

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18541

研究課題名(和文)上皮の管径を維持するやわらかな力学機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of a force-dependent mechanism for maintaining radial size of epithelial tubes

研究代表者

平島 剛志(Hirashima, Tsuyoshi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：10620198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体組織のサイズ維持機構の理解を深めるために、マウスの精巣上皮細管の発生過程における力学的側面に注目した。細胞動態の蛍光イメージング定量解析と数理モデリングを中心に用いることで、管径を維持するための協調的な多細胞の振舞いを明らかにすることを目標とした。実験と数理を融合したアプローチにより、細胞が組織内で発生する力を受容し、それに対する応答として能動的な運動を行うことで管サイズが維持されるメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For the understanding of mechanisms for size maintenance of biological tissues, I focused on an aspect of mechanics in mouse epididymal tubules during developmental process. I aimed at clarifying collective multicellular behaviors for maintaining diameter of epididymal tubules by using quantitative fluorescence imaging and mathematical modeling. The integrated approach revealed a mechanism of the size maintenance that constitutive cells within the tubules receive mechanical forces and respond by active cellular movement.

研究分野：発生生物学

キーワード：サイズ維持 上皮管 形態形成 数理モデル イメージング 器官形成 精巣上皮

### 1. 研究開始当初の背景

生体内の臓器形態形成において、関連する遺伝子群の実体は、分子生物・発生工学の発展とともにリストアップされてきているが、その力学機構は未だ不明な点が多い。特に、組織のサイズが力学的にどのように制御されているかについては、ほとんど分かっていない。申請者は、臓器を構成する組織の基本形態である管組織に焦点を当て、この問題解決に適したマウスの精巣上体の発生現象を研究題材とする。

マウスの精巣上体細管は、胎生15日目を起点に頭側から順序よく折れたたまり、ダイナミックな形態変化を見せるにも関わらず、その管径は一定に保たれている。管の折れたたみ変形を引き起こすためには、分裂による細胞数の増加が軸方向への力に変換されることが要請される。つまり、精巣上体細管の形態形成現象には、かたちの変化を支える管径サイズの維持機構が内在していると考えられる。

予備的な実験観察により、生体組織の力学を考える上で重要な因子である活性化ミオシン（リン酸化ミオシン）が、管アピカル側に局在していることが分かっていた。また、ミオシン収縮の阻害剤を加えた上で器官培養を行ったところ、頭側の精巣上体細管が異常に太くなる事実を発見していた。さらに、精巣上体細管における分裂細胞と活性化ミオシンの分布を測定したところ、管の細胞分裂が頻繁に起こっている頭側の領域で、リン酸化ミオシンがより多く発現していることが示された。

アピカル面に局在した活性化ミオシンの存在は、細胞が自発的に力を生成して運動をする傍証である。また、細胞分裂による管内で発生する力の大きさと、細胞が生み出す力が正の相関を持つということは、組織内部で発生する力の大きさや方向を周囲の細胞が感知した上で、それに応じた力の生成を調整するフィードバック機構の存在を示唆する。組織内部での応力発生源となる細胞分裂に対し、周囲の細胞群はどのような協調的な振舞いをすれば、管の太さを維持することができるだろうか、という疑点を有して研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究では、イメージングによる詳細な観察と形態異常を引き起こす摂動実験、それらの定量データを基に構築された数理モデルによる解析を通して、周囲の力学環境に適応的に振る舞う多細胞力学システムの存在可能性を明らかにすることを目標とする。生体組織のサイズ維持機構を明らかにするため、マウスの精巣上体細管の発生過程における力学的側面に注目する。細胞動態の静的・動的な定量解析と数理モデリングを中心に用いて、管径を維持するための協調的な多細胞間の振舞いを明示ことを目標とする。実験解析

と定量的な測定による確かな前提のもとで理論検証を行い、検証実験に結びつける提言を行う。また、本研究を通して、実験と数理の融合アプローチの有効性を幅広い分野に示す波及効果を期待する。

### 3. 研究の方法

(1) イメージングデータに画像・統計処理を施し、多細胞動態因子を定量化する。また、それをルーティーンに行う手法の枠組みを作る。これにより、精巣上体細管のサイズ維持に寄与する、分子や細胞動態の相関を求め、特徴的な運動（例えば、方向性を持った多細胞運動など）を抽出する。

(2) 管径に形態異常が生じるものと正常なものにおいて、細胞動態因子を定量比較することで、管径維持に寄与する細胞レベルでの要因を特定する。

(3) 上記2つの課題で得た測定データを基に、数理モデルを構築し解析する。生体組織の力学システムとしての論理構造を理論的に明らかにすることを目標に据え、本申請課題後に続く実験検証に有用な予測を行う。

### 4. 研究成果

平成27年度には、生体組織のサイズ維持機構を明らかにするため、マウスの精巣上体細管を実験材料として用い、(1) 組織深部における細胞集団運動のライブイメージング、(2) 細胞集団運動の定量、(3) 数理モデル構築、の3点を主に行った。

上皮の管径を維持するやわらかな力学機構の解明に向けて、組織深部における管上皮のライブイメージングを行った。マウス胎仔の精巣上体細管は、組織表面から100um以上深部に位置しているため、二光子顕微鏡を用いてタイムラプス画像を取得した。その結果、分裂細胞に隣接している細胞集団が、分裂方向に応じて異なる挙動を示すことがわかった。すなわち、管円周方向に沿った細胞分裂に対しては、細胞集団が相対的に配置換えを起こす一方で、長軸方向に沿った細胞分裂に対しては細胞集団の相対的な配置換えは起きない。取得時系列画像における細胞の相対的な配置換えを評価するために、先行研究で提案された手法を用いて、細胞の再配列運動を定量した。その結果、観察事実を定量的に示すデータを得ることができた。

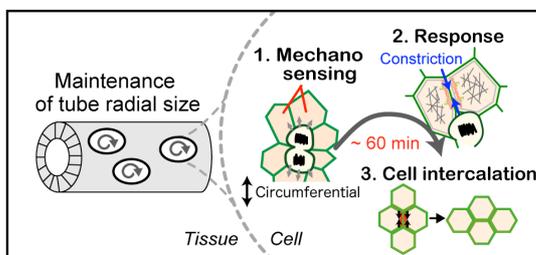
これらの定量データをもとに、多細胞上皮組織の動態を表す数理モデルを構築した。細胞のアピカル面を多角形とみなし、頂点のダイナミクス運動を表すバーテクスダイナミクスモデルを用いた。モデル解析の結果、組織内部における細胞分裂が及ぼす組織内細胞張力の時空間分布や、組織形態に対する細胞の再配列の影響を評価することができた。

平成28年度には、生体組織のサイズ維持機構を明らかにするため、マウスの精巣上体細管を実験材料として用い、(1) ライブイメージングデータの細胞動態の定量、(2)  $\square$  ミオシンリン酸化程度の定量、(3) 数理モデルの発展の3点を主に行った。

管上皮のライブイメージング画像から細胞の再配列運動を定量化することを目的とし、先行研究で提案された手法に基づく定量化法を考案した。測定の結果、管円周方向に沿った細胞分裂に対しては、細胞集団が相対的に配置換えを起こす一方で、長軸方向に沿った細胞分裂に対しては細胞集団の相対的な配置換えが起きにくいこと、また、分裂後60分程度で再配列が起きやすいことがわかった。さらに、再配列を引き起こすための力を生み出すミオシン軽鎖のリン酸化程度を定量化するために、ウェスタンブロット解析を行った。これらの測定手法を組み合わせ、管を異方的に圧縮した場合の、リン酸化応答を測定した。その結果、特定の方向に沿った圧縮に対してのみ、精巣上体の細胞がリン酸化を引き起こすことがわかった。

平成29年度には、細胞個々の動態を定量的に組み込むことができる数理モデルの構築を行い、シミュレーション結果と実験データを照らし合わせることで、管径維持に必要な多細胞動態機構を提言することを目的とした。多細胞の形態形成を表現するコンピュータシミュレーションの枠組みの一つとして、まず、バーテクスダイナミクスモデルを用いた。

前年度までに得ていた実験データをもとに、管の大きさや細胞の挙動をシミュレーションに組み入れ、現象の再現を行なった。また、精巣上体細管で起こる細胞集団の配置換えを引き起こす仕組みについて、細胞が隣接細胞からの力を受けて能動的に動くシナリオをモデルとして表現し、シミュレーションを行ったところ、観察事実に合致する結果を得た。これにより、マウスの精巣上体細管の発生過程における上皮管の管径維持を説明する機構を提言することができた(下図)。



内容は論文として取りまとめ投稿した(bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/172916>)。また、別の多細胞コンピュータシミュレーションモデルであるセルラーポッツモデルを用いた上皮管のモデリングも行い、それに関する総説を国際誌にて発表した。

## 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 4 件)

① Tsuyoshi Hirashima, Miho Hoshuyama, and Taiji Adachi (2017)

In vitro tubulogenesis of Madin-Darby canine kidney (MDCK) spheroids occurs depending on constituent cell number and scaffold gel concentration. *Journal of Theoretical Biology*, 435, pp110-115.

② Tsuyoshi Hirashima, Elisabeth G. Rens, and Roeland M.H. Merks (2017)

(Review) Cellular Potts Modeling of Complex Multicellular Behaviors in Tissue Morphogenesis. *Development, Growth & Differentiation*, 59, pp329-339.

③ Tsuyoshi Hirashima (2016)

Mathematical Study on Robust Tissue Pattern Formation in Growing Epididymal Tubule. *Journal of Theoretical Biology*, 407, pp71-80.

④ Tsuyoshi Hirashima and Taiji Adachi (2015)

Procedures for the Quantification of Whole-Tissue Immunofluorescence Images Obtained at Single-Cell Resolution During Murine Tubular Organ Development. *PLOS ONE*, 10(8): e0135343.

[学会発表] (計 9 件)

① Tsuyoshi Hirashima and Taiji Adachi

On Dynamic Cellular Behaviors Realizing Homeostatic Radial Size in Developing Epithelial Tubule,

EMBL symposium - Physics of Cells and Tissues,

short talk (selected), Heidelberg, Germany, Oct 1, 2015.

② Tsuyoshi Hirashima and Taiji Adachi

Adaptive Multicellular Behaviors as Mechanoresponse for Radial Size Maintenance of Epithelial Tube

18th International Congress of Developmental Biology. Singapore University, Singapore, June 18-22, 2017.

PS. 1.64

③ Tsuyoshi Hirashima and Taiji Adachi

Adaptive Multicellular Dynamics via Directional Mechanosensing for Homeostatic Radial Size of Proliferating Tube

Mechanobiology from molecules to tissues - theory and applications. Quy Nhon,

Vietnam, June 26-Jul 2, 2016.

④ Tsuyoshi Hirashima and Taiji Adachi  
Adaptive Cellular Behavior for  
Homeostatic Radial Size in Proliferating  
Tube,  
RIKEN CDB Symposium 2016- Size in  
Development, P14-A, Kobe, Japan, March  
28-30, 2016.

⑤ Tsuyoshi Hirashima and Taiji Adachi  
Adaptive Cellular Behaviors Realizing  
Homeostatic Radial Size in Developing  
Epithelial Tubule  
Commemorative Symposium for the 31st  
International Prize for Biology. xx, Kyoto  
International Conference Center, Japan.  
Dec. 05, 2015.

⑥ Tsuyoshi Hirashima and Taiji Adachi  
Cellular Surface Dynamics of Biological  
Tube for Homeostatic Radial Size.  
iCeMS International Symposium -  
Hierarchical Dynamics in Soft Materials  
and Biological Matter.  
P24, Kyoto University, Japan.  
Sep. 24, 2015.

⑦ 平島剛志、安達泰治  
増殖する上皮管の径サイズ恒常維持に働く  
適応的な多細胞動態システムについて 第  
68回日本細胞生物学会・日本ケミカルバイオ  
ロジー学会第11回年回合同大会 京都テ  
ルサ S13-6 2016年6月16日

⑧ 平島剛志  
伸びてねじれる精巣上体細管のかたち作り  
(招待講演)  
第79回形の科学会シンポジウム「生物にみ  
られるねじれ構造」  
千葉工業大学、2015年6月13日

⑨ 平島剛志、安達泰治  
Anisotropic Cellular Mechanoresponse  
Maintains the Radial Size of Developing  
Epididymal Tubules  
第55回日本生物物理学会 2J1355 熊本大学  
黒髪北地区 2017年9月19日～21日

[図書] (計 4 件)

① 平島剛志 (2017)  
精巣上体細管の形態形成を支える力学原理  
と細胞力学応答システム. 生物物理 (総説),  
333(57-5), pp244-248.

② 平島剛志、松田道行 (2017)  
ライブイメージングに基づくシミュレーシ  
ョン解析. 実験医学 (増刊号 わかる・でき  
る 生命科学の数理モデルとシミュレーシ

ョン), 35(5), pp134-138.

③ 平島剛志、安達泰治 (2016)  
細胞間で働く力の受容と細胞応答による生  
体組織中の力の制御. 実験医学 (増刊号 再  
生医療と疾患解明の鍵となる組織幹細胞),  
34(17), pp 40-45.

④ 平島剛志 (2016)  
上皮管組織の異方的な成長を支える協調的  
な多細胞動態と力学. 生体の科学 (特集 細  
胞の社会学: 細胞間で繰り広げられる協調  
と競争), 67(2), pp168-172.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
<https://sites.google.com/site/tsuyoshihirashima/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平島剛志 (HIRASHIMA, Tsuyoshi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号: 10620198