

研究報告書

「上皮組織のかたちづくりを理解する」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

研究者：三浦 岳

1. 研究のねらい

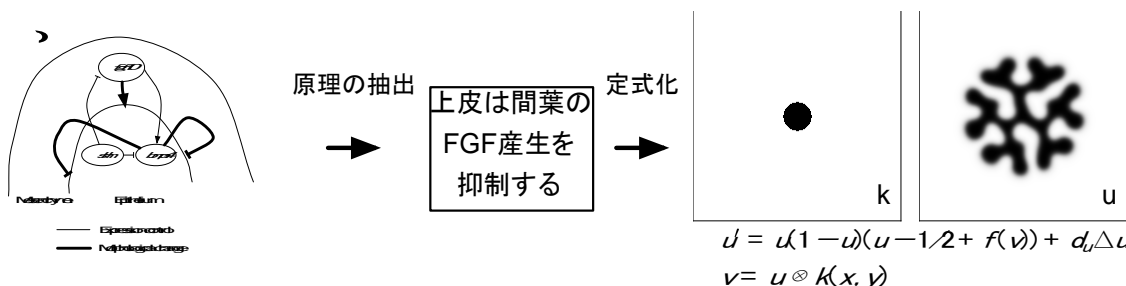
上皮組織とは、外界と人体の界面に存在するシート状の組織です。発生段階で様々な形を変えているいろいろな器官を作り出します。しかし、この形をうまく記述する枠組みがこれまでほとんど提案されていませんでした。この研究では、シート構造が周囲と相互作用しながら形を作っていく現象をできるだけうまく定式化する事で、生物の形づくりの本質に迫ります。

2. 研究成果

肺の枝分かれ形成

肺の枝分かれ構造形成は古くから研究が進んでおり、関与する分子は数多く同定されましたが、それらの相互作用がどのようにして枝分かれ構造を作るのか、そのメカニズムは不明なままでした。我々は肺の上皮のみを単離した培養系を用いて、間葉が無い状態での枝分かれ形成の本質は上皮による FGF の消費であることを示しましたが、間葉が存在する状況で何が起きているのかはよく理解されていませんでした(1)。

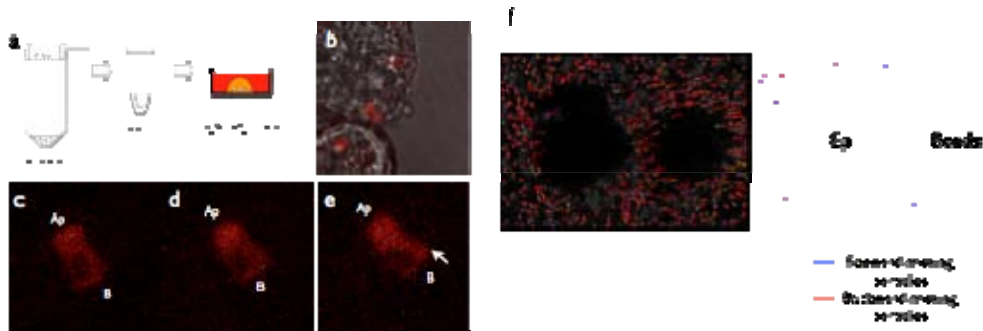
我々はまず、肺の枝分かれ形成と嚢胞形成が同時に起こる鳥類肺の系で、嚢胞形成が FGF の拡散係数の差によって生じることを示しました (2)。また最近になって、Sonic Hedgehog と呼ばれる分子を介した上皮間葉間相互作用と境界の形状の関係によって分岐構造が作られるという形のモデルが他のグループによって提案されたのですが、我々は再構成培養系を用いて境界形状とは無関係に枝分れを形成できることを示しました。この培養系の遺伝子発現の解析から、発生段階の肺における上皮間葉間相互作用は要するに「上皮組織が間葉組織での FGF 産生を抑制する」という作用に集約できることがわかってきました。これは、2変数の充分簡単な反応拡散系に落とすことができ、解析的に扱う事も可能です。また、間葉が上皮に及ぼす作用を畳み込み積分のカーネルで表現する事で、実測データから直接この影響関数を算出する事も原理的には可能です。これはまだ培養系での枝分かれ構造形成のモデルですが、上皮間葉間相互作用を充分単純な形に落とせたというのは一歩前進であると思います。



上皮-間葉間相互作用のモデル化。複雑な分子間相互作用から本質的な反応のみを抜き出して定式化する。

また、FGF の産生領域に向かって上皮が動いて行くメカニズムに関して、Collective cell migration という観点から解明を行いました。その結果、FGF に向かって行く上皮の先頭部分

は特に変化がなかったのですが、組織の側面にある細胞群が力を出して目標に向かって進んで行く事が明らかになり、これまでの先頭の細胞群が大きな役割を果たすメカニズムとは別種の仕組みがある事が明らかになりました。このような挙動をモデル化しようとした場合、界面を進行波解で表すこれまでのやり方では表現できないため、各細胞の位置を明示的に書き下す別種のやり方を導入する必要があります。

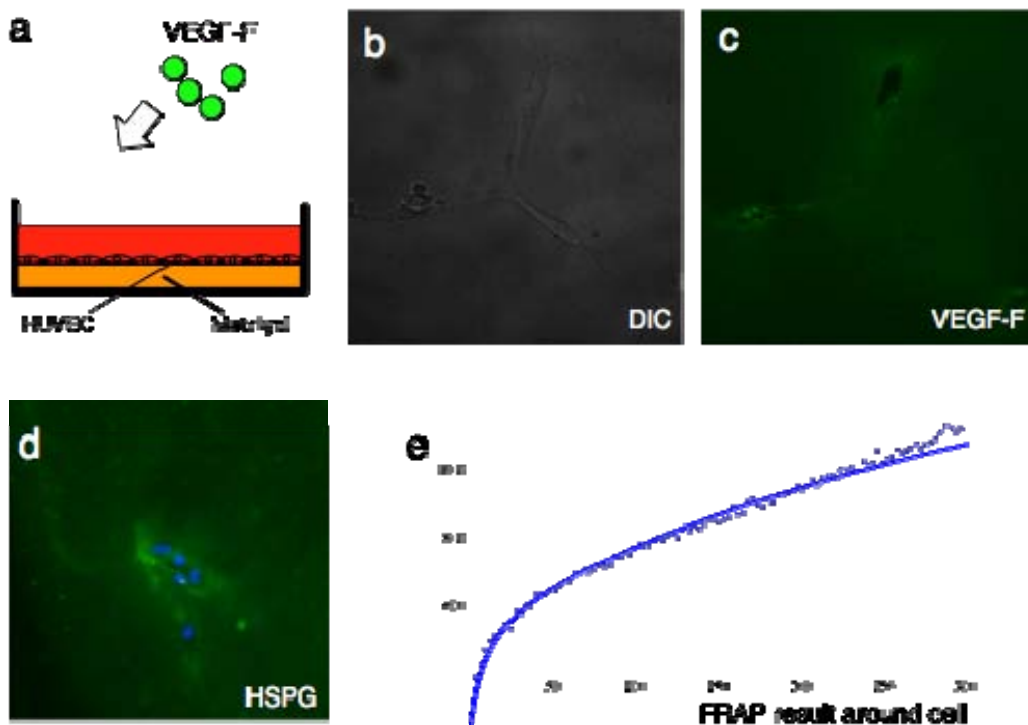


(a) 肺上皮の大量培養のプロトコル。(b) 肺上皮の細胞骨格運動の可視化。(c-e) 肺上皮細胞の運動。基底膜側が活発に運動している。(f) 肺上皮組織が動く際の周辺のゲルの変形。

HUVECによる血管構造形成

血管構造は、三次元組織に酸素、栄養を供給する上で必要不可欠であり、どの器官形成を研究する場合でも必ず関わってくるので、その原理を理解するのは発生生物学の立場からは非常に大事です。その過程の研究によく使われる実験系としてヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)があります。この細胞は、Matrigel と呼ばれる細胞外基質上で培養すると自発的にメッシュワーク構造を形成します。この構造形成に関しては、イタリアの Gamba, Serini らのグループの作った連続モデル、オランダの Merks らの用いている Cellular Potts model の2種類の定式化がありますが、どちらのモデルでも、血管のメッシュワーク構造の特徴長さを決定する最も重要な因子は拡散性のシグナル因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)の拡散係数と分解です。我々はこのそれぞれを実験的に計測し、Matrigel 単独では VEGF の拡散が速すぎて適正な構造を構成できないことを示しました (4)。

それでは、HUVEC はどのようにして血管網を形成するのでしょうか？じつは、FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)を用いた解析によって、内皮細胞周辺でのみ VEGF の拡散係数が3桁も減少している事が明らかになりました。また、細胞による VEGF の産生もそれほど多くなく、培地中の VEGF が細胞外基質に吸着されてパターン形成を誘発するという新しい描像に到達しました。このストーリーに関しては、応用数学者のグループと共同で論文にまとめる予定です。

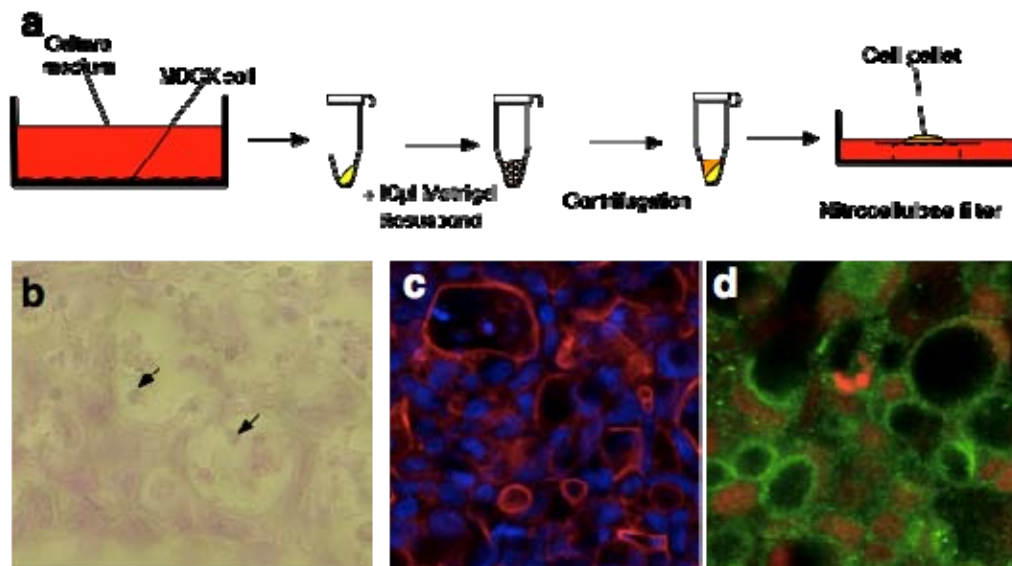


(a) 実験条件。培地中に蛍光ラベルした VEGF を投与する。(b) HUVEC の微分干渉像。(c) 実験開始後 30 分で吸着された VEGF の分布。(d) ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)の細胞外の分布。(e) FRAP による蛍光の回復曲線。拡散の速い成分と遅い成分があると仮定しないとうまく Fitting できない。

上皮細胞での組織構造の形成

かたちづくりの真の理解とは何でしょうか？端的には、対象となる構造を制御して作ることができたら真の理解に近いと言ってよいと思います。Turing パターンも、ごく最近までは想像上のものでしたが、1990年代はじめに化学者が CIMA 反応を実際に開発してから理論研究が再燃した経緯があります。

個々の上皮細胞は apical-basal 側の極性を形成しようとするがあります。また、その上皮細胞同士は相互作用を行い、極性の方向をそろえる性質があります。ただし、スピングラスや平面極性とは異なり、Apical 面同士、Basal 面同士の接触も許可されます。この挙動は化学に於ける界面活性剤分子やコポリマーの挙動と定性的に一緒なので、極性形成能の強い細胞集団を一緒にするだけである程度組織構造を作ることが予想されます。我々は MDCK 細胞株を用いてこのような三次元的な高密度の状態を作り出し、ある種の組織構造を作り出すことに成功しました。まだ構造がきちんとコントロールできない状態なので、apical 側と basal 側の領域を制御する工夫が必要であると思われる。



(a) 培養条件。MDCK 細胞株を高密度で培養する。(b) 形成される組織構造。(c) Phalloidin-Rhodamine による Apical 膜の染色。(d) Syntaxin3 による Apical 膜の染色。

3. 今後の展開

肺の枝分かれに関しては、上皮間葉間相互作用を充分単純化したモデルがようやく研究期間の終盤で導出できたため、今一番面白い段階にあると思います。FGF の遺伝子発現パターンから deconvolution による影響関数 k の導出、実測した影響関数を用いた数値計算、枝分かれ形成の実測データからの界面方程式の導出等(細胞運動で確立されたやり方がある)、考える枠組みができたため、やるべきことは沢山あります。

また、導出したモデルは一般的であることから、発生段階で生じる他の枝分れ器官にも応用できる事が期待されます。来年度から合流する九州大学の平島氏は腎臓の枝分かれ形成のモデルを作っていましたが、この系ではキーとなる GDNF という分子が FGF と同様に枝分れを起こす上皮の周辺に発現することがわかっています。このような場合、分子の名前を入れ替えるだけで簡単に他の系の定式化も可能です。

細胞外に分泌されるシグナル因子の拡散速度の定量はこれまでほとんど行われて来ていませんでした。最近になって morphogen gradient の形成に関連する分子の計測結果がトップジャーナルに載るようになってきましたが、自発的パターン形成の特徴長さを決めるパラメータ、という観点での仕事はまだありません。研究期間後半になって、拡散の計測に関する技術と道具が揃ったので、この分野にも独自の視点で攻めて行こうと思います。

4. 自己評価

当初は反応拡散系を用いた定式化からの脱却を計っていたのですが、結局使い慣れた道具に回帰してしまった感があります。Cellular automaton を使った系や粒子系も試してはみたのですが、数値計算の結果のバラエティや、数理解析の道具の整備のされ方等から結局連続モデルに戻ってしまいました。しかし、実験結果と対応の付けやすい定式化の仕方を探る、という点では独自性が出せたと思います。

成果の発信の部分に関しては、通常の論文発表の他に、発生生物学会における国際シンポジウム主催という経験をさせていただきました。2009 年度は大会長が数理を用いた研究を後押しする意向が強かったのと、JST の国際強化支援策で金銭面のサポートをしていただい

たのが大きかったと思います。学会におけるシンポジウム主催がどの程度波及力があるものなのかわかりませんが、各種学会でこのような試みは続けていった方がよいと思います。

研究費の主要な使い道は共焦点顕微鏡の購入とラボテクニシヤンの人件費ですが、これはどちらも非常によく働いてくれました。共焦点顕微鏡は主に培養系の経時観察に用いていたので、可動時間が4000時間を超えましたが、特にいまのところトラブルがありません。共用設備ではとてもこうはいかなかったでしょう。また、技官さんも優秀な方で、私がへたっているときは実験に追い立ててくれ、混乱した指示も的確に整理して実験を遂行してくれたため、たくさんの実験データを出すことができました。

5. 研究総括の見解

発生段階で上皮組織が形を変えて様々な器官を作り出す過程を理論的に記述しようという、まだ未開拓な部分が多い研究課題に様々な角度から意欲的かつ挑戦的に取り組んだ。具体的には、肺の枝分かれ形成やヒト腔帯静脈由来内皮細胞による血管構造形成などを取り上げた。特に前者に関しては、上皮組織が間葉組織での FGF 産生を抑制することを最近自ら発見し、それに基づいて2変数の簡単なフェイズフィールドモデルを構築し、枝分かれ形成が定性的に再現されることを明らかにした。今後このモデルがどのように発展するか期待が持たれる。また、JST の支援を受けて発生生物学会で国際シンポジウムを開催し、この分野での数理研究の波及を図るなど情報発信に向けた積極性も評価される。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Miura. Modeling lung branching morphogenesis. Current topics in developmental biology (2008)
2. Miura et al. The cyst-branch difference in developing chick lung results from a different morphogen diffusion coefficient. Mech Dev (2009) vol. 126 (3-4) pp. 160-72
3. Miura T. and R. Tanaka. In vitro Vasculogenesis Models Revisited—Measurement of VEGF Diffusion in Matrigel. Mathematical Modelling of Natural Phenomena Vol. 4, No. 4, 2009, pp. 118-130 (2009)
4. Kondo and Miura. Reaction-diffusion model as a framework for understanding biological pattern formation. Science (2010) vol. 329 (5999) pp. 1616-20
5. "Mechanism of lung branching morphogenesis", T. Miura, In "Biological and Physical Constraints on the Evolution of Form in Plants and Animals", Vienna series in Theoretical biology, in press.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

Mechanism of lung branching morphogenesis、Biological and Physical Constraints on the Evolution of Form in Plants and Animals, Konrad Lorentz Institute, 2010/9/23 (Austria)

FGF-induced collective cell migration during lung branching morphogenesis, SDB-JSDB Joint Meeting in Albuquerque, 2010/8/8, Albuquerque (USA)

Modeling lung branching morphogenesis, EMBO Conference on Morphogenesis and Dynamics of Multicellular System, 2009/10/6, Heidelberg

