

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「多細胞間での時空間的相互作用の理
解を目指した定量的解析基盤の創出」
研究課題「体表多様性を創発する上皮―間充織相
相互作用の動的制御機構の解明」

研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者: 藤原 裕展
(理化学研究所 生命機能科学研究所 センター チームリーダー)

§1 研究実施の概要

(1) 実施概要

「体表多様性を創発する上皮-間充織相互作用の動的制御機構」を解明するため、藤原グループのマウス毛包発生の長期ライブイメージング法と、二階堂グループの高精度 1 細胞トランスクリプトーム法を組み合わせることで、1 細胞レベルで細胞の動態、系譜、遺伝子発現を経時観察できる解析手法を開発した。この手法により、毛包上皮の多細胞の動態、系譜、遺伝子発現状態の変化を網羅的に記述した「毛包発生の 4D アトラス」を作成した。アトラスの解析により、毛包が望遠鏡が伸びるような多細胞動態で発生することを見出し、それをもとに毛包を構成する細胞の区画化と幹細胞誘導を同時に可能とする形態形成機構として「テレスコープモデル」を提唱した。本成果は、毛包幹細胞の細胞起源と誘導モデルに関する従来の理論を根本的に書き換える重要な発見と位置づけられる。また、上皮と間充織との相互作用を仲介する基底膜のリアルタイム可視化法を開発し、基底膜が弾塑性膜としての性質を持つことを示すとともに、その膜としての振る舞いのダイナミクスが毛包の形態形成を制御する機構を明らかにした。二階堂グループでは、上記の藤原グループとの共同研究に加え、1 細胞遺伝子発現データから予測が困難な多対多の細胞間相互作用を予測する新規手法を開発した。その手法を胃の発生へ応用することで、胃の幹細胞と胃粘膜分泌細胞の分化・維持に関わる細胞相互作用シグナルを同定した。さらに、独自に開発した高精度 1 細胞 RNA-seq 法「Quartz-Seq2」をマイクロ流体装置等と融合することで 1 細胞 RNA-seq のスループット向上の見込みが得られた。長山グループは、独自の 3 次元多細胞モデルに基底膜モデルを導入することで、毛包の初期陥入現象は、上皮細胞の増殖パターン、基底膜の拡張性、そして真皮の弾性の時空間制御により実現されるとの結果を得た。大浪グループは、独自開発のイメージデータレポジトリとデータベースを多細胞領域用に改変し、領域内イメージデータ共有プラットフォームを確立した。藤原グループを含む多くの領域メンバーのイメージデータレポジトリ/データベースとしての活用が進んでいる。以上の成果により、上皮-間充織相互作用を解析する新規研究ツールの開発や、上皮-間充織相互作用による器官形成の動的制御機構の理解が進んだ。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 毛包幹細胞の発生起源を解明 ～筒状の区画に幹細胞を誘導する「テレスコープモデル」の提唱～

概要： マウス毛包発生の長期 *ex vivo* ライブイメージングと 1 細胞トランスクリプトーム解析を組み合わせ、1 細胞レベルで細胞の動態、系譜、遺伝子発現を経時観察できる独自のデータ駆動型の解析手法を開発した。この手法により、毛包が望遠鏡が伸びるような多細胞動態で発生することを見出し、それをもとに毛包を構成する細胞の区画化と幹細胞誘導を同時に可能とする形態形成機構として「テレスコープモデル」を提唱した (Morita et al., *Nature* 2021)。本成果は、毛包幹細胞の細胞起源と誘導モデルに関する従来の理論を根本的に書き換える重要な発見と位置づけられ、*Nature* 誌の NEWS AND VIEWS でも取り上げられた。藤原グループと二階堂グループの共同研究成果。

2. 基底膜が多様な上皮と間充織組織を一体化する機構を解明

概要： 基底膜は上皮と間充織をつなぐ細胞外マトリックス (ECM) で、その物理化学的性質により細胞の挙動や運命を制御している。我々は、成体皮膚における ECM 分子の mRNA 発現とタンパク質の空間情報を網羅した「Skin ECM アトラス」を作成した。このアトラスにより、基底膜が組織領域ごとにその分子組成を最適化することで、上皮と間充織の多様な組織を一体化するインターフェースとして機能していることが明らかになった (Tsutsui et al.,

Nature Communications 2021)。細胞間相互作用の研究では ECM の役割が見過ごされがちであるが、本研究は基底膜が上皮-間充織相互作用において重要な役割を果たすことを示した。

3. 基底膜のリアルタイム可視化法の開発と、基底膜ダイナミクスが毛包形成を制御する機構の解明

概要： 基底膜タンパク質の動態をマウスの発生組織内でリアルタイム計測できるライブイメージング技術を開発した。摂動実験と組み合わせることで、基底膜タンパク質のターンオーバー時間が基底膜の拡張速度に影響を与え、これが毛包の上皮形態形成を制御することを明らかにした (Wuergezhen et al., *Journal of Cell Biology* 2025; 特願 2024-61790)。内在性の基底膜コアタンパク質を機能を損なわずに蛍光標識し、長時間ライブイメージングすることが技術的に困難である状況下、哺乳類の組織でそれを達成した本研究成果は国際的に高く評価されている (Stramer & Sherwood, *Journal of Cell Biology* 2024)。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 細胞間相互作用を予測する新規手法の開発とその器官発生現象への適用

概要： 1 細胞遺伝子発現データから細胞間相互作用を予測する手法を開発した (Tsuyuzaki et al., *BMC Bioinformatics* 2023; Tsuyuzaki et al., *Journal of Open Source Software* 2023)。細胞相互作用予測を胃の発生へ応用することで、胃の幹細胞と胃粘膜分泌細胞の分化・維持に関わる細胞相互作用シグナルを同定した (Takada, Sasagawa et al., *Nature Communications* 2023)。藤原チームの毛包上皮細胞と間充織との相互作用の予測に活用できる重要な技術である。また、他のあらゆる 1 細胞トランスクリプトームデータ解析への貢献が期待される。

2. 生命科学画像のデータ形式の標準化とデータ共有リポジトリの整備

概要： バイオイメージングデータのためのプラットフォーム SSBD において、論文投稿や査読にあわせて研究データを公開する SSBD:repository では 2024 年上半期までに 35TB (テラバイト) のデータを公開した。うち 6 データ/1.1TB は CREST 多細胞の支援を受けた研究データである。再利用性が高いデータに豊富なメタデータを付与して共有する SSBD:database においても 11 データセット/3.4TB のデータを公開した。「画像データのオープンフォーマットとデータ共有レポジトリの国際標準に関する国際提言」を取りまとめ公表するとともに (Swedlow et al., *Nature Methods* 2021; Bajcsy et al., arXiv 2024)、バイオイメージングデータの国際的な協働をはかる HORIZON Europe/foundingGIDE プロジェクトの拠点として SSBD が採択されるなど、研究イメージデータの国際標準化・蓄積・共有等に大きく貢献する成果を達成した。

3. 生組織内の力学環境を計測するための新規 AFM 測定技術の開発

概要： C3 プロジェクトにおける奥田グループと藤原グループとの共同研究により、生組織内の力学環境を計測するための、新規 AFM 測定技術を開発した (Shioka et al., *Acta Biomaterialia* 2024)。本技術は、正立蛍光顕微鏡、構造化照明、そして AFM を組み合わせることで、一般的な AFM システムでは困難な、生きた厚みのある立体組織の表面の力学特性の網羅的なマッピング結果と蛍光像の重ね合わせを可能にした。多細胞からなる組織レベルの力学特性の網羅的な解析に威力を発揮すると期待される。

< 代表的な論文 >

1. Tracing the origin of hair follicle stem cells. Morita R, Sanzen N, Sasaki H, Hayashi T,

Umeda M, Yoshimura M, Yamamoto T, Shibata T, Abe T, Kiyonari H, Furuta Y, Nikaido I, Fujiwara H (2021) *Nature*, 594, 547–552

概要：マウス毛包発生の長期 *ex vivo* ライブイメージングと1細胞トランスクリプトーム解析を組み合わせ、1細胞レベルで細胞の動態、系譜、遺伝子発現を経時観察できる独自のデータ駆動型の解析手法を開発した。この手法により、毛包が望遠鏡が伸びるような多細胞動態で発生することを見出し、それをもとに毛包を構成する細胞の区画化と幹細胞誘導を同時に可能とする新しい形態形成のモデルとして「テレスコープモデル」を提唱した。本成果は、毛包幹細胞の細胞起源と誘導モデルに関する従来の理論を根本的に書き換える重要な発見と位置づけられ、*Nature* 誌の NEWS AND VIEWS でも取り上げられた。藤原グループと二階堂グループの共同研究成果。

2. **Mapping the molecular and structural specialization of the skin basement membrane for inter-tissue interactions.** Tsutsui K, Machida H, Nakagawa A, Ahn K, Morita R, Sekiguchi K, Miner JH, Fujiwara H (2021) *Nature Communications*, 12, 2577.

概要：基底膜は上皮と間充織をつなぐ細胞外マトリックス (ECM) で、その物理化学的な性質により、細胞の挙動や運命を制御している。我々は、成体皮膚における ECM 分子の mRNA 発現とタンパク質の空間情報を網羅した「Skin ECM アトラス」を作成した。このアトラスにより、基底膜が組織領域ごとにその分子組成を最適化することで、上皮と間充織の多様な組織を一体化するインターフェースとして機能していることが明らかになった。細胞間相互作用の研究では ECM の役割が見過ごされがちであるが、本研究は基底膜が上皮-間充織相互作用において重要な役割を果たすことを示した。

3. **Single-cell transcriptomics uncovers EGFR signaling-mediated gastric progenitor cell differentiation in stomach homeostasis.** Takeda H#, Sasagawa Y#, Yoshimura M, Tanaka K, Iwayama Y, Hayashi T, Isomura-Matoba A, Nikaido I, Kurisaki A (2023) *Nature Communications*, 14, 3750

概要：二階堂グループが開発した世界最高精度の scRNA-seq 法「Quartz-Seq2」を用いてマウスの胃を構成する様々な細胞の遺伝子の発現を1細胞レベルで精密に解析した。この遺伝子発現解析データを用いることで、胃の幹細胞と胃粘膜分泌細胞の分化・維持に関わる細胞相互作用シグナルを同定した。高精度のデータを取得することで、発現量は低い細胞の分化などに重要な働きをする細胞間相互作用を同定できた。他の scRNA-seq 法では達成困難な独創的成果であると言える。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「藤原裕展」グループ

研究代表者：藤原 裕展（理化学研究所生命機能科学研究センター（BDR） チームリーダー）

研究項目

1. 発生毛包まるごとの 4D イメージングと全細胞規模トラッキング
2. 1細胞トランスクリプトームデータの取得
3. トランスクリプトームデータへの器官内空間情報と細胞型情報の紐付け
4. キーシグナル活性の時空間的変動の解析
5. 摂動と 4D イメージング解析
6. 他の体表器官の 4D イメージングと1細胞トランスクリプトーム解析

② 「二階堂愛」グループ

主たる共同研究者：二階堂 愛（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）

研究項目

1. 1細胞トランスクリプトームデータの取得
2. トランスクリプトームデータに器官内空間情報と細胞型情報を紐付けする方法の開発
3. 細胞間・領域間相互作用ネットワークの同定と、その時空間的変動の解析
4. 摂動と1細胞トランスクリプトーム解析
5. 他の体表器官の1細胞トランスクリプトーム解析

③ 「長山雅晴」グループ

主たる共同研究者：長山 雅晴（北海道大学電子科学研究所 教授）

研究項目

1. 器官発生の数理動態モデル（トイモデル）の作成
2. 数理動態モデルへの実験計測データの適用
3. 数理動態モデルへの細胞間相互作用予測データの統合
4. 数理モデルを用いたテレスコープモデルの普遍性の検証
5. 力学特性を取り込んだ数理モデルの構築

④ 「大浪修一」グループ

主たる共同研究者：大浪 修一（理化学研究所生命機能科学研究センター（BDR）チームリーダー）

研究項目

1. 論文発表済みの成果に関連した研究データやツールを世界に発信する運用システムの構築
2. 未発表の研究データやツールを領域内で共有する運用システムの構築
3. 研究データやツールを世界発信/領域内共有する運用システムの改善

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

① 藤原グループ

【領域内連携】

1. 奥田 覚（金沢大学ナノ研・准教授）：(C3 課題)
「プラコードの形態形成に関わる多細胞間の力学的相互作用の解析 (C3 課題)」において、奥田グループの AFM 計測と 3D バーテックスモデルを藤原チームに導入するとともに、「生組織の弾性率マッピング法」の共同開発を行った (Shioka et al., *Acta Biomaterialia* 2024)。

【領域外連携】

1. 清成 寛（理研 BDR・チームリーダー）：
本事業の遂行に必要な遺伝子組換えマウスの共同開発を行っている。
2. 柴田 達夫（理研 BDR・チームリーダー）：
共同研究により、4D イメージング画像から、基底膜に対する細胞分裂軸の角度を計測するアルゴリズムの開発を行い論文発表した (Morita et al., *Nature* 2021)。コードは GitHub で公開した (<https://github.com/RIKEN-PHB/Morita-Paper-Spindle-Analysis>)。
3. Valentina Greco（米国 Yale University・Professor）：
マウス皮膚上皮のがん組織の形態変化に関与する ECM 分子の同定を共同で行い論文発表した (Xin et al., *Nature Cell Biology* 2024)。

② 二階堂グループ

【領域内連携】

1. 澤井 哲（東京大学・教授）：（C3 課題）
粘菌の 1 細胞 RNA-seq を実施し多細胞動態に関わる遺伝子を同定した。
2. 宮道 和成（理研 BDR・チームリーダー）：（C3 課題）
神経投射と 1 細胞トランスクリプトームを同時に計測する新技術の開発を進めた。
3. 森下 善弘（理研 BDR・チームリーダー）：
空間トランスクリプトーム解析の実験デザインやデータ解析をサポートした。

【領域外連携】

1. 二階堂グループで開発した 1 細胞 RNA-seq 技術を用いて阪大・岡田真里子研 (Michida H. Cell Rep. 2020; Wibisana JN. PLoS Genet. 2021)、順天堂大・加藤忠史 (Sawada T. Mol. Psych. 2020)、神戸大・内匠研 (Lin CW. Mol. Psych. 2022)などと連携し論文を出版した。
2. 2020 年に Human Cell Atlas プロジェクトで実施された 1 細胞 RNA-seq の国際的ベンチマーキングに参加し、二階堂グループが開発した Quartz-Seq2 が世界最高性能であることが示された(Mereu E. Nature Biotech. 2020)。アジアから本研究に招待されたのは二階堂グループのみであり国際的なコミュニティのなかで技術が評価されているといえる。
3. 1 細胞解析技術を中心とした計測技術を開発する研究コミュニティに参加し計測技術のスループット定量のガイドラインに関する論文を出版した(Herbig M. Nature Methods. 2022)。

③ 長山グループ

【領域内連携】

1. 奥田 覚（金沢大学ナノ研・准教授）：（C3 課題）
毛包発生の数理モデル構築に関する議論を行い、互いにフィードバックを得ている。

【領域外連携】

1. 夏賀 健（北大医学部皮膚科・准教授）：
皮膚疾患メカニズムについて本 CREST で構築した数理モデルを用いた共同研究を進めている。
2. 宮井雅史・後藤真紀子（資生堂・研究員）：
角層ピーリングによる表皮構造への影響やシワ構造が表皮構造へ与える影響を評価するために数理モデルを用いた共同研究を進めている。

④ 大浪グループ

【領域内連携】

1. 藤原グループ、榎本チーム今井グループ、澤井チーム澤井グループなどから積極的なデータ提供やシステムに関するフィードバックを受けている。若本チーム若本グループからは数多くの再利用性の高いデータの提供を受けている。

【領域外連携】

1. SSBD:repository に関しては、欧州の BioImage Archive (BIA) 等の生命科学画像データレポジトリと連携し、相互検索に向けたメタデータの共通化などの改良を行っている。
2. SSBD:database に関しては、欧州の Image Data Resource (IDR) 等の生命科学画像の高付加価値 (Added-Value) データベースと連携し、データの相互検索や相互活用の仕組みを導入するなどの改良を行っている。
3. Global BioImaging における顕微鏡画像のメタデータの標準化のための組織や、

QUAREP-LiMi 等の顕微鏡装置・設定に関するメタデータの標準化のための組織とも連携している。

4. 先端バイオイメーシング支援プラットフォーム（ABiS）と連携し、国内の生命科学画像データの収集と共有の推進を行なっている。
5. 顕微鏡会社と連携して顕微鏡装置に関する情報を収集することにより、画像データに対するメタデータ記入の簡素化と一貫性のあるメタデータ付与を可能にした。