

研究報告書

「形態形成を引き起こす力学過程の解明：分子・細胞・組織をつなぐ」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：石原 秀至

1, 研究のねらい

多細胞生物の発生過程では、単純な形態の胚から、複雑な形をもった生体組織へと動的な変形が起こります。この変形は、組織を構成する細胞が「押しあいへしあい」を行うことで進みます。1980年代頃から、発生生物学が分子生物学的手法を取り込むことで、個体発生を支える分子のネットワークの理解が急速に深まってきました。一方で、組織の変形の背後にある「力」の理解は乏しく、形態形成が適切に進むための力学的制御がどのような原理で働いているのかについて多くのことがわかっていません。特に、発生過程のような多階層にまたがる現象を理解するためには、「分子の動態がどのように細胞の機械的性質を規定するのか?」「個々の細胞の機械的性質がどのように組織の変形を促すのか?」という分子・細胞・組織という異なる階層間の関係をふまえながら力学的制御を明らかにする必要があります。本研究では、ショウジョウバエ上皮組織をモデル系として、分子活性や細胞特性、組織の力学的物性といった異なる階層間の関係を結びつけ、生物の「かたちづくり」にある力学制御の原理を明らかにすることを目指しました。

2, 研究成果

(1) 画像データからの力推定手法の開発

上皮細胞の細胞集団では、(i) 個々の細胞がもつ圧力(ii) 細胞接着面ではたらく張力が重要だと考えられており(図1)、特に後者は細胞中を細胞膜に沿って走るアクチオシンケールが大きな寄与をしている。発生過程での力の動態の理解がこれまで進んでこなかった理由として、これら力の直接測定が困難であることがあげられる。現在もっとも使用されている手法は、アクチオシンケールをレーザーで切断して応答を見る(レーザー切断法)ものだが、この手法は侵襲的であり、また一つの接着面での張力のみが計られる。広範囲の張力を非侵襲的に計測する手法は確立していない。そこで我々は、画像データから細胞集団中の力を推定する手法を開発した(図2)。細胞の形態を多角形で表し、各結節点に対し働く力について、 P_i (i番目の細胞目の圧力)、 T_j (j番目の細胞接着面の張力)と抗力の釣り合い方程式を考える(図2B)。この方程式で、一般に未知変数の数に対して条件式が足りず、解を一意的に決めることができない。そこで、レーザー切断法から示唆されているように、張力 T_j が正であることを期待し、これを事前分布としてベイズ統計に基づいて逆問題を定式化した(図2D)。この手法を数値計算で得られた人工データに適用した結果、精度よく推定できることを確かめた。また、*in vivo*データに対しての有効性を検証するために、レーザー切断法の結果と比較し、切断に対しての応答の強さと推定値は高い相関を示しており、開発した推定方法が妥当であることを確かめた。さらに、推定した個々の細胞の圧力や接着面の張力から、それらを足し合わせてよりマクロなスケールでの応力テンソルを計算する式を導出した。釣り合いを考えることで、この手法から系にはたらく外力の方向を見積もることができるようになった(図3Bの楕円)。

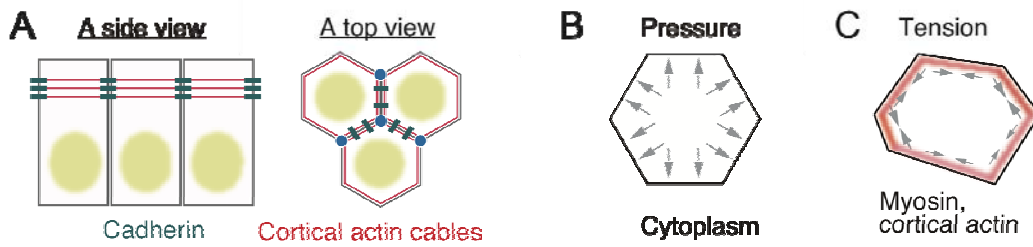
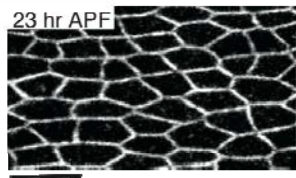
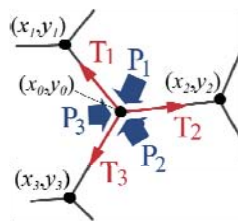


図1 A 翅上皮組織の模式図。アクチンケーブルが細胞内を膜にそって走っている B,C 細上皮細胞組織に働く力。個々の細胞の圧力(B)と細胞接着面の張力(C)の釣り合いによって細胞の形態が決まる。

A Input: an image of cells



B Balance of forces at each vertex



$$\alpha_1^x T_1 + \alpha_2^x T_2 + \alpha_3^x T_3 + \beta_1^x P_1 + \beta_2^x P_2 + \beta_3^x P_3 = \gamma \hat{x}_e$$

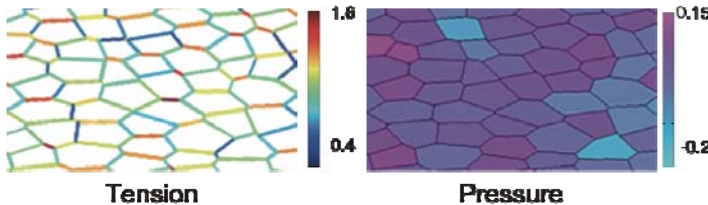
$$\alpha_1^y T_1 + \alpha_2^y T_2 + \alpha_3^y T_3 + \beta_1^y P_1 + \beta_2^y P_2 + \beta_3^y P_3 = \gamma \hat{y}_e$$

$$T_i^x = \frac{x_1 - x_0}{\|x_1 - x_0\|} \times T_i \quad P_i^x = \frac{y_2 - y_1}{2} \times P_i$$

$$Ap = \gamma v \quad v = (T_1, \dots, T_M, P_1, \dots, P_N)$$

drag $v = \hat{i}$

C Output: relative values of tension and pressure



D Inverse problem

Minimize

$$F = |Ap - \gamma v|^2 + \mu |Bp - f|^2$$

Force balance Positive tensions

- exclude hydrostatic pressure
- determine μ by empirical Bayese

図2 画像からの力推定手法。A細胞の画像(入力) B圧力(P)、張力(T)に関する釣り合い方程式。未知数に関して線形であり、係数は結節点の相対位置から決まる。C推定された張力と圧力の相対値。D実際にはBの式のみからでは決定せず、張力が正であるという事前分布を用いて逆問題を定式化した。

(2) ショウジョウバエ翅形態形成の力場の異方性と外力

開発した手法を用いて、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の翅が形態形成中でどのような力場を示すのかを調べた(杉村薫京都大学助教との共同研究)。ショウジョウバエ翅では、形態形成を通して細胞の形態が一度遠近軸(PD 軸)方向に伸長し、再び等方的になることが観察される。図3に発生ステージ 16.5-18.5hr APF での張力推定結果を示す。推定結果は、張力がPD 軸にそって強いこと、すなわち力場が異方的であることを示唆していた。この結果は、ミオシン分布やレーザー切断実験の結果とも整合的である。一方で、「張力が強い(ミオシン量が多い)接着面が収縮し、周りを引っ張る」という描像からは、PD 軸に細胞が長くなることを説明できない。これを明らかにするため、注目領域全体の応力場を見積もったところ(図3B 楕円)、翅はPD 軸に沿った引っ張り力を受けていることを示唆する結果を得た。これを確かめるために、レーザーによって矩形の穴をあけた所、PD 軸にそって穴が広がっていくことを確認した。また、PD 方向への張力を緩和するために、前後軸(AP 軸)にそって切れ込みをいれた結果、細胞形態の異

方が緩和された。つまり、細胞形態は外力によって強く規定されている。また、PD 軸に沿っての強い張力分布は、この外力に釣り合うためだと考えられる。さらに、応力緩和にともなってミオシンの分布が異方性を失うことを見出した。この結果は、ミオシンが力を生み出すだけでなく、力の場を感知して応答していることを意味し、発生過程の変形制御において力(形態)とミオシンの間のフィードバックがあり得ることを示唆している。潜在的に重要な寄与を果たしうる知見だと考えている。

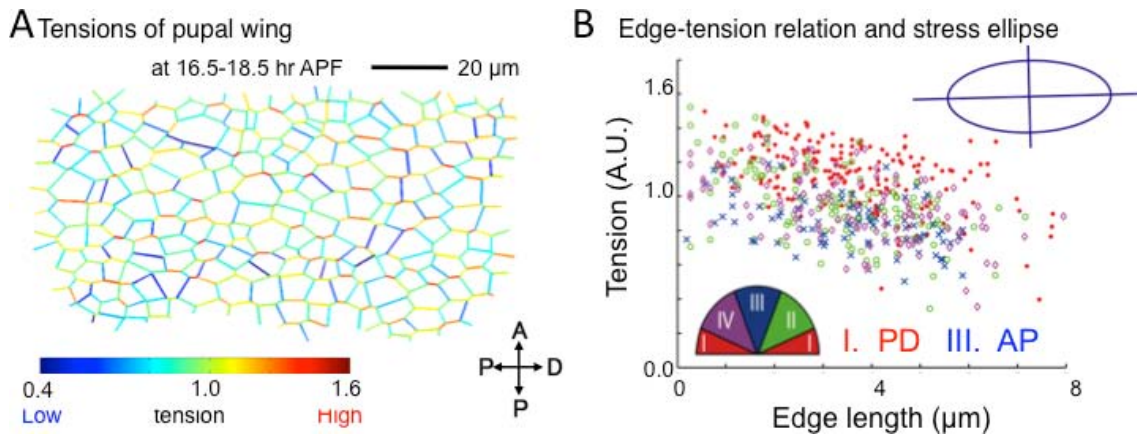


図3 ショウジョウバエ翅の推定結果。A 16.5hr APFでの細胞接着面張力の推定値。B 推定張力値の長さ依存性。角度クラスで色分けした。PD軸にそったもの(赤点)が高い張力を示している。また、同じ角度クラスでは、張力が大きな接着面ほど長さが短くなる。

(3) 細胞配置を制御する新規メカニズム

上の結果は、ミオシンに注目した他の系での知見 (Bertet *et al. Nature* 2004, Fernandez-Gonzalez *et al. Dev Cell* 2009) と異なっており、ショウジョウバエ翅系で細胞形態を制御する新規メカニズムを示唆する。翅系では、発生とともに細胞の配置が六角格子状に整列していく hexagonal cell packing (HCP) が報告されているが (Classen *et al. Dev Cell* 2005)、張力推定手法の適用結果、この過程で細胞配置替え中の張力は、収縮する細胞接着面で強いわけではなく、むしろ PD 軸へ向いた時に強い張力を持つことを見出した (図4A)。我々は、HCP 中の細胞配置替えに異方的な外場が寄与している可能性を検証した。外場を考慮した数値シミュレーションを行った所、異方的な張力場で最も顕著に HCP が進むことがわかった (図4B)。さらに、切断による異方的な張力緩和、六角形細胞のもつ方向の解析等を通して、以下のメカニズムを見出した。六角格子は「エネルギー的に」最小状態なので、細胞は基本的に六角形になりやすい。しかしながら、六角格子には決まった方向性はなく(基底状態が縮退している)、それが格子のミスマッチを生みやすい。異方的な外力場があることで個々の細胞に方向を教え、それによって六角化がスムーズにすすむ。以上の研究を通じ、①これまで考慮されてこなかった外力が重要となる新規メカニズム②方向情報が力を通じて個々の細胞に伝えられていること、を明らかにした。

以上の結果は K. Sugimura*, T. Uemura, A. Miyawaki, K. Kaneko, and S. Ishihara** として論文改訂中である。

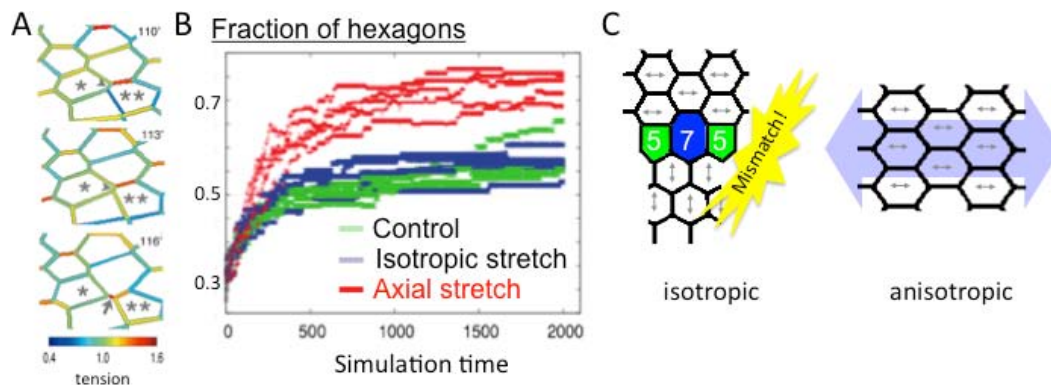


図4 細胞六角化過程。A 細胞の配置換えで、収縮する接着面の張力が高いわけではない(矢頭)。B 細胞配置換えの数値計算。異方向な外場のもとで細胞六角格子化がもっとも進む。C 等方的な外力の場では、格子間のミスマッチを生みやすい。異方向的な引っ張りの下では、細胞の向きが方向付けられることで、細胞の整列がスムーズに進む。

3. 今後の展開

理論-実験の共同研究を通し、実験手法・データ処理に関して独自手法を開発してきた。特に力の推定手法は広く応用可能であり、今後の研究にも活用していく。

- ①ミオシンと力のフィードバックが生み出す効果を定量的に評価し、発生過程への意義(安定性や形態形成の新規メカニズムの可能性)を探る
- ②細胞分裂や細胞死の力場への効果。特に単細胞で細胞分裂方向が力場によって影響をうけることが示されている。これらの効果が発生に与える影響を調べる。
- ③細胞形態を内部自由度にとりこんだ連続体モデルの構築。

4. 自己評価

本研究をとおして、いくつかの大きな結果を得たと考えている。画像からの張力・圧力推定手法は、適用手法も広く、発生学における古くて新しい問題である変形の背後にある力学を明らかにする上で、有用な手法になると期待される。また、これまでの知見とは異なる力学制御メカニズムを明らかにしたことは、この分野での力学制御パラダイムに新しい視点を与えると思われる。

一方で、当初計画していた細胞分裂や細胞内分子挙動と力学過程の関連については解析しきれなかった。単細胞培養系で示唆されたように細胞分裂の方向は細胞がおかれた力学場に依存することから、細胞集団中では逆に周囲に影響を及ぼす可能性がある。この関係からどのように組織の形態が決まっているのだろうか？これについてはデータ取得やシミュレーションもある程度行っていたのだが、解析しきれずにいる。また、分子と力学場のフィードバックは興味深い問題であり、その理論的取り扱いをも含めて多くの課題が残っている。今後とも進めていきたい。

5. 研究総括の見解

多細胞生物の発生過程の研究は、分子レベルでの理解は進んできたが、組織の変形を促す物理的力についての理解が抜けているという問題意識の下で、画像データから非侵襲的に各細

胞内の圧力と細胞接着面で働く張力を推定するというユニークで有用な手法を開発した。さらにこの手法をショウジョウバエの翅形態形成過程に適用した結果、翅が遠近軸に沿って引っ張られている事、また、この異方的な外力場が細胞再配置に重要な役割を果たしている事など、細胞形態を制御する新規なメカニズムを明らかにしたことは極めて興味深く高く評価できる。物理学に根ざした洞察力が発生過程の力学的動態に新しい切口をもたらしたと言える成果である。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Akihiko Nakajima, Takako Isshiki, Kunihiko Kaneko and Shuji Ishihara, “Robustness under Functional Constraint: The Genetic Network for Temporal Expression in *Drosophila* Neurogenesis” *PLoS Comput. Biol.* 6(4):e1000760 (2010)
2. Mikiya Otsuji, Yuya Terashima, Shuji Ishihara, Shinya Kuroda and Kouji Matsushima, “A Conceptual Molecular Network for Chemotactic Behaviors Characterized by Feedback of Molecules Cycling Between the Membrane and the Cytosol” *Sci. Signal.* 3 ra89 (2010)
3. Akihiko Nakajima and Shuji Ishihara, “Kinetics of the Cellular Potts model revisited” *New Jour. Phys.* 3, 033035 (2011)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

【著書・総説】

1. 石原 秀至, 杉村 薫「理論生物学の眺め方」理論生物学—生命科学の新しい潮流 望月 敦史編 第1章第2節 共立出版 (2011)
2. 藤本仰一、石原 秀至、金子邦彦「空間パタン形成の遺伝子ネットワーク進化理論—ネットワーク構造と機能の対応づけ」生物物理 Vol. 50 (2010) No. 1 pp. 018
3. 石原 秀至, 杉村 薫「理論生物学研究の眺め方 A practical guide of theoretical biology for molecular biologists」蛋白質核酸酵素, 54 (12月号): 1993–1999 (2009)

【主な学会発表等】(招待講演,国際学会での口頭発表)

1. 明治大学 GCOE MAS セミナー(2011/12/8 明治大学)
細胞のおしあいへしあいによる生物のかたちづくり
2. Regional Bio-Soft Matter Workshop (11/10/27, Taipei)
Mechanical control of hexagonal cell packing in *Drosophila* wing
3. International Conference of Systems Biology 2011 (11/8/29 Menheim)
Estimating the dynamics of forces during morphogenesis
4. 東京大学駒場物性セミナー(2011/10/21 東京大学)
細胞のおしあいへしあいによる生き物の形づくり
5. RIKEN CDB セミナー (2011/4/14, RIKEN CDB)

Estimating the dynamics of forces during morphogenesis

6.神戸大学古瀬研セミナー (11/2/24 神戸大学)

上皮形態形成の力学的制御

7.生命現象の数理:ミクロの世界の仕組み(2011/1/21 東京大学)

Mechanical control of cell configuration in a growing epithelial tissue

8. 理研 ASI 細胞システムコロキウム理論生物学(2011/2/10 理研 ASI)

形態形成を支える応力場のダイナミクス

9. 第 19 回 日本バイオイメーjing学会学術集会 (2010/9/10 慶応大学)

Estimating force distribution in the growing tissue

10. RIKEN Mathematical Science Workshop (2010/10/1 Kami-suwa)

Analyzing mechanics in the growing tissue

11. New Trends On Growth and form (2010/6/15 Agay, France)

Estimating stress field in growing tissue

12. RIKEN ASI 佐甲研セミナー (2010/2/17 RIKEN ASI)

成長する上皮組織に働く力学過程の解析

13. 定量生物学の会第 2 回年会 (2010/1/11 大阪大学)

上皮組織の応力場のパターンと成長のダイナミクス

14. 第5回生物数学の理論とその応用 (2009/1/14 京都大学)

保存量がある反応拡散系の性質と細胞運動のモデル化