

## 「曲率に対する力学応答システムによる分岐形態形成」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：平島 剛志

## 1. 研究のねらい

本研究課題では、臓器の形態形成を対象とし、多細胞が有する力学刺激や組織の曲率に対する細胞応答の定量を通して、三次元組織形成を実現する細胞間相互作用の解明を目的とする。研究課題を推進し、複雑な器官の形態形成を支える多細胞のシステム機構の一端を明らかにするとともに細胞集団スケールでのメカノバイオロジー研究の新たな展開をねらいとする。

臓器の形態形成は、高い再現性を担保する多細胞システムに支えられている。多細胞システムの構成要素である細胞個々は、自身が持つゲノム情報を適切に利用するための環境応答能を有しており、それらが細胞間相互作用の結果として発揮する集団特性を明らかにすることで、複雑な器官の形態形成制御を支えるシステム機構が明らかとなると考えられる。たとえば、ほ乳類における発生過程の肺の分岐形態形成は、複雑な分岐パターンを高い精度で再現性よくかたち作る一例であり、ロバスタな形態形成を支える多細胞システムの研究に適している。申請者はこれまでに、マウス胎仔肺の分岐形態形成過程において、肺上皮組織のみでも分岐は引き起こされるが、生じる分岐形態にばらつきが大きく、分岐形態形成の精度が低いという問題に直面している。問題解決の糸口として、肺上皮細胞間相互作用を通して受ける力や形の情報を細胞が利用することでダイナミックな組織の形態形成が実現される可能性に注目した。

本研究課題では、細胞が受ける力学刺激やそれに伴う変形に応じて活性が制御される細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular Signal-regulated Kinase: ERK) に着目し、上皮系培養細胞株やマウス胎仔の上皮管組織を対象に研究を進める。目的達成のために、研究テーマを「形-力-シグナル連成システムの測定系の確立」、「数理モデルの開発」、「組織曲率に対する細胞応答の解析と形態形成の理解」の3つに分け、それぞれのテーマのつながりを意識して課題を進める。本研究課題を進めることで曲率感知に対する細胞応答という、新たな細胞の環境応答能が形態形成の機能に果たす役割を明らかにすることが期待できる。また、国内外を問わず異分野研究者間での交流を深め、積極的に協働しながら本研究課題を進める。

## 2. 研究成果

## (1) 概要

組織曲率に対する力学応答システムと自律的な形態形成の理解に向けて、細胞間相互作用が生み出す形-力-シグナルの連成制御システムについての研究を進めた。初年度までに、培養上皮細胞を用いて、受容する力に応じて細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular Signal-regulated Kinase: ERK) の活性が制御され、さらに、キナーゼの活性化がアクチオシンの収縮を介して細胞の力生成を制御することを見出した。このフィードバック機構が、振動や伝播といった細胞集団のダイナミックな動態を生み出す基本原理であること

を実験と数理により明らかにした(主な研究成果リスト 代表的な論文 1)。マウス胎仔組織を用いて本機構の検証を進めるために、生体外組織培養環境下での長時間蛍光ライブイメージング系を確立した。ライブイメージング観察の結果、細胞内のシグナル活性と細胞の機械的な力の関連を捉えることができ、組織スケールの曲率形成を駆動する仕組みを明らかにした(主な研究成果リスト 代表的な論文 2)。これらの知見をもとに、マウス胎仔肺を用いて分岐形態形成時の組織曲率に対する細胞力学応答システムの解明を進めた。その結果、上皮組織の曲率に応じて ERK 活性が制御されることを見出した。また、ERK 活性化により細胞頂端側で局所的にアクチン重合が促進され、細胞頂端膜を押し広げることで、組織曲率を下げる効果があることがわかった。得られた実験結果を基に、多細胞力学・生化学反応を含む数理モデルを構築し、シミュレーション解析を行った。これらの解析により、ERK 活性と組織曲率の間に負のフィードバック制御が存在し、上皮組織自律的に分岐形態形成を駆動する可能性を示した(主な研究成果リスト 代表的な論文 3)。原著論文の成果に関連して得られた知見をまとめ、3報の総説論文を発表し(2022, Biochemical Journal; 2022, Frontiers in Cell and Developmental Biology; 2022, Seminars in Cell and Developmental Biology)、現在2報の総説論文を執筆している。また、本課題に関する2件の国際研究集会を開催し、国内外を問わず異分野研究者間での研究交流を深めた。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「形-力-シグナル連成システムの測定系の確立」

組織曲率に対する力学応答システムと自律的な形態形成の理解に向けて、上皮細胞間相互作用が生み出す形-力-シグナルの連成制御システムについての研究を進めた。細胞が受容する機械的な力や細胞変形に応答して活性化される細胞外シグナル調節キナーゼ(Extracellular Signal-regulated Kinase)ERK/MAP キナーゼに着目し、上皮細胞集団における ERK シグナル活性応答について調べた。はじめに、蛍光共鳴エネルギー移動 FRET の原理に基づくバイオセンサーを発現させたイヌ腎臓上皮由来の MDCK 細胞を用いて、力学的摂動環境下での ERK 活性をライブイメージング測定する方法を確立した。さらに、細胞が基質に対して及ぼす牽引力を測定するためのイメージング手法と FRET イメージングを組み合わせることで、世界で初めて細胞集団における細胞牽引力と ERK シグナル活性の同時測定系を確立した(主な研究成果リスト その他の成果 1)。測定の結果、細胞の圧縮や引張りなどの力学刺激により、細胞変形を通して ERK シグナル活性が調節されることがわかった。さらに、ERK 活性が細胞骨格系であるアクチンミオシンの作用を介して細胞の力生成を制御することを明らかにした(主な研究成果リスト 代表的な論文 1・その他の成果 2)。

次に、3次元組織における細胞動態と ERK 活性を測定するために、成長する臓器の生体外培養法と二光子顕微鏡ライブイメージング法の確立を進めた。マウス胎仔から摘出した肺などの臓器に対し、組織成長が阻害されないような条件で細胞の足場となるハイドロゲルを用いて培養皿に固定し、さらに異なる培地成分等を検討することで、生体外で長時間培養できる力学および生化学的条件を確定した。さらに、FRET の原理に基づくバイオセンサーを全身で発現するトランスジェニックマウスを用いて、生体組織中の個々の細胞における ERK 活性をライブで観察するための二光子顕微鏡イメージング手法を確立した(2020 年

Frontiers in Cell and Developmental Biology 誌、2021 年 Royal Society Open Science 誌など)。また、顕微鏡画像群から組織の曲率を定量する画像処理および解析法を開発することで、組織や細胞の形と ERK 活性を定量的に関連づけるための一連の手続きを確立した。

#### 研究テーマB「数理モデルの開発」

実験で得られた知見を基に、上皮細胞間相互作用が生み出す形-カ-シグナルの連成制御システムの数理モデル化を行った。対象と目的に応じてモデルを構築し、それぞれシミュレーション解析や数理解析を行った。はじめに、MDCK 細胞の上皮集団運動と ERK 活性時空感パターンを表現するために、ダイナミックに変形する細胞集団を一細胞解像度で表現する Cellular Potts Model を用いてモデルの構築を行った。これにより、細胞が有する運動のための前後軸極性の重要性が示唆され、検証すべき実験項目を裏付ける結果を得た(主な研究成果リスト その他の成果 3)。さらに、集団運動における細胞の力とシグナル伝達の連成を表現する定量的な連続体モデルを開発した。実験測定の結果と照らし合わせて数理モデルのパラメーターを推定することで、細胞集団運動の定量的な予測に成功した。また、シミュレーション解析により、複雑な生命現象を理論的に再現・予測できることを示した(2021 年 Nature Physics 誌など)。

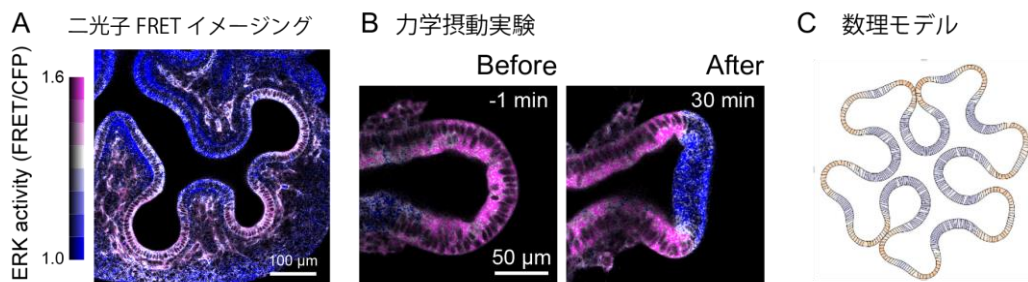
さらに、前テーマで確立した3次元組織における細胞動態と ERK 活性の二光子顕微鏡イメージング測定法を用いて得られるデータを組み入れることのできる数理モデルの開発を進めた。マウス蝸牛上皮管の伸長に対しては、管長軸に沿った一次元の細胞群モデル Beads-Spring Model を、肺上皮組織の形態形成には、二次元の力学ベースの多細胞集団モデル Vertex Dynamics Model をそれぞれ開発し、数値シミュレーションにて解析するための技術基盤を確立した(主な研究成果リスト その他の成果 3,4)。これらを用いることで、上皮組織における分岐形態形成をシミュレーション解析するための手段を開発することに成功した。

#### 研究テーマC「組織曲率に対する細胞応答の解析と形態形成の理解」

上皮培養細胞を用いて明らかにした、細胞が生み出す力と ERK 活性間の相互作用をマウス胎仔組織で検証するために、先述のテーマで確立した長時間蛍光深部ライブイメージング観察や薬理的摂動、数理モデルの解析を行った。特徴的な曲率を有するマウス蝸牛管の上皮組織に着目して解析を進めた結果、3次元成長過程における曲率形成を駆動する局所的な細胞群の流れとそれを生み出す細胞力学機構、および、ERK 活性の連関を明らかにした(主な研究成果リスト 代表的な論文 2、その他の成果 4)。

これらの知見をもとに、マウス胎仔肺を用いて分岐形態形成時の組織曲率に対する細胞力学応答システムの解明を進めた。特に、上皮組織の曲率感知に関して ERK 活性に注目し、生体外培養系における肺上皮組織の ERK 活性の定量とその生理的意義の解明を目指した。ERK 活性を評価できる FRET バイオセンサーマウスを用いて、肺上皮の分岐形態形成を二光子顕微鏡で観察したところ、間充織に対して凸の領域の細胞で ERK が活性化し、凹の領域の細胞では ERK が不活性化していることがわかった(図A)。また、シリコンチャンバーを用いた力学摂動実験により、上皮管の曲率変化に応じて ERK 活性が変化することを明らかにした(図B)。これは、上皮組織の曲率に応じて細胞外シグナルタンパク質である

Fibroblast Growth Factor の上皮細胞への取り込み量が変わり、下流の ERK 活性が制御されると考えられる。また、ERK 活性化により細胞頂端側で局所的にアクチン重合が促進され、細胞頂端膜を押し広げることで、組織曲率を下げる結果となることがわかった。得られた実験結果を基に、多細胞力学・生化学反応を含む数理モデルを構築し、シミュレーション解析を行った結果、肺上皮細胞は曲率に応じて ERK を活性化し、能動的な細胞変形を通じて曲率を負に制御するシステムを備えていることがわかった(図C)。さらに詳細な解析を進めたところ、肺上皮組織における曲率感知と力生成による自律的な分岐形態形成には、ERK 活性による細胞頂端側でのアクチンの脱重合や分解が遅く、細胞が組織曲率を感知する記憶を一定時間保持する仕組みが重要であることがわかった(主な研究成果リスト その他の成果 5, 6)。細胞内のシグナル活性と機械的な力の関連を捉えることができ、組織スケールの曲率形成を駆動する仕組みが明らかとなった(主な研究成果リスト 代表的な論文 3)。得られた成果からさらに研究を進展させ、現在は上皮-間充織細胞間相互作用による形態形成への影響について調べている。



これらの成果に関連して、3報の総説論文を発表した(2022, Biochemical Journal; 2022, Frontiers in Cell and Developmental Biology; 2022, Seminars in Cell and Developmental Biology)。また、現在2報の総説論文を執筆している。

### 3. 今後の展開

本研究成果は、生体組織の曲率が細胞集団の機能発現の入力源となることを示し、組織曲率と細胞内シグナル伝達が機械的な力を介してフィードバックすることで自律的な形態形成が実行されることを示した、基礎的理解を深める上で重要なものである。曲率というわかりやすい幾何量が多細胞動態システムを支えるキーワードになることを示すことで、生命科学に馴染みの薄い数学・工学・物理学・情報科学などの異分野の研究者が多細胞動態システムの研究分野に興味を抱ききっかけを与えるものであり、新たな学術の広がりを生み出すものと考えている。

本研究課題の進捗に伴い、場の形状や力学刺激に対する細胞応答と組織形態形成への影響の理解に向けて、曲面を有する細胞足場デバイスの作製を試みた。課題期間初期に、材料加工を専門とする機関と共同で、レーザー描画装置を用いた厚膜フォトレジストへの直接描画法の条件

検討を行ったが、デバイスの厚みを最大 33  $\mu\text{m}$  程度までしか作製できないこと、フォトレジストに描画したパターンから細胞足場となるゲルへの転写が極めて難しいこと、機械の具合により発泡が生じやすく再現性にばらつきがあるなどの問題点が見つかった。期間後半では、コロナ禍における活動制限や所属研究環境の変更により、本項目を十分に実現することができなかった。現在、領域会議でのアドバイザーからの助言を参考にし、光架橋性の高分子ゲルを用いた細胞曲面足場の開発に取り組んでいる。本開発は、微細材料加工を専門とするベルギーの研究グループと共同で進めており、また、緊密な連携を高めるために国際共同研究を進めるグラント ASEM-DUO FELLOWSHIP PROGRAMME“DUO Wallonia-Brussels”を獲得し、研究交流を進めている。

#### 4. 自己評価

本研究課題期間中に2度の所属変更(2021年1月に京都大学白眉センターに特定准教授として、2022年6月にシンガポール国立大学メカノバイオロジー研究所に研究室主催者として着任)があり、コロナ禍による活動制限も生じたため、研究実施体制を安定して継続することは難しく十分でなかった。このような研究環境の変化より本課題の推進が遅れた点もあるが、総じて研究目的は達成されたかと思う。また、海外機関からのオファーは本さがけ関連の活動を評価されてのことであり、研究者としての将来への飛躍につながるものと考えている。

本さがけ研究活動を通して、別領域のさがけ研究者と共同で国際ワークショップを開催するなど、国内外を問わず異分野研究者間の交流推進に貢献した。これらは、京都大学数理解析研究所の国際共同研究プロジェクトとして開催された2件の国際研究集会であり成功をおさめた(1件目: Mathematical Mechanobiology、2021年7月14日開催; 2件目: Biofluid Mechanics of Reproduction、2021年7月29日開催)。また、内閣府/総合科学技術・イノベーション会議のエビデンス事業の一環で行われているウェブプロジェクトに、さがけ研究の内容を中高生向けの平易な文章で紹介するなどアウトリーチ活動も行った。

本さがけ期間中に、採択済み論文10件、審査中論文2件の成果を得た。この成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、メカノバイオロジー分野の若手研究者として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。これに関連し、1件の国際誌と2件の和文誌の特集号の企画・編集を担当する機会を得た(1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, "Multicellularity: Views from Cellular Signaling and Mechanics. 2. 生体の科学、「特集 形態形成の統合的理解」。3. 生物物理、「特集細胞や個体の集団が生み出すかたち、パターンとダイナミクス」)。さらに、2022年には理論生物学分野での重要国際誌である *Journal of Theoretical Biology* の編集委員に任命された。

本さがけ研究の成果が新たな研究プログラムに発展し、文部科学省科学研究費助成事業 学術変革領域研究(A)に計画班として採択(領域名:多細胞生命自律性)、また、同事業 新学術領域研究(領域名:シンギュラリティ生物学)に公募班として採択された。さらに、同事業 学術変革領域研究(B)(領域名:ヘテロ群知能)に班友として関与するなど、研究者としての飛躍につながった。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:12件(採択済み10件、審査中2件)

1. Naoya Hino, Leone Rossetti, Ariadna Marín-Llauradó, Kazuhiro Aoki, Xavier Trepas, Michiyuki Matsuda, Tsuyoshi Hirashima. ERK-mediated mechanochemical waves direct collective cell polarization. *Developmental Cell*. 2020. 53, 6, pp646-660,

細胞が受容した力に応答して活性化する ERK/MAP キナーゼ(細胞外シグナル調節キナーゼ)に着目し、上皮細胞株を用いて細胞間力学相互作用における ERK シグナル活性応答について調べた。その結果、細胞の圧縮や引張りにより ERK シグナル活性が調節され、さらに ERK 活性がアクチンを介して細胞の力生成が制御されることを実験と数理的手法により明らかにした。

2. Mamoru Ishii, Tomoko Tateya, Michiyuki Matsuda, Tsuyoshi Hirashima. Retrograde ERK activation waves drive base-to-apex multicellular flow in murine cochlear duct morphogenesis. *eLife*. 2021. 10:e61092

マウス上皮組織の曲率形成過程における ERK 活性を介した力学-生化学シグナル連成機構について調べた。まず、特徴的な曲率を持つマウス胎仔の蝸牛管を、生体外培養環境下で長時間二光子顕微鏡ライブイメージングを可能にする実験系を確立した。観察や薬理的摂動、および数理モデルの解析を通して、上皮組織の3次元成長過程における曲率形成を駆動する局所的な細胞群の流れとそれを生み出す細胞力学機構、および、ERK 活性の連関を明らかにした。

3. Tsuyoshi Hirashima, Michiyuki Matsuda. ERK-mediated Curvature Feedback Regulates Branching Morphogenesis in Lung Epithelial Tissue. *bioRxiv*. 2022. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.07.11.451982>.

マウス胎仔の肺組織を対象に、上皮組織曲率に応じた ERK 活性化の仕組みを調べた。組織曲率の大きな部位の細胞のみが成長因子である FGF を取り込み、シグナル経路下流の ERK を活性化することを明らかにした。また、ERK の活性化が、細胞の頂端側でアクチン重合を促し細胞膜を押し広げる力を生み出すことで、上皮組織の曲率を低下させることを見出した。さらに、この制御が、繰り返し生じる分岐形態形成を生み出すのに十分であることを数理モデルのシミュレーション解析によって示した。

### (2) 特許出願

なし

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 招待講演、Mechano-chemical feedbacks in multicellular epithelial tissues underlying pattern formation and morphogenesis、第44回日本分子生物学会年、2021年12月1日
- プレスリリース、Cells communicate by doing the 'wave'、EurekAlert! Science News Releases、2020年7月21日

3. 招待講演、メカノケミカルフィードバックによる多細胞体のパターン形成生物数学の理論とその応用、京都大学数理解析研究所、2020年1月27日
4. 招待講演、ERK-mediated mechanochemical feedbacks in epithelial tissue morphogenesis、第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会合同大会、2021年3月28日
5. 招待講演、ERK-mediated Curvature Feedback in Branching Morphogenesis of Lung Epithelial Tissue、第94回日本生化学会年会、2021年11月3日
6. 招待講演、ERK-mediated curvature feedback regulates branching morphogenesis in lung epithelial tissue、11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics、2021年12月2日