

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：23901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25330341

研究課題名(和文)細胞移動における力分布・変形・前後極性の関係解明

研究課題名(英文)Force distribution and morphological change in polarized cell migration

研究代表者

作村 諭一 (SAKUMURA, Yuichi)

愛知県立大学・情報科学部・准教授

研究者番号：50324968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、力学過程に焦点を当てた細胞移動の原理解明を目的とする。具体的には、細胞が基質に対して生成する「力場分布」、そこから変換された合成力としての「前後極性」、そして実際の「移動」、という一連の物理過程を解明する。この目的のため、細胞が基質に対して作用する力のベイズ的推定手法の開発、機械的力が与えられた際の細胞(好中球・細胞性粘菌)の運動特性の抽出、細胞運動中の細胞内Myosin IIの動的濃縮過程の解析、硬さに極性がある基質上での細胞移動の数値モデル化を行った(細胞性粘菌およびケラトサイト)。

研究成果の概要(英文)：This research aims to elucidate the mechanism of cell migration focusing on mechanical processes, in which cell acts mechanically on the culture substrate, integrates all resultant forces to generate moving polarity, and migrates actually. To this end, we developed Bayesian method for estimating force, extracted migration property of neutrophils and Dictyostelium in mechanical stimulation, analyzed Myosin II accumulation during migration, and developed mathematical models of cell migration (Dictyostelium and keratocyte).

研究分野：数理細胞生物学

キーワード：メカノバイオロジー 細胞移動 数値モデル Myosin II メカノセンシング

1. 研究開始当初の背景

細胞運動(移動・変形)は生物の形態形成の基本であるだけでなく、ガン細胞の浸潤などにも関わるため、その原理解明は重要である。細胞運動の過程は大きく2つに分類できる。1つ目は外部環境の情報に反応して運動方向を決める「意思決定過程」であり、上位の細胞内分子シグナルに基づく研究が豊富である(例えば Meinhardt, J. Cell Sci. 1999; Janetopoulos et al., PNAS, 2004)。もう1つの過程は、物理的に接触した細胞外の環境(例えば培養基質)に対する作用力・反作用力の関係に基づく「力学過程」である。後者の過程は細胞運動に対して直接的な制御を与えるにもかかわらず、力の配分と実際の動きを説明する研究は少ない。後者の研究が遅れている原因は、細胞が生成する力の計測が近年になってようやく可能になってきたことにある。

上位シグナルは、細胞骨格を介した物理的力への変換がない限り、決して実際の運動につながらない。力へ変換されたとしても、細胞自身の構造や基質との接着の状況などの力学的制約により、意思のままに運動できるとは限らない。これはヒトが自身の意思通りに運動できるとは限らないことと同じであり、また細胞と同様に、自身の構造と環境に大きく依存する。したがって細胞運動における力学過程の解明は重要である。

2. 研究の目的

本研究課題は、力学過程に焦点を当てた細胞移動の原理解明を目的とする。具体的には、細胞が基質に対して形成する「力場分布」、そこから変換された合成力としての「前後極性」、そして実際の「移動」、という一連の物理過程を解明する。この目的のために、細胞の運動特性の統計的性質を解析し、実験定量データを導入した数理モデルを構築する。対象は培養基質上の細胞性粘菌の運動である。上位のシグナルが外部環境に基づいて移動方向を決定する過程は、本研究課題で扱わない。あくまで細胞と基質の間の力学過程に重点を置き、力学過程と実際の移動の関係を明らかにする。以下に研究項目を挙げる。

(1) 細胞が基質に対して作用する力、および Myosin II (力を生み出す分子) の濃縮度を顕微鏡画像から定量し、その定量データから細胞の力や Myosin II の分布を明らかにする。細胞形状変化と Myosin II の因果関係を推論する。

(2) 以下の生物学的知見:

- ① 細胞は力が強い方向は退縮し、力が弱い方向に移動する。
- ② 大きな力と Myosin II の集積に相関がある

といった現象に対し、細胞と基質の接着動態を導入して因果関係を明らかにする。

(3) 細胞が自身の力を統合し「前後極性」と「形」を形成し、移動する力学的過程を明ら

かにする。そのために、細胞の力データと Myosin II の集積データを導入した包括的な定量数理モデル構築を行う。

(4) 他の細胞(魚類ケラトサイト、神経成長円錐、好中球)の運動を解析し、細胞移動の特性を抽出する。

3. 研究の方法

(1) 蛍光ビーズの変位からの力推定、形態の定量化、Myosin II 定量: 細胞が生み出す力は、基質に埋め込まれた蛍光ビーズの変移量から推定される。基本技術は他のグループによる先行研究(Sabass et al., Biophys. J. 2008)で開発されているが、ビーズ変移の速度成分とその統計的分布、タイムラプス画像の利点を用いた時空間的な拘束条件を導入した改良が見込まれる。特に、実験条件によりビーズが疎であったり密であったりする場合などの困難があると考えられる。その場合は、力の方向に関して拘束条件を設けたベイズ理論により推定する方法を導入する。人工的にビーズ変移の擬似データを作成し、本手法が有効であることを確認のもと、実際の顕微鏡画像に適用する。

(2) Myosin II 濃縮の時空間解析: 細胞に関連する力のうち、Myosin II が生む収縮力は非常に大きい。予備的な実験データによれば、Myosin II は細胞外からの力に応答して濃縮する(力-Myosin II フィードバック)。本研究課題は力学過程に焦点を当てているが、Myosin II だけは力に直接関係する分子として計測する必要がある。連携研究者は、細胞性粘菌アメーバに GFP-myosin II を発現させ、全反射光学条件で蛍光ビーズの変位と Myosin II の細胞内分布を同時に計測することに成功している(J. Cell Sci. 2008)。これらの実験データの提供を受け、力のみならず細胞内部の Myosin II の濃縮度およびその分布を定量化する。実験データはライブセルイメージングであるため膨大な数の顕微鏡画像となる。Myosin II 濃縮の定量化を自動化するアルゴリズムを開発し、ハイスループット化をはかる。

(3) 細胞移動における力学過程の数理モデル構築: 実験データの特性から力学過程に基づいた数理モデルを構築する。細胞は可能な限り簡素にするため2次元多角形で考え、ノードをバネ・ダンパエッジで結合したものを考える。細胞形状に関するモデル設定の後、基質との相互作用を含めた力学過程を定式化する。細胞が基質と接着・剥離を繰り返す過程を静止摩擦・動摩擦の運動に例えて数式化を行う。これをベースにモデル修正を行う。モデル変数のうち基質への作用力や Myosin II 濃度は実験定量データを適用し、他の変数については実験観測可能性を検討する。バネ定数によって細胞変形の仕方が変わるため、実験データからバネ定数を推定する必要がある。また最大静止摩擦力と動摩擦力に関するパラメータが細胞の動きを決める重要な

ファクターである。これらのパラメータも実験データから推定する。

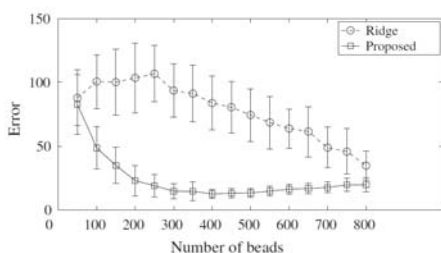
(4) 定量数理モデルが固まった後、パラメータの変更および解析学的な数式処理を行い、前後極性・変形・移動の原理を抽出する。白血球やケラトサイトといった別の細胞の実験データの提供を受け、それぞれの運動を数理モデルで再現できるかどうかシミュレーションを行う。数理モデルが、粘菌の「前後極性」だけでなく、ケラトサイトの「形」まで再現できるための条件を抽出する。もし、パラメータ変更だけでケラトサイトのような三日月形状を再現できれば、本研究の数理モデルが、細胞運動の一般原理を表現していると強く示唆される。

4. 研究成果

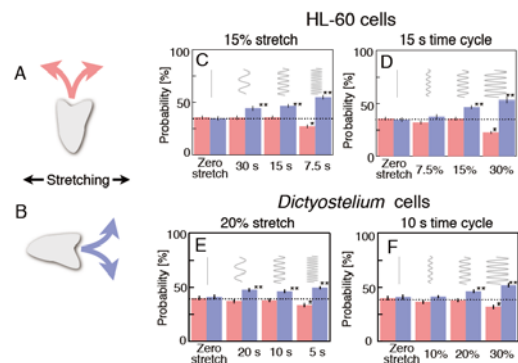
(1) 蛍光ビーズの変位からの力推定: 基質上を移動する細胞内部では、周辺部においてアクチン重合によるアクチンフィラメントの形成、細胞膜からの張力および Myosin II が生み出す収縮力によるアクチンフィラメントの内向き流動が見られる。これらは細胞エッジの変形と細胞全体の移動に関わる根幹的な力学過程を担う。したがって、細胞が基質に対して発生する力はほぼ内向きである。この生物学的知見を事前知識として導入し、ベイズの定理を用いることで細胞が生み出す力の推定を行った。

先行研究と同じく、ビーズが埋め込まれた基質を用い、細胞が動いた際のビーズの変位を計測する。その変位と基質の硬さに関するパラメータから細胞が生み出した力を推定する（上図はビーズの変位と力の事前知識を表す）。従来の推定法では、精度を上げるためにビーズの密度を高くするなどの手法が用いられたが、高密度のビーズは基質の性質を変性させる可能性がある。そこで我々は、ビーズの数が少ない場合でも高精度の力推定が可能な手法を開発した。

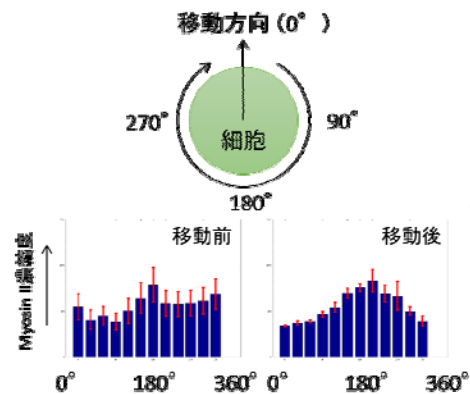
力の方向に関する事前知識と、力からビーズの変位を生み出すモデルによる尤度から事後分布を計算し、力推定を行った。その結果、従来手法に比べビーズの数が少ない場合でも力推定の誤差が抑えられることが分かった（下図；横軸がビーズの数、縦軸が誤差）。



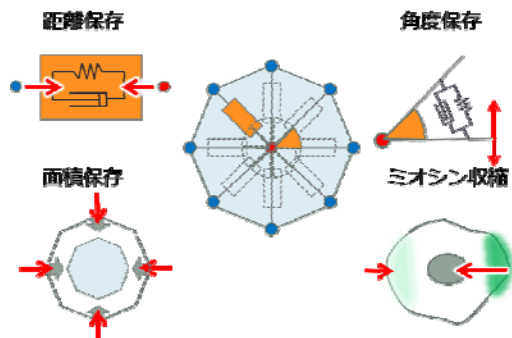
(2) 機械的力刺激に対する細胞運動極性の特性解析: 細胞は生化学的なシグナルだけではなく力学的な刺激を感知し、それに反応して移動方向を決定する。自ら生み出した力、すなわち内的要因による力にも反応するため、外的要因による力刺激に対する移動特性を明らかにする必要がある。伸縮性の基質を周期的に伸縮させることにより（連携研究者）、細胞（好中球と細胞性粘菌）に対して機械的の刺激を与え、その際の移動特性を解析した。その結果、伸縮の周期が速いほど、また伸縮の振幅が大きいほど、伸縮方向を避ける方向に方向転換し易いことが分かった（下図の青）。一方、伸縮方向に移動している場合は、力刺激の強さにかかわらず方向転換の確率は変化しなかった（下図の赤）。こうした特性により、好中球と細胞性粘菌は力刺激を避ける方向に移動することが分かった。



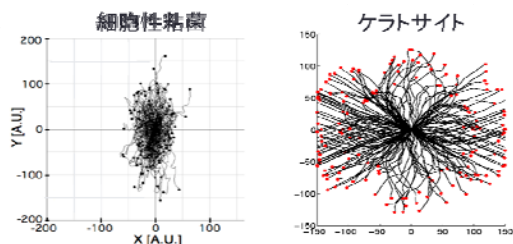
(3) 細胞運動時の Myosin II の動的濃縮過程の解析: 予備実験から細胞性粘菌が外的力を感知する際に Myosin II が関連している可能性が示唆されている。そのため、細胞移動の方向と細胞内の Myosin II の濃縮方向について統計的解析を行った。その結果、細胞の移動前において比較的前方の Myosin II の濃縮が低く、移動後においては後方の濃縮が有意に高かった。これらの結果は、細胞移動の結果が力学的作用を介して Myosin II 濃縮にシグナル変換されていることを示唆する（下図）。



(4) 細胞移動の力学的数理モデル: これまでの結果を踏まえ、細胞運動・移動の数理モデルを構築し、基質の硬さに対する実験観測を再現した。細胞は 2D の 8 角形で簡略化し、



ノード間にバネ・ダンパからなる力学モデルを導入した(上図)。モデルは細胞性粘菌とケラトサイトを対象としたが、ケラトサイトには巨大なストレスファイバーに対応する骨格を細胞内部に設置した。横方向に硬く縦方向に柔らかい基質上で細胞性粘菌やケラトサイトを培養すると、細胞性粘菌は柔らかい方向に移動するがケラトサイトは硬い方向に移動する。我々はこの違いがストレスファイバーの存在の有無に依存するという作業仮説を立て、その可能性を検証した。その結果、実験結果と同様の移動特性を再現することができた(下図)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Okimura C, Ueda K, Sakumura Y and Iwadate Y, Fast-crawling cell types migrate to avoid the direction of periodic substratum stretching. *Cell Adhesion & Migration*, DOI:10.1080/19336918.2015.1129482, 2016.
- ② Kozawa S, Sakumura Y, Toriyama M, Inagaki N, Ikeda K. Bayesian Cell Force Estimation Considering Force Directions, *Neural Processing Letters*, DOI 10.1007/s11063-013-9320-y, 2013

[学会発表] (計 3 件)

- ① Sakumura Y, Inagaki N, Spontaneous Symmetry Breaking in Neural Morphology, Society for Industrial and Applied Mathematics annual meeting 2014, 2014.7.7-7.11, Chicago (USA).
- ② Sakumura Y, Okimura C, Iwadate Y, Computational model of directional migration of crawling cell on anisotropic substratum, International Symposium on

Mechanobiology 2014, 2014.5.20-5.23, 岡山大学 (岡山).

- ③ Kozawa S, Sakumura Y, Toriyama M, Inagaki N, Ikeda K, Bayesian estimation of traction force generated by neuronal growth cone, Society for Neuroscience Annual Meeting, 2014, Washington DC (USA).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ist.aichi-pu.ac.jp/lab/sakulab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

作村 諭一 (SAKUMURA, Yuichi)
愛知県立大学・情報科学部・准教授
研究者番号：50324968

(2)研究分担者

池田 和司 (IKEDA, Kazushi)
奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科・教授
研究者番号：10262552

(3)連携研究者

岩楯 好昭 (IWADATE, Yoshiaki)
山口大学・理学部・准教授
研究者番号：40298170