

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14534

研究課題名（和文）立体イメージベースモデリングによる眼杯組織の動力学場推定

研究課題名（英文）Stress field estimation in three-dimensional optic-cup by image-based modeling

研究代表者

奥田 覚（Okuda, Satoru）

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：80707836

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、実験的に取得した三次元画像を元にして、三次元頂点モデルを用いて、実際の組織の形態情報に基づいた力学シミュレーションを目指した。さらに、力学シミュレーションにより予測される組織変形を実際の組織の形態変化と定量的に比較することにより、組織・器官の内部に生じる力作用を予測した。まず、アポトーシスによる細胞数の変化や力学作用が及ぼす影響を考慮した形態形成の力学場推定を可能にするため、三次元バーテックスモデルにおけるアポトーシスの数理モデル化を行った。さらに、この数理モデルをマウスの眼杯組織の形成過程に適用し、その力学機構の定量的な予測を行った。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a method to simulate tissue morphogenesis based on experimentally observed morphological data using the 3D vertex model. Moreover, by comparing the in-vivo and in-silico deformation processes quantitatively, we predicted several key mechanisms to drive the tissue morphogenesis. First, we developed the mathematical model of cell apoptosis based on the 3D vertex model framework. Next, by applying the developed model to the optic-cup morphogenesis, we qualitatively predicted the mechanisms of the tissue morphogenesis.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：三次元バーテックスモデル 器官形成 バイオメカニクス

1. 研究開始当初の背景

近年の組織培養・観察技術の向上により、胚内部の三次元的な組織・器官の発生過程が観察されるようになってきた。一方で、複数の組織が詰まった胚内部の情報から、個々の組織・器官の形態形成を理解することは簡単ではない。

これまでに我々は、組織・器官形成の力学機構を解析するため、三次元頂点モデルによる力学シミュレーション手法を開発してきた。これにより、仮定した細胞の物性・挙動に基づき、組織・器官の立体的な形成過程の予測を可能にした。

本研究では、実験的に取得した三次元画像を元にして、三次元頂点モデルにおける物理的なパラメータを推定し、実際の組織の形態情報に基づいた力学シミュレーションを行う。さらに、力学シミュレーションにより予測される組織変形を実際の組織の形態変化と定量的に比較することにより、組織・器官の内部に生じる力作用を推定する。

2. 研究の目的

(1) 三次元頂点モデルによる力学シミュレーション技術と画像解析技術を組み合わせ、多細胞組織形成における立体的な力学場を定量的に推定する手法を開発する。

(2) マウス胚における眼杯形成の過程を観察し、開発した推定手法を適用することにより、眼杯組織の立体構造の形成過程における細胞レベルの力学場、および、それが組織の形態形成に及ぼす影響について究明する。

3. 研究の方法

(1a) 細胞・組織の力学作用を記述するポテンシャルエネルギー関数の設計

多数の細胞からなる組織・器官は、細胞骨格や細胞間結合タンパク質によって結合された連続的な構造物であり、組織局所の物性は、能動的・受動的に振舞う。例えば、上皮組織の頂端面付近には、収縮性のアクチン細胞骨格が存在し、ミオシン活性の程度に応じて、その収縮性が変化する。このような細胞構成要素レベルの内部構造による力作用を、三次元頂点モデルの幾何学的な構成要素を基準とし、ポテンシャルエネルギー関数として数理モデル化する。この際、頂点の数に依存したアーティファクトな影響を避けるため、細胞形状のみに依存した関数を用いる。

(2a) 実験により得られた三次元画像からの組織形態の抽出

定量的な評価を実現するために、領域分割手法の一種である grabcut を三次元に拡張し、適用することで、観測データに基づいた客観的な組織形状取得を行う。組織内の細胞は数が多く、手動で客観的な検出を行うことが困難である。これに対しては、細胞形状が凸包

であることを利用し、細胞の輪郭からの距離が極大となる点を検出する画像処理を行い、自動で細胞を検出する。

(3a) マウス眼杯形成のイメージングによる多細胞動態の観察

眼杯組織の立体的な形態変化を観察するため、E7.5 から E10.5 の期間におけるマウス胚の眼杯形成過程のイメージングを行う。まず、連続切片の染色により、三次元的な細胞・組織の形態と網膜組織などへの分化状態、および、アクチンミオシンの活性や細胞分裂、アポトーシス等の空間分布を観察する。次に、細胞の力学的な状態を直接的に維持する細胞骨格や細胞接着構造に対して薬理的な摂動を加え、細胞活動や細胞・組織変形への影響を観察する。

(1b) 三次元頂点モデルにおける形態の差異からの力学作用の推定

組織形成の時間スケールは数時間から数日オーダーである。したがって、多くの場合、その変形は、熱力学的に準静的な過程である。そこで、各時刻において、組織内外の内力は釣り合っているものと過程する。この過程の元で、組織形態を表現するネットワーク構造に対して、(1a) で設計したポテンシャルエネルギー関数を適用し、その全体のポテンシャルエネルギー、および、個々の細胞構成要素のポテンシャルエネルギーを計算する。さらに、時系列になった複数のネットワーク構造において、同様のエネルギーを計算し、各エネルギー成分の変化を組織の局所ごとに計算する。これにより、力作用を引き起こす物理パラメータを推定する。

(2b) 組織形態から三次元頂点モデル上のネットワーク構造への変換

三次元頂点モデルでは、個々の細胞が1つの多面体で表現され、組織全体の形態は多面体の頂点とエッジとを結ぶ1つのネットワークで表現される。さらに、このネットワーク上では、1つの頂点に対して必ず4つのエッジが連結するという規則がある。この規則を考慮し、ボクセル型三次元ポロノイ手法を用いて、(2a) において抽出した細胞・組織の形態の情報から、実際の組織を三次元頂点モデルに粗視化したネットワーク構造を作成する。

(3b) 力学的摂動実験によるマウス眼杯の力場観察

我々は、これまでの *in vitro* の研究によって、眼杯組織の応力場の観察に成功している。これに加えて、眼杯組織が外部組織から受ける力学作用を検討するため、眼杯が組織中に埋まった *in vivo* での応力場の観察を試みる。レーザーアブレーションやピンセット等を用いて、組織外部からの力学的な摂動を加え、それに対する眼杯組織の応答を見ることに

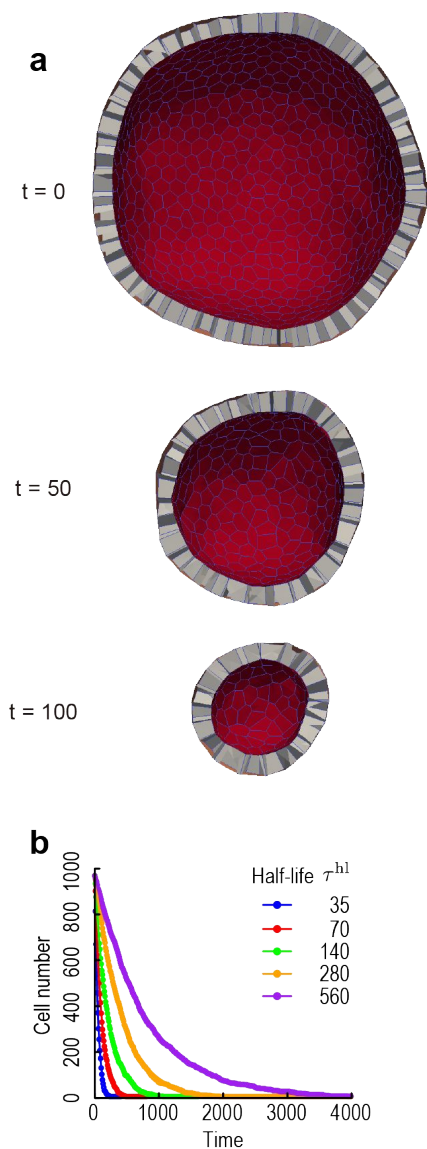


図1 アポトーシスの数理モデルによる多細胞シミュレーション
 a. アポトーシスによる組織変形過程
 b. 細胞数の時間変化

より，外部からの力学作用を観察する．

(4) マウス眼杯の力場推定

実験(3a)により取得した眼杯組織の三次元画像に対して，(2a)により作成した形態抽出手法を適用し，眼杯の細胞・組織の形態を抽出する．また，この形態の情報に対して，(2b)により作成した変換手法を適用し，三次元頂点モデル上のネットワーク情報に変換する．さらに，得られたネットワーク情報に対して，(1a)および(1b)により構築した力学作用の推定手法を適用することにより，眼杯組織における細胞レベルの力場を推定する．これにより，眼杯形成の力学機構を予測する．この推定結果を3b)により測定された力場と比較することにより，推定された力学作用の妥当性を検証する．推定で

きない場合，もしくは，(3b)により観察された力場と矛盾する場合は，(1a)において開発したポテンシャルエネルギー関数を修正し，上記の過程を繰り返す．

4. 研究成果

1) 多細胞組織の形態形成は，能動的なアポトーシスを伴う．そこで，本研究では，アポトーシスによる細胞数の変化や力学作用が及ぼす影響を考慮した形態形成の力学場推定を可能にするため，三次元バーテックスモデルにおけるアポトーシスの数理モデル化を行った．本モデルでは，細胞のアポトーシスを形態的な変化と幾何学的な変化に分けてモデル化した．まず，形態的な変化については，エネルギー関数の時間変化により表現した．さらに，幾何学的な変化については，本数理モデルの元となる三次元頂点モデルにおいて細胞を表現する多面体の融合により表現した．特に，この融合に際して，幾何学ネットワークの変換則に従う工夫を行うことにより，幾何学的な矛盾を生じること無く，連続的な数値解析を実現した．さらに，この数理モデルを用いて，複数の幾何形体を有する多細胞組織のダイナミクスについて，数値シミュレーションを行い，アポトーシスの影響を考慮した力学場推定が可能であることを確かめた(図1)．

2) 昨年度の研究により，アポトーシスによる細胞数の変化や力学作用が及ぼす影響を考慮した形態形成の力学場推定を可能にする，三次元バーテックスモデルを開発した．本年度では，この数理モデルをマウスの眼杯組織の形成過程に適用し，その力学機構の定量的な予測を行った．まず，マウス胚の眼杯組織の三次元形態を観察し，画像処理により，変形量の定量化を行った．次に，原子間力顕微鏡を用いて，眼杯組織を構成する組織局所の弾性率を計測した．さらに，これらの計測データに基づき，開発した数理モデルを適用し，眼杯組織の形成過程の力学シミュレーションを行い，眼杯組織形成過程の再現を行った．ここで，細胞の収縮，伸長，分裂，アポトーシスなど，個々の細胞の力学的な振る舞いを決める力学パラメータを探索することにより，眼杯の形態形成に重要な力学因子を予測し，各過程における組織の応力分布を推定した．

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue
Mototsugu Eiraku, Taiji Adachi,
 Yoshiaki Sasai, Modeling cell

apoptosis for simulating three-dimensional multicellular morphogenesis based on a reversible network reconnection framework, *Biomechanics and modeling in Mechanobiology*, 15, 2016, 805-816 (査読有)

DOI:10.1007/s10237-015-0724-7

Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Three-dimensional vertex model for simulating multicellular morphogenesis, *Biophysics and physicobiology*, 12, 2015, 13-20 (査読有)

DOI:10.2142/biophysico.12.0.13

[学会発表](計6件)

奥田 覚, 永樂元次, 「実器官の多細胞ダイナミクスを解析する汎用三次元パーティックスモデルの開発」, 日本機械学会 第29回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋ウインク愛知, 愛知, 20, Jan., 2017

Satoru Okuda, Mototsugu Eiraku, "Mechanical regulatory mechanism of 3D multicellular dynamics during optic-cup morphogenesis", The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, パシフィコ横浜, Kanagawa, Japan 1, Dec. 2016

Satoru Okuda, Mototsugu Eiraku, "Mechanical regulatory mechanism of 3D multicellular dynamics during epithelial invagination", The 54th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, つくば国際会議場, Ibaraki, Japan 26, Nov. 2016

奥田 覚, 井上康博, 安達泰治, 永樂元次, 「多細胞の三次元組織形成シミュレーションのためのアポトーシスの数理モデル化」, 日本機械学会 第28回バイオエンジニアリング講演会, 東京工業大学, 東京, 9, Jan. 2016

Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Yoshiki Sasai, Mototsugu Eiraku, "Versatile modeling of three-dimensional multicellular morphogenesis: application to apically-convex invagination during optic-cup formation", The 26th CDB meeting: Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization, RIKEN CDB, Hyogo, 8 - 9, Sep. 2015

Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Yoshiki Sasai, Mototsugu Eiraku, "Vertex dynamics simulation of viscosity-dependent deformation during 3D multicellular morphogenesis", International Congress of Biorheology and 8th International Conference on Clinical

Hemorheology, Korea University, Korea, 24 - 28, May. 2015

[図書](計1件)

奥田 覚, 永樂元次, 羊土社, 実験医学, 2015, 4

[産業財産権]

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 覚 (OKUDA Satoru)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号: 80707836

(2) 研究分担者

橋本 敦史 (HASHIMOTO Atsushi)

京都大学・教育学研究科・助教

研究者番号: 80641753

(3) 連携研究者

永樂 元次 (EIRAKU Mototsugu)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー
研究者番号: 40415097

森 俊介 (MORI Shunsuke)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号: 90733147