氏島微小血管由来内皮細胞株 MS-1 細胞の動態を解析したところ、細胞接触による方向性を持った直線運動と回転運動の亢進がその基盤となっていることを見出した。各種阻害剤やゲノム編集による遺伝子改変により、これらの内皮細胞特有の運動特性を規定する分子が一部明らかになった。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特定転写因子とその下流候補遺伝子群を同定するとともに、クラスタリング解析などにより血管新生に伴う遺伝子変動のパターンが明らかになり始めた。現在、遺伝子発現プロファイルと細胞表現型を対比させながら、細胞運動と転写制御の連携機構の解明を進めている。

(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こと、これらの分化誘導に BMP、FGF シグナルがそれぞれ関わることを明らかにした。②心臓内に流入する神経堤細胞のトランスクリプトーム解析により、幹細胞・前駆細胞様の未分化細胞群、平滑筋様細胞などを含む多様な細胞集団を形成していることを明らかにし、細胞系譜の時間発展予測を行った。③冠動脈形成において、大動脈起始部周囲の胎生期毛細血管網とそこから派生すると思われるリンパ管細胞が関与しており、Semaphorin シグナルが関与していることを明らかにした。これらの多様な細胞群間の相互作用がそれぞれの組織形成を通して心臓発生にどのように寄与しているか、現在解析を進めている。

時弘グループ

(1) 血管新生の数理モデル

栗原グループの血管新生初期における内皮細胞の運行に関する実験データに対して、いわゆる松家モデルを2次元的に拡張し、異方的な相互作用を取り入れた数理モデルを実験データと比較し、モデル内のパラメータを決定し、内皮細胞の往復運動の再現を行った。その結果、異方性の効果が重要であり、同じ進行方向を向く細胞間では引力相互作用が弱く、逆に異なる進行方向の細胞間では強い相互作用が生じることがわかった。また、エントロピーの概念を用いることで、異方性を持つモデルの方がより実験に近いセルミキシングを生じることがわかった。

次に、形状の効果と異方性の効果を取り入れた2次元の数理モデルを構成した。引力相互作用、排除体積効果に加えて形状のパラメータとして扁平率を用い、生じる慣性モーメントに対する影響を取り入れると、扁平率が大きくなるほど細胞同士が進行方向を揃えることがわかった。このモデル

では、扁平率が小さい場合には、単なる凝縮あるいは一様な拡張しか見られないが、大きくなると自然に分岐伸長を行い、内皮細胞を一様に分布させた初期状態から血管網の構成が観測され、細胞増殖による血管新生と細胞の一様分布からの血管網生成のどちらも記述できる。この両者を同時に説明できるモデルはこれまでに存在せず、内皮細胞運動の本質を捉えたモデルと考えている。

(2) 心筋拍動の数理モデル

確率微分方程式を用いた不応期を持つ積分発火モデルについての研究をまとめ、**Scientific Reports** に発表した。また、多細胞系(数千程度の細胞)に対して、異種細胞の混合を行い、その割合や形状における同期現象の有無、同期による周波数変化などを考察した。今後の実験を待つて、パラメータ比較などを行う予定である。

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

血管新生モデルにおけるトランスクリプトーム解析によって一群の遺伝子群を同定したが、特に Klf4 について先導的な研究を行った。本転写因子は、山中因子の一つとして広く知られているが、血管内皮細胞の機能に深く関与していることも知られている。Klf4 による血管新生における内皮細胞の機能制御機序は本研究の重要なテーマである。実際に制御している遺伝子群の同定には、良好な抗体による ChIP-Seq データが不可欠である。我々は今回あらたに Klf4 抗体を樹立し、ChIP によるスクリーニングを行い ChIP-Seq に適した抗体を選んだ。実際既知の Klf4 制御遺伝子上で良好な濃縮率をえることができたため、ChIP-Seq を実施した。他のヒストン修飾、とりわけエンハンサーマークとの相関関係が良好であったことから、本抗体が Klf4 を特異的に認識することが強く示唆された。さらに、Klf4 をノックアウトした細胞を使った同様の実験によって、Klf4 シグナルの特異性が確認された。今年度の研究によって、Klf4 の特異的結合部位が確認できたので、当該領域に設計したプライマーによる capture Hi-C が可能となり、内皮細胞の機能変化におけるクロマチンダイナミクスおよびその原理の解明を次年度に予定している。

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

中間評価でのプロジェクトの方向性の集中についての助言に従って、昨年度より、心筋拍動の同期研究については、それまでの研究をまとめる範囲に留めてまとめる方向で整理を進め、本プロジェクト内では、血管新生に関する技術支援の開発、研究に集中することとした。血管内皮細胞の相互作用を構成的に理解するため、従来の基板上の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、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、さらに毛細血管サイズの微細構造から自在に内径を変化させることができる微細加工技術とすることに成功した。この毛細血管サイズの微細構造を利用して、実際に MS-1 細胞等の3次元構造内での運動ダイナミクスの計測、解析にも成功した。

代表論文

1. Asai R, Haneda Y, Seya D, Arima Y, Fukuda K, Kurihara Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Amniogenic somatopleure: a novel origin of multiple cell lineages contributing to the cardiovascular system. *Sci. Rep.* 7(1):8955, 2017.
2. Hayashi T, Tokihiro T, Kurihara H, Yasuda K. Community effect of cardiomyocytes in beating rhythms is determined by stable cells. *Sci Rep.* 7(1):15450, 2017.
3. Hayashi T, Tokihiro T, Kurihara H, Nomura F, Yasuda K. Integrate and fire model with refractory period for synchronization of two cardiomyocytes. *J. Theor. Biol.* 437:141-148, 2018.