

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：21401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2022

課題番号：17KK0007

研究課題名（和文）細胞外シグナル伝達と組織形態形成の解明：4D解析の開発及びシミュレーション研究

研究課題名（英文）4D data analysis and simulation study on the relationship between extracellular signaling and morphogenesis

研究代表者

石本 志高（Ishimoto, Yukitaka）

秋田県立大学・システム科学技術学部・教授

研究者番号：30391858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）： 4D可視化、4Dデータ解析手法およびシミュレーションの研究開発を行うことにより、キイロショウジョウバエ蛹期の翅上皮形態形成に関し、細胞外シグナル伝達と組織形態形成の関係解明に寄与することができた。共焦点顕微鏡および多光子顕微鏡によって取得されたハエ胚蛹殻期の翅形成ライブイメージングデータに対し、実験システムに特化した画像処理プログラムの開発および各種解析法を開発し、シグナルと3D組織形態形成の関係解明に寄与し、また、関連する粘弾性情報を表現するシミュレーションモデルの開発およびin-silico実験システムの構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

We have developed four-dimensional visualization and analysis system for fly pupal wing, and simulation for viscoelastic epithelial monolayer. The results are applicable to various in-vivo animal systems, and they may further contribute to medical research and society in the future.

研究成果の概要（英文）： We have developed our simulation for epithelial tissues, 4D visualisation and 4D data analysis methods and systems, and contributed to the elucidation of the relationship between extracellular signalling and tissue morphogenesis with regard to wing epithelial morphogenesis during the pupal stage of *Drosophila melanogaster*.

In detail, we have developed 4D image processing programmes and various analysis methods specific to the confocal and multiphoton microscopy systems for pupal wing formation of the fruit fly, and contributed to the elucidation of the relationship between BMP signalling and 3D tissue morphogenesis such as differentiation and growth. Based on our tissue mechanics model, called bubbly model, in-silico viscoelastic simulation systems have also been developed and constructed.

研究分野：数理生物

キーワード：生体情報定量化 コンピュータシミュレーション 細胞・組織・器官 データ解析 発生・分化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年、翅形態形成に関する計測技術が急速な発展をとげ、細胞レベルでの種々の動力学測定や器官サイズの全細胞トラッキングデータの可視化(4D可視化)が可能となってきた。これらは主に、フランスやドイツで進められているが、分化・成長に第一義的に関与するBMPシグナル伝達経路の専門家でも4D可視化を計画している研究グループは、ヘルシンキ大学の新見グループのみであった。本研究課題の目的である細胞外シグナル伝達と生体組織の分化・成長メカニズムの解明を進めるには、当該グループとの共同研究が必要であった。国内に目を向けると、ショウジョウバエ翅形態形成の4D観察が可能な施設・設備は少数あるが、上述のBMPシグナル伝達経路の専門家で行っている研究者は、研究開始時点では皆無であった。また、渡航先海外機関には、彼らおよび同大学複数グループで構成するフィンランド国家プロジェクト「実験と理論計算の協働による進化発生生物学研究拠点」があり、基課題研究の目指す理論研究と実験研究の融合研究という目的と合致し、両者にとって非常に有意義な共同研究となる。さらに、競合研究グループが欧州にあるため、目的遂行に最適な共同研究相手と世界に先んじて本研究を進めると同時に、成果の発信を欧州にて行うことも非常に重要な意義を持つ。

## 2. 研究の目的

基課題「一細胞の複雑な形状に基づく器官・組織動力学モデルのシミュレーション研究」では、高精度に測定される一細胞レベルでの複雑な形状に着目し、多階層で力学情報を再現・予測する、器官・組織動力学モデルの構築およびそのシミュレーション研究を進めた。具体的には、マウスの発生過程およびショウジョウバエの翅形態形成メカニズムの解明を目指して進めた。

本国際共同研究では、基課題で示した方向性の一つである、ハエ発生過程における細胞外シグナル伝達と生体組織の分化・成長メカニズムの解明を目指し、新規理論研究のみならず、形態学・発生生物学での実験的研究も同時に強力に推進し、これらを直接的に融合する発展研究を行う。具体的には、シミュレーションモデルの開発を行うと共に、実験グループとの共同研究で細胞組織の4D可視化および4Dデータ解析の開発を推進する。国内外で密な連携を取り、基課題の進捗で得た優位性を保ちつつ、ショウジョウバエの発生過程における細胞外シグナル伝達(BMPシグナル伝達関連)と生体組織の形態形成・分化・成長メカニズムの解明を目指した発展研究を進める。

## 3. 研究の方法

上記研究目的を達成する方法として、具体的には、高速共焦点顕微鏡等によって取得されたハエ胚蛹殻期の翅形成ライブイメージングデータを基に、高精細3D解析システムによってスナップショットごとに多細胞情報の3Dデータ化を行い、時系列データ化(4Dデータ化)を強化するプログラム開発を行い、4Dデータ化部の高精度化を行うと共に、その検証・評価を行い、スムーズかつ高精細・高精度・高信頼性をもつ4D可視化・解析システムの構築を行う。また、取得された4Dデータを再現できるシグナル伝達分子および多細胞動力学の数値モデルを構築し、目的とする基課題の発展研究を行う。

本研究に先立ち、ヘルシンキの新見グループでショウジョウバエの翅形成ライブイメージングデータの取得が開始されている。3D立体解析システムImarisが受入機関共用施設内に導入されているが、一次解析のみで、プログラム開発要員の養成、開発用の高精細3D解析システムの新規導入が必要な状況である。上記と並行して、組織形態形成モデルを開発しているフランス・ソルボンヌ大学不均質物質研究所のフィリップ・マーク氏と、一細胞レベルの形状の記述に関し議論を重ねてきた。

滞在前半では、ヘルシンキ大学にて開発用3D解析システムの新規導入及びセットアップを行い、開発要員(高精度データ化及び高精度インプットデータ生成)の養成を行う。また、3D解析システムによる細胞情報の4Dデータ化・解析に向けて、各種取得可能な生体情報に対する要件整理およびプログラム開発を新見氏と共に行う。さらに、新見氏のもつ発生生物学的知見や生化学的知見と申請者のもつ数理科学的知見を基に議論を重ね、取得すべき生体情報の検討を行い、情報取得のための実験デザインを新見氏と共同で行う。滞在中後半では、ショウジョウバエ発生過程における細胞外シグナル伝達と生体組織の形態形成・分化・成長メカニズムの解明に向けた実験の実施、および一次データの取得を行い、前半で開発を進めたプログラムの実装および4Dデータ解析システムの高精度化を進め、開発する数値モデルおよび4Dデータにより、目的とする基課題の発展研究を行う。

実験の実行および一次データ取得を新見氏が担い、マーク氏は、解析プログラム部分の協力者、かつ、モデル構築部分の共同研究者としての役割を担う。なお、滞在は断続的となるため、国内滞在中にも本研究課題のプログラム開発の一部を行う予定であり、また、上記の通り、理論的計算科学研究を深化させるため、フランスのソルボンヌ大学に短期滞在する。さらに、関連するショウジョウバエやマウスの実験的知見に関して、国内研究協力者らと意見交換を行い、本研究を推進する。

## 4. 研究成果

基課題「一細胞の複雑な形状に基づく器官・組織動力学モデルのシミュレーション研究」において進展させた方向性、すなわち、ハエ発生過程における細胞外シグナル伝達と生体組織の分

化・成長メカニズムの解明を目指し、本研究課題による発展研究を行った。実施内容の多くは、海外研究機関での緊密な議論および研究実施を必要とし、この点に関して新型コロナウイルスの影響が大きく、例えば、海外研究機関でも実験実施不可の状況が続いた。実施再開後も部外者の立ち入りを禁じられるなど研究計画の遂行に多大な困難が生じたが、連携を緊密に保ちつつ以下の項目に関して十分な成果を得た。

- (1) シグナル伝達と生体組織の分化・成長メカニズムの解明
- (2) 4 D可視化用画像処理プログラムの開発
- (3) 4 Dデータ解析法（移動・変形定量化法と力学推定法）の開発
- (4) シミュレーションモデルの開発

- (1) 当初より、高速共焦点顕微鏡によって取得されたハエ蛹殻期の翅形成イメージングデータおよびライブイメージングデータを基に、高精細3D解析システムによってスナップショットごとに多細胞情報のデータ化を行い、時系列データ化を強化するプログラム開発を行った。得られたデータが示す現象の解析を行い、蛹期翅器官の3次元形態変化とシグナル分子の時空間動態および成長・分化を促進する遺伝子の発現状況とが密接に関連して進行していることを実験的および解析的に明らかにした。つまり、成長や分化は近隣細胞間のシグナル伝達や、シグナルを伝達する分子の単純な側方移動にのみ制御されるわけではなく、器官の形態の変化とも他組織とも密接に関係するという重要な知見が得られた（図1）。この状況は他種および他器官でも同様に起こっていることが示唆される。この結果に関して、査読付き論文1編 [1] を出版した。

さらに、後述の可視化用処理プログラムの開発およびデータ解析法の開発を受けて、ショウジョウバエ蛹期初期に距離を置いて2層ある単層上皮組織の各細胞に対し、複数の形態状態遷移過程として形態変化を定量化し、形態変化と細胞分裂および2層の立体的構造変化の関係をシグナル伝達の動態と共に明らかにし、シグナル伝達と形態形成の関連をより明確にする結果を与えた。この結果に関して、論文1編を上梓、投稿した。

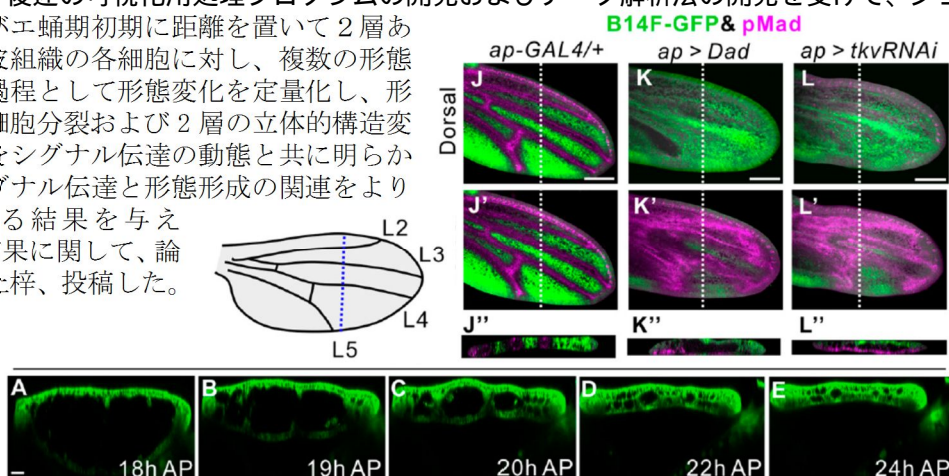


図1 ハエ蛹期翅上皮形態とシグナル伝達。袋状の翅構造に対し左上図の破線断面を下図に示す。背側シグナル伝達の変異は形状にも変化を与える [1]。

- (2) キイロショウジョウバエの蛹期翅上皮の細胞核および膜や、上皮組織の細胞接着分子であるカドヘリンの蛍光染色を高速共焦点顕微鏡や多光子顕微鏡を用いたライブイメージングで可視化およびデータ化し、定量化に最適な実験条件の洗い出しを共同研究者らとともに進め、それらで取得される一次画像データに関しての画像処理プログラム開発を行った。一次画像には、試料に起因するエラー、用いる機器に固有のエラー、デジタル処理の手順で発生するエラー等があり、これらを勘案せず一般的な画像処理を行うと元々画像が持っている定量性（物質の発現量に応じた輝度値）が損なわれてしまう。これらを精査しつつ画像処理で定量性を一定水準以上に保ったまま精細化するプログラムの開発を行った。また、翅上皮組織の周りには他の器官がひしめき、翅内部にも多種の細胞が混在するため、これらを自動認識・排除処理し、時空間スケールによってゆらぐ発現量を表す蛍光画像データの正規化手法の開発等を行った。これにより、二層ある翅上皮の三次元位置を精細に抽出することが可能となった（図2）。さらに追加で、細胞骨格を構成するチューブリンの蛍光マーカーや、細胞分裂マーカーとなる中心体マーカーのライブイメージングデータに関して、ノイズ除去を目的としたプログラム開発および解析を進めた。上記(1)における結果は、これらの成果を受けたものである。

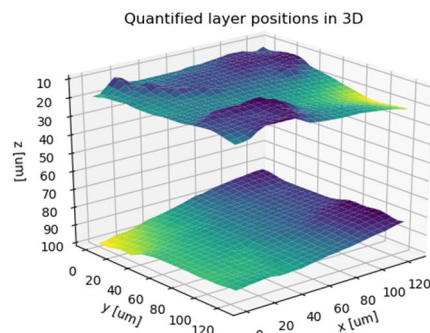


図2 画像データ正規化手法により得られた翅上皮2層の高精度3D位置

- (3) 各時刻の3D画像に上述の半定量的画像処理を施し、形状データの抽出を行った。比較的頻繁に起こる変形や細胞分裂、トポロジー変化により、抽出データそのままでは細胞トラッキ

ングはスムーズにいかない。最終的なリアルタイム処理も視野に据え、アルゴリズム及び実装プログラムの改良を行った。数時間程度（2桁タイムポイント）の半自動形状トラッキングを行うためのプログラムの拡張および実装を行った。さらに高速共焦点顕微鏡および多光子顕微鏡を用いたライブイメージングデータから細胞形状を抽出するプロトコルおよびプログラムを改良し、機械学習の手法 [2] を援用しつつ、形状抽出に大幅な向上が見られた。これらの発展によりさらに約 2 倍の長さのデータにまで形状トラッキングが拡張され解析可能となった。

上記研究と並行して、細胞核移動の定量化をすべく、ライブイメージングデータの細胞核画像から細胞核 3D 位置を高精度で推定する深層学習モデルを開発し、低解像度 4D ライブデータから細胞核トラッキングを可能とする道筋を示した [3]。さらに深層学習用のアノテーション付き追加学習データを作成し、時系列データ向け機械学習モデルの構成を試みるなど 4D データ解析システムの高精度化に向け研究を進めた。

これらの形状トラッキング結果を用いて、既存の細胞境界張力推定法 [4] を発展させ、細胞移動量変形量も考慮した細胞境界張力および細胞内圧力推定法、形状変形量の算出法を開発した。これらを実データの解析に適用し、細胞形状変化に関しての有用な力学特徴量を得た。さらに、シミュレーションで作成したモデルデータを用いた推定法の検証を行い、得られた結果から推定法の改良を行った。推定張力および圧力を用いたモデルパラメータの推定、即ちデータ同化にも着手し、定性的だが良好な結果を得た。

- (4) 得られたデータ及び関連する生物学的知見に関して共同研究者らと議論を重ね、基課題において開発中の泡・頂点モデルシミュレーションに反映させつつ、新規計算機実験を構成、実行した。具体的には周期的ひずみ入力に対する細胞組織の応力応答をみる in-silico 実験システムを構築、実行し、既存の頂点モデルに比べて泡・頂点モデルが複雑な粘弾性体を表現できるモデルであることを明らかにした [5]。さらにデータ同化検証用に単軸伸長インシリコ実験のコードを作成しインシリコ粘弾性実験を行った。

これらの成果に関し、多数の国際会議および国内会議にて成果発表を行った。

また、上述の成果に関して共同研究者らおよび協力研究者らと議論を重ねた結果、力学特徴量の推定法および機械学習援用定量化法に関し、それぞれ新規手法の発案に至ったため、今後これらの構築および実データの分析を行う予定である。

## 参考文献

- [1] J. Gui, Y. Huang, M. Montanari, D. Toddie-Moore, K. Kikushima, S. Nix, Y. Ishimoto, and O. Shimmi; Coupling between dynamic 3D tissue architecture and BMP morphogen signaling during *Drosophila* wing morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116** (2019) pp. 4352-4361.
- [2] B. Aigouy, C. Cortes, S. Liu, B. Prud'Homme; EPySeg: a coding-free solution for automated segmentation of epithelia using deep learning. *Development* **147** (24) (2020) dev194589.
- [3] Y. Ishimoto, T. Watanabe; Towards Particle Tracking Velocimetry of Cell Flow in Developing Tissue Using Deep Neural Network. *Lect. Notes Comput. Vis. Biomech.* **36** (2020) 495-504.
- [4] G. W. Brodland, J. H. Veldhuis, S. Kim, M. Perrone, D. Mashburn, et al; *PLoS ONE* **9**(6) (2014) e99116.
- [5] T. Toyoshima, Y. Ishimoto; Dynamical Rheological Properties of In-Silico Epithelial Tissue by Vertex Models. *Lect. Notes Comput. Vis. Biomech.* **36** (2020) 632-638.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishimoto Y., Watanabe T.	4. 巻 36
2. 論文標題 Towards Particle Tracking Velocimetry of Cell Flow in Developing Tissue Using Deep Neural Network.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lecture Notes in Computational Vision and Biomechanics	6. 最初と最後の頁 495-504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-43195-2_40	査読の有無 有
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 Toyoshima T., Ishimoto Y.	4. 巻 36
2. 論文標題 Dynamical Rheological Properties of In-Silico Epithelial Tissue by Vertex Models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lecture Notes in Computational Vision and Biomechanics	6. 最初と最後の頁 632-638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-43195-2_53	査読の有無 有
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 J. Gui, Y. Huang, M. Montanari, D. Toddie-Moore, K. Kikushima, S. Nix, Y. Ishimoto, and O. Shimmi	4. 巻 116
2. 論文標題 Coupling between dynamic 3D tissue architecture and BMP morphogen signaling during Drosophila wing morphogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 4352-4361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1815427116	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 該当する

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 1件／うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Yukitaka Ishimoto, Masayuki Kashiwa
2. 発表標題 In-vivo cell flow visualisation using deep learning and other means
3. 学会等名 Virtual SMB 2021 Annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Masayuki Kashiwa, Takuya Toyoshima, Yukitaka Ishimoto
2 . 発表標題 Visualization of cell flow by cell vertex and bubbly cell shape tracking
3 . 学会等名 Virtual SMB 2021 Annual meeting ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Yukitaka Ishimoto
2 . 発表標題 Monoaxial stretch of an edge-bound in-silico epithelial tissue by bubbly vertex model
3 . 学会等名 17th International Symposium on Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering and the 5th Conference on Imaging and Visualization ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 M. Kashiwa, T. Toyoshima, Y. Ishimoto
2 . 発表標題 Visualization and quantification of cell flow by bubbly cell tracking
3 . 学会等名 17th International Symposium on Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering and the 5th Conference on Imaging and Visualization ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Y. Ishimoto, M. Kashiwa
2 . 発表標題 Modelling, quantification, and data assimilation of epithelial monolayer tissue
3 . 学会等名 The 11th Asia-Pacific Conference on Biomechanics ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1．発表者名 石本志高
2．発表標題 単層上皮組織のモデリング・定量化およびデータ同化
3．学会等名 日本機械学会第33回バイオエンジニアリング講演会（招待講演）
4．発表年 2021年

1．発表者名 石本志高，豊嶋拓哉
2．発表標題 バブリーバーテックス模型によるインシリコ上皮組織のレオロジー特性
3．学会等名 機械学会2021年度年次大会
4．発表年 2021年

1．発表者名 Masayuki Kashiwa, Takuya Toyoshima, Yukitaka Ishimoto
2．発表標題 Visualization of cell flow by cell vertex and bubbly cell shape tracking
3．学会等名 ソフトバイオ研究会2021
4．発表年 2021年

1．発表者名 石本志高，柏正幸，渡部茂暁
2．発表標題 生体組織内細胞流れの深層ニューラルネットワークを用いた可視化の試み
3．学会等名 生体医工学シンポジウム
4．発表年 2020年

1．発表者名 柏正幸，豊嶋拓哉，石本志高
2．発表標題 細胞頂点・形状トラッキングによる細胞流れ可視化の試み
3．学会等名 生体医工学シンポジウム
4．発表年 2020年

1．発表者名 石本志高，柏正幸
2．発表標題 変形移動する上皮細胞集団流れの可視化に向けて
3．学会等名 数理生物学会2020
4．発表年 2020年

1．発表者名 石本志高
2．発表標題 深層学習等を用いた生体組織内細胞流れの可視化
3．学会等名 日本物理学会第76回年次大会
4．発表年 2021年

1．発表者名 Y. Ishimoto, T. Toyoshima
2．発表標題 Dynamical rheological properties of in-silico epithelial tissue by vertex models.
3．学会等名 International Soft Matter Conference 2019 (国際学会)
4．発表年 2019年



1. 発表者名 Y. Ishimoto, T. Watanabe
2. 発表標題 Towards particle tracking velocimetry of cell flow in developing tissue using deep neural network
3. 学会等名 16th International Symposium on Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering and 4th Conference on Imaging and Visualization (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Ishimoto, T. Watanabe
2. 発表標題 Towards Particle Tracking Velocimetry of Cell Flow Using Deep Learning
3. 学会等名 The 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP Biomech 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石本志高
2. 発表標題 生物・生命の移動現象：実験とシミュレーションと機械と私
3. 学会等名 研究会「理論と実験」2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊嶋拓哉, 石本志高
2. 発表標題 生体組織内多細胞構造のレオロジーおよび移動現象に関するシミュレーション研究
3. 学会等名 ソフトバイオ研究会2019
4. 発表年 2019年

1．発表者名 柏正幸，豊嶋拓哉，石本志高
2．発表標題 Bubbly Cell Tracking Velocimetry - 細胞頂点・形状トラッキングの試み
3．学会等名 機械学会東北支部会第55期支部総会・講演会
4．発表年 2020年

1．発表者名 Y. Ishimoto and T. Toyoshima
2．発表標題 In-silico rheological experiments of an epithelial sheet by the cell vertex model and the bubbly vertex model
3．学会等名 12th European Fluid Mechanics Conference (EFMC12) (国際学会)
4．発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap: 石本 志高 -- Published papers  
[https://researchmap.jp/y.ishimoto/published\\_papers](https://researchmap.jp/y.ishimoto/published_papers)  
 Research Gate: Yukiitaka Ishimoto -- Publications  
[http://www.researchgate.net/profile/Yukiitaka\\_Ishimoto/publications](http://www.researchgate.net/profile/Yukiitaka_Ishimoto/publications)

## 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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	新見 修  (Shimmi Osamu)	ヘルシンキ大学・パイオテクノロジーセンター・グループリーダー	兼務
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	新見 修  (Shimmi Osamu)	タルトゥ大学・科学技術学部発生物学講座・教授	兼務
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	マーク フィリップ  (Marcq Philippe)	ソルボンヌ大学・不均質物質研究所・講師	

## 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
---------	---------

フィンランド	ヘルシンキ大学			
エストニア	タルトゥ大学			
フランス	ソルボンヌ大学			