

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22387

研究課題名（和文）関数論による逆問題的アプローチに基づく細胞配向構造の設計理論の構築

研究課題名（英文）A Design Method for Cell Alignment Using Complex Function Theory

研究代表者

宮廻 裕樹（Miyazako, Hiroki）

東京大学・大学院情報理工学系研究科・助教

研究者番号：40881206

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、所望の細胞配向構造を再現性良く実現するための細胞パターン形状の設計手法を構築した。具体的には、細胞の配向現象を複素関数論により定式化し、細胞集団内に不可避免的に生じる位相欠陥を考慮した細胞集団の配向構造の数値計算法を構築した。さらに、位相欠陥の位置ゆらぎを抑え、所望の配向構造を再現性よく実現するための細胞パターンの形状設計法を提案した。数値実験および細胞培養実験の結果から、提案手法による計算法の有効性が実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞シートなどの細胞から生体組織を再構成する組織工学の技術が広く応用されるには、作成された細胞組織の構造の再現性を担保する必要がある。しかしながら、これまでの研究は実験者の試行錯誤による構造設計が主なアプローチであった。本研究で得られた細胞の配向構造の計算法や培養領域の設計法は、細胞の培養基板の形状の最適設計などのような実験者の試行錯誤に頼らない理論保証された細胞組織の設計につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study proposed a design method for cell patterns to achieve reproducible fabrication of cell alignment. To this end, we introduced a complex potential to describe the cell alignment. Then, we derived a formula for cell alignment considering topological defects, at which the alignment angle cannot be defined. In addition, we proposed a design method for geometries of cell culture substrates to suppress stochastic fluctuations of defects. The validity of the proposed methods was confirmed by numerical and cell culture experiments.

研究分野：設計工学

キーワード：細胞集団 位相欠陥 ソフトマター 組織工学 関数論 逆問題

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幹細胞技術や微細加工技術、バイオプリンティング技術の発展により、細胞シートや人工臓器などの生体組織工学が確立されつつあり、これらの技術は移植治療や創薬の分野における基盤技術になると期待されている。細胞シートや人工臓器の作成技術が広く応用されるには、作成された細胞組織の構造の再現性を担保する必要がある。しかしながら、閉領域内に培養された細胞集団には位相欠陥とよばれる細胞の配向角度が定義できない特異点が不可避免的に生じることが近年明らかになってきている。さらに、細胞集団内の位相欠陥において、細胞が突出・凝集するなどの特異的な振る舞いを示すことが明らかとなっている。このような位相欠陥まわりでの特異的な細胞の振る舞いは、細胞組織の均質性を乱す要因となり得る。したがって、再現性の高い細胞組織の構築のためには、細胞組織に生じる位相欠陥の位置を予測・制御する必要がある。

しかしながら、先行研究(G. Duclos *et al.*, *Nature Physics*, 13,58 (2017))では単純な円領域における配向角度しか計算されておらず、申請者らの先行研究においても探索的な欠陥生成位置予測法しか提案されていない。すなわち、細胞組織の形状が与えられたときの効率的な配向構造の計算法は未だ確立されていない。また、所望の配向構造を実現するように細胞組織の形状を逆推定する問題は先行研究では提起されておらず、解法も確立していない問題がある。

2. 研究の目的

本研究は、所望の細胞配向構造を再現性良く実現するための細胞パターン形状の設計手法を構築することを目的とする。そのために、細胞の配向現象を複素関数論により定式化し、細胞集団内に不可避免的に生じる位相欠陥を考慮した細胞集団の配向構造の数値計算法(順問題解法)を構築する。この順問題の解法をもとに、所望の配向構造を実現するための細胞パターンの形状設計法(逆問題解法)の構築を行う。さらに、設計した形状を持つ細胞パターンを実際に作成し、培養することによって提案手法の有効性を実験的に検証する。

3. 研究の方法

(1) 細胞配向構造の物理モデル化と複素関数論による問題の定式化

細胞を液晶分子とモデル化することで、液晶の配向角度に関する支配方程式がソフトマター物理学の理論より得られる。このことに基づき、細胞の配向角度が従う支配方程式の解を複素関数によって表現した。

(2) 位相欠陥を考慮した細胞配向構造の効率的な数値計算法の構築

2次元平面上に存在する細胞について、配向の位相欠陥がどの位置で生成されるかを推定する効率的な計算法を構築する。そのために細胞集団全体が持つ弾性エネルギーと欠陥の位置との間の依存性を調べ、エネルギーを極小化することで欠陥の生成位置を推定するアルゴリズムを構築した。

(3) 所望の細胞配向構造を実現するための形状設計法の構築

(2)の順問題の解法をもとに、所望の配向構造を実現するためにどのようなパターン形状を作るのが最適かを設計する逆問題解析法を構築した。特に、位相欠陥の確率ゆらぎに着目し、欠陥の位置のゆらぎが小さくなるようなパターン形状を設計する手法を検討した。

(4) 細胞培養実験による提案手法の妥当性の検証

提案手法(2)および(3)の妥当性を検証するため、細胞を特定の閉領域内で培養したときの細胞の配向角度を計測し、計算との比較や再現性を評価した。マウス筋芽細胞(C2C12)を高さ40 μm の凹凸を持つPDMS構造上に播種し、凹凸の境界に沿って細胞を配向させた。細胞培養後の細胞の顕微鏡画像から画像解析によって位相欠陥の位置を測定し、理論解との比較を行った。

4. 研究成果

(1) 位相欠陥を考慮した細胞配向構造の効率的な数値計算法の構築

単位円板上での細胞配向構造の陽公式の導出

はじめに、単位円板上に細胞が存在し、円周に沿って細胞が配向するという境界条件の下での細胞の配向角度の陽公式を導出した。具体的には、単位円板内に配置した位相欠陥による複素ポテンシャルと、鏡像の位置に配置した位相欠陥による複素ポテンシャルの和によって細胞の配向角度が記述できることを示した。導出した公式は、位相欠陥の位置や個数についての仮定が不要である一般的な公式となっている長所がある。

2次元単連結領域上での細胞配向構造の陽公式の導出

で導出した単位円板上における細胞の配向角度の公式を2次元単連結領域の場合に拡張した。そのために、複素関数論におけるリーマンの写像定理によって単位円板から2次元単連結領

域への等角写像が存在することや、数値的に等角写像が構成できることに着目した。の単位円板上での陽公式と数値等角写像を組み合わせることによって、2次元単連結領域において細胞が領域の境界に沿って配向するという境界条件の下での細胞の配向角度の公式を導出することができた。また、多角形の頂点のような特異性を持つ領域に対しても同様に計算できることを示した。導出した陽公式は、位相欠陥の位置および領域の境界形状を表す等角写像を陽に含むという特徴があり、後述する位相欠陥の生成位置の推定や形状の設計の理論構築において重要である。

弾性エネルギー極小化による位相欠陥の生成位置の推定

で導出した陽公式と複素関数論におけるグリーンの公式によって、2次元領域上における細胞の弾性エネルギーを計算することができる。この弾性エネルギーは、位相欠陥の位置によって変化する。したがって、弾性エネルギーが極小となるような位置に位相欠陥が生成されると予想される。そこで、弾性エネルギーを欠陥の位置について直接微分をとり、最急降下法によって弾性エネルギーを極小化する計算アルゴリズムを提案した。

数値実験による提案手法の検証

で提案した計算手法の妥当性を示すための数値実験を行い、配向角度の計算や弾性エネルギーを極小化する欠陥の位置推定が正しく行えていることを確認した。特に、位相欠陥が複数個存在する場合で弾性エネルギーの極小化を行った場合、2個の欠陥対が対消滅する場合もあることを確認した。また、領域の形状によっては弾性エネルギーを極小化する欠陥の生成位置の候補が複数あり得ることも確認することができた。

(2) 所望の細胞配向構造を実現するための形状設計法の構築

(1) の弾性エネルギーの極小化により、欠陥の生成位置が数値的に予測可能となった。しかし実際の細胞は分裂や遊走をするため、実験的には欠陥の位置が確率的にゆらぎ、その結果として配向構造も最安定な構造からゆらいでしまう。そのため、欠陥の位置の確率的なゆらぎを定量化し、なるべく欠陥の位置のゆらぎを小さくするような領域を設計することにより再現性の高い細胞の配向構造が生成されると考えられる。

そこで、(1)で得られた細胞の配向構造の計算方法を拡張し、位相欠陥の位置の確率的なゆらぎを考慮した確率モデルの提案を行った。具体的には、細胞の位相欠陥は(1)で計算される弾性エネルギーから計算される力とランダム力の2つの力を受けると仮定し、位相欠陥が従うラグランジュ方程式を立式した。そしてラグランジュ方程式から、位相欠陥の位置がしたがう平衡分布を導出した。位相欠陥の平衡分布はマルコフ連鎖モンテカルロ法(MCMC)によって数値計算することができ、さらに実験データからランジュバン方程式におけるランダム力の温度パラメータを逆推定できることも示した。実際に、様々な形状に対する位相欠陥の平衡分布をMCMCによって計算した結果、形状の対称性が崩れると、位相欠陥が最頻値のまわりで局在化する傾向が見られた。したがって、細胞の培養領域の形状と欠陥の位置のゆらぎの大きさとの間の依存関係が定量的に評価でき、どのような形状が最適か設計できるようになった。提案した設計法は、再現性の高い細胞組織を実現するための培養基板の設計指針につながると考えられる。

(3) 細胞培養実験による実験検証

(1),(2)で提案した数値計算法の妥当性を検証するため、数値実験で使用した領域と同様の形状を持つPDMS構造体を作成し、その構造体上で細胞を培養した。画像処理によって位相欠陥の位置を計測した結果、位相欠陥は(1)で予測された位置のまわりに局在化して分布する傾向が見られ、(1)の計算方法の妥当性が実証された。また、等角写像 $f(z) = z + \alpha z^3$ ($0 < \alpha < 1/3$)で表される領域における細胞の位相欠陥の分布を計測した結果、 α を増加させて対称性を崩すと位相欠陥の生成位置がより局在化する傾向が見られ、(2)の計算方法の妥当性が示された。(2)で提案した方法によって実験データから温度パラメータを推定した結果、温度パラメータは形状の変化に対しては大きく変化しないことが分かった。この結果は、実験的に計測された位相欠陥の位置の確率ゆらぎの局在性は、温度パラメータではなく領域の形状に依存していることを示唆している。したがって、領域の形状を設計することで細胞の位相欠陥の位置や配向構造のゆらぎを抑えるという本研究のアプローチが有効であることが理論と実験の両面から実証されたと考えられる。

本研究では、2次元領域における細胞の配向構造や位相欠陥の位置の計算法と位相欠陥の位置の確率ゆらぎを抑える領域の設計法を提案した。これらの結果は、細胞の培養基板の形状の最適設計など、実験者の試行錯誤に頼らない理論保証された細胞組織の設計につながると考えられる。今後の課題として、曲面上や3次元構造中の細胞の配向構造の計算への拡張を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hiroki Miyazako, Takaaki Nara	4. 巻 9
2. 論文標題 Explicit calculation method for cell alignment in non-circular geometries	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 211663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsos.211663	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土山晃平, 宮廻裕樹, 奈良高明
2. 発表標題 トポロジカル欠陥の空間分布に基づく細胞の配向設計法
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮廻裕樹, 佐藤弘之, 奈良高明
2. 発表標題 特異点をもつ 2次元領域における細胞配向とトポロジカル欠陥
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮廻裕樹, 奈良高明
2. 発表標題 函数論に基づく細胞配向の数値計算法と実験検証
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮廻裕樹
2. 発表標題 函数論に基づく細胞配向場の計算論
3. 学会等名 One-day workshop on Applied and Computational Complex Analysis (ACCA2021)
4. 発表年 2021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