

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22742

研究課題名（和文）数理モデルと実験の融合による顆粒球分葉核形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of nuclear segmentation in granulocytes

研究代表者

杉原 圭（Sugihara, Kei）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：80875881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞核は遺伝情報を保持する重要な細胞内小器官であり、一般にその形態は球状や楕円体状とされているが、顆粒球は、分化・成熟に伴い、桿状を経て分葉した極めて特殊化した形態へと至る。この形態ができるメカニズムの全体像を明らかにするため、本研究では、粗視化2次元粒子モデルを構築し、弾性を持つ膜内部でクロマチン凝集による体積減少が起こることによって生じる形態変化として分葉核形成過程を再現した。また、その仮定の一部を実験的に検証するとともに、メカニズムのさらなる詳細な理解へ向けた実験系の構築も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古典的に教科書に記載されている顆粒球の核分葉という形態がつくられるメカニズムの一端を数理モデリングと実験を融合することで明らかにした。また、このモデル枠組みは他の特殊化した核形態への適用可能であるため、悪性腫瘍などで見られる核の形態異常などの疾患における形態変化への応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：The nucleus is an essential intracellular organelle that retains genetic information and is generally considered spherical or ellipsoidal. However, granulocytes undergo differentiation and maturation into band-shaped and then lobulated, a highly specialized morphology. To elucidate the morphogenetic mechanism of this drastic change, we developed a coarse-grained two-dimensional particle model. Using this model, we reproduced the process of lobulation as a morphological change caused by volume reduction due to chromatin condensation inside an elastic membrane. We also experimentally verified some model assumptions and constructed an experimental system to explore the detailed mechanisms further.

研究分野：数理生物学・発生生物学・細胞生物学

キーワード：核分葉 顆粒球 好中球 数理モデル 形態形成 核膜 核ラミナ クロマチン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

細胞核は遺伝情報を保持する重要な細胞内小器官であるが、その形態は一般に球状や楕円体状とされている。また、核の形態異常はがん細胞の特質として病理学で重視されている。しかし、生理的な条件での核形態の多様性については組織学・発生学ではほとんど注目されてこなかった。

自然免疫を担う好中球などの顆粒球は、分化・成熟に伴い、球形、桿状を経て分葉した極めて特殊化した形態へと至る(図1)。この形態ができるメカニズムについては、ラミンB受容体遺伝子欠損によるPelger-Huët異常が核の低・無分葉構造を示すことを端緒に、遺伝子・分子と形態の関連について断片的な情報が得られつつあるが、なぜその形ができるのかという形態形成の原理は明らかではない。

生物は個体・組織・細胞にわたる種々の階層で多様性に富んだ形態をとる。このような形態形成過程の原理を明らかにするために、近年では実験生物学的なアプローチに加えて、数理モデルを用いることでその原理を解明しようとする研究が行われるようになってきている。しかし、形態形成現象に対する数理モデルを利用した融合的アプローチはこれまで多細胞レベルでの現象で多く行われており、単細胞レベルで起きる形態形成現象については注目が集まっていない。



図1: 顆粒球の核形態変化

2. 研究の目的

前述の背景を基にして、本研究では、核膜動態と内部構造動態、及びそれらの相互作用を数理モデル化し、細胞レベルの形態形成原理の予測・抽出を行うとともに、生物学的実験を組み合わせ、特異な核形態形成機構の原理を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 数理モデリング

単純な2次元の粗視化モデルとして、核膜・核ラミナを膜粒子、ヘテロクロマチン成分を内部粒子として表現し、膜粒子間の曲げ弾性と圧縮弾性、内部-内部粒子間・内部-膜粒子間に働く相互作用、内部粒子の増加、体積保存項、ランダム運動、空間制約を考慮した。分化成熟過程でのラミン発現減少に対応する核表面の曲げ弾性低下、ヘテロクロマチン領域の増加に対応する体積保存項の標準体積低下と内部粒子数の増加、ヘテロクロマチン間相互作用の増強に伴う内部-内部粒子間相互作用の増強をモデルパラメータの経時的変化として実装した。数値計算はC++ (g++ version 11~13)を用いて行なった。

(2) 実験的観察

(2-1) 培養細胞を用いた観察

HL-60細胞を理化学研究所バイオリソース研究センターから入手した。10%ウシ胎児血清添加RPMI1640培地で培養し、1.25% DMSOあるいは1 μ M レチノイン酸にて3-5日間分化誘導を行った。核はHoechst 33342で染色し、分化誘導に伴う形態変化をNikon A1Rを用いて観察した。

(2-2) マウス初代細胞を用いた分化誘導系

先行研究[1,2]に基づき、マウス初代骨髄細胞を用いたex vivo分化誘導系を立ち上げた。成体マウス(SLCより入手)の大腿骨と脛骨から骨髄細胞を採取し、Lineage Cell Depletion Kit, mouse (Miltenyi Biotec)を用いて造血幹細胞を分取した。20%ウマ血清添加IMDM培地に50 ng/mL SCF, IL-3を添加して3日間培養した後、50 ng/mL SCF, IL-3, G-CSF添加培地で2日間、50 ng/mL G-CSF添加培地で2日間培養することで、成熟好中球様の細胞を得た。培養5日に細胞をHoechst 33342で染色した上でマトリゲルに包埋し、Nikon A1Rを用いて2日間タイムラプス観察を行った。

(3) ヒト標本の観察

健康成人志願者より末梢血を採取し、ACK 溶血バッファーにより赤血球を除去した。Cytospin 3 にてスライドガラスに塗抹し、4%パラホルムアルデヒド固定の後、CD11b 抗体と Hoechst 33342 を用いて染色した。作成した標本は、Nikon A1R を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 数理モデリング

2次元粒子モデルを用いて、弾性を持つ膜内部でクロマチン凝集による体積減少が起こることによって生じる形態変化としてヒト顆粒球の分葉核形成過程が再現された(図2)。また、数値計算実験から、核が一定の空間内に拘束されていることが、分葉はないが伸張しているという桿状球の形態を作ることに寄与する可能性があること、成熟分化過程で核表面の曲げ弾性が弱まり、クロマチン間相互作用が強くなることでそれぞれ分葉核での多分葉形成に寄与している可能性があること、が示唆された。

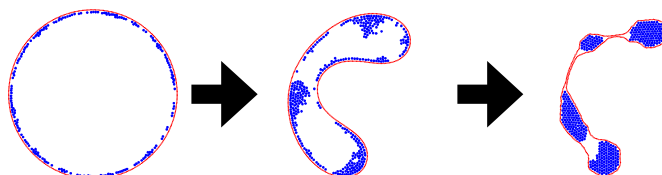


図 2 : 数値計算結果例

(2) 実験的観察

(2-1) 培養細胞を用いた観察

DMSO あるいはレチノイン酸刺激により、HL-60 細胞の核形態には変化が見られたが、いずれも変化は軽微なものが多く、形態学的に成熟好中球様と認められるような変化は認められなかった。

(2-2) マウス初代細胞を用いた分化誘導系

ex vivo 実験系では培養 7 日間で得られる細胞の大半はマウス好中球様の形態を示しマウス好中球マーカー陽性 (Ly6C/6G) であり、効率的に分化誘導が行えていることが確認された。成熟過程のタイムラプスイメージングからは、分化過程における核変形の様子が多彩であり、また、核全体が細胞内でダイナミックに移動しながら変形を生じる様子が観察された。

(3) ヒト標本での形態解析

ヒト標本での形態解析からは、分葉数の増加に応じて表面積に対して相対的に体積が減少していることを示す予備的データが得られた。これはモデルの重要な仮定であるクロマチン凝集による体積減少の妥当性を支持するものである。

(4) まとめ

以上より、核膜・核ラミナ・クロマチンの相互作用によって生じる分葉核形成メカニズムを提唱し、その一端を解明することができた。

<引用文献>

- [1] Gupta D, Shah HP, Malu K, Berliner N, Gaines P. Differentiation and characterization of myeloid cells. *Curr Protoc Immunol.* 2014 Feb 4;104:22F.5.1-22F.5.28. doi: 10.1002/0471142735.im22f05s104. PMID: 24510620; PMCID: PMC4539021.
- [2] Pelletier MG, Szymczak K, Barbeau AM, Prata GN, O'Fallon KS, Gaines P. Characterization of neutrophils and macrophages from ex vivo-cultured murine bone marrow for morphologic maturation and functional responses by imaging flow cytometry. *Methods.* 2017 Jan 1;112:124-146. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.09.005. Epub 2016 Sep 20. PMID: 27663441; PMCID: PMC5205552.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉原 圭, 三浦 岳
2. 発表標題 ヒト顆粒球分葉核形成の数理モデル
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------