

研究終了報告書

「高度情報処理技術を用いた器官発生過程の再構築、予測、操作」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：森下 喜弘

1. 研究のねらい

器官の発生現象、特に細胞集団の自己組織的な形態形成・空間パターンニングの研究において典型的に現れる2種類の細胞運動データへ統計的・機械学習的手法を応用する。一つは形態形成（Morphogenesis）で現れるデータである。形態形成研究では、動物個体内の各器官の形態が発生過程によってどのように構築されるか、その背後にあるメカニズム・デザイン原理を明らかにすることが大目標である。脊椎動物のほとんどの器官発生過程では、細胞軌道の高分解能計測は不可能であることが多く、分解能の低い3D細胞軌道データが取得されたときに、赤池ベイズ情報量規準などの統計的手法を駆使し、組織変形過程を表す3D非線形写像を再構築することを目的とする。さらに、得られた変形写像から計算される連続体の変形として記述される各種テンソル量を、局所的な細胞動態（分裂の頻度・方向、再配列など）を表すテンソルへと分解することにより、組織の階層と細胞の階層間の動態を対応づけることが可能となる。二つ目は、パターン形成（Pattern formation）に関するデータを扱う。3Dの形態形成過程とは異なり、シャーレ等の中で2次元的に培養された細胞集団運動は多くの場合高分解能で計測可能である。近年の画像解析技術を駆使することで個々の細胞軌道を抽出・定量化し、細胞間相互作用を表す関数を明らかにする。データから運動を再現するための数理モデルを提案する。また、提案した数理モデルを用いて、データ同化手法によりパラメータ推定を行い、形成されるパタンの予測を試みる。以上のように、計測が困難な変数（力学状態や物性）や時空間分解能の不足分を統計数理の手法で補うことで、これまで国内外に見ても停滞していた、「細胞スケールの動態がいかに器官全体の形態形成過程、あるいは集団運動を通じた空間パターン形成過程へとリンクするか」に踏み込み、生物学の進展に貢献することを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、細胞集団の自己組織的な形態形成・空間パターンニングの研究において典型的に現れる2種類の細胞運動データへ統計的・機械学習的手法を応用し、背後にあるメカニズムを解明することを目的とした。形態形成研究に関しては、心臓初期発生過程、四肢発生過程、頭部形成過程を対象に研究を行った。解析の起点として、分解能の低い細胞軌道データから、赤池ベイズ情報量規準を用い、組織変形過程を表す非線形写像の再構築を行った。心臓研究に関しては、組織動態を表すテンソル量を個々の細胞プロセスへの寄与へと定量的に分解することで、組織動態と細胞動態の関係性を明らかにした。とくに、心臓初期発生で生じる原始心筒のルーピングの仕組みとして、従来モデルで想定されてきたダイナミクスとは異なる新規メカニズムの発見へとつながった。四肢発生過程に関しては、相同器官形成過程における種間比較（ニワトリ・カエル）を目的とし、現象を記述する適切な座標系を新規導入

することで、種を超えて保存されたダイナミクスの存在を明らかにし、さきがけ研究開始時点では想定していなかった新規性・独創性の高い主要な業績を得ることができた。頭部形成過程に関してはゼブラフィッシュ胚を用いて器官形成過程における組織間相互作用の寄与を解明する目的で研究を進めた。しかし当初計画よりも進展が遅れ、現在までにクリアな結果を得ることができていない。さきがけ研究終了後も解析を継続し当初の目的完遂を目指す計画である。

他方で、パタン形成に関しては、四肢間葉細胞の培養系を用いた軟骨パタン形成過程を対象として研究を行った。ニワトリ胚を用いた高分解能イメージング系を確立し、画像解析技術により、各細胞軌道の検出に成功した。現在までにPIVやPTV等の軌道解析により細胞間の運動に相関を見出しているが、個々の細胞の運動のランダムネスが強く、現象の背後にあるクリアなルールを得るまでには至っていない。しかし、解析自体は着実に進んでいるため、当初想定していたタイムスケジュールよりも遅れてはいるが、さきがけ研究の終了後も引き続き解析を進めることで当初の目的を完遂することを目指す。他方で、運動を人工的に変化させる目的で、光刺激依存的な遺伝子発現系をニワトリ胚の細胞内で確立し、結果を論文として発表した。

(2) 詳細

研究テーマ1「心臓初期発生過程における形態形成機構の解明」

心臓の発生は、心筒と呼ばれるまっすぐな管状の構造の形成から始まり、それが体の右側に飛び出したループ状構造へと変化し、明確な左右非対称性が現れる。このプロセスは、心筒がCの字となることからC-loopingと呼ばれる(図1)。これまで、C-loopingを説明するための二つの有力なモデルが広く受け入れられてきた(図2)。一つは、心筒がまず腹側に曲がり、飛び出した後に右側に回転するという「Ventral bending and rotation モデル」、もう一つは、心筒が限られた体内空間において長軸方向に伸びることで、その圧力に耐えられず座屈しループするという「Buckling モデル」である。これらのモデルはいずれも、心筒の長軸伸長と心筒の両端における境界条件(心臓に接続する血管からもたらされる左右非対称な細胞の流入や力の負荷)が、右側へのループを引き起こす主要なメカニズムであると仮定している。近年の顕微鏡技術やデータ解析技術等の進歩は、こうした過去に提案されてきた仮説モデルのどちらが正しいのかという問題に対する、客観的なアプローチを可能にしつつある。

本プロジェクトでは、ニワトリ胚を用いた心臓初期発生過程の二光子顕微鏡計測を行い、一部の細胞軌道データからベイズ再構成によりC-looping時の組織変形写像を初めて明らかにした。その結果、心筒を構成する左右の心筋組織はその伸長方向に明確な非対称性を持ち(右側:心筒の長軸方向に沿った伸長、左側:心筒の周長に近い方向に伸長)、この非対称性がC字型の形態変化を引き起こすことが明らかとなった(図3)。

次に、組織レベルで見られる左右非対称な変形を実現する細胞プロセスを明らかにするために、組織変形に影響を与えうる様々な細胞動態の測定を行った。細胞増殖や細胞死の影響は小さいため、細胞のサイズ・形の変化と細胞間の再配列に焦点を当て定量した。単位時間当たりの組織変形量を表すひずみ速度テンソルを、細胞動態を表すテンソル量に分解した結果、右側の心筋組織では細胞が並び替わることによる細胞の再配列が長軸方向の伸長に

大きく寄与し、一方の左側の心筋組織では細胞の形状変化が心筒の周長に近い方向への変形に高い寄与を持つことが明らかとなった(図4)。アクチン重合を阻害すると右側組織の細胞再配列が減少しルーピングが阻害されるため、一度形成された心筋組織の管が、静的に保たれているのではなく、管を形成する心筋細胞集団が次々と並び変わることで自ら形を作っているという動的な描像が明らかとなった。これまで想定されていたモデルでは、特に心筒の前後端での境界条件がループ形成に重要だと考えられていたが、我々の解析結果は境界条件の重要性よりはむしろ、すでに構築された Tube 状の心筋組織自体の変形がループ形成に重要であることを示し、器官形態形成機構の解明には本研究で行ったような組織・細胞動態の定量解析が必須であることを示した[Kawahira et al., Cell Reports, 2020]。

研究テーマ2「種を超えて保存された相同器官(四肢)固有の形態形成ダイナミクスの存在」

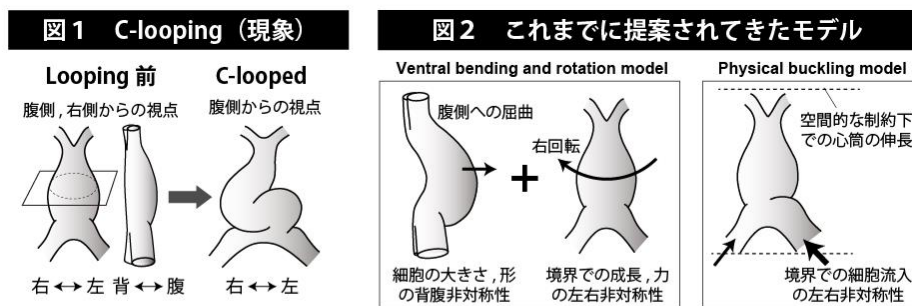


図3 ベイズ再構成された組織変形写像と局所変形量の時空間パターン

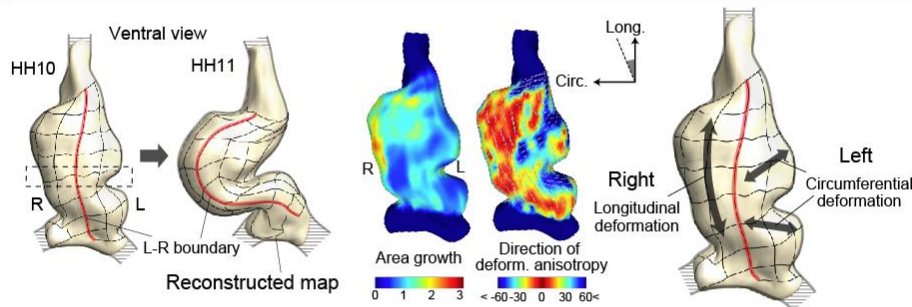
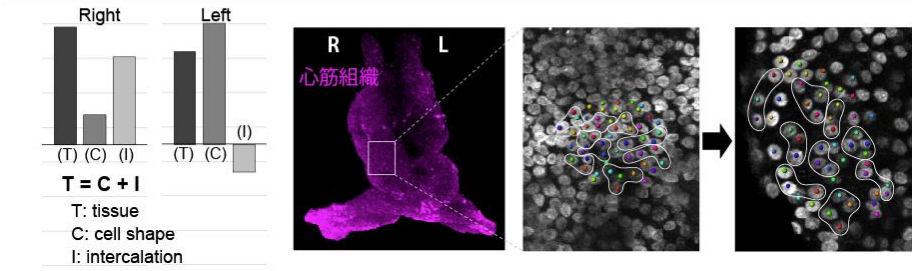


図4 組織変形量の細胞素過程への分解と右側組織で見られる細胞再配列



相同器官の発生を制御する基本的な遺伝子セットは種間で保存されている。また器官原基(例えば四肢発生の例でいうと肢芽)の大きさやアスペクト比(例えば遠近長:前後長)は種間で明確に異なるものの、Hox を含む典型的な領域化遺伝子の時空間発現パターンは種間で「相対的に」似ている。そのため相同器官は同じような形態形成過程を経るだろうと「漠然と」想像される。「相対的に」をより数理の言葉で述べ、「漠然と」想像されることを客観化するために、研究代表者らは適切な座標系下で変形動態を観測することでこの問題に迫ることを提

案した(unpublished のため詳細は省略)。アイデアの数学的定式化を行い、実験検証のためにアフリカツメガエル後肢発生過程の細胞系譜追跡データをもとに組織変形写像のベイズ再構成を行い、得られた結果を以前に発表済みであるニワトリ四肢発生過程の変形写像 [Morishita et al., Development, 2015] と定量比較解析を行った。結果として、提案した座標系では、両者の動態が強い一致性を示し、種間で保存された形態形成動態の存在が明らかとなった [Morishita et al., unpublished 投稿準備中]。

研究テーマ3「四肢間葉細胞の培養系における軟骨パタン形成過程の計測と動態解析」

脊椎動物四肢間葉細胞の培養系で見られる細胞の凝集過程(軟骨分化パタン形成)を実現するためのメカニズムを理解するため、ニワトリ胚を用いた高分解能イメージング系を確立した。画像解析技術を用いて、各細胞軌道の検出に成功し、PIV(particle image velocimetry)や PTV(particle tracking velocimetry)等の解析により細胞間の運動に相関が見え始めている。しかし、個々の細胞の運動のランダムネスがとて強く、現時点までにクリアな結果が得られておらず、当初想定していたタイムスケジュールよりも遅れている。さきがけ研究の終了後も引き続き解析を進め、当初の目的を完遂することを目指す。他方で、運動を人工的に変化させる目的で光刺激依存的な遺伝子発現系をニワトリ胚の細胞内で確立し、結果を論文発表した [Kitajima et al., Dev. Growth Differ, 2021]。

3. 今後の展開

器官発生現象は生物学の一大テーマであるにも関わらず、器官形態形成過程の背後にあるルール・支配方程式は、全くと言っていいほど明らかになっていない。組織変形動態解析は、物理現象としての形態形成過程の背後にある構成則を解明するうえで極めて重要な情報を提供する。形態形成機構を解明することは、純粋な理学的興味に加え、幹細胞から複雑な3次元器官創成を目指す次世代再生医学とも密接に関連する。例えば、現在のオルガノイド研究では各臓器の分化マーカーの発現パタンは再現できる一方で、その形態は実際に機能する臓器と比べ極めて未成熟である。この事実は、これまでにシステム生物学で研究が進んでいる細胞内・細胞間シグナル伝達ネットワーク動態により決定される細胞分化パタン制御の問題と、複雑な物理過程である形態形成の問題が大きく異なることを示しており、この意味で形態形成研究の一層の進展が望まれる状況にある。形態形成動態の背後にあるルールが明らかになることと、それを正確に制御可能とする技術開発はまた別の問題であるため、社会実装へとつながるタイムスパンを予測することは難しいが、希望的観測としては10年後には器官の形を操作する研究が主流になる未来構築を目指したい。

4. 自己評価

本研究の目的は、形態形成研究とパタン形成研究で典型的に得られるデータに対し、情報科学の手法を応用することで、背後にあるメカニズムを解明することである。形態形成研究に関しては、心臓初期発生の計測と詳細な数理解析を通じ、従来モデルが想定してきたことは大きく異なる、よりダイナミックな描像(一度形成された構造が細胞再配列を通じ形態を時々変化させる)を明らかにすることができた。また、四肢形態形成過程の種間比較によって、(少なくともニワトリ・カエルの2種に対して)種を超えて保存された動態の存在を示し

たことは、新規性・独創性の高い発見であり、本さがけ研究の主要な結果と位置付けることができる。この結果に関しては現在論文執筆中であり、可能な限り早急に国際誌掲載を目指したい。他方で、細胞集団運動を通じたパターン形成に関する研究は、細胞運動自身の強いランダムネスにより計測データの画像解析に時間がかかり、当初の計画よりも進展が遅れているが、着実に進展はしているため、さがけ研究終了後も当初の目的を完遂すべく研究を継続する計画である。

研究実施体制としては、研究代表者とデータ取得・解析補助を行う研究補助者という適切な組織で研究を進めることができた。また、研究費執行状況についても当初計画より大きな変更はなく、順調に進めることができた。

さがけ研究の成果の展開を1つのコアプロジェクトとした CREST 研究課題が採択され(2020年11月よりスタート)、さがけ研究で発見した結果を飛躍的に進め、器官発生過程における種間・器官間に共通した形態形成則を解明するための研究基盤を構築することができた。今後も引き続き形態形成研究を継続し、生物学に残された大きな課題の一つである「我々動物の形がいかんにして作られるのか」という問いを解き明かすべく精進したい。上述のように、形態形成研究は、純粋な理学的興味だけではなく、幹細胞から複雑な3次元器官創成を目指す次世代再生医学とも密接に関連するため、得られた成果は医療応用という形で社会へとフィードバックされることが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表 3件まで

研究期間累積件数:4件

1. N. Kawahira, D. Ohtsuka, N. Kida, K. Hironaka, and Y. Morishita, "Quantitative Analysis of 3D Tissue Deformation Reveals Key Cellular Mechanism Associated with Initial Heart Looping", Cell Reports, 30, 3889-3903, 2020

ニワトリ胚の心臓初期発生における形態形成過程(C-looping)に対し、二光子顕微鏡による4D計測(空間3次元+時間1次元)を行い、組織変形写像のベイズ再構成、組織変形に寄与する細胞プロセスの定量解析を行った。その結果、心臓原基を構成する組織の変形異方性の左右非対称性によりループ構造が形成されること、その主要因が特に右側の心筋細胞集団が特定方向に再配列するためであることを解明した。従来の心臓形成モデルが前提とした空間的な制約や外部組織からの細胞流入ではなく、心臓を構成する細胞の集団運動が左右非対称な心臓を形作ることを示すという発見となった。

2. K. Kitajima, N. Kawahira, S. Lee, K. Tamura, Y. Morishita*, D. Ohtsuka* (*co-corresponding authors), Light-induced local gene expression in primary chick cell culture system, Development Growth and Differentiation, 63:189-198, 2021

生体組織または細胞培養系において、ある特定の領域で遺伝子発現量を正確に操作することは、標的遺伝子の機能を解析する上で本質的に重要なことである。発生生物学研究のモデル動物の一つであるニワトリでは、様々な遺伝子導入・発現系の手法が確立されてきた

が、空間的に正確に発現を制御することに限界があった。本研究では、最近報告された光刺激依存的に活性を変える GAVPO タンパクを利用した光依存的遺伝子発現誘導系をニワトリ細胞の初代培養系に導入し、機能的なたんぱく質を効率的に誘導することを示した。光照射条件をうまく調整することで、遺伝子破壊や導入による二値的発現ではなく発現量を多段階的に制御可能であることを示した。

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会招待講演

(3-1) Y. Morishita, “Quantitative and comparative analysis of tissue deformation dynamics during chick and Xenopus limb development”, EMBO workshop – Limb Development and Regeneration, Barcelona (Spain), 2019

(3-2) Y. Morishita, “A quantitative and systems approach to vertebrate forebrain and heart morphogenesis”, Annual Meeting of SMB and JSMB, Sydney (Australia), 2018

国内学会招待講演

(3-3) Y. Morishita, “Bayesian reconstruction of tissue deformation maps and common rules of morphogenetic dynamics”, 日本分子生物学会年会, 2020

(3-4) Y. Morishita, “4D 計測・データ解析・数理モデリングを通じた器官形態形成メカニズム解明へのアプローチ”, 第 19 回日本心臓血管発生研究会, 2020

(3-5) Y. Morishita, “Quantitative analysis of tissue and cell dynamics during early heart development”, 第 126 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2021

プレスリリース

(3-6) https://www.riken.jp/press/2020/20200416_1/index.html

著作物

(3-7) 森下喜弘, 器官発生時の組織変形写像のベイズ的再構成, 可視化情報学会誌 Vol.40 No.159(2020 年 10 月)