

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26400440

研究課題名(和文) 複雑な3次元形態を有する器官発生における組織変形動態の解析手法の確立

研究課題名(英文) Reconstructing 3D deformation dynamics for complex sheet morphogenesis

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・生命システム研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：00404062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：発生・再生現象における3次元形態構築過程は自由度が極めて高い多階層システムにより実現されるため、その理解を目的としたシステムモデル構築のためには実験データに基づいてシナリオを絞り込む必要がある。本研究では、中でも組織レベルの動態に着目し、その理解の最大のネックとなっている計測技術の限界を補完すべく、ベイズ統計モデルに基づき、低分解能データから正確に3D組織変形写像を推定するための手法を構築し、ニワトリ前脳発生データへと提案手法を応用することでその妥当性を示した。これらの結果はNature communications誌に掲載された。

研究成果の概要(英文)：Quantifying global tissue deformation patterns is essential for understanding how organ-specific morphology is generated during development and regeneration. However, due to imaging difficulties and complex morphology, little is known about deformation dynamics for most vertebrate organs such as the brain and heart. To better understand these dynamics, we propose a method to precisely reconstruct global deformation patterns for 3D morphogenesis of curved epithelial sheets using positional data from labeled cells representing only 1-10% of the entire tissue with limited resolution. Combining differential-geometrical and Bayesian frameworks, the method is applicable to any morphology described with arbitrary coordinates, and ensures the feasibility of analyzing many organs. Application to data from chick forebrain morphogenesis demonstrates that our method provides not only a quantitative description of tissue deformation dynamics but also predictions of morphogenetic mechanisms.

研究分野：理論生物学、発生生物学

キーワード：形態形成 ベイズ推定

1. 研究開始当初の背景

「器官固有の『かたち』はどのように決まっているのか?」という問いに答えることは、発生生物学の究極のゴールの一つであり、また純粋に基礎科学としての興味の対象だけではなく「人工的な器官形態の制御・デザイン」という応用研究にも波及効果のある重要な課題である。この課題をクリアするためには、組織-細胞-分子の各階層での動態を定量化し、その特徴量を抽出、そしてそれら階層間のイベントの動的な相互関係を解明することが不可欠である。過去20~30年にわたって、分子・細胞生物学的研究により発生現象に関連する分子・細胞的知見が膨大に蓄積されてきたのに対して、『組織変形動態』つまり組織の各部位がどのような変形を通じて最終的に適切な形になるか、というマクロな情報については殆ど知見がない。形態決定メカニズムを解明するためには、この組織変形動態の定量的解析が不可欠となる。

組織変形は数学的に、変形前後の細胞位置の対応関係を表す非線形写像で表現される。変形写像は「いつどこでどのように細胞集団・組織片が変形したか、形の変化に関する情報のすべて」であり、一番マクロな「組織」の階層において説明したい量そのものである。1細胞レベルの分解能で組織内全ての細胞軌道を追跡できれば写像の定量化は比較的容易である。しかし実際には、ハエやゼブラフィッシュの上皮のように薄く透明な組織という特殊なケースでのみそうした計測・解析が進んでいる。他方で、脊椎動物の多くの器官のように透明度が低く3次元的に大きな構造に対しては、高分解能イメージングは現実的に困難であり、組織変形動態に関する情報は極めて乏しい。これに対し申請者らは、ベイズ推定の枠組みを用いて、離散的に少数だけ導入された蛍光ラベル点の短期間トラッキングデータのみから器官全体の組織変形過程を正確に推定する統計的手法を構築してきた。しかし、これまで提案してきた手法は中空を持たない3次元形状の変形を想定しており、脳や心臓のように空洞を持つより複雑な3次元形態の変形をとらえるためには、より高度な推定方法へと拡張する必要がある。それにより、任意の臓器形成過程へと適用可能となり、多階層システムが一番マクロな組織レベルでの動態情報が解明されることになる。

2. 研究の目的

発生・再生現象における3次元形態の構築過程は自由度が極めて高い多階層システムにより実現されるため、その理解を目的としたシステムモデル構築のためには実験データに基づいてシナリオを絞りこむ必要がある。そのためには、組織-細胞-分子の各階層における動態を定量化して階層間の相関関係を理解することが不可欠であるが、分子・細胞動態と比べて、組織レベルでの変形動態に関

する情報は著しく欠如している。本研究では、組織変形動態の理解の最大のネックとなっている計測技術の限界を補完すべく、(1)ベイズ統計に基づき低分解能データから正確に3D組織変形写像を推定するための手法の構築、および(2)ニワトリ脳発生データを用いた提案手法の有効性の検証を行う。

3. 研究の方法

本研究ではこれまでの研究をシリーズとして展開させ、『より汎用性の高い変形写像推定方法を構築』し、『提案手法を複雑な3次元形態を有するニワトリ脳発生過程へと応用しその有効性を検証』する。より具体的には以下の内容に取り組む。

(1)理論パート:これまでに研究代表者が提案してきたベイズ統計的手法を座標フリー表現への拡張、複雑な形状に適した評価関数の導入、座標データと部分的な変形勾配テンソルの混合データへの拡張、を通じて改良し、より汎用性の高い解析手法を確立させる。

(2)実験パート:複雑な3次元構造の代表例として、ニワトリ胚における脳形成過程を応用例とする。光刺激による蛍光ラベリングと量子ドットを用いたランドマークを生成し、多光子顕微鏡を用いて4D計測(空間3次元+時間)を行い、理論パートで確立した解析手法の有効性を検証する。

4. 研究成果

我々は、対象とする器官が十分多くの細胞から構成され、近似的に連続体とみなすことができると仮定し、“連続体の変形を記述する写像の推定”のための方法と実データを用いた手法の検証を行った。脳や心臓など、多くの臓器の発生過程では、管や袋状の上皮組織が変形することにより目的の形が作られる。従って、特に閉曲面で近似可能、つまり2次元多様体として記述可能なシート状の組織を研究対象とした(図1左)。

写像の推定の概略は、以下の通りである(図1右破線内)。

まず、発生の各時点における対象器官の形態と、少数のラベルされた細胞あるいは細胞小集団をランドマーク(目印)として、その3次元座標を計測する。

次に、球面調和関数などを用いて、対象器官を2次元多様体としてみたときの2次元局所座標系を定義する。これは、地球表面上の各点が緯度と経度の二つの数字の組で表されるように、シート状の組織の表面上に2次元の曲線座標系が張られることを意味する。

計測したランドマークの異なる2時点間の座標の位置情報から、写像を推定する。データ観測の確率分布と組織内部と境界の変形が滑らかであるという事前分布を組み込

んだベイズモデルを構築し、対数周辺尤度の最大化問題を数値的に解くことで、2次元座標系で表された変形写像が推定される。

最後に、得られた2次元写像を3次元写像に変換することで、目的の変形写像が得られる。

一旦変形写像が得られれば、各時点、各場所において、組織の体積(面積)変化速度や方向依存的な伸長や収縮などの形態変化の情報を全て計算できる。この手法を、ニワトリ胚の前脳の発生過程へ応用した。ヒトを含む哺乳類や鳥類などの羊膜類では、脳は神経管が複雑に変形することで形成される(図1左)。特に発生初期では、眼胞と呼ばれる突起の形成と伸長が起こる(図1左)。眼胞とは将来、その先端に眼(レンズや網膜)が形成される部位である。

推定された変形写像をもとに、組織の各点における局所的な変形量を計算した。その結果、対象とした前脳の発生過程における形態の変化は、組織の体積変化がある領域(眼胞の先端)に集中するなど、空間的に非一様な成長によって起こるのではなく、“組織の各場所で細胞小集団が一つの軸方向につぶれることで起こる”ことが明らかになった(図1右下)。この傾向は、発生初期から十分に眼胞が形成するまで観察された。

観察した発生過程では、細胞の大きさや形状には大きな変化はなく、また細胞の分裂方向にも規則性が無かった。従って、“方向依存的な組織の変形は、細胞集団がその位置を再配列することによって実現すること”が示唆された。すなわち図1に示した形態変化は、場所による体積変化の差を伴わずに、組織の一方方向への伸長と収縮のみで起こっていた。

本手法により、高分解能で計測することが困難な多くの臓器に対して、全体の1~数%程度の細胞という比較的少数のランドマーク情報から、その組織変形過程を再構築することが可能になった。また、こうした組織レベルでの解析を、正常胚と先天性奇形・形態異常を引き起こす遺伝子を欠損した胚との間で定量的に比較することで、「各遺伝子が発生過程のいつ、どこで、どのように形に影響を与えるのか」という問題を数値化することが可能になった。

遺伝子・細胞・組織という異なる階層におけるダイナミクスの関係性が統合的に理解されることで、将来的にはヒトを含む動物の形が決定されるメカニズムの解明と、さらにはその仕組みを利用した機能的な臓器形態のデザインや制御技術へとつながることが期待できり。

本研究は、生命現象の解明に数学的なアプローチが有効であることも示した。

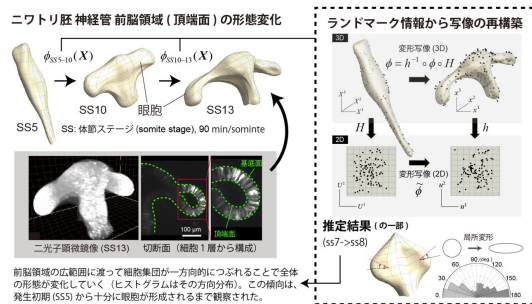


図1 曲率を持つ複雑なシート状組織の変形動態解析

左 : ニワトリ胚の前脳の発生過程を示す。脳や心臓をはじめ、多くの臓器の発生過程では管や袋状の上皮組織が変形することにより最終的な形態ができあがる。

右上 : 本研究で提案した、限られたランドマーク位置座標情報から変形写像を推定する過程の模式図。Hとhは2次元局所座標系を与える。また、組織上の黒点は模式的なものであり、実データではない。

右下 : 推定された変形写像をもとに組織の各点における局所的な変形量を計算した結果、前脳初期発生における形態の変化は、組織の体積変化がある領域(眼胞の先端)に集中するなど空間的に非一様な成長が起こることで実現するのではなく、組織の各場所で細胞小集団が一つの軸方向につぶれることで実現することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Morishita Y, Hironaka KI, Lee SW, Jin T, Ohtsuka D., Reconstructing 3D deformation dynamics for curved epithelial sheet morphogenesis from positional data of sparsely-labelled cells, Nature Communications 2017 May 2: 8(1):15. Doi: 10.1038/s41467-017-00023-7

〔学会発表〕(計1件)

1. Yoshihiro Morishita, Reconstructing 3D deformation dynamics for curved epithelial sheet morphogenesis and attempts of tissue mechanical modeling, GFE-JSDB joint meeting (招待講演), Kiel, Germany (2017/3/15 ~ 3/18).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.qbic.riken.jp/japanese/research/outline/lab-32.html>

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

6．研究組織

(1)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・生命システム研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：00404062

(2)研究分担者

なし

研究者番号：

(3)連携研究者

大塚 大輔 (OHTSUKA, DAISUKE)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：40632865