

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25702025

研究課題名(和文)細胞間相互作用に着目した組織形成の解析

研究課題名(英文)Simulation on tissue formation through intercellular interaction

研究代表者

井上 康博(Inoue, Yasuhiro)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：80442929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,600,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、形態形成において細胞間に働く力をシグナル入力とするメカノフィードバック機構の役割の解明を目指した。実験との定量的な比較による検証を重ね、細胞・組織レベルにおいては、細胞間接着のメカノフィードバック機構を考慮した多細胞ダイナミクス、および、分子レベルにおいては、力による分子間結合親和性の変調を表す数理モデルをそれぞれ構築した。これらの数理モデルにより、メカノフィードバックは、細胞レベルの力作用の集積した結果として生じる組織の大域的な形状を、再び、細胞レベルのローカルな安定形状にフィードバックすることによって、平滑な組織形状を力学的に安定に実現する役割を果たしている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on a mechano-feedback at an intercellular adhesion machinery. At cellular-to-tissue level, we constructed a mathematical model expressing the feedback, and performed simulations on a growing spheroid-like tissue. These simulations revealed that continuous modifications through mechano-feedback are necessary for maintaining a smooth apical surface. At molecular level, we constructed a physical model for explaining actin-based mechano-sensing that is one of necessary components at the mechano-feedback. The model captured the qualitative and quantitative responses of actin-binding proteins to the forces, as observed experimentally. We theoretically suggested that actin-binding proteins can show different kinetic responses even to the same mechanical signal (tension).

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：細胞間相互作用 メカノフィードバック メカノセンシング 数理モデル 形態形成

1. 研究開始当初の背景

発生期の上皮組織の形態形成においては、細胞レベルのローカルな力発生から、組織レベルの形態変化が協調的に生じる。形態形成は、主に遺伝子発現で決まる細胞活動によって制御されていると考えられているが、果たして、ダイナミックに次から次へと生じる組織変形を予め決められた遺伝子発現のみで予定調和のように導くことができるのだろうか。細胞内の確率的な分子運動、遺伝子発現に対し、器官形成の高い再現性は、進化的に洗練されており、また、細胞が発生する力の集積が組織の変形を生むことを考えると、発生の各段階において、組織形状から逐次的に細胞の力発生を制御するフィードバック機構(メカノフィードバック)が存在すると期待される。そのようなメカノフィードバック機構を担う接着分子に関して、構造生物学、細胞生物学の観点から知見の蓄積が進む一方で、具体的にどのような力学刺激が入力となり、分子的なシグナルにフィードバックされるのか、また、組織レベルの形態形成において、メカノフィードバックは、どのような役割を果たしているのかについては解明されていない重要課題であった。

2. 研究の目的

細胞・組織スケール、分子スケールの各階層において、それぞれ、メカノフィードバックによる細胞活動の変調に関する数理モデル、力学刺激から分子的シグナルへの変換に関する数理モデルを構築し、形態形成におけるメカノフィードバックの役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

上皮組織の細胞間接着構造を構成するタンパク質には、力感受の分子機構があり、培養細胞を用いたシスト形成実験によって、張力感受性の有無がシスト形状に球形度の違いをもたらすことが示されている。そこで、本研究では、細胞・組織スケールのメカノフィードバックに着目し、まず、頂端収縮の制御には、隣接する細胞集団から細胞形状を制御入力としたフィードバックが存在する、と作業仮説を立て、頂端収縮調整の数理モデルを構築する。次に、本数理モデルを用いた多細胞力学シミュレーションを行い、シスト形成実験との比較による数理モデルの検証を行う。

分子スケールにおいては、細胞間接着装置に力伝達をし、さらには、力発生の場となるアクチン細胞骨格系に着目し、物理法則に基づく数理モデルを用いて、力学刺激が分子シグナルに変換される仕組みの1つを示す。

4. 研究成果

(1) まず、細胞・組織スケールの研究を進める上で必須となる数理的基盤を確立した。これまでに開発してきた多細胞ダイナミク

スを表す3Dバーテックスモデルの適用範囲を、エネルギー関数の時間発展を含む系へと拡張し、細胞の能動的な活動を表現できる数理モデルへと改良した。これにより、細胞間接着タンパク質複合体の張力感受性を、能動的なエネルギー変化として考慮することができるようになり、メカノフィードバックのある多細胞系の形態変化のシミュレーションが可能となった。

そこで、作業仮説にもとづき、メカノフィードバックとして、ローカルな力のバランスの結果として決まる周囲細胞の頂端周長が、頂端収縮力の変化にフィードバックされる時間発展式を導出した。実験との定量的比較による数理モデルの評価を行うため、*in vitro* のシスト形成実験により得られた組織形状を楕円形近似により定量化し、シミュレーション結果との比較を行った。結果、数理モデルは、メカノフィードバックの有無による形状変化の定性的な傾向を捉えられることが確認された。さらに、より定量的な再現を目指し、エネルギー関数の改良を行った。結果、メカノフィードバックによって発生する収縮力そのものばらつきを考慮することが重要であることが示唆された。

次に、改良を施した新しい数理モデルを用いて、組織形成シミュレーションを行い、メカノフィードバックの形態形成における役割を検討した。メカノフィードバックのあるコントロールモデルでは、メカノフィードバックを介した隣接細胞間との逐次的な収縮力の調整によって、安定な細胞形状が組織サイズに整合するよう1つに定まり、平滑な組織形状が維持された。一方、メカノフィードバックの調整感度に関するパラメータを次第に鈍化させたところ、細胞間のローカルな力の釣り合いから生じる細胞形状が、必ずしも組織サイズとは整合しない感度域となり、組織形状の乱れとともに様々な細胞形状が生じた(図1)。

組織形状の乱れの原因は、主に2つあると考えられた。1つ目は細胞増殖によって、組織に弾性エネルギーが蓄えられ、面外変形が生じやすい状態にあること、2つ目は、シストの頂端面が外側に凸であることにより、力学的な不安定性が存在することである。これ

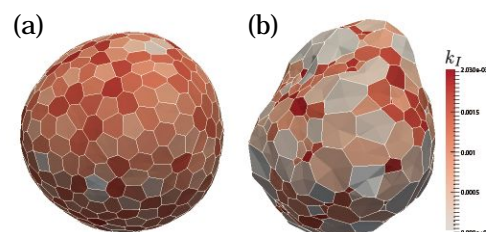


図1 3Dバーテックスモデルによるシスト形成モデル (a)コントロール、(b)メカノフィードバック欠失型

らのいずれもが、メカノフィードバックによる頂端収縮調整により、細胞形状が均一化することを介して、解消されたと考えられた(図2)。

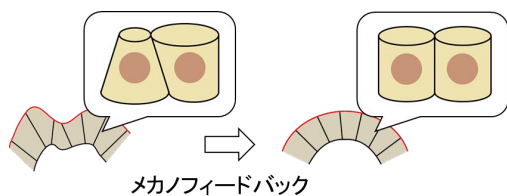


図2 メカノフィードバックにより、細胞形状は均一化され、組織形状の乱れが抑えられる

メカノフィードバックの役割の検討をさらに進めるため、細胞形状を定量的に評価する臨界充填パラメータ(CPP)を導入し、細胞形状に関する自由エネルギーを解析した。これにより、組織内において、どのような細胞形状が実現されやすいかを定量的に理解することが可能となる。自由エネルギーを解析した結果、メカノフィードバックを欠失した変異型では、細胞形状は2つの安定状態を有した二状態系となることがわかった。安定状態の1つは、球殻形状とは整合しない頂端側に細い細胞形状であり、組織形状の乱れの原因となることが確認された。メカノフィードバックを有するコントロールモデル(野生型)では、メカノフィードバックにより、頂端収縮に起因する二状態系が解消されるとともに、球殻形状の幾何学的条件に適合する細胞形状が唯一の安定状態となることがわかった(図3)。

このことから、メカノフィードバックは、細胞レベルのローカルな力作用の集積した結果として生じる組織の大域的な形状を、再び、細胞レベルのローカルな安定形状にフィードバックすることによって、平滑な組織形状を力学的に安定に実現する役割を果たしている可能性が明らかとなった。

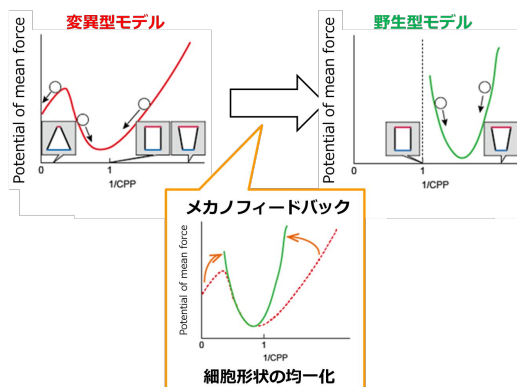


図3 メカノフィードバックの役割

(2) 分子スケールにおいて、メカノフィードバックに必須の要素の1つである力伝達および力発生場となるアクチンフィラメントには、メカノセンサーとしての機能があることが実験的に示唆されており、力学刺激の感知と分子的なシグナルへの変換を担う機構の1つと考えられている。しかしながら、その物理的なメカニズムについては未解明のままであった。そこで、本課題では、物理学の基本法則の1つであるエネルギー保存則を起点に、メカノセンサー機構の根幹をなす分子間結合・解離の力依存性を考察することにより、力学刺激が分子シグナルに変換される仕組みの1つを明らかにした。

分子間結合・解離の化学平衡は、化学ポテンシャルによって表される。結合・解離を伴う熱力学的な系のエネルギー保存則は、熱、仕事、結合・解離による化学ポテンシャルの収支に対して成立する。このエネルギー保存則とギブズの自由エネルギーにおける示量性から、示強変数である温度、応力、化学ポテンシャルの間には数学的に厳密に満たさなければならない方程式を導出することができる(Gibbs-Duhem 方程式)。

細胞には、温度恒常性があるため、結合・解離の状態変化の前後において、温度は変化しないと仮定することにより、Gibbs-Duhem 方程式から、次式を導くことができる。

$$v d\sigma + d\mu = 0$$

この方程式は、応力 σ と化学ポテンシャル μ が変化するときには、必ず成立しなければならない拘束条件式であり、力学刺激が分子シグナルに変換される仕組みの1つを数学的に表現している。

本式を解析的に解くことにより、アクチン結合タンパク質とアクチンフィラメントとの化学平衡は、アクチンフィラメントの力学的な変形を表す“ひずみ”の関数として記述できることが理論的に明らかとなった。これにより、アクチンフィラメントに対する引張、曲げ、ねじりの力学的な変形が、アクチン結合タンパク質の親和性をどのように変調するかを数式によって予測することが可能となった(図4)。

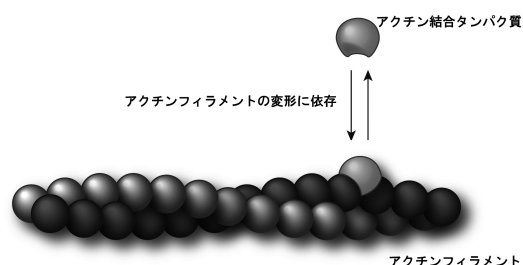


図4 分子レベルのメカノセンシング

そこで、実験と定量的な比較を行うために、分子レベルの本理論式から、マクロレベルの予測式を導出するための検討を行った。細胞内のアクチンフィラメントが示すゆらぎの統計性をもとに、理論の粗視化を行うことができることがわかり、実際の実験が行われる空間・時間スケールの現象に対する予測式を得ることに成功した。

既に実験報告のあった曲がりを有するアクチンフィラメントとフィラメント分岐因子 Arp2/3 の結合親和性の測定結果および張力作用下のアクチンフィラメントに対するアクチン切断因子コフィリンの結合親和性の測定結果と、本課題で導出した予測式を定量的に比較したところ、測定結果と予測式は非常に良く一致することが確認できた。これにより、アクチンフィラメントに作用する力が、分子シグナルに変換される機構の1つを数理物理学の観点から明らかにすることに成功した。

さらに、本理論から得られる新たな知見として、アクチンフィラメントに作用する張力によって、アクチン結合タンパク質の結合親和性が増大するタンパク質群と低下するタンパク質群が存在し、これら2群を分ける重要な因子は、結合領域の体積と幅で代表される幾何学的なサイズであることが予想された。分子レベルの情報が、どのように階層を超えて、細胞レベルに影響を及ぼすかを理解するための重要な指針を与えるものである。また、細胞生物学の観点からは、“張力”という同一の力学シグナル入力に対して、異なる分子シグナルの変化を出力可能であることを意味し、張力に対する多様な細胞応答の根幹を担っていることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)すべて査読有

Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Mechanosensitive kinetic preference of actin-binding protein to actin filament, *Physical Review E*, Vol. 93, 2016, pp. 042403-1-1,

<http://journals.aps.org/pre/abstract/10.1103/PhysRevE.93.042403>

Yasuhiro Inoue, Takeji Deji, Taiji Adachi, Brownian dynamics simulation study on force-velocity relation in actin-based membrane protrusion, Vol. 2, 2015, pp. 329-337,

<http://link.springer.com/article/10.1007/s40571-015-0051-x>

Yasuhiro Inoue, Kazuki Ishida, Naoki Takada, Masaki Hojo, Reductions in anisotropic errors from implementation of phase-field wetting boundary condition for off-grid objects, Vol. 12, 2015, pp. 1550042-1-15

<http://www.worldscientific.com/doi/a>

bs/10.1142/S0219876215500425

〔学会発表〕(計 7 件)

井上康博、榎本祥英、米村重信、安達泰治、頂端収縮調整に関する細胞メカニクスのフィードバックの数理モデル、日本細胞生物学会、第68回大会、2016年6月(招待講演)

Yoshihide Enomoto, Yasuhiro Inoue, Shigenobu Yonemura, Taiji Adachi, Three-dimensional vertex simulation on smooth surface maintenance of growing epithelial tissue based on intercellular mechano-feedback, *Biophysical society*, 60th annual meeting, 2016年2月

榎本祥英、井上康博、米村重信、安達泰治、細胞における収縮力-形状フィードバックを考慮した上皮細胞の形態変化シミュレーション、日本機械学会、第28回バイオエンジニアリング講演会、2016年1月

榎本祥英、井上康博、米村重信、安達泰治、組織形状平滑化を実現する頂端収縮力調整機能の数理モデリング、日本機械学会、2015年度年次大会、2015年9月

大戸康平、井上康博、米村重信、安達泰治、SMDシミュレーションによるヘリックス構造を有するタンパク質の引張試験の条件検討、日本機械学会、2014年度年次大会

井上康博、アクチン細胞骨格系のマルチスケール計算バイオメカニクス、神戸大学第7回協定講座シンポジウム「ロボティクスとバイオメカニクスの計算科学的接点」2013年12月(招待講演)

Yasuhiro Inoue, Satoru Okuda, Tetsuya Fujii, Kohei Ohto, Taiji Adachi, Computational biophysics on epithelial tissue deformation: from molecular to tissue scale, *日本生物物理学会*, 51st annual meeting, 2013年10月(招待講演)

〔図書〕(計1件)

曾我部正博 編、井上康博 他著、化学同人、メカノバイオロジー 細胞が力を感じ応答する仕組み、2015、332(担当 pp. 293 - 303)

〔その他〕

ホームページ

<https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/1S2qY>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 康博 (INOUE, Yasuhiro)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：80442929