

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2022

課題番号：16K05523

研究課題名(和文)細胞集団の数理的研究

研究課題名(英文)Mathematical studies on cell aggregates

研究代表者

野瀬 真規子(野々村真規子)(NOSE (NONOMURA), Makiko)

日本大学・生産工学部・教授

研究者番号：20333320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の内部状態や分子の局在を考慮した細胞形状の数理モデルの構築を目指した研究として、卵細胞と嚢胞に関して分子の局在を使った分裂面の計算を取り入れて数値計算を行った。また、細胞集団運動の数理モデルの開発への道筋をつけるために、集団細胞の実験画像を粒子画像流速測定法(PIV)や機械学習を使って解析し、細胞集団の運動特性の定量化をおこなった。さらに新たな細胞輪郭の抽出法も考案した。今後は、本研究で得られた知見を基に、細胞の形態形成や機能発現に関する理解をさらに深めるための数理的研究に繋げていきたいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞集団を表すフェーズフィールドモデルに細胞分裂や分子の局在を汲み込み、さらにそれを用いて卵割や嚢胞などの数値計算を行った。また、PIVや粒子法、機械学習などのさまざまな手法を用いて、細胞集団運動の特性を数値化し、今後の細胞集団運動の数理モデル開発への道筋をつけた。本研究成果は、個々の細胞が形態形成や機能発現に与える影響の解明に向けた数理的研究への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to construct a mathematical model of cell shape that takes into account the internal state of the cell and molecular localization, numerical calculations were performed for oocytes and cysts, incorporating the calculation of division planes that take into account molecular localization. To develop a mathematical model of cell population dynamics, we analyzed experimental images of cell populations using particle image velocimetry (PIV) and machine learning to quantify the characteristics of cell population dynamics. We also devised a new method for extracting cell contours. In the future, we intend to use the findings of this study to conduct mathematical research to further our understanding of cell morphogenesis and functional expression.

研究分野：数理生物学

キーワード：フェーズフィールド法 細胞集団 形態形成 細胞運動

1. 研究開始当初の背景

計測・分析技術の進歩により、細胞研究は驚異的な進展を遂げており、細胞内の一分子測定から細胞位置の統計量など、様々な実験データが急速に蓄積されている。中でも、細胞の集団運動は、表皮の再生や形態形成、ガンの浸潤などにも密接に関わっている重要な現象であり、学問的な興味に加えて医学や工学への応用を見据えて積極的に研究が行われている。

一方で、数理的研究では、さまざまな数理モデルが提案され、それらを用いた数値計算によって現象の理解が進められている。例えば、Vertex Dynamics モデルや Cell Center モデルによって、細胞の再配置や形態形成を説明されている。また、Cellular Potts モデルはセルソーティングや化学走化性などの現象を解明するために利用されている。これらの数理モデルは、実験結果を補完し、現象のメカニズムをより深く理解するために重要なツールとなっている。

しかしながら、数理的なモデルによって説明できる範囲は実験から得られる知見の一部に過ぎない。細胞は非常に複雑なシステムであり、単純な物理現象の組み合わせだけではその振る舞いを完全に理解することができないためである。細胞の数理的研究のさらなる発展のためには、微細な構造や細胞内部の化学物質の分布など、細胞の内部情報も考慮に入れた、より包括的な数理モデルが必要になると考えられる。

2. 研究の目的

この研究では、細胞の内部状態や分子の局在を考慮した数理モデルの構築を目指した。具体的には、以下の二つの課題に取り組んだ。

第一の課題として、分子の局在が系全体の形に影響を与える卵細胞と囊胞の数値計算を行った。特に卵割は1つの卵細胞から細胞分裂を繰り返して生命としての機能を確立していく非常に重要な発生の初期過程である。卵割の分裂方向がどのように決定されるのかを数理的に説明することには高い意義がある。分子の局在や卵細胞の形状が卵割様式に与える影響を調べることで、様々な卵割様式の形成メカニズムを明らかにすることを目指した。

また、第二の課題として、細胞の集団運動の画像解析を行った。細胞は周囲の細胞や基板、溶媒といった環境によってその動きや形状を変化させることが知られている。本研究では、細胞の形状の変化や内部構造の動きが観測しやすい基板上の細胞の集団運動に着目した。染色が細胞運動に与える影響を排除するために、細胞を染色せずに観察できる位相差顕微鏡による実験画像を用いることにした。まず位相差顕微鏡画像の解析でよく用いられている粒子画像流速測定法(PIV)によって、細胞の運動が環境によってどのように変化するかを解析した。また、細胞の境界が不明瞭である位相差顕微鏡画像では難しいとされている、細胞輪郭の抽出もいくつかの方法で試みた。輪郭抽出の精度をあげることはもちろん、得られた細胞の輪郭から細胞の重心位置、面積、周長、速度などが環境によってどのように変化するかを解析し、細胞の集団的な振る舞いの理解を深め、細胞集団運動の数理モデルの開発に向けた道筋をつけることを目的とした。

3. 研究の方法

数値計算に関しては、本研究課題の申請前に提案した多細胞の形状を表現できるフェーズフィールドモデル[1]を基に研究を進めた。このモデルは、細胞の基本的な振る舞いである細胞接着、基板付着、細胞分裂、細胞死、細胞成長、細胞分化などに加えて、細胞膜や細胞核などを容易に表現できるという特徴がある。形態形成で重要となる細胞分裂方向は紡錘体によって決定されることが知られている。細胞膜に存在しているある特定の分子が、マイクロチューブを通して中心体に力を加え、紡錘体の向きが決まることを簡単な数理モデルで表し、上述のフェーズフィールドモデルに組み込むことで卵割と囊胞の数値計算を行った[2]。

また、基板上の細胞の集団運動の位相差顕微鏡写真の画像解析に関しては、まずPIVで求めた移動ベクトル場による運動特性の定量化を行った。PIVは流れ場の解析で広く用いられる手法で、Fig.1で示したように、集団細胞の位相差画像の輝度パターンの一部を抜き出し(時相1の赤枠線)、時相2の探查領域(青太枠)内でそれに最も類似している領域(時相2の赤枠線)を探し出すことで、移動ベクトル(黄色矢印)を表記する手法である。この手法を使用して、細胞集団の運動特性が環境や細胞の状態によってどのような影響を受けるのかを示す指標を、文献[3]を参考にして提案した[4]。

さらに、機械学習による細胞の輪

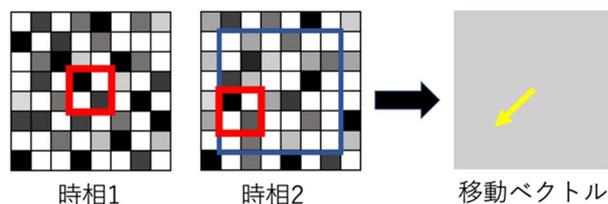
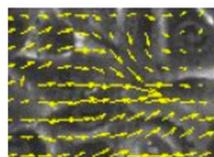


Fig 1. PIVによる細胞集団移動解析。(上) PIV解析の原理の概念図。(左) MDCK細胞の位相差画像上に連続する2つの位相差画像から求めた移動ベクトル場を重ねたもの。



郭抽出も行なった。PIVは非染色細胞の解析方法として主流である一方で、得られた移動ベクトル場が個別の細胞の移動を表しておらず、細胞ごとの運動特性を抜き出すことは難しいという欠点を持つ。そこで、細胞集団中の個別細胞の輪郭を追跡するための方法として、フェーズフィールド法、粒子法、機械学習などを活用し、細胞境界が曖昧な位相差顕微鏡画像において集団細胞の個別細胞の細胞輪郭抽出を試みた。機械学習ではImageJ内のTrainable Weka Segmentation[5]とUsiigaci[6]内のMask R-CNNの2種類の手法を用いた。それぞれの解析結果は手動で細胞輪郭を抽出した結果と比較・検証した。これらの輪郭抽出データを用いて、細胞形状と細胞の集団運動の関係を調べた。

4. 研究成果

主な研究成果は以下の3つである。

(1)細胞分裂モデルによる数値計算について[2]

多細胞の細胞形状を表す数理モデルに、紡錘体による分裂面を決めるアルゴリズムを導入し、細胞の形成や卵割の数値計算を行った。特に卵割に焦点を当て、細胞内の分子の濃度勾配が卵割の軸形成に与える影響を調べた。球形の卵細胞に対して、中心体に力を与えるための膜上の分子が一樣分布している場合は、Fig.2のように卵割が正常に起こらないのに対して、細胞膜上にその分子の濃度勾配がある場合には卵割の軸が形成されることがわかった。この結果は、細胞膜上の分子濃度勾配が卵割の軸形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。また、楕円体に仮定した卵割では球形とは異なる卵割様式を示すことも見出した。

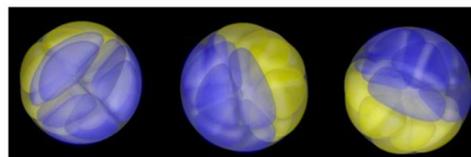


Fig 2. 球体で分子の局在がない場合の卵割の数値計算例。

(2)PIVによる運動特性について[4]

PIVで得られた移動ベクトル場とその相関関数から上皮間葉転換(EMT)を定量化する方法を提案した。具体的には、相関曲線を指数関数でフィッティングすることで、トランスフォーミング増殖因子によるEMTの進行と阻害剤によるその抑制を表す指標を得ることができた。さらに、その指標をリアルタイムにモニタリングすることで、時間依存的なEMT進行過程を示すことができた。

(3)機械学習による細胞の輪郭抽出について

本研究では、細胞の輪郭抽出するためにさまざまな方法を試した。その中の一つであるTrainable Weka Segmentationという機械学習手法では、抽出した輪郭データから、各細胞の中心位置から細胞の速度を算出し、細胞密度と細胞速度の関係を明らかにした。Fig.3はその結果の一部である。この図から播種してからしばらくは細胞数が増えると同時に細胞速度も上昇していき、ある程度の密度になると速度の上昇が止まることがわかる。さらに、個別細胞の形状を楕円で近似して、楕円の長軸と細胞の速度ベクトルの角度差を求めることで、細胞密度が高くなると楕円の長軸に沿うような運動が顕著になる傾向があることを明らかにした。

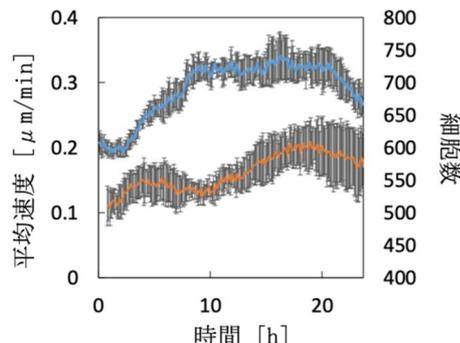


Fig 3. 機械学習による細胞の輪郭抽出結果を用いた解析例。(青線)細胞の平均速度。(オレンジ線)細胞数。

参考文献

- [1] M. Nonomura, "Study on Multicellular Systems Using a Phase Field Model", Plos One 7, e33501 (2012).
- [2] M. Akiyama, M. Nonomura, A. Tero and R. Kobayashi, "Numerical study on spindle positioning using phase field method", Physical Biology 16, 016005 (2019).
- [3] T. E. Angelini, E. Hannezo, X. Trepat, J. J. Fredberg, and D. A. Weitz, Cell Migration Driven by Cooperative Substrate Deformation Patterns, Physical Review Letter 104, 168104 (2010).
- [4] S. Yamamoto, T. Miyama, T. Komoda, M. Sugawara, M. Nonomura and J. Nakanishi, "A Facile Assay of Epithelial-mesenchymal Transition Based on Cooperativity Quantification of Cellular Autonomous Motions", Analytical Sciences 36, 263 (2020).
- [5] I. Arganda-Carreras and others, "Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification", Bioinformatics 33, 2424 (2017).
- [6] H. F. Tsai, J. Gajda, T. F. W. Sloan, A. Rares and A. Q. Shen, "Usiigaci: Instance-aware Cell Tracking in Stain-free Phase Contrast Microscopy Enabled by Machine Learning", Software 9, 230 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 S. Yamamoto, T. Miyama, T. Komoda, M. Sugawara, M. Nonomura, J. Nakanishi	4. 巻 36
2. 論文標題 A facile assay of epithelial-mesenchymal transition based on cooperativity quantification of cellular autonomous motions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 263 ~ 268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.19P233	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 M. Akiyama, M. Nonomura, A. Tero, R. Kobayashi	4. 巻 16
2. 論文標題 Numerical study on spindle positioning using phase field method	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physical Biology	6. 最初と最後の頁 16005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1478-3975/aeee45	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takumi Hanzawa, Tatsuya Miyama, Makiko Nonomura, Jun Nakanishi, Michiko Sugawara
2. 発表標題 Analysis of collective cell migration on geometrically constrained circular region using Particle Image Velocimetry
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arifumi Fushimi, Michiko Sugawara, Makiko Nonomura
2. 発表標題 The Study of Polymerization and Depolymerization of Actin Filaments and Its Effect to Shape of Cell Membrane
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Arifumi Fushimi, Makiko Nonomura, Michiko Sugawara
2. 発表標題 The study of polymerization and depolymerization of actin filament
3. 学会等名 International concerence on APEF 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深山達也, 野々村真規子, 菰田貴文, 菅原路子, 中西淳
2. 発表標題 上皮間葉転換阻害剤のスクリーニングに向けた細胞集団性の定量化法
3. 学会等名 日本分析化学年会第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 深山達也, 野々村真規子, 菰田貴文, 菅原路子, 中西淳
2. 発表標題 光応答基板と数理解析に基づく細胞集団性の評価
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 深山達也, 菰田貴文, 菅原路子, A.Abdellatef Shima, 山口和夫, 野々村真規子, 中西淳
2. 発表標題 光応答基板と画像流速解析を用いた細胞集団移動現象定量化法
3. 学会等名 日本分析化学会第65年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tatsuya Miyama, Makiko Nonomura, Takafumi Komoda, Michiko Sugawara, Jun Nakanishi
2. 発表標題 Quantification of epithelial-mesenchymal transition by using photoactivatable substrates and particle image velocimetry
3. 学会等名 RSC Tokyo International Conference 2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takafumi Komoda, Michiko Sugawara, Tatsuya Miyama, Makiko Nonomura, Jun Nakanishi
2. 発表標題 Improved Particle Image Velocimetry for Collective Cell Migration Studies
3. 学会等名 International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tatsuya Miyama, Makiko Nonomura, Takafumi Komoda, Michiko Sugawara, Jun Nakanishi
2. 発表標題 Quantification of epithelial-mesenchymal transition on photoactivatable substrates by means of particle image velocimetry
3. 学会等名 International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology
4. 発表年 2016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
---------	---------