

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0070

研究課題名(和文) 脊索中胚葉システムの形態形成における自発運動の力場解析

研究課題名(英文) Analysis of Force Field Generated by Active Deformation of Mesoderms during Morphogenesis

研究代表者

田中 求 (Tanaka, Motomu)

京都大学・高等研究院・特任教授

研究者番号：00706814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胚原腸形成後に脊索原基の頭尾方向への伸長を統べる力学原理の統合的理解を目指した。具体的には、硬さを自在に制御可能な基板材料にアフリカツメガエル中胚葉エクスプラントを安定に定着させる技術を確認することと並行して、自発運動する細胞・細胞塊の生み出す局所的な力場を可視化する牽引力顕微鏡の解析プラットフォームを確立した。エクスプラントを体軸に垂直・平行な方向へ牽引しながらその動的応答をライブ観測できる装置を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的な意義として重要なものの一つに、自在に硬さを変調可能なヒドロゲル基板の上にツメガエル中胚葉を安定に固定化できる技術の確立があげられる。また数理解析面からは、従来型の時間軸に対して対称な双極子とは異なり変形・運動の方向を定量化できる四極子解析プラットフォームの確立があげられる。社会的な意義としては本研究で用いた硬さを自在に制御可能なヒドロゲル基板を用いた細胞制御技術が日経産業新聞で取り上げられ(2019年5月16日)、実際に技術移転への準備が進んでいる。

研究成果の概要(英文)：This project aims at the systemic understanding of the mechanical principle that governs the conversion/extension of mesoderm in the direction of body axis during morphogenesis. As the model animal, we selected *Xenopus* and established the culture, the preparation of mesoderms (explants), and the stable immobilization of mesoderms on hydrogel substrates with tunable elasticity. In parallel, we developed an analytical platform for a self-developed traction microscopy in order to quantify the force fields generated by collective cell dynamics by extracting the force dipoles and quadrupoles. In addition, we fabricated a custom-designed instrument that allows for the live imaging of dynamic relaxation of tissues in the direction parallel and/or perpendicular to the body axis.

研究分野：ソフトマター物理学、統計物理学、生命物理学、医工学

キーワード：細胞集団運動 力場計測 対称性の破れ

1. 研究開始当初の背景

単なる無秩序な細胞の塊ではなく、個々の細胞が細胞同士あるいは細胞と細胞外基質との相互作用を通じて自発的に秩序だった高次構造や機能を発現する形態形成は、個体の発生において非常に重要な過程である。しかしながら、現在の細胞運動の研究の主流は、粘菌や継代培養した細胞株を用いた単一細胞レベルが大多数であり、多細胞からなる組織としての細胞移動・運動については *in vivo* 系における光学顕微鏡による現象論的観測に留まっていた。

2. 研究の目的

本申請では、生命物理学者(代表・田中)が発生生物学(上野)と非平衡物理学(佐野)の連携研究者と協力して、胚の球形から桿形への変形の原動力となる脊索中胚葉の頭尾方向への伸長運動を個別細胞の線形総和でなくシステムとして統合的にとらえ、その集団的細胞運動の基本原理解に迫る。研究対象としてはアフリカツメガエル胚に注目し、原腸形成後に脊索原基の伸長を統べる基本原理解を、硬さを自在に制御可能な材料を駆使して、牽引力顕微鏡を用いた自発運動する胚葉システムが生み出す局所的な力場の精密計測、組織形成の過程での細胞骨格の対称性の破れの数理解析、刺激応答材料や loss of function といった外的摂動に対する中胚葉の動態を物理学・分子生物学手法を有機的に組み合わせたシステムバイオロジーの枠組みで解明することを目指した。

3. 研究の方法

硬さと接着能を精密制御した基質モデルの構築と最適化

ここでは、力場計測の基礎となる、細胞外基質モデルを構築し、ゲルの弾性率を精密に制御することによりツメガエル中胚葉との力学的コンプライアンスを最適化する。アフリカツメガエルのアニマルキャップを用いた研究[Koerner, ... Tanaka, PLoS ONE (2013)]で、接着能が弱すぎる基板では組織は丸まって表面から剥離してしまう一方、*in vivo* と異なる接着分子で修飾した基板では細胞が解離し正常に分化誘導が行えないことを見出した。そこで本研究ではツメガエルの脊索中胚葉の安定した *in vitro* 培養のために、フィブロネクチンを用いてゲル表面の接着能を最適化する。

脊索内胚葉組織の生み出す力場と対称性の破れの時空間解析

第二段階では、細胞の自発変形が生み出す力学場を精密計測し、細胞骨格タンパク質の対称性の破れとの相関を解析するプラットフォームを確立する。運動する組織が局所的に生み出す力場の計算には、ゲル内に埋め込まれた蛍光ビーズの変位をモニタリングする、牽引力顕微鏡 (traction force microscopy) を用いる。

外部からの摂動に対する中胚葉組織のシステム応答

第三段階では、外からの摂動(外場)が中胚葉システムの変形や運動に与える影響を解析する。ここでは、刺激応答性のゲルを用いて基板の硬さを最適条件から急に変化させたり、中軸に平行または垂直方向に基板を延伸した際の動的緩和過程を観測する。

4. 研究成果

硬さと接着能を精密制御した基質モデルの構築と最適化

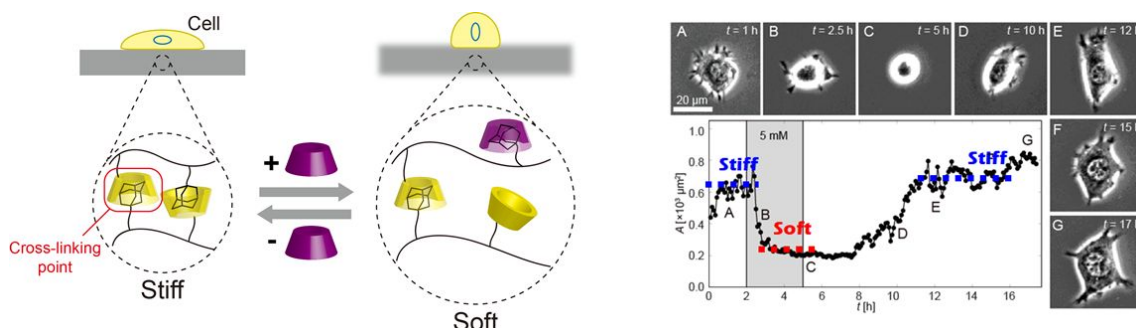


図1 超分子結合を用いたゲルの硬さ制御(左)とC2C12筋芽細胞の形状の可逆制御の例(Hoerning, Nakahata, ... Tanaka, Sci. Rep. (2017)).

当初基板弾性率の制御には申請者らが開発した、生体適合性ブロック共重合体ミセルを物理的に架橋した基板 [Yoshikawa, ... Tanaka, JACS (2011)] を用いる計画であったが pH がツメガエル胚に与える影響を考慮して、超分子結合により架橋されたゲルを阪大・原田明教授のグループと共同で新たに開発した [Hoerning, Nakahata, ... Tanaka, Sci. Rep. (2017)]. 本研究費で雇用した博士研究員・林は、ツメガエル飼育施設を確立し、このゲル表面をフィブロネクチンで密度を精密に制御して機能化することで、ツメガエルの中胚葉 Explant を安定に固定化し、長時間の観察を行うことに成功した (図 2)。

またこの超分子ゲル材料を用いた細胞制御法は知財として申請し (現在各国移行手続き中) 社会実装へと進んでいるだけでなく、日経産業新聞にて広く社会に紹介された。

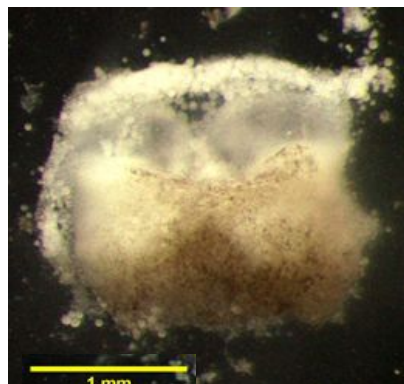


図 2 フィブロネクチンで機能化されたゲル (弾性率 10kPa) 上に固定化されたツメガエル中胚葉。

脊索内胚葉組織の生み出す力場と対称性の破れの時空間解析

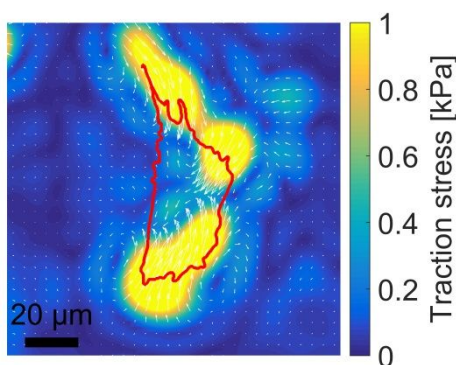


図 3 硬いゲル ($E \approx 15$ kPa) 上で hMSC が自発変形で生み出す Force Dipole の空間分布。

牽引力顕微鏡を用いた力場解析においては、従来型の力場双極子のみを用いた解析手法だけでなく、運動の方向性を記述できるより高次の四極子解析 (研究協力者・佐野) を用いた。図では大きな細胞でかつ比較的運動性が乏しいヒト間葉系幹細胞 (hMSC) を用いた硬いゲル上での最初の解析例を示している (共同研究者・Dr. S. Kaumann & P. Linke からの顕微鏡画像を了承を得て解析)。

また位置 r における力 T とビーズの変位 u を用いて細胞の変形による Total Energy

$$U = \frac{1}{2} \int \vec{T}(\vec{r}) \cdot \vec{u}(\vec{r}) dx dy$$

を計算した。図 3 で示したデータからは 3×10^{-12} J という値が計算できる。

外部からの摂動に対する中胚葉組織のシステム応答

ここでは、外からの摂動 (外場) が中胚葉システムの変形や運動に与える影響を解析した。図 4 (左) には図 3 で示した hMSC が基板の硬さを 3 分の 1 に下げた際に、10 分後示した Force Dipole の空間分布を示す。また、図 4 (右) には分担研究者・鈴木がデザインした、ゲル状に固定した組織を体軸に対して垂直あるいは平行に牽引しながら組織を水浸対物レンズを用いて共焦点顕微鏡でライブ観測できる、自作の装置を示す。

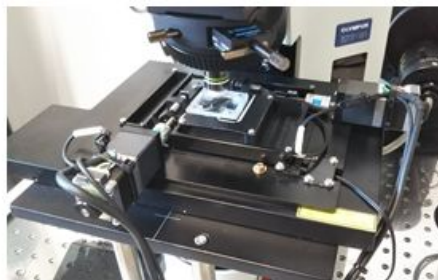
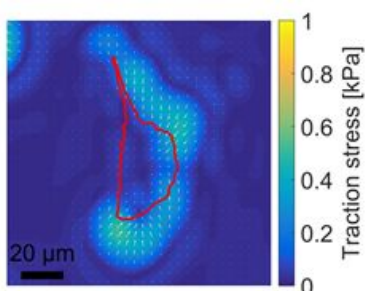


図 4 力学的摂動を与えたときの動的応答計測系。(左) 図 3 で示した細胞の基板の硬さを軟らかく ($E \approx 4$ kPa) してから 10 分後の細胞の生み出す力場。(右) ヒドロゲル基板上の細胞・組織を正立共焦点顕微鏡で観測しながら二軸牽引可能な装置。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Shatirishvili, M.; Burk, A. S.; Franz, C. M.; Pace, G.; Kastilan, T.; Breuhahn, K.; Hinterseer, E.; Dierich, A.; Bakiri, L.; Wagner, E. F.; Ponta, H.; Hartmann, T. N.; Tanaka, M.; Orian-Rousseau, V. , Epidermal-Specific Deletion of CD44 Reveals a Function in Keratinocytes in Response to Mechanical Stress, Cell Death and Disease, 査読有, 7 巻, 2016, e2461, <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.342>
2. Dai, W.; Lee, L.-T.; Schuetz, A.; Zelenay, B.; Zheng, Z.; Borgschulte, A.; Doebeli, M.; Abuillan, W.; Konovalov, O. V.; Tanaka, M.; Schlueter, A. D, Three-Legged 2,2'-Bipyridine Monomer at the Air/Water Interface: Monolayer Structure and Reactions with Ni(II) Ions from the Subphase, Langmuir, 査読有, 33 巻, 2017, 1646-1654 , <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04282>
3. Yoshikawa, H.Y.; Pink, D. A.; Acevedo, N. C.; Peyronel, F.; Marangoni, A. G.; Tanaka, M., Mechanical Response of Single Triacylglycerol Spherulites by Using Microcolloidal Probes, Chemistry Letters, 査読有, 46 巻, 2017, 599-601, <https://doi.org/10.1246/cl.170014>
4. Higaki, Y.; Froehlich, B.; Yamamoto, A.; Murakami, R.; Kaneko, M.; Takahara, A.; Tanaka, M., Ion-Specific Modulation of Interfacial Interaction Potentials between Solid Substrates and Cell-Sized Particles Mediated via Zwitterionic, Super-Hydrophilic Poly(sulfobetaine) Brushes, The Journal of Physical Chemistry B, 査読有, 121 巻, 2017, 1396-1404, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b11540>
5. Korytowski, A.; Abuillan, W.; Amadei, F.; Makky, A.; Gumiero, A.; Sinning, I.; Gauss, A.; Stremmel, W.; Tanaka, M., Accumulation of Phosphatidylcholine on Gut Mucosal Surface is not Dominated by Electrostatic Interactions, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 査読有, 1859 巻, 2017, 959-965, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.02.008>
6. Tsuchiya, M.; Hara, Y.; Okuda, M.; Itoh, K.; Nishioka, R.; Shiomi, A.; Nagao, K.; Mori, M.; Mori, Y.; Ikenouchi, J.; Suzuki, R.; Tanaka, M.; Ohwada, T.; Aoki, J.; Kanagawa, M.; Toda, T.; Nagata, Y.; Matsuda, R.; Takayama, Y.; Tominaga, M. & Umeda, M., Cell Surface Flip-Flop of Phosphatidylserine is Critical for PIEZO1-Mediated Myotube Formation., Nature Commun, 査読有, 9 巻, 2018, 2049, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04436-w>
7. Ohta, T.; Monzel, C.; Becker, A. S.; Ho, A. D. & Tanaka, M., Simple Physical Model Unravels Influences of Chemokine on Shape Deformation and Migration of Human Hematopoietic Stem Cells., Scientific Reports, 査読有, 8 巻, 2018, 10630, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28750-x>
8. Linke, P.; Suzuki, R.; Yamamoto, A.; Nakahata, M.; Kengaku, M.; Fujiwara, T.; Ohzono, T.; Tanaka, M., Dynamic Contact Guidance of Myoblasts by Feature Size and Reversible Switching of

Substrate Topography: Orchestration of Cell Shape, Orientation, and Nematic Ordering of Actin Cytoskeletons., Langmuir, 査読有, special issue, 2018,
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02972>

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Ryo Suzuki
Experimental investigation of polar pattern formation in driven filament systems through collisions
International Symposium: Current and Future Perspectives in Active Matter (招待講演) (国際学会)、2016年10月28日~2016年10月29日、Tokyo, Japan
2. Ryo Suzuki
Quantification of Morphological Dynamics and Symmetry Break in Regenerating Hydra Tissues
The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
2016年11月25日~2016年11月27日、Tsukuba, Japan
3. Ryo Suzuki
Active deformation and symmetry breaking in regenerating Hydra tissues
MIMS workshop "Modeling and Numerical Analysis of Nonlinear Phenomena: Fluid Dynamics, Motion of Interfaces, and Cell Biology"、2017年12月6日~2017年12月8日、Tokyo, Japan

〔産業財産権〕

出願状況 (計 4 件)

1. 名称：検出方法及びデバイス
発明者：上野 祐子、古川 一暁、手島 哲彦、田中 求
権利者：同上
種類：特許
番号：2016-211569
出願年：2016
国内外の別：国内
2. 名称：培地用高分子ゲル、培地、細胞の培養方法及びキット
発明者：原田 明、高島 義徳、中畑 雅樹、田中 求、M.Horning
権利者：同上
種類：特許
番号：2018-529902
出願年：2018
国内外の別：国内
3. 名称：培地用高分子ゲル、培地、細胞の培養方法及びキット
発明者：原田 明、高島 義徳、中畑 雅樹、田中 求、M.Horning
権利者：同上
種類：特許
番号：16/320,622
出願年：2019
国内外の別：外国

4. 名称：培地用高分子ゲル、培地、細胞の培養方法及びキット
発明者：原田 明、高島 義徳、中畑 雅樹、田中 求、 M.Horning
権利者：同上
種類：特許
番号：17834295.2
出願年：2019
国内外の別： 外国

〔その他〕

ホームページ等
<https://cimphy.kuias.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 量
ローマ字氏名：Ryo SUZUKI
所属研究機関名：京都大学
部局名：高等研究院
職名：特定助教
研究者番号(8桁): 10768071

(2)研究協力者

研究協力者氏名：佐野 雅己
ローマ字氏名：Masaki SANO
研究協力者氏名：上野 直人
ローマ字氏名：Naoto UENO