

画像データに基づく上皮組織力学の
モデル構築およびパラメータ推定法

荻田 豪士

目次

要旨	iv
略語表	vi
第 1 章 序論	1
1.1 形態形成における力学の重要性	1
1.2 形態形成の力学的理解	1
1.3 上皮組織の形態形成と力学	2
1.4 上皮組織の力学計測	3
1.5 上皮組織の力学モデル	5
1.6 先行研究におけるモデリングの問題点と本研究の目的	9
1.7 本研究の内容	11
第 2 章 本研究において開発した手法	14
2.1 画像データに基づく細胞の力と形の相関の定量	14
2.2 細胞の力学モデルの構築	17
2.3 力学パラメータの推定	22
2.4 最小 AIC 法によるモデル選択	23
第 3 章 本研究で用いたデータ	27
3.1 人工データ	27
3.2 生体データ	30
3.2.1 ショウジョウバエ蛹の翅	30
3.2.2 ショウジョウバエ蛹の背板	30
3.2.3 ショウジョウバエ胚	31
第 4 章 本研究において開発した手法の妥当性検証	33
4.1 本手法は人工データの真パラメータを高い精度で推定した	33

4.2	人工データにおいて AIC は最良モデルを選択した	34
4.3	本手法は画像処理誤差に対し十分な頑健性を示した	35
4.4	張力の予測値は既知の異方性を示した	38
第 5 章	ショウジョウバエ上皮組織における力学パラメータの解析	41
5.1	ショウジョウバエ上皮組織では異方性ばねモデルが選択された	41
5.2	細胞接着面張力の張力パラメータの異方性は発生過程に伴って変化した	42
第 6 章	外科的操作および遺伝学的操作が張力パラメータに与える影響の解析	46
6.1	翅上皮の引張りを緩和すると張力パラメータの異方性が低下した	46
6.2	胚の前後軸情報の遺伝的攪乱によって張力パラメータの異方性が低下した	47
第 7 章	考察	50
7.1	本研究で開発した手法の有効性について	50
7.2	本手法の妥当性について	51
7.3	本手法の限界と対策	51
7.4	細胞接着面の負のばね定数の異方性の機能について	52
7.5	今後の展開	53
第 8 章	材料と方法	55
8.1	上皮組織における力のベイズ推定法	55
8.2	力学パラメータ推定	56
8.2.1	データの前処理	56
8.2.2	力の釣り合い方程式の解法	56
8.3	予測張力の異方性	58
8.4	ショウジョウバエ系統	59
8.5	外科的操作による組織応力の緩和	59
8.6	画像取得	59
8.7	画像処理と解析	60
8.8	パラメータ推定のノイズ耐性試験	60
第 9 章	補遺	62
9.1	線形重回帰によるパラメータ推定	62
注釈		64
参考文献		65

要旨

個体発生において組織が変形し体の形を作る過程は形態形成と呼ばれる。形態形成を力学によって理解するためには、変形と力に加えて、細胞の体積弾性などの機械特性を把握する必要がある。細胞の機械特性の生体計測は極めて高度な技術を要するため、細胞の機械特性を表す数理モデル（力学モデル）を用いて理論的・数値的な解析が行われてきた。しかしながら、多くの先行研究では、分子の機能など定性的な情報から力学モデルを構築し、数値計算と実験データを要約統計量を用いて間接的に比較することで力学モデルのパラメータ（力学パラメータ）を推定していた。以上の技術的な問題を解決するために、本研究では、定量的な情報に基づいて力学モデルを構築し、力学パラメータを画像データから直接抽出する手法の確立を目指した。

本研究で開発した手法は、上皮組織の細胞接着面を蛍光標識した画像データを入力として、上皮組織の最適力学モデルと力学パラメータを出力する。本手法はモデル構築、パラメータ推定、モデル評価からなる。モデル構築では、力のベイズ推定法によって画像データから推定した細胞の力と形態特徴量の相関を基に、力学モデルの関数を決定する。次に、力学モデルの関数を細胞の頂点における力のつり合い方程式に代入し、この方程式を解くことで、力学パラメータを推定する。加えて、統計学において広く用いられるモデル評価指標である赤池情報量規準（Akaike information criterion; AIC）を用いて、複数の候補モデルの中から最も適した力学モデルを選択する。

本手法の妥当性を数値計算により生成した人工データを用いて検証した結果、本手法が力学パラメータを高い精度で推定できること、および最適な力学モデルを選択できることを確認した。人工データおよびショウジョウバエ上皮組織画像データに観測誤差を加えてパラメータ推定を行った結果、パラメータ推定は画像解析による誤差に対して十分な頑健性を示すことを確認した。さらに、ショウジョウバエ上皮組織画像データに本手法を適用し、推定した力学パラメータを用いて計算した細胞接着面の張力が、先行研究において報告された体軸に対する方向依存性（異方性）を再現することを確認した。

次に、本手法をショウジョウバエ上皮組織に適用し、ショウジョウバエ上皮細胞の機械特性を解析した。まず、先行研究において提案された力学モデルと本手法によって構築し

た力学モデルを AIC を用いて比較した結果、すべてのサンプルにおいて後者の力学モデルが選択された。次に、推定した力学パラメータの発生過程に伴う変化を解析したところ、細胞接着面の張力を制御するパラメータの異方性が方向性のある細胞配置換えを担うことを見出した。さらに、本手法が組織の外科的・遺伝的な攪乱による力学パラメータの変化を検出できることを確認した。

以上の結果から、本手法によって画像データに基づいた定量的なモデル構築と迅速かつ正確なパラメータ推定が可能になり、さらに生体組織においても有効に機能することが示された。今後、本手法を用いた細胞の機械特性の簡便な定量が、個体発生 of 力学制御の理解に寄与すると期待される。

略語表

AIC	Akaike information criteria (赤池情報量規準)
AJ	adherence junction
AP	anteroposterior
APF	after puparium formation
CPM	Cellular Potts model
CVM	Cell Vertex model
DV	dorsoventral
E-cad	E-cadherin
GBE	germband extension
ML	medioateral
myo-II	myosin-II
PD	proximodistal
WT	wild type

第 1 章

序論

1.1 形態形成における力学の重要性

個体発生において、組織は複雑な変形を繰り返し、体の形を作る。この過程は形態形成 (morphogenesis) と呼ばれ、発生生物学における主な興味の一つである。1980 年代以降、分子生物学的な手法によって形態形成の遺伝子制御機構の理解が深められてきた。加えて、近年、生体内における力学計測技術の著しい進歩に伴って、形態形成における力学の重要性が明らかになってきた (図 1.1A; Labouesse, 2011; Heisenberg and Bellaïche, 2013; Goodwin, 2021)。

例えば、細胞は分子モーターの働きで自ら力を生成したり、隣接する別の組織から力を受けたりする (Keller *et al.*, 2000; Quintin *et al.*, 2008)。これらの力に対して多細胞組織が変形するか否か、変形する場合の変形の大きさや速さは、組織や細胞の弾性や粘性などの機械特性によって決まる (Davidson *et al.*, 2009; Petridou and Heisenberg 2019; Barriga and Mayor, 2019)。さらに、細胞は機械感受性チャネルなどのメカノセンサーや細胞骨格の構造変化を介して力を感知し、遺伝子発現を制御する (図 1.1B; Petridou *et al.*, 2017; Wagh *et al.*, 2021)。このように、組織の形態形成は力学と遺伝子の複雑な相互作用によって達成される (Hannezo and Heisenberg, 2019; Lenne *et al.*, 2021)。

1.2 形態形成の力学的理解

では、形態形成は力学によってどのように理解されるのだろうか。一般に物質の変形は、物質に働く力に加えて、弾性や粘性といった物質の機械特性によって決定される。機械特性の身近な例として、ばね定数で表されるばねの弾性が挙げられる。ばねの伸びは、ばねに加える力とばね定数によって決まる (図 1.2)。すなわち、大きな力で引張るとばねは大きく伸び、小さな力で引張るとばねは小さく伸びる。さらに、ばねを同じ力で引張っ

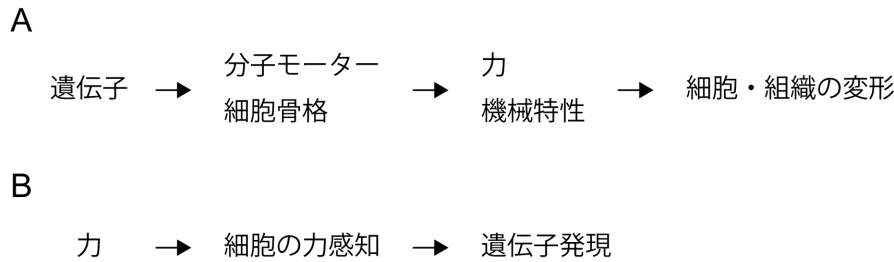


図 1.1 形態形成における力学と遺伝子制御の関係

(A) 遺伝子は分子モーターや細胞骨格構成因子をコードする。分子モーターや細胞骨格などの働きで、細胞の力や機械特性が制御される。細胞の力や機械特性は、細胞や組織の変形を司る。(B) 細胞は力を感じ、遺伝子発現を制御する。

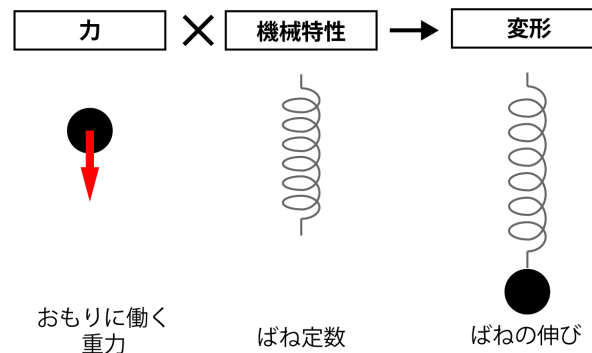


図 1.2 物質の機械特性と変形

図の例では、おもりに加わる重力と、おもりを吊るすばねの機械特性（ばね定数）によってばねの伸び（変形）の大きさが決まる。このように、力と機械特性から物質の変形が決まる。

でも、ばね定数が大きなばねはあまり伸びないが、ばね定数が小さなばねはよく伸びる。このように、物質の変形は、変形・力・機械特性の関係を基に理解できる。

この原則は形態形成における組織変形の力学を理解する場合も同様である (Davidson 2009)。すなわち、形態形成過程において組織が示す変形・力・機械特性を定量し、その関係を明らかにすることで、形態形成の力学による理解が達成される。

1.3 上皮組織の形態形成と力学

上皮シートとは、上皮細胞により構成されたシート状の組織である (図 1.3A)。動物の個体発生過程では、伸長や折りたたみといった上皮シートの変形が繰り返されることで、単純な形状の初期胚から、複雑な構造を持った体が形成される (本多, 2000; Hannezo *et al.*, 2014)。したがって、上皮シートの変形は個体発生において中心的な役割を担うといえる。

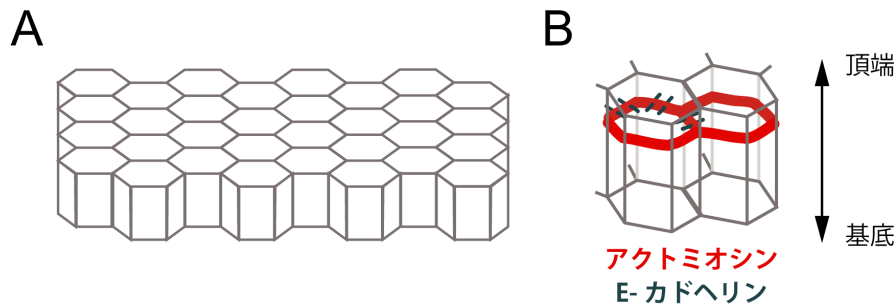


図 1.3 上皮シートと上皮細胞の構造

(A) 上皮シートの模式図。上皮細胞がお互いに結合して、シート状の組織を形成する。
 (B) 上皮細胞の構造。上皮細胞の側方面の頂端側に位置する接着結合では、アクトミオシンが集積し、細胞の形態を制御する（赤）。また、上皮細胞どうしは細胞接着分子である E-cad によって結合する（緑）。E-cad は隣り合う細胞のアクトミオシンを接続し、細胞間の力伝達を担う。

上皮シート内の個々の上皮細胞は頂端面と基底面の極性を持ち、それらの間の側方面においてお互いに接着する（図 1.3B）。細胞側方面の頂端面近くに位置する接着結合（Adherence junction; AJ）では、細胞骨格であるアクチンフィラメントと分子モーターであるミオシンの複合体（アクトミオシン）が細胞辺縁部に形成され、細胞を内側から支えることで細胞の形を制御する。細胞接着分子の一つである E-カドヘリン（E-cadherin; E-cad）の細胞外ドメインは、隣接する細胞の E-cad と結合し細胞間接着を形成する。細胞質ドメインは、アダプタータンパク質を通してアクチンフィラメントと結合する。これらの分子間結合を介して、E-cad は隣接する細胞間の力伝達を担う。

上皮シートの変形は、上皮細胞の力によって引き起こされる（図 1.4A）。隣り合う上皮細胞の間の細胞接着面には、アクトミオシンの収縮や E-cad の接着により張力が生じる。細胞接着面の張力と細胞の圧力が時空間的に変動することで、細胞レベルの形態形成プロセスが引き起こされる。例えば、特定方向の細胞接着面の張力が上昇すると、細胞接着面の張力が異方的になり、細胞の形状や隣接関係が変化する（図 1.4B, C; Lecuit and Lenne, 2007; Quintin *et al.*, 2008）。細胞レベルの形態形成プロセスが積み重なることによって、上皮シートの変形が駆動される（Heisenberg and Bellaïche, 2013）。

1.4 上皮組織の力学計測

生体上皮組織における力学計測は、ここ十年で大きく発展した（Sugimura *et al.*, 2016; Roca-Cusachs *et al.*, 2017; Gómez-González *et al.*, 2020; Fischer *et al.*, 2021）。例えば、細胞接着面の張力を測定する手法として、レーザー破壊法や光ピンセット法が挙げられる（図 1.5; Ma *et al.*, 2009; Bambardekar *et al.*, 2015）。レーザー破壊法はフェムト

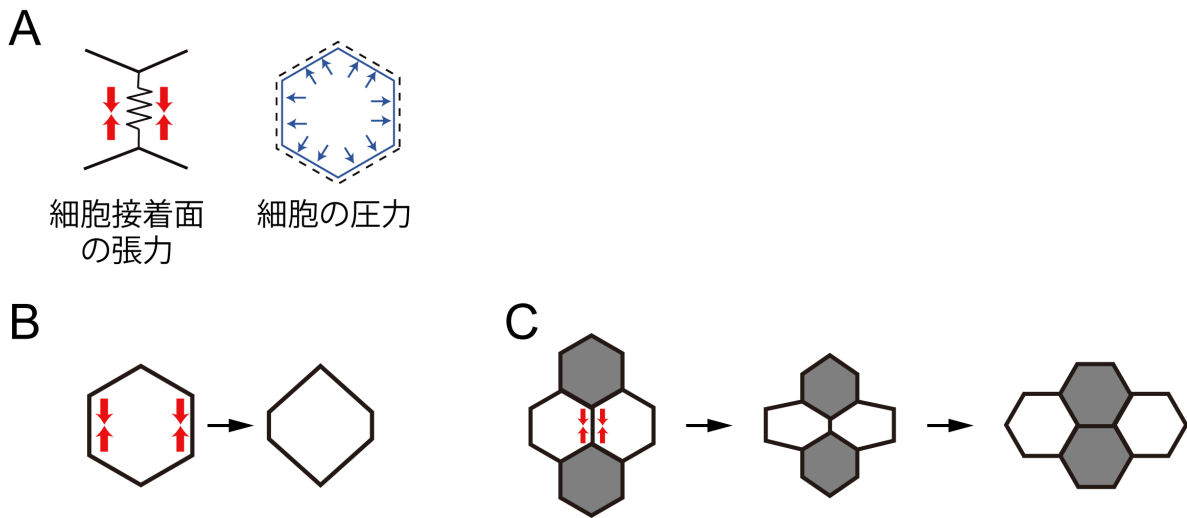


図 1.4 上皮細胞の力と細胞レベルの形態形成プロセス

(A) 上皮細胞の力。アクチンミオシンや E-cad の働きによる細胞接着面の張力 (左) と細胞の圧力 (右)。(B, C) 細胞レベルの形態形成プロセスの例。細胞接着面の張力や細胞の圧力が時空間的に変動することで、細胞レベルの形態形成プロセスが引き起こされる。例えば、特定方向の細胞接着面の張力が強まることで、細胞の変形 (B) や細胞の配置換え (C) が起こる。図では、細胞配置換えによって白い細胞の隣接関係が失われ、灰色の細胞が隣り合うようになる。

秒レーザーなどを細胞接着面近傍に照射して、細胞接着面を裏打ちする細胞骨格を破壊し、照射後の細胞の変形から細胞接着面の張力を測定する手法である (図 1.5A, B)。光ピンセット法は、レーザーによって屈折率が異なる物体 (生体内にインジェクションしたビーズや細胞膜、核など) をトラップし、測定対象を移動・変形させ、トラップ力との力のバランスから知りたい力を測定する手法である。(図 1.5C)。

上皮細胞の力を細胞形態から推定するアプローチも提案されている。例えば、石原・杉村は 2012 年に力のベイズ推定法を発表した (図 1.6; Ishihara and Sugimura, 2012)。この手法では、AJ 平面上の細胞頂点に働く力の釣り合い方程式を考慮し、力と形の逆問題をベイズ統計学の枠組みで定式化することで (図 1.6A, B)、上皮組織画像中の細胞形態から細胞接着面の張力や細胞の圧力の相対値を推定する (図 1.6C; 詳細は第 8.1 節を参照)。その他にも、細胞接着面の曲率や時系列情報を用いて上皮細胞の力を推定する手法が提案されている (Broadland *et al.*, 2014; Vasan *et al.*, 2019)。

一方で、細胞の力の生体内計測に比べて、細胞の機械特性の生体内計測は遅れを取っている (Davidson, 2007; Campaś, 2016)。マイクロピペット吸引法や原子間力顕微鏡は古くから細胞や細胞塊の機械特性の計測に用いられてきた (図 1.7; Guevorkian *et al.*, 2010; Haase and Pelling, 2015)。しかしながら、これらの計測手法はマイクロピペットやカンチレバーをサンプルに直接接触させて操作する必要があるため、解析対象が限られ

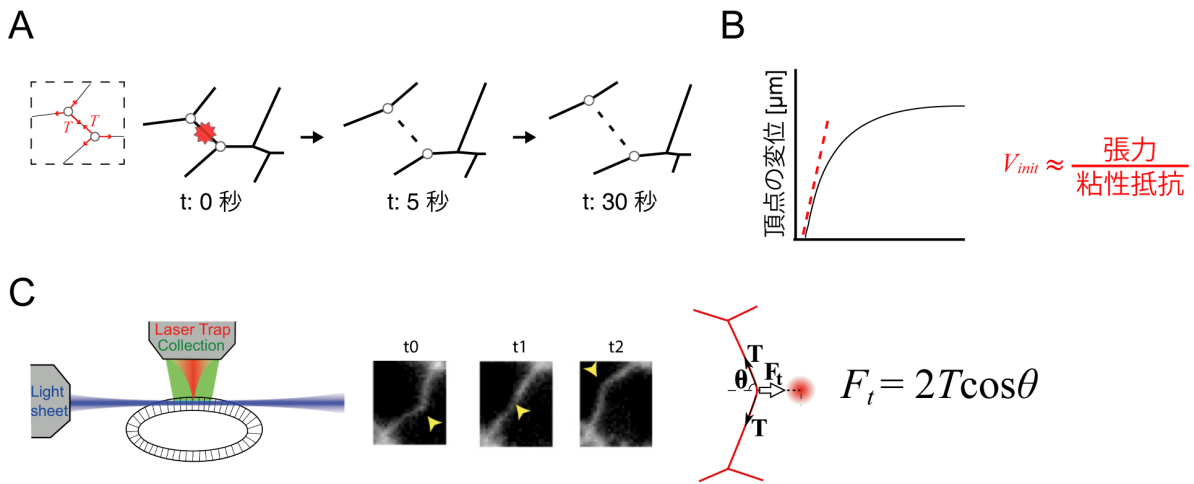


図 1.5 上皮組織の力計測

(A, B) レーザー破壊法。細胞接着面を裏打ちする細胞骨格をレーザーにより破壊し、細胞接着面の頂点（白丸）間の距離の変位を測定する (A)。頂点の変位をレーザー照後時間に対してプロットした (B)。頂点の変位の時刻 0 における接線 (V_{init}) の傾きは張力の強さと比例し、粘性による牽引力と反比例する。したがって、細胞接着面の粘性抵抗が一樣であるならば、 V_{init} から細胞接着面の張力を評価できる。(C) 光ピンセット法。図はショウジョウバエ初期胚の細胞接着面をレーザーでトラップした例。レーザーのトラップ力を F_t (白矢印)、細胞接着面とトラップ力がなす角を θ とすると、細胞接着面の張力 T は $F_t = 2T \cos \theta$ から求められる。杉村・石原 2018 より図を引用・改変 (A–C)。

る。前述のレーザー破壊法や光ピンセット法によって計測した力と細胞の形態を関連付ければ、サンプルに直接接触せずに、細胞の機械特性を評価することができる。例えば、レーザー破壊法によって計測した細胞接着面の張力に対して細胞接着面の長さをプロットすれば、プロットの形状から細胞接着面の機械物性を定量できる (Rauzi *et al.*, 2008; Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2009)。しかしながら、レーザー破壊法は細胞接着面の破壊という侵襲的な操作を伴うため、1つの組織から十数個の細胞接着面の張力しか計測できない。光ピンセット法は細胞接着面の機械特性を非侵襲的に定量できるが、細胞接着面を直接トラップする際のトラップ力の較正などに非常に高度な技術を必要とするため、ほとんど普及していない (Bambardekar *et al.*, 2015; Clement *et al.*, 2017)。

1.5 上皮組織の力学モデル

前述の通り、上皮組織における力学計測は近年急速に発展したものの、細胞の機械特性の生体内計測は未だに困難である。組織力学分野では、機械特性の実験的な計測の代わりに、細胞集団の変形と力学の数理モデルを用いることで、細胞や組織が持つ機械特性が形

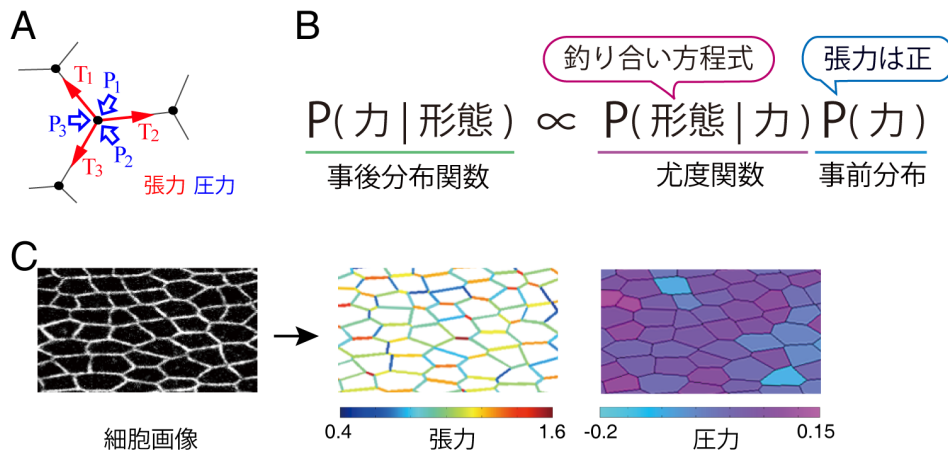


図 1.6 力のベイズ推定法

(A) 細胞頂点に働く力。細胞頂点（黒点）には細胞接着面の張力（赤矢印）と細胞の圧力（青矢印）が働く。(B) 上皮細胞の力と形の逆問題のベイズ統計学による定式化。細胞頂点における釣り合い方程式を尤度関数 $P(\text{形態}|\text{力})$ 、細胞接着面の張力が正であるという実験事実を反映した事前分布 $P(\text{力})$ を用いて、事後分布 $P(\text{力}|\text{形態})$ を計算する。事後分布を最大にする力の値（最大事後分布推定値）が推定値として得られる。(C) 力のベイズ推定法の適用例。細胞接着面を標識したショウジョウバエ蛹の翅上皮の画像（左）から、細胞接着面の張力（中央）と細胞の圧力（右）の相対値のマップを取得する。スケールバーの色は細胞接着面の張力および細胞の圧力の推定値を表す。杉村・石原, 2018 より図を引用した (A–C)。

形態形成に及ぼす影響が調べられてきた (Fletcher *et al.*, 2017; Loerke and Blankenshi, 2019; Taber, 2020)。数理モデルを用いたアプローチではまず、細胞や組織が持つと期待される機械特性を数式（力学モデル）を用いて表現する。その上で、構築した力学モデルを用いて数値計算を行い、数値計算の結果が現実の形態形成を再現するかを検証する。もし、数値計算が現実の形態形成を再現するならば、力学モデルで表した機械特性が形態形成の達成に十分であることの証左となる。さらに、力学モデルのパラメータを様々な値に変化させ数値計算を行うことで、特定の機械特性の影響によって最終的な組織の形態がどのように変化するかを調べることができる。

これまでに上皮組織の変形を記述する様々な数理モデルが提案されている。マクロな変形を取り扱う場合は、細胞構造を無視して連続体とみなした、連続体モデルが主に用いられる (図 1.8A; Taber 2020)。一方、細胞の機械特性が引き起こす変形を対象とする場合は、Cell Vertex model (CVM) (図 1.8B; Honda 1983, Fletcher *et al.*, 2014; Alt *et al.*, 2017) や Cellular Potts model^{*1} (CPM) (図 1.8C; Graner & Glazier 1992; Hirashima *et al.*, 2017) などの個々の細胞が顕に表される数理モデルが用いられる。

^{*1} Glaizier-Graner-Hogeweg (GGH) model とも呼ばれる。

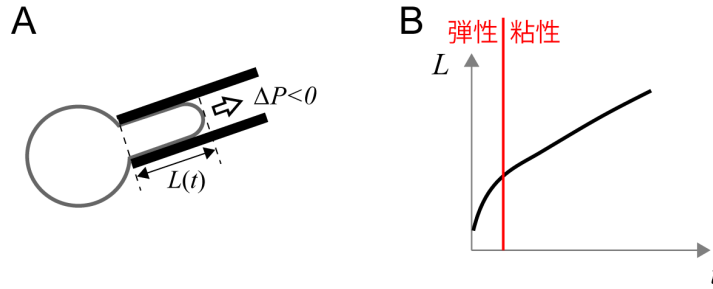


図 1.7 直接接触による細胞の機械特性の測定

(A, B) マイクロピペット吸引法。マイクロピペットによって吸引圧力 ΔP でサンプルを吸引し、ピペット内に引き込まれた距離 L の時間変化を測定する (A)。サンプルがピペット内に引き込まれた距離 L の時間変化の関係からサンプルの表面張力、粘性、弾性係数を評価する (B)。この例では、吸引開始直後に L が急激に立ち上がることから、吸引開始直後にサンプルは弾性的な応答を示すことがわかる。その後、 L が時間に比例して上昇することから、粘性的な応答を示すことがわかる。粘弾性モデルを用いてこのプロットをフィッティングすることで、サンプルの粘弾性パラメータを測定する。Guevorkian *et al.*, 2010 を参考に作成した (A, B)。

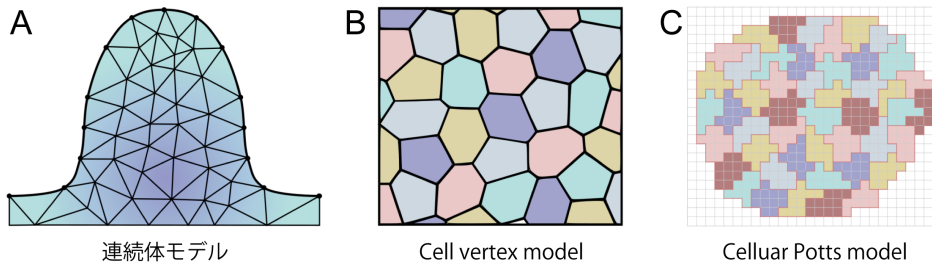


図 1.8 上皮組織の変形を記述する数理モデル

(A) 連続体モデル。上皮組織は細胞構造を無視した連続体として表される。メッシュは有限要素法による数値計算のための分割を表す。(B, C) 細胞が顕に表される数理モデル。Cell Vertex model は、細胞を多角形で表現する (B)。Cellular Potts model は、平面を格子で区切り、格子の集団によって細胞を表現する (C)。Sermeus *et al.*, 2022 より図を引用・改変した (A–C)。

2次元のCVMでは、細胞を多角形で近似する(図1.8B)。細胞の機械特性はポテンシャルエネルギーや細胞の力と形態特徴量を関連付ける力学モデルによって表現される。例えば、Farhadifarらはショウジョウバエ翅原基が持つ機械特性を、細胞頂点の座標 $\{\mathbf{x}\}$ に関するポテンシャルエネルギーによって表した(式1.1; Farhadifar *et al.*, 2007)。

$$U_0(\{\mathbf{x}\}) = \sum_{[ij]:\text{junction}} \Lambda l_{ij} + \sum_{i:\text{cell}} \frac{1}{2} \Gamma L_i^2 + \sum_{i:\text{cell}} \frac{1}{2} k (A_i - A_0)^2 \quad (1.1)$$

式1.1において、 l_{ij} および L_i 、 A_i は細胞の形態特徴量である。 l_{ij} は細胞 i と細胞 j を隔てる細胞接着面の長さを、 L_i および A_i は細胞 i の周囲長および面積を表す。これらの細

胞の形態特徴量は全て、細胞頂点の座標 $\{\mathbf{x}_i\}$ から計算される。 Λ および Γ 、 k 、 A_0 は細胞の機械特性に関する力学パラメータである。 Λ および Γ はそれぞれ細胞接着面の線張力および細胞皮質の弾性を表す。 k および A_0 はそれぞれ細胞の面積弾性係数および細胞の理想面積を表す。張力と圧力の定義は

$$T_{ij} \equiv \frac{\partial U_0}{\partial l_{ij}} \quad (1.2)$$

$$P_i \equiv -\frac{\partial U_0}{\partial A_i} \quad (1.3)$$

によって与えられるので、細胞接着面の張力 T_{ij} と細胞の圧力 P_i を式 1.4 および式 1.5 のように式 1.1 のポテンシャルエネルギーから求めることができる。

$$T_{ij} = \Lambda + \Gamma(L_i + L_j) \quad (1.4)$$

$$P_i = -k(A_i - A_0) \quad (1.5)$$

式 1.4 は細胞接着面の張力 T_{ij} と細胞周囲長の和 $L_i + L_j$ を関連付ける細胞接着面の張力モデルである。式 1.5 は細胞の圧力 P_i と細胞の面積 A_i を関連付ける細胞の圧力モデルである。逆に、細胞接着面と細胞の力学モデルをそれぞれ l_{ij} および A_i によって積分し、すべての細胞接着面と細胞に関して足し合わせるとポテンシャルエネルギーを得ることができる。

CVM において、組織変形は細胞頂点の移動や繋ぎ換えを行うことで再現する (Fletcher *et al.*, 2014)。細胞頂点の移動は、ポテンシャルエネルギーが小さくなるように、すなわち、細胞頂点に加わる細胞接着面の張力と圧力の合力に従って行われる (図 1.9A)。また、細胞頂点の繋ぎ換えは、細胞接着面が予め定めた基準長よりも短くなったときに実行される (図 1.9B)*²。

CVM は、1980 年代に基本的なコンセプトが提案されて以来、上皮組織形態形成の力学制御に関して多くの知見をもたらしてきた (Fletcher *et al.*, 2014; Alt *et al.*, 2017)。例えば、Farhadifar らは線張力や細胞皮質の弾性によって組織内の細胞形態や細胞配置が決定されうることを報告した (Farhadifar *et al.*, 2007)。また、Rauzi らは細胞接着面の弾性の異方性が引き起こす細胞配置換えが組織伸長の駆動に十分であることを示した (Rauzi *et al.*, 2008)。近年では、モデルの 3 次元への拡張や (Okuda *et al.*, 2015)、モルフォゲンや平面内細胞極性などの生化学シグナル動態と組織変形の相互作用を取り入れたモデルも提案されている (Schilling *et al.*, 2011; Salbreux *et al.*, 2012)。

*² 細胞頂点の繋ぎ換えと移動の具体的な計算手順は第 3.1 節を参照。

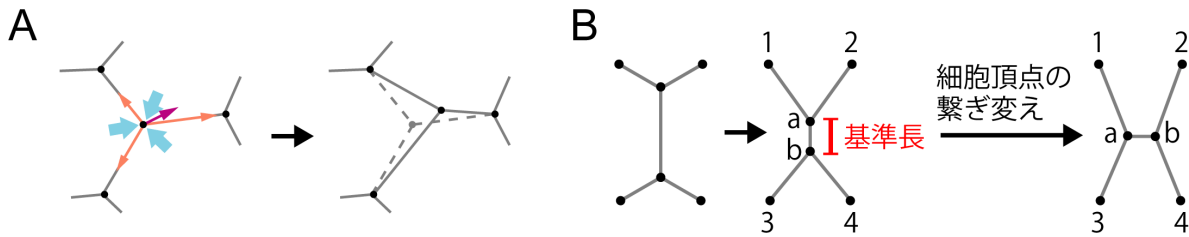


図 1.9 CVM における細胞頂点の移動と繋ぎ換え

(A) 細胞頂点の移動。黒点は細胞頂点、灰色線は細胞接着面を表す。細胞頂点に加わる細胞接着面の張力（オレンジ色矢印）と細胞の圧力（水色矢印）の合力（紫色矢印）に従って（左）、細胞頂点が移動する（右）。(B) 細胞頂点の繋ぎ換え。細胞接着面が収縮し、基準長よりも短くなったとき（中央）に細胞頂点の繋ぎ換えは実行される（右）。細胞頂点の繋ぎ換えが起こる前は、2とaおよび3とbの細胞頂点が接続している。細胞頂点の繋ぎ換えによって上記の接続が失われ、2とbおよび3とaの細胞頂点の接続が生成された。

1.6 先行研究におけるモデリングの問題点と本研究の目的

前節で述べたように、CVMは上皮細胞の機械特性が上皮組織の形態形成に与える影響の解明に多大な貢献を果たしてきた。一方で、CVMにおけるモデリングのプロセスについては、モデル構築・パラメータ推定・モデル評価のそれぞれに課題が残されている (Fletcher, 2022)。

まず、モデル構築において、力学モデルの関数を定性的な情報に基づいて決定している (図 1.10)。上皮細胞の機械特性の生体内における直接計測が技術的に困難であるため (第 1.4 節)、細胞の力学モデルの関数は、細胞を構成する分子や細胞接着面の張力に関する定性的な性質に基づいて推測される。例えば、Farhadifar らは、細胞接着面の myo-II や E-cad および細胞皮質のアクトミオシンの性質に基づいて力学モデルの関数を設定した (Farhadifar *et al.*, 2007)。また、Rauzi らは胚帯伸長期の上皮組織において特定の方向の細胞接着面に myo-II が濃縮するという実験事実に基づいて、細胞接着面の張力が方向依存性を持つ張力モデルの関数を構築した (Rauzi *et al.*, 2008)。しかしながら、このようなアプローチでは、定性的な関係に基づいて力学モデルの関数を決定する以上、関数自体の妥当性は不明である。したがって、より定量的な情報に基づいて力学モデルの関数を構築することが望ましい。

力学モデルのパラメータ推定は、数値計算と実験結果との要約統計量を介した間接的な比較を通じて行われる (図 1.11)。CVMのパラメータは、現実の上皮組織をよく再現するパラメータを探索することで推定されてきた。パラメータセットと組織形状を対応付けるために、多くのパラメータセットを用いた網羅的な数値計算が行われる。数値計算に

よって得られた結果は、現実の上皮組織と比較されるが、上皮組織内の全ての細胞の形状や位置を比較することはできない。そこで、少数の特徴を定量的に表した要約統計量を介して間接的な比較が行われる。例えば、Farhadifar らは組織内の細胞の多角形分布や、多角形ごとの面積の分布に基づいてショウジョウバエ翅原基の力学パラメータを推定した (Farhadifar *et al.*, 2007)。Nestoro-Bergmann らはこの方向性をより発展させ、多角形ごとの面積分布の二乗誤差に基づいて尤度を計算し、アフリカツメガエル胚の上皮組織の力学パラメータを推定した (Nestoro-Bergmann *et al.*, 2018)。さらに、Kursawe らは複数の要約統計量を組み合わせた要約統計量を用いて近似ベイズ計算 (approximate Bayesian computation) を行い、パラメータの事後分布を計算する方法を提案した (Kursawe *et al.*, 2018)。

しかしながら、数値計算と要約統計量を用いたパラメータ推定は前述の通り網羅的な数値計算を必要とするため、多くの計算リソースを必要とする。例えば Kursawe らの方法は、2つの力学パラメータを推定するために 10^6 回もの数値計算を必要とする (Kursawe *et al.*, 2018)。したがって、張力の異方性などより多くの力学パラメータを持つ複雑な力学モデルのパラメータ推定は現実的に難しい。また、時間刻みや細胞配置換え処理など、数値計算の詳細な設定は数値の結果に影響するため、これらの設定には入念な検討が必要である (Kursawe *et al.*, 2017)。さらに、数値計算の結果を現実の上皮組織と比較する際に用いる要約統計量の選択に力学パラメータの推定精度が依存することも明らかになっている (Kursawe *et al.*, 2018)。したがって、数値計算や要約統計量に依存しないパラメータ推定法が必要とされている。

最後に、CVM において統計的な力学モデルの選択方法が未だに確立していない。一般に、ある現象を表すモデルの関数は複数の候補が考えられるため、候補モデルの中から適切なものを選択する必要がある。適切なモデルを選択する問題はモデル選択と呼ばれ、統計学において盛んに研究されている (下平ら, 2004)。CVM を用いた先行研究では、前

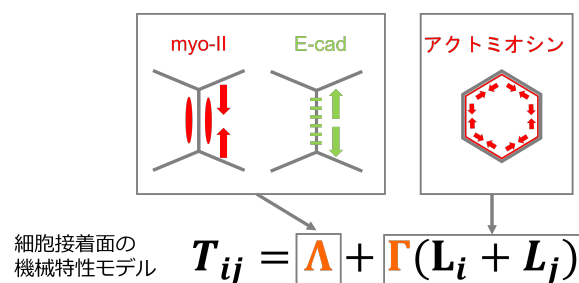


図 1.10 先行研究におけるモデル構築

myo-II や E-cad が細胞接着面を短くしたり、長くしたりする性質や、細胞皮質のアクトミオシンが細胞周囲長を収縮する性質といった分子に関する定性的な情報に基づいて細胞接着面の張力モデルの関数を設定する。

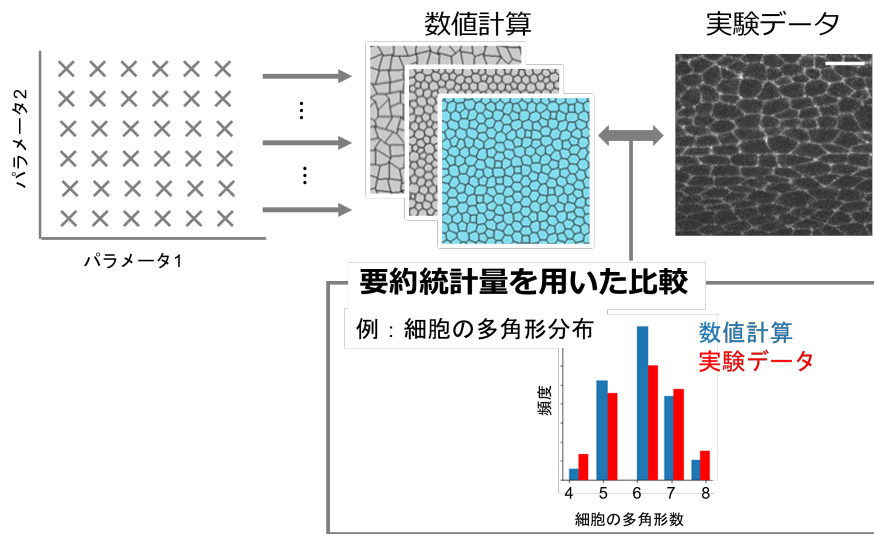


図 1.11 先行研究におけるパラメータ推定

力学パラメータの値を振って網羅的に数値計算を実施し、数値計算結果を実験データと比較する。この比較の際に、細胞の多角形分布などの要約統計量を用いる。実験データに近い要約統計量の値を持つ数値計算結果を生成した力学パラメータの値を、推定値として取得する。

述のパラメータ推定の困難さが原因で、モデル選択を頭に行っているものは少ない。例えば、Tetley らは細胞接着面の機械特性を表す 3 つの力学モデルについて数値計算を行い、細胞形状が最も現実の組織に近い力学モデルを選択した (Tetley *et al.*, 2018)。このように、CVM におけるモデル選択は、力学モデルの数値計算結果と実験結果との定性的な比較にとどまっており、より定量的な指標に基づいてモデル選択を行う必要がある。

CVM におけるモデリングにおける問題点は以下のようにまとめられる。

- 定性的な情報に基づいたモデル構築
- 数値計算と要約統計量による間接的な比較を介したパラメータ推定
- 定性的なモデル選択

そこで本研究では、細胞の力と形態特徴量の定量的な性質に基づくモデル構築や、数値計算や要約統計量に依存しないパラメータ推定、および統計的な指標に基づいたモデル選択を提案することを目指した。

1.7 本研究の内容

本研究では上皮細胞の機械特性を表す力学モデルとそのパラメータを上皮組織の画像データから推定する手法を開発した (図 1.12)。開発した手法をショウジョウバエ上皮組

織に適用することで上皮組織形態形成における新たな力学制御機構を見出した。

開発した手法ではまず、上皮組織の画像データから力のベイズ推定法を用いて細胞の力と形態特徴量の相関を取得し、この相関が持つ特徴を基にして、力学モデルの関数を決定する。次に、構築した力学モデルの関数を細胞頂点における力の釣り合い方程式に代入し、この方程式を解くことで力学パラメータの推定値を得る。最後に、広く用いられるモデル評価指標である赤池情報量規準 (Akaike information criterion; AIC) を用いて、複数の力学モデルの中から最も適した力学モデルを選択する。本手法は上皮組織画像データに対して、組織中の上皮細胞が持つ機械特性を表す最適な力学モデルと力学パラメータの推定を可能にする。

本手法のパラメータ推定の正確性やモデル選択の妥当性を数値計算により生成した人工データを用いて検証した。また、人工データおよびショウジョウバエ上皮組織画像データに人工的に誤差を加えてパラメータ推定を行い、パラメータ推定が画像解析による誤差に対して十分な頑健性を持つことを確認した。さらに、ショウジョウバエ上皮組織画像データに本手法を適用し、推定した力学パラメータを用いて計算した細胞接着面の張力が、先行研究において報告された体軸に対する方向依存性を再現することを確認した。

次に、本手法をショウジョウバエ上皮組織に適用し、上皮細胞の持つ機械特性を解析した。AICによるモデル選択の結果から、従来用いられてきた細胞接着面の張力モデルよりも、本手法によって構築された張力モデルのほうがショウジョウバエ上皮細胞の性質をより良く反映していることが示唆された。推定した力学パラメータの解析により、細胞接着面張力の異方性を制御する力学パラメータの発生過程に伴う変化が明らかになった。最後に、遺伝学的操作および外科的操作をショウジョウバエ上皮組織に施し、操作を施した上皮組織の画像に本手法を適用することで、これらの操作が力学パラメータに与える影響を解析した。

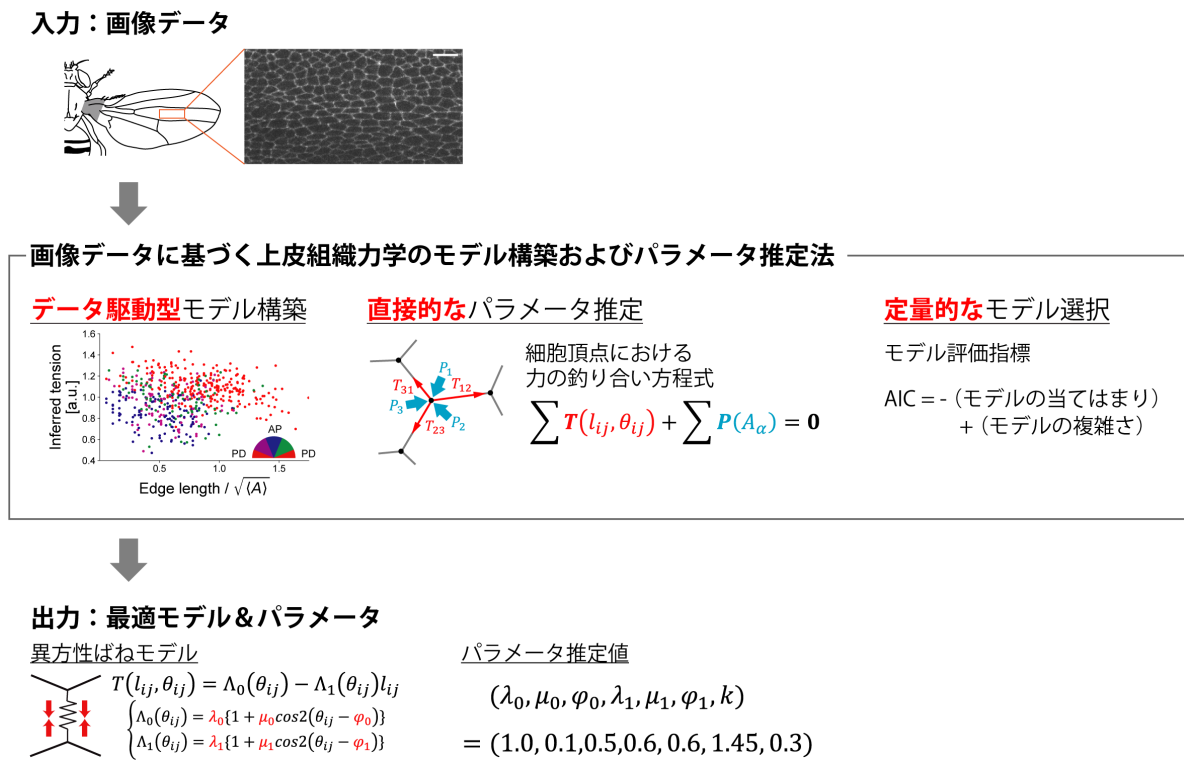


図 1.12 本研究で開発した手法の概要

本手法は、画像データを入力として、最適な力学モデルと力学パラメータを出力する。本手法ではまず、画像データから推定した細胞の力と形態特徴量の相関から力学モデルの関数を構築する。次に、構築した力学モデルの関数を細胞頂点における力の釣り合い方程式に代入し、この方程式を解くことで力学パラメータの推定値を得る。最後に、最小 AIC 法によって複数の力学モデルの中から最も適した力学モデルを選択する。本手法の各ステップの詳細については、第 2 章で説明する。

第 2 章

本研究において開発した手法

第 2 章では、本研究において開発した上皮組織のモデル構築およびパラメータ推定法を解説する。本手法ではまず、力のベイズ推定法によって得られた細胞の力と形態特徴量の相関から、細胞の機械特性を解析する（第 2.1 節）。次に、解析によって得られた細胞の機械特性の特徴を基に、細胞の力と形態特徴量を結ぶ力学モデルを複数構築する（第 2.2 節）。続いて、AJ 面上の細胞頂点における力の釣り合い方程式にモデル式を代入し解くことで、力学モデルのパラメータ推定を行う（第 2.3 節）。最後に、最小 AIC 法を用いて最適な力学モデルを選択する（第 2.4 節）。

2.1 画像データに基づく細胞の力と形の相関の定量

本手法ではまず、力のベイズ推定法を用いて上皮組織の画像から細胞の力を推定した。さらに、先行研究 (Ishihara and Sugimura, 2012) の方法に倣って、推定した力を細胞の形態特徴量に対してプロットすることで、細胞の力と形態特徴量の相関を解析した。

まず、力のベイズ推定法を用いた機械特性の解析の妥当性を、機械特性が予め知られている物質を用いて検証した。泡の界面の張力は、界面の長さや向きに関わらず一定であることが知られている (Cantat *et al.*, 2013)。泡の画像に力のベイズ推定法を適用し、得られた泡の界面の張力を長さおよび向きに対してプロットした。結果を図 2.1 に示す。張力の推定値は界面の長さおよび方向にかかわらず一定であり (図 2.1D)、力のベイズ推定法に基づく力と形態特徴量の相関は物質の機械特性を正しく反映しうることが示唆された。

次に、ショウジョウバエ蛹の翅上皮の細胞輪郭が標識された画像データに力のベイズ推定法を適用し、細胞接着面の張力と細胞接着面の長さおよび向きとの相関を調べた (図

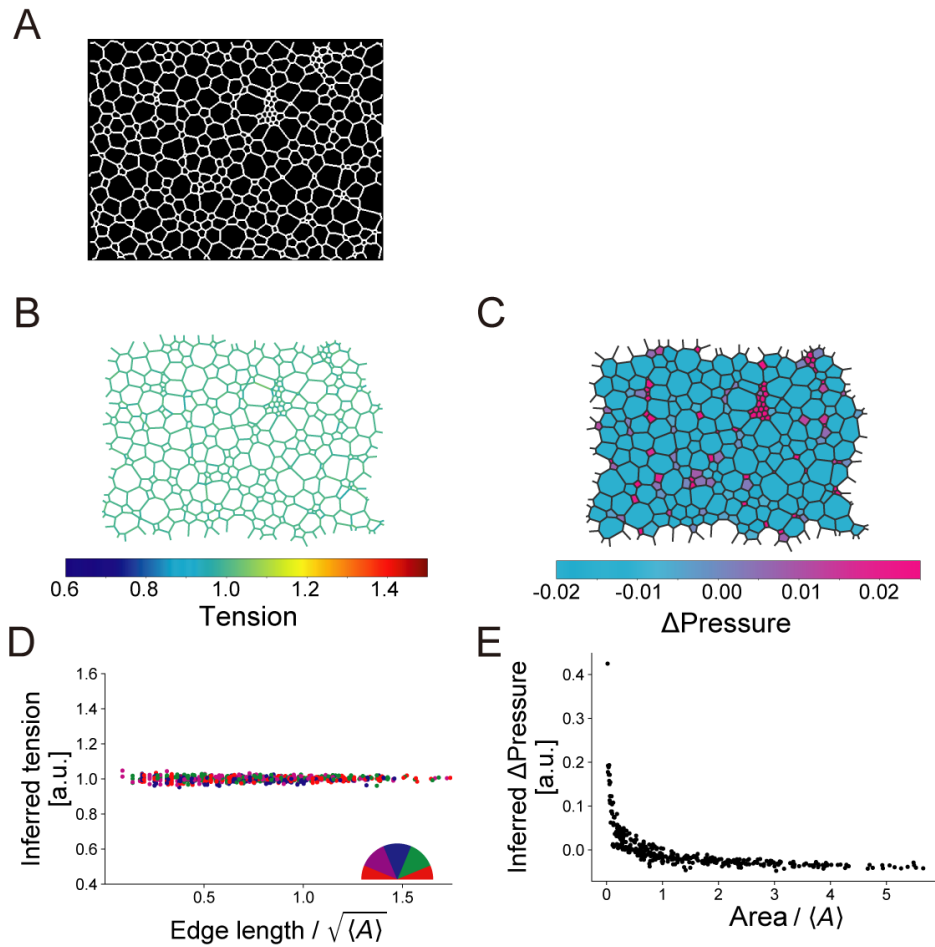


図 2.1 力のベイズ推定法によって推定した泡の力と形態特徴量の関係

(A) 推定に用いた泡の画像 (Lordereau 2002 より引用)。(B, C) 力のベイズ推定法によって推定した泡の張力 (B) および圧力 (C) の分布。(B) 泡の界面の色はカラーバーで示された張力の推定値に対応する。(C) 泡の色はカラーバーで示された圧力の推定値に対応する。(D, E) 泡における力と形態特徴量の関係。(D) 泡の界面の張力を界面の長さおよび向きに対してプロットした。グラフ内の半円は点の色と泡の表面の向きとの対応を示す。例えば、(A) において画像水平方向を向く界面は赤い点で表される。(E) 泡の圧力を面積に対してプロットした。 $\langle A \rangle$ は泡の平均面積を表す。

2.2)。結果として、細胞接着面の張力は以下の 3 点の特徴を示すことが明らかになった (図 2.3)。

第一に、細胞接着面の張力と向きとの関係に着目すると、遠近 (PD) 軸向きの細胞接着面が前後 (AP) 軸向きの細胞接着面よりも強い張力を示すことがわかった (図 2.3A)。したがって、細胞接着面の張力は体軸に対して方向依存性 (異方性) を示すことが明らかになった。第二に、同じ向きの細胞接着面を比較すると、細胞接着面の張力は細胞接着面の長さとの負の相関を示し、細胞接着面は負のばね弾性を持つことが示唆された (図 2.3B)。

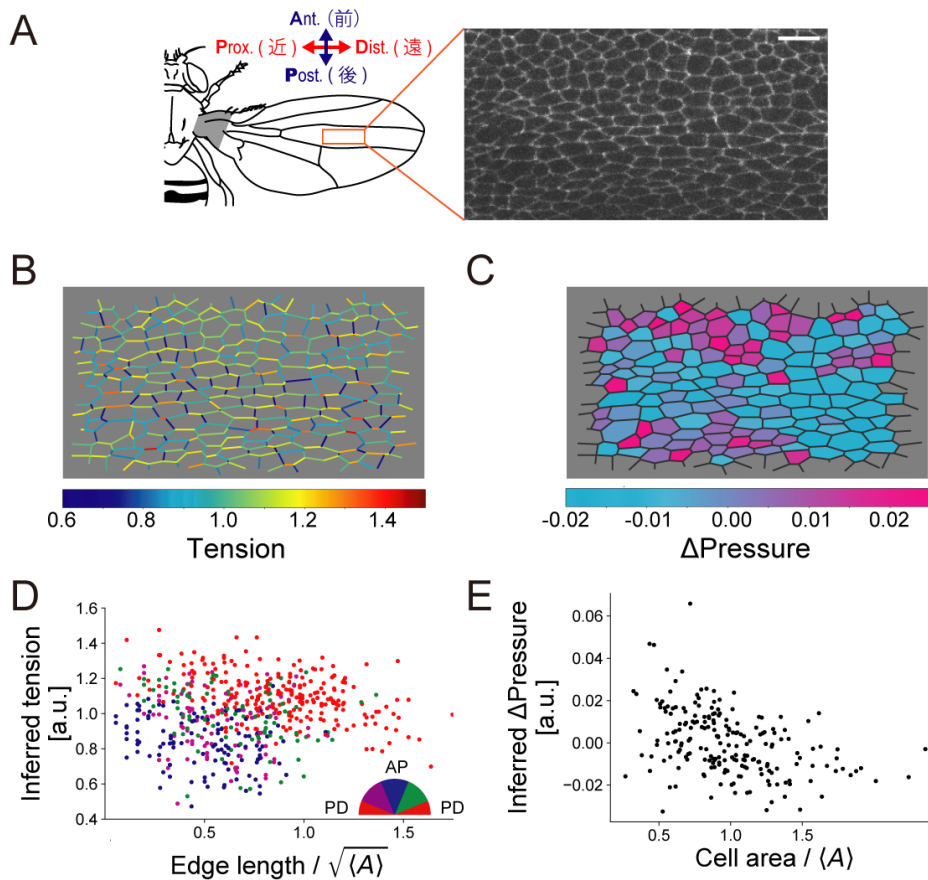


図 2.2 力のベイズ推定法によって推定した力と細胞の形態特徴量の関係（ショウジョウバエ蛹の翅）

(A) 推定に用いたショウジョウバエ蛹の翅上皮の画像。左図のオレンジ色の四角はパラメータ推定に用いた領域を示す。右画像は E-cad を蛍光標識したショウジョウバエから撮影されたものである。垂直および水平方向はそれぞれ AP 軸方向および PD 軸方向を示す。スケールバー：10 μm 。(B, C) 力のベイズ推定法によって推定した細胞接着面の張力 (B) および圧力 (C) のマップ。(B) 細胞接着面の色はカラーバーで示された張力の推定値に対応する。(C) 細胞の色はカラーバーで示された圧力の推定値に対応する。(D, E) 蛹の翅上皮における細胞の力と形態特徴量の関係。(D) 細胞接着面の張力を細胞接着面の長さおよび向きに対してプロットした。グラフ内の半円は点の色と細胞接着面の体軸に対する向きとの対応を示す。例えば、(A) において PD 軸方向（水平方向）を向く細胞接着面は赤色の点、AP 軸方向（垂直方向）を向く細胞接着面は青色の点で表される。(E) 細胞の圧力を細胞の面積に対してプロットした。 $\langle A \rangle$ は細胞の平均面積を示す。

第三に、AP 軸方向の細胞接着面の張力は、PD 軸方向の細胞接着面よりも強く細胞接着面の長さに依存しており、細胞接着面の負のばね弾性の強さも異方性を示すことがわかった (図 2.3C)。

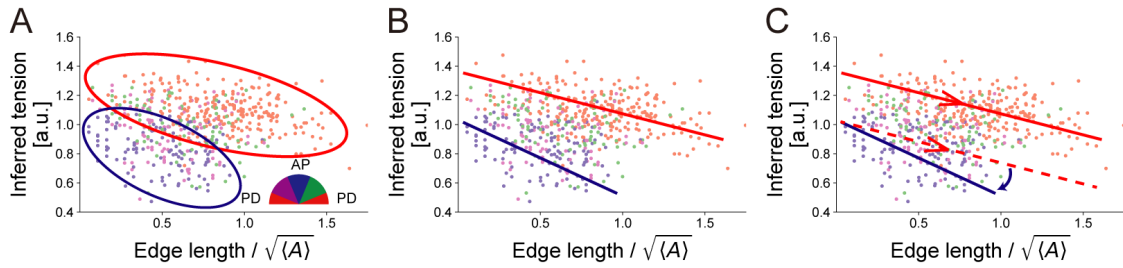


図 2.3 細胞接着面の張力と長さの相関の持つ性質（ショウジョウバエ蛹の翅）

(A) 赤い点で示された PD 軸方向の細胞接着面は青い点で示された AP 軸方向きの細胞接着面に比べてより強い張力を示す。グラフ内の半円は点の色と細胞接着面の体軸に対する向きとの対応を示す。(B) 同じ方向を向く細胞接着面の張力は、それぞれ細胞接着面の長さに対して負の依存性を示す。(C) AP 軸方向の細胞接着面は、PD 軸方向の細胞接着面に比べてより強い負の依存性を示す。赤点線は赤線の平行であり、PD 軸方向の細胞接着面の負の依存性の強さに対応する。青線は赤点線よりも傾きが大きいことから、AP 軸方向の細胞接着面は PD 軸方向の細胞接着面よりも強い負の依存性を持つことがわかる。 $\langle A \rangle$ は細胞の平均面積を示す。

2.2 細胞の力学モデルの構築

前節で得られた細胞接着面の張力と長さ・向きの相関が持つ 3 つの特徴（図 2.3）に基づいて、式 2.1 の異方性ばねモデルを構築した。

$$T(l_{ij}, \theta_{ij}) = \Lambda_0(\theta_{ij}) - \Lambda_1(\theta_{ij})l_{ij} \quad (2.1)$$

l_{ij} と θ_{ij} はそれぞれ、 i 番目と j 番目の細胞間の細胞接着面の長さと同画像水平方向右向きに対する角度を表す。 $\Lambda_0(\theta_{ij})$ および $\Lambda_1(\theta_{ij})$ はそれぞれ、細胞接着面の線張力および細胞接着面の張力の細胞接着面の長さに対する負の依存性を表す。なお、本論文では、 $\Lambda_1(\theta_{ij})$ がばね定数と同じ次元を持つことから、 $\Lambda_1(\theta_{ij})$ を「細胞接着面の負のばね定数」と呼称する。 $\Lambda_0(\theta_{ij})$ および $\Lambda_1(\theta_{ij})$ は次式で定義した。

$$\begin{cases} \Lambda_0(\theta_{ij}) = \lambda_0 \{1 + \mu_0 \cos 2(\theta_{ij} - \varphi_0)\} \\ \Lambda_1(\theta_{ij}) = \lambda_1 \{1 + \mu_1 \cos 2(\theta_{ij} - \varphi_1)\} \end{cases} \quad (2.2)$$

$\Lambda_0(\theta_{ij})$ および $\Lambda_1(\theta_{ij})$ は異方性を示し、その強さは μ_0 および μ_1 、向きは φ_0 および φ_1 によって決まる（図 2.4）。本研究で解析したすべてのショウジョウバエ上皮組織において、細胞接着面の張力と長さは負に相関したため、 $0 \leq \Lambda_1(\theta_{ij})$ 、すなわち $0 \leq \mu_1 \leq 1$ とした。

先行研究において、細胞接着面の張力の細胞接着面の長さに対する負の依存性は、細胞接着面の収縮と myo-II 濃縮による細胞接着面の張力上昇のフィードバックを表す効果と

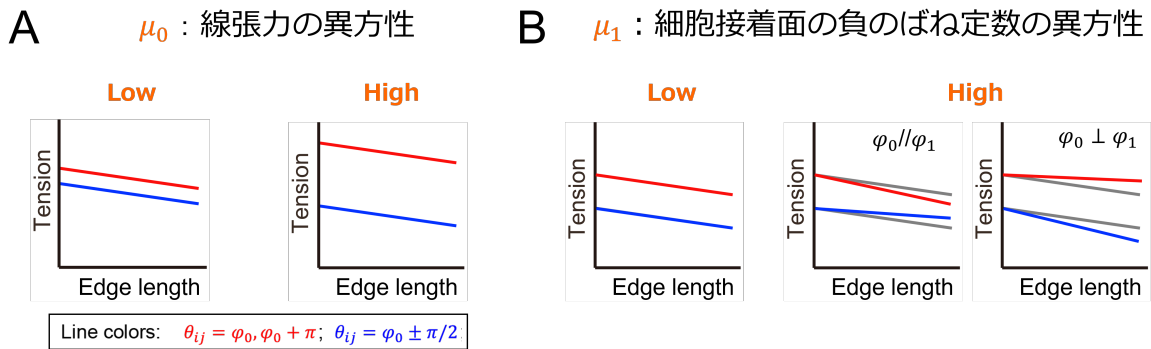


図 2.4 力学パラメータの異方性の大きさと細胞接着面張力の関係

(A) 細胞接着面の線張力の異方性 μ_0 の値の大小による細胞接着面の張力と長さ・向きの変化。線張力の異方性は μ_0 の値に依存し、 μ_0 の値が大きいほど φ_0 方向と $\varphi_0 + \pi$ 方向の細胞接着面の張力差が大きくなる。(B) 細胞接着面の負のばね定数の異方性 μ_1 の影響。 μ_1 が低い場合、細胞接着面の張力の長さに対する依存性は細胞接着面の方向によらず一定だが (左)、 μ_1 が高い場合は細胞接着面の張力の長さに対する依存性が細胞接着面の方向によって大きく変化する (中央および右)。 φ_0 と φ_1 が同じ方向の場合は、細胞接着面の長さが長くなるにつれ張力異方性 (赤線と青線の差) が小さくなり (中央)、 φ_0 と φ_1 が直交するときは細胞接着面の長さが長くなるにつれ張力異方性 (赤線と青線の差) が大きくなる (右)。

して導入されている (図 2.5; Tetley *et al.*, 2016; Lan *et al.*, 2015; Siang *et al.*, 2018)。ショウジョウバエ蛹期の翅上皮や胚帯伸長 (Germband extension; GBE) 期の胚帯における方向性を持った細胞配置換えでは (第 3.2 節参照)、細胞接着面の収縮に伴って myo-II が濃縮することが知られている (図 2.5A; Rauzi *et al.*, 2010; Bardet *et al.*, 2013; Tetley *et al.*, 2016)。myo-II 濃縮は張力の上昇を引き起こし、さらなる細胞接着面の収縮を促進することから、細胞接着面の収縮と myo-II 濃縮および張力の上昇の間には正のフィードバックループが形成される (図 2.5B; 以下では myo-II 濃縮フィードバックとする; Tetley *et al.*, 2016)。

細胞接着面の張力が細胞接着面の長さに対して負の依存性を示す場合も同様に、細胞接着面の収縮は張力の上昇を引き起こし、張力の上昇によって細胞接着面は更に収縮する (図 2.5C)。すなわち、異方性ばねモデルにおいて細胞接着面の負のばね定数 $\Lambda_1(\theta_{ij})$ の異方性を決定する (μ_1, φ_1) は、myo-II 濃縮フィードバックの異方性の強さと向きを表していると考えられる。

本研究では異方性ばねモデル (式 2.1) に加えて、より単純な張力モデルも検討した (図 2.6A)。以下では、パラメータを多く持つ複雑な張力モデルから順にモデル A–E と呼ぶ。モデル A は式 2.1 で定義されるフルモデルであり、細胞接着面の線張力とばね定数が共に異方性を示す。モデル B は $\mu_0 = 0$ とし、細胞接着面のばね定数の異方性を省略した。モ

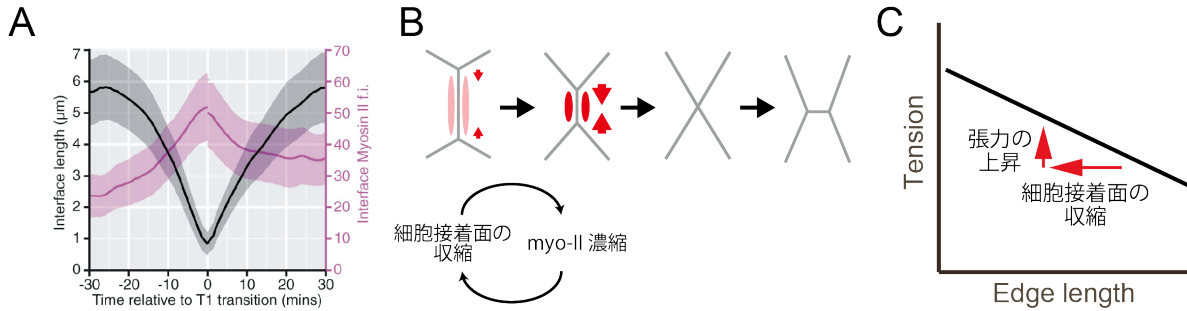


図 2.5 myo-II 濃縮フィードバック

(A) 方向性を持った細胞配置換えにおける細胞接着面の収縮と myo-II 濃度の定量 (GBE 期、胚帯)。横軸は細胞接着面の切り替わった時間を 0 分とした時間を表す。細胞接着面の長さを黒で、蛍光標識した myo-II の細胞接着面近傍の蛍光強度をマゼンタで表す。0 分以前に着目すると、細胞接着面の収縮 (黒線) に伴って myo-II 蛍光強度が上昇しているのがわかる。Tetley *et al.*, 2016 より引用。(B) 方向性を持った細胞配置換えにおける myo-II 濃縮の模式図。赤い丸および赤矢印はそれぞれ細胞接着面に局在する myo-II および細胞接着面の張力を表す。赤い丸の色の濃さは myo-II の濃度を、矢印の大きさは張力の強さに対応する。細胞接着面の収縮によって細胞接着面に局在する myo-II が濃縮し、細胞接着面の張力が上昇する。細胞接着面の張力上昇はさらなる細胞接着面の収縮と myo-II の濃縮を引き起こす。つまり、細胞接着面の収縮と myo-II 濃縮による張力上昇は正のフィードバック (myo-II 濃縮フィードバック) を形成する。(C) 細胞接着面の負のばね弾性は myo-II 濃縮フィードバックに対応する。B と同様に、細胞接着面の収縮 (左矢印) は張力の上昇 (上矢印) を引き起こす。

デル C は、 $\mu_0 = \mu_1 = 0$ とし、張力は細胞接着面の長さのみに依存する。モデル D では、 $\Lambda_1(\theta_{ij}) = 0$ とし、細胞接着面は異方的な線張力のみを示す。最後にモデル E では、細胞接着面は張力一定、つまり、 $T_{ij}(l_{ij}, \theta_{ij}) = \lambda_0$ とした。

細胞の圧力と細胞の面積は負に相関したため (図 2.2E)、先行研究に従って以下の圧力モデルを用いた (Farhadifar *et al.*, 2007)。

$$P(A_i) = -kA_i + P_0 \quad (2.3)$$

式 2.3 において、 A_i は i 番目の細胞の面積を表す。 k および P_0 はそれぞれ細胞の面積弾性係数および静水圧を示す*¹。他の圧力モデルも検討したが、圧力モデルの選択はこれ以降に記載する張力パラメータの解析結果にほとんど影響を与えなかった (図 2.7)。

張力モデルは本研究において構築した異方性ばねモデルに加えて、広く用いられている力学モデル (以降典型モデルと呼ぶ) も検討した (式 1.4 参照; Alt *et al.*, 2017; Fletcher *et al.*, 2014)。本研究では異方性ばねモデルと同様に、式 1.4 の線張力 $\Lambda(\theta_{ij})$ および細胞

*¹ $P_0 = kA_0$ とすれば、式 1.5 と式 2.3 は一致する。

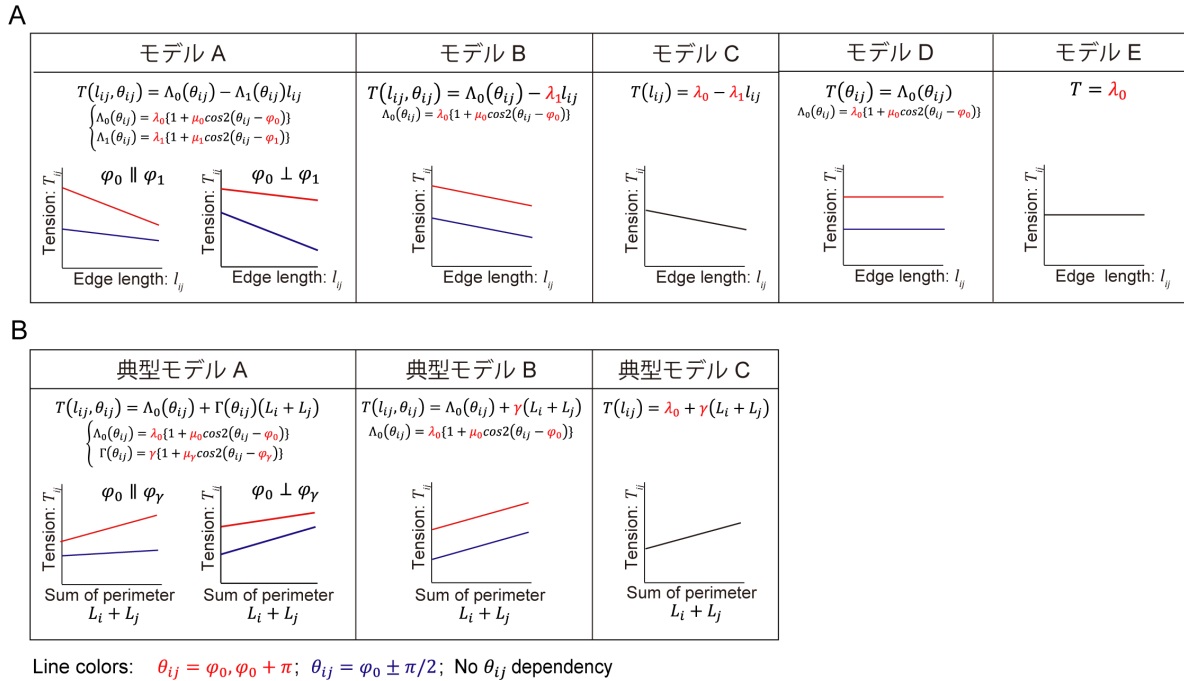


図 2.6 本研究で検討した細胞接着面の張力モデル

(A) 本研究で構築した候補モデル。(B) 典型モデル。各張力モデルに対して、張力モデルの式および細胞接着面張力と細胞接着面の長さ・向きとの関係の模式図を示す。張力モデルの式の中の赤字は力学パラメータを表す。

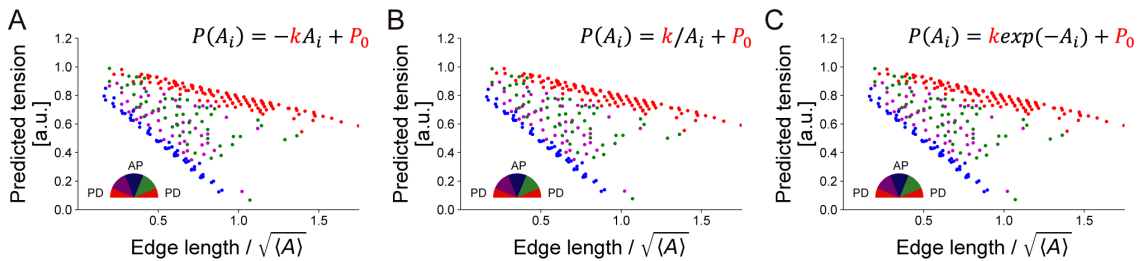


図 2.7 圧力モデルの違いが張力の予測値に与える影響

(A–C) 力学パラメータの推定値を用いて計算した張力の予測値を細胞接着面の長さに対してプロットした。グラフ内の半円は点の色と細胞接着面の体軸に対する向きとの対応を表す。推定には圧力の関数として、 $P(A_\alpha) = -kA_\alpha + P_0$ (A; 図 2.2C と同じグラフである) および $P(A_\alpha) = k/A_\alpha + P_0$ (B)、 $P(A_\alpha) = k \exp(-A_\alpha) + P_0$ (C) を用いた。 A_α は平均面積を用いて標準化している (第 8.2.1 項参照)。

皮質の弾性係数 $\Gamma(\theta_{ij})$ に異方性を導入した (式 2.4)。

$$T(L_i, L_j, \theta_{ij}) = \Lambda_0(\theta_{ij}) + \Gamma(\theta_{ij})(L_i + L_j) \quad (2.4)$$

上式において、 L_i および L_j は i 番目および j 番目の細胞の周囲長を示す。さらに、異方性の一部あるいは全てを省略したより単純な張力モデルも検討した (図 2.6B)。

表 2.1 に本研究で検討した力学モデルのパラメータをまとめた。

力学モデル	力学パラメータの名称	等方成分	異方成分	
			異方性の強さ	異方性の向き
張力	細胞接着面の線張力	λ_0	μ_0	φ_0
	細胞接着面の負のばね定数* ²	λ_1	μ_1	φ_1
	細胞皮質の弾性係数	γ	μ_γ	φ_γ
圧力	細胞の面積弾性係数	k		
	細胞の静水圧	P_0		

表 2.1 本研究で検討した力学モデルのパラメータ一覧。

*² 細胞接着面の負のばね定数の定義は 2.2 節を参照。

2.3 力学パラメータの推定

本手法では、AJ 平面上の細胞頂点における力の釣り合い方程式を解くことで細胞の力学モデルのパラメータ推定を行う (図 2.8)。まず、上皮組織を多角形の細胞によって敷き詰められた 2 次元のシートとみなす (図 2.8A)。細胞 i と細胞 j の間の細胞接着面の張力は T_{ij} であり、 i 番目の細胞の圧力は P_i であるとする (図 2.8B, C)。図 2.8D に示した細胞頂点に働く張力と圧力の合力 $\mathbf{f}_0 = (f_0^x, f_0^y)$ は、式 2.5 で与えられる。

$$\begin{cases} f_0^x &= a_1^x T_{12} + a_2^x T_{23} + a_3^x T_{31} + b_1^x P_1 + b_2^x P_2 + b_3^x P_3 \\ f_0^y &= a_1^y T_{12} + a_2^y T_{23} + a_3^y T_{31} + b_1^y P_1 + b_2^y P_2 + b_3^y P_3 \end{cases} \quad (2.5)$$

上式における張力および圧力の係数は、細胞頂点の座標から計算できる。例えば、張力の係数は $a_1^x = (x_1 - x_0)/l_{12} = \cos(\theta_{12})$ や $a_1^y = (y_1 - y_0)/l_{12} = \sin(\theta_{12})$ のように計算される。圧力の係数は、 $b_1^x = (y_2 - y_1)/2$ や $b_1^y = -(x_2 - x_1)/2$ のように計算される*3。

同様にして、上皮組織画像内のすべての細胞頂点に加わる力を考える。上皮組織の画像に含まれる細胞頂点の数を n 、細胞接着面と細胞の数の和を m とする。このとき、細胞頂点に働く合力の x 成分および y 成分を並べた $\mathbf{F} = (f_0^x, f_0^y, f_1^x, f_1^y, \dots)$ は、 $2n$ 次元のベクトルである。 $\mathbf{X} = (\mathbf{T}, \mathbf{P})$ を T_{ij} および P_i で構成された m 次元のベクトルと置くと、 \mathbf{F} は \mathbf{X} を用いて、

$$\mathbf{F} = \mathbf{C}\mathbf{X} \quad (2.6)$$

と表される。上式において、 \mathbf{C} は力の釣り合い方程式の係数 a や b で構成された $2n$ 行 m 列の行列である (Ishihara and Sugimura, 2012)。組織形態形成を準静的過程と仮定すると、

$$\mathbf{F} = \mathbf{C}\mathbf{X} \cong \mathbf{0} \quad (2.7)$$

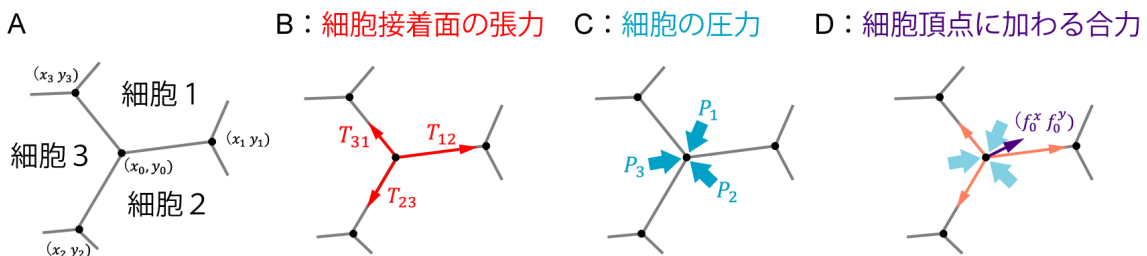


図 2.8 細胞頂点に加わる合力の計算

(A) 上皮細胞を多角形で近似する。すなわち、細胞接着面を直線とみなす。(B, C) 細胞の力。細胞接着面の張力 (B) および細胞の圧力 (C)。(D) 細胞頂点に加わる合力。

*3 各細胞頂点において、圧力の係数の和は 0 となる。例えば、 $b_1^x + b_2^x + b_3^x = (y_2 - y_1)/2 + (y_3 - y_2)/2 + (y_1 - y_3)/2 = 0$ である。したがって、静水圧 P_0 は式から消えてしまい、推定できない。

が成り立つ*4。

第2.2節で構築した細胞の力学モデルを用いると、細胞接着面の長さ l_{ij} および角度 θ_{ij} や、細胞の面積 A_i から、細胞接着面の張力 T_{ij} および細胞の圧力 P_i をそれぞれ $T_{ij} = T(l_{ij}, \theta_{ij}; \beta_T)$ や $P_i = P(A_i; \beta_P)$ のように計算できる (β_T, β_P ; 張力モデルおよび圧力モデルのパラメータ)。計算した張力や圧力を代入すると、式2.7は β_T および β_P に関する方程式となる。したがって、この方程式を解けば、力学パラメータを推定できる。解法の詳細は第8.2.2項および第9.1節に記す。

本手法を用いて力学パラメータを推定するためには、細胞接着面の長さなどの形態特微量が十分にばらついている必要がある。例えば、正六角形が敷き詰められた画像では各頂点における力の釣り合いが1つの方程式で表される。したがって、パラメータを多く持つ複雑な力学モデルの推定には条件式が不足し、原理的に力学パラメータを推定できない。

図2.9A および B にショウジョウバエ蛹の翅上皮の画像から推定した力学パラメータを用いて計算した張力および圧力の予測値と形態特微量の相関を示す。張力の予測値は、第2.1節で解析した細胞接着面の張力および長さ・向きの相関を持つ特徴(図2.3)をよく捉えていた。さらに、張力と圧力の予測値は力のベイズ推定法により推定した張力および圧力とよく相関した(図2.9C, D)。

2.4 最小 AIC 法によるモデル選択

第2.2節において、細胞の力と形態特微量の相関に基づいて、複数の張力モデル(候補モデル)を構築した。複数の候補モデルから適切なものを選択する問題は、モデル選択と呼ばれる(図2.10)。本研究で開発した手法では、モデル評価基準の一つである赤池情報量規準(Akaike information criterion, AIC)を用いて、複数の張力モデルの中から最も適切なものを選択した(Akaike 1973; Kirk *et al.*, 2013)。

情報量規準はモデルの当てはまりの良さのみでなく、予測の観点からモデルを比較する統計的な基準である。一般に、単純すぎるモデルは当てはまりが悪く、データを十分に説明できない(過少適合; 図2.10B 左)。一方、複雑なモデルはパラメータ推定に用いたデータセットに対しては当てはまりが良くなるが、新たに得られた別のデータセットに対しては当てはまりが悪くなる(過剰適合*5; 図2.10B 右)。情報量規準は、複雑さと当てはまりの良さのバランスが最も取れたモデルを最適モデルとして選択する(図2.10B

*4 前述の通り、この方程式の未知数および方程式の数は、それぞれ m 個および $2n$ 個である。幾何的な制約から必ず $m < 2n$ が成り立つため、この問題は劣決定問題である(Ishihara and Sugimura, 2012)。したがって、この方程式の解は一意に定まらない。これをベイズの定理によって対処したのが力のベイズ推定法である。詳細は第8.1節を参照。

*5 過学習とも呼ばれる。

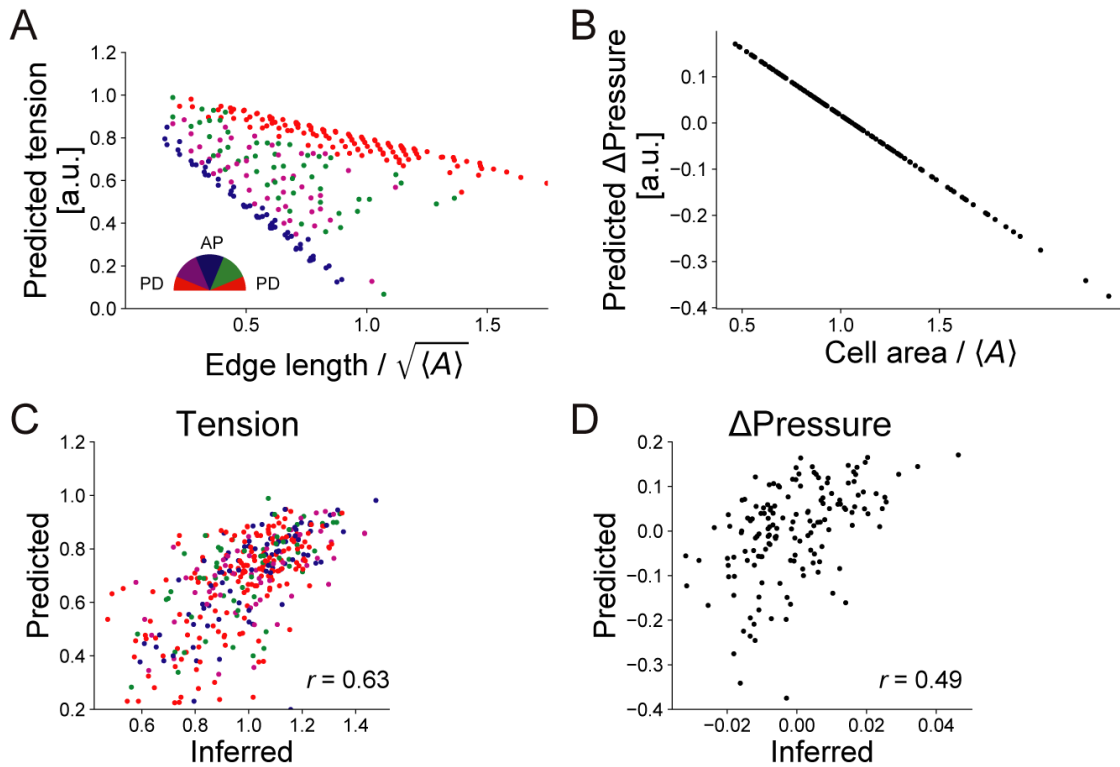


図 2.9 力学パラメータの推定値を用いて計算した細胞の力

(A, B) 力学パラメータの推定値を用いて計算した細胞の力と細胞の形態特徴量の関係。(A) 細胞接着面の張力を細胞接着面の長さおよび向きに対してプロットした。グラフ内の半円は点の色と細胞接着面の体軸に対する向きとの対応を示す。(B) 細胞の圧力を細胞の面積に対してプロットした。 $\langle A \rangle$ は細胞の平均面積を示す。(C, D) 力学パラメータの推定値を用いて計算した細胞の力（縦軸）と力のベイズ推定法で推定した細胞の力（横軸）の相関。C は細胞接着面の張力、D は細胞の圧力について解析した結果を示す。グラフ右下に相関係数を示す。

中央)。情報量規準には本研究で用いる AIC のほかに、ベイズ情報量規準 (Bayesian information criterion, BIC) や広く使える情報量規準 (Widely applicable information criterion, WAIC) など様々なものが提案されている (小西・北川, 2004)。

AIC は広く用いられる情報量規準のひとつであり、モデルの当てはまりの良さおよび複雑さにそれぞれ対応するモデルの最大対数尤度と自由パラメータ数を用いて、

$$AIC = -2(\text{モデルの最大対数尤度}) + 2(\text{自由パラメータ数}) \quad (2.8)$$

と表される。比較するモデルのそれぞれに対して AIC を計算し、AIC の値が最小となるモデルが最適モデルとして選択される (図 2.10C)。

本研究のパラメータ推定問題において、細胞頂点に働く合力が平均 0 の正規分布に従う

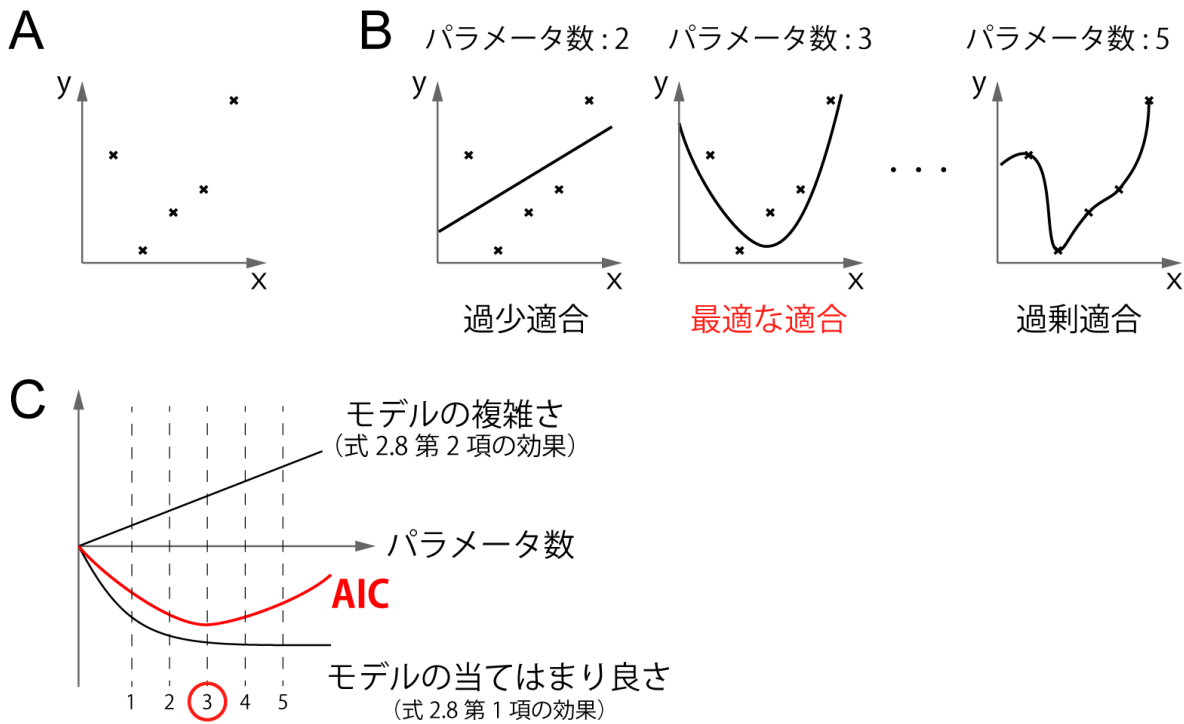


図 2.10 AIC によるモデル選択

(A, B) モデル選択の考え方。一般に、得られたデータ (A) を説明するモデルとして複数の候補モデルが考えられる。モデル選択では、候補モデルから適切なものを選択する。パラメータの少ない単純なモデルは過少適合であり、現象を十分に説明できない (B 左)。一方、パラメータが多すぎる複雑なモデルは過剰適合を引き起こし、予測性能が悪くなる (B 右)。したがって、現象の説明に十分かつ複雑すぎないモデルを選択することが望ましい (B 中央)。(C) AIC によるモデル選択のイメージ。パラメータが増えるほど、モデルの当てはまりは良くなるがモデルの複雑さは増えていく (式 2.8 の第 1 項は -2 がかけられているため、当てはまりが良くなるほど値は小さくなることに注意)。これらの 2 つのバランスが最も取れたモデルの AIC が最小となり、最適モデルとして選択される。

とすると、AIC は式 2.9 で定義される。

$$AIC = n \log(2\pi\hat{\sigma}^2) + n + 2(p + 1) \tag{2.9}$$

上式において、 p は力学モデルに含まれる自由パラメータの数を表す。例えば、モデル A を張力モデルとして用いた場合は $p = 6$ である*6。 $\hat{\sigma}^2 = \|\mathbf{F}(\hat{\boldsymbol{\beta}})\|^2/n$ は誤差分散の推定値であり、 $\hat{\boldsymbol{\beta}}$ は第 2.3 節の方法で推定した力学モデルのパラメータを表す。図 2.2A のサ

*6 張力モデルと圧力モデルの総パラメータ数は、モデル A を張力モデルとして用いた場合は 7 つである。しかし、本手法では λ_0 を固定値として推定を行うため (第 8.2.2 節を参照)、自由パラメータ数は 6 となる。なお、式 2.9 の第 3 項は細胞の力学モデルのパラメータに加えて誤差分散 σ を考慮し、自由パラメータ数を $p + 1$ とした (小西 2010)。

ンプルについて、候補モデル（図 2.6）の AIC を計算した結果を表 2.4 に示す。このサンプルではモデル A の AIC が最小となり、モデル A が最良モデルとして選択された。

張力モデル	最大対数尤度	自由パラメータ数 $[p]$	AIC
モデル A	137	6	-263
モデル B	100	4	-193
モデル C	-79	2	165
モデル D	-115	3	235
モデル E	-182	1	367
典型モデル A	-61	6	136
典型モデル B	-70	4	150
典型モデル C	-182	2	370

表 2.2 図 2.2A のサンプルにおける各張力モデルの最大対数尤度・自由パラメータ数および AIC

最小 AIC の張力モデルを黄色で網掛けして示した。

第 3 章

本研究で用いたデータ

第 3 章では、本研究において開発した上皮組織のモデル構築およびパラメータ推定法の検証や解析に用いた人工データおよび生体データについて説明する。第 3.1 節では、人工データの生成に用いた CVM の数値計算の設定について述べる。第 3.2 節では、本研究で用いた生体データとして取得したショウジョウバエ蛹の翅上皮と背板上皮とショウジョウバエ胚の上皮について、先行研究で得られていた力学および形態形成に関する知見をまとめる。

3.1 人工データ

本研究において開発した手法の妥当性検証に用いる人工データを CVM の数値計算により生成した。CVM では、細胞頂点 \mathbf{x} の座標および接続関係が、ポテンシャルエネルギー $U_0(\mathbf{x})$ が緩和するように変化する (Fletcher, 2014; Alt *et al.*, 2017)。異方性ばねモデルのポテンシャルエネルギーは、

$$U_0(\mathbf{x}) = \sum_{[ij]:\text{junction}} \left\{ \Lambda_0(\theta_{ij})l_{ij} - \frac{1}{2}\Lambda_1(\theta_{ij})l_{ij}^2 \right\} + \sum_{i:\text{cell}} \frac{1}{2}k(A_i - A_0)^2 \quad (3.1)$$

と表される。式 3.1 において、 A_0 は細胞の理想面積を表す。 $\Lambda_0(\theta)$ および $\Lambda_1(\theta)$ は式 2.2 で定義される細胞接着面の線張力および負のばね定数を表す。典型モデルのポテンシャルエネルギーは、

$$U_0(\mathbf{x}) = \sum_{[ij]:\text{junction}} \Lambda_0(\theta_{ij})l_{ij} + \sum_{i:\text{cell}} \frac{1}{2}\Gamma(\theta_{ij})L_i^2 + \sum_{i:\text{cell}} \frac{1}{2}k(A_i - A_0)^2 \quad (3.2)$$

と表される。式 3.2 において、 L_i は細胞 i の周囲長を表す。ポテンシャルエネルギー $U_0(\mathbf{x})$ の l_{ij} および A_i についての微分から、張力 $T_{ij} = \partial U_0 / \partial l_{ij} = T(l_{ij}, \theta_{ij})$ および圧

力 $P_i = -\partial U_0 / \partial A_i = P(A_i)$ がそれぞれ導かれる。

数値計算では、以下の方程式を解いた。

$$\frac{dx_i}{dt} = -\frac{\partial U_0(\mathbf{x})}{\partial x_i} = -T_{ij} \frac{\partial l_{ij}}{\partial x_i} + P_i \frac{\partial A_i}{\partial x_i} \quad (3.3)$$

$\partial A(\theta_{ij}) / \partial x_i$ のような異方性を示す係数の微分項は無視した (Hiraiwa *et al.*, 2019)。数値計算のプログラムは C++ によって実装した。

初期条件として、 20×20 細胞からなる組織を、ランダムな母点から算出されたボロノイ分割により生成した (図 3.1A)。このとき、細胞の平均面積が A_0 になるよう母点の分布を設定した。時間微分の刻み幅は $\Delta t = 0.1$ に設定し、 $t = 5000$ まで計算を行った (図 3.1B)。細胞配置換えは、細胞接着面が基準長よりも短くなり、かつ配置換えによってポテンシャルエネルギーが減少する場合に実行した (Alt *et al.*, 2017; 図 3.1C)。

基準パラメータセットとして $(\lambda_0, \mu_0, \lambda_1, \mu_1, k) = (0.2, 0.15, 0.03, 0.5, 1.0)$ を用いた。複数の人工データを生成するために、基準パラメータセットのパラメータの値を1つを変更し、合計 20 個のパラメータセットから人工データを生成した (表 3.1)。細胞の理想面

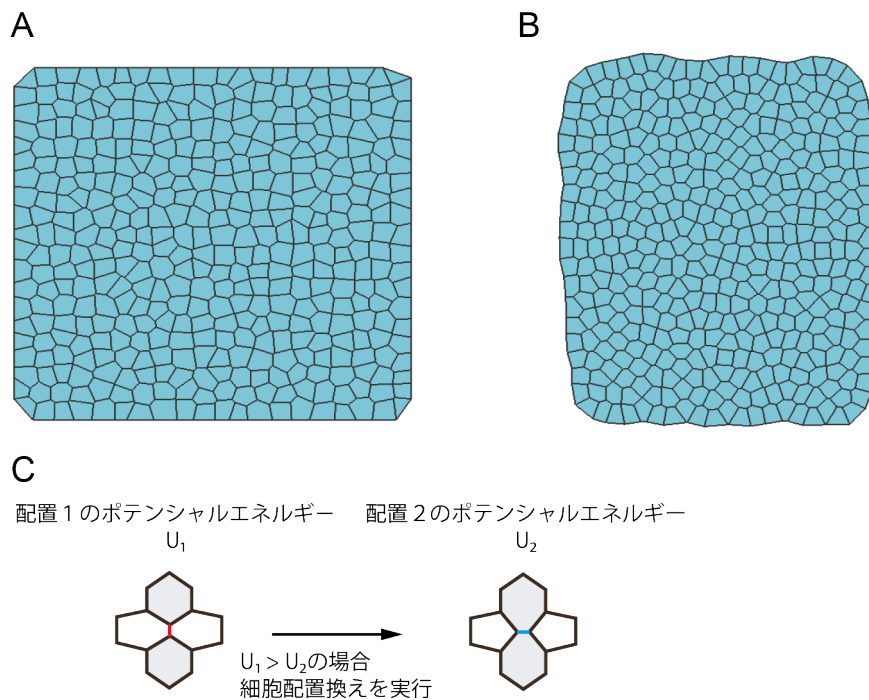


図 3.1 CVM の初期条件および細胞配置換え処理

(A, B) CVM の数値計算に用いた初期条件 (A) および数値計算後の最終状態 (B; $t = 5000$)。 (C) 細胞配置換えの処理。細胞接着面が基準長さよりも短くなった場合、細胞配置換えの判定を行う。細胞配置換えを行う前のポテンシャルエネルギー (U_1) と細胞配置換えを行った場合のポテンシャルエネルギー (U_2) を比較し、ポテンシャルエネルギーが減少する場合 ($U_1 > U_2$) に細胞配置換えを実行する。

積は A_0 は 1.0 に固定した。

ID	λ_0	μ_0	λ_1	μ_1	k
0	0.2	0.15	0.03	0.5	1.0
1	0.1	0.15	0.03	0.5	1.0
2	0.15	0.15	0.03	0.5	1.0
3	0.25	0.15	0.03	0.5	1.0
4	0.3	0.15	0.03	0.5	1.0
5	0.2	0.05	0.03	0.5	1.0
6	0.2	0.1	0.03	0.5	1.0
7	0.2	0.2	0.03	0.5	1.0
8	0.2	0.25	0.03	0.5	1.0
9	0.2	0.3	0.03	0.5	1.0
10	0.2	0.15	0.01	0.5	1.0
11	0.2	0.15	0.02	0.5	1.0
12	0.2	0.15	0.04	0.5	1.0
13	0.2	0.15	0.03	0.1	1.0
14	0.2	0.15	0.03	0.2	1.0
15	0.2	0.15	0.03	0.3	1.0
16	0.2	0.15	0.03	0.4	1.0
17	0.2	0.15	0.03	0.5	0.75
18	0.2	0.15	0.03	0.5	2.0
19	0.2	0.15	0.03	0.5	4.0

表 3.1 人工データ生成に用いたパラメータセット

基準パラメータセット (ID: 0) から値を変更したパラメータを黄色で網掛けして示した。

3.2 生体データ

本研究では、生体データとしてショウジョウバエ蛹の翅上皮および背板上皮とショウジョウバエ胚の上皮の画像を取得した。本節では、これらの3つの上皮組織の形態形成とその力学について、先行研究で報告された知見をまとめる。

3.2.1 ショウジョウバエ蛹の翅

ショウジョウバエ蛹の翅は、翅基部からの力によってPD軸方向に引張りを受ける (Aigouy *et al.*, 2010; Sugimura and Ishihara, 2013; Matamoro-vidal *et al.*, 2015; Etournay *et al.*, 2015; Ray *et al.*, 2015)。この外部からの引張り力に抵抗するために、翅の細胞はPD軸方向の細胞接着面にmyo-IIを集積し、強い張力を生成する (図3.2A; Sugimura and Ishihara, 2013)。細胞接着面の張力異方性は蛹化後21–23時間に最大になる (図3.2C; Sugimura and Ishihara, 2013; Etournay *et al.*, 2015)。

蛹の翅上皮は、方向性を持った細胞配置換えを行う。蛹化後15–21時間ではPD軸方向の細胞接着面が収縮し、AP軸方向に切り替わる (図3.2D; Etournay *et al.*, 2015; Guirao *et al.*, 2015)。この時期の細胞配置換えは翅基部からの引張り力の有無にかかわらず生じる能動的な細胞配置換えである (Etournay *et al.*, 2015)。蛹化後21時間以降では、AP軸方向の細胞接着面が収縮し、PD軸方向に切り替わる (図3.2E; Aigouy *et al.*, 2010; Sugimura and Ishihara, 2013; Matamoro-vidal *et al.*, 2015; Etournay *et al.*, 2015; Guirao *et al.*, 2015)。この時期の細胞配置換えは、翅基部からの引張り力が失われた場合には発生頻度が大きく下がる、受動的な細胞配置換えである (Aigouy *et al.*, 2010; Sugimura and Ishihara, 2013)。受動的な細胞配置換えは、引張りに対する受動的な緩和過程として機能し、受動的な細胞配置換えに伴って細胞形状の異方性が下がり、等方的になる (Sugimura and Ishihara, 2013)。

3.2.2 ショウジョウバエ蛹の背板

蛹の背板は、時空間的に不均一な形態形成を示す (Guirao *et al.*, 2015)。背板の形態形成は正中線に対して左右対称であることから、高度に制御されていると考えられる (Bosveld *et al.*, 2012; Guirao *et al.*, 2015)。背板前側の正中線に近い領域 (図3.2B) では、myo-II局在および張力は弱いAP軸方向の異方性を示し、この方向に沿って細胞が伸長し配置換えする (図3.2C; Ishihara and Sugimura, 2012; Guirao *et al.*, 2015; Ishihara *et al.*, 2013)。

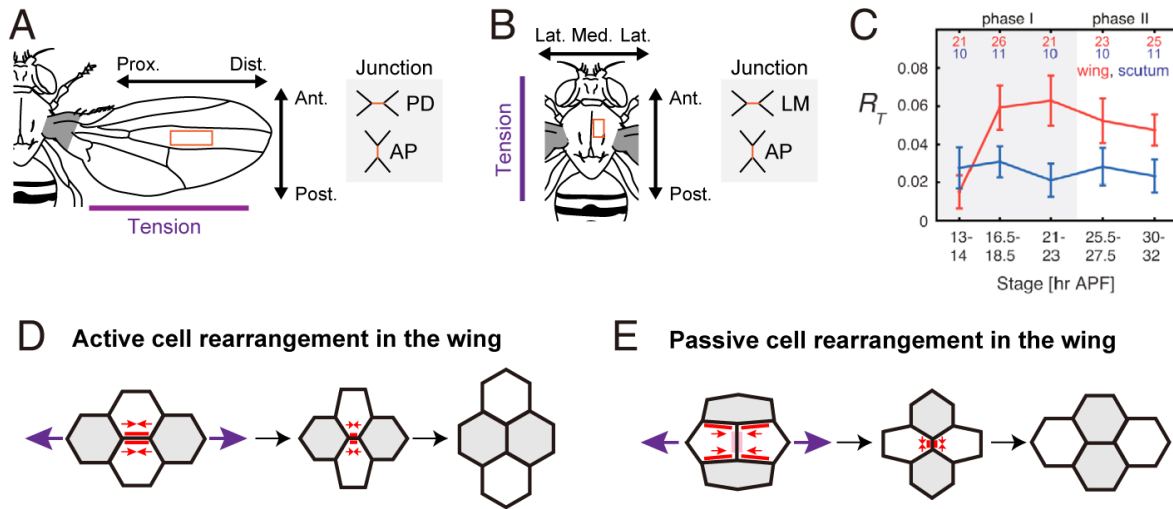


図 3.2 本研究で用いたショウジョウバエ蛹の上皮組織

(A, B) 本研究で用いたショウジョウバエ蛹の上皮組織の模式図 (Ikawa & Sugimura 2018 より引用)。本研究においてパラメータ推定に用いた領域をオレンジ色の四角形で囲った。紫色の線は組織張力の方向を示す。右側に細胞接着面の模式図を示す。(A) ショウジョウバエ成虫の翅の模式図。灰色の部分には翅基部を示す。この図および図 (D, E) において、水平および垂直方向はそれぞれ AP 軸および PD 軸方向に対応する。(B) ショウジョウバエ成虫の背板 (notum) の模式図。図の水平および垂直方向はそれぞれ ML 軸および AP 軸方向に対応する。(C) 蛹の翅および背板における張力異方性の強さの推移 (Sugimura & Ishihara 2013 より引用)。赤い線および青い線はそれぞれ蛹の翅および背板における細胞接着面の張力の異方性の発生過程に伴う推移を示す。横軸は蛹化後 13 時間以降の発生ステージを、縦軸は張力異方性の強さを表す統計量 R_T を示す (第 8.3 節)。 R_T が 0 のとき、張力は等方的であり、 R_T が大きくなるほど異方性が強くなる。(D, E) 蛹の翅で生じる方向性を持った細胞配置換え。赤色の矢印は細胞接着面の張力を示し、紫色の矢印は翅基部からの引張りによる張力を示す。線の色の濃さは細胞接着面に沿った myo-II の濃度に対応する。(D) 蛹の翅で生じる能動的な細胞配置換え。PD 軸方向の細胞接着面が収縮し、AP 軸方向の細胞接着面に切り替わる。(E) 蛹の翅で生じる受動的な細胞配置換え。AP 軸方向の細胞接着面が収縮し、PD 軸方向の細胞接着面に切り替わる。

3.2.3 ショウジョウバエ胚

胚帯伸長 (germband extension; GBE) 期のショウジョウバエ胚では、腹側の上皮 (胚帯) が伸長する (図 3.3A; Agarwal and Zaidel-Bar, 2019; Perez-Vale and Peifer, 2020)。このとき、背腹軸 (DV 軸) 方向の細胞接着面に myo-II が局在するとともに、細胞頂端面では DV 軸方向の細胞接着面に向かってアクトミオシンが流れる (Bertet *et al.*, 2004; Zallen and Wieschaus, 2004; Rauzi *et al.*, 2010)。結果として、DV 軸方向の細胞接着

面の張力が上昇し、DV 軸方向の細胞接着面が AP 軸方向に切り替わる細胞配置換えが起こる (図 3.3B, C; Rauzi *et al.*, 2008; Bambardekar *et al.*, 2015, Kong *et al.*, 2019)。胚帯の細胞の DV 軸方向の細胞接着面における myo-II 局在には、転写因子をコードするペアルール遺伝子である *even-skipped* および *runt* の AP 軸方向に沿った縞模様の遺伝子発現など、AP 軸方向のパターニングが必要である (Irvine and Wieschaus, 1994; Zallen and Wieschaus, 2004; Paré *et al.*, 2014)。

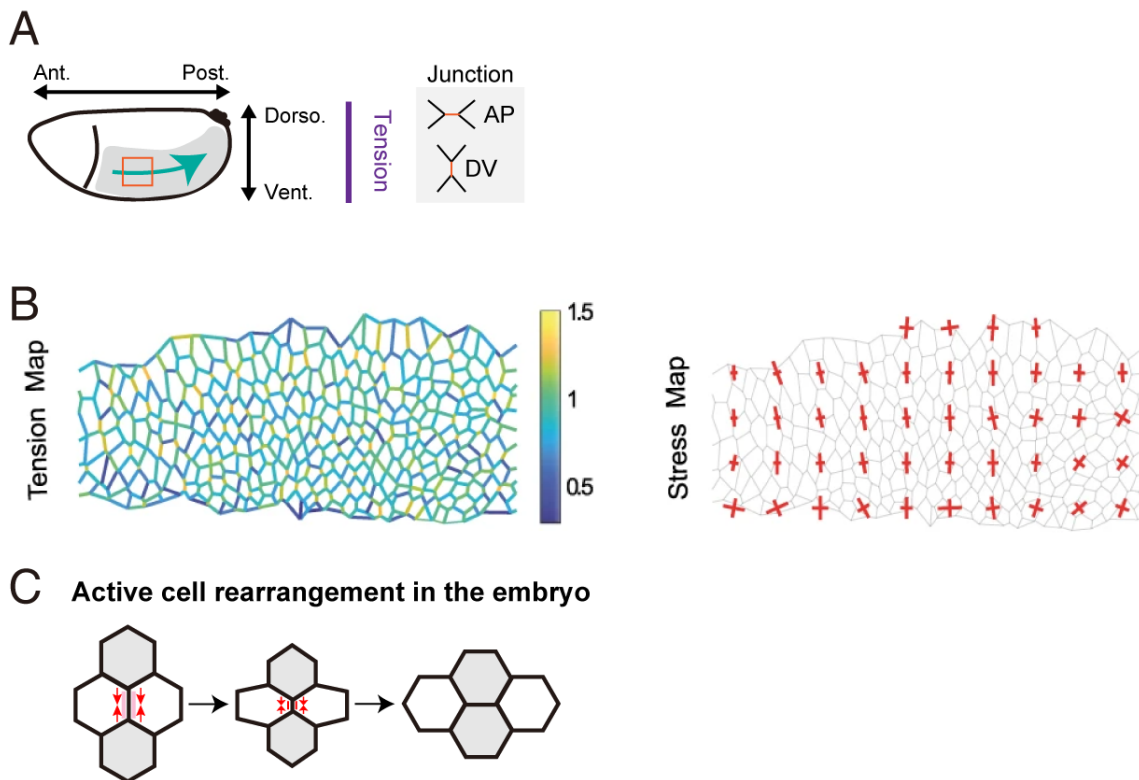


図 3.3 本研究で用いたショウジョウバエ胚の上皮組織

(A) 胚帯伸長 (GBE) 期におけるショウジョウバエ胚の模式図。灰色の部分には胚帯 (germband) を示す。本研究においてパラメータ推定に用いた領域をオレンジ色の四角形で囲った。紫色の線および緑色の矢印はそれぞれ組織張力および組織伸長の方向を示す。右側は細胞接着面の模式図を示す。本図において、水平および垂直方向はそれぞれ AP 軸および DV 軸方向に対応する。(B) GBE 期における細胞接着面張力の異方向性 (Kong *et al.*, 2019 より引用・改変)。左側は細胞接着面張力の推定値を表し、それぞれの細胞接着面の張力の推定値はカラーバーの値と対応する。AP 方向の細胞接着面よりも DV 方向の細胞接着面の方が張力が高い。右側は応力分布を表す。赤い十字は応力テンソルの主方向とそれに直交する方向を示し、十字の腕の長さはその方向の応力の強さに対応する。十字の腕の長さは AP 方向よりも DV 方向のほうが長く、DV 軸方向に強い応力が生じている。(C) GBE 期に生じる能動的な細胞配置換え。赤色の矢印は細胞接着面の張力を示す。DV 軸方向の細胞接着面が収縮し、AP 軸方向の細胞接着面に切り替わる。

第 4 章

本研究において開発した手法の妥当性検証

第 4 章では、本研究において開発した上皮組織のモデル構築およびパラメータ推定法の妥当性を検証する。まず、人工データを用いて本手法によるパラメータ推定の推定精度とモデル選択の妥当性を検証した（第 4.1 節および第 4.2 節）。さらに、人工データおよび生体データにノイズを加え、本手法のパラメータ推定の画像解析誤差に対する頑健性を調べた（第 4.3 節）。最後に、ショウジョウバエ上皮組織の画像に本手法を適用し、推定した力学パラメータを用いて計算した細胞接着面の張力（予測張力）の異方性を解析した。その結果、予測張力の異方性が先行研究における知見とよく一致することを確認した（第 4.4 節）。

4.1 本手法は人工データの真パラメータを高い精度で推定した

力学パラメータの真値が既知である人工データを用いて、力学パラメータ推定法の推定精度を確認した。第 3.1 節の方法で数値計算によって生成した人工データから力学パラメータを推定し、真値と推定値を比較した（図 4.1A）。真値と推定値の比較は、面積弾性係数 k および細胞の理想面積 A_0 を用いて無次元化した値を基に行った。本手法では A_0 を推定できないため、推定値の無次元化の際には真値 $A_0 = 1.0$ を用いた。図 4.1B-E から明らかなように、推定値は真値とほぼ一致していた。さらに、推定誤差の大きさは最大で 5.4% だった。典型モデルにおいても、標準的に用いられているパラメータセット

$(\Lambda_0, \Gamma) = (0.12, 0.04)$ から生成した人工データについて同様の試験を行った (Farhadifar *et al.*, 2007; Kursawe *et al.*, 2018)。 Λ_0 および Γ の推定誤差はそれぞれ 0.27% および -0.20% だった。以上の結果から、本研究において開発した手法は複数の力学モデルから生成された人工データの力学パラメータを高い精度で推定できることが示された。

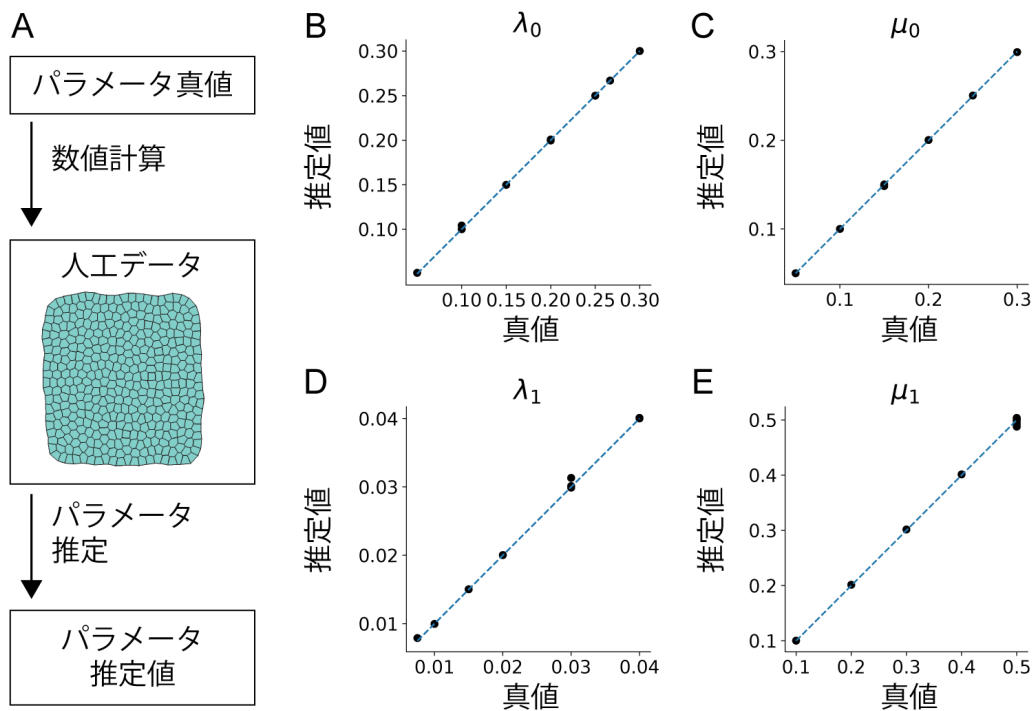


図 4.1 人工データを用いたパラメータ推定精度の検証

(A) 人工データを用いたパラメータ推定精度の確認。真パラメータから数値計算を用いて人工データを生成した後、人工データの細胞配置を入力としてパラメータ推定を行った（人工データ生成の詳細は第 3.1 節を参照）。(B–E) 細胞接着面の線張力 λ_0 (B)、負のばね定数 λ_1 (C)、線張力の異方性 μ_0 (D)、負のばね定数の異方性 μ_1 (E) の真値（横軸）と推定値（縦軸）の関係。 λ_0 および λ_1 の推定値は k および $A_0 = 1.0$ を用いて、 $\lambda_0 = \hat{\lambda}_0 / \hat{k} A_0^{1.5}$ および $\lambda_1 = \hat{\lambda}_1 / \hat{k} A_0$ のように標準化した。ここで、 \hat{q} は力学パラメータ q の推定値を示す。点線は $y = x$ を示す。

4.2 人工データにおいて AIC は最良モデルを選択した

次に、AIC を用いたモデル選択の妥当性を検証した。まず、モデル A から E を用いて人工データ生成した（表 4.2、データ生成モデル）。次に、それぞれの人工データをモデル A–E を用いてパラメータ推定および AIC 計算を行い（表 4.2、推定モデル）、モデル選択を行った。表 4.2 に示す結果の通り、データ生成モデルを用いてパラメータ推定を行った

ときに AIC が最小となった。以上から、AIC を用いたモデル選択の妥当性が確認された。

4.3 本手法は画像処理誤差に対し十分な頑健性を示した

力のベイズ推定法および本研究で開発したパラメータ推定法は、上皮組織画像から抽出された細胞頂点の座標および接続関係に基づいて細胞の力や力学モデルのパラメータ推定を行う。細胞頂点の座標および接続関係は二値化や細線化などの画像処理によって取得するため（第 8.7 節）、画像処理の過程で生じる誤差が出力に与える推定誤差を評価する必要がある。先行研究において、力のベイズ推定法が画像解析誤差に対して頑健であることが報告されている (Ishihara *et al.*, 2013; Ishihara and Sugimura, 2012)。

本手法についても同様に、画像処理誤差がパラメータ推定精度に与える影響を評価した。まず、ノイズの加わっていない生体データおよび人工データ（元データ）から、力学パラメータを推定した。次に、元データの細胞頂点の 10% について、細胞頂点の座標にガウシアンノイズを付加しノイズ付加データを生成した。さらに、ノイズ付加データから力学パラメータを推定し、元データから推定した力学パラメータとの間の誤差を計算した。

図 4.2 に結果を示す。細胞接着面張力と細胞圧力の相対的な大きさを決める λ_1 および k のノイズ付加による誤差は、10% の範囲内に収まった（図 4.2E–H, M–P）^{*1}。細胞接着面の張力の異方性を制御する μ_0 および μ_1 のノイズ付加による誤差は、人工データおよび生体データの一部のサンプルで 40% を超えたが、その他の多くのサンプル・力学パラメータでは 25% の範囲内に収まった（図 4.2A–D, I–L）。

	データ生成モデル		推定モデル		
	A	B	C	D	E
A	-12844	-6498	-4011	-3202	-975
B	-11770	-11773	-4365	-2924	-246
C	-16407	-16410	-16412	-4662	-4665
D	-15999	-16002	-2998	-16002	-1087
E	-20351	-20353	-20356	-20355	-20358

表 4.1 人工データを用いたモデル選択の妥当性検証

各行に示す人工データに対して、AIC が最小となるモデルを黄色で網掛けして示した。各人工データに対して、データ生成モデルと推定モデルが一致する場合に AIC が最小となった。

^{*1} 細胞接着面張力の線張力を決める λ_0 は本研究では 1.0 に固定されているため、ノイズ付加による影響を受けない（第 8.2.2 節を参照）。

さらに、元データとノイズ付加データのそれぞれから推定した力学パラメータを用いて計算した張力予測値の間の相関係数を計算すると、相関係数は0.97より高かった。したがって、張力の予測値はノイズ付加による影響をほとんど受けないことが明らかになった。以上の結果から、本研究のパラメータ推定法は上皮組織における画像データの画像解析誤差に関して十分に頑健であることが示唆された。

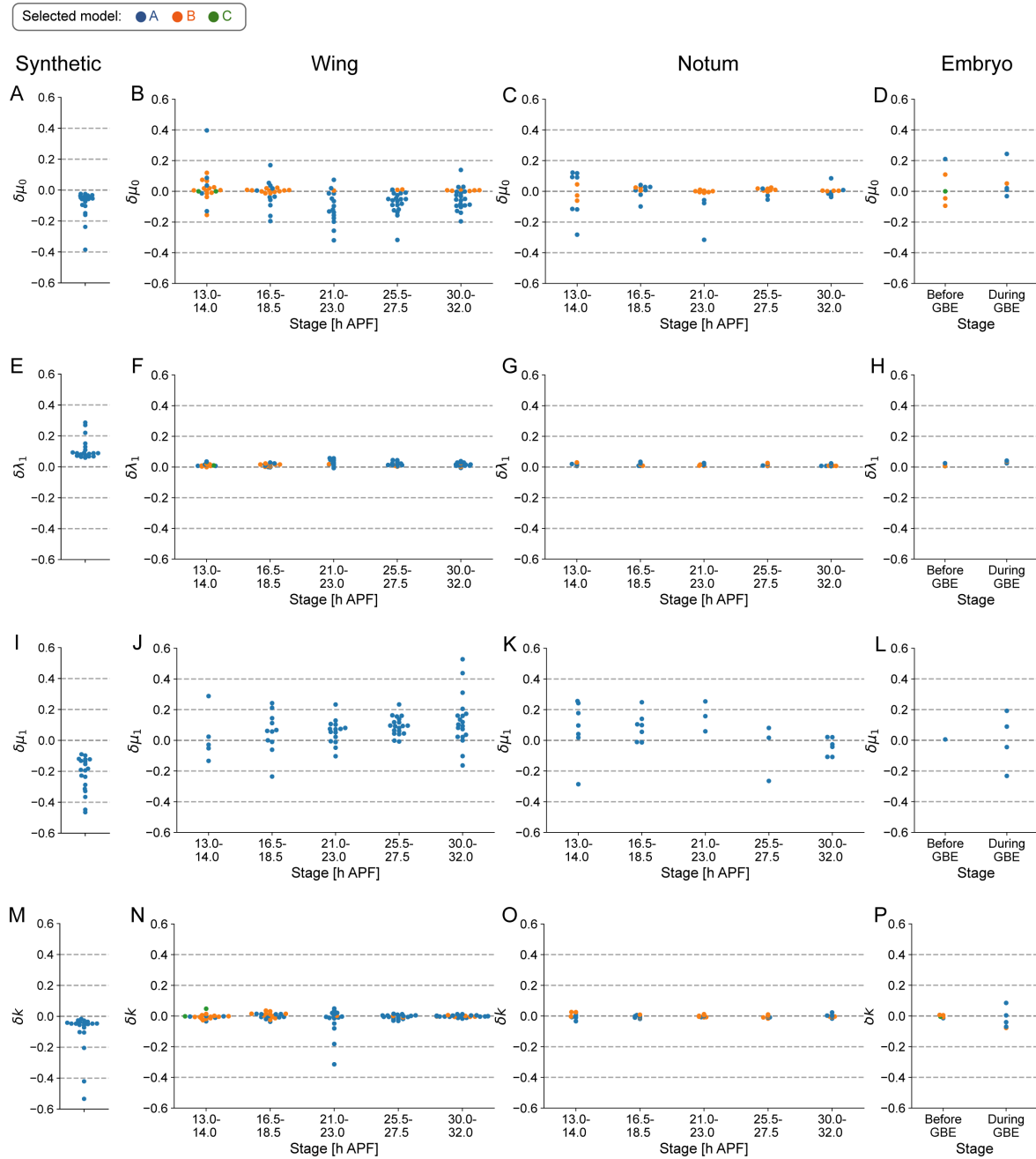


図 4.2 パラメータ推定の画像解析誤差に対する耐性の評価

(A-P) ノイズ耐性試験の結果。パネルの行は力学モデルのパラメータに対応し、細胞接着面の線張力の異方性 μ_0 (A-D)、負のばね定数 λ_1 (E-H)、負のばね定数の異方性 μ_1 (I-L) および細胞の面積弾性係数 k (M-P) の結果を表す。パネルの列は解析に用いたデータに対応し、人工データ (Synthetic; A, E, I, M)、ショウジョウバエ蛹の翅 (Wing; B, F, J, N) および背板 (Notum; C, G, K, O)、ショウジョウバエ胚 (Embryo; D, H, L, P) の結果を表す。縦軸はノイズ付加による誤差を示す。ショウジョウバエの画像データをまとめたグラフにおいて、横軸は発生ステージを示す。それぞれの点はノイズ付加およびパラメータ推定を繰り返した際のノイズ付加による誤差の中央値を示し、0に近いほどノイズを加えた場合に生じるパラメータの推定値の変化が小さく、ノイズ耐性が高いといえる。点の色は元データにおいて最小 AIC 法で選択された張力モデルを示す。青、オレンジ、緑色の点はそれぞれモデル A、B、C に対応する。

4.4 張力の予測値は既知の異方性を示した

本研究で解析に用いたショウジョウバエ上皮組織において、細胞接着面の張力異方性は発生ステージに伴って特徴的な変化を示す（第3.2節参照）。そこで、本手法によって推定した力学パラメータを用いて予測した張力（予測張力）が、組織の発生ステージに伴う異方性の変化を示すかを調べることで、本手法の生体組織における妥当性を検証した。

図4.3に、それぞれの上皮組織の発生ステージに伴う予測張力と細胞接着面の長さおよび方向との相関を示す。加えて、予測張力の異方性を評価する統計量である R_T および Θ を用いて（第8.3節; Sugimura and Ishihara 2013）、予測張力が示す異方性の発生過程に伴う変化を定量した（図4.4）。 R_T および Θ は、それぞれ細胞接着面の予測張力の異方性の強さおよび向きを表す。 R_T が0に近いほど細胞接着面の予測張力の異方性は小さく、 R_T が大きくなるほど細胞接着面の予測張力の異方性が大きいことを示す。

蛹化後13–14時間の蛹の翅上皮において、細胞接着面の予測張力は、細胞接着面の方向にほとんど依存しなかった（図4.3A）。 R_T も0に近いため、このステージの細胞接着面の予測張力は等方的であるといえる（図4.4A）。その後、蛹化後16.5時間以降ではPD軸方向の細胞接着面の予測張力がより強くなり（図4.3B–E）、 Θ も全てのサンプルでPD軸方向に揃った（図4.4D）。 R_T は蛹化後13時間から21時間にかけて上昇した後、下降した（図4.4A）。

蛹の背板上皮の予測張力は、本研究で解析した発生ステージを通じてAP軸方向の細胞接着面がより強い予測張力を示し（図4.3F–J）、 Θ もほとんどのサンプルでAP軸方向だった（図4.4E）。 R_T は全ステージを通してほぼ変化しなかった（図4.4B）。以上の結果は、先行研究における同様の定量結果とよく一致する（図3.2C参照; Sugimura and Ishihara, 2013）

GBE開始前の胚帯では、細胞接着面の予測張力が細胞接着面の方向にほとんど依存せず（図4.3K）、 R_T も0に近い値を取った（図4.4C）。GBE期では、DV方向の細胞接着面の予測張力がより強くなった（図4.3L）。 R_T も上昇し、 Θ がDV方向になった（図4.4C, F）。この結果も先行研究において報告された張力異方性の動態とよく一致する（図3.3B参照; Kong et al. 2019）。以上の結果から、生体組織においても本手法は妥当なパラメータ推定が可能であることが示唆された。

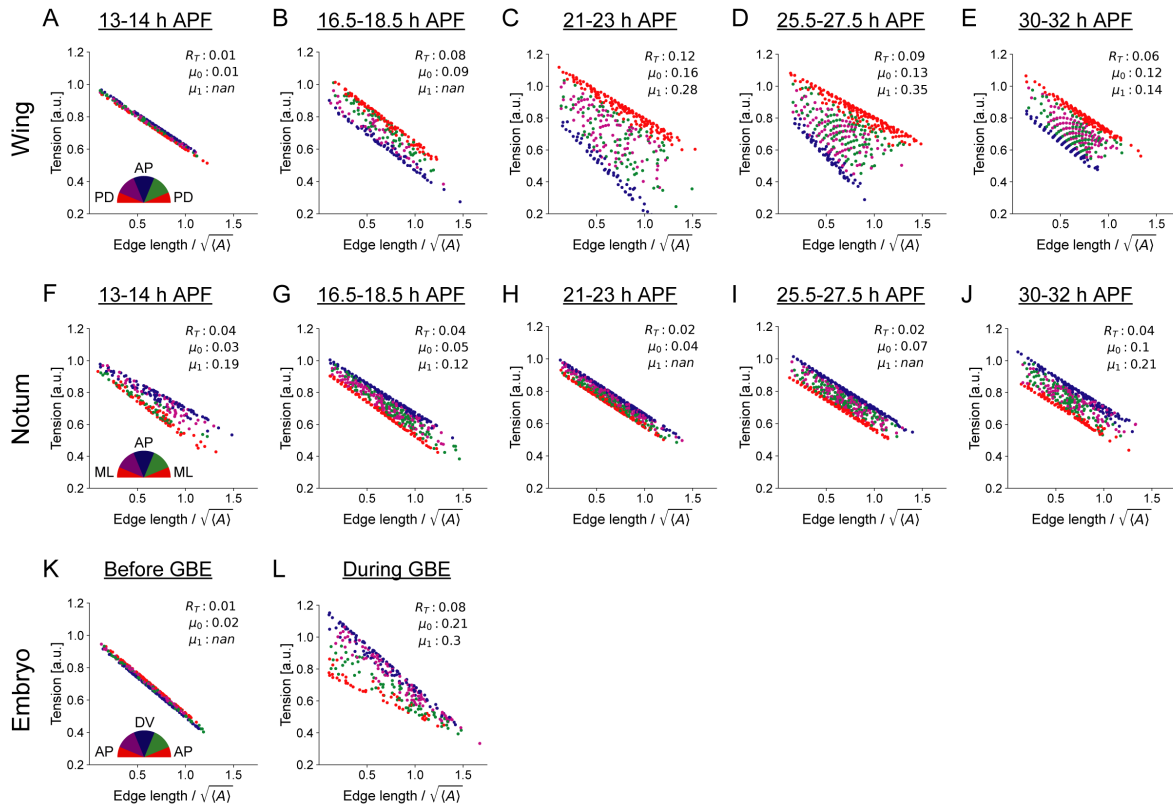


図 4.3 予測張力と細胞接着面の長さおよび方向の相関

(A–F) ショウジョウバエ蛹の翅 (Wing; A–E)、背板 (Notum; F–J) およびショウジョウバエ胚 (Embryo; K, L) の各発生ステージにおける予測張力と細胞接着面形態の相関。各ステージにおいて代表的なサンプルを示す。予測張力は本手法で選択された力学モデルと力学パラメータの推定値を用いて計算した。予測張力の異方性の強さを示す統計量 R_T 、細胞接着面の線張力の異方性 μ_0 および負のばね定数の異方性 μ_1 の推定値をグラフ右上に示す。点の色は細胞接着面の体軸に対する向きを示し、A、F、K 内の半円は細胞接着面の向きの分類を示す (AP: 前後軸方向、PD: 遠近軸方向、DV: 背腹軸方向、ML: 中心-側方軸方向)。 $\langle A \rangle$ は細胞の平均面積を表す。

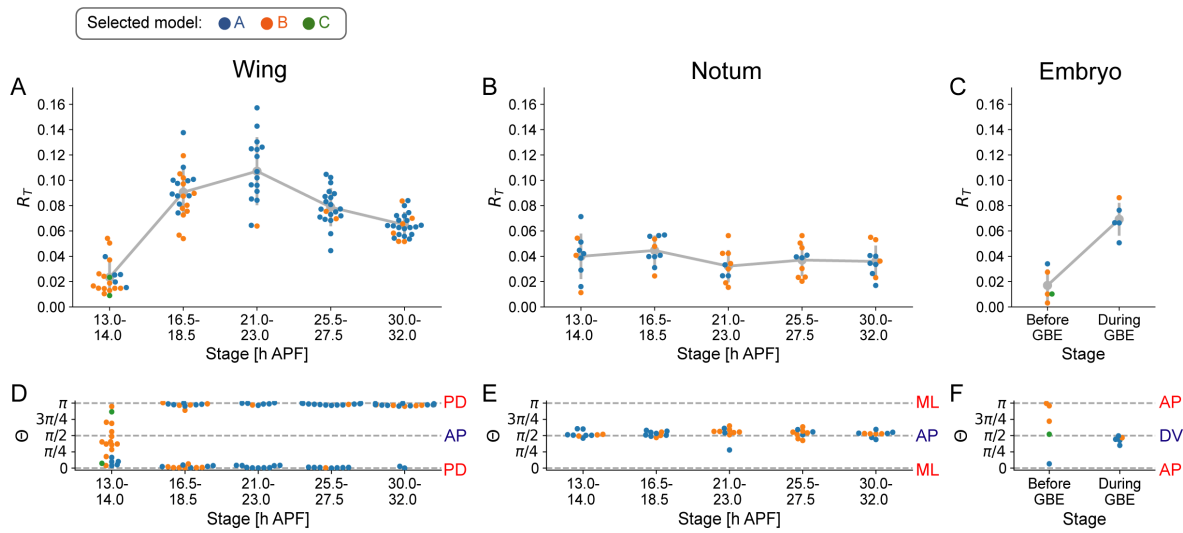


図 4.4 予測張力の異方性 (R_T, Θ) の発生過程に伴う変化

(A-F) ショウジョウバエ蛹の翅 (Wing; A, D)、背板 (Notum; B, E) およびショウジョウバエ胚 (Embryo; C, F) の各ステージにおける、予測張力の異方性の強さ R_T (A-C) および向き Θ (D-F)。それぞれの点は画像 1 枚から推定した力学パラメータを用いて計算した予測張力の異方性の R_T (A-C) および向き Θ (D-F)、点の色は選択された張力モデルを示す。灰色の線およびエラーバーはそれぞれ各ステージにおける R_T の平均値および標準偏差を示す。

第 5 章

ショウジョウバエ上皮組織における力学パラメータの解析

第 5 章では、本研究において開発した上皮組織の力学モデル構築およびパラメータ推定法をショウジョウバエの野生型個体の上皮組織の画像に適用した。第 5.1 節では最小 AIC 法によって、ショウジョウバエ上皮組織の細胞接着面が持つ機械特性を最もよく表す張力モデルを選択した。第 5.2 節では、ショウジョウバエ上皮組織の発生過程に伴う力学パラメータの変化を本手法により解析し、細胞接着面の線張力の異方性 (μ_0, φ_0) および負のばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) がそれぞれ独立に変化するを見出した。

5.1 ショウジョウバエ上皮組織では異方性ばねモデルが選択された

最小 AIC 法によるモデル選択を実施し、候補モデルの中からショウジョウバエ上皮組織の細胞接着面が持つ機械特性を最もよく表す張力モデルを選択した。張力モデルの候補モデルとして、本研究で構築した張力モデルであるモデル A–E および典型モデル A–C を用いた (図 2.6 参照)。1 つの画像データについて上記の候補モデルをそれぞれ用いてパラメータ推定および AIC 計算を行い、AIC が最小となる張力モデルを最適モデルとして選択した。

結果を表 5.1 に示す。解析したすべての画像において本研究で構築した張力モデルが選択され、典型モデルは選択されなかった。本研究で構築した張力モデルの中でも、モデル A や B が多くのサンプルで選択され、まれにモデル C が選択された。以上から、本研究

において細胞接着面の張力と長さおよび向きの相関を基に定量的に構築した張力モデルがショウジョウバエ上皮細胞の機械特性をより良く反映していることが示唆された。本章の力学パラメータの解析では、それぞれの画像データについて最小 AIC 法により選択された張力モデルを用いて推定した結果を示す。

組織	ステージ	モデル A	モデル B	モデル C	合計
翅	13–14 h APF	5	13	2	20
	16.5–18.5 h APF	11	12		23
	21–23 h APF	15	1		16
	25.5–27.5 h APF	19	2		21
	30–32 h APF	19	6		25
背板	13–14 h APF	7	3		10
	16.5–18.5 h APF	7	3		10
	21–23 h APF	3	7		10
	25.5–27.5 h APF	3	7		10
	30–32 h APF	6	4		10
胚	Before GBE	1	3	1	5
	During GBE	4	1		5

表 5.1 ショウジョウバエ上皮組織におけるモデル選択の結果
h APF および GBE はそれぞれ蛹化後時間および胚帯伸長を表す。

5.2 細胞接着面張力の張力パラメータの異方性は発生過程に伴って変化した

次に、本手法によってショウジョウバエ上皮組織の画像データから力学パラメータを推定し、推定した力学パラメータの発生過程に伴う変化を解析した。細胞接着面の負のばね定数の等方成分 λ_1 の推定値は、大半のサンプルにおいて 0.3–0.5 であり、全ステージを通してほぼ変化しなかった (図 5.1A–C)。細胞の面積弾性係数 k も同様に、大半のサンプルで 0.2–0.4 の間であり、ショウジョウバエ胚の胚帯の面積弾性係数を除き、発生過程を通してほとんど変化しなかった (図 5.1D–F)。

異方性ばねモデルでは、細胞接着面の線張力 $\Lambda_0(\theta)$ と負のばね定数 $\Lambda_1(\theta)$ がそれぞれ異方性を示す (式 2.1 参照)。以下で、 $\Lambda_0(\theta)$ および $\Lambda_1(\theta)$ の異方性を制御する (μ_0, φ_0) および (μ_1, φ_1) が発生ステージに伴ってどのように変化するかを解析した。

まず、線張力の異方性 (μ_0, φ_0) に着目した (図 5.2)。蛹の翅において、蛹化後 13–14

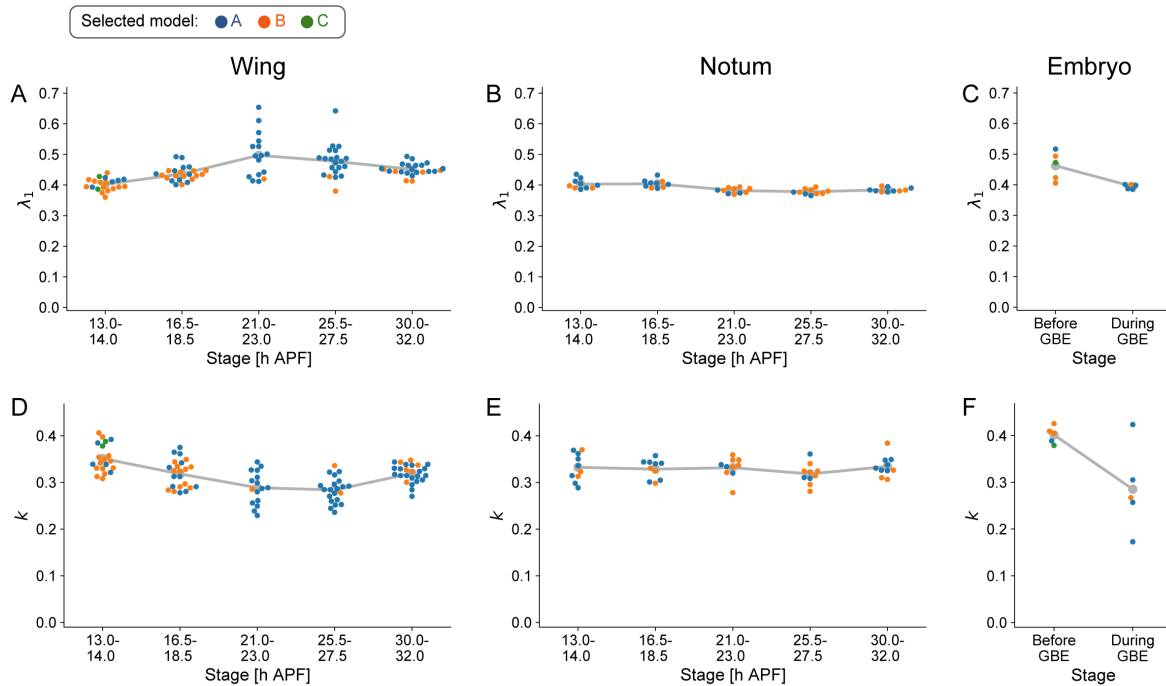


図 5.1 細胞接着面の負のばね定数の等方成分 λ_1 および細胞の面積弾性係数 k の発生過程に伴う変化

(A–F) ショウジョウバエ蛹の翅 (Wing; A, D)、背板 (Notum; B, E) およびショウジョウバエ胚 (Embryo; C, F) の各ステージにおける細胞接着面の負のばね定数の等方成分 λ_1 (A–C) および細胞の面積弾性係数 k (D–F)。それぞれの点は1つの画像データから推定した力学パラメータの値を示し、点の色は選択された張力モデルを示す。

時間では μ_0 が低く、 φ_0 もサンプルによって様々でステージとしての特徴は見られなかった。 μ_0 は蛹化後 16.5–18.5 時間から上昇し、 φ_0 も PD 軸向きに揃っていた (図 5.2A, D)。その後、蛹化後 32 時間までこの傾向は維持された。蛹の背板ではステージを通して、 μ_0 はほぼ一定であり、 φ_0 は AP 軸向きだった (図 5.2B, E)。胚では、GBE 期に μ_0 の上昇が見られ、 φ_0 は DV 軸向きに揃った (図 5.2C, F)。これらの動態は、第 4.4 節の張力異方性の定量結果 (R_T, Θ) とよく相関した。したがって、線張力の異方性 (μ_0, φ_0) は張力異方性の強さ及び向きを制御することが示唆された。

次に、細胞接着面の負のばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) に着目した (図 5.3)。細胞接着面の負のばね定数はモデル A のみが持ち、モデル選択によりモデル A 以外が選択された場合は省略される。したがって、モデル B あるいは C が選択されるサンプルでは $\mu_1 = 0$ としてプロットした (図 5.3 A–C のオレンジ点および緑点がモデル B およびモデル C に対応)。

蛹の翅において、蛹化後 13–14 時間および 16.5–18.5 時間では、半数以上のサンプルで

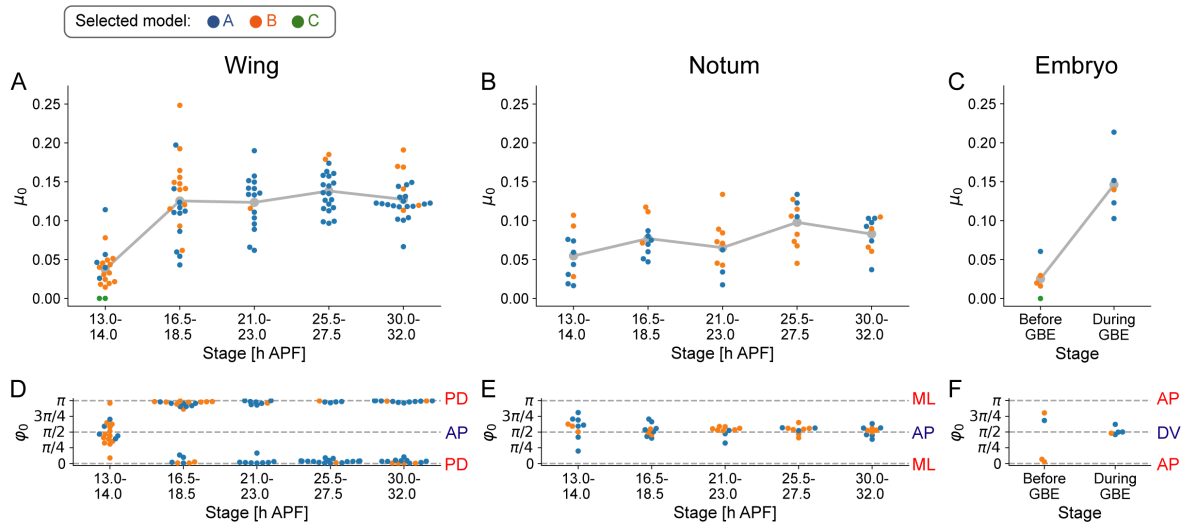


図 5.2 線張力の異方性 (μ_0, φ_0) の発生過程に伴う変化

(A–F) ショウジョウバエ蛹の翅 (Wing; A, D)、背板 (Notum; B, E) およびショウジョウバエ胚 (Embryo; C, F) の上皮組織画像から推定した線張力の異方性の強さ μ_0 (A–C) および向き φ_0 (D–F)。それぞれの点は画像 1 枚から推定した力学パラメータの値を示し、点の色は選択された張力モデルを示す。灰色の線は各ステージにおける μ_0 の中央値を示す。

モデル B あるいはモデル C が選択されたため、 μ_1 の中央値は低い値を取った (図 5.3A)。 μ_1 はその後上昇し、受動的な細胞配置換えが起こる蛹化後 21–23 時間に最大となった (図 5.3A)。 φ_1 は全ステージを通して AP 軸向きだった (図 5.3D)。背板において、 μ_1 は全ステージを通して低い値を取った。 φ_1 は蛹化後 21–23 時間までは ML 軸方向、蛹化後 25.5–17.5 時間は AP 軸方向になり、蛹化後 30–32 時間ではばらつきが大きくなった (図 5.3B, E)。胚では線張力の異方性 (μ_0, φ_0) と同様に、GBE 期に μ_1 が上昇し、 φ_1 は DV 軸向きだった (図 5.3C, F)。

第 2.2 節で議論したように、細胞接着面の負のばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) は、方向性を持った細胞配置換えの際に収縮する細胞接着面で見られる myo-II 濃縮フィードバックの異方性を表していると考えられる。そこで、蛹の翅上皮と胚帯について、方向性を持った細胞配置換えが生じるステージおよび細胞接着面が収縮する方向と、そのステージにおける細胞接着面の負のばね定数の異方性の強さ μ_1 および向き φ_1 とをそれぞれ比較した (表 5.2)。

翅上皮の受動的な細胞配置換えと胚帯の能動的細胞配置換えでは、細胞配置換えが起こるステージに μ_1 が上昇し、 φ_1 は細胞接着面が収縮する向きと一致した。一方で、翅上皮の能動的細胞配置換えが生じるステージでは μ_1 が低く、 φ_1 は細胞接着面が収縮する方向と一致しなかった。このような細胞配置換えにおける細胞接着面の収縮と細胞接着面の

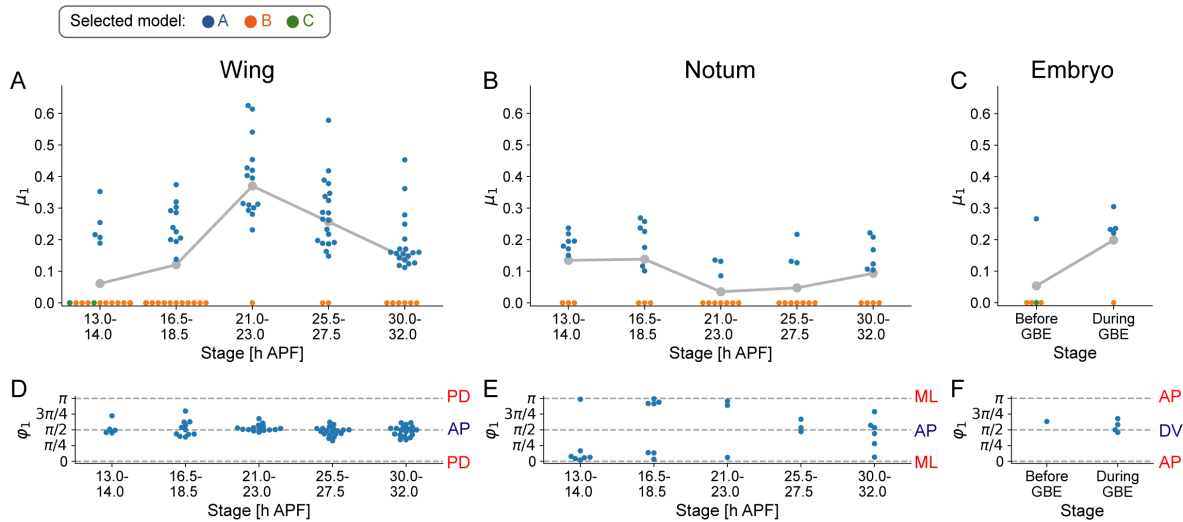


図 5.3 細胞接着面のばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) の発生過程に伴う変化

(A–F) ショウジョウバエ蛹の翅 (Wing; A, D)、背板 (Notum; B, E) およびショウジョウバエ胚 (Embryo; C, F) の上皮組織画像から推定した細胞接着面のばね定数の異方性の強さ μ_1 (A–C) および向き φ_1 (D–F)。それぞれの点は画像 1 枚から推定した力学パラメータの値を示し、点の色は選択された張力モデルを示す。灰色の線は各ステージにおける μ_1 の中央値を示す。

	細胞配置換え (第 3.2 節)		細胞接着面の負のばね定数の推定値	
	細胞配置換えが生じるステージ	細胞接着面が収縮する方向	μ_1 の強さ	φ_1 の向き
蛹の翅の能動的配置換え	15–21 h APF	PD 軸方向	弱	AP 軸方向
蛹の翅の受動的配置換え	21 h APF–	AP 軸方向	強	AP 軸方向
胚帯の能動的配置換え	GBE 期	DV 軸方向	強	DV 軸方向

表 5.2 方向性を持った細胞配置換えと細胞接着面の負のばね弾性の異方性 (μ_1, φ_1) の比較

負のばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) の相関の有無が生じる理由については、第 7.4 節で考察する。

以上の結果から、張力パラメータの異方性の強さは発生ステージに伴って変化し、それぞれの組織において特有の振る舞いを示すことが明らかになった。

第 6 章

外科的操作および遺伝学的操作が張力パラメータに与える影響の解析

第 6 章では、外科的あるいは遺伝的に形態形成を攪乱したショウジョウバエ上皮組織から取得した画像データに、本研究において開発した力学パラメータ推定法を適用し張力パラメータを推定した。第 6.1 節では、翅基部の外科的な切断により、PD 方向の引張りが緩和されたショウジョウバエ蛹の翅上皮を解析した。第 6.2 節では、ペアルール遺伝子の機能喪失型変異により、AP 軸方向に沿った遺伝子発現パターンが攪乱されたショウジョウバエ変異体の胚帯を解析した。

6.1 翅上皮の引張りを緩和すると張力パラメータの異方性が低下した

ショウジョウバエ蛹の翅では、翅基部からの引張りが翅上皮に軸情報を与える（第 3.2 節参照）。例えば、翅を基部で切断し引張りを緩和すると、PD 軸方向にそった細胞接着面における張力および myo-II の異方性が失われ、受動的な細胞配置換えの方向性が減弱することが知られている（図 6.1A, B; Aigouy *et al.*, 2010; Sugimura and Ishihara 2013）。そこで、基部で切断した翅の画像データから本研究において開発した手法を用いてパラメータを行い、張力パラメータの異方性にどのような影響が生じるかを調べた。本章の解析では攪乱の有無による力学パラメータの推定値の違いを比較しやすいように、モデル A を用いて推定を行った。

コントロールの翅および基部で切断した翅のそれぞれについて取得した予測張力と細胞

接着面の長さおよび向きとの相関を図 6.1C および D に示す。PD 軸方向の細胞接着面と AP 軸方向の細胞接着面の張力の大きさの差が基部で切断した翅では小さくなることがわかった。張力異方性の強さを表す統計量 R_T も基部で切断した翅では小さくなった (図 6.1E)。

次に、張力パラメータの異方性を比較した。細胞接着面の線張力の異方性 μ_0 は R_T と同様に、基部で切断した翅では小さくなることがわかった (図 6.1F)。細胞接着面の負のばね定数の異方性 μ_1 は、コントロールの翅では蛹化後 24 時間から減少するが、基部で切断した翅では全ステージを通して低い値を取り、コントロールの翅との差は受動的な細胞配置換えがほぼ終了する蛹化後 30 時間で失われることがわかった (図 6.1G)。以上の結果から、翅基部の切断によって引張り力を緩和すると、細胞接着面の線張力およびばね定数の両方の異方性が低下することが明らかになった。

6.2 胚の前後軸情報の遺伝的攪乱によって張力パラメータの異方性が低下した

胚帯身長 (GBE) 期のショウジョウバエ胚において、胚帯の細胞が *myo-II* を DV 軸方向の細胞接着面に局在させるためには、転写因子をコードするペアルール遺伝子 *even-skipped* および *runt* の AP 軸方向に沿った縞模様の遺伝子発現などの AP 軸方向に沿ったパターンニングが必要がある (第 3.2.3 項参照; Zallen and Wieschaus, 2004; Paré *et al.*, 2014)。例えば、*runt* の機能喪失型変異体では AP 軸方向に沿ったパターンニングが攪乱され、方向性を持った細胞配置換えや胚帯伸長が阻害される (図 6.2A, B; Irvine and Wieschaus, 1994; Zallen and Wieschaus, 2004; Farrell *et al.* 2017)。本研究では *runt* の機能喪失型変異体 (*runt*³) の画像データから力学パラメータの推定を行い、AP 軸方向に沿った遺伝子発現パターンの遺伝的攪乱が予測張力や張力パラメータに与える影響を調べた。

図 6.2 に結果を示す。*runt*³ の予測張力の異方性は、WT よりも小さくなった (図 6.2C–E, H)。張力パラメータの異方性に着目すると、細胞接着面の線張力とばね定数の両方について、異方性が弱くなり (図 6.2F, G)、異方性の向きのサンプル間のばらつきが大きくなった (図 6.2I, J)。

以上から、外科的・遺伝的に体軸情報を攪乱すると、予測張力の異方性と細胞接着面の線張力および負のばね定数の異方性が低下することが明らかになった。

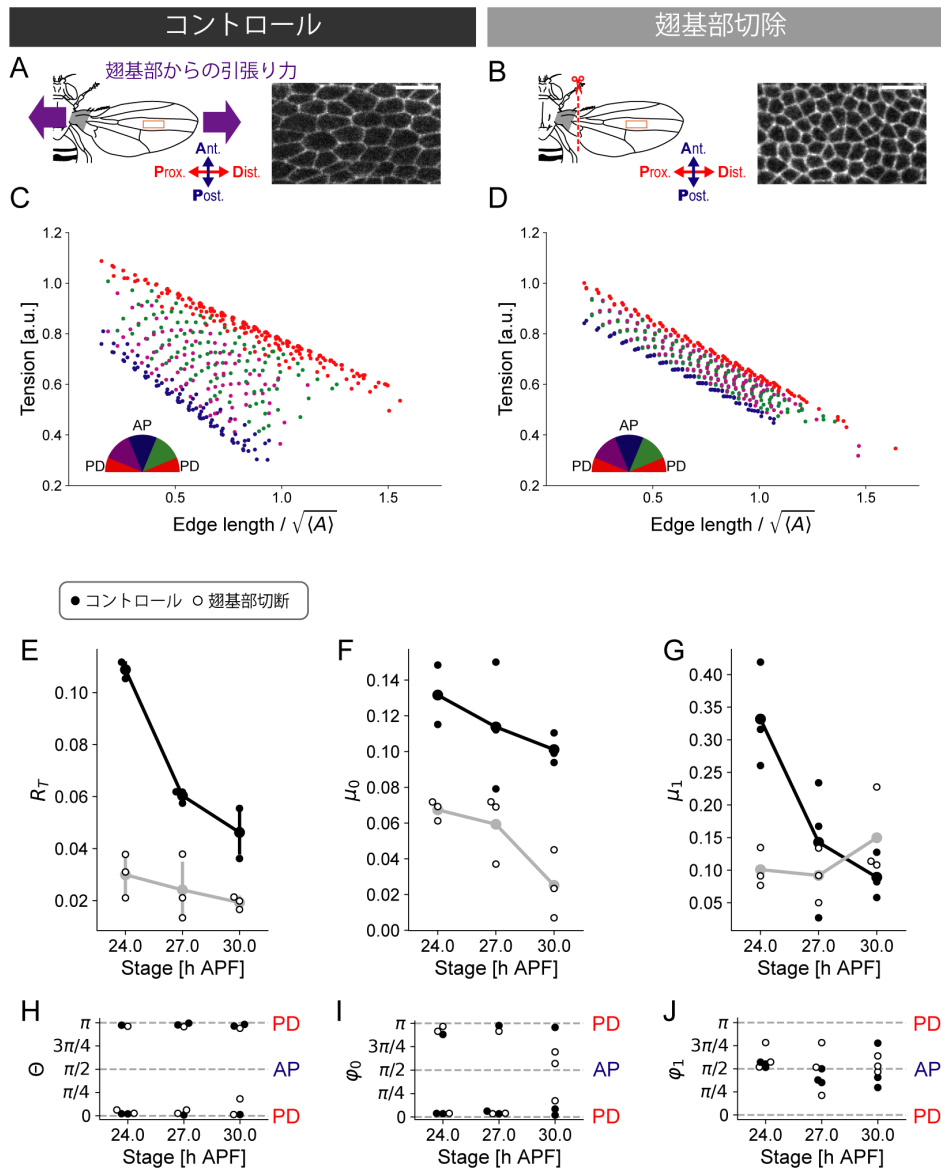


図 6.1 翅基部の切断による予測張力および張力パラメータへの影響

(A, B) 実験条件の概要。翅は翅基部から引張り力を受けるが (A; 紫矢印)、基部で切断した翅では引張り力が失われる (B)。それぞれのパネルの右側に推定に用いた組織の画像を示す。スケールバー: $10 \mu\text{m}$ 。(C, D) コントロールの翅 (C) および基部で切断した翅 (D) における予測張力と細胞接着面の長さおよび向きとの相関。半円は点の色と細胞接着面の体軸に対する向きとの対応を示す。 $\langle A \rangle$ は細胞の平均面積を表す。(E-J) コントロールの翅 (黒丸) および基部で切断した翅 (白丸) の 24-30 h APF のタイムラプス画像から得られた予測張力の異方性と張力パラメータの推定値。予測張力の異方性の強さ R_T および向き θ を E, H に、細胞接着面の線張力の異方性の強さ μ_0 及び向き φ_0 を F, I に、ばね定数の異方性 μ_1 および向き φ_1 を G, J に示す。黒と灰色の線はそれぞれコントロールの翅と基部で切断した翅のステージごとの平均値 (E) あるいは中央値 (F, G) を表す。パネル E のエラーバーは標準偏差を表す。

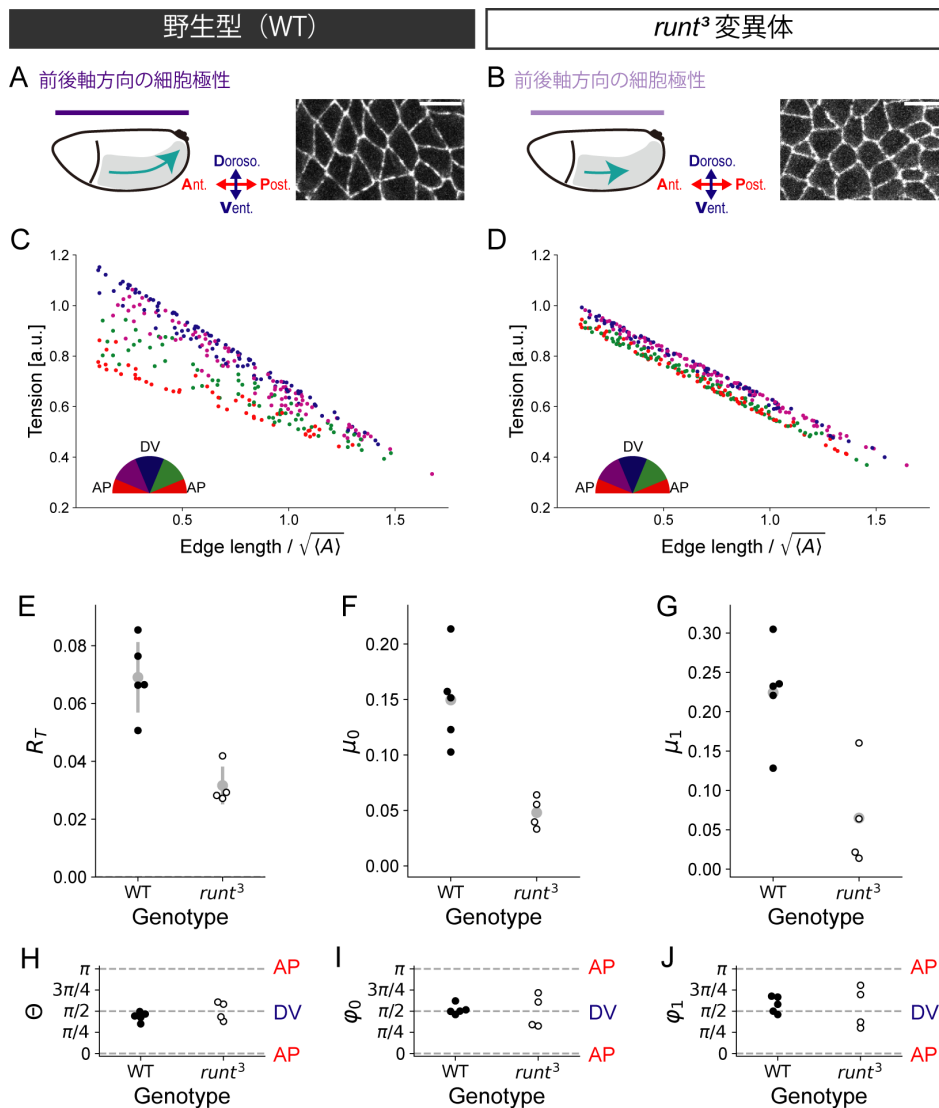


図 6.2 胚の体軸情報の遺伝的攪乱による予測張力および張力パラメータへの影響

(A, B) 実験条件の概要。WT 個体において、胚帯の細胞は前後軸方向の細胞極性を示す (紫矢印) (A)。一方、*runt*³ 変異体では前後軸方向の細胞極性が部分的に失われ、さらに胚帯の伸長も阻害される (B)。それぞれのパネルの右側に推定に用いた組織の画像を示す。スケールバー：10 μm 。(C, D) GBE 期の WT 個体 (C) および *runt*³ 個体 (D) における予測張力と細胞接着面の長さおよび向きとの相関。半円は点の色と細胞接着面の体軸に対する向きとの対応を示す。 $\langle A \rangle$ は細胞の平均面積を表す。(E-J) WT (黒丸) および *runt*³ (白丸) の胚のタイムラプス画像から得られた予測張力の異方性と張力パラメータの推定値。予測張力の異方性の強さ R_T および向き Θ を E, H に、細胞接着面の線張力の異方性の強さ μ_0 及び向き φ_0 を F, I に、ばね定数の異方性 μ_1 および向き φ_1 を G, J に示す。灰色の点はそれぞれの条件における平均値 (E) あるいは中央値 (F, G) を表す。パネル E のエラーバーは標準偏差を表す。

第7章

考察

第7章の前半では、本研究において開発した上皮組織の力学モデル構築およびパラメータ推定法の有効性や推定の妥当性、および手法の限界について議論する。後半では、細胞接着面の負のばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) の機能をショウジョウバエの上皮組織形態形成と対応させて考察する。最後に、形態形成の力学制御機構に関する研究において、本手法が今後果たすと期待される役割について述べる。

7.1 本研究で開発した手法の有効性について

本研究において、我々は上皮組織の画像データから上皮組織を構成する細胞の力学モデルおよびそのパラメータを統計的に推定する手法を開発した。

本手法では力のベイズ推定法によって得られた細胞の力と、細胞の形態特徴量が示す定量的な関係に基づいて力学モデルを構築する。これにより、データ駆動型のモデル構築が可能になり、細胞接着面が張力自体の異方性に加え、張力の辺長に対する依存性（ばね定数）の異方性を持つモデル（異方性ばねモデル）が構築された。

本手法では力学モデルの関数を代入した力の釣り合い方程式を解析的に解き、力学パラメータの推定値を得る。したがって、数値計算の繰り返しが必要な先行研究のアプローチより計算コストが少なく、パラメータ数が多い複雑な力学モデルのパラメータを簡単に推定できるようになった。これにより先行研究では計算コストの都合から固定値として推定から除外されていた張力パラメータの異方性の向きも、本研究では自由パラメータとして推定することができた。結果として、細胞接着面の線張力とばね定数の異方性の向きが直交するという予想外の知見を得ることができた。

さらに、本手法では統計モデリングで広く用いられるモデル評価基準である AIC を用いて定量的にモデル選択を行う。AIC によるモデル選択と前述の簡便なパラメータ推定によって、組織や発生ステージの異なる上皮組織画像データのそれぞれに対して、複数の張力モデルを検討し、最適な張力モデルを選択できるようになった。これにより、典型モデルよりも異方性ばねモデルがショウジョウバエ蛹の翅・背板およびショウジョウバエ胚の細胞接着面が持つ力学的な性質をより良く反映していることが明らかになった。

7.2 本手法の妥当性について

本研究では、開発した手法の妥当性を人工データと生体データを用いて検証した。人工データを用いた試験によって、AIC を用いたモデル選択の妥当性や、パラメータ推定の正確性を確認した。これらの結果から、本手法が人工データに対して高い推定能力を有することが示された。さらに、本手法を生体データに適用した結果、予測張力の異方性が先行研究における報告と一致することから、本手法によって生体データの張力パラメータに対しても適切な推定値が得られることを確認した。

動物の上皮組織における細胞の圧力に関する知見が限られているため、生体データにおける圧力パラメータの妥当性の検証はできなかった。力のベイズ推定法を用いて取得した細胞の圧力と面積の関係はばらつきが大きく、圧力モデルのモデル構築についても不確実な部分が多い（図 2.2D 参照）。圧力モデルの関数や圧力パラメータの推定値の妥当性の検証のためには、細胞の力学計測法のさらなる発展が待たれる。

7.3 本手法の限界と対策

本研究において開発した手法は、効率・精度よく上皮組織の力学パラメータを推定できる一方、原理的な限界もある*1。

一点目は、本手法により得られる力学パラメータの推定値は相対値である点だ。これは、静水圧 (P_0) が力の釣り合い方程式 (式 2.5) から消去されてしまうことに起因する。したがって力学パラメータの絶対値を取得したい場合には、光ピンセット法などの実験計測法による測定結果によって較正する必要がある。

二点目は、統計推定一般の問題で、力学モデルの各パラメータがどのような原因で決定されるかを本手法単独では特定できない点だ。例えば、ある組織において細胞接着面の線張力の異方性 μ_0 が高い推定値を示した場合を考えよう。 μ_0 が高い推定値を示す原因として、組織が伸長するために特定の方向の細胞接着面に分子モーターを局在させる能動的な

*1 本節の内容は力のベイズ推定法と共通する。

場合が考えられる。加えて、組織が周囲から引張られ、引張られた方向の細胞接着面の張力が高くなる受動的な場合もありうる。しかしながら、本手法によってわかるのは、上皮組織の画像を撮影した時点において μ_0 が高い値を示すということだけであり、その原因が前述の2つのどちらであるかを区別することはできない。力学パラメータの決定要因を同定するためには、第6章で示したような摂動実験を行う必要がある。能動的・受動的に伸長する組織はそれぞれ特徴的な細胞形態や移動を示すことが理論的に示唆されている (Glickman *et al.*, 2003; Ishihara *et al.*, 2018)。今後、これらの情報を推定に取り込むことで、解析した上皮組織の伸長が能動的か受動的かを区別できるようになるかもしれない。

7.4 細胞接着面の負のばね定数の異方性の機能について

野生型ショウジョウバエにおいて、細胞接着面の線張力の異方性 (μ_0, φ_0) および負のばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) が発生過程に伴って変化することが明らかになった (第5.2節)。線張力の異方性 (μ_0, φ_0) は、張力異方性 (R_T, Θ) とよく相関することから、myo-IIの局在の偏りを反映すると考えられる (第3.2項参照)。

細胞接着面の負のばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) は、myo-II濃縮フィードバックの異方性を表していると考えられる (第2.2節)。実際、先行研究において提示された胚帯の細胞接着面の張力モデルと同様に、胚帯では (μ_1, φ_1) と細胞配置換えにおける細胞接着面の収縮の相関が見られた (図7.1A; 表5.2)。一方で、蛹の翅上皮において、(μ_1, φ_1) と細胞配置換えにおける細胞接着面の収縮は、受動的な細胞配置換えでは相関したが、能動的な細胞配置換えでは相関しなかった (表5.2)。翅の発生段階による、(μ_1, φ_1) と細胞配置換えにおける細胞接着面の収縮の相関の差に発生生物学的な意義があるのだろうか。

蛹の翅上皮では翅基部からの引張り力に抵抗するために myo-II が PD 軸方向の細胞接着面に局在し、PD 軸方向の細胞接着面の張力は AP 軸方向の細胞接着面に比べて高くなる (図3.2A)。したがって、能動的な細胞配置換えでは、PD 軸方向の細胞接着面を収縮させるために myo-II を濃縮させる必要はない (図7.1B)。一方で、受動的な細胞配置換えでは、AP 軸方向の細胞接着面を収縮させるためには、PD 軸方向の myo-II 局在に直交した AP 方向の細胞接着面に myo-II を濃縮させなければならない (図7.1C)。このように、(μ_1, φ_1) と細胞配置換えにおける細胞接着面の収縮の相関の有無は、細胞配置換えにおける細胞接着面収縮のために myo-II の濃縮し、細胞接着面の張力を上昇させる必要があるか否かを反映していると考えられる。

蛹の翅上皮における受動的な細胞配置換えでは、細胞接着面の線張力の異方性 (μ_0, φ_0) と負のばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) を独立に制御することで、翅基部からの DV 軸方向の引張り力に抵抗しつつ、AP 軸方向の細胞接着面の張力を上昇させ細胞配置換えを促進し

ているのかもしれない。今後、翅においてはばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) を制御する分子メカニズムを明らかにする必要がある。翅上皮では AP 軸方向の細胞接着面にアクチン結合タンパク質である actin interacting protein 1 やシグナル伝達因子である PI 3,4,5-トリリン酸が局在することが先行研究において報告されている (Ikawa and Sugimura, 2018; Berdet *et al.*, 2013)。これらのタンパク質やシグナル伝達物質の局在の違いによって myo-II 濃縮フィードバックの強弱が制御されているのかもしれない。

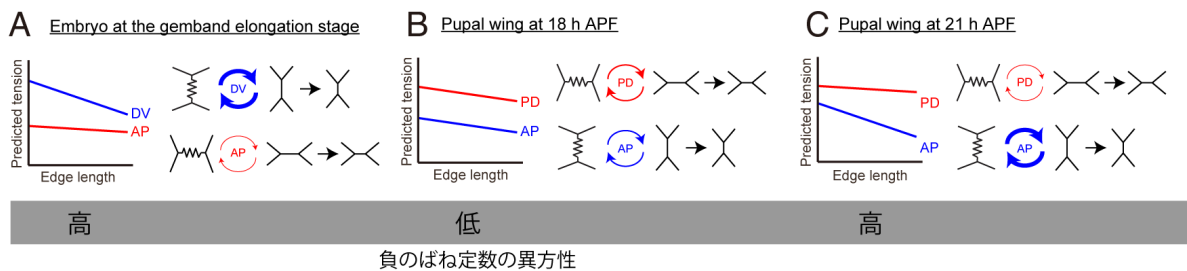


図 7.1 細胞接着面の負のばね定数の異方性を介した方向性を持った細胞配置換えの制御

(A–C) 細胞接着面の負のばね定数の異方性 (μ_1, φ_1) と、方向性を持った細胞配置換えにおける myo-II 濃縮フィードバックの相関。線の色および矢印の太さは、それぞれ細胞接着面の体軸に対する方向および myo-II 濃縮フィードバックの強さを表す。GBE 期のショウジョウバエ胚では、DV 方向の細胞接着面の負のばね定数が大きくなった (A, 左図)。これは、方向性を持った細胞配置換えにおいて DV 軸方向の細胞接着面を収縮させるために、DV 方向の細胞接着面の myo-II 濃縮フィードバックがより強くなることを反映していると考えられる (A, 右図)。蛹化後 18 時間のショウジョウバエ蛹の翅上皮では、PD 方向の細胞接着面に myo-II が濃縮しているため、方向性を持った細胞配置換えのために myo-II 濃縮は必要ない (B)。一方で、蛹化後 21 時間のショウジョウバエ蛹の翅上皮では、方向性を持った細胞配置換えのために AP 方向の細胞接着面に myo-II を濃縮させる必要がある (C, 右図)。AP 方向の細胞接着面の負のばね定数は、この myo-II 濃縮の必要性を反映して大きくなっていると考えられる (C, 左図)。

7.5 今後の展開

力学と遺伝子ネットワークはフィードバックを形成し、お互いを綿密に制御し合うことで組織を形作る (Hannezo and Heisenberg 2019; Wagh *et al.*, 2021)。したがって、力学—遺伝子ネットワーク間のフィードバック制御による形態形成機構を理解するためには、力学計測と遺伝学的アプローチを組み合わせた解析が必要である。生体内で細胞の機械特性を測定する既存の手法は高度な技術を必要とするため、遺伝子型と細胞の機械特性の関係を網羅的に調査することは困難であった。一方で、本研究において開発した手法は上皮細胞の形態が標識された画像のみを入力データとして必要としており、遺伝学的アプロー

チとの組み合わせが容易である。例えば、本手法を用いて細胞の力学パラメータを指標とする大規模遺伝学スクリーニングを行うことで、特定の力学パラメータに影響を及ぼす遺伝子を特定できるかもしれない。第6章において外科的・遺伝的な摂動を検出できたことから、このような解析の有効性は大いに期待できる。さらに、本手法をショウジョウバエ以外の生物に用いることで、上皮組織形態形成に共通する原理や、種・器官特異的な性質も明らかにできるかもしれない。

第 8 章

材料と方法

8.1 上皮組織における力のベイズ推定法

統計学において、事前分布および尤度関数を用いて計算した事後分布を最大化するパラメータの値を最大事後確率 (Maximum a posteriori; MAP) 推定値と呼ぶ。力のベイズ推定法では、細胞接着面の張力が正であるという実験事実と細胞頂点における力の釣り合い方程式を基にそれぞれ導出した事前分布と尤度関数を用いて事後分布を計算し、MAP 推定値を得る (Ishihara and Sugimura, 2012)。

細胞接着面の張力の事前分布は、細胞接着面の張力が平均 1、分散 ω^2 の正規分布に従うと仮定し、

$$\pi_T(\mathbf{X}; \omega^2) = \frac{1}{(2\pi\omega^2)^{m'/2}} \exp \left[-\frac{1}{2\omega^2} \sum_{ij} (T_{ij} - 1)^2 \right] \quad (8.1)$$

とした。式 8.1 において、 \mathbf{X} は第 2.3 節で定義した細胞接着面の張力 T_{ij} と細胞の圧力 P_i を並べたベクトルである。 m' は画像データ中の細胞接着面の総数を表す。細胞の圧力の事前分布は、静水圧の効果を打ち消すためにディラックのデルタ関数 $\delta(\mathbf{X} \cdot \mathbf{X}_{hs})$ とした。 $\mathbf{X} \cdot \mathbf{X}_{hs}$ はベクトル \mathbf{X} と \mathbf{X}_{hs} との間の内積を表す。 \mathbf{X}_{hs} は、 \mathbf{X} の全ての細胞接着面の張力成分 T_{ij} および細胞の圧力成分 P_i をそれぞれ 0 および 1 としたベクトルである。

尤度関数は、細胞頂点に働く合力が平均 0、分散 σ^2 の正規分布に従うと仮定し、

$$P(\mathbf{0}|\mathbf{X}; \sigma^2) = \frac{1}{(2\pi\sigma^2)^n} \exp \left[-\frac{1}{2\sigma^2} \|\mathbf{C}\mathbf{X}\|^2 \right] \quad (8.2)$$

とした。式 8.2 において、 n は画像データ中の細胞頂点の数を表す。以上の事前分布および尤度関数を組み合わせて、細胞の力の事後分布を式 8.3 により計算した。

$$P(\mathbf{X}|\mathbf{0}) \propto P(\mathbf{0}|\mathbf{X})\pi_T(\mathbf{X})\delta(\mathbf{X} \cdot \mathbf{X}_{hs}) \quad (8.3)$$

式 8.3 を \mathbf{X} について周辺化した周辺尤度を最大化する ω および σ を数値最適化によっ

て求めたのち、これらの値を用いて \mathbf{X} の MAP 推定値を計算した (推定の詳細は Ishihara and Sugimura, 2012 を参照)。

先行研究において CVM の数値計算により生成した人工データを用いて複数の事前分布をテストし、細胞接着面の張力を正とする事前分布が最も正確な推定値を与えることが示されている (Ishihara and Sugimura, 2012)。加えて、人工データや実験データを用いた検証により、推定の妥当性と頑健性が確認されている (Ishihara *et al.*, 2013; Ishihara and Sugimura, 2012; Sugimura *et al.*, 2013; Sugimura and Ishihara, 2013)。

力のベイズ推定法とパラメータ推定法は、解くべき力の釣り合い方程式は同じだが、未知変数の数が異なる。力のベイズ推定は、細胞の力学モデルを仮定することなく \mathbf{X} を直接推定する。したがって、未知変数の数は \mathbf{X} の成分数、すなわち細胞接着面の数と細胞の数の和である。一方、パラメータ推定法は細胞の力学モデルを仮定することで、未知数の数が \mathbf{X} の成分数から力学モデルのパラメータ数まで減少する。これにより、力の釣り合い方程式は優決定となり単体で解けるようになる。

8.2 力学パラメータ推定

8.2.1 データの前処理

データの前処理として、外れ値の除去および空間スケールの標準化を行った。極端に短い細胞接着面は、方向を正確に評価できないので、基準値よりも短い細胞接着面を入力データから除外した (人工データ: $0.05 \times \sqrt{A_0}$; 上皮組織画像データ: 3 ピクセル)。加えて、背板の感覚細胞など、極端に大きな面積をもつ細胞はその他の細胞と異なる機械物性を持つと考えられるので (図 8.1A)、組織中の細胞面積の中央値の 2 倍より大きい面積を持つ細胞も入力データから除外した (図 8.1B, C)。以上の操作後に、細胞面積の中央値を用いて空間スケールを標準化した。

8.2.2 力の釣り合い方程式の解法

異方性ばねモデルの力学パラメータの推定では、以下に述べる方法で力の釣り合い方程式を線形重回帰問題に帰着した。式 2.2 の細胞接着面の線張力 $\Lambda_0(\theta_{ij})$ および負のばね定数 $\Lambda_1(\theta_{ij})$ は、式 8.4 で定義される $(\lambda'_0, \lambda''_0, \lambda'_1, \lambda''_1)$ を用いると、式 8.5 のように力学パラメータに関して線形に表される。

$$\begin{aligned} \lambda'_0 &= \lambda_0 \mu_0 \sin 2\varphi_0 \\ \lambda''_0 &= \lambda_0 \mu_0 \cos 2\varphi_0 \\ \lambda'_1 &= \lambda_1 \mu_1 \sin 2\varphi_1 \\ \lambda''_1 &= \lambda_1 \mu_1 \cos 2\varphi_1 \end{aligned} \tag{8.4}$$

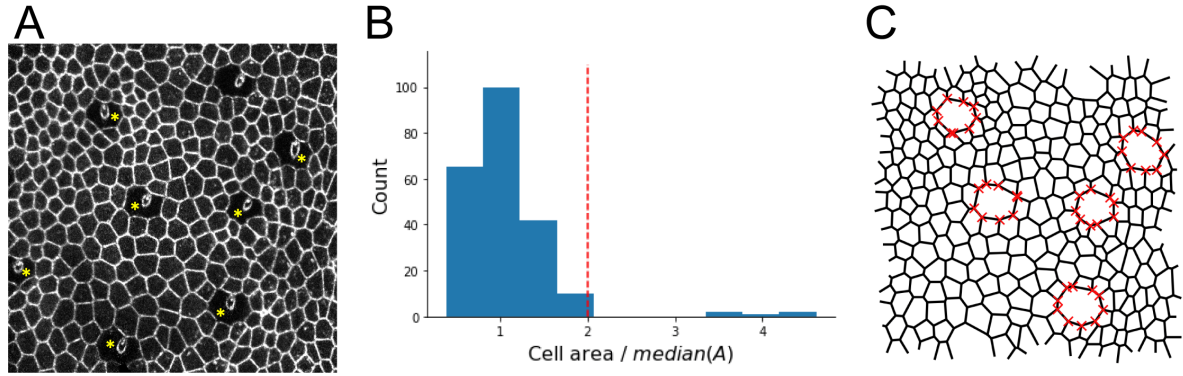


図 8.1 データの前処理：細胞面積

(A) 背板の画像の例。感覚細胞を黄色のアスタリスクで示す。(B) 細胞面積の分布。細胞面積の中央値の 2 倍 (赤点線) を基準とし、それよりも大きい細胞を外れ値として除外した。(C) 推定に用いた前処理後のデータ。赤い × 印で囲まれた細胞を外れ値として除外した。

$$\begin{cases} \Lambda_0(\theta_{ij}) = \lambda_0 + \lambda'_0 \sin 2\theta_{ij} + \lambda''_0 \cos 2\theta_{ij} \\ \Lambda_1(\theta_{ij}) = \lambda_1 + \lambda'_1 \sin 2\theta_{ij} + \lambda''_1 \cos 2\theta_{ij} \end{cases} \quad (8.5)$$

したがって、行列 L_T および L_P を

$$L_T = \begin{pmatrix} \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & \sin 2\theta_{ij} & \cos 2\theta_{ij} & -l_{ij} & -l_{ij} \sin 2\theta_{ij} & -l_{ij} \cos 2\theta_{ij} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \end{pmatrix}, \quad (8.6)$$

$$L_P = \begin{pmatrix} \vdots \\ -A_i \\ \vdots \end{pmatrix}$$

と定義すると、細胞接着面の張力および細胞の圧力によって構成されるベクトル \mathbf{T} および \mathbf{P} は、式 8.7 によって与えられる。

$$\mathbf{T} = L_T \boldsymbol{\beta}_T, \quad \mathbf{P} = L_P \boldsymbol{\beta}_P \quad (8.7)$$

式 8.7 において、 $\boldsymbol{\beta}_T = (\lambda_0, \lambda'_0, \lambda''_0, \lambda_1, \lambda'_1, \lambda''_1)^T$ および $\boldsymbol{\beta}_P = (k)$ は力学モデルのパラメータから構成されるベクトルを表す。モデル B-E のパラメータ推定は、不必要な力学パラメータおよびそのパラメータに対応する列を $\boldsymbol{\beta}_T$ および L_T からそれぞれ除外し、モデル A と同様に行った。

式 8.7 を用いると、画像中の細胞頂点における力の釣り合い方程式 (式 2.7) は、

$$L = \begin{pmatrix} L_T & 0 \\ 0 & L_P \end{pmatrix}, \quad \boldsymbol{\beta} = \begin{pmatrix} \boldsymbol{\beta}_T \\ \boldsymbol{\beta}_P \end{pmatrix} \quad (8.8)$$

を用いて、

$$\mathbf{F} = CL\boldsymbol{\beta} = \mathbf{0} \quad (8.9)$$

と表される。本研究で開発した手法では、式 8.9 を β について解いて推定した。本手法では力学パラメータの相対値しか推定できないため、 λ_0 をスケーリング因子として 1.0 に固定した。その他の力学パラメータは $\|\mathbf{F}\|^2$ の最小化により推定した。この問題は線形重回帰問題と同等であり、最小二乗法によって解くことができる（詳細は第 9.1 節を参照）。本研究では、Python のパッケージ statsmodels 内の関数 OLS.fit() を用いて重回帰問題を解いた。AIC も同じ関数を用いて計算した。推定を行った後、式 8.4 を用いて力学パラメータの変換を行った。

典型モデルにおいて、細胞皮質の弾性 Γ は正であると仮定されている (Farhadifar *et al.*, 2007; Staple *et al.*, 2010)。したがって、本研究でも同様に拘束条件 $\Gamma > 0$ のもと $\|\mathbf{F}\|^2$ を最小化し、力学パラメータを推定した。スケーリング因子は異方性ばねモデルと同様、 $\lambda_0 = 1.0$ とした。本研究では Python のパッケージ SciPy 内の関数 optimize.least_squares() を用いて $\|\mathbf{F}\|^2$ を最小化し、力学パラメータを推定した。推定後に式 2.9 を用いて AIC を計算した。

8.3 予測張力の異方性

予測張力の異方性 R_T は、

$$R_T \langle \hat{T}_{ij} \rangle e^{i2\Theta} = \langle \hat{T}_{ij} e^{i2\theta_{ij}} \rangle - \langle \hat{T}_{ij} \rangle \langle e^{i2\theta_{ij}} \rangle \quad (8.10)$$

により計算した (図 8.2; Sugimura and Ishihara, 2013)。ここで、 \hat{T}_{ij} は i 番目と j 番目の細胞を隔てる細胞接着面の予測張力を表し、 $\langle x_{ij} \rangle$ はある量 x_{ij} の組織内の全細胞接着面についての平均を表す。 Θ は R_T の方向を表す。

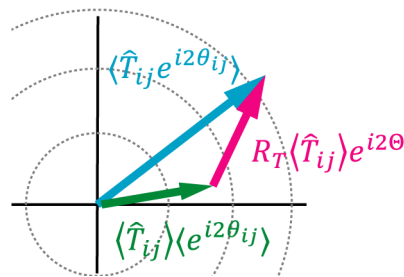


図 8.2 張力異方性を表す統計量 (R_T, Θ) の定義

(R_T, Θ) の定義。図中のマゼンタ色、水色および緑色の矢印は、式 8.10 の左辺、右辺第 1 項および右辺第 2 項に対応する。張力の角度平均（水色矢印）から細胞接着面の角度分布の効果（緑色矢印）を差し引いて張力異方性（マゼンタ色矢印）を計算する。Sugimura and Ishihara, 2013 を参考に作成した。

8.4 ショウジョウバエ系統

本研究で用いたショウジョウバエ系統は、*sqhp-sqh-GFP* (Royou *et al.*, 2004)、*UAS-D α -cat-TagRFP* (Ishihara and Sugimura, 2012)、*apterous(ap)-Gal4*, *DE-cad-GFP* (Huang *et al.*, 2009)、および *runt*³ (別称 *runt*^{LB5}; Gergen and Butler, 1988; Zallen and Wieschaus, 2004) である。図番号と用いたショウジョウバエの遺伝型を表 8.1 に示す。

図番号	遺伝型	画像データ取得	撮影条件
図 2.2, 図 2.3 図 2.7, 図 2.9	<i>DE-cad-GFP</i>	Ikawa and Sugimura, 2018	タイムラプス画像
図 4.2B, F, J, N 図 4.2C, G, K, O 図 4.3A–J 図 4.4A, B, D, E 図 5.2A, B, D, E 図 5.3A, B, D, E	<i>sqhp-sqh-GFP</i> , <i>UAS-Dα-cat-TagRFP/sqhp-sqh-GFP</i> , <i>ap-Gal4</i>	Ishihara and Sugimura, 2012 Sugimura and Ishihara, 2013	静止画像
図 4.2D, H, L, P 図 4.3K, L 図 4.4C, F 図 5.2C, F 図 5.3C, F 図 6.2A, C, E–J	<i>DE-cad-GFP</i>	本研究	タイムラプス画像
図 6.1	<i>DE-cad-GFP</i>	Ikawa and Sugimura, 2018, 本研究	タイムラプス画像
図 6.2B, D, E–J	<i>runt</i> ³ / <i>Y</i> ; <i>DE-cad-GFP</i>	本研究	タイムラプス画像

表 8.1 本研究で用いたショウジョウバエの遺伝型および画像データの由来

8.5 外科的操作による組織応力の緩和

先行研究と同様の方法で、蛹化後 23 時間にピンセットを用いてショウジョウバエ蛹の翅を基部で切断した (Ikawa and Sugimura, 2018; Sugimura and Ishihara, 2013)。

8.6 画像取得

本研究で解析に用いた画像データは先行研究および本研究において取得されたものである (表 8.1)。

ショウジョウバエ蛹の翅および背板のライブイメージングは先行研究にならった (Guirao *et al.*, 2015; Ikawa and Sugimura, 2018; Koto *et al.*, 2009; Sugimura and Ishihara, 2013)。まず、両面テープを用いて蛹をスライドグラスに固定し、左翅あるいは背板の囲蛹殻を注射針とピンセットを用いて除去した。次に、蛹をガラスボトムディッシュあるいはスライドグラスにマウントした。翅を撮影する場合は、ガラスボトムディッ

シュのガラス面の上に水あるいはイマージョンオイル (Immersol W 2010, ツァイス社) を滴下し、その上に蛹を固定した。水マウンドの場合は、左翅がガラス面に向くように、ろ紙を用いて蛹の向きを調整した。オイルマウンドの場合は、蛹の右側面を両面テープにつけて、左翅がガラス面に向くように、両面テープをガラスボトムディッシュに固定した。背板を撮影する場合は、水を垂らしたカバーガラスとシリコングリス (HIVAC-G, 信越化学工業) を用いて蛹を封入した。翅および背板の静止画像は、FV1000D 共焦点倒立顕微鏡 (Olympus) に 60x/NA1.2 SPlanApo 水浸対物レンズを取り付けて撮影した。翅のタイムラプス動画は、IX83 倒立顕微鏡 (Olympus) に CSU-W1 (横河電機) および iXon3 888 EMCCD カメラ (Andor)、60x/NA1.2 SplanApo 水浸対物レンズ、ステージトップインキュベーター (東海ヒット) を取り付け、IQ 2.9.1 を使用して撮影した (Guirao *et al.*, 2015)。撮影は、1 分間隔で蛹化後 24 時間から 30 時間まで行った。

ショウジョウバエ胚のライブイメージングは先行研究の方法を改良して行った (Kondo and Hayashi, 2013)。まず、胚を漂白剤により塩素漂白してコリオンを除去し、水で洗浄した。次に、糊を用いて、胚をガラスボトムディッシュに固定した。シリコングリス (HIVAC-G, 信越化学工業) を用いて胚の周りに土手を作った後に、シリコンオイル (FL-100-1000CS, 信越化学工業) を用いて胚を覆った。乾燥を防ぐために、土手の外側は水で満たした。タイムラプス撮影は、前述の CSU 撮影システムに 60x/NA1.35 SPlanApo 油浸対物レンズを取り付け、10 秒間隔で行った。

8.7 画像処理と解析

本研究で開発した手法は、モデル構築およびパラメータ推定のために細胞頂点の座標及び接続関係を必要とする。そこで、細胞接着面を蛍光標識した画像を細線化処理し、細線化画像から細胞頂点の座標と接続関係を抽出した。蛹の翅および背板の静止画像の細胞輪郭の細線化は、先行研究と同様に ImageJ のマクロおよびプラグインを用いて行った (Sugimura and Ishihara, 2013)。翅および胚のタイムラプス画像の細胞輪郭の細線化は、2次元組織の細線化を行う Python パッケージである EPySeg を用いた (図 8.3A,B; Aigouy *et al.*, 2020)。細胞頂点の位置及び接続関係は、石原秀至博士が C++ および OpenCV を用いて実装したソフトウェア (GetVertex) を用いて抽出した (図 8.3C, D)。

8.8 パラメータ推定のノイズ耐性試験

パラメータ推定の画像解析誤差に対する頑健性を評価するために、細胞頂点の座標にノイズを加えたデータ (ノイズ付加データ) と加えていないデータ (元データ) からパラメータ推定を実施し、それぞれの推定値を比較した。ノイズ付加データは、元データ

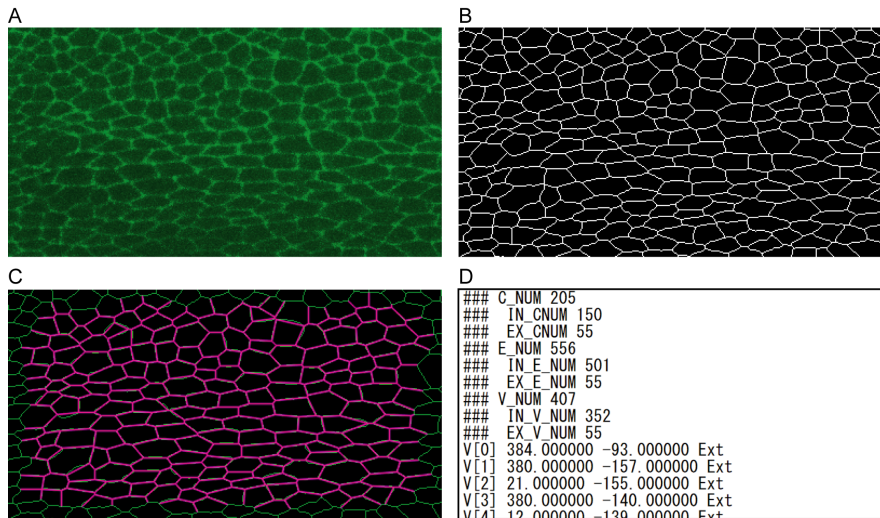


図 8.3 画像処理の流れ

(A) 処理を行う前の蛍光画像。緑色のシグナルは *DE-cad-GFP* を示す。本画像は図 2.2A のものと同様である。(B) EpySeg による細線化処理後の画像。蛍光シグナルから細胞の輪郭を抽出する。(C, D) GetVertex による画像解析の結果。(C) 細線化処理後の画像（緑線、B の白線と同じ）から、直線近似した細胞輪郭を抽出する（マゼンタ線）。(D) 細胞頂点の座標、細胞頂点の接続関係などの情報をテキストファイルで取得する。

の細胞頂点の座標の 10% にガウシアンノイズを加えて生成した。ノイズの標準偏差は元データの散らばり（行列 CL の各行の分散）を考慮し、人工データと生体データに対して同程度の影響が出るように調整した（人工データ： $0.02 \times \sqrt{\text{median}(A)}$ 、生体データ： $0.05 \times \sqrt{\text{median}(A)}$ ）。ノイズ付加データのパラメータ推定には、人工データに対してはモデル A を、生体データに対しては元データで選択された張力モデルを用いた。ノイズ付加データのパラメータ推定を行った後、力学パラメータの推定値の差異 $\delta\beta$ およびノイズ付加データと元データ間の張力予測値の相関係数 r を計算した。力学パラメータの推定値の差異は、 $\delta\beta = (\beta_n - \beta_o)/\beta_o$ と定義した。この式における β_n と β_o は、それぞれノイズ付加データおよび元データから推定したある力学パラメータ β の推定値を表す。上記の操作をそれぞれのサンプルに対し 100 回繰り返して、 $\delta\beta$ の中央値を図 4.2 にプロットした。

第9章

補遺

9.1 線形重回帰によるパラメータ推定

本節では、異方性ばねモデルのパラメータ推定問題を線形重回帰モデルに帰着する方法を説明する。まず、線形重回帰モデルの定義と最小二乗法によるパラメータ推定について解説する。次に、異方性ばねモデルのパラメータ推定を行う際に解く力の釣り合い方程式を変形し、線形重回帰モデルに帰着する方法を示す。

一般に、ある現象が複数の要因から引き起こされ、現象と要因の間に線形の関係があるときに線形重回帰モデルが用いられる。着目する現象を目的変数 y 、複数の要因を x_i ($i = 1, 2, \dots, p$) とすると、その関係は、式 9.1 で与えられる。

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \cdots + \beta_p x_p + \varepsilon \quad (9.1)$$

式 9.1 において、 β_0 は定数項を表すパラメータであり、 $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p$ は変数 x_1, x_2, \dots, x_p に対応するパラメータである。 ε は誤差を表す。ここで、 n 回の測定によって $(y_1, x_{11}, x_{12}, \dots, x_{1p})$, $(y_2, x_{21}, x_{22}, \dots, x_{2p})$, \dots , $(y_n, x_{n1}, x_{n2}, \dots, x_{np})$ の n 組のデータセットが得られたとする。目的変数の観測値を並べたベクトル \mathbf{y} および説明変数を並べた行列 X を

$$\mathbf{y} = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix}, X = \begin{pmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1p} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \cdots & x_{np} \end{pmatrix} \quad (9.2)$$

のように定義すれば、線形重回帰モデルは、

$$\mathbf{y} = X\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (9.3)$$

と表される。式 9.5 において、 $\boldsymbol{\beta}$ および $\boldsymbol{\varepsilon}$ はパラメータベクトルおよび誤差ベクトルであ

り、以下のように定義される。

$$\boldsymbol{\beta} = \begin{pmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_p \end{pmatrix}, \boldsymbol{\varepsilon} = \begin{pmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{pmatrix} \quad (9.4)$$

このとき、誤差の二乗和を最小化するパラメータの値が最小二乗法による推定値 $\hat{\boldsymbol{\beta}}$ であり、

$$\hat{\boldsymbol{\beta}} = (X^T X)^{-1} X^T \mathbf{y} \quad (9.5)$$

により与えられる。

式 8.9 (第 8.2.2 節) の左辺および中辺は、

$$\mathbf{F} = CL\boldsymbol{\beta} \quad (9.6)$$

であった。スケール因子として $\lambda_0 = 1$ とすると、上式は

$$\begin{aligned} \mathbf{F} &= CL \begin{pmatrix} 1 \\ \lambda'_0 \\ \lambda''_0 \\ \lambda_1 \\ \lambda'_1 \\ \lambda''_1 \\ k \end{pmatrix} \\ &= (\mathbf{CL})_1 + (CL)_{2:7} \boldsymbol{\beta}_{2:7} \end{aligned} \quad (9.7)$$

と変形できる。ここで、 $(\mathbf{CL})_1$ および $(CL)_{2:7}$ はそれぞれ、行列 CL の 1 列目および 2-7 列目を抜き出した列ベクトルおよび行列である。 $\boldsymbol{\beta}_{2:7} = (\lambda'_0, \lambda''_0, \lambda_1, \lambda'_1, \lambda''_1, k)^T$ とすると、式 9.7 の変形によって式 9.8 が得られる。

$$(\mathbf{CL})_1 = -(CL)_{2:7} \boldsymbol{\beta}_{2:7} + \mathbf{F} \quad (9.8)$$

式 9.8 において、

$$\begin{aligned} \mathbf{y} &= (\mathbf{CL})_1, \\ X &= -(CL)_{2:7}, \\ \boldsymbol{\beta} &= \boldsymbol{\beta}_{2:7}, \\ \boldsymbol{\varepsilon} &= \mathbf{F} \end{aligned}$$

とすれば、式 9.8 は線形重回帰モデル (式 9.3) と一致する。本手法で求める推定パラメータは、細胞頂点に加わる合力 \mathbf{F} の成分の二乗和を最小にするもの、すなわち、最小二乗推定値である。したがって、力学パラメータの推定値は式 9.5 により得られる。

注釈

本研究は、複数の共同研究者とともに行われた。手法の開発や研究の進行、得られた解析結果の解釈については、杉村薫博士および石原秀至博士と議論を重ねて方針を吟味した。CVMの数値計算および力のベイズ推定法は、石原秀至博士が実装したプログラムを用いた。本研究で用いたショウジョウバエ蛹および胚の蛍光画像は、杉村薫博士、近藤武史博士および井川敬介博士が系統作製および撮影したものである。

参考文献

- [Agarwal and Zaidel-Bar, 2019] Agarwal, P., and Zaidel-Bar, R. (2019). Principles of actomyosin regulation *in vivo*. *Trends in Cell Biology* 29, 150 – 163. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.09.006>.
- [Aigouy *et al.*, 2020] Aigouy, B., Cortes, C., Liu, S., and Prud' Homme, B. (2020). EPySeg: a coding-free solution for automated segmentation of epithelia using deep learning. *Development* 147. <https://doi.org/10.1242/dev.194589>.
- [Aigouy *et al.*, 2010] Aigouy, B., Farhadifar, R., Staple, D.B., Sagner, A., Röper, J.-C., Jülicher, F., and Eaton, S. (2010). Cell flow reorients the axis of planar polarity in the wing epithelium of *Drosophila*. *Cell* 142, 773 – 786. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.042>.
- [Akaike, 1973] Akaike, H. (1973). Information theory and an extension of the maximum likelihood principle (Akademiai Kiado, Budapest).
- [Alt *et al.*, 2017] Alt, S., Ganguly, P., and Salbreux, G. (2017). Vertex models: from cell mechanics to tissue morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372, 20150520. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0520>.
- [Bambardekar *et al.*, 2015] Bambardekar, K., Clément, R., Blanc, O., Chardès, C., and Lenne, P.-F. (2015). Direct laser manipulation reveals the mechanics of cell contacts *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 1416 – 1421. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418732112>.
- [Bardet *et al.*, 2013] Bardet, P.-L., Guirao, B., Paoletti, C., Serman, F., Léopold, V., Bosveld, F., Goya, Y., Mirouse, V., Graner, F., and Bellaïche, Y. (2013). PTEN controls junction lengthening and stability during cell rearrangement in epithelial tissue. *Developmental Cell* 25, 534 – 546. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.04.020>.
- [Barriga *et al.*, 2019] Barriga, E.H., and Mayor, R. (2019). Adjustable viscoelasticity

- allows for efficient collective cell migration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 93, 55 – 68. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.05.027>.
- [Bertet *et al.*, 2004] Bertet, C., Sulak, L., and Lecuit, T. (2004). Myosin-dependent junction remodelling controls planar cell intercalation and axis elongation. *Nature* 429, 667 – 671. <https://doi.org/10.1038/nature02590>.
- [Bosveld *et al.*, 2012] Bosveld, F., Bonnet, I., Guirao, B., Tlili, S., Wang, Z., Petitalot, A., Marchand, R., Bardet, P.-L., Marcq, P., Graner, F., et al. (2012). Mechanical control of morphogenesis by Fat/Dachsous/Four-Jointed planar cell polarity pathway. *Science* 336, 724 – 727. <https://doi.org/10.1126/science.1221071>.
- [Broadland *et al.*, 2014] Broadland, G.W., Veldhuis, J.H., Kim, S., Perrone, M., Mashburn, D., and Hutson, M.S. (2014). CellFIT: A cellular force-inference toolkit using curvilinear cell boundaries. *PLOS ONE* 9, e99116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099116>.
- [Campàs, 2016] Campàs, O. (2016). A toolbox to explore the mechanics of living embryonic tissues. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 55, 119 – 130. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.03.011>.
- [Cantat *et al.*, 2013] Cantat, I., Cohen-Addad, S., Elias, F., Graner, F., Höhler, R., Pitois, O., Rouyer, F., Saint-Jalmes, A. and Cox, S. (2013). *Foams: structure and dynamics*. Oxford University Press.
- [Clément *et al.*, 2017] Clément, R., Dehapiot, B., Collinet, C., Lecuit, T., and Lenne, P.-F. (2017). Viscoelastic dissipation stabilizes cell shape changes during tissue morphogenesis. *Current Biology* 27, 3132-3142.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.005>.
- [Dasbiswas *et al.*, 2018] Dasbiswas, K., Hannezo, E., and Gov, N.S. (2018). Theory of epithelial cell shape transitions induced by mechanoactive chemical gradients. *Biophysical Journal* 114, 968 – 977. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.12.022>.
- [Davidson *et al.*, 2009] Davidson, L., von Dassow, M., and Zhou, J. (2009). Multi-scale mechanics from molecules to morphogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 2147 – 2162. <https://doi.org/10.1016/j.bio-cel.2009.04.015>.
- [Davidson and Keller, 2007] Davidson, L., and Keller, R. (2007). Measuring mechanical properties of embryos and embryonic tissues. *Methods in Cell Biology* 83, 425 – 439.
- [Etournay *et al.*, 2015] Etournay, R., Popović, M., Merkel, M., Nandi, A., Blasse, C., Aigouy, B., Brandl, H., Myers, G., Salbreux, G., Jülicher, F., et al. (2015).

- Interplay of cell dynamics and epithelial tension during morphogenesis of the *Drosophila* pupal wing. *eLife* 4, e07090. <https://doi.org/10.7554/eLife.07090>.
- [Farrel *et al.*, 2017] Farrell, D.L., Weitz, O., Magnasco, M.O., and Zallen, J.A. (2017). SEGGA: a toolset for rapid automated analysis of epithelial cell polarity and dynamics. *Development* 144, 1725 – 1734. <https://doi.org/10.1242/dev.146837>.
- [Farhadifar *et al.*, 2007] Farhadifar, R., Röper, J.-C., Aigouy, B., Eaton, S., and Jülicher, F. (2007). The influence of cell Mechanics, cell-cell interactions, and proliferation on epithelial packing. *Current Biology* 17, 2095 – 2104. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.11.049>.
- [Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2009] Fernandez-Gonzalez, R., Simoes, S. de M., Röper, J.-C., Eaton, S., and Zallen, J.A. (2009). Myosin II dynamics are regulated by tension in intercalating cells. *Developmental Cell* 17, 736 – 743. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.09.003>.
- [Fischer *et al.*, 2021] Fischer, L.S., Rangarajan, S., Sadhanasatish, T., and Grashoff, C. (2021). Molecular force measurement with tension sensors. *Annual Review of Biophysics* 50, 595 – 616. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-101920-064756>.
- [Fletcher *et al.*, 2017] Fletcher, A.G., Cooper, F., and Baker, R.E. (2017). Mechanocellular models of epithelial morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372, 20150519. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0519>.
- [Fletcher and Osborne, 2022] Fletcher, A.G., and Osborne, J.M. (2022). Seven challenges in the multiscale modeling of multicellular tissues. *WIREs Mechanisms of Disease* 14, e1527. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1527>.
- [Fletcher *et al.*, 2014] Fletcher, A.G., Osterfield, M., Baker, R.E., and Shvartsman, S.Y. (2014). Vertex models of epithelial morphogenesis. *Biophysical Journal* 106, 2291 – 2304. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.4498>.
- [Gergen and Butler, 1988] Gergen, J.P., and Butler, B.A. (1988). Isolation of the *Drosophila* segmentation gene *runt* and analysis of its expression during embryogenesis. *Genes & Development* 2, 1179 – 1193. <https://doi.org/10.1101/gad.2.9.1179>.
- [Glickman *et al.*, 2003] Glickman, N.S., Kimmel, C.B., Jones, M.A., and Adams, R.J. (2003). Shaping the zebrafish notochord. *Development* 130, 873 – 887. <https://doi.org/10.1242/dev.00314>.
- [Gómez-González *et al.*, 2020] Gómez-González, M., Latorre, E., Arroyo, M., and

- Trepat, X. (2020). Measuring mechanical stress in living tissues. *Nature Reviews Physics* 2, 300 – 317. <https://doi.org/10.1038/s42254-020-0184-6>.
- [Goodwin and Nelson, 2021] Goodwin, K., and Nelson, C.M. (2021). Mechanics of development. *Developmental Cell* 56, 240 – 250. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.025>.
- [Graner and Glaizier, 1992] Graner, F., and Glazier, J.A. (1992). Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended Potts model. *Physical Review Letters* 69, 2013 – 2016. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.69.2013>.
- [Guevorkian *et al.*, 2010] Guevorkian, K., Colbert, M.-J., Durth, M., Dufour, S., and Brochard-Wyart, F. (2010). Aspiration of biological viscoelastic drops. *Physical Review Letters* 104, 218101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.218101>.
- [Guirao *et al.*, 2015] Guirao, B., Rigaud, S.U., Bosveld, F., Bailles, A., López-Gay, J., Ishihara, S., Sugimura, K., Graner, F., and Bellaïche, Y. (2015). Unified quantitative characterization of epithelial tissue development. *eLife* 4, e08519. <https://doi.org/10.7554/eLife.08519>.
- [Hasse and Pelling, 2015] Haase, K., and Pelling, A.E. (2015). Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *Journal of The Royal Society Interface* 12, 20140970. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0970>.
- [Hannezo and Heisenberg, 2019] Hannezo, E., and Heisenberg, C.-P. (2019). Mechanochemical feedback loops in development and disease. *Cell* 178, 12 – 25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.052>.
- [Hannezo *et al.*, 2014] Hannezo, E., Prost, J., and Joanny, J.-F. (2014). Theory of epithelial sheet morphology in three dimensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 27 – 32. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312076111>.
- [Heisenberg and Bellaïche, 2013] Heisenberg, C.-P., and Bellaïche, Y. (2013). Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell* 153, 948 – 962. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.008>.
- [Hiraiwa *et al.*, 2019] Hiraiwa, T., Wen, F.-L., Shibata, T., and Kuranaga, E. (2019). Mathematical modeling of tissue folding and asymmetric tissue flow during epithelial morphogenesis. *Symmetry* 11, 113. <https://doi.org/10.3390/sym11010113>.
- [Hirashima *et al.*, 2017] Hirashima, T., Rens, E.G., and Merks, R.M.H. (2017). Cellular Potts modeling of complex multicellular behaviors in tissue morphogenesis. *Development, Growth & Differentiation* 59, 329 – 339. <https://doi.org/10.1111/dgd.12358>.

- [Honda, 1983] Honda, H. (1983). Geometrical models for cells in tissues. *International Review of Cytology* 81, 191 – 248. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62339-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62339-6).
- [Huang *et al.*, 2009] Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A.M. and Hong, Y. (2009). Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106: 8284 – 8289. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900641106>
- [Ikawa and Sugimura, 2018] Ikawa, K., and Sugimura, K. (2018). AIP1 and cofilin ensure a resistance to tissue tension and promote directional cell rearrangement. *Nature Communications* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05605-7>.
- [Irvine and Wieschaus, 1994] Irvine, K.D., and Wieschaus, E. (1994). Cell intercalation during *Drosophila* germband extension and its regulation by pair-rule segmentation genes. *Development* 120, 827-841. <https://doi.org/10.1242/dev.120.4.827>.
- [Ishihara *et al.*, 2017] Ishihara, S., Marcq, P., and Sugimura, K. (2017). From cells to tissue: A continuum model of epithelial mechanics. *Physical Review E* 96. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.96.022418>.
- [Ishihara and Sugimura, 2012] Ishihara, S., and Sugimura, K. (2012). Bayesian inference of force dynamics during morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology* 313, 201 – 211. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.08.017>.
- [Ishihara *et al.*, 2013] Ishihara, S., Sugimura, K., Cox, S.J., Bonnet, I., Bellaïche, Y., and Graner, F. (2013). Comparative study of non-invasive force and stress inference methods in tissue. *The European Physical Journal E* 36. <https://doi.org/10.1140/epje/i2013-13045-8>.
- [Keller *et al.*, 2000] Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D., and Skoglund, P. (2000). Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355, 897 – 922. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0626>.
- [Kirk *et al.*, 2013] Kirk, P., Thorne, T., and Stumpf, M.P. (2013). Model selection in systems and synthetic biology. *Current Opinion in Biotechnology* 24, 767 – 774. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.03.012>.
- [Kondo and Hayashi, 2013] Kondo, T., and Hayashi, S. (2013). Mitotic cell rounding accelerates epithelial invagination. *Nature* 494, 125 – 129. <https://doi.org/10.1038/nature11792>.
- [Kong *et al.*, 2019] Kong, W., Loison, O., Chavadimane Shivakumar, P., Chan, E.H.,

- Saadaoui, M., Collinet, C., Lenne, P.-F., and Clément, R. (2019). Experimental validation of force inference in epithelia from cell to tissue scale. *Scientific Reports* 9, 14647. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50690-3>.
- [Koto *et al.*, 2009] Koto, A., Kuranaga, E., and Miura, M. (2009). Temporal regulation of *Drosophila* IAP1 determines caspase functions in sensory organ development. *Journal of Cell Biology* 187, 219 – 231. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905110>.
- [Kursawe *et al.*, 2017] Kursawe, J., Baker, R.E., and Fletcher, A.G. (2017). Impact of implementation choices on quantitative predictions of cell-based computational models. *Journal of Computational Physics* 345, 752 – 767. <https://doi.org/10.1016/j.jcp.2017.05.048>.
- [Kursawe *et al.*, 2018] Kursawe, J., Baker, R.E., and Fletcher, A.G. (2018). Approximate Bayesian computation reveals the importance of repeated measurements for parameterising cell-based models of growing tissues. *Journal of Theoretical Biology* 443, 66 – 81. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.01.020>.
- [Labouesse, 2011] Labouesse, M. (2011). Preface. *Current Topics in Developmental Biology* 95, xi – xvi. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385065-2.00009-8>.
- [Lan *et al.*, 2015] Lan, H., Wang, Q., Fernandez-Gonzalez, R., and Feng, J.J. (2015). A biomechanical model for cell polarization and intercalation during *Drosophila* germband extension. *Physical Biology* 12, 056011. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/12/5/056011>.
- [Lecuit and Lenne, 2007] Lecuit, T., and Lenne, P.-F. (2007). Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 633 – 644. <https://doi.org/10.1038/nrm2222>.
- [Lenne *et al.*, 2020] Lenne, P.-F., Munro, E., Heemskerk, I., Warmflash, A., Bocanegra-Moreno, L., Kishi, K., Kicheva, A., Long, Y., Fruleux, A., Boudaoud, A., et al. (2020). Roadmap for the multiscale coupling of biochemical and mechanical signals during development. *Physical Biology* 18, 041501. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/abd0db>.
- [Loerke and Blankenship, 2019] Loerke, D., and Blankenship, J.T. (2019). Viscoelastic voyages – Biophysical perspectives on cell intercalation during *Drosophila* gastrulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.11.005>.
- [Lorderau, 2002] Lorderau, O. (2002). Les mousses bidimensionnelles: de la caractérisation à la rhéologie des matériaux hétérogènes. These de doctorat. Rennes

1.

- [Ma *et al.*, 2009] Ma, X., Lynch, H.E., Scully, P.C., and Hutson, M.S. (2009). Probing embryonic tissue mechanics with laser hole drilling. *Physical Biology* 6, 036004. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/6/3/036004>.
- [matamoro-Vidal *et al.*, 2015] Matamoro-Vidal, A., Salazar-Ciudad, I., and Houle, D. (2015). Making quantitative morphological variation from basic developmental processes: Where are we? The case of the *Drosophila* wing. *Developmental Dynamics* 244, 1058 – 1073. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24255>.
- [Mishra and Heisenberg, 2021] Mishra, N., and Heisenberg, C.-P. (2021). Dissecting organismal morphogenesis by bridging genetics and biophysics. *Annual Review of Genetics* 55, 209 – 233. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-071819-103748>.
- [Nestor-Bergmann *et al.*, 2018] Nestor-Bergmann, A., Johns, E., Woolner, S., and Jensen, O.E. (2018). Mechanical characterization of disordered and anisotropic cellular monolayers. *Physical Review E* 97, 052409. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.97.052409>.
- [Okuda *et al.*, 2015] Okuda, S., Inoue, Y., Eiraku, M., Adachi, T., and Sasai, Y. (2015). Vertex dynamics simulations of viscosity-dependent deformation during tissue morphogenesis. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 14, 413 – 425. <https://doi.org/10.1007/s10237-014-0613-5>.
- [Paré *et al.*, 2014] Paré, A.C., Vichas, A., Fincher, C.T., Mirman, Z., Farrell, D.L., Mainieri, A., and Zallen, J.A. (2014). A positional Toll receptor code directs convergent extension in *Drosophila*. *Nature* 515, 523 – 527. <https://doi.org/10.1038/nature13953>.
- [Perez-Vale *et al.*, 2020] Perez-Vale, K.Z., and Peifer, M. (2020). Orchestrating morphogenesis: building the body plan by cell shape changes and movements. *Development* 147. <https://doi.org/10.1242/dev.191049>.
- [Petridou and Heisenberg, 2019] Petridou, N.I., and Heisenberg, C.-P. (2019). Tissue rheology in embryonic organization. *The EMBO Journal* 38, e102497. <https://doi.org/10.15252/emj.2019102497>.
- [Petridouw *et al.*, 2017] Petridou, N.I., Spiró, Z., and Heisenberg, C.-P. (2017). Multiscale force sensing in development. *Nature Cell Biology* 19, 581 – 588. <https://doi.org/10.1038/ncb3524>.
- [Quintin *et al.*, 2008] Quintin, S., Gally, C., and Labouesse, M. (2008). Epithelial morphogenesis in embryos: asymmetries, motors and brakes. *Trends in Genetics* 24, 221 – 230. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.02.005>.

- [Rauzi *et al.*, 2010] Rauzi, M., Lenne, P.-F., and Lecuit, T. (2010). Planar polarized actomyosin contractile flows control epithelial junction remodelling. *Nature* 468, 1110 – 1114. <https://doi.org/10.1038/nature09566>.
- [Rauzi *et al.*, 2008] Rauzi, M., Verant, P., Lecuit, T., and Lenne, P.-F. (2008). Nature and anisotropy of cortical forces orienting *Drosophila* tissue morphogenesis. *Nature Cell Biology* 10, 1401 – 1410. <https://doi.org/10.1038/ncb1798>.
- [Ray *et al.*, 2015] Ray, R.P., Matamoro-Vidal, A., Ribeiro, P.S., Tapon, N., Houle, D., Salazar-Ciudad, I., and Thompson, B.J. (2015). Patterned anchorage to the apical extracellular matrix defines tissue shape in the developing appendages of *Drosophila*. *Developmental Cell* 34, 310 – 322. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.019>.
- [Roca-Cusachs *et al.*, 2017] Roca-Cusachs, P., Conte, V., and Trepats, X. (2017). Quantifying forces in cell biology. *Nature Cell Biology* 19, 742 – 751. <https://doi.org/10.1038/ncb3564>.
- [Royou *et al.*, 2004] Royou, A., Field, C., Sisson, J.C., Sullivan, W., and Karsenti, R. (2004). Reassessing the role and dynamics of nonmuscle myosin II during furrow formation in early *Drosophila* embryos. *Molecular Biology of the Cell* 15, 838 – 850. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-06-0440>.
- [Salbreux *et al.*, 2012] Salbreux, G., Barthel, L.K., Raymond, P.A., and Lubensky, D.K. (2012). Coupling mechanical deformations and planar cell polarity to create regular patterns in the zebrafish retina. *PLOS Computational Biology* 8, e1002618. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002618>.
- [Schilling *et al.*, 2011] Schilling, S., Willecke, M., Aegerter-Wilmsen, T., Cirrka, O.A., Basler, K., and Mering, C. von (2011). Cell-sorting at the A/P boundary in the *Drosophila* wing primordium: a computational model to consolidate observed non-local effects of Hh signaling. *PLOS Computational Biology* 7, e1002025. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002025>.
- [Sermeus *et al.*, 2022] Sermeus, Y., Vangheel, J., Geris, L., Smeets, B., and Tylzanowski, P. (2022). Mechanical regulation of limb bud formation. *Cells* 11, 420. <https://doi.org/10.3390/cells11030420>.
- [Siang *et al.*, 2018] Siang, L.C., Fernandez-Gonzalez, R., and Feng, J.J. (2018). Modeling cell intercalation during *Drosophila* germband extension. *Physical Biology* 15, 066008. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/aad865>.
- [Staple *et al.*, 2010] Staple, D.B., Farhadifar, R., Röper, J.-C., Aigouy, B., Eaton, S., and Jülicher, F. (2010). Mechanics and remodelling of cell

- packings in epithelia. *The European Physical Journal E* 33, 117 – 127. <https://doi.org/10.1140/epje/i2010-10677-0>.
- [Suigimura *et al.*, 2013] Sugimura, K., Bellaïche, Y., Graner, F., Marcq, P., and Ishihara, S. (2013). Robustness of force and stress inference in an epithelial tissue. In 2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), pp. 2712 – 2715.
- [Sugimura *et al.*, 2016] Sugimura, K., Lenne, P.-F., and Graner, F. (2016). Measuring forces and stresses *in situ* in living tissues. *Development* 143, 186 – 196. <https://doi.org/10.1242/dev.119776>.
- [Sugimura and Ishihara, 2013] Sugimura, K., and Ishihara, S. (2013). The mechanical anisotropy in a tissue promotes ordering in hexagonal cell packing. *Development* 140, 4091 – 4101. <https://doi.org/10.1242/dev.094060>.
- [Taber, 2020] Taber, L.A. (2020). *Continuum modeling in mechanobiology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-43209-6>.
- [Tetley *et al.*, 2016] Tetley, R.J., Blanchard, G.B., Fletcher, A.G., Adams, R.J., and Sanson, B. (2016). Unipolar distributions of junctional Myosin II identify cell stripe boundaries that drive cell intercalation throughout *Drosophila* axis extension. *ELife* 5, e12094. <https://doi.org/10.7554/eLife.12094>.
- [Vansan *et al.*, 2019] Vasan, R., Malekar, M.M., Williams, C.D., and Rangamani, P. (2019). DLITE uses cell-cell interface movement to better infer cell-cell tensions. *Biophysical Journal* 117, 1714 – 1727. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.09.034>.
- [Wagh *et al.*, 2021] Wagh, K., Ishikawa, M., Garcia, D.A., Stavreva, D.A., Upadhyaya, A., and Hager, G.L. (2021). Mechanical regulation of transcription: recent advances. *Trends in Cell Biology* 31, 457 – 472. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.02.008>.
- [Zallen and Wieschaus, 2004] Zallen, J.A., and Wieschaus, E. (2004). Patterned gene expression directs bipolar planar polarity in *Drosophila*. *Developmental Cell* 6, 343 – 355. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00060-7).
- [本多, 2000] 本多久夫 (2000) 「袋で行われる自己構築」本多久夫編『生物の形作りの数理と物理』pp. 1-16. 共立出版
- [杉村・石原, 2018] 杉村薫・石原秀至 (2018) 「組織の力・応力の定量生物学」小林哲也『定量生物学—生命現象を定量的に理解するために—』pp.109-128. 化学同人
- [下平ら, 2004] 下平寿英・伊藤秀一・久保川達也・竹内啓 (2004) 『モデル選択—予測・検定・推定の交差点』(統計学のフロンティア 3) 岩波書店
- [小西・北川, 2003] 小西貞則・北川源四郎 (2003) 『情報量規準』(シリーズ・予測と発見

の化学 2) 朝倉書店

謝辞

本研究は、杉村薫先生（東京大学大学院理学系研究科）、上村匡先生（京都大学大学院生命科学研究科）および石原秀至先生（東京大学大学院総合文化研究科）のご指導の元、主に杉村研究室において行われました。まず、指導教官である杉村薫先生に感謝を申し上げます。杉村先生は、博士課程から研究分野を大きく変え、右も左もわからない私に根気強く指導をしてくださいました。日々の研究活動では、お忙しいにも関わらず頻繁に議論していただき、学会発表や申請書についても丁寧に助言や添削をしていただきました。お陰様で、まだまだ至らないところがありますが、研究者としてなんとかやっていけるスキルが身についたと思います。これまでに頂いたご指導を糧に、今後も精進していきたいと思えます。上村匡先生には、受け入れ指導教官として大変お世話になりました。私はほとんど上村研には在室していませんでしたが、上村研のセミナー発表では、研究内容や発表方法に関して建設的なご意見をいただきました。また、杉村研究室が東京に移転した後も何かと気にかけていただき、精神的な助けになりました。心からお礼申し上げます。石原秀至先生は、共同研究者として主に毎週のミーティングにおいて指導していただきました。石原先生は、数学や物理学があまり良くわかっていない私のちぐはぐな意見も汲み取ってくださり、的確なアドバイスをしていただきました。深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたってお世話になった方々にも感謝申し上げます。近藤武史先生（京都大学大学院生命科学研究科）は、ショウジョウバエ胚の画像データ取得にご協力いただきました。私が上村研でセミナー発表した際に変異体を使った解析を提案していただいたおかげで、本論文の説得力が大いに増したと思います。井川敬介先生（現：名古屋大学理学研究科）には、ショウジョウバエ蛹の翅基部切断実験の画像データを頂きました。井川先生には共同研究者としてだけでなく、頼れる先輩として日頃から様々な相談に乗っていただきました。ありがとうございました。

安達泰治先生（京都大学医生物学研究所）および鈴木淳先生（京都大学高等研究院 物質－細胞統合システム拠点）、本田直樹先生（広島大学大学院統合生命科学研究科）、井上康博先生（京都大学大学院工学研究科）には、副指導教官を引き受けて頂きました。研究の遂行に当たり、有益なアドバイスを頂きありがとうございました。

所属した杉村研究室、上村研究室および石原研究室の皆様にも大変お世話になりました。駒野恭子さん、有賀美穂さんには技術補佐員として画像解析などをしていただきました。トラウデン和子さん、武田萌奈ロザーンさん、富岡直子さん、沖かなえさんそして今井博子さんには、事務手続きで大変お世話になりました。松井理紗さん（京都大学大学院生命科学研究所）には、本論文の原稿のチェックをしていただきました。さらに、これまで在籍した小山研究室、船山研究室の皆様にも感謝いたします。

最後に、これまでの研究生活を支えてくださった家族や友人たちに心より感謝します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Goshi Ogita, Takefumi Kondo, Keisuke Ikawa, Tadashi Uemura, Shuji Ishihara and Kaoru Sugimura.

Image-based parameter inference for epithelial mechanics.

PLOS Computational Biology, *in press*.

2022年8月8日

荻田 豪士