

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01819

研究課題名(和文) 器官立体構築原理をデータに基づく数理モデルによって解明する - 心臓発生を例に

研究課題名(英文) A data-driven approach for elucidating morphogenetic mechanisms of early heart development

研究代表者

森下 喜弘 (Morishita, Yoshihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00404062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：器官形態形成に重要となる分子情報の蓄積とは対照的に、組織変形、細胞の集団運動、それらの力学との関与など、形態が構築される「物理プロセス」については殆どの臓器に渡って未解明のままである。本研究では、具体的な生物対象として心臓初期発生過程を用い、二光子顕微鏡計測データを基に、組織変形動態と細胞集団運動を定量化し、細胞・組織の両階層で心筒内部の左右非対称な動態を明らかにした。さらにデータ解析から想定される構成則を基に力学シミュレーションを行い、初期形態変化の再現に成功し、国際誌に論文を発表した [Kawahira et al., Cell Reports, 2020]。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々ヒトを含む動物や臓器の形がどのように形成されるかという問題は生物学における長年未解決な問題の一つである。この問題の解決には、表現型(外形)の定性的な記述や分子生物学による関連遺伝子の同定のみでは不十分であり、物理プロセスとしての理解が不可欠である。また形態形成の問題は、純粋な理学的興味にとどまらず、ES細胞やiPS細胞を培養し複雑な3次元形状を作り出す次世代再生医学においても、目的の臓器形状やサイズを自在に制御するという観点からも深く関係する。心臓以外の臓器に対しても同様の解析を行うことで、臓器間に共通した形態形成則の存在が解明されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In contrast to the accumulation of information on molecules important for organ morphogenesis, physical processes such as tissue deformation, cell collective motion, and their involvement in mechanics remain unresolved for most organs. In this study, we performed high resolution 4D imaging of early heart development (specifically, C-looping process) and quantitative analysis of tissue and cell dynamics from cell trajectory data. We found left-right asymmetric dynamics within the heart tube at both cellular and tissue levels. We also performed mechanical simulations based on the constitutive laws assumed from the results of data analysis, and succeeded in reproducing the initial morphological changes. These results were published in Cell Reports [Kawahira et al., Cell Rep., 2020].

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 定量生物学 数理モデル

## 1. 研究開始当初の背景

数理モデリング及びシミュレーション研究は、生命現象の理解を深めるための重要なアプローチ方法の一つとして成功を収めてきた。しかし一方で、器官形態形成過程の問題に目を向けると必ずしもそうではないだろう。これは、器官発生過程は極めて自由度が高いシステムであり、現象を理解するためのモデル構築に必要な実験データが不十分であるためである。ヒトを含む動物の器官形成過程は、塊や管のような単純な形態を持つ細胞集団が複雑に変形・成長することで最終的な形態へ到達する。当たり前のことではあるが、同一初期状態から目的の器官形態を構築するための道筋には無数の可能性がある。例えば、いつ、どこで(細胞分裂・細胞死を通じて)体積の増減が起き、また細胞同士がお互いに再整列することで特定の方向に伸長するか、あるいは変形履歴や力学環境によってどう力学応答特性(物性の異方性、能動的な変形異方性)を変化させるのか。数理モデリングやシミュレーションしようにも、こうした無数の可能性を試験することは極めて困難であり、メカニズムを絞り込む必要性から実験データに向き合うことが不可欠である。器官全体の3次元形状の経時的变化、組織内の細胞軌道、組織の物性や応力分布に関して測定可能な範囲でデータを取得し、器官固有の形を決めるのに重要と考えられる因子を抽出することが必要である(他方でこれらのデータは数理モデルの性能評価にも利用可能である)。

また、体積成長と大変形を伴う生体材料の力学を記述するための数理モデルが十分に整備されていないことも、器官形態形成研究が発展途上であることの一理由の一つと考えられる。器官発生過程における生体材料は、力学状態に応じた能動的な変形・体積成長を伴いうる。こうした複雑な材料は、非生物材料を扱う分野(材料力学、構造力学等)ではもちろんのこと、バイオメカニクスの分野においてもあまり想定されてこなかった。そのため、データから想定される成長と変形のルールを適切に反映することができるより体系だった数理モデル構築が必要となる。

## 2. 研究の目的

上述のように、器官立体構築原理を理解するためには、(1)仮説を構築するのに十分な定量的データの取得と解析、および(2)成長と能動的変形を扱うことのできる力学モデルの構築が不可欠となる。本研究では具体的な生物対象として心臓形成過程を例に、実験データに基づく数理モデル(超弾性体モデルをベースとした体積成長・大変形を伴う非線形連続体力学モデル)を構築し、正常発生過程の再現、形態異常の予測を目指す。具体的には実験と理論の両側面から以下の研究課題に取り組む。

課題1: 心臓発生時における一部の細胞軌道データを取得し、微分幾何的定式化とベイズ統計モデルを組み合わせることで組織変形写像と変形テンソルの時空間マップを構築する。

課題2: 力学状態に応じた能動的変形・体積成長を扱う非線形連続体力学モデルを構築する。

課題3: 応力分布と組織変形量に関するデータから、心臓初期発生時の形態形成則(構成則)を想定し、モデル化する。

課題4: 正常発生時の心臓形成過程をシミュレーションによって再現し、また形態異常のメカニズムを予測する。

## 3. 研究の方法

課題1: 研究代表者らは、以前の研究において、スパース(組織内全細胞の数%)かつランダムにラベルされた細胞の軌道データから、任意の座標系によって記述された複雑な3次元組織変形写像  $\varphi(X,t)$  (及びそれから計算される変形テンソル  $C(X,t)$  の時空間マップ) を正確に再構築するベイズ推定方法を開発した [Morishita et al., Nature Communications, 2017]。その手法をニワトリ胚の心臓発生過程のデータへ適用し、変形ダイナミクスの定量解析を行った。細胞軌道データは、エレクトロポレーション法により、ランダムに蛍光たんぱく質を発現させた細胞を、二光子顕微鏡を用いた4D計測により取得した。

課題2・3: 生体組織の物性を表す構成式(力と変形の関係式)としては、超弾性体を基本とする。超弾性体は血管の力学特性を表すモデルとして良く用いられてきた。大変形・体積成長を実装する方法として、変形勾配テンソル  $F$  (局所成長) を(i)能動的な変形及び質量増減を通じた成長過程  $F_g$  と(ii)弾性変形  $F_e$  (超弾性体としての) に分解することを考える。(i)では応力フリーの状態を仮定するが、その結果各組織断片は不適な配置をとる。その不適な配置を超弾性体という拘束条件によって適正な配置へと戻す過程が(ii)に相当する。課題1と課題3で得られる幾何学的・力学的情報から構成則を想定し、 $F_g$  として力学モデルに組み込んだ。各時刻における、心筋組織にかかる応力異方性は(能動的変形を伴わない受動的な)力学シミュレーションにより見積もる(心筒内に静水圧を想定した時の心筋組織の曲面方向の応力異方性を計算した)。

課題4：課題1～3によって完成された非線形連続体力学モデルを、有限要素法によって数値シミュレーションする。シミュレーションは並列計算機を用いて行った。

#### 4．研究成果

ニワトリ胚を用いて、心臓初期発生過程（C-looping）に対する4D計測を行い、組織動態と細胞動態の定量解析を行った。初期ループ形成の研究は半世紀以上の歴史を持ち多くの「モデル」が提案されてきたが、細胞運動と組織レベルの変形動態を定量しその関係性を論じた研究は皆無である。特に、現在主流のモデルでは、原始心筒（心筋組織のチューブ）の両端から流入する細胞数や応力の左右非対称性が重要なメカニズムとされているが、先行研究において「心臓組織は胚から単離した状態でも自律的にC字型となる形態形成能を有している（Latacha et al., 2005 Dev Dyn）」ことが知られており、心筒の境界に注目した現象の説明には限界がある。本研究で行った組織変形・細胞集団運動の定量解析の結果、心筒の境界ではなく心筒内部において、組織・細胞動態の左右差が明らかとなった。具体的には、右側組織では方向性を持った細胞集団の再配列によって長軸方向に伸長し、他方で左側組織では、細胞再配列の組織変形への寄与は小さく、むしろ細胞の形状変化によって心筒の周長方向へ組織が伸長することが明らかとなった。また、右側組織の細胞集団運動を通じた組織変形の方向は、アクチンの配向性や力学シミュレーション結果から想定される組織内応力方向と直交しており、これはC-loopingを実現するために必要な（右側組織固有の）構成則とみなすことができた。さらにこのデータ解析結果から想定される構成則を基に力学シミュレーションを行うことで、初期形態変化の再現に成功し、国際誌に論文を発表した [Kawahira et al., Cell Reports, 2020]。全期間での研究成果を総括すると、当初の目的をおおむね達成できたと判断する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naofumi Kawahira, Daisuke Ohtsuka, Naoki Kida, Ken-ichi Hironaka, Yoshihiro Morishita	4. 巻 30
2. 論文標題 Quantitative Analysis of 3D Tissue Deformation Reveals Key Cellular Mechanism Associated with Initial Heart Looping	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3889-3903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.02.071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshihiro Morishita
2. 発表標題 A quantitative and systems approach to vertebrate forebrain and heart morphogenesis
3. 学会等名 2018 Annual Meeting of the Society for Mathematical Biology & the Japanese Society for Mathematical Biology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiro Morishita
2. 発表標題 Quantitative analysis of cellular and tissue dynamics and continuum mechanical modeling for epithelial morphogenesis
3. 学会等名 The 11th European Conference on Mathematical and Theoretical Biology (ECMTB 2018)（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiro Morishita
2. 発表標題 Quantitative analysis of cellular and tissue dynamics during early heart morphogenesis
3. 学会等名 51st Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biologists
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiro Morishita and Naofumi Kawahira
2. 発表標題 Quantitative analysis of cellular and tissue dynamics during early heart morphogenesis
3. 学会等名 日本発生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森下喜弘
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第19回日本心臓血管発生研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihiro Morishita
2. 発表標題 Quantitative analysis of tissue and cell dynamics during early heart development
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
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
連携研究者	木田 直樹  (Kida Naoki)  (00732554)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員    (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	大塚 大輔  (Ohtsuka Daisuke)  (40632865)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・上級研究員    (82401)	

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