

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 (東京大学先端科学技術研究センター、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 (東京大学大学院数理科学研究科、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

(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で取得したデータを時弘グループに提供するとともに、画像データの取得と解析法の改良に取り組んだ。さらに、数理モデルで検討している内皮細胞間の相互作用の特徴を単一細胞レベルで明らかにするために、安田グループとアガロースチャンバー加工による一次元細胞運動解析システムを構築するとともに、和田グループと単一細胞レベルでの遺伝子発現パターンを C-1(Fluidigm 社)を用いて解析し、個々の細胞の多様性を見出すとともに、血管新生過程における細胞動態の多様性との関連が示唆された。

(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、後耳胞領域に由来する心臓神経堤細胞に先んじて心臓内に流入し、冠動脈平滑筋などに分化することを見出すとともに、新たな領域から流入する細胞群をも見出し、細胞起源の多様性がさらに明らかになった。さらに、頭部神経堤がその形成の中心となり、心臓発生と密接に関連する鰓弓領域の研究が進展し、理研の倉谷滋博士らとの共同研究で、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。

時弘グループ

(1) 血管新生の数理モデル

西山-栗原らによる血管新生の実験に基づき内皮細胞間の 2 体相互作用および、新生血管の先端部分の細胞外器質と内皮細胞との相互作用を取り入れた、血管新生の伸長と分岐の離散数理モデルを構成した。そして、数値シミュレーションによって、VEGF の濃度勾配による細胞の走化性がなくても、実験で観測されたセル-ミキシング現象が再現できること、伸長と分岐を再現することを示した。また、この離散モデルの連続極限を考察し、解析的に取り扱うことのできる微分方程式モデルを構成し、分岐回数や分岐長とパラメータの関係を明らかにした。特に、離散モデルでは取り入れなかった、細胞分裂の効果の重要性について理論的に指摘を行った。

(2) 心筋拍動の数理モデル

安田グループの心筋細胞の同期実験に基づき、特に 2 細胞における同期と同調について、五島の理論に対応する数理モデル(不応期を取り入れた積分発火モデル)を構成し、分析した。その結果、正常細胞(不応期が細胞ごとに異なる)どうしでは、早い周期の細胞にもう一方の細胞が同期するという五島の主張が成り立つが、不応期が一定しないような異常のある細胞では、さまざまな相が生じ、必ずしも五島の主張は成り立たないことを示した。

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、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)を行った。また、解析の精度向上を図るため、活性型 RNA ポリメラーゼ II 抗体を新規に樹立した。

(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。今後、血管新生系において、種々の内皮細胞マーカー遺伝子発現により、内皮細胞集団の **population** を観察し、不均一性の実体を明らかにする。

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

孤立した心筋細胞の拍動が、集団化したときにどのような拍動周期になるのか、また、同期化した心筋細胞集団の薬物等に対する応答性に着目し、その集団化の細胞数、空間パターンの違いによる応答性の違いを明らかにすることで「細胞の集団化効果」を実験的に検討した。また、その結果を時弘グループでの数理モデルによる構成と分析のために提供し、数理モデルと実験結果との検証を一緒に行った。

(2) 血管内皮細胞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推進した。また、細胞サイズを特異的に選別できる凹状マイクロ粒子を開発し、この微細構造の(エントロピー的作用である)空間的排除効果によって、特異的にその凹形状により近いサイズの細胞が捕獲されるふるい分け効果があることを確認した。

(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、1細胞レベルでの培養空間パターンを構築する技術を栗原グループに提供しその効果を検討した。

代表的な論文

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.* (in press)
2. Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Li G, Poh HM, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro JI, Sugiyama A, Kaneki K, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Ruan X, Aburatani H, Nangaku M, Ruan Y, Kodama T, *Wada Y, Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of

two response elements. *Genome Biol.* 2014 Apr 10;15(4):R63. doi:
10.1186/gb-2014-15-4-r63

3. Kaneko T, Nomura F, Hamada T, Abe Y, Takamori H, Sakakura T, Takasuna K, Sanbuissho A, Johan Hyllner, Peter Sartipy, Yasuda K. On-chip in vitro cell-network pre-clinical cardiac toxicity using spatiotemporal human cardiomyocyte measurement on a chip. *Sci. Rep.* 4:4670, 2014. doi: 10.1038/srep04670.