

上皮細胞シートにおけるフラクタル構造形成のメカニズム Mechanism of fractal formation in the contour of epithelial monolayer

小熊 俊輝^[*] 今村 寿子 三浦 岳

TOSHIKI OGUMA, HISAKO TAKIGAWA-IMAMURA, TAKASHI MIURA

ANATOMY AND CELL BIOLOGY, GRADUATE SCHOOL OF MEDICAL SCIENCES, KYUSHU UNIVERSITY

Abstract

MDCK 細胞を 2 次元培養すると、細胞接着を介しシート構造を形成する。このシート構造の界面の時間変化を観察すると、どの時間においても自己アフィンフラクタル構造を形成し、かつ界面全体の荒さも時間に対してスケールする、「動的スケールリング則」が成立していた。この性質がどのような仕組みで形成されているのかを確かめるため界面付近の細胞運動を観察したところ、界面上には Leader 細胞と呼ばれる運動性の高い細胞が出現しており、その運動に伴い界面構造が変化していることが観察された。そこで界面上の細胞運動を数理モデルで表し、実際に観察された界面構造を再現した。この数理モデルに対する解析的な考察から、動的スケールリング則を特徴づける量であるハースト指数 (α)、および成長指数 (β) のパラメータ依存性を明らかにした。

1 はじめに

細胞集団の界面の構造が構成している細胞の性質により変化することは、特に病理学の分野において観察されてきた [1]。一般に腫瘍細胞の悪性度が高い場合には界面は荒く不整形な形状をとり、良性の場合は平滑な形状を取る傾向にある。そこで界面の荒さを定量するにあたり、フラクタル次元を考えることで腫瘍組織を分類する試みは度々為されてきた [2] が、そのフラクタル構造がどのようなメカニズムで形成されているのかについては、未だ明らかになっていない。

このフラクタル構造は自己アフィンフラクタルと呼ばれ、地層や雲、バクテリアコロニーの界面などで観察されることが知られている。ある曲線が自己アフィンフラクタル構造であるとは、その曲線の一部を一定の倍率で拡大することで、元の曲線が得られるような場合を言う。その際の拡大スケールは一般に軸ごとに異なっており、特に (1+1) 次元の場合に、その水平軸方向のスケール率を a 、垂直軸方向のスケール率を b とし、 $a = b^\alpha$ となるような指数 α をハースト指数と呼ぶ。ハースト指数は自己アフィンフラクタル構造を特徴づける量として知られており、Box count により測定されたフラクタル次元 D と $\alpha + D = 2$ を満たすことが知られている [3, 4]。

$y = h(x, t)$ として表されるような曲線について考える。連続したある x の区間 (領域長 l) における、高さ $h(x)$ の標準偏差 ($SD[h(x)]$) の平均を local roughness $w(l, t)$ と定める。これについて

$$w(l, t) \sim \begin{cases} l^\alpha & \text{for } l \ll l_* \\ t^\beta & \text{for } l \gg l_* \end{cases}, \quad (1)$$

^{*}t.oguma.111@s.kyushu-u.ac.jp

が成り立つ場合、この曲線は動的スケージング則を満たしていると言う。ここで1つ目の条件は任意の t において曲線が自己アフィンフラクタル構造を形成していることを表し、2つ目の条件は界面全体の荒さが時間に対してスケールしていることを表す。この β の値は成長指数と呼ばれ、ハースト指数・成長指数が動的スケージング則を特徴づける量となる [5, 4]。

2 上皮細胞シート界面のダイナミクス

今回の実験系の概要を以下に示す。Polydimethylsiloxane(PDMS) で作成したドーナツ状のシートを細胞培養ディッシュに置き、その上に Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を播種する。シート内で MDCK 細胞がコンフルエントになるまで培養し、その後 PDMS シートを除去することで、ほぼ正円の形状を取る MDCK 細胞シートが形成される。この上皮細胞シートを CellTracker を用いて可視化し、二値化処理を行った後に重心から界面までの距離を測定した (図 1)。

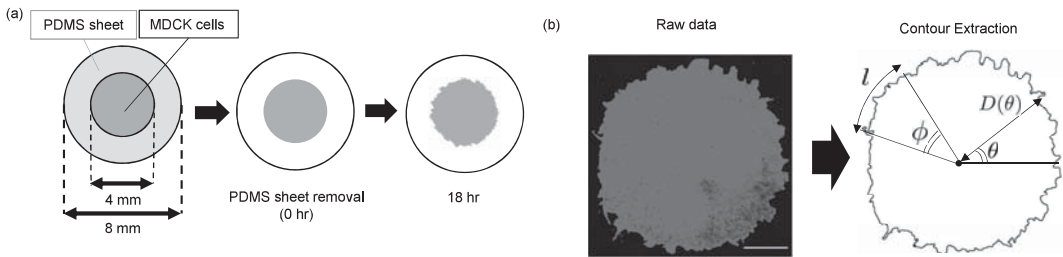


図 1: (a) 実験手順 (b) 界面の測定方法

これにより得られた $D(\theta)$ について、local roughness $w(l, t)$ の値を、円周方向の長さ l に対する $D(\theta)$ の標準偏差として計測し、ハースト指数・成長指数を推定した (図 2)。図 2(a) は上皮細胞シートの時間変化

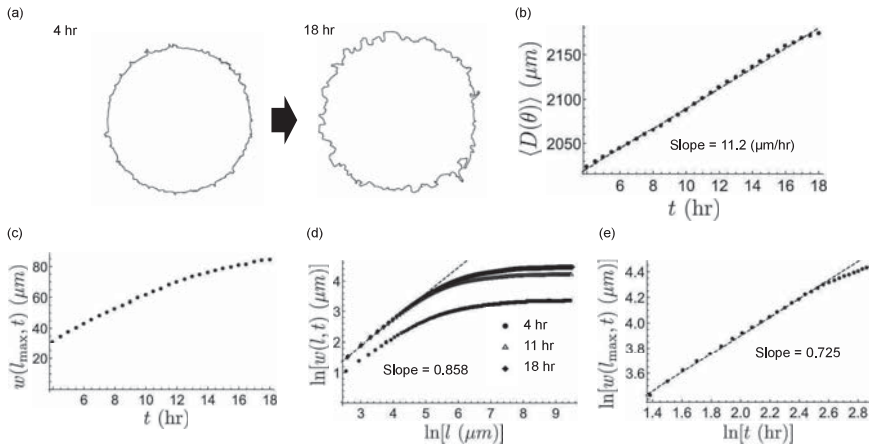


図 2: (a) 抽出した界面形状 (b) 重心から界面までの距離の平均 (c) 界面全体の標準偏差 (d) $w(l, t)$ と l の両対数プロットによるハースト指数の推定 (e) $w(l_{\max}, t)$ と t の両対数プロットによるハースト指数の推定

を表す。PDMS シートを除去した後、細胞シートは外側に広がっていき、またその界面形状は時間とともに不均一なものになる。図 2(b) は重心から界面までの距離 $D(\theta)$ の平均を時間に対してプロットしたものであり、図 2(c) は $D(\theta)$ 全体の標準偏差をプロットしたものになる。これらの値は単調増加しており、図 2(a) で観察されたような特徴が反映されている。特に $D(\theta)$ については時間に対して線形に増加しており、その速度は $11.2 (\mu\text{m}/\text{hr})$ であった。図 2(d) は $w(l, t)$ と l の両対数プロットであり、その線形性から、 l がある程度小さい場合には $w(l, t) \sim l^\alpha$ の関係が成立していることを表している。また、図 2(e) は $w(l_{\text{max}}, t)$ と t の両対数プロットであり、その線形性から $w(l_{\text{max}}, t) \sim t^\beta$ の関係が成立していることを表している。

以上の結果から、MDCK 細胞シートの界面は動的スケーリング則に従って拡大していることが示唆され、両対数プロットの傾きからハースト指数 $\alpha = 0.858$ 、成長指数 $\beta = 0.725$ と推定される。

3 界面における細胞ダイナミクス

図 3(a) は界面の細胞の座標を追跡したものになる。これを見ると $t = 1\text{hr}$ において界面を構成していた細胞がそのまま移動して $t = 17\text{hr}$ における界面も形成しており、かつ少数の運動性の高い細胞が他の細胞を引き連れるようにしてシートの突起を形成している。また、PDMS シートを除去して 2 時間後の位相差顕微鏡画像を見ると、この段階で大きな細胞体と仮足を持つ細胞が出現している (図 3(b))。細胞の集団運動においては Leader 細胞と呼ばれる大きい細胞体・仮足を持ち、運動性が高い細胞が出現することが知られている [6, 7]。その形態的特徴から、図 3(b) の細胞は Leader 細胞であることが推察され、集団細胞運動の早期の段階で Leader 細胞が出現していることが示唆される。

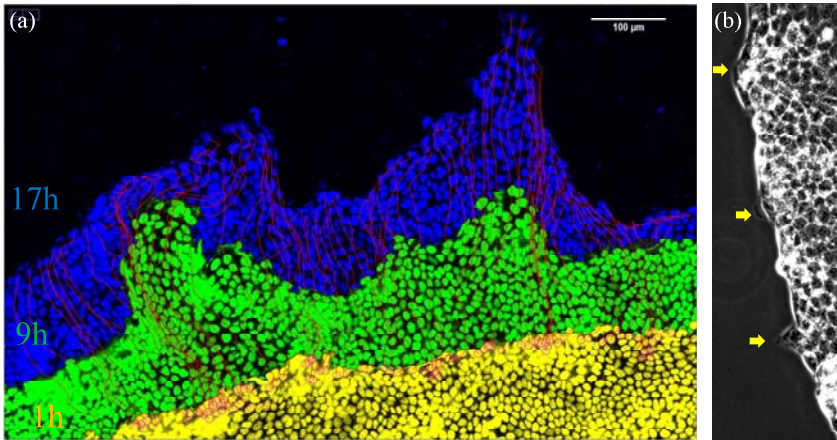


図 3: (a) $t = 1, 9, 17\text{hr}$ における界面形状と辺縁細胞の細胞核 (b) $t = 2\text{hr}$ における上皮細胞シート辺縁部の位相差顕微鏡画像

4 数理モデル

これらの結果を踏まえ、上皮細胞シート界面のダイナミクスが辺縁に存在する細胞の運動により生じていると仮定して単純な数理モデルを構築した。

$$\frac{d}{dt}\mathbf{r}_i(t) = \mathbf{M}_i + (\mathbf{T}_i - \mathbf{T}_{i+1}) + \sigma\eta_i(t)\mathbf{r}_i/|\mathbf{r}_i|, \quad (2)$$

ここで \mathbf{r}_i は細胞の座標を、 \mathbf{M}_i は辺縁細胞の志向的な動きを、 \mathbf{T}_{i+1} は細胞間接着に起因する細胞運動を、 $\sigma\eta_i(t)$ は辺縁細胞のランダム運動を表している。ここで辺縁細胞の運動性は Leader/follower の 2 つの状態が存在すると仮定し、

$$\mathbf{M}_i = \begin{cases} v_l \mathbf{r}_i/|\mathbf{r}_i| & (\text{if the cell } i \text{ is a leader cell}) \\ v_f \mathbf{r}_i/|\mathbf{r}_i| & (\text{otherwise}), \end{cases} \quad (3)$$

とおく。また、細胞間接着に伴う張力の効果は細胞同士の距離に線形に依存すると仮定し、

$$\mathbf{T}_i = \rho(\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{i-1}), \quad (4)$$

とおいた。パラメータを $v_l = 94 [\mu\text{m h}^{-1}]$, $v_f = 2 [\mu\text{m h}^{-1}]$, $p_l = 0.1$, $\rho = 6.67[\text{h}^{-1}]$, and $\sigma = 3 [\mu\text{m h}^{-1/2}]$ としたときの数値計算結果が図 4 である。これを見ると、図 2 で得られたような値がうまく再現出来ていることが分かる。

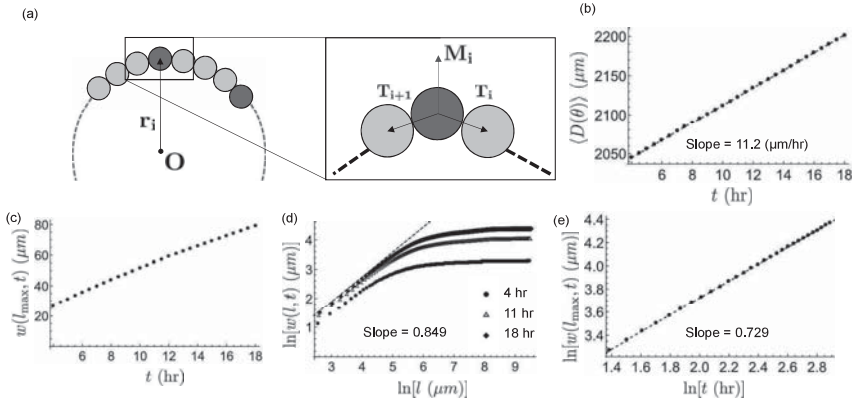


図 4: (a) 数理モデルのスキーム (b) 重心から界面までの距離の平均 (c) 界面全体の標準偏差 (d) $w(l, t)$ と l の両対数プロットによるハースト指数の推定 (e) $w(l_{\max}, t)$ と t の両対数プロットによるハースト指数の推定

5 モデル (2) の解析

辺縁細胞の数が十分多い場合、構築した数理モデル (2) は以下のような単純な 1 次元での空間離散な微分方程式 (周期境界) と見なすことが出来る。

$$\frac{d}{dt}h_x(t) = f_x + \rho(h_{x+1}(t) + h_{x-1}(t) - 2h_x(t)) + \sigma\eta_x(t). \quad (5)$$

ここで f_x は Leader/follower に合わせて v_l, v_f の値を取る。 $h_x(t)$ について離散フーリエ変換を用いて周波数成分のみに着目することで

$$\frac{d}{dt}\hat{h}_k(t) = \hat{f}_k - \left(4\rho \sin^2 \frac{\pi k}{n}\right) \hat{h}_k(t) + \sigma \eta_k(t). \quad (6)$$

となり、ランジュバン型の確率微分方程式に帰着することが出来る。よって h_x のパワースペクトル $|\hat{h}_k|^2$ の期待値を計算でき、

$$E[|\hat{h}_k(t)|^2] = \frac{|\hat{f}_k|^2}{a_k^2}(1 - 2e^{-a_k t} + e^{-2a_k t}) + \frac{\sigma^2}{2a_k}(1 - e^{-2a_k t}). \quad (7)$$

と表せる。限られた領域における $h(x)$ の分散の平均が

$$w^2(l, t) = w^2(m\Delta x, t) = R(0) - \frac{1}{m(m-1)} \sum_{l=1}^{m-1} 2(m-l)R(l). \quad (8)$$

のように h_x の自己相関係数 $R(l)$ により表せることから、 $w(l, t)$ の期待値を式 (8) の平方根を取ることで推できる。その値は $\alpha = 0.80, \beta = 0.73$ となり、その値は数値計算により得られるものにかなり近い値を取る。

6 まとめ

これらの結果から、モデル (2) は MDCK 細胞シート界面の拡大における動的スケールング則を生み出すメカニズムをうまく説明していると考えられる。数理モデルのさらに詳しい解析・およびその実験的検証については追って報告する。

参 考 文 献

- [1] Robert A Weinberg. *The Biology of Cancer*. Garland Science, 2 edition, 2013.
- [2] Frances Lennon, Gianguido Cianci, Nicole Cipriani, Thomas Hensing, Hannah Zhang, Chin-Tu Chen, Septimiu Murgu, Everett Vokes, Michael Vannier, and Ravi Salgia. Lung cancer—a fractal viewpoint. *Nat Rev Clin Oncol*, Vol. 12, No. 11, pp. 664–675, 2015.
- [3] Benoit B Mandelbrot. Self-Affine fractals and fractal dimension. *Phys. Scr.*, Vol. 32, No. 4, pp. 257–260, 1985.
- [4] Paul Meakin. *Fractals, Scaling and Growth Far from Equilibrium*. Cambridge University Press, 2011.
- [5] Kazumasa A Takeuchi. An appetizer to modern developments on the Kardar–Parisi–Zhang universality class. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 2018.
- [6] Hisashi Haga, Chikako Irahara, Ryo Kobayashi, Toshiyuki Nakagaki, and Kazushige Kawabata. Collective movement of epithelial cells on a collagen gel substrate. *Biophys J*, Vol. 88, No. 3, pp. 2250–2256, 2005.
- [7] T. Omelchenko, J. Vasiliev, I. Gelfand, H. Feder, and E. Bonder. Rho-dependent formation of epithelial “leader” cells during wound healing. *Proc National Acad Sci*, Vol. 100, No. 19, pp. 10788–10793, 2003.