

résumé

## 肺の枝分れの形成機構

三浦 岳

京都大学大学院医学研究科

生体構造医学講座 形態形成機構学教室

Department of Anatomy and Developmental Biology,

Kyoto University Graduate School of Medicine.

E-mail: miura-takashi@umin.net.

### 1 概要

哺乳類の肺は上皮構造の枝分かれ形成によって樹状構造が形作られる。このような枝分かれ形成に関わる遺伝子群は多数同定されているが、それによってどのように枝分かれ構造が形成されているのか、生体内でのメカニズムは未だに明らかになっていない。我々は、肺の枝分かれ形成を再現する最も単純な実験系を取りあげ、この系の中でパターン形成が生じる形のモデルを定式化した。次に、このモデルの結果を外挿できる系として、鳥類肺に注目した。鳥類肺は背側では枝分かれ構造、腹側では囊胞構造を作るため、この形態変化がどのような性質の変化によって起こるのかをモデルから予測し、腹側の領域では FGF の拡散係数が大きいために囊胞構造になることを示した。

### 2 はじめに-肺のでき方

脊椎動物の肺は、樹状構造を持っている。この樹状構造は、母体内の胎児期に形成される。具体的には、はじめに消化管の袋から上皮（体の表面や内腔を覆うシート状の組織）の袋構造が腹側（おなか側）に飛び出してくるところからでき始める。この上皮の袋は、周囲を間葉と呼ばれる組織に覆われており、この袋状の組織の先端が枝分れしながら伸びていくことによって樹状構造が形作られる。

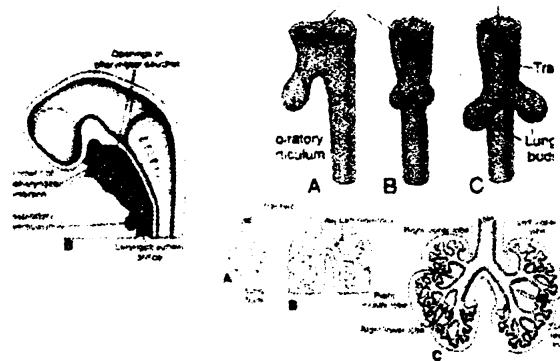


図 1: 肺の枝分かれ構造の形成過程。Sadler (2004) より。

### 3 *in vitro* での肺上皮の枝分かれ形成 - モデル化と実験的検証

肺の枝分かれ形成は、発生生物学の分野では古くから研究されてきた。その理由として、器官培養系が古くから確立していたことが挙げられる。ネズミの胎児から肺の組織のみを切り出して培養すると、培養皿の中でも枝分かれ構造が形成される。体の中に出してしまえば実験的操作は容易である。様々な増殖因子を外から加えて枝分かれ構造の形成への影響を見ることで、多くの知見が蓄積していた。また、近年遺伝子改変動物が多く作られるようになったが、その結果出てくる表現型の中では肺の異常は比較的外から発見しやすい。このため、現段階でも肺の枝分かれに関与する遺伝子は多くリストアップされている。(Cardoso & Lue 2006)。しかし、それによってそもそもなぜ枝分かれ構造が形作られるのか、そのメカニズムはわかっていなかった。私が肺の研究を始めた1999年の時点で既にかなり多くのことがわかっていて、分子生物学的な方法論でこのような分子のリストを長大にしてもメカニズムの理解に到達するとはとても思われず、何か他の方法論が必要であると感じた。

一方で、物理や化学の系では枝分かれ構造を作る系は多数存在し、そのメカニズムもよくわかっている。たとえば結晶成長においては、尖って居る部分の方が熱を放出しやすいため成長が起こりやすい、という性質で界面の不安定性が生じるし、粘性突起 (viscous fingering) においては尖った領域の方がへこんでいる領域よりも粘性の高い流体に入り込んでいきやすい、という形でパターン形成が起こる。しかし、これらの現象はいずれも1-2個の因子の相互作用からパターン形成が起こっており、生物系のような多数の因子が関わっている現象と対応をつけるのは一見難しい。

生体内では、上皮組織と周辺の間葉組織が複雑な相互作用をしながら枝分かれ構造を作る。いきなり生体内の構造のでき方を考えると問題が複雑すぎる。したがって我々はまず、枝分かれ構造を形成する、という性質を残している最も単純な実験系を選ぶところから始めた。千葉大学の野川らが1995年に発表した上皮の単離培養系というものがある (Nogawa & Ito 1995)。これは、

1. 肺の上皮のみを酵素処理で間葉から単離する
2. 単離した上皮組織をマトリゲルと呼ばれるゲルの中に埋め込む
3. 培地に FGF (線維芽細胞増殖因子) という蛋白を加えて培養する

という操作によって、周辺の間葉組織がなくても枝分かれ構造が形成できる、というものである。FGF は、*in vivo* でも局所的に投与するとそちらに向かって肺の上皮が伸びていく。このことから、この培養系で起こっている形態変化はある程度 *in vivo* の現象を反映していると思われる。

### 4 *in vitro* 系のモデル化

この培養系の状況を定式化する際、参考になったのが松下や三村が行っていたバクテリアコロニーのパターン形成のモデルである (Matsushita et al. 1998)。培養系の肺の枝分かれとバクテリアコロニーのパターン形成の二つの現象を見比べていると、バクテリア密度が細胞密度に、栄養分の濃度が FGF 濃度に相当することが浮かび上がってきた。これらの情報を用いて、肺の細胞が FGF を消費して成長する、という形のモデルを定式化した。このモデルでは、

- 細胞は FGF を消費して増殖する。
- FGF は培養系の中を自由に拡散する。
- 細胞は細胞密度が一定になるまでは拡散様の動きをするが、細胞密度が一定以下になるような動きはしないような形に定義する ( $J(c)$ )。

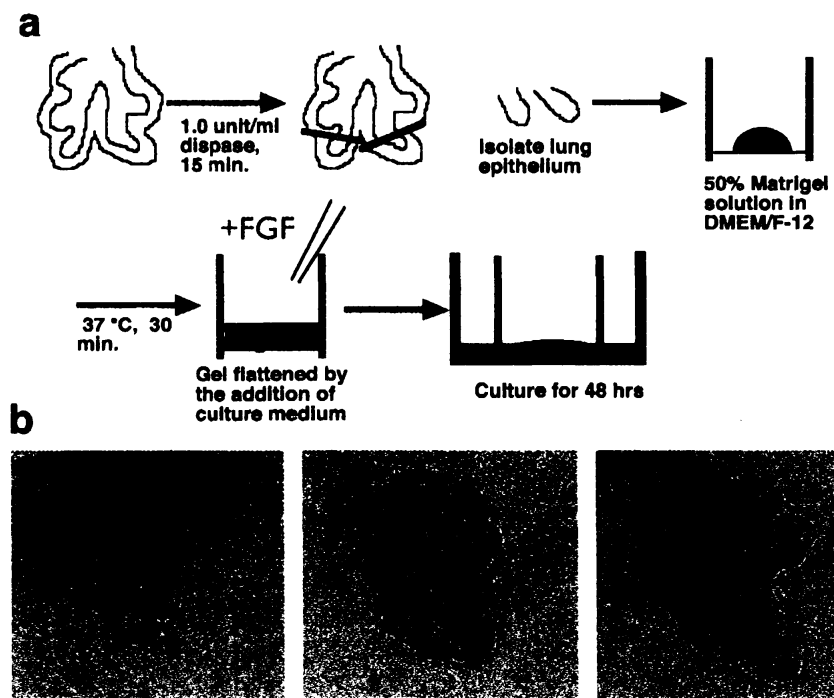


図 2: (a) 野川らの開発した培養手法 (一部改変). (b) この培養系で生じる肺上皮の形態変化. Nogawa & Ito (1995) より.

という形になっている。このような系では、最初に少し出っ張っているところは、他の FGF を消費する組織よりも離れているので、高濃度の FGF に接しやすい。結果として、少し出っ張ったところがさらに伸びる、という形で界面の形状が不安定になって枝分れが形成される。

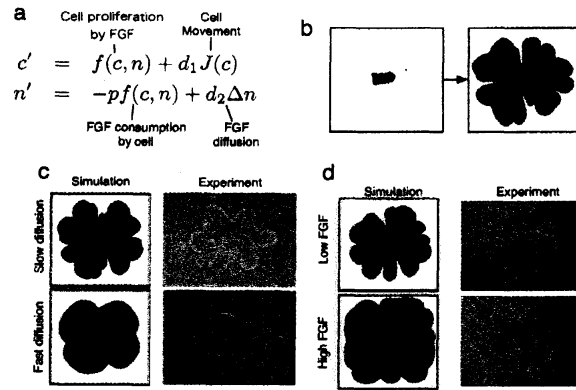


図 3: (a) 支配方程式. (b) 数値計算の結果. (c) FGF の拡散係数の上昇および飽和量の FGF の添加による囊胞構造の形成. Miura (2007) より.

このモデルで、枝分れではなく囊胞を作るやり方は2つ考えられる。一つは、外から加える FGF の量を非常に多くして、FGF に対する上皮の反応を飽和させてしまうやり方である。もう一つは、外部の Matrigel を酵素処理して緩くしてしまい、FGF の拡散を早くするやり方である。我々は、*in vitro* の実験系では、この2通りのやり方のどちらでも囊胞構造を誘導できることを示した。

## 5 *in vivo* に外挿できるか? - 鳥類肺の構造

以上の仕事で、培養系で枝分れが生じるメカニズムはわかったが、では、実際の生体内ではどうか、となるとまた話は別である。生物学者として、培養皿の中だけの現象だけでなく、生体内で起こっている現象をきちんと理解したい。しかし、生体内の事もいきなり理解しようとするのは難しいので、先ほどの *in vitro* の結果をうまく外挿できる系として、鳥類の肺に着目した。鳥類の肺は不思議な形をしていて、背中側は我々と同様の枝分かれ構造を作るが、おなか側では気嚢 (air sac) と呼ばれる囊胞状の構造を作る。

以前の研究で、鳥類肺の枝分かれと囊胞の差は、周囲の間葉の差であることがわかっていて、それなら、以前のモデルの結果を踏まえて、腹側の間葉で生産している FGF 量が大変多いか、もしくは腹側の間葉の中での FGF の拡散が早い事が考えられる。

これらのことが生体内で起こっているのかどうかを調べるため、まず、背側と腹側で FGF の産生量がどちらが多いかを調べた。すると、枝分れを起こしている背側の方が実は FGF の産生量が多いことがわかり、FGF シグナルの飽和によって囊胞構造を形成している訳ではないことがわかった。そこで、次に蛍光蛋白を用いて、腹側と背側の組織での FGF の拡散を調べた。すると、腹側の組織内の方が FGF の拡散が早いことがわかった。このことから、鳥類肺の腹側で枝分れではなく囊胞状の構造ができるのは、FGF の拡散が早いことによることがわかった。

この拡散の早い理由としては、

- 組織自体の細胞密度が違う事 (図 4 参照.)

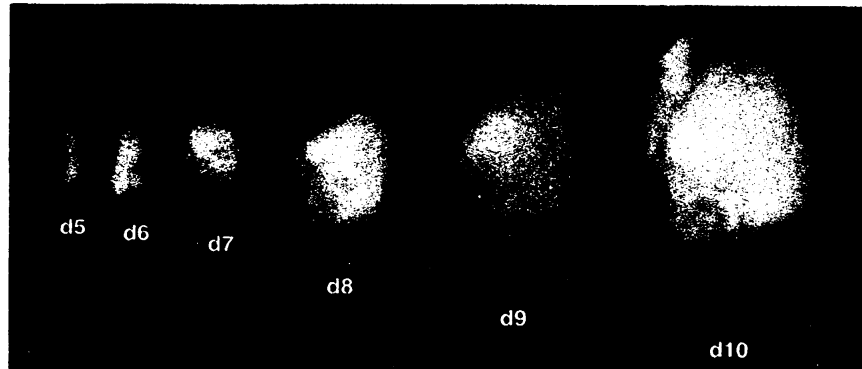


図 4: ニワトリ肺の形成過程. 培養 9 日目, 腹側 (左側) では嚢胞構造ができるが, 背側 (右側) では枝分かれ構造ができる. Miura et al. (2009) より.

- 組織内の細胞外基質の中で, FGF をトラップする成分の量が違う事

の 2 つが両方とも働くことによって実現されていることがわかった. これらの差を生み出しているさらに上流の機構についてはさらに検索が必要だが, すくなくとも嚢胞と枝分れを区別する直接のメカニズムに関しては, モデルと実験をうまく組み合わせて説明ができたと考えている.

## 6 おわりに

肺の枝分かれに関しては, 他のタイプのモデルもある. たとえば, 北岡, 高木らは, L-system をベースにしたモデルをつくり, ガス交換機能を最適化するような形状を考察している (Kitaoka et al. 1999). 肺機能を考察するには, 我々の用いているような反応拡散ベースのモデルよりも, 流路のコネクションが明示的に入っているような L-system の方があとの機能解析が容易であるため, 彼らの目的のためにはこのような定式化が適切であると思われる. このような L-system を用いた定式化は, 樹状構造の形成ではよく用いられるが (Honda 1971), 前述のような偏微分方程式系の枝分かれ構造形成との対応はあまりきちんとなされていないように思われる. L-system で用いている分岐ルールが, 支配方程式のどのパラメータとどのように対応するのか, 理論面での進展が必要であると思われる.

また, Lubkin & Murray (1995) らは, 肺の枝分かれ形成の実態は viscous fingering である, という全く別の観点からモデルを書いている. これは, 粘性の低い流体を粘性の高い流体の中に押し込んでいくと, 先端が尖っている方が圧力が高くなって入っていきやすいことから, 最初少し尖っているところがさらに入っていきやすい, というメカニズムで, 我々の用いている FGF 濃度の代わりに圧力が不安定性の源になっている, という主張をしている. 我々は最初, 分子生物学的知見を用いることのできないこのようなモデルはそれほど妥当性があるとは思っていなかったが, 最近になって, 培養肺上皮も外の細胞外基質を力学的に変形させて形態形成を起こしている事がわかってきた. このような力学的なモデルの妥当性についても今後実験技術の開発とともに検証が進んでいくと思われる.

*in vivo* のパターン形成に関しては未だに不明なままである. 生体内では, 組織形状や FGF の産生される領域がダイナミックに変化するため, *in vitro* よりも遥かに複雑なことが起こっていると思われる. 最近, 九州大学の平島, 森下らが, 肺上皮の遠位部で産生される Shh と近位部で産生される TGF $\beta$  が協調して FGF の産生領域を決定する, という形のモデルを書いている (Hirashima et al. 2009). かれらは組織の曲率によ

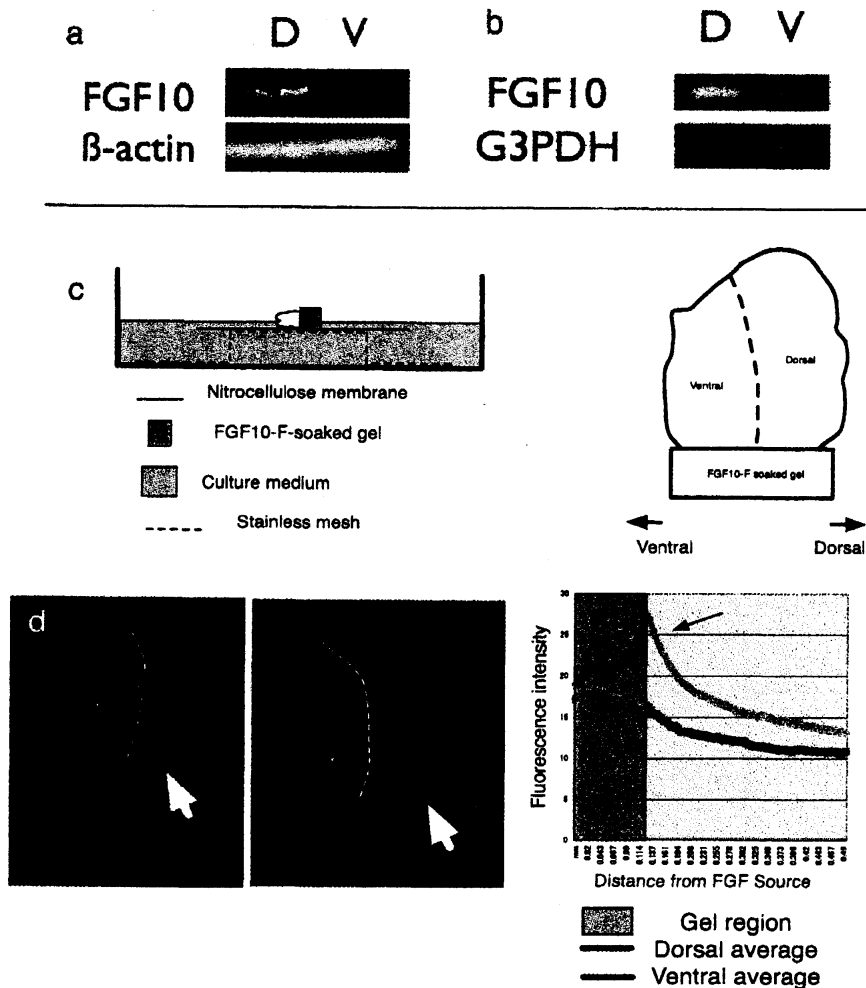


図 5: ニワトリ肺における FGF mRNA の発現. (b) ニワトリ肺における FGF 蛋白の発現. どちらも, 枝分かれを作る背側 (D) の方が嚢胞を作る腹側 (V) よりも FGF の量が多い. (c) FGF の拡散を見るための実験. ニワトリ胎児の肺を半切し, そこに蛍光ラベルした FGF をしみ込ませたゲル片を並べておいて, 浸透の早さを見る. (d) 実験結果. ゲルをおいてから 30 分後, 背側の組織の近傍では FGF が「溜まる」領域が出現するが (矢印), 腹側の組織では単純に洗い流されてなくなってしまう. (e) FGF 濃度のプロフィールプロット. Miura et al. (2009) より.

る FGF 産生領域の分布の違いについても解析を行っている。実際の組織では枝分かれ構造の精製に伴って組織が変形していくので、このような組織の形状を固定した考察が妥当かどうかは実験的な検証が待たれる。また、細胞外の分泌性のシグナル因子を可視化するのは技術的に非常に難しい。通常の免疫染色では、固定の段階で見たい因子が流れ出して失われている事が多く、見えている像が本当に生体内の分子の分布を反映しているのかどうかはあまり確証を持ってない。これらの技術的な問題を一つ一つ解決していく事で、実際に *in vivo* で何が起きているのかが少しずつ明らかになっていくことを期待している。

## 参考文献

- Cardoso, W. V. & Lue, J. (2006), 'Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies.', *Development* **133**(9), 1611–1624.
- Hirashima, T., Yoh, I. & Yoshihiro, M. (2009), Mechanisms for split localization of fgf10 in lung bud branching, in 'Annual Meeting of Japanese Society for Developmental Biologists (Niigata)'.
- Honda, H. (1971), 'Description of the form of trees by the parameters of the tree-like body: effects of the branching angle and the branch length on the sample of the tree-like body.', *J Theor Biol* **31**(2), 331–338.
- Kitaoka, H., Takaki, R. & Suki, B. (1999), 'A three-dimensional model of the human airway tree.', *J Appl Physiol* **87**(6), 2207–2217.
- Lubkin, S. R. & Murray, J. D. (1995), 'A mechanism for early branching in lung morphogenesis.', *J Math Biol* **34**(1), 77–94.
- Matsushita, M., Wakita, J., Itoh, H., Rafols, I., Matsuyama, T., Sakaguchi, H. & Mimura, M. (1998), 'Interface growth and pattern formation in bacterial colonies', *Physica A* **249**, 517–524.
- Miura, T. (2007), 'Modelling lung branching morphogenesis', *Curr Top Dev Biol* p. In press.
- Miura, T., Hartmann, D., Kinboshi, M., Komada, M., Ishibashi, M. & Shiota, K. (2009), 'The cyst-branch difference in developing chick lung results from a different morphogen diffusion coefficient.', *Mech Dev* **126**(3–4), 160–172.
- Nogawa, H. & Ito, T. (1995), 'Branching morphogenesis of embryonic mouse lung epithelium in mesenchyme-free culture', *Development* **121**(4), 1015–22.
- Sadler, T. W. (2004), *Langman's Medical Embryology*, 9th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Maryland.