

研究報告書

「生体3次元特有の形態の解明手法の構築」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：昌子 浩登

1. 研究のねらい

肝臓は、基本単位である肝小葉が無数に連結し構成される。肝小葉の内部構造をみると、どの隣り合う肝細胞をみても、血管系である類洞と外分泌系の毛細胆管の2種類の管にそれぞれ2カ所以上ずつ接しながら、見事な3次元特有の周期ネットワーク構造を自己組織的に作り上げている。しかも、上皮である肝細胞はその方向性を含んでいる。このような3次元の形態を理解するには数理の言葉を用いるのが有用であると考えられる。この研究では、共焦点顕微鏡を用いた観察をもとに、肝細胞の3次元上の方向性について数理的な指標化を行う。そして、2種の管の形作りや疾患による肝小葉内の3次元構造配置の転移について、観察をもとに、数理モデルを用いた解析により構造制御の性質や形態形成の仕組みを解明することを目指した。

2. 研究成果

(1) 肝細胞－類洞－胆管の方向性の計測

肝小葉の3次元形態を観察するために、動物から摘出した肝臓サンプルを多重免疫染色し、共焦点顕微鏡により観察し、2次元画像の重ね合わせとして3次元像を取得する。自作したアプリケーションを用い、コンピュータ上での種々の画像処理を通して、コンピュータ内に類洞、毛細胆管、肝細胞などの3次元再構築する。例えば、類洞と毛細胆管と肝細胞1つを3次元プロットすると、図1(b)のように表される。太さの異なる類洞と胆管は、互いに交わらない3次元配置が見ることができる。

極性を持つ上皮細胞のうち、2次元シートの配列する細胞では、その裏表の関係により明確にその極性が理解できる。しかし、肝細胞の極性、つまりタイトジャンクションで裏打ちされる毛細胆管側の表側と、血管系である類洞の裏側が3次元的にどのように配置されているは複雑である。この問題に対し、観察をもとにその数理的指標化を行ってきた。図1(c)の球面は、(b)で示した肝細胞の重心からいろいろな方向に対して距離を離していき、最初にあてはまる別の構造を球面上に表したものである(赤:類洞、緑:胆管、青:他の肝細胞)。この球面を、量子力学で用いられる球面調和関数の分布の球面上分布(図1(d)の (m,l) で決められる球面上の分布)の重ね合わせで表す。3次元空間の基本軸の設定については、肝細胞ごとに、さまざまな方向を基軸にとり、相関のよいものをその基軸として選んだ。このようにして得られた類洞、胆管、隣の肝細胞のそれぞれの球面調和関数の係数ベクトルを平均したものが図1(d)である。この結果を、球面調和関数を用いて表してみると、類洞は直線的な方向と共にその垂直方向に存在しやすい。また、胆管は類洞の存在しやすい方向の隙間方向に存在しやすいという傾向がわかった(投稿準備中)。

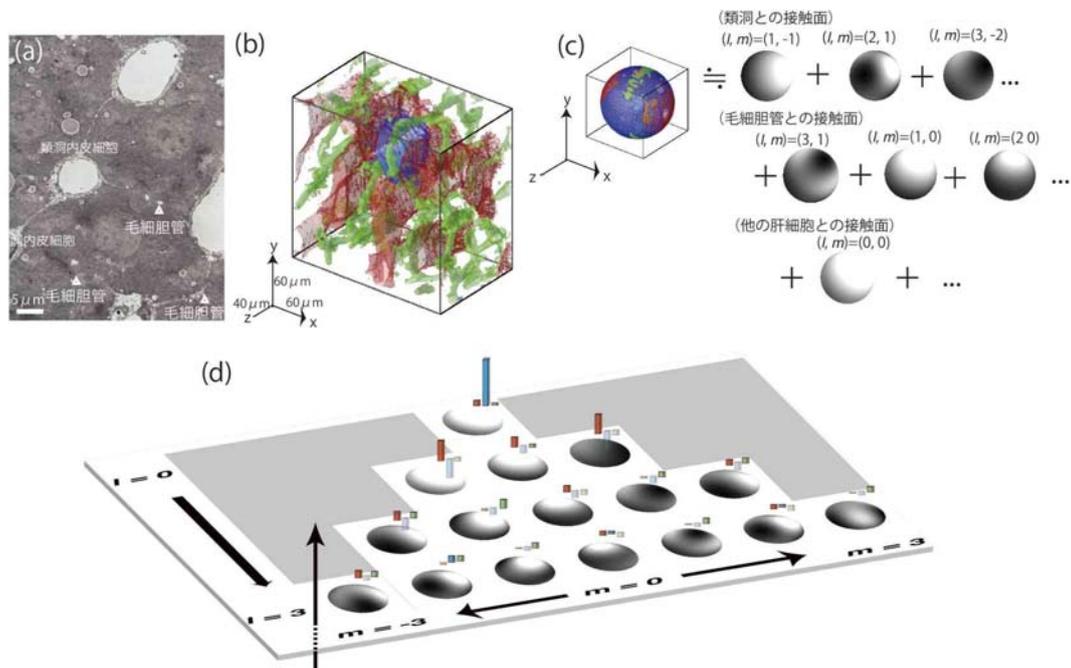


図1 (a) マウス肝細胞の TEM 像 (b) 類洞 (赤) と毛細胆管 (緑) の3次元立体構築像。1つの肝細胞 (青) も表示。(c) (b) で示した肝細胞を球形として、表面上のどの方向に他の構造が接触しているかを図示する (左)。緑の方向に胆管、赤の方向には類洞、青の方向には他の肝細胞が接触していた。これを、球面調和関数を用い、類洞、毛細胆管、他の肝細胞と接触する面を用いて表す。メインの正の要素のみを表示した。(d) 肝小葉内の中心静脈と門脈の中間領域の肝細胞の画像解析結果をまとめたもの。係数の平均を球面調和関数の係数 (m, l) ごとに示した (赤棒: 類洞、緑棒: 胆管、青棒: 他の肝細胞)。

(2) 疾患による3次元形態変化

肝がんの原因として現在その割合が増加している非アルコール性脂肪肝炎 (Non alcoholic steatohepatitis : NASH) について、疾患による肝小葉の3次元形態変化を解析した。ヒトの NASH 症状に類似した状況を作成できるように調整された飼料を与え続け、疾患モデルラットを作成し、4週ごとに肝臓サンプルを採取した。図2(b) は調整された飼料を与えて続けて 12 週後の個体から得た肝細胞の TEM 像である。肝細胞に脂肪沈着し、肥大化した脂肪滴が見られる。また、図2(a)のコントロール像に比べて肝細胞が大きくなっていることがわかる。サンプルの共焦点画像を取得し、3次元再構築像を作成し、3次元形態特徴量を計測した。図2(c)-(f) はそれぞれの時間のサンプルの3次元構築例である。時間とともに、脂肪滴が大きくなり、押しだされるように類洞が細くなっていくのがわかる。12 週や 16 週のサンプルについて、図1(c) で見たように肝細胞の他の構造の接触面を見ると、傾向が変わっていた。また、脂肪滴の配置をフーリエ変換してその配置を調べると、球の最適な配置の一つである体心立方構造のピークがしばしば見られるようになった。

この立体構造の転移点の解析、ならびにケアを行い脂肪滴の拡大を止めたときなどの仮想的な状況を考察するため、これまで提案されているポッツモデルをもとに、各格子点上にベクトルを与え、そして(1)で得た細胞接着力に対する方向性を導入したモデルを用いて考察した。肝細胞内に脂肪滴を成長させていくと、ある点から肝細胞の極性などによる立体配置性から脂肪滴

の球としての立体配置性へとシフトしていくことが見られる。そして、こうした配置になった状態から今度は脂肪滴の体積を減らす操作を行ってみると、先ほどの転移点を大きく超えても、なかなか肝細胞の極性が制御する配置に戻るができない。この現象は、脂肪性肝疾患が進み、あるステージまで達してしまうと、いくらケアを行っても、予後不良になり重症化は免れ得ない現象と対応しているのではと考えられる。これまで分子的なメカニズムの解析が行われてきているが、肝小葉内の3次元形態も解析も必要ではないかと思われる。

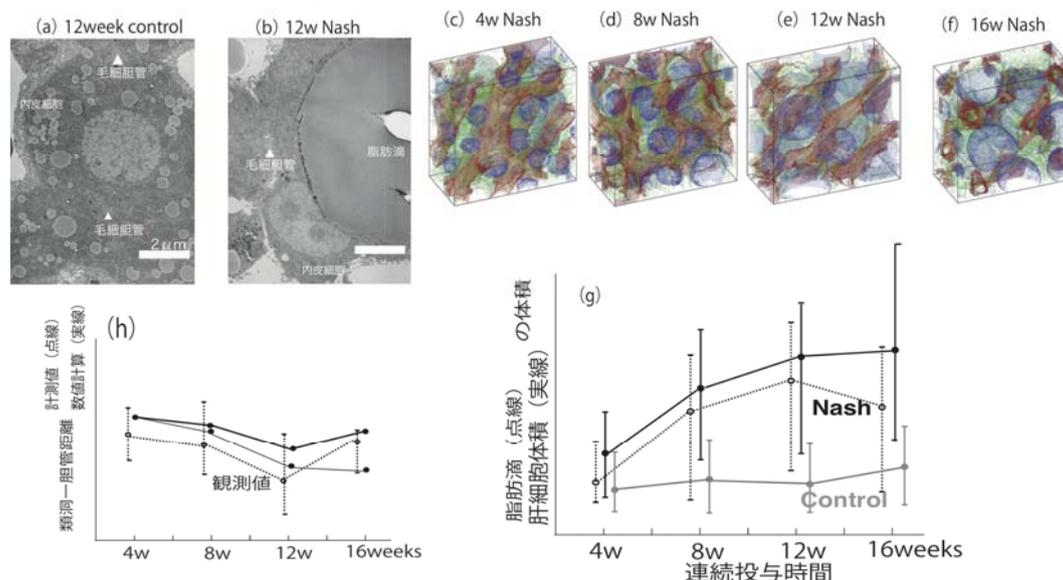


図 2 (a), (b) 連続投与 12 週後のサンプルの肝細胞(TEM)像。(c)-(f) 各週のサンプルの3次元構築の例。類洞(赤)、脂肪滴(青)、細胞膜(緑)で示す。(g)脂肪滴、肝細胞の体積の変化。(h)類洞と胆管の最小距離の推移(点線:計測値、実線:モデルより得た値)。

(3) 太さの異なる2管の形態形成

(1)で見たように、1〜十数 μm のオーダーの直径の、太さの異なる2種類の管ネットワークが見事に3次元独特の周期的な構造を作り出している。この形成過程のメカニズムの理解のため、観察をもとに、(2)で用いた Potts モデルを用いて解析を行ってきた。

生後5日から5日ごとにうさぎ肝臓を取り出し、肝小葉内の相対位置ごとに立体構築を作製した。図 3(a)-(i)の5、10、30日の毛細胆管、類洞の配置を表す。類洞が門脈域から中心静脈に向けて徐々に形成される。一方で、胆管は隣り合う肝細胞が形成されると形成されるが、管自体がつながっていくのは、中心静脈付近から徐々に形成されていくのがわかる。この形成を(2)で用いた改訂 Potts モデルにより作成することを試みている。現在、観察で見られた事実を、画像解析により得られた3次元パターンの特徴量を比較することでモデルのパラメータ推定を行った。現在、サンプルデータの充実させること、そして数値解析をより広げ、このモデルでの形成されるパターンの多様性などを検討している。

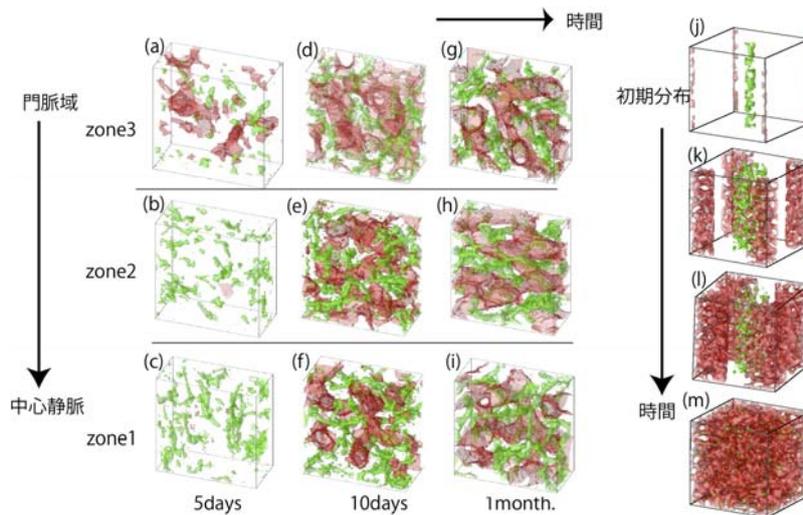


図 3 (a)–(i) 類洞と胆管の立体構築図(赤:類洞、緑:毛細胆管)。肝小葉内の相対的位置(縦)とサンプル取得の生後の時間(横)とに分けて表示。(j)–(l) 改訂 Potts モデルを用いたシミュレーション結果。最初、正方領域内の四隅に成熟した類洞内皮細胞が、中心部分に胆管が形成されているとして数値計算を始めた。

3. 今後の展開

肝小葉3次元周期構造を、画像解析、数理的手法を用いて構造の認識、ならびに数理モデルを用いた現象の理解という枠組みで肝小葉の形態理解を試みてきた。現在は部域に分けて観察計測してきたが、1つの肝小葉でさえ1ミリ立方程度の大きさで、このスケールのギャップに心配が残る。そのため、我々はマクロな構造理解のために、我々は血管鋳型法を用いて3次元構造を観察する方法を構築してきている。今後、この手法により得られるデータと比較して、不備がないかどうかということを検証したい。

また、さきがけ期間に構築してきた方法により、さまざまな課題に挑戦できるようになったと思う。例えば、さまざまな動物の肝臓の方向性比較をぜひ近いうちに行いたい。また、臨床に役立つよう疾患進行と3次元形態の進行との関係をより詳細に調べたい。臨床の先生方に我々の推論をきいてもらい、可能なら患者様の肝マーカーや血液検査の各種データと生検サンプルによる推論の検証、予後の状態の違いの理解など具体的に取り組んでいきたい。

4. 自己評価

上皮細胞である肝細胞の3次元上の方向性を、球面調和関数を用いて指標化することで、複雑な3次元の方向性を数理的に表現する方法を構築できた。この手法を足がかりに、肝小葉内の立体構造の形態形成と動的な形態制御について観察、評価を行ってきた。また、この手法による表示により細胞の細胞接着方向性を自然に導入した Potts モデルが作製でき、3次元形態配置変化の解析を行ってきた。これらを通して、肝細胞–類洞の3次元配置と疾患の動態の関係性を示唆してきた。しかしながら、類洞と毛細胆管の3次元周期ネットワーク構造形成過程の観察も含め、3次元立体構築像を得るための設定構築は予想された以上に難航した。数理的な画像解析手法、数理モデルを構築も含め、ようやくすべての面で道具立てが完了した段階である。今後、この3年半の研究期間の間に獲得できた多くの技術的、数理的なノウハウを生かし、現在

取り組んでいる胆管、類洞の形態形成のメカニズム解明を含め、生体に見られる3次元形態の形成機構とその動的な形態制御機構メカニズムの理解を深めていきたい。

5. 研究総括の見解

肝臓の基本単位である肝小葉の3次元ネットワーク構造を、共焦点顕微鏡を用いて画像化し、肝小葉を構成する類洞や毛細胆管の形態形成、肝炎などの疾患による3次元構造の形態変化等を、数理モデルを用いて明らかにするという意欲的な提案であった。実際の研究においては、数理解析が可能な鮮明な画像取得が中々進まず大変苦労をしたが、期間後半になって要求レベルの画像が得られるようになり、複雑な3次元構造の特徴を表現する数学的な指標を提案して形態変化の数量化に成功したことは評価できる。さきがけ研究者らしく、本人が一人で粘り強く取り組んで獲得した技術的、数理的ノウハウが今後の展開に生かされることを期待したい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Hiroto Shoji and Keitaro Saitoh, "Pattern Formation in Chemotactic Reaction-diffusion Systems" <i>Int. J. Biomath.</i> , 5. 1260013 (9pages) (2012). |
| 2. Hiroto Shoji, Makiko Nonomura and Kohtaro Yamada, "Three-dimensional specific patterns based on the Keller-Segel model" <i>Forma</i> , in press. |
| 3. Hiroto Shoji, Makiko Nonomura and Kohtaro Yamada, "Three-dimensional aggregation patterns in Keller-Segel models" <i>Pion. J. Adv. in Appl. Math</i> , 3, 59-72 (2011). |
| 4. Fumio Matsui <i>et. al.</i> "Effects of Stress of postnatal development on corticosterone, serotonin and behavioral changes" <i>Brain & Development</i> , 32, 517-523 (2010). |
| 5. Hiroto Shoji, "Entrainment and Modulation of Turing Patterns under Spatiotemporal Forcing" <i>Forma</i> , 24, 23-27 (2009). |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表

・「不可抗力をかけた系の観察・測定から生体システムを考える」第1回複雑系科学シンポジウム
主催: 日本科学者会議複雑系科学研究会, 2011/9/20, 大阪大学豊中キャンパス.

・「3D Aggregation Patterns in Keller-Segel Models」The 3rd China-Japan Colloquium of
Mathematical Biology 2010/10/18-21, Beijing, China.

著作物

1. 昌子浩登 「3次元チューリングパターン」自己組織化ハンドブック, NTS 出版, p338-341 (2009).

2. 昌子浩登 「Cellular Potts モデルを用いた肝小葉3次元周期構造の解析」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み, GMC 出版, 印刷中.