

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06260

研究課題名（和文）実験 - 理論相互連動による肺の階層構造形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Coordination of FGF and Wnt in the construction of the hierarchical branching structure of lung

研究代表者

今村 寿子 (Takigawa-Imamura, Hisako)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30523790

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：肺気管支が、長さ太さに関して階層的な構造を形成するメカニズムについて、実験観察と数理モデルを組み合わせた研究を行った。その結果、発生が進むにつれて上皮組織のシグナル分子応答性が変化することを見出し、これが分岐枝の長さを調節するという予測を得た。さらに分岐枝径と分岐枝長の調節機構として、細胞変形の重要性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分岐理論研究の中で、本研究の特徴は、2つの異なる分岐原理を組み合わせた点にある。ひとつは上皮の突出部で成長が進むこと、もうひとつは頂端収縮を介した自発曲率変化である。本研究はFGFとWntがこれらの制御を介して分岐スケールを決定していることを示した。定量的実験に基づいた高次分岐のシミュレーションにより、上皮の性質が肺のメソスケール構造をどのように制御しているか新しい視点を提供した。

研究成果の概要（英文）：The mechanism by which the pulmonary bronchi form a hierarchical structure with respect to length and diameter was investigated. Experimental results showed that the FGF signaling responsiveness of epithelium changes depending on the developmental stage, which regulates the branching frequencies, as shown by a mathematical model. I showed the importance of cell shape regulation as a modulator of branching formation when branch diameter is varied.

研究分野：数理生物学

キーワード：形態形成 肺 分岐形成 計算機シミュレーション 数理モデル 発生生物学

1. 研究開始当初の背景

肺は、消化管から分かれ出た気管上皮が、伸長しながら規則的に分岐を繰り返すことで形成される。どの枝にいくつの分岐がどのくらいの角度であるか、種ごとにほぼ決まった形を取る。基部側から末端側になる程、管径も分岐間の距離も短くなるが、肺で見られるこの傾向は、分岐が起きた時点から顕著であり、制御機構の存在が示唆される(図1)。管腔径と分岐枝長は、肺の構造を決定する要素だが、器官形成の中でどのようにプログラミングされているのか分かっていない。

気管支の構造は、上皮管腔の「分岐」と「伸長」の繰り返しにより形作られるものであり、この2つの制御を大域的構造決定の核と捉えることができる[1](図1)。上皮枝の伸長と分岐は、数理モデル研究において「突出した部分ほど早く成長する(ラプラシアン成長)」という性質から説明されてきた[2-4](図2)。これはFGF10濃度依存的な上皮の応答に基づくもので、「上皮枝の先端は成長が比較的早いから、枝は伸長し、いずれ先端が肥大化し曲率が低下すると、形状が不安定化しやすくなるため分岐が起こる」と考えられてきた。つまり分岐は、成長の盛んな先端部分の中で成長速度の違いが生じるもので、上皮側の反応性が重要であると推測できる。間葉を取り除いたマトリゲル培養系でも、上皮は分岐を形成できることから、上皮の自律性の解析が肺の形態形成の解明に必要であると考えた。

本研究の予備検討として、マウス胎仔肺におけるFGF10下流のMAPK活性を測定したところ、上皮組織の突出部ほど活性が亢進していることを確認できた。このような組織曲率に応じたFGF10シグナル活性の変化率は、発生ステージが進むにつれて低下していた(図3上)。そこでラプラシアン成長の数理モデルを構築し予備検討を行ったところ、曲率依存性が低下するにつれて枝長が短くなるのが分かり、実際の枝長の階層性と一致した(図3下)。一方で管径については、細い枝ほど枝長が長くなり、実際の気管支の特徴と矛盾する結果となった。

またこの解析と平行して、FGFと並んで肺発生に重要な制御因子であるWntに注目した検討を行ってきた[5]。研究代表者は、連携研究者の麓勝己助教(大阪大学)と共同して、Wntシグナルによる頂端収縮が細胞間応力を生み出し、組織の自発曲率を上昇させることで分岐を調節していることを明らかにした[6]。細胞変形による組織変形の数理モデルを構築したところ、頂端収縮が分岐を促してサイズの小さい管腔を形成することが示された(図4)。このような頂端収縮を介した自発曲率制御による分岐形成と、上述のラプラシアン成長による分岐形成の連関を調べることで、管径の制御について理解が深まる可能性がある。

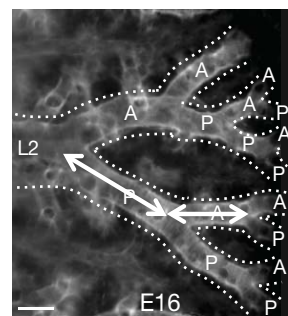


図1 マウス肺上皮の先端分岐(1)より加筆。分岐と分岐の間の距離(白矢印)は、基部側で長く、先端側で短い。

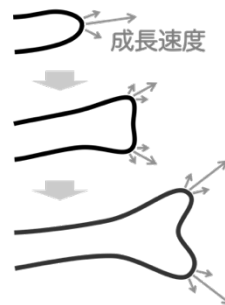


図2 ラプラシアン成長の概念。ラプラシアンは曲率(凹凸度合い)を計算する演算子を指す。上皮組織の突出した(曲率の高い)部分はFGF10シグナルをより強く受け取る。曲率依存的成長による分岐パターン形成は氷晶やバクテリアコロニーの樹状パターン形成にも当てはまる。

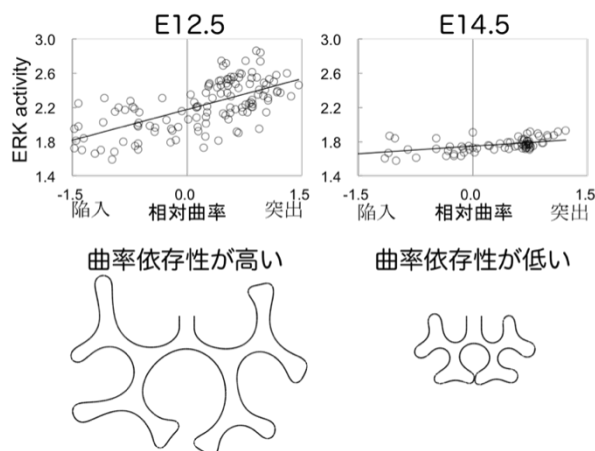


図3 ラプラシアン成長の実験的検証(上)と数理モデル(下)。(上)マウス肺上皮におけるFGF10シグナル活性。突出部では活性が高く、陥入部では活性が低い。胎生12.5日と比較して胎生14.5日には活性の曲率依存性が大きく低減した。(下)成長する上皮管腔を二次元平面上にモデル化し、曲率依存的に成長させると、成長に伴って自発的に分岐構造が現れた。成長(増殖と運動)の曲率依存性を変えることにより枝長の違いが再現された。

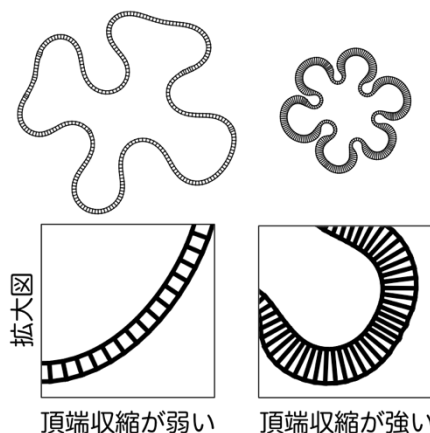


図4 自発曲率モデルにおける上皮シスト成長の表現。上皮細胞に頂端収縮が働くと、組織は高い曲率で安定化する。成長して組織が大きくなると、曲率が低下して不安定化が起こり、複数のbudが生じる。

2. 研究の目的

管腔伸長と分岐形成という現象が積み重なって出来上がる階層構造の制御原理を明らかにすることを目的とした。実験的に枝長や管径を変化させた研究結果は蓄積があるが[7-9]、多くのシグナル経路は多様な作用を持って絡み合っており、形態形成への因果関係や原理の理解につなげることは容易ではない。そこで本研究では、上皮細胞の代表的な挙動として「運動・増殖・変形」を取り上げ、数理モデルを用いてこれらが「形態」に与える影響を調べた。上皮組織の形態形成はこれまで上皮-間葉相互作用を中心に据えた解析が行われてきたが、本研究では上皮組織の自律性という観点で実験観察を行うものとした。発生ステージにわたる上皮の応答性の変化に注目した研究は知られていない。上皮枝の近位と遠位端は Sox2 と Sox9 により成長が制御されているが[10]、形状の階層性がどのように生み出されるかは精査できていない。頂端収縮による分岐形成はトリにおいて報告されているが[11]、我々は Wnt による調節機構を明らかにしており[6]、これを遠位側の管径の制御に結びつけられるか検討が必要であると考えた。

肺の分岐形成の数理モデルは多数発表されているが、枝長と管径の階層性に注目したものは知られておらず、いずれも枝の太さはほぼ均一で長さの階層性も再現されていない[3, 4]。肺上皮では、分岐した先の枝はより細くなり、分岐形成時から階層性が現れている (図1)。このことについて発生初期ほど増殖や運動が盛んであると仮定するだけでは、形成速度が変化することのみで、長さや太さの階層性を説明できない。本研究はこれまで見過ごされてきた新しい問題提起に基づくものであり、上皮組織の構築原理について力学的観点から理論的枠組みの創造を狙った。

3. 研究の方法

(1) マウス胎仔肺上皮の FGF シグナル分布の観察

分岐が形成される腺様期の肺上皮について、組織曲率を FGF シグナル活性を調べる。FGF シグナル活性は、MAP キナーゼ活性をモニターする FRET バイオセンサーを発現させたトランスジェニックマウスを用いて検出した。肺上皮は、dispase 処理により間葉から分離し、FGF10 を添加した Matrigel に埋め込んで培養した。共焦点レーザー顕微鏡により取得した蛍光像から、局所的な組織曲率とシグナル活性を計測した。また、シグナル活性の FGF10 濃度依存性の検定のため、小径で球状の上皮シストを用いてシスト毎のシグナル活性を取得した。上皮細胞内への FGF10 の取り込み量を調べるために、蛍光標識した FGF10 を Matrigel に添加し細胞内での蛍光シグナルを観察した。細胞内の蛍光シグナルが FGF10 タンパク質の局在を反映していることは抗 FGF10 抗体を用いた免疫組織染色により確認した。

(2) ラブラシアン成長モデル

組織成長の曲率依存性により分岐パターンがどのように変化するか調べた。細胞を円と見立て、これをつなぎ合わせた構造により、上皮組織の断面を表現するモデル系を、研究代表者は構築しており[12]、これを応用した (図3)。細胞を増やすことで増殖を、移動させることで走化性を表し、増殖頻度および走化性の強さは局所的な組織曲率に依存すると仮定した。予備検討から、このモデルを用いて高次の分岐構造を表現できると確認した。また、曲率依存性の違いによって枝長が変化することもわかった (図3)。本研究ではさらなる検討として、増殖と走化性のそれぞれの曲率依存性と他のパラメータがどのように枝長や管径を変化させるか調べた。

(3) 頂端収縮モデル

頂端収縮を含めた細胞変形が上皮組織形態をどのように変化させるか調べた。細胞を四角形と見立てて、これをつなぎ合わせた構造により、上皮組織の断面を表現するモデル系を、研究代表者は構築しており[6] (図4)、これを応用した。このモデル系に曲率依存的成長を組み込むことで分岐形成が表現できるか検討した。

また頂端収縮が誘導する分岐の理論解析として、上皮シストの変形 (分岐と定性的に類似する形態不安定化) について数理解析を行った。上皮シストにおいて全周的な頂端収縮が起きた場合に最も安定なシスト形状を数値計算により求め、シミュレーション結果と比較した。

(4) 細胞形状の観察

数理モデルとの比較のため、肺上皮細胞の形状を調べた。E-cadherin 抗体を用いた免疫組織染色を行い細胞形状を観察し定量した。

(5) 細胞形状制御を導入したラブラシアン成長モデル

これまでの観察結果および数理モデル検討結果を踏まえて、曲率依存的な成長と細胞変形を組み込んだ数理モデルを構築した。(3) のモデルを基に、曲率依存的な成長を導入した。このモデルを用いて高次の分岐形成を表現し、各パラメータがどのように分岐形態を変化させるか調べた。

4. 研究成果

(1) マウス胎仔肺上皮の FGF シグナル分布の観察

E12.5、E13.5、E14.5の肺上皮シストについてFGF10シグナル活性の空間的分布を調べた。上皮組織の曲率の高い領域ほどシグナル活性が高いという傾向、および発生初期ほど活性の曲率依存性が高いことを確認した。また他のFGFファミリー分子によるシグナル活性化についても調べたところ[13]、曲率依存性はFGF1でより高く、FGF7でより低かった。これに対応するように、FGF1では突出部の曲率の変化が急峻であり、FGF7では突出部の曲率が低く穏やかに変化していた。

FGF10に関して、シグナル活性化の用量依存性も調べたところ、発生初期ほど用量依存性が高いことがわかった。また、シストが小さく曲率が高いほど活性化が強いことが確認された。FGF10に暴露しない場合にはシストが拡大し細胞の丈が増すことも明らかになった。蛍光標識FGF10の細胞内への取り込みにも用量依存性が確認された。一方で、細胞内への取り込みには曲率依存性は確認されなかった。以上の結果から、発生初期の肺上皮ほどFGF10への応答性が高いが、組織内での活性化状態に違いは細胞内へのFGF10の取り込み量の差では説明できないことがわかった。

(2) ラプラシアン成長モデル

分岐形成のモデルにおいて、増殖および遊走の曲率依存的を変化させたところ、どちらについても曲率依存性が高いほど分岐枝が長くなることを確認した。同じ検討をシストにおけるbud形成のモデルで行ったところ、遊走の曲率依存性が高い場合には細く長く突出したbudが形成され、増殖の曲率依存性が高い場合には丸みを帯びた緩やかなbudが形成されることがわかった。このことから、異なるFGFファミリー分子にで見られた上皮シスト形態の違いは、増殖と遊走への作用の違いに起因する可能性が示唆された。

分岐形成のモデルについては、他のパラメータの影響も調べた。組織の曲げ弾性を高めた場合、上皮枝先端のbudの曲率が下がるが、このとき分岐枝の長さはより短くなった。このことは、予備検討において細い枝ほど枝長が長くなることと関連している。ここでの検討から、長くて太い分岐構造が形成されるためには、高い曲率依存性と高い曲げ弾性が共存する必要があると推測された。

(3) 頂端収縮モデル

細胞形状を表現するモデル系を用いて、曲げ弾性が組織のどのような要素に起因して生じるか調べたところ、個々の細胞の力学的性質を等しく仮定した場合でも、細胞の丈が高いほど組織の曲げ弾性が高まることがわかった。

頂端収縮による分岐形成に関して数理解析を行ったところ、シストの細胞数が、最適な曲率から計算される細胞数を超えると、変形が起きることが明らかになり、計算機シミュレーションの結果ともよく一致していた。分岐後の管径は、細胞の丈と頂端収縮の程度から決定されることも分かった。

(4) 細胞形状の観察

肺上皮細胞のサイズと丈を計測したところ、発生初期ほど細胞が大きく、発生が進むにつれて小さくなること、サイズに比して細胞の丈がも低くなることがわかった。また、上皮枝先端のbud領域では、duct領域に比べて細胞の丈が低くなっていた(図5A)。このことは、(1)においてFGFシグナル活性化と細胞の丈の関連が観察されたことと符号する。(2)および(4)の数理解析の結果と合わせて考察すると、発生が進むにしたがって、成長の曲率依存性に加えて、細胞のサイズおよび丈が変化することで、分岐構造の階層性が制御されている可能性が考えられた。

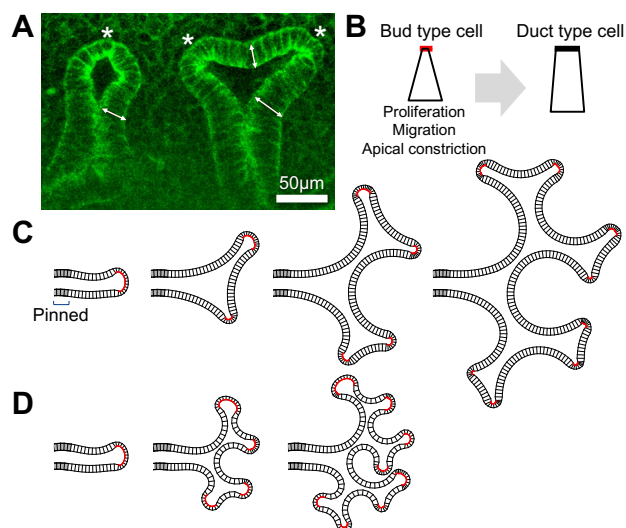


図5 マウス肺上皮枝先端の細胞形状と、細胞形状制御を導入したラプラシアン成長モデル。(A)E14.5 マウス肺の E-cadherin 染色。矢印は duct 領域の丈の高い細胞、*印は bud 領域の丈の低い細胞を示す。(B)Cell type switching の仮定。高曲率領域の細胞は bud 型と仮定し、増殖、遊走、頂端収縮を行う。低曲率領域の細胞は、丈の高い duct 型に切り替わる。(C)成長の曲率依存性が高く、細胞の丈も高い細胞を仮定した場合の、上皮管腔の成長の計算機シミュレーション結果(snapshot)。大きいスケールの分岐構造が現れる。(D)成長の曲率依存性が低く、細胞の丈も低い細胞を仮定した場合。小さいスケールの分岐構造が現れる。

(5) 細胞形状制御を導入したラプラシアン成長モデル

曲率依存的シグナル応答、細胞のサイズ、細胞の丈について、実験観察結果を反映させた数理モデルの構築を試みた。検討した結果、(4)で観察された bud 領域と duct 領域の細胞形態の違いを導入することで、高次の分岐形成が表現できることがわかった。すなわち、曲率の高いところでは細胞の丈が低く (bud 領域)、曲率の高いところでは細胞の丈が高い (duct 領域) と仮定することで (図 5B)、bud 領域が成長するにつれて形態が不安定化し、分岐を生じるという過程が繰り返される様子をシミュレーションすることができた。また、発生過程において見られる曲率依存的シグナル応答と細胞の丈の変化によって、初期の太く長い分岐構造と、より後期の細く短い分岐構造が再現された (図 5C, D)。

以上の成果は学術誌掲載に向けて査読を受けており、受理に先んじて bioRxiv にて公開している (10.1101/2023.03.23.533381)。形態形成分野においては、本研究で取り上げたような力学的な観点が急速に広まってきた。上述の主要テーマで構築した数理モデルを応用して他の様々な現象について力学的形態形成の数理モデルを提案した。分岐研究の発展として、肺とは別の原理が想定される血管形成のモデル化を行った。血管内皮細胞の運動特性による分岐形成モデル系を構築し、マウス胎仔脳に特徴的な血管パターンの制御ルールを予測した [14]。その他、肺胞嚢形成 (連携研究者の麓勝己氏との共著) [15]、細胞コロニー成長 [16]、植物根毛形成 [17]、葉表皮細胞変形 [18] の数理モデルを発表した。

<引用文献>

[1] Metzger *et al.*, 2008. The branching programme of mouse lung development. *Nature*. [2] Miura and Shiota, 2000. Time-lapse observation of branching morphogenesis of the lung bud epithelium in mesenchyme-free culture and its relationship with the localization of actin filaments. *Int. J. Dev. Biol.* [3] Guo *et al.*, 2014. Branching patterns emerge in a mathematical model of the dynamics of lung development. *J. Physiol.* [4] Clément *et al.*, 2012. Shape Self-Regulation in Early Lung Morphogenesis. *PLoS One*. [5] Lin *et al.*, 2017. YAP is essential for mechanical force production and epithelial cell proliferation during lung branching morphogenesis. *Elife*. [6] Fumoto *et al.*, 2017. Modulation of apical constriction by Wnt signaling is required for lung epithelial shape transition. *Development*. [7] Tang *et al.*, 2011. Control of mitotic spindle angle by the RAS-regulated ERK1/2 pathway determines lung tube shape. *Science*. [8] Mucenski *et al.*, 2003. β -Catenin Is Required for Specification of Proximal/Distal Cell Fate During Lung Morphogenesis. *J. Biol. Chem.* [9] Kim *et al.*, 2015. Localized smooth muscle differentiation is essential for epithelial bifurcation during branching morphogenesis of the mammalian lung. *Dev Cell*. [10] Rockich *et al.*, 2013. Sox9 plays multiple roles in the lung epithelium during branching morphogenesis. *PNAS*. [11] Varner *et al.*, 2015. Mechanically patterning the embryonic airway epithelium. *PNAS*. [12] Takigawa-Imamura *et al.*, 2015. Tooth germ invagination from cell-cell interaction: Working hypothesis on mechanical instability. *J. Theor. Biol.* [13] Bellusci *et al.*, 1997. Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10) and branching morphogenesis in the embryonic mouse lung. *Development*. [14] Takigawa-Imamura *et al.*, 2022. Computational model exploring characteristic pattern regulation in periventricular vessels. *Life*. [15] Fumoto *et al.*, 2019. Mark1 regulates distal airspace expansion through type I pneumocyte flattening in lung development. *J. Cell Sci.* [16] Oguma *et al.*, 2020. Mechanism underlying dynamic scaling properties observed in the contour of spreading epithelial monolayer. *Phys. Rev. E*. [17] Hirano *et al.*, 2018. PtdIns(3,5)P(2) mediates root hair shank hardening in *Arabidopsis*. *Nat. Plants*. [18] Gunji *et al.*, 2020. Excess pyrophosphate restrains pavement cell morphogenesis and alters organ flatness in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Oguma Toshiki, Takigawa-Imamura Hisako, Miura Takashi	4. 巻 102
2. 論文標題 Mechanism underlying dynamic scaling properties observed in the contour of spreading epithelial monolayer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Review E	6. 最初と最後の頁 62408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1103/PhysRevE.102.062408	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 -
1. 著者名 Gunji Shizuka, Oda Yoshihisa, Takigawa-Imamura Hisako, Tsukaya Hirokazu, Ferjani Ali	4. 巻 11
2. 論文標題 Excess Pyrophosphate Restrains Pavement Cell Morphogenesis and Alters Organ Flatness in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00031	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Fumoto Katsumi, Takigawa-Imamura Hisako, Sumiyama Kenta, Yoshimura Shige H., Maehara Natsumi, Kikuchi Akira	4. 巻 132
2. 論文標題 Mark1 regulates distal airspace expansion through type I pneumocyte flattening in lung development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs235556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.235556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomoko Hirano, Hiroki Konno, Seiji Takeda, Liam Dolan, Mariko Kato, Takashi Aoyama, Takumi Higaki, Hisako Takigawa-Imamura, Masa H Sato	4. 巻 11
2. 論文標題 PtdIns (3, 5) P 2 mediates root hair shank hardening in Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41477-019-0416-x	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 該当する

1. 著者名 Takigawa-Imamura Hisako, Hirano Saito, Watanabe Chisato, Ohtaka-Maruyama Chiaki, Ema Masatsugu, Mizutani Ken-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Computational Model Exploring Characteristic Pattern Regulation in Periventricular Vessels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 2069 ~ 2069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12122069	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今村寿子
2. 発表標題 肺のヒエラルキー構造形成メカニズムの数理モデル
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会, (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野才人、今村寿子
2. 発表標題 血管内皮細胞集団による分岐構造形成のモデル化
3. 学会等名 第31回日本数理生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村寿子
2. 発表標題 気管支の階層構造を生み出すメカニズムを実験と数理モデルから考える
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村寿子、麓勝己、三浦岳
2. 発表標題 FGFとWntの協同による肺分岐のヒエラルキー構造形成
3. 学会等名 第15回 生物数学の理論とその応用 -次世代の数理科学への展開-への参加（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今村寿子、麓勝己、三浦岳
2. 発表標題 肺の形態形成 II：細胞形状制御による組織変形の数理モデル
3. 学会等名 反応拡散系と実験の融合2（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村寿子、平野才人
2. 発表標題 Computational model exploring the regulation for characteristic patterns in periventricular vessels.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村寿子、平野才人、水谷健一
2. 発表標題 Mathematical model exploring the regulation for characteristic patterns in periventricular vessels.
3. 学会等名 2022年度日本数理生物学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------