

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657145

研究課題名(和文)細胞と組織の関係を明らかにする新規数理モデルの開発

研究課題名(英文)Models for connecting mechanics at cell and tissue scales

研究代表者

石原 秀至 (ISHIHARA, SHUJI)

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号：10401217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：個体発生中に起こる組織の変形の背後にある力学過程について、その理解は進んでいません。大きな要因として、組織中の力の直接測定が難しい事があげられます。我々自身が開発してきた細胞形態からの力推定法について、レーザー切断実験との比較による実験検証、手法間の比較を行い、推定手法が妥当である事を確かめました。その手法をショウジョウバエの幾つかの上皮系に適用し、それぞれの組織に特有の発生様式(速さなど)とその背後にある細胞の機械的特性の違いを明らかにしています。

研究成果の概要(英文)：Because of difficulty in directly measuring forces working in growing tissues, how mechanical forces are regulated for achieving deformation of animal body in their morphogenesis is still not well understood. We have developed a theoretical method for inferring the forces from shape of cells. We verified the accuracy and robustness of the method by performing comparison of our method with laser-ablation experiments, and also comparison among other inference methods. By applying our method to Drosophila epithelial tissues, we compared how mechanical features of cells in respective tissues can result in distinct and characteristic behaviors of the tissues.

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：「生物科学」、「発生生物学」

キーワード：発用力学 統計学

1. 研究開始当初の背景

(1) 個体発生における組織の変形などを力学的視点から解析する研究は、その重要性にも関わらず立ち後れている。その一つの要因として、組織内の力の直接計測ができないことにある。我々はこれまで、細胞形態からその力の釣り合いを考え、かつ、逆問題をベイズ統計スキームで定式化する事で組織内部の力を推定する理論的手法の構築を進めていた。

(2) ショウジョウバエ *Drosophila Melanogaster* の体軸伸張期の初期胚や、成長期の翅、背板等の上皮系は、個々の細胞内でおこる分子活性、各細胞の動きと組織全体の変形のつながりが見えることから、個体発生の変形を解析する系としてよく用いられている。成長中の翅では、遠近軸にそった組織の伸張にともない、細胞の配置替えによって八ニカム構造が形成される事 (hexagonal cell packing) が知られていた (Classen et al., *Dev Cell*, 2005)。この hexagonal cell packing を駆動する力学的メカニズムについてはわかっていなかった。また、上で述べた系は、それぞれ特徴的な発生進行速度や細胞の組み換えの異方性を持つが、その背後にある細胞の特性の違いについては定性的な議論しかなかった。

(3) バイオメカニクス分野では、多くの場合組織を連続弾性体として取り扱う。発生を考える場合、変形が弾性(細胞変形)のみならず細胞の配置替えによっておこり、かつ変形自身を駆動する細胞内分子活性を取り扱うため、細胞の形態自由度や化学場の自由度取り入れた数理モデルが望ましいが、そのようなモデルスキームは存在していなかった。

2. 研究の目的

(1) 我々自身が開発してきた、ベイズ統計スキームに基づいた細胞形態からの力推定手法に対して、その正確性やエラーへの頑健性を評価し、実験等との比較を行うことでその推定手法の妥当性を確かめる。また、細胞膜の曲率を取り入れた細胞推定手法を開発する。

(2) ショウジョウバエの翅について、hexagonal cell packing がどのような力学的制御の元に起こっているのかを明らかにする。また、幾つかの組織に関して、その発生中におこる細胞組み換えの異方性や速度と、力場の関係を比較する事で、ここの特徴的な発生様式が細胞のどのような違いから出てくるのかを定量する。

(3) 細胞の形態変化自由度を取り入れた組織

の物性を表す連続体方程式を開発する。また、細胞レベルの特長付け(個々の細胞の圧力や細胞膜の張力)との整合性を調べる。

3. 研究の方法

(1) 従来、上皮系細胞膜に働く張力の評価法として、レーザー切断による応答速度からの見積もる方法があった(この方法は局所的・侵襲的である)。ショウジョウバエ翅の幾つかの発生ステージで、杉村がこの実験を行う。同じサンプルで、レーザー照射直前のデータから力推定を行い、比較を行う。同時期に提案された推定手法 (Chiou et al, *PLoS Comp Biol*, 2012) を含めたいくつかのあり得る近似的手法を、数値実験から得られたデータに適用し、それぞれがどの程度真値と近いかを評価することで、比較する。フランスキュリー研グループが、ショウジョウバエ背板にドーナツ上に穴をあけ (annular ablation) その応答をみることで組織のストレスの異方性を見積もった (Bonnet et al., *J Roy Soc Int*, 2012)。共同研究として、同じデータに対して我々の手法を用いてストレステンソルを見積もり、互いの手法が整合的な結果を示すかどうか調べる。細胞膜の曲率を考慮することで、より精度の高い推定手法の開発を行う。

(2) 発生中の翅においては、細胞分裂が一段落した後、細胞の配置替えによって組織の変形がおこる。この発生ステージで、細胞配置替えを駆動する力場の評価を力推定手法を用いて行い、力学的視点から細胞が六角構造になる制御メカニズムを探る。データから推測されるメカニズムについて、Cell Vertex Model を用いて数値シミュレーションを行うことで確認を行う。また、幾つかの組織に関し、その発生中におこる細胞組み換えの異方性や速度が、細胞のどのような力学的性質によって起こるのか、力推定手法と細胞の幾何学的・運動学的特徴を行う事で関連づけ、組織間での比較を行う。

(3) 細胞の形態を特徴付ける量として、texture tensor が Graner らによって提案されていた (Graner et al., *Eur Phys J E*, 2007)。この texture tensor を変数自由度として取り込んだ連続体力学方程式の構築を行う。

4. 研究成果

(1) ベイズに基づいた組織内の力推定手法では、細胞の形態をポリゴンで近似し、個々の細胞の圧力や細胞膜上の張力を推定する (Ishihara and Sugimura, *J Theor Biol* 2012)。発生中のショウジョウバエの翅に対し、3つの

ステージでこの手法を適用するとともに、レーザー照射により細胞膜の主張な張力源であるアクチンケーブルを切断した後の変位の速度を見積もった。この二つで評価した張力の値は高い相関を示し、推定手法が妥当な値を与えている事を支持する結果が得られた(図1)。これらの結果は、Ishihara and Sugimura(*J Theor Biol*, 2012)および Sugimura and Ishihara (*Development*, 2013)に掲載された。

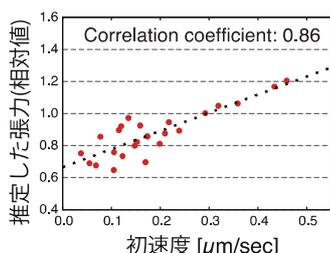


図1 レーザー切断後の膜変化の初速度と推定した値の推定値。ショウジョウバエ蛹期での測定。

我々が開発した力推定手法では、推定手法として力の釣り合いから出発し、それにベイズのフレームワークを適用する。同様に力の釣り合いから出発するものの、その後の定式化の理論的フレームワークや仮定の違いで、幾つかの近似/類似手法が存在しう。例えば同時期に他グループから提案された手法(Chiou et al, *PLoS Comp Biol*, 2012)では、細胞の圧力が一定という強い仮定がおかれていた。そこで、これらの異なる手法をとりあげ、それぞれの精度を比較した。比較する手法として Ishihara and Sugimura (*J Theor Biol*, 2012)で提案したベイズ的手法(STP)、圧力一定と仮定した手法(ST)、張力一定とした手法(SP)を取り上げた。

検証用のデータとして、以下の四つのデータを用意した。まず、セル構造をもつ泡の数値計算データ(曲率あり)、Cell Vertex Modelから得た数値実験データ。数値実験データでは真値が得られる事から、推定手法の直接比較が可能である。次に、*in vivo* データとしてショウジョウバエ翅と背板上皮を用いた。

まず、数値計算データで手法を比較した所、泡のデータでは SP が最も良く、STP はほぼ同等な性能を示し、ST が最も悪かった。泡の場合、張力が一定なので SP の採用している仮定が正しく、SP がもっとも良くなる事は予想された。Cell Vertex Model から得られたデータの場合には、STP がもっともよく、ST では推定精度は悪かった(図2左)。SP は比較的真値に近い値を推定したものの、STP より精度が劣った。圧力一定を仮定する ST の場合、エラーの要因として、データ画像にパッチ上の構造が現れることが見出された。これは STP では推定の正則化項が取り入れられ

ているのに対して、ST ではそれに対応する項がなく、長波長エラーが載りやすい事に起因すると考えられる(図2右)。

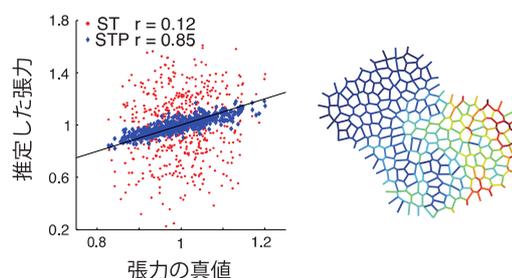


図2(左)ST と STP による Cell Vertex Data の張力推定と真値の比較。(右)ST に現れるパッチ構造。

翅、背板の実データに適用した所、それぞれの手法は、数値データと同様な傾向を示した。例えば SP の圧力値と STP の圧力値は近い。また、ST では上で述べたようなパッチ構造を示し、推定値全体のバラツキも STP と比べてずっと大きい。この事は、実データにおいても ST の精度は悪い事を示唆する。これらの結果は Ishihara et al. (*Eur Phys J E*, 2013)に掲載された(同ジャーナルのカバーページに選ばれた図3右)。

推定手法の、データ取得や処理に対する頑健性を調べるため、データにわざとノイズを加えたり、細胞膜の同定にエラーを入れたりして推定を行った。エラーに対して推定値はほとんど変わらないこと、大きなエラーに対してもそれは局所的な影響しか及ぼさない事を確認した(Ishihara and Sugimura, *J Theor Biol*, 2012)。また、数分間隔でとったデータにこれらの推定手法を適用した。発生時間に比べ短い時間では、細胞の圧力や細胞膜張力に大きな変化はないと期待されるので、実際の処理に避けられないエラーに対する推定手法の頑健性を確かめることに相当する。STP, SP, ST の手法を試した所、頑健性の点からも STP がもっとも滑らかな時間変動を示し、妥当な結果を与えていると期待されることが示された(Sugimura et al. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2012)。

以上の結果から、比較した手法の中では、我々が Ishihara and Sugimura(*J Theor Biol*, 2012)で提案した手法が正確性や頑健性の点からも最も優れている事を示した。

フランスキュリー研のグループが報告した、ショウジョウバエ背板での annular ablation 実験からの組織に働く力の異方性を見積もり(Bonnet et al., *J Roy Soc Int*, 2012)に対して、我々の手法との比較を行った。彼ら得たデータを解析し、細胞の圧力/張力の推定を実行した後、それらを Bachelor 式に代

入することで組織に働く張力を推定する。異方性の指標として、法線応力差(の2分の1) $\Delta\sigma = (\sigma_{yy} - \sigma_{xx})/2$ をとり、annular ablation 実験とベイズによる力推定手法での評価を比較した。それぞれの手法で評価した $\Delta\sigma$ は高い相関を示し、それぞれの手法のクロスバリデーションとなる結果を得た(図3)。結果は Ishihara et al., *Eur Phys J E*, 2013 に掲載された。

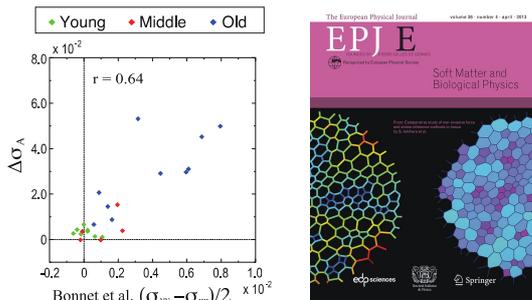


図3 (左) Annular ablation とベイズ推定法で見積もった応力異方性 (右) ジャーナル表紙に選ばれた。

これまでの手法では、細胞の形態をポリゴンとして扱ってきた。そこでは、細胞膜は直線として扱われてきたが、実際には曲率を持っている組織が多々ある。細胞膜の曲率と、細胞膜を介して隣り合う細胞の圧力差、膜の張力の間には Laplace の釣り合い方程式があることを考慮すれば、曲率から細胞中の力に対する質的に新しい情報を得ることができることを示せる。この定式化を行い、人工データに対して適用した。デジタル画像からの曲率評価が一般に難しく、推定精度が悪い事がわかった。大きな倍率で、細胞数が少ない時には妥当な結果が得られるが、細胞が多数になった時に起こるエラーを制御できず、現在、その点を改良している最中である。定式化として、画像から評価した曲率を真値とは見なさず、曲率自体を含め推定する定式化を行っている。このとき、方程式が非線形になることから、数値的に実用的なアルゴリズムの実装も含め定式化を行っている。

(2) ショウジョウバエ翅の形成過程で細胞の組み換えが起こり、hexagonal cell packing が進むステージで、力の推定を行った。その結果、この時期で翅は遠近軸方向に沿った強い異方性を示す事が示唆された。レーザー切断実験(ローカルな切断、グローバルな切除)もこの異方性を示唆した。分子的にも、張力を出す因子ミオシンの分布を見ると、遠近軸方向に向いた細胞膜の方が強いシグナルが観察される。これらの異方性を特徴付けるために、検定量を定義し、ブートストラップを行う事で定量的にも異方性があること、また、

ステージ毎に異方性が変わる事を確認した。初期ステージ(多く細胞分裂が観察される)では系は等方的で、その細胞配置替えが進む時期に異方的になる。ステージ 21-23 hr after puparium formation(APF)で異方性が最大になり、その後徐々に減って行く。力学的異方性については、先行研究から翅の付け根 hinge が収縮を起こし、それが翅を遠近軸に引っばっているという報告(Aigouy et al., *Cell*, 2010) と整合的である。

細胞の hexagonal cell packing はどのようなメカニズムですすむのであろうか?我々はこの異方的な力学条件下のもとで、力の釣り合いを満たすために細胞の六角化が促進するとの仮説を立てていたが、実際に hinge から切り離れた組織では異方性が減少し、六角細胞も少なくなる事、cell vertex model で異方的な力学条件で六角格子が進む事を確認した。また、対立モデルとして張力パラメータが角度依存する数値シミュレーションを行った所、実験結果とは定性的に異なる結果が得られることをみた。この事から、異方的な力学条件が細胞配置の促進を促す要因となっていると結論した。これらの結果を Sugimura and Ishihara (*Development*, 2013)で報告した。

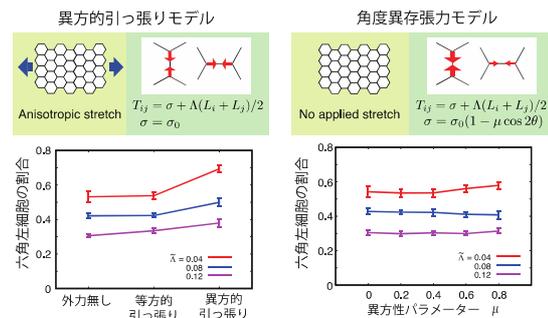


図4 (左) 異方的な力学環境を考慮したモデルとそのシミュレーション結果 (右) 張力が角度依存するモデルとそのシミュレーション結果

ショウジョウバエの幾つかの上皮組織を比較した。初期の体軸伸張期胚、翅、背板について、前者2つの組織は異方的な細胞組み換えを起こすが、背板は組み換えも少なく、異方性は小さい。初期胚の発生は早く(~30min)翅はより遅い(~8時間)。この違いを見るために、それぞれの組織について力の推定をおこない、張力が各辺の長さや角度にどのような依存性を示すかを調べた。さらにこの違いを反映する数値計算を行う事で組織間の発生様式の違いの理解を理解する(進行中)。

(3)連続体の構築に関しては、フランスのグループがモデルを提唱し、当初の研究予定の変更を余儀なくされた(論文改訂中;改訂中の原稿についてはコメントを求められている)。現在、彼らと連携をとり、細胞レベルの測定と力推定、そしてそれらが連続体方程式とどう結びつくのか(例えばパラメータの値がどう決まるかなど)、それを検証するための実験とそのデータ解析ツール、数理モデルの開発などを進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

K. Sugimura and S. Ishihara, The mechanical anisotropy in a tissue promotes ordering in hexagonal cell packing, *Development*, 査読有, 140, 2013, pp. 4091-4101

DOI: 10.1242/dev.094060

K. Sugimura, et al., Robustness of force and stress inference in an epithelial tissue, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, 査読有, 2013 年号, 2013, pp. 2712-2715

DOI: 10.1109/EMBC.2013.6610100

石原秀至, 杉村薫, 細胞のかたちから推定する“力”の場～生き物の形づくりをベイズ統計で解き明かす, *実験医学* 31, 査読なし, 2013, pp. 1232-1238

S. Ishihara, et al., Comparative study of non-invasive force and stress inference in tissue *Eur. Phys. J. E*, 査読有, 36, 2013, 45

DOI: 10.1140/epje/i2013-13045-8

H. Sano, et al., The *Drosophila* actin regulator ENABLED regulates cell shape and orientation during gonad morphogenesis, *PLoS One*, 査読有, 7, 2012, e52649

S. Ishihara and K. Sugimura, Bayesian inference of force dynamics during morphogenesis, *Journal of Theoretical Biology*, 査読有, 313, 2012, pp. 201-211

DOI: 10.1016/j.jtbi.2012.08.017.

[学会発表](計 11 件)

S. Ishihara and K. Sugimura, Bayesian inference of forces in epithelial tissues. Workshop on Mechanics and Growth of Tissues: Development and Cancer 2014/1/13 ~ 1/16 Curie 研究所 (パリ, フランス)

S. Ishihara and K. Sugimura, Bayesian inference of force dynamics during morphogenesis. Seminar at Paris 7 (招待講演) 2013/9/4 パリ第7大学(パリ, フランス)

石原秀至, 杉村薫 形態形成の力学制御 京都駅前セミナー(招待講演)2013/5/17 京都キャンパスプラザ(京都市下京区)

石原秀至, 杉村薫 Mechanical control of hexagonal cell packing in *Drosophila* wing. 東大物性研セミナー(招待講演) 2013/5/14 東京大学物性研(千葉県柏市)

石原秀至, 杉村薫 細胞の六角格子化を駆動する力学的な制御. 第 85 回日本生化学会(招待講演) 2012/12/14~12/16 福岡国際会議場(福岡)

S. Ishihara and K. Sugimura. Estimating the Dynamics of Forces During Morphogenesis. 第 50 回日本生物物理学会 2012/9/22~9/24 名古屋大学(名古屋)

S. Ishihara and K. Sugimura. Mechanical control of hexagonal packing in the growing *Drosophila* wing. EMBO Conference Series Morphogenesis and Dynamics of Multicellular Systems 2012/9/7~9/9 EMBL-Heidelberg (ドイツ, ハイデルベルグ)

S. Ishihara and K. Sugimura. Mechanical control of cell rearrangements for the developing animal forms. RIKEN QBIC セミナー(招待講演) 2012/7/4 理研 QBIC (大阪)

石原秀至 変形する組織の物理特性のシステム解析. 多細胞動態の力学的制御とそのモデル化(招待講演) 2012/6/26~6/27 RIKEN CDB (神戸)

S. Ishihara and K. Sugimura. Mechanical control of cell rearrangements in the developing animal forms. 京都大学理学部先端研究拠点セミナー(招待講演) 2012/5/25 京都大学(京都)

S. Ishihara and K. Sugimura. Estimating Dynamics of Forces during Morphogenesis. 京都大学医学部セミナー(招待講演) 2012/4/18 京都大学(京都)

[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]

フランスキュリー研究所 Y. Bellaïche, パリ第7大学 F. Graner らのグループとの共同研究に発展し、また、2014年5月には組織の力測定や推定の国際ワークショップをパリ第7大学で開く(杉村, F. Graner がオーガナイザーメンバー)、国際連携としても活発な活動を行

っている。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 秀至 (ISHIHARA, Shuji)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号: 10401217

(2) 研究分担者

杉村 薫 (SUGIMURA, Kaoru)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点

(iCeMS)・助教

研究者番号: 50466033