

RIMS 共同研究「離散力学系の分子細胞生物学への応用数理」(2009. 1. 5 – 1. 9)

「差異・パターン形成と拡散方程式の現在」三浦岳先生分 レクチャーノート

(担当：東京大学 大学院新領域創成科学研究科 野口 怜)

講演タイトル：似てるものは同じ？

はじめに：

三浦先生の専門は発生生物学で、研究の対象は、「生物のからだはどのようにできていくか」。それを理解する上で、反応拡散系によるパターン形成の概念を用いている。

講演の構成は、

1. 似ていて同じだった。
2. 似ているけれど？
3. 似ていなかった。

(しかし、時間の関係上、実際の講演では「1. 似ていて同じだった」のみ話された)

現在の生物学では、分子生物学的な手法によって、どういう分子が同様現象にかかわっているのか、ということ是非常によく調べられている。実際、発生生物学におけるパターン形成、たとえば肺の枝分かれ形成においても、関連分子がリストアップされている (*Development*, 133: 1611-1624 (2006))。しかし、これでは本質的にどのようにして形ができるのか、ということがわかった気がしない。

そこで、応用数理の分野で近年よくやられている反応拡散系によるパターン形成の概念を用いて何かできないか、と考えた。反応拡散系によるパターン形成は、非常に単純な原理から、様々な「形」を表現することができるという理論は多く蓄積されていたが、その一方で、その応用としての、実際に生物の中ではどのように効いているのかということや、「形」からそれがどのようにしてできたのかということを理解することに関してはあまりよく調べられていなかった。そこで、その観点から、もし最終的に得られる「形」が似ている場合に、メカニズムにも何か接点があるはずである、ということを考え、実際にうまくそれが適用できた、「頭蓋骨の縫合線」についての研究を紹介する。

頭蓋骨の縫合線は、生まれたばかりの頃には真っ直ぐで太い形状をしているが、成長していくにしたがって、細くなり、また湾曲していく (Fig. 1)。その実体は、骨と骨との間に存在している未分化な間葉組織がだんだんと骨を作りながらじわじわと広がっていくというものである。脳自体が成長するために、その周りを覆う頭蓋骨も成長する必要があるが、縫合線はこの頭蓋骨の成長のために存在している。実際、何らかの原因で幼いころに縫合線が癒合してしまって頭蓋骨の成長が妨げられて、頭蓋骨が大きく変形してしまうという頭蓋骨早期癒合症という病気も存在している (*Child's Nerv. Syst.*, 16: 645-658 (2000))。この病気では、FGF レセプターが、リガンドのない状態でも活性化してしまっていることがわかっている。



Fig.1 新生児(左) と成人(右)の頭蓋骨縫合線

また、成人の湾曲した縫合線が 1 次元のフラクタル構造になっているとは古くから言われている (Fig. 2, *J. Morphol.*, 185:285-295 (1985)) が、メカニズムに関しては触れられていない。

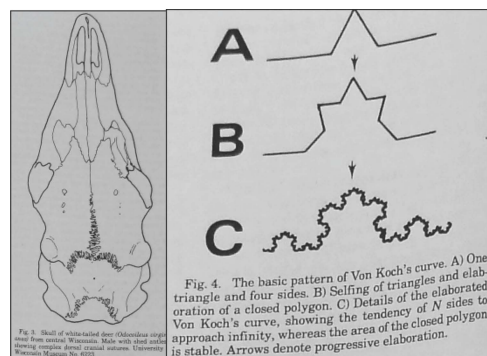


Fig.2 オジロジカにおける縫合線(左) とフラクタル構造(右)

縫合線の湾曲が、頭蓋骨の結合強度を増しているということも言われていたが、実際にヤギの頭蓋骨を用いて引張試験を行った人がいて、結果として湾曲しているほうが弾力性がある強度は弱かったものの、衝撃の吸収などには向いているのだらうと述べている (*J. Biomechanics*, 23(4): 313-321 (1990))。

以上が縫合線についての概説であるが、ともかく自分自身は「形ができるメカニズム」に興味がある。それについて述べられている研究として、縫合線がフラクタル構造をしているということから、「Eden 衝突モデル」というものを提唱してこの構造を生み出すメカニズムについて説明している方がいる (Prof. S. Miyajima, *FORMA*, 19: 197-205 (2004))。しかし、実際の縫合線は、生後まもない頃は基本的には真っ直ぐであり、成長に従って湾曲していくものであるため、このモデルでは説明ができない可能性が高い。では、どのように定式化すればこれが説明できるのだろうか。

とりあえず、ここまでの問題をまとめると、以下の 3 点に集約される。

- i) 未分化な間葉組織が一定幅で維持されているのはなぜか？
- ii) 縫合線組織が湾曲するのはなぜか？
- iii) なぜフラクタル構造になるか？

これらの問題にアプローチするにあたって、まずは関わっている分子について調べることから始めた。その結果、分子や相互作用について、それなりに多くの知見が見つかった (*Dev. Dyn.*, 233: 847-852 (2005))。また、その一方で、真っ直ぐな線が湾曲していく様子は反応拡散方程式によって記述することができるということも知った (*PRL*, 72(15): 2494- (1994))。では、判明している関連分子と、反応拡散方程式とを、どのように結びつけたらよいだろうか。モデル化する上で、モノが多すぎるため、まずは「どう単純化するか」ということを考えた。そこで、機能と場所とで関連分子を分類した上 (Table 1) で、骨と骨ではないところをそれぞれ安定させるような因子 (Table 1, 赤字) と、それとはまた別の変数として基質分子 (Table 1, 青字) という2つの変数を考えてモデル化をした (Fig.3)。

Table 1 関連分子の、機能と場所による分類

局在 \ 骨分化への役割	促進効果	阻害効果
骨	Runx2, Osterix	-
間葉組織	FGF2, FGF18, BMP4	Noggin, Twist

赤色の分子：安定化因子

青色の分子：基質分子

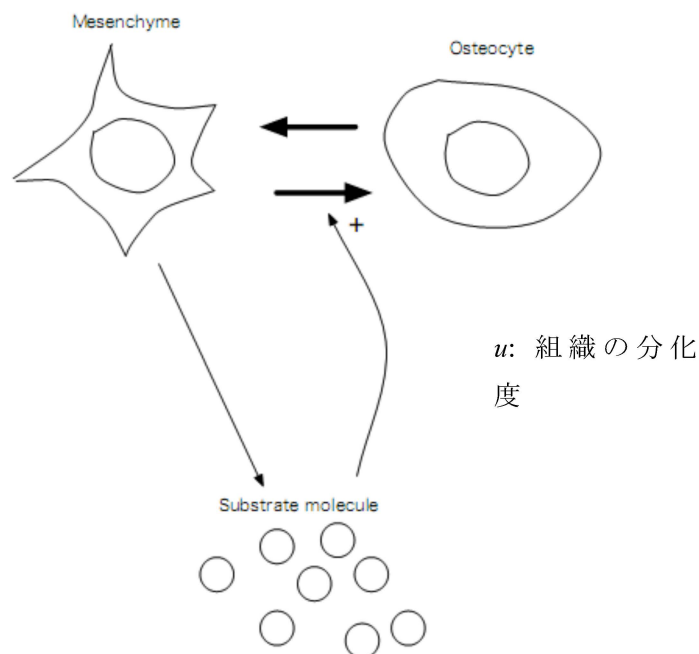


Fig.3 縫合線湾曲のモデル化

このモデルでは、安定化因子の作用によって、組織には 2 つの安定な状態があるとし、一つは骨（骨細胞 (osteocyte), $u > 0$), もう一つは未分化な間葉組織 (mesenchyme, $u < 0$) である。未分化な間葉組織は基質因子を分泌し、基質因子は骨分化を促進するというモデル構造になっている。これを Fig. 4 のように定式化した。

$$\begin{aligned}
 u' &= \boxed{u} - \boxed{u^3} + \boxed{a_1 v} + \boxed{a_0} + \boxed{\Delta u} \\
 v' &= -\boxed{a_2 u} - \boxed{a_3 v} + \boxed{d \Delta v}
 \end{aligned}$$

安定化因子の作用
飽和
基質因子の作用
ベースの基質因子作用
安定化因子の拡散

基質因子の産生
減衰
基質因子の拡散

Fig. 4 縫合線湾曲モデルの定式化

これにより、組織が一定幅に保たれるメカニズムがわかったうえ、真っ直ぐな縫合線が湾曲する様子も再現することができた (Fig. 5)。では、なぜパターン形成が起こるのだろうか。それには、組織が一定幅に保たれることに加え、突出部が早く伸びる傾向にあることによる界面の不安定化が関係していることが分かった。つまり、少しでも突出しているところでは、凹んでいるところに比べて周囲に未分化な間葉が多いために、基質因子の濃度が高い状態にあり、それによって分化が進んでさらに突出する、ということが起こる。

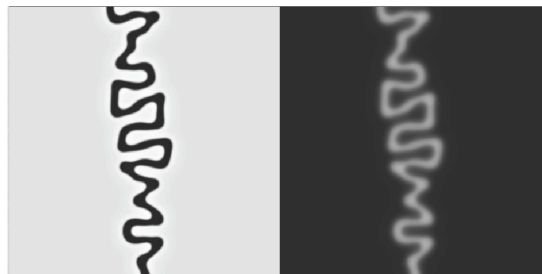


Fig. 5 シミュレーションによる分化度 (左) と基質濃度 (右) の湾曲の様子

次に、ベースとなる基質因子の量 (= パラメータ a_0) が外からの流入などによって上がっ

た場合にはどのようなことが起こるのか調べたところ、 a_0 の値が大きすぎるときには湾曲が起こらず、さらに大きくすると全部骨になってしまうということが予測された (Fig. 6)。これは、湾曲が基質因子の量の差によって起こるものであるため、飽和するような領域にまで a_0 を増やしてしまうと湾曲できなくなり、またそれ以上に増やすと、未分化な組織へと安定させるマイナスの項が維持できなくなり、全部骨になってしまうものと考えられる。

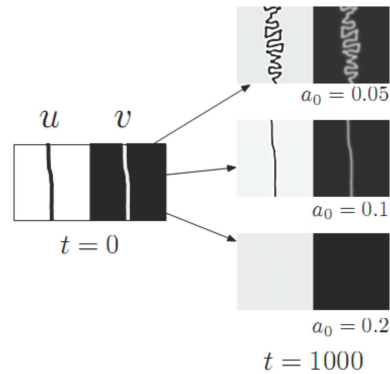


Fig. 6 パラメータ a_0 の値を増加させた場合のパターン形成の変化の様子

これをできるだけ簡単に検証できないかと考え、真っ直ぐなところと曲がっているところで何が違うのかということ考えた。そこで、縫合線は表から見ると湾曲しているが裏から見ると細く真っ直ぐな線になっていることに着目した(Fig. 7)。

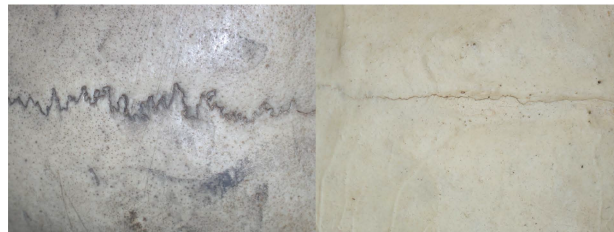


Fig. 7 頭蓋骨の表側 (左) と裏側 (右) から見たときの縫合線

これと、Fig. 6 で得られた結果を突き合わせ、基質因子の供給が頭蓋骨の内側からあることによって、表側と裏側とでこのような湾曲の有無が生じているのではないかと考えた。そこで、免疫染色によって表側と裏側の基質因子の量を調べた。その結果、確かに、裏側のほうが基質因子の量が非常に多いことが分かった (Fig. 8)。

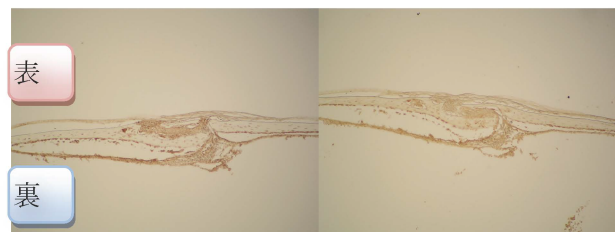


Fig. 8 免疫染色による表側と裏側の基質因子 (FGF2 (左), FGF18 (右)) の量の比較

次に、年齢とともに縫合線の組織が細くなる (Fig. 1) ことに着目し、これが、間葉組織の線維化が進むことによって拡散係数が変化していることに起因しているのではないかと考えた。そこで、Fig. 4 の方程式に、時間依存パラメータを組み込んだ (Fig. 9)。

$$\begin{aligned} u' &= u - u^3 + a_1 v + a_0 + h(t) \Delta u \\ v' &= a_2 u - a_3 v + h(t) d \Delta v \end{aligned}$$

$h(t)$: Exponential decreasing function with t

Fig. 9 時間依存パラメータを組み込んだ拡散方程式

すると、線は時間の経過に従って、細くなり、そして湾曲しながらフラクタル構造を形成していく様子が観察された (Fig. 10)。

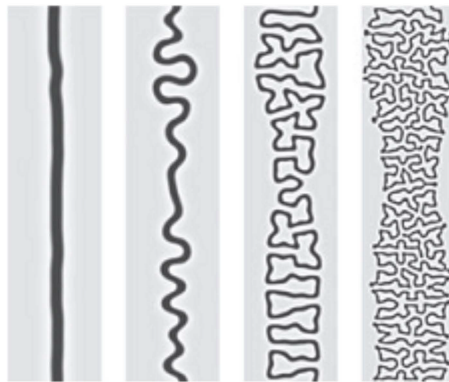


Fig. 10 時間依存パラメータを組み込んだときのパターン形成の様子
(左から右に従って時間が経過)

このことの直感的な説明としては、本来ならば一定の幅を保って湾曲していくはずが、時間依存的に拡散係数が減少することによって、できる構造がだんだんと小さくなり、大きい構造に小さな構造が付け加わっていくような形になるということが挙げられる。このようなメカニズムは、フラクタル図形の種類である Koch 曲線 (Fig. 12) ともよく似ており、頭蓋骨の縫合線とフラクタル図形とのつながりがより明確となった。

しかし、新生児の太く真っ直ぐな縫合線が、なぜ成長すると細くなって湾曲してゆくのか

かということの、実験的な裏付けはまだまったくできていない（いろいろ試してはいるが、そもそも今実験で用いているマウスでは、湾曲のオンセットくらいしか見えず、フラクタル構造まではいつてくれない。なので、もうちょっと大きな動物でいずれは試してみようと思っている。）。

このように、まったく別の系で使っている式を、単に「形が似ている」からというだけで適用して、対応をつけることができた。対応がつけば、そこからいろいろなことが分かる。今回は理論のほうで蓄積された知識を、生物のほうで使うことで新たな理解へとつながった。逆に生物側から理論側へパスを返すというのはまだまだできていないが、理論の人からどんどんと突っ込みを入れていただいて、こんなことができるんじゃないか、など、意見や提案がいただければと思う。

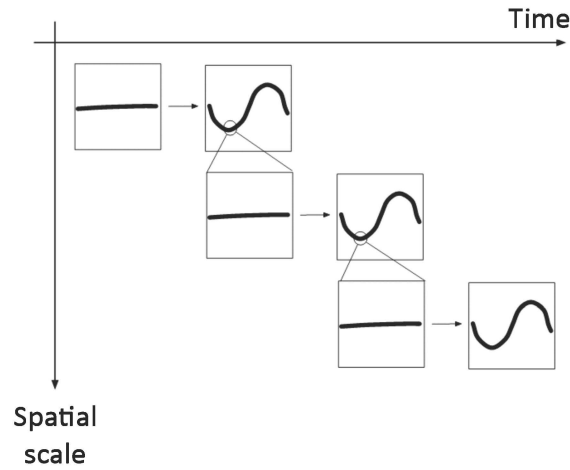


Fig. 11 時間依存パラメータを組み込んだときのパターン形成の直感的な説明

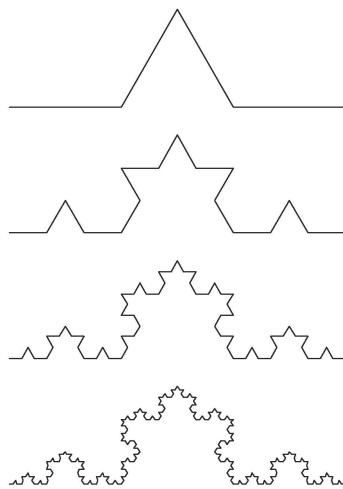


Fig. 12 Koch 曲線

【質疑応答】

Q: 時間依存パラメータを組み込んだモデルは、実際の縫合線の形状にあまり似ていないのでは？（骨と間葉組織という状態と、inhibitor と activator という 3 つの変数があるのに、それを 2 変数に落としているからでは？）

A: 後頭部にあるラムダ縫合というところは、非常に湾曲しているうえに、一本線になっており、Fig. 10 (一番右) の様子と非常に似ている (Fig. 13)。時間依存のパラメータを入れないとこのような形状は作れず、一本線ではなくてたくさんの分岐があるような形状になってしまう。



Fig. 13 ラムダ縫合の湾曲

Q: 時間変化する拡散係数はどのように決めた？

A: とにかく時間依存で減少する必要があるので、とりあえず exponential に減少していくものを入れてみた。どういう関数を入れるか、などに関しては全く検討していないので、なんとかしたいとは思っている。拡散係数をいじるのではなく、反応項のスピードが速くなっていく、ということでも再現できると考えられるが、我々の感覚としては、こういった生物の成長に関するものは、若い時のほうが早く、成長するに従って遅くなる、ということが多いように思うので、今回のこの例とは逆になってしまい、対応が見つからない。

Q: exponential ではなくて、多項式的な減少ではだめか？多項式的な減少よりは速い減少であるということは、実験的に示せるのか？

A: 今のところはモデルで再現できるというところまでで、どういう減り方をしているかということに関してはまったく証拠がない状態。また、関わっている分子はたくさんあり、その中でどれが最もクリティカルに効いているのかもわかっていないため、減少の仕方を測ること自体が現状では難しい。逆に、モデルから、こういう減り方をしていないというフラクタル構造は得られない、などということが言えないか、とは考えている。

Q: 似ているということのを定量的に測れない？

A: 曲がり具合をフーリエ変換して測ればできるかもしれないが、まだやっていない。

Q: 式上での拡散係数と組織の拡散のスピードとの間に何か対応関係はあるか？

A: FGF の吸着されやすいものは、理由は分からないが拡散が遅いことが分かっている。一方で、通常の数十 kDa くらいの分子の溶液中での拡散のオーダーは 1 秒間に $10 \mu\text{m}^2$ 程度ということはわかっており、そのオーダーだとこの組織の拡散スピードは速すぎる。そのため、何か非常に遅い因子がかかっているはずで、それが FGF ではないかということは示唆できるが、まだ定性的な議論にとどまっている。ただ、そもそも拡散係数というのは組織の種類によって全然違うので、小さい細胞膜上で測っている人はいくらかいるが、細胞が密になっているところなどで測っている人はあまりおらず、ちゃんと測る方法論も確立されていないと思われる。ちゃんとやりたいとは思っているが、現状はなかなか難しい。

Q: 人によって湾曲が違っているといっていたが、個体差はかなりあるのか？

A: 京大の博物館にコレクションがあるので、いちどトレースしてみたが、かなり人によって湾曲の度合いが違っていた。

Q: 表面と脳側とで縫合線の形状が異なる、ということだったが、進化的あるいは機能的にはなぜこのような形になったと考えられる？

A: パターンの形成に主に興味が集まっているので、機能的な面に関してはあまり深く考えたことがない。まっすぐか、曲がっているかで、機能的な側面で異なりそうなのは結合強度ぐらい。

Q: 縫合線の形状の違いによる結合強度を調べる実験ができるか？

A: ヤギで実験した人はいて、湾曲しているほうが結合強度は下がるものの弾力性は増すということは報告されている。自分の場合は、やろうと思えばできるかもしれないが、どちらかというやはり、どのようにして形が作られるかということのほうに興味が集まっているので、進化的、機能的な側面に関することは優先順位が低い。

Q: 縫合線の形状に遺伝性はあるのか？

A: 早期癒合症に関しては原因遺伝子がわりとわかっているため、家族性がある可能性はある。しかし、縫合線の形状そのものに関しては、現状では臨床でそのデータを抽出する必要性がなく、データ自体が存在しないため、調べることができない。

Q: 湾曲の仕方に個体差がかなりあるということだったが、モデル上でそれは表現できるのか？たとえば、初期値の違いなど。

A: 初期値の違いで形状は確かに変わるが、それは実際の個体差での曲がりきついかどうかというのとはちょっと異なる。それよりは、パラメータのどれかが上がる、下がるによって曲がりきつくなったりするので、それによって個体差は表現できるのではないかと思う。

Q: 変数 u は分化度ということだったが、「 u の拡散」とはどう考えたらよい？

A: 安定化因子のなかに拡散性の因子があるので、きっちりと分かれているわけではなくて、空間的に分化しているものがあつたらそこに影響を与える、という意味。

Q: 力学的負荷による影響は？

A: 骨の培養系で、力学的負荷をかけると FGF の発現量が変わるという話があり、そういう pathway を通して湾曲の度合いが変わることはあるかもしれない。また逆に、培養系で力学的負荷がまったくかかっていない状況下でも曲がるということは確認されている。確かに、力学的負荷がかかったときにどうなるか、ということに興味がある人のほうが多いとは思いますが、現状はまだそこまでいっていない。

Q: 移植した実験はできるか？

A: そういう実験はある。前頭部の縫合線は癒合が早くて比較的真っ直ぐな形状をしているが、後頭部は非常に遅くて湾曲が激しい。そこで、ウサギの頭蓋骨で、その前頭部、後頭部の縫合線を両方含むように頭蓋骨を切り取り（硬膜はそのまま）、前後逆にして自己移植する、ということをした人がいる。その結果、本来移植前には真っ直ぐになるはずだった縫合線は湾曲し、湾曲するはずだった縫合線は真っ直ぐになった。このことから、これらの縫合線の形状は硬膜から出る factor によって決まっているだろうと考えられる。