

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15125

研究課題名(和文)細胞配置換えの速度と方向を決定する分子・力学メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidating cell physical properties that determine the rate and directionality of cell rearrangement

研究代表者

杉村 薫 (Sugimura, Kaoru)

京都大学・高等研究院・特定拠点准教授

研究者番号：50466033

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)：本研究は、力と変形をつなぐ機械物性を調べることで、細胞配置換えの速度・方向の制御機構の解明を目指した。まず、画像データからCell Vertex Model (CVM) の構成式とパラメータを包括的に推定する手法を構築し、推定の妥当性を確認した。開発手法を用いて、ハエ上皮組織における細胞機械物性と細胞配置換えの関係を解析したところ、細胞接着面の負のバネ定数の異方性が細胞接着面収縮の速度と方向を支配することを示唆する結果を得た。この仮説を検証するためのCVMの数値計算に取り組んでいるところである。加えて、分子メカニズムの解析も進め、アクチン脱重合因子による細胞配置換え制御を論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CVMは組織力学分野で最も広く用いられている理論モデルの一つである。本研究で開発した手法は、多角形分布などの要約統計量を利用する既存手法よりも格段に精度高く、CVMのパラメータを推定でき、細胞配置換えに留まらず、多様な個体発生現象を力学的に解析する際の有用なツールになる可能性がある。加えて、本研究は、上皮組織により10倍以上も異なることがあるにも関わらず、ほとんど研究されてこなかった細胞配置換え速度の制御機構解明の第一歩となりうるものであり、今後の研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand how tissue shape is determined during morphogenesis, it is critical to uncover how cell mechanics tune morphogenetic cell processes, including cell rearrangement. The Cell Vertex model (CVM) has been widely used to address this question. Previous studies, however, mostly relied on summary statistics when evaluating model parameters from in vivo data. Here, we developed a new method to infer CVM parameters from the image data of epithelial tissue. This method estimates model equations and parameters based on an observed relationship between cell geometry and forces, namely, cell junction tension and cell pressures. We showed that the accuracy of inference was greatly improved compared with previous methods. Next, we used our method to identify a link between mechanical parameters and cell rearrangement in *Drosophila*. Our data suggest that the anisotropy of a negative spring constant of the cell junction governs the speed and directionality of the cell rearrangement.

研究分野：発生生物学、生物物理学

キーワード：力学 組織形態形成 細胞配置換え 統計推定

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞配置換え速度の制御機構の理解が大きく遅れていた

細胞配置換えは形態形成や創傷治癒を駆動する非常に重要なプロセスであり、その方向と速度は正確に制御される必要がある。これまでに、細胞配置換えに伴うアドヘレンスジャンクション(AJ)の収縮と伸長の分子メカニズムの多くが明らかにされてきた (Pinheiro and Bellaïche, *Dev. Cell*, 2018)。なかでも、ミオシンによる力の生成が重要で、ミオシンが生成する細胞接着面の張力の偏りが細胞配置換えの方向を決定することが分かっている (図 1a)。この細胞配置換え方向の制御機構が脊椎動物および無脊椎動物の上皮組織で広く保存される一方で、細胞配置換え速度は上皮組織により 10 倍以上も異なるにも関わらず、その制御機構はほとんど全く研究されてこなかった (図 1b)。

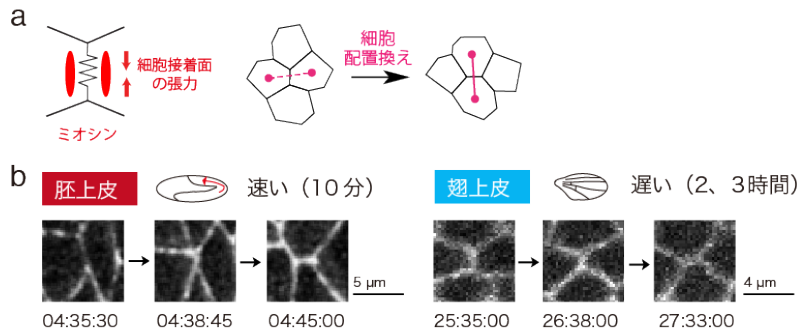


図 1 細胞配置換えの方向と速度

(a) 細胞配置換え方向の制御機構。ミオシンが特定方向の細胞接着面に濃縮することで細胞接着面の張力が増強され、細胞接着面の短縮が引き起こされる。(b) ショウジョウバエの胚と蛹期の翅上皮において細胞配置換え過程を追跡したタイムラプス画像。図の縦方向の細胞接着面が短縮して組み替わり、横方向の細胞接着面が形成される。胚上皮の方が細胞の大きさは大きい、細胞配置換えが完了するまでにかかる時間は 1/10 以下である。胚は孵化後、蛹は蛹化後の時間を時間:分:秒で表示している。

(2) 細胞機械物性の生体内計測は技術的に困難であった

一般に、物質に力をかけた時の変形の数値や可塑性は物質の機械物性により決定される(変形と力の関係を表す式は構成式と呼ばれ、物質の機械物性は構成式の形式とパラメータの大きさにより表現される)。したがって、細胞配置換え速度の制御機構を解明するためには、「力」と「変形」をつなぐ「機械物性」を定量し、理解することが必須である。

力と変形と機械物性のうち、研究代表者は本研究開始時点で、力と変形の定量手法を確立済みであった。例えば、力のベイズ推定法を用いれば、上皮細胞のかたちから数千細胞の圧力と細胞接着面の張力を同時に計測することができる。しかしながら、磁気ピンセット法やマイクロレオロジー法などの細胞機械物性の測定手法は精緻な計測が可能一方で、歩留まりが悪いので、対応する時空間情報を得ることが非常に困難であった。このことから、生体上皮細胞の機械物性を新しい視点、アプローチで定量できれば、細胞配置換え速度決定メカニズム解明の突破口が開かれると強く示唆された。

(3) 実験データに基づく Cell Vertex Model (CVM) のパラメータ評価の問題点

細胞の機械物性の生体内計測が技術的に困難なため、細胞の機械物性と組織の動態の関係を調べる目的でしばしば、理論モデルが用いられる。なかでも、Cell Vertex Model (CVM) は組織力学分野で最も広く用いられている理論モデルの一つである (Honda, *Int. Rev. Cytol.*, 1983)。CVM では、細胞は多角形で表現され、細胞の力学過程を考慮したポテンシャル関数の最小化により、細胞の頂点の位置変化と繋ぎかえが実装される。CVM の数値計算から生物学的に意味のある知見を得るためには、構成式の形式とパラメータの値を実験データから抽出することが望ましい。既存研究は、細胞の多角形分布や細胞面積の辺数依存性などの要約統計量を介して CVM と実験データを比較しており (Farhadifar et al. *Curr. Biol.*, 2007; Kursawe et al. *J. Theor. Biol.*, 2018)、より直接的に構成式とパラメータを評価する手法の構築が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究は、生体上皮細胞の機械物性を統計的に推定する手法を開発すること、さらには、細胞の機械物性が細胞配置換えの速度・方向を司る機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ上皮組織の動画取得と画像処理

DE-cadherin もしくは α -catenin と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現するショウジョウバエ系統をスピニングディスク型もしくはレーザー走査型共焦点顕微鏡で観察した。得られた画像データから ImageJ を用いて細胞接着面のシグナルを抽出し、OpenCV を用いて細胞の頂点の座標と結合関係を得た (Ishihara and Sugimura, *J. Theor. Biol.*, 2012; Sugimura and Ishihara, *Development*, 2013)。細胞配置換えの方向および速度は ImageJ を用いて計測した (Ikawa and

(2) 力のベイズ推定法

(1)で得た細胞の頂点の座標と結合関係を入力として、力とかたちの逆問題をベイズ統計の枠組みで解くことで、細胞接着面の張力と細胞の圧力を得た。詳細は研究代表者の過去の文献を参照 (Ishihara and Sugimura. *J. Theor. Biol.*, 2012)。

(3) 画像データから細胞の機械物性 (CVM の構成式とパラメータ) を推定する手法
本研究で開発。4. 研究成果で詳述。

(4) CVM の数値計算

CVM のポテンシャルエネルギーは、(3)の手法を用いて推定した構成式とパラメータから導出した。ポテンシャルエネルギーの緩和過程を計算する C++プログラムを実装し、数値計算を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞の画像から細胞の機械物性を推定する手法の開発

力のベイズ推定法は、細胞の弾性エネルギーや細胞接着面のバネエネルギーなどのポテンシャルエネルギー形式に関する仮定を必要としない。我々は、この力のベイズ推定法の特長を生かして、画像データから細胞の機械物性を推定する手法を着想した。図 2 に手法の概略を示す。まず、ショウジョウバエ上皮組織 (翅、背板、胚) の細胞画像データから、力のベイズ推定法を用いて、細胞の圧力と細胞接着面の張力を定量する。次に、推定した力を細胞の形態特徴量に対してプロットする。例えば、細胞接着面の張力は細胞接着面の長さに対して負に相関しており、細胞接着面が負のバネ弾性を持つことが示唆された。この力-かたちのプロットと既知の細胞生物学的知見をもとに、細胞接着面の張力と細胞の圧力の表式の候補を複数得る (図 2 上段; 力の表式と CVM のポテンシャルエネルギーは図 2 上段のピンク四角の関係にある)。張力と圧力の表式を細胞の頂点における力の釣り合い方程式に代入すれば (図 2 中段)、最小二乗法によりパラメータの推定値が求まる (図 2 下段)。加えて、赤池情報量規準 (Akaike Information Criterion (AIC)) に基づくモデル選択により、細胞接着面の張力と細胞の圧力の表式の複数の候補の中からデータに照らし合わせて、最も尤もらしいものを同定できる。以上の手続きにより、細胞の機械物性を規定する構成式を実験データに基づいて統計的に選択し、さらに、構成式に含まれるパラメータを推定する手法が構築された。

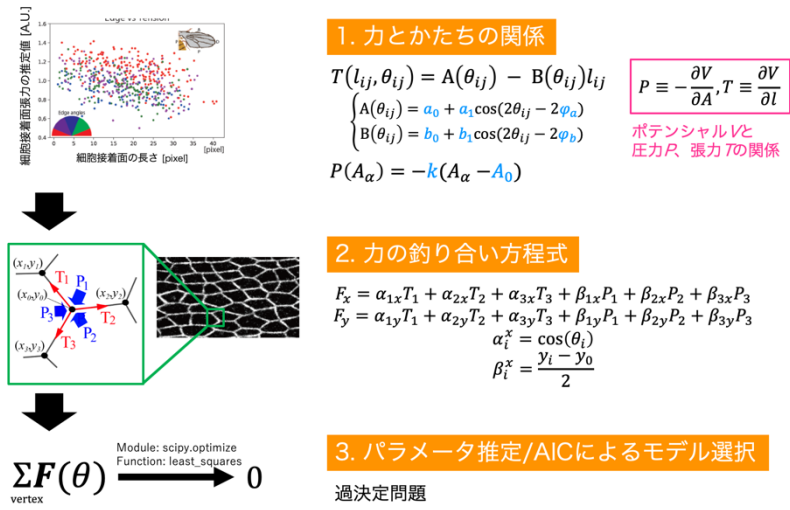


図2 細胞画像からCVMのパラメータを推定する解析フローの概略

T: 細胞接着面の張力、P: 細胞の圧力、 l_{ij} : 細胞接着面の長さ、 θ_{ij} : 細胞接着面の向き、V: ポテンシャルエネルギー。細胞接着面の張力と細胞の圧力の表式の候補の一つを挙げる。パラメータを青字で示す。

(2) パーフェクトモデル実験により、開発手法の推定の正確性が確認された

開発手法の推定の正確性を評価するために、CVM の数値計算データを用いたパーフェクトモデル実験を実施した。パーフェクトモデル実験では、数値計算データを生成した真のモデルと同一のモデルを用いて、パラメータの推定を行う。本研究では、入れ子構造の5種類のモデル (図 2 上段に一例を示す) および CVM の典型的なモデル (Farhadifar et al. *Curr. Biol.*, 2007) について、数値計算で得られた頂点の座標と結合関係をもとに構成式に含まれるパラメータを推定した。その結果、推定誤差は最大でも 6%程度であり、要約統計量を用いた既存手法と比較して (Kursawe et al. *J. Theor. Biol.*, 2018)、開発手法は推定の精度が格段に向上していることが示された。加えて、5種類のモデル全てについて、真のモデルを推定に用いた際に AIC が最小になったことから、AIC によるモデル選択が正しく動作していることが確認できた。

(3) ショウジョウバエ上皮組織画像データでのモデル選択と誤差解析

開発手法が数値データに対して期待通りに働くことを確認できたので、3. 研究の方法(1)に記載

したショウジョウバエ上皮組織（翅、背板、胚）の細胞画像データに適用し、生体上皮細胞の機械物性を推定した（図3）。AICによるモデル選択では、全てのデータで、CVMの典型的なモデルではなく、細胞接着面張力が辺長に負に依存する負のバネ弾性モデルが選択された。さらに、推定値の信頼度を評価するために誤差共分散行列やモンテカルロ法を用いた誤差解析を実施し、ショウジョウバエ上皮組織データにおけるパラメータ推定値が妥当なレベルの信頼度を持つことを確認した。

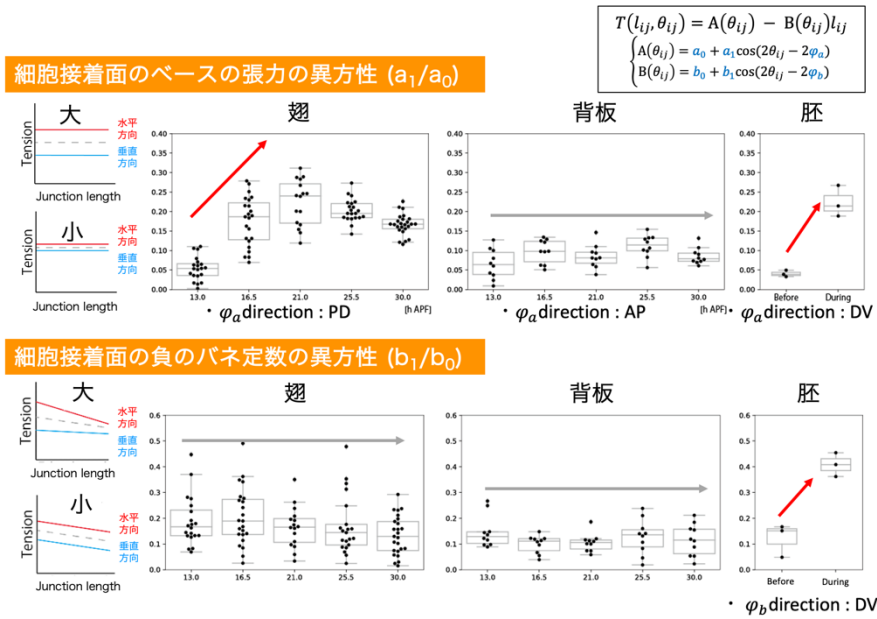


図3 ショウジョウバエ上皮組織（翅、背板、胚）の結果のまとめ

縦軸は細胞接着面のベースの張力の異方性の強さ (a_1/a_0 ; 上段)、細胞接着面の負のバネ定数の異方性の強さ (b_1/b_0 ; 下段)、横軸は発生段階（翅と背板は蛹化後の時間、胚は胚帯伸長の前 (before) と進行中 (during)）を表す。PD: 遠近軸方向、AP: 前後軸方向、DV: 背腹軸方向。推定したパラメータのうち細胞接着面の張力に関するものを右上に青字で示す。上段: 翅と胚で細胞接着面のベースの張力の異方性が発生過程特異的に強まっており (赤矢印)、先行研究と整合的である。下段: 胚帯伸長伸長期特異的に、細胞接着面の負のバネ定数の異方性が強まることがわかった (赤矢印)。

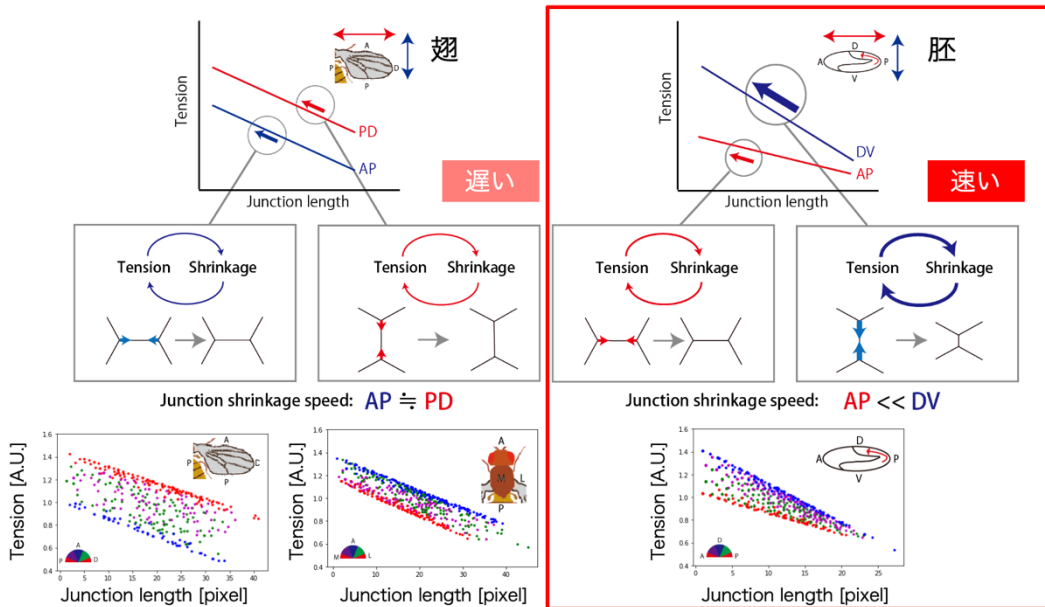


図4 推定結果のまとめと作業仮説

上段: 推定結果の模式図。細胞接着面の張力を細胞接着面の長さに対してプロットしたグラフ。このグラフの傾きは細胞接着面の負のバネ定数の大きさを表す。赤と青は軸方向を表す。PD: 遠近軸方向、AP: 前後軸方向、DV: 背腹軸方向。中段: 赤矢印、青矢印の太さは、細胞接着面の張力と収縮の間に働く正のフィードバックの強さを表す。胚上皮ではこの正のフィードバックが背腹軸方向の細胞接着面で特異的に強く働くので、細胞接着面収縮が加速されると示唆される。下段: 実際の推定結果。細胞接着面の張力を細胞接着面の長さに対してプロットしたグラフ。点の色は細胞接着面の向きを表す (左下半円)。

(4) 細胞接着面の負のバネ定数の異方性が細胞接着面収縮の速度と方向を支配する
細胞配置換えの速度や方向と細胞の機械物性の関係を調べるために、細胞配置換えの速度や方向が異なるショウジョウバエ上皮組織（翅、背板、胚）の比較解析を実施した。翅上皮と背板上皮では細胞配置換えが数時間かけて進行するのに対し、胚上皮では 10 分以内に完了する。AIC によるモデル選択とパラメータ推定の結果は、細胞接着面の負のバネ定数の角度依存性が細胞配置換えの速度・方向と相関することを示していた（図 3; 紙面の都合でデータの一部を省略）。細胞接着面の負のバネ定数は、細胞接着面の張力と収縮の間に働く正のフィードバックの強さを表す（図 4）。胚上皮ではこの正のフィードバックが背腹軸方向の細胞接着面でのみ強く働くので、細胞配置換え過程における細胞接着面収縮が加速されると考えられる。この仮説を検証するために、CVM にパラメータ推定結果を取り込んで数値計算を行って、細胞配置換えの速度や方向が再現されるかを調べている。

(5) ハエ翅の遠近軸方向への細胞配置換えにおいて AIP1 と cofilin が必須の役割を担う
(1)–(4)の数理的なアプローチに加えて、細胞配置換えの分子メカニズムの解析にも取り組んだ。ショウジョウバエ翅上皮では、引張り応力と直交する前後軸方向の細胞接着面が短縮し、細胞接着面が組み換わった後に、遠近軸方向の細胞接着面が新生される (Aigouy et al. *Cell*, 2010; Sugimura and Ishihara. *Development*, 2013)。我々は、AIP1 が cofilin と機械的にリラックスした F-アクチンとの協同的結合を介して、前後軸方向の細胞接着面に局在すること、AIP1 と cofilin はアクチン細胞骨格や細胞間接着の再編成を調節して、組織引張り応力と直交する向きの細胞間接着面に機械的な負荷に対する強度を与え、その結果、細胞が正しい向きに並びかえられることを明らかにし、論文にまとめて報告した (Ikawa and Sugimura. *Nat. Commun.*, 2018)。AIP1 と cofilin をはじめとするアクチン細胞骨格・細胞間接着関連分子の機能欠損が細胞配置換え速度に与える影響の解析が進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 杉村 薫, 石原 秀至	4. 巻 70
2. 論文標題 細胞と組織をつなぐ新しいクラスの連続体モデル	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 333-338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.11477/mf.2425201009	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 -

1. 著者名 石原 秀至, 杉村 薫	4. 巻 60
2. 論文標題 組織変形の定量化手法と多階層連続体モデル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 37-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2142/biophys.60.037	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 Keisuke Ikawa and Kaoru Sugimura.	4. 巻 9
2. 論文標題 AIP1 and cofilin ensure a resistance to tissue tension and promote directional cell rearrangement.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41467-018-05605-7	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12件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井川 敬介, 杉村 薫
2. 発表標題 アクチン細胞骨格系を中心とした細胞配置換え制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉村 薫、井川 敬介
2. 発表標題 細胞配置換え過程におけるアクチン脱重合因子を介した力感知・力抵抗機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉村薫
2. 発表標題 The mechanics of nature behind the multicellular tissue structure
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Ikawa and Kaoru Sugimura
2. 発表標題 AIP1 and cofilin ensure a resistance to tissue tension and promote directional cell rearrangement in the Drosophila wing.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井川 敬介、杉村 薫
2. 発表標題 AIP1 and cofilin ensure a resistance to tissue tension and promote directional cell rearrangement in the Drosophila wing
3. 学会等名 The 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井川 敬介、杉村 薫
2. 発表標題 アクチン細胞骨格系を中心とした細胞配置換え制御メカニズムの解明と数理モデルの構築
3. 学会等名 定量生物学の会第九回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻田豪士、石原秀至、杉村 薫
2. 発表標題 組織形態形成の時空間制御を担う細胞機械物性の解明に向けて 画像データを用いた定量手法の開発
3. 学会等名 定量生物学の会第九回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaoru Sugimura, Keisuke Ikawa
2. 発表標題 Actin interacting protein 1 and cofilin sense the tensile tissue stress and orient cell rearrangement in Drosophila wing.
3. 学会等名 The 4th Asia-Pacific Drosophila Research Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kaoru Sugimura, Philippe Marcq, Shuji Ishihara
2. 発表標題 Quantifying and modelling epithelial morphogenesis
3. 学会等名 第23回iCeMS国際シンポジウム「Emerging Science for Unlocking Cell's Secrets」(招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井川敬介、杉村薫
2. 発表標題 外力駆動型の細胞配置換え制御機構の解明
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉村薫、井川敬介
2. 発表標題 外力駆動型細胞配置換えを担うアクチン骨格制御
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井川敬介、杉村薫
2. 発表標題 外力駆動型の細胞配置換え制御機構の解明
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉村 薫, 石原 秀至	4. 発行年 2018年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 290
3. 書名 小林徹也(編) 定量生物学 第7章 組織の力・応力の定量生物学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学高等研究院物質-細胞統合システム拠点杉村グループウェブサイト
<http://www.koolau.info/>
<http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/ja/wwa/sugimura/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----