

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01413

研究課題名(和文) 制御-計測-情報の高度融合による組織形成場におけるダイナミクス解析

研究課題名(英文) Dynamic culture environmental analysis during tissue formation by control-sensing-information system platform

研究代表者

萩原 将也 (Hagiwara, Masaya)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・理研白眉研究チームリーダー

研究者番号：00705056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題においては、*in vitro*の培養環境を微細加工を始めとする工学技術で制御した状態で長期に渡り細胞動態のデータを取得し、数理モデルに還元することで多細胞集団が特定パターンを形成する過程で場に働くダイナミクスの解析を行った。細胞が細胞外マトリックス内を移動する際には、ECMから抵抗力を受けており、この抵抗力は細胞の活動によりダイナミックにリモデリングされ、細胞が存在しやすい場を自ら作り上げていることを明らかにした。さらに人為的にECMを局所的に制御することで、細胞の移動方向を誘導可能であることを示し、三次元組織パターン形成においても場を支配することで制御できる可能性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、微細加工や光ピンセットといった多くの工学技術を活用することで、細胞の周囲環境を人為的に制御・計測する手法を確立、細胞行動の原理の一端を明らかにした。制御技術を確立することで、ランダムに見えた細胞行動モジュールが存在していることが顕著になり、計測された細胞行動のデータは情報処理技術により数式に還元し、細胞行がどのようなルールに従い移動方向を決定しているの数式に落とし込むことができた。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have analysed how the spatio-temporally remodelled extracellular matrix (ECM) alters the resistance force exerted on cells so that the cells can expand their territory. Multiple microfabrication techniques, optical tweezers, as well as mathematical models were employed to prove the simultaneous construction and breakage of ECM during cellular movement, and to show that this modification of the surrounding environment can guide cellular movement. Furthermore, by artificially remodelling the microenvironment, we showed that the directionality of collective cell migration, as well as the three dimensional branch pattern formation of lung epithelial cells, can be controlled. The results thus confirm that active remodelling of cellular microenvironment modulates the physical forces exerted on cells by the ECM, which contributes to the directionality of collective cell migration and consequently, pattern formation.

研究分野：バイオエンジニアリング

キーワード：培養環境制御 パターン形成 細胞行動 ECMリモデリング

1. 研究開始当初の背景

生体組織の形成においては、各細胞は周囲の環境から化学的・力学的相互作用を受けながら各組織に応じた固有のパターンを自律的に形成する。この発達メカニズムに関しては過去 100 年以上におよぶ分子生物学の発展に伴い、何の遺伝子がどういった役割を果たしているのか明らかになりつつある。一方で、遺伝子発現の結果として発生する分子濃度勾配変化や集団内応力分布変化といった、場に働くダイナミクスについては、その計測の困難さから驚くほど研究が進んでいない。組織形成過程において、各細胞は逐次変化する場からの情報を取得することで自身の位置情報を取得し、全体として協調して成長方向を決定していると考えられていることから、場に働くダイナミクスを解析することは組織形成システムを理解する上で必要不可欠である。この解析手法の不足は現在急速に研究が進んでいる体外組織再生の分野においてもボトルネックとなっており、有効な手段の確立が急務である。

そこで化学相互作用や力学相互作用を反応拡散モデル (T. Miura, *J. Biochem.*, 2015) や vertex モデル (S. Okuda et al., *Biomech. Model Mechnobiol.*, 2013.) を用いて数理モデル化することにより、形態形成における現象の解明を行う研究が進められている。しかし従来の実験系はそのほとんどが細胞動態計測にレーザーを要し、モデルを検証することができる長期間観測可能かつ再現性の高い実験・計測系が不足している。結果として数多くの未知パラメータを検証することが出来ないため、化学相互作用、力学相互作用のどちらか一方のみから表現したモデルが複数存在しその応用が限定されている。

2. 研究の目的

我々は近年、気管支上皮細胞が二次元においても分岐状のパターン形成を行える実験系を確立した (M. Hagiwara, *Integr. Biol.*, 2016)。培養を二次元に限定することにより、レーザーを用いることなく集団形成と細胞動態を長期計測可能である。そこで本研究課題では、細胞間に働く力学相互作用や細胞-細胞外基質間の相互作用の動的変化といった、従来直接計測が困難であった細胞行動および集団形成に影響を及ぼす場に働くダイナミクスを、制御・計測・情報技術を高度に融合することにより計測・解析することを目的とする。

3. 研究の方法

フォトリソグラフィにより作成したマイクロモールドを用いて、PDMS に幾何学パターンを有する薄膜を作製し、これをマスクとして細胞をディッシュ上にパターンニングを行うことができる。本手法を用いて、気管支上皮細胞をパターンニングすることで、初期条件を厳密に揃えた状態で再現性の高い細胞行動データを取得可能になる。さらに今回、細胞のパターンニングとともに周囲の ECM パターンを同時に制御する手法を構築した。作製した PDMS 薄膜の片面に FN を塗布したのちに、ディッシュに転写させることで、PDMS 薄膜状に FN のコーティングができ、PDMS の開口部の形状に沿った細胞のパターンニングが可能となった (図 1)。このように細胞の遺伝子を改変することなく場に摂動を与え、得られる細胞行動データの差異を解析することで、細胞が従っているルールを明らかにする。

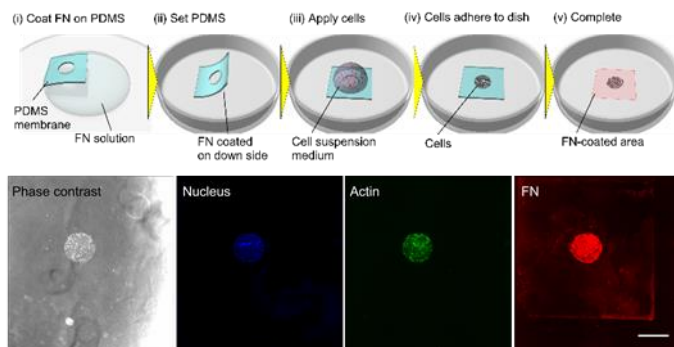


図 1. 細胞・FN 同時パターンニング

4. 研究成果

まず気管支上皮細胞 (NHBE) を三角形に配置し、細胞が頂点の一端に凝集した段階で固定しフィブロネクチン (FN) 染色を行うと、既に細胞が存在していない領域にも FN が残っていることが確認できた。このことから、NHBE 細胞が一度存在した場所には FN の足跡を残していることが確認できた (図 2 A)。次に、上記細胞と FN のパターンニングを行い、細胞集団付近に予め人為的に FN をパターンニングした状態で細胞のトラッキングを行うと、個々の細胞は FN の領域から外に出ず、境界まで近づくとき

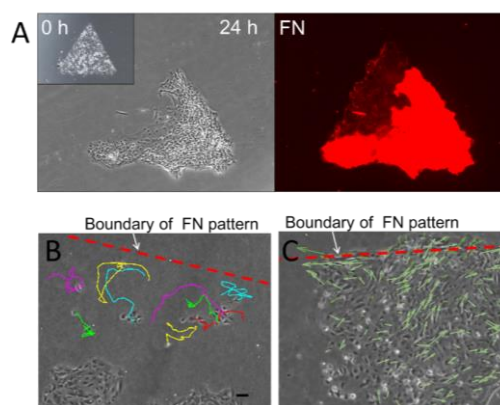


図 2. FN 領域による細胞行動

をすることが明らかになった。一方、細胞集団で FN の境界に近づいた場合は、細胞は周囲の他の細胞に押し出され FN の領域を超え、細胞自身が FN を新たに場に残して FN の領域を自ら広げていることが確認できた。このことから、NHBE 細胞は、基本的に FN の存在範囲内に留まろうとするものの、何らかの要因で外に出ると FN の範囲を自ら広げて領域を拡大していることが見て取れる。

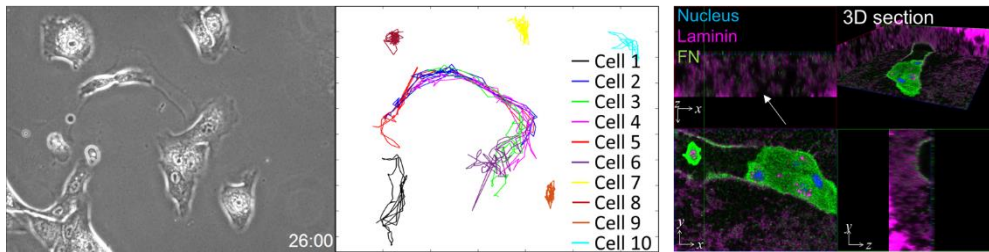


図 3. 周囲 ECM と細胞の相互作用による細胞行動

次に、細胞と周囲 ECM との間でどのような相互作用が働いているのか確認するため、NHBE 細胞の上にマトリゲルを被膜し、細胞のタイムラプス計測を行った。初めのうちはその場からほとんど動けなかった細胞は、徐々に行動範囲を広げ 24 時間ほどすると細胞が通った箇所には跡が残り、他の細胞がそのパスを追随していることが確認できた。このパスを三次元イメージングで可視化すると、細胞がマトリゲルの中を通った部位に明らかなトンネルができていたことが確認できた (図 3)。光ピンセットを用いて同様にマトリゲルのなかで $10\mu\text{m}$ ビーズを駆動させてみると、細胞同様、初めのうちはゲル内の抵抗が強く動かすことができないのに対し、何度も往復運動を繰り返すことで徐々にゲルからの抵抗が下がり、駆動可能範囲が大きくなっていくことが確認できた。このことから、細胞は周囲の ECM により行動を抑制されているものの、移動・増殖を繰り返す中で周囲の抵抗値が徐々に下がり行動範囲を広げ、抵抗が低い領域を好んで行動することが明らかになった。

上記細胞-ECM 間における相互作用のダイナミクス (①ECM から抵抗を受けて行動を制限されている、②細胞は ECM を時間とともに分解し抵抗を弱めている) を、これまで知られている細胞-細胞間相互作用、化学走性、細胞極性ととも数値モデルに当てはめ、細胞行動のシミュレーションを行ったところ、*in vitro* における実験結果と同等の動きを確認することができた (図 4)。

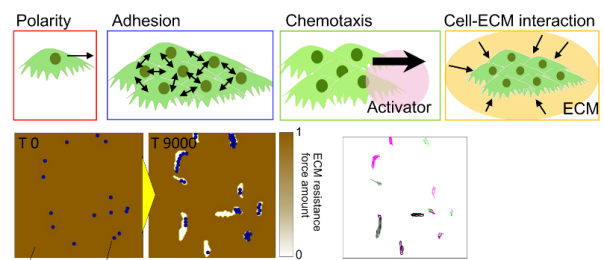


図 4. 数値モデルシミュレーション

次に、上記数値モデルを用いたシミュレーションの高精度化を行うため、集団内における細胞行動のデータ取りを行った。NHBE 細胞を図 5 のように三角形に配列した状態から培養を始めると、細胞は必ず頂点方向へと移動する一方で、三角形の外へと出るわけではなく頂点付近で凝集し、中心に細胞が存在しない空間が発生した。その後三角形を再び構成しながら、高い確率で初期三角形の頂点付近から外へと集団形成していく挙動を示した。一見特異的に見えるこの細胞行動は、三角形に細胞を配置して実験を何度繰り返しても同様の挙動を示した。このように再現性の高い行動は、得られるデータの SN 比が非常に高いことと同義である。得られた細胞行動のデータから初期形状に応じた動きの特徴を定量化するため、三角形の中心が空く過程と三角形を再構築する過程で特徴量抽出を行なった。集団内における細胞の相対位置と細胞の移動方向関係性を表すために、三角形の重心と自身の位置を結ぶベクトルと、細胞の速度ベクトルの成す角を θ_0 とする (図 6A)。これを細胞の速度と共に細胞トラッキングの生データから計算してプロットを行った結果が図 6B, C になる。培養初期の頂点方向に向かう段階では、 θ_0 が 0 に近い値を多くの細胞が示し、重心位置から一直線に離れていく様子がデータとして表すことが出来る。一方、細胞が三角形を再構築する際には、細胞の移動方向に指向性は見えず、また速度も全体的に遅くなっていることから頂点付近に押し込まれた細胞が、お互いの反発力から徐々に戻っていく様子が見て取れる。

以上のように、我々が直感的に認知し行っている判断は生データだけでは表すことができないことが多いが、影響を及ぼす要因を絞りデータの切り口を変更することで、データ

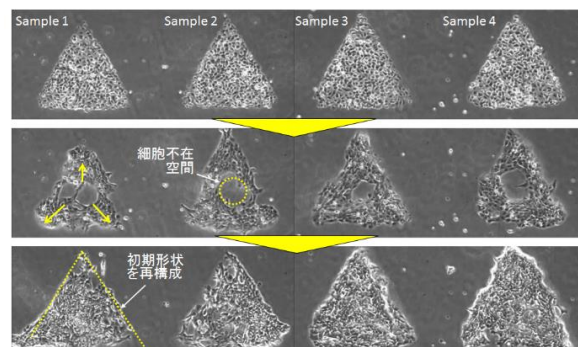


図 5. 集団初期制御による細胞行動

の傾向を表現し特徴を定量的に表すことができようになる。一方, 図 6 のデータは細胞集団を三角形に配置するという制御下における実験であるため, 集団の重心を既知情報として利用することが可能であり, その後のデータ処理が効率よく行なうことが出来た。

二次元と同様に三次元培養においても, 細胞の初期配置によって形成されるパターンの再現性が大幅に向上することが確認できた。マトリゲル内の一箇所に気管支上皮細胞を高密度に配置することで, 上皮細胞は分岐パターンを形成する。しかしそのパターン(分岐長さや方向)は同じ人間が同じ細胞・タイミングで行っても大きく異なってしまふ。そこで培養開始時に三次元空間における細胞集団を厳密に制御して三次元培養を行った。微細加工技術を用いて作成した微小の型を先ほどの培養 Cube 内に充填したゲルに挿入した状態でゲルを硬化させ, 型を引き抜くことでゲル内に形状の空隙を作成することが出来た。この空隙に細胞を詰め込むことにより, 細胞集団の初期配置を厳密に制御することが可能となった(図 7)。円柱状に気管支上皮細胞集団を配置して培養を行うと, ほとんどの分岐が円柱の軸から 90 度方向へと同じ太さ・長さで成長した。実験を何度行っても同様の結果が得られ, 集団パターン形成のバラつきを大幅に抑えることが確認できた。さらに培養 Cube を用いて多面からイメージングを行い, 各分岐形状を定量的に計測すると, 明らかに実験毎の形成分岐パターンのバラつきが小さくなったことが分かる(図 7C)。このように 2 次元・3 次元関わらず, 培養時における細胞集団の配置は細胞行動および集団形成に大きく関わっており, 毎回同じ条件から始めることにより実験データのバラつきを大幅に抑えることが出来ることから重要である。

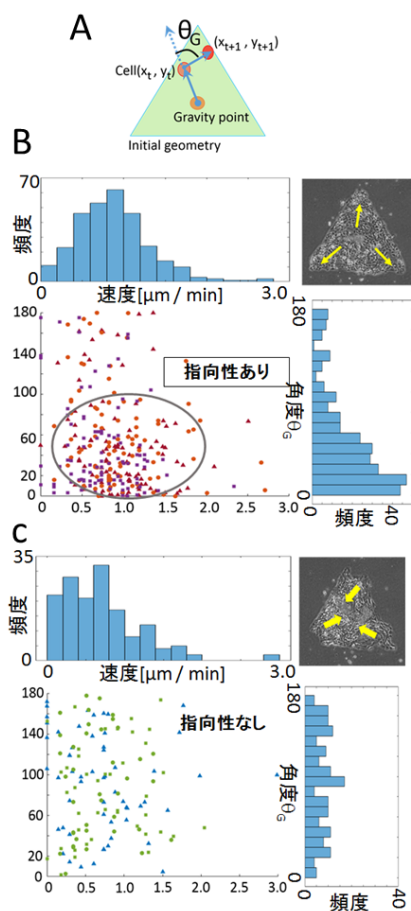


図 6. 特徴量抽出によるデータ解析

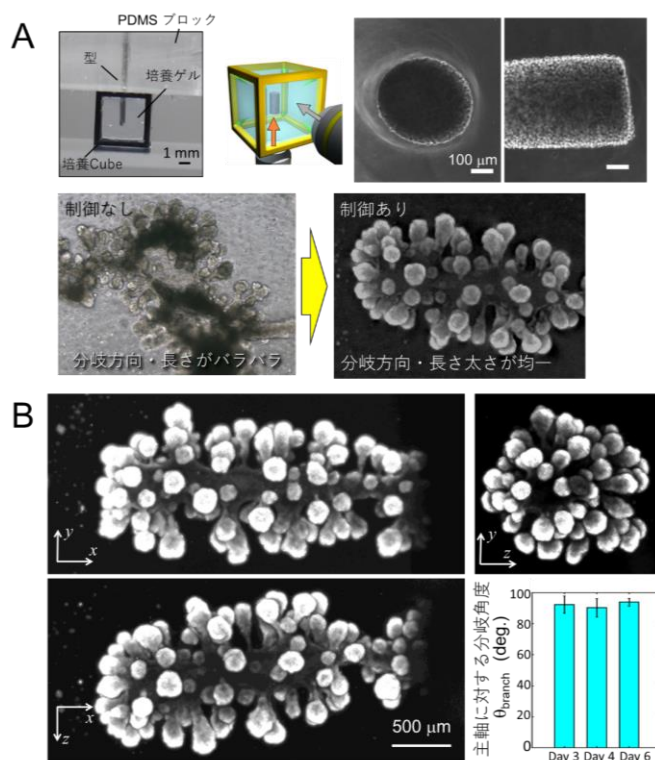


図 7. 三次元初期制御による分岐パターン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hagiwara Masaya, Maruyama Hisataka, Akiyama Masakazu, Koh Isabel, Arai Fumihito	4. 巻 1
2. 論文標題 Physical Interaction of Cells with ECM Weakens the Resistance Force and Regulates the Directionality of Collective Cell Migration and Pattern Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 SSRN Electronic Journal	6. 最初と最後の頁 1-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2139/ssrn.3782003	査読の有無 無
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 Hagiwara Masaya, Koh Isabel	4. 巻 62
2. 論文標題 Engineering approaches to control and design the in vitro environment towards the reconstruction of organs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 158-166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12647	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 HAGIWARA Masaya	4. 巻 60
2. 論文標題 System Analysis of Multi-cellular Organization by Incorporating Control-sensing-information Technologies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 019 ~ 024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.60.019	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 Hagiwara Masaya, Nobata Rina, Kawahara Tomohiro	4. 巻 145
2. 論文標題 Initial 3D Cell Cluster Control in a Hybrid Gel Cube Device for Repeatable Pattern Formations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/59214	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 Masaya Hagiwara, Ikuhiko Nakase	4. 巻 507
2. 論文標題 Epidermal growth factor induced macropinocytosis directs branch formation of lung epithelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 297-303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.028	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 Hagiwara Masaya, Nobata Rina, Kawahara Tomohiro	4. 巻 10
2. 論文標題 High repeatability from 3D experimental platform for quantitative analysis of cellular branch pattern formations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Integrative Biology	6. 最初と最後の頁 306 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8IB00032H	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 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masaya Hagiwara, Isabel Koh, Atsushi Takano
2. 発表標題 Integrative 3D culture platform to control and sensing microenvironment to elucidate the system during tissue development
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (WS「分子生物学を越えた形作りの基本原理」) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masaya Hagiwara, Isabel Koh, Atsushi Takano
2. 発表標題 Integrative platform to control and sensing microenvironment for organoid formations
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposium: Organoids: Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋原将也、Koh Isabel、高野温
2. 発表標題 三次元細胞動態計測 制御が可能なオルガノイド培養プラットフォーム
3. 学会等名 化学とマイクロナノシステム学会第42回発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asuka Yamaguchi, Masakazu Akiyama, Ikuhiko Nakase and Masaya Hagiwara
2. 発表標題 IN VITRO-IN SILICO INTERFACE PLATFORM: BRIDGING THE GAP BETWEEN EXPERIMENT AND THEORY BY INFORMATION SYSTEM TO ELUCIDATE CELLULAR BEHAVIOR SYSTEM
3. 学会等名 The Twenty Third International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋原将也、丸本萌、丸山央峰、森英樹、新井史人
2. 発表標題 細胞外環境リモデリングが支配する細胞行動の時空間解析
3. 学会等名 第37回化学とマイクロナノシステム学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Moegi Marumoto, Masaya Hagiwara
2. 発表標題 System analysis of cellular behavior with machine learning during collective cell migration
3. 学会等名 第56回生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaya Hagiwara, Moegi Marumoto, Hisataka Maruyama, Fumihtio Arai
2. 発表標題 patio-temporal remodeling of microenvironment regulates the directionality of collective cell migration for tissue development and maintenance
3. 学会等名 第56回生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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