

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K13325

研究課題名(和文)形態形成因子の定量計測による細胞発達メカニズム解明手法の確立

研究課題名(英文)Spatio-temporal analysis to elucidate the 2D pattern formation mechanisms

研究代表者

萩原 将也(Hagiwara, Masaya)

大阪府立大学・21世紀科学研究機構・講師

研究者番号：00705056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、2次元における培養環境を微細加工技術により制御し、数理モデルの理想的な環境にin vitro実験を限りなく制御し、実験とモデルのフィードバックを繰り返すことにより、数理モデルの有用性を最大限引き出すことで、細胞が自律的に形成するパターン形成メカニズムのダイナミック解析を達成した。細胞主としてはヒト正常気管支上皮細胞を用い、フォトリソグラフィーにより培養開始時における細胞集団の幾何形状および濃度を制御し、反応拡散モデルとのフィードバックを行った。

研究成果の概要(英文)：We have developed in vitro experimental model to generate two-dimensional pattern formation on a glass slide. The cell position control is relatively easy for 2D culture and our system does not require heterotypic cell-cell interactions but epithelial cells can produce the specific pattern by themselves. Here we employed photolithography technologies to control initial culture environments on a glass slide in order to match the in-vitro experimental conditions and simulation conditions exactly. By conducting pattern formation experiments and developmental simulations simultaneously with the same initial cell positions, quality of the analysis can be improved significantly to elucidate the pattern formation mechanisms.

研究分野：マイクロナノシステム

キーワード：培養制御 細胞位置制御 パターンフォーメーション 反応拡散モデル

1. 研究開始当初の背景

肺気管支の分岐形成や血管ネットワーク形成など多くの細胞組織は発達の過程でそれぞれ固有のパターンを形成する。しかし細胞がどうやってお互いにコミュニケーションをとり組織全体としての形状を保っているかなど、発達メカニズムについては不明な点が多い。その要因の一つとして、細胞間コミュニケーションにおいてやり取りされる分子のダイナミクスを培養実験のみでは解析が困難であることが挙げられる。そこで数理モデルを用いて、分子の時空間変化を解析することにより発達のメカニズム解明に大きく寄与することが期待されている。一方、数理モデル内に多くの実験パラメータが存在しているため、シミュレーションの評価は定性的なものが主体となっていた。さらに *in vitro* による実験系では、実験条件のバラつきに起因するノイズが多く含まれ、発達する分岐パターンの再現性の点で課題が残る。結果として実験とモデルの間には曖昧性を含むギャップが存在していた。

反応拡散系モデルは細胞が発する形態形成因子の空間的な拡がりから細胞パターン形成をモデル化したものであり、細胞組織発達のメカニズム解明に大きく寄与することが期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、2次元平面において気管支上皮細胞のみで細胞集団が固有のパターン形状を形成する実験系を用いて、細胞集団がどのようにして固有の形状へと移動・増殖を行うのかというメカニズムを解明するための手法を確立することを目的としている。2次元における実験系を微細加工技術により制御し、限りなく数理モデルの理想的な環境に培養実験を近づけることにより、上皮細胞集団が形成するパターンの再現性を大幅に向上させることができる。さらに実験とモデルとの比較も定量的に行うことが出来るようになり、培養初期条件を変化させながら両者のフィードバックを繰り返すことにより、モデルの精度を大幅に向上させることができるようになる。

3. 研究の方法

本研究では以下の手順により、気管支上皮細胞集団の2次元におけるパターン形成メカニズムを *in vitro* 実験と反応拡散モデルの両面から解析・立証を行う。

① *in vitro* 培養初期条件制御

フォトリソグラフィ技術を用いて作製した PDMS マスクにより、細胞集団の初期位置・濃度を制御し、細胞を整然と配列した外乱を最小限に抑えた状態から培養を開始することで、形成するパターンの再現性を向上させ、細胞集団の移動方向・位置を定量的に計測する。

② 反応拡散モデルによるパターン形成シミュレーション

③ 反応拡散モデルによるパターン形成シミュレーション

反応拡散モデルは細胞が発する形態形成因子の空間的拡散と個々の因子の反応を数値モデル化したものであり、これを用いる事により細胞がどのように発達してパターンを形成しているのかを知る手掛かりになる非常に有効なツールである。そこで本研究では以下の H. Meinhardt が提唱したモデルを用いる (H. Meinhardt, *Differentiation*, 1976)。

$$\frac{\partial A}{\partial t} = \frac{cA^2S}{H} - \mu A + D_A \nabla^2 A + \rho_A Y$$

$$\frac{\partial H}{\partial t} = cA^2S - \nu H + D_H \nabla^2 H + \rho_H Y$$

$$\frac{\partial S}{\partial t} = c_0 - \gamma S - \varepsilon SY + D_S \nabla^2 S$$

$$\frac{\partial Y}{\partial t} = dA - eY + \frac{Y^2}{1 + \beta Y^2}$$

In vitro 実験で得られた細胞集団のパターン形成と上記モデルによるシミュレーションとを比較し、必要に応じてパラメータを修正する。次に初期条件を変更して実験とモデルのフィードバックを繰り返すことで、モデル精度の向上を図る。

4. 研究成果

① *in vitro* 培養初期条件制御

細胞の初期位置制御については、図1に示すようにシリコン基板上にフォトリソグラフィによりパターンニングした SU-8 の型を作製し、この型に熱硬化性樹脂である PDMS (Polydimethylsiloxane) を流しこみ、マイクロパターンを持つ PDMS の薄膜を作製する。この PDMS 薄膜をエタコールに濡らした後に培養ディッシュ上に置き、オープンにすることで、エタコールが蒸発時に PDMS 薄膜とディッシュとの間にある空隙をなくすることができる。その後 PDMS 薄膜上から細胞混濁液を滴下して培養することで、マイクロパターンの内側のみに細胞がディッシュに接着し成長するようになる。マイクロパターン内における細胞が一杯になるまで培養を行った後に PDMS 膜を取り除き、その上からゲルで被膜することで実験系が完成する。本手法により従来の細胞位置制御手法よりも簡便に細胞集団の形状・濃度を制御することが可能となった。

図2に上記細胞位置制御により三角形に細胞群を配置した際の分岐形成結果を示す。細胞群を三角形に並べてから培養を開始すると、

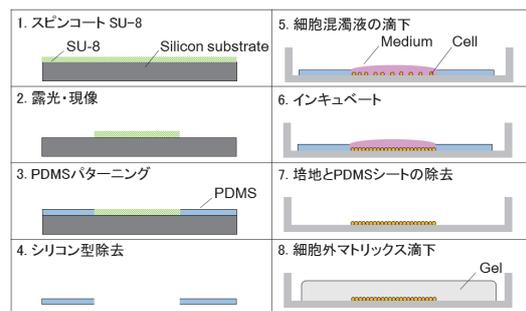


図1: フォトリソグラフィによる細胞初期位置制御プロセス

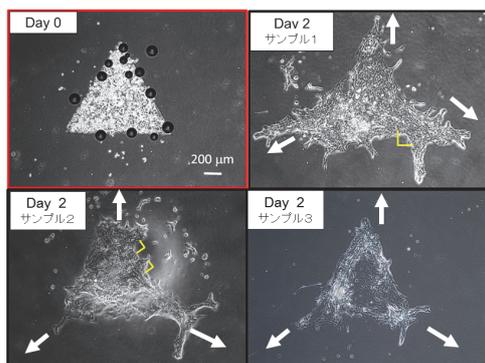


図 2：培養初期条件制御下における気管支上皮細胞パターン形成

どのサンプルの場合においても三角形の頂点から分岐が発生しているのがわかる。さらに分岐の方向は初期位置から 90 度方向に分岐が進んでいる確率が非常に高いことが見て取れる。このように細胞位置制御した上で分岐形成実験を行うことによって、in vitro での実験再現性が大幅に向上させることができるため、上記分岐発生についてどのようなロジックが働いているのかを検証することができる。

②反応拡散モデルによるパターン形成シミュレーション

反応拡散モデルを用いて細胞位置制御した分岐形成実験とシミュレーションとの比較を図 3 に示す。培養初期における細胞群形状を変えながら実験とモデルの比較を繰り返し、パラメータを精査していくことでシミュレーションの精度を向上させることができた。その上でシミュレーション結果を見てみると、実験同様、全ての細胞群形状の頂点から分岐は発達しており、分岐方向も細胞群の稜線から 90 度方向へと伸びていっていることが確認できる。

この原因を解析するため、分岐形成を開始する時点での形態形成因子（活性因子・抑制因子）の濃度分布をシミュレーションにより確認すると、頂点における抑制因子濃度が少なく、活性因子濃度が高いことが分かった（図 4）。これは、抑制因子の拡散速度が活性因子の拡散速度と比較して 10 倍程度速く、抑制因子の影響が遠距離まで届いていることが要因である。抑制因子が遠距離に抑制するため、近隣の細胞数が多い中心付近では抑制因子の濃度が高い一方、周囲に細胞がない頂点付近においては抑制因子の濃度が低い為、逆に活性因子濃度が高くなっている。結果として、細胞の分岐形成は頂点で必ず行われていることが分かった。

次に分岐が細胞群の稜線から 90 度方向へと伸びている原因についてだが、形態形成因子は濃度が高いところから低い方向へと拡散していく。因子自体は細胞から生成されているので、細胞を直線に配列した場合は稜線から 90 度方向へと因子の拡散が進んでいく。この結果分岐方向も 90 度に伸びていくことが分かった。

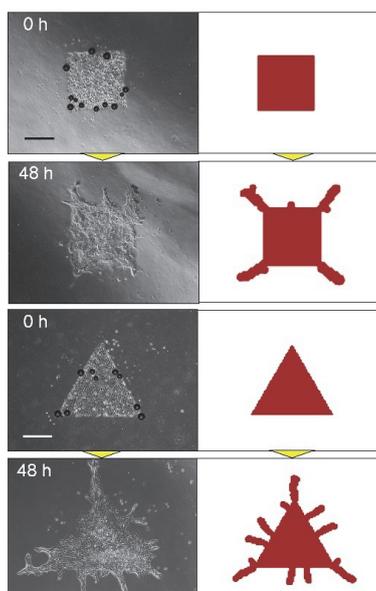


図 3：実験結果と反応拡散モデルによるパターン形成との比較

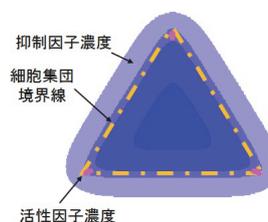


図 4：反応拡散モデルによる形態形成因子濃度分布シミュレーション

以上、本研究では、フォトリスグラフィ技術を用いて細胞培養における細胞初期位置を制御することで、in vitro での実験再現性を大幅に向上させ、数理モデルの理想的な環境に限りなく近づけることにより vitro と silico の実験系の間には存在するギャップを取り除くことを行った。これによりシミュレーション精度は従来と比較して大幅に向上することができ、精度を高めたシミュレーションを用いることで実験では観察できない分子の時空間変化を解析することで気管支上皮細胞集団のパターン形成メカニズムの一端を解明した。

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）

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 白石大和, 萩原将也, 培養環境制御による細胞集団パターン形成制御, 第 33 回化学とマイクロナノシステム学会, 2016 年 4 月 26 日, 東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区)
- ② 萩原将也, 培養制御でつなぐ in vitro/in silico インターフェースによる気管支分岐形成メカニズム解析, 第 32 回化学とマイクロナノシステム学会, 2015 年 11 月 27 日, 北九州国際会議場(福

- 岡山北九州市)
- ③ 萩原将也, 森英樹, 原正之, 二次元気管支分岐形成技術による方向決定メカニズム解明, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, 2015年11月9日, 京都テルサ (京都府京都市)
 - ④ Masaya Hagiwara, “Dynamic analysis of branching morphogenesis by feedback system of Reaction-diffusion model and controlled cell culture”, QBiC Symposium 2015, Aug. 25th, 2015, RIKEN QBiC, Suita, Osaka Japan

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 将也 (HAGIWARA MASAYA)

大阪府立大学 21 世紀科学研究機構・講師

研究者番号 : 00705056

(2) 研究分担者

許 岩 (XU YAN)

大阪府立大学 21 世紀科学研究機構・講師

研究者番号 : 90593898