

令和 7 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2024

課題番号：21K15332

研究課題名（和文）数値モデルと実験の融合による細胞の3次元地形に対する応答機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of cellular response to three-dimensional topography in tissues

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、生物工学の分野では、細胞が3次元的地形を感知し、応答することが明らかになりつつある。一方で、生体内においても同様の応答が存在するのか、またそれが組織や器官の形成・機能にどのような影響を及ぼすのかは、十分に解明されていない。本研究では、血管周皮細胞が血管分岐部に局在する現象に注目し、3次元地形への細胞応答が関与している可能性を示した。細胞分布の定量解析、数値モデリング、*in vitro*および*in vivo*でのタイムラプスイメージングを統合したアプローチにより、この可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生体内における細胞の3次元地形応答という視点から血管周皮細胞の局在機構を調べた。これまで*in vitro*で論じられてきた3次元地形応答を生体内でも生じうる現象として示した点に意義があり、これは形態形成や組織構築の理解に新たな知見をもたらす。また、将来的には、細胞が周囲の環境の幾何学的性質に応答するという性質は、再生医療やバイオマテリアル設計においても活用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In recent years, bioengineering research has revealed that cells can sense and respond to three-dimensional topography *in vitro*. However, it remains unclear whether similar responses occur *in vivo*, and how such responses influence tissue or organ morphology and function. In this study, we quantitatively demonstrated that vascular pericytes preferentially localize near vascular three-way junctions across multiple tissues. Using an integrative approach, including quantitative analysis of cell distribution, mathematical modeling, and both *in vitro* and *in vivo* time-lapse imaging, we suggest that pericyte localization is regulated by the three-dimensional topography of endothelial structures.

研究分野：数理生物学・発生生物学・細胞生物学

キーワード：血管周皮細胞 3次元地形 細胞運動 数値モデル

1. 研究開始当初の背景

細胞は環境に応答して様々な応答を示す。2次元的環境と3次元的環境では細胞運動の様式が大きく異なることや、基質の硬さのような物理的な性質が分化に影響を与えることが知られている。近年生物学の分野で、細胞が3次元地形を感知し応答しうるということが明らかになりつつある。例えば、PDMS樹脂等で微細加工された地形での細胞の振る舞いを調べると、凹凸のある表面では凹領域へ遊走することや、山形の表面では山の麓部分に局在することが明らかになっている。これらの現象には細胞骨格や核-細胞骨格連関が関与していると報告されている。一方で、生体内でもこのような細胞の3次元地形への応答が存在するのか、この現象が組織・器官レベルでどのような影響を与えるのかは明らかではない。

血管周皮細胞は、毛細血管等の小血管において血管を覆うように存在する機能的に重要な細胞である。周皮細胞は、血管発生制御(血管新生・リモデリング)、恒常性維持、血流制御、間葉系幹細胞の供給源など様々な機能を持ち、慢性腎臓病・腫瘍・糖尿病性網膜症などの病態においても重要な役割を果たす。しかし、分子間相互作用に関する研究が大きく進展している一方で、細胞・組織形態や組織内分布などの形態形成機構に関する研究は進んでいない。例えば、血管周皮細胞の数が組織や器官によって大きく異なることは知られているが、各々の組織内でどのように分布し、その分布がどのように形成されるのかは知られていない。生物の組織や臓器が機能するためには個々の細胞ならびに細胞集団が適切な形態を作る必要があるため、形態形成の研究は機能や病態の理解の面からも重要である。

数理モデルやそれに基づく数値計算、数理解析は、複雑な形態形成現象に対するアプローチとして注目されている。申請者はこれまでに数理モデルと *in vitro* 実験を組み合わせ、血管周皮細胞が血管内皮細胞を覆うメカニズムを明らかにしてきた (Sugihara et al. 2020 *J Royal Soc Interface*)。申請者はさらにこれを発展させて、マウス網膜において周皮細胞が血管分岐部に局在する可能性を見出している。

2. 研究の目的

本研究では、血管が分岐部で鞍状の特殊な地形となっているという切り口から、血管周皮細胞の分岐部局在のメカニズムを数理モデルと発生生物学・細胞生物学的研究を組み合わせ、解明することを目的とする。生体内において3次元地形が細胞動態に影響を与えている可能性がある例として、血管系以外にも、造血ニッチ・骨リモデリング・腸絨毛/陰窩などの場が想定される。血管周皮細胞の局在という特定の現象のメカニズム解明を契機に、数理モデルを応用して、広く生体内での3次元地形への細胞応答機構の解明につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 分岐部局在現象の定量解析

まず、3週齢または4週齢の *Ednra-EYFP* マウス網膜サンプル(名古屋市立大学植村明嘉教授から提供)を共焦点顕微鏡(Nikon A1)を用いて観察し、タイリング画像を取得した。次に、血管内皮細胞と壁細胞両方を可視化したゼブラフィッシュシステムを用いて、成体の脳と皮膚の3次元画像を取得した(共同研究:日本医科大学福原茂朋教授・石井智裕助教による)。

(2) 数理モデリング

次に、血管分岐部様の地形に対する細胞応答をモデル化するため、3次元フェーズフィールド法を用いて単純な数理モデルを構築した。本モデルでは、時間的に変化しない基質(血管内皮細胞が作る構造)を表すフェーズと、時間的に変化する地形上を動く細胞を表すフェーズ、また、場合によっては細胞内に存在する核を表すフェーズを用意し、それらの相互作用をモデル化した。基質形状としては、平面、円柱、正弦波様に曲がった円柱(分岐部を想定)を検討した。また、特に細胞の表面張力、細胞-基質間の接着性、細胞の一方向性の遊走(外場による化学走化性を想定)を組み込んだ。

(3) 分岐部特異的な分子の探索

新生仔マウス網膜を用いて、周皮細胞の動態に関係していることが推測される複数の分子について免疫染色を行って、当該分子の分布を可視化した。

(4) *in vitro* 脱細胞界面骨格での細胞動態観察

市販の化粧用スポンジ(脱細胞カイメン骨格、フィリピン産)をメスで2-3mm角に切った。純水に浸してその中で良く洗浄したあと、70% EtOHに置き換え、一晚以上静置した。スポンジ片を乾燥させたあと、4% Matrigel 溶液中で37°Cで4時間回転させながらコートした。ヒト胎盤由来血管周皮細胞などの培養細胞は、CellTracker Green CMFDAで染色し、スポンジを入れたチューブ内で回転培養することで接着させた。細胞を接着させた後、共焦点顕微鏡(Nikon A1)を用いてタイムラプスイメージングを行った。

(5) *in vivo* タイムラプスイメージングでの細胞動態観察

ゼブラフィッシュ幼生の脳血管上での壁細胞動態をタイムラプスイメージングにより観察した（共同研究：日本医科大学福原茂朋教授・石井智裕助教による）。

4. 研究成果

(1) 分岐部局在現象の定量解析

画像処理手法を用いて、血管周皮細胞や壁細胞の位置を同定した。また、血管構造を抽出し、細線化まで行うことで構造の骨格を抽出した。これらの細胞が接着している血管の位置の最近傍の分岐部からの距離を定量し、これを内皮細胞骨格自体の距離分布と比較した。マウス網膜やゼブラフィッシュ脳では、実際に細胞が接着している部位は明らかに 0 に寄っており、これらの細胞が血管分岐部近傍に局在している傾向が定量的に明らかになった。一方、ゼブラフィッシュ皮膚ではそのような傾向は観察されなかった。

(2) 数理モデリング

モデルにより細胞が受動的に血管分岐部様の鞍状の地形に向かって自発的に遊走することが明らかになった。また、この現象には、細胞の表面張力と接着性のバランスが重要であることもわかった。また、化学走化性などで細胞が移動し続ける状況であっても、このような地形の近傍に相対的に長く滞留しうること、また、その近傍では一度停留しその後加速する現象（stop-and-go 現象）がみられることを明らかになった。一方、方向性のある運動性の強さが、細胞が分岐部に留まるパターンと分岐部周辺で一旦減速したのち再び動き出すパターンという 2 つの違いに影響しうるということがわかった。以上の結果は、地形の影響で血管周皮細胞の分岐部局在が生まれている可能性を示唆する。

(3) 分岐部特異的な分子の探索

探索の範囲では、分岐部特異的な集積あるいは減弱を示すような分子は見出されなかった。完全ではないものの、特定分子の分布の影響で血管周皮細胞の分岐部局在が生まれている可能性を一部否定するものである。

(4) *in vitro* 脱細胞界面骨格での細胞動態観察

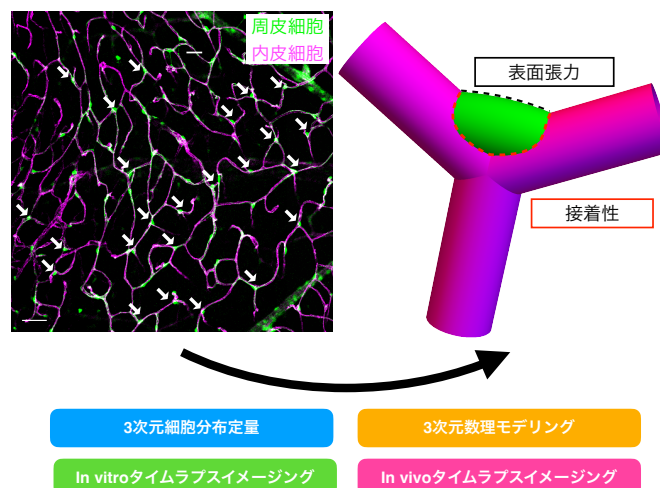
培養血管周皮細胞が、カイメン骨格の分岐近傍で停留し、その後動き出す stop-and-go パターンが観察された。また、同様の現象は他のいくつかの間葉系の培養細胞でも観察された。これらのことは、細胞の分岐部様地形に対する応答が内皮細胞なしでも生じることからモデルの妥当性が支持され、また、この地形応答が周皮細胞特異的でない可能性を示唆する。

(5) *in vivo* タイムラプスイメージングでの細胞動態観察

細胞動態をトラッキングし、細胞が停留した後に高速に動き出すというパターンを同定したところ、そのイベントのほとんどが血管の分岐部、あるいは分岐でなくとも湾曲の強い部位近くで起こっていることがわかった。これは、生体でも stop-and-go パターンが生じていることを示すものであり、モデルの妥当性を支持する。

(6) まとめと展望 (図)

細胞分布の定量解析、数理モデリング、*in vitro* と *in vivo* のタイムラプスイメージングの結果から、血管周皮細胞の分岐部局在という現象が、細胞の地形に対する応答によって生じている可能性が強く示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉原 圭, 石井 智裕, 黄 嘉偉, 植村 明嘉, 菊地 謙次, 福原 茂朋, 三浦 岳
2. 発表標題 Cellular response to 3D topography in vivo observed in vascular pericytes in blood vessels.
3. 学会等名 第52回内藤コンファレンス「物理的・機械的視点が拓く生物学」
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 杉原 圭, 石井 智裕, 黄 嘉偉, 植村 明嘉, 菊地 謙次, 福原 茂朋, 三浦 岳
2. 発表標題 内皮細胞のつくる3次元地形による血管周皮細胞の分岐部選好性
3. 学会等名 第57回日本発生活物学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 杉原 圭, 石井 智裕, 黄 嘉偉, 植村 明嘉, 菊地 謙次, 福原 茂朋, 三浦 岳
2. 発表標題 生体内での細胞の3次元地形応答：ペリサイトの血管分岐部選好性
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉原 圭, 石井 智裕, 黄 嘉偉, 植村 明嘉, 菊地 謙次, 福原 茂朋, 三浦 岳
2. 発表標題 血管内皮細胞のつくる3次元地形によりペリサイトは血管分岐部に局在する
3. 学会等名 第31回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kei Sugihara
2. 発表標題 How does a cell wrap around another cell? - the case of vascular endothelial cells and pericytes
3. 学会等名 Lorentz Center Workshop: Simulating tissue dynamics with cellular Potts model (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉原 圭, 植村 明嘉, 三浦 岳
2. 発表標題 3次元地形による血管周皮細胞の分岐部選好性
3. 学会等名 第55回日本発生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉原 圭, 植村 明嘉, 三浦 岳
2. 発表標題 血管様の3次元地形に対する細胞応答の数値モデル
3. 学会等名 2021年度日本数理生物学会年会
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
---------	---------