

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命動態の理解と制御のための基盤技
術の創出」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 2013年10月～2019年3月

研究代表者：栗原裕基
(東京大学大学院医学系研究科、教
授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

I. 血管新生における発芽伸長を可能にする内皮細胞動態と分子機構の解明

マウス大動脈片組織培養による血管新生の *in vitro* モデルを中心に、細胞間の追い越しや混じり合いを伴う複雑な発芽伸長過程が、細胞の自律的運動と隣接細胞間の相互作用による協調運動によって営まれることを明らかにした。さらに、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、血管新生過程での細胞計測データに基づく検証を行うとともに、細胞間相互作用の異方向性を明らかにした。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、マウス膝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、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、接着分子を介する分子機序とともに明らかにした。

II. 血管新生過程への関与に必要な遺伝子制御を実現する核内構造ダイナミクス

血管新生における細胞運動の不均一性が明らかになり、それぞれの挙動を担う遺伝子制御メカニズムを解明するため、血管新生過程の MS1 細胞において、①単一細胞トランスクリプトーム解析によって従来 *tip cell* と呼ばれていた先導的な役割を果たす細胞群を同定して重要な転写因子を同定した。さらに、②ヒストン修飾、RNA ポリメラーゼ II、転写因子抗体を用いたエピゲノムデータを用いたインフォマティクスによって“クロマチンランドスケープ”を浮き彫りにした。最後に③クロマチン相互作用と 3D-FISH によって、予想された核内構造変化の経時的な検証を行った。以上の研究によって、血管構造の維持から血管新生に向かう細胞における核内構造ダイナミクスを明らかにした。

III. 血管新生の数理モデル構築と多粒子系による形態形成の基本モデルへの発展

実験結果から、血管新生における内皮細胞の動態では、2 細胞間の相互作用が究めて本質的であることが示唆された。その相互作用の特徴は、(1) 細胞の形状に伴う異方性を持つこと、(2) 接触した 2 細胞の運動に逆相関が存在すること、である。この結果をもとに、細胞の内部状態(遺伝子発現)・個々の細胞の運動 - 原初血管構造の形成という階層構造を説明する数理モデルとして、反同期位相振動子を内部変数として持つ 2 体相互作用を行う楕円体粒子モデルを構成した。このモデルの画期的な点は、実験的に観測された 2 細胞間の相補的運動と遺伝子ノックダウンによるその抑制、細胞種による形態形成の変化、原初血管の伸長と分岐、セルミキシング、内皮細胞の一様分布状態からの血管網形成を、少数のパラメータ、初期条件及び境界条件によってすべて実現する点である。また、細胞の接触に伴う相互作用が遺伝子発現を伴い、その結果がまた細胞の動態を規定し、形態形成につながることを示した力学モデルであり、生命動態の階層構造原理を解明する第一歩であると考えられる。

IV. 心臓発生に寄与する細胞起源と分化方向の多様性

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。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。さらに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。

V. 心臓拍動の「レゾナンス」現象を説明するコミュニティーエフェクト機構の構成的1細胞実験手法と数理モデルからの理解

孤立した1細胞では拍動状態や応答性が異なるヘテロな自律拍動心筋細胞が集団化した時、

既存の理解である拍動周期の早い細胞に追従して拍動同期する「overdrive suppression」の概念を覆し、集団の中で拍動周期がより安定した心筋細胞の周期に同期化する「レゾナンス」現象を見出し、また、この機構を不応期と揺動散逸定理を組み入れた数理モデルによって再現することに成功した。またヘテロな心筋集団によって興奮伝導の状態に違いが発生することも新たに見出し、これを創薬スクリーニングに応用できることを確認した。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. 確率論的数理モデルによる血管新生過程の細胞動態解明 (栗原 G)

概要: 血管新生のライブイメージングに基づく確率論的数理モデリングにより、血管の伸長を担う多細胞運動のしくみとして、細胞が自発的に自らを制御して自律的に動く過程と、隣接した細胞から適宜影響を受けて協調的に動く過程がうまく共存することで、全体の動きが巧みに統制されていることを明らかにした。ここで示された細胞動態メカニズムは、生物の形態形成を支える共通原理を解明する糸口になることが期待される (Sugihara K et al. Cell Rep. 13: 1814-1827, 2015)。

2. 細胞間相互作用に基づく決定論的数理モデルの構築 (時弘 G)

概要: 最近の実験成果をもとに、細胞間の相互作用を取り入れた離散力学系として血管新生における内皮細胞運動の数理モデルを構築し、セルミキシング現象や血管伸長及び分岐の動態を定性的に再現し、内皮細胞に特有な細胞間相互作用の重要性を明らかにした。また、この数理モデルの連続極限で得られる偏微分方程式に対して、血管の伸長におけるスケーリング則や、細胞運動の周期構造についての数学的に厳密な命題を証明し、今後の実験データの解析に新しい視点を提供した (Matsuya K et al. SIAM J. Appl. Math. 76:2243-2259, 2016)。

3. 羊膜形成領域に由来する新しい心臓血管細胞起源の発見 (栗原 G)

概要: 我々は鳥類胚において羊膜の原基となる明域に蛍光標識して追跡することにより、羊膜を形成する細胞群と咽頭弓の先端領域を通して胚内に流入する細胞群の2つの流れがあること、胚内に流入した細胞は咽頭弓・心流出路において FGF, BMP シグナルによりそれぞれ血管内皮細胞、心筋細胞へ分化することを明らかにした。この知見は、胚の保護器官としての役割に加え、細胞の供給源としての羊膜の新たな役割を示すものと考えられる (Asai R et al. Sci. Rep. 7:8955, 2017)。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 心筋細胞ネットワークの集団効果による協働性評価技術を用いた創薬スクリーニング法の評価 (安田 G)

概要: 第一三共 (株) と共同で、心筋細胞の集団効果による協働性が催不整脈性を持った薬剤及びばす影響について、細胞間の興奮伝導への影響を中心にヒト ES 細胞由来心筋細胞を用いて評価した結果、再分極時間の時間的ゆらぎと、新たに加えた興奮伝導の伝導速度の時間的ゆらぎを2次元の指標とすることで、従来の手法では困難であった偽陰性、偽陽性薬剤の催不整脈性を正確に評価できることを示し、「筋細胞の集団効果」の理解に基づいた新しい quasi-in vivo 安全性評価技術の標準化に向けた基盤整備を進めた (Asahi Y et al. Sci. Rep, 8:14536, 2018)。

2. くも膜細胞の内皮化とその分子制御機構の解明 (和田 G)

概要: 血管新生プロセスは、ヒト各種疾患病態と深く関わっており、とりわけ虚血、出血性の血管疾患においては治癒過程として重要な現象である。特に、くも膜下出血においては、発症 7 日目から 14 日目に生じる脳底動脈の攣縮が予後の決定因子であり、その回復には脳血管の

再内皮化が必要である。脳底動脈への再内皮化においては、周辺健常内皮細胞、骨髄由来細胞に加えて、くも膜細胞の内皮細胞への分化が関与していることを見出した。これは、従来 **Endothelial Mesenchymal Transition(EndMT)**として知られている内皮細胞からの脱分化と逆方向の現象であった。さらに、くも膜細胞と内皮細胞のゲノム、エピゲノム解析によって、**TGF β** 経路の転写制御が関与していることを明らかにした(投稿中)

<代表的な論文>

1. 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.
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. 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 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

① 栗原グループ

研究代表者:栗原 裕基(東京大学大学院医学系研究科 教授)

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

主たる共同研究者:和田 洋一郎(東京大学アイントープ総合センター 教授)

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

主たる共同研究者:時弘 哲治(東京大学大学院数理科学研究科 教授)

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

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)

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)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

- ・AMED 生命動態システム科学推進拠点事業「転写の機構解明のための動態システム生物医学数理解析拠点」(代表:井原 茂男、平成 24~28 年度)と連携して研究、若手育成を行った。

・細胞動態計測技術に関し、同じ CREST 領域内で、飯野チーム吉田グループ(主たる共同研究者:吉田 亮)の協力を得た。