

骨形態形成における多細胞動態の連続体力学解析

横山 優花

目次

第1章 緒 論	1
1.1 力学的機能に適応した骨形態	1
1.2 骨形態を形成する多細胞動態	3
1.3 骨形態形成における多細胞動態を制御する因子	5
1.3.1 生化学的因子による成長板構造の制御	5
1.3.2 生化学的因子による軟骨カラム形成の制御	6
1.3.3 力学的因子による骨形態形成の制御	7
1.4 骨形態形成メカニズム解明に向けたシミュレーション研究	9
1.4.1 生化学的因子の数理解析	10
1.4.2 連続体力学に基づく骨の力学解析	11
1.4.3 離散系モデルに基づく多細胞の力学解析	12
1.4.4 連続体ベース粒子法の発展	12
1.5 本論文の目的と構成	13
参考文献	15
第2章 細胞成長および増殖の連続体ベース粒子モデル構築	28
2.1 緒 言	28
2.2 手 法	31
2.2.1 Material point method	31
2.2.2 細胞成長の連続体ベース粒子モデル	34
2.2.3 細胞増殖の連続体ベース粒子モデル	35
2.3 結 果	37
2.3.1 グリッド間隔依存性の検討	37
2.3.2 細胞成長・増殖モデルの検証	39
2.3.3 多細胞組織の形態形成シミュレーション	41
2.4 考 察	46
2.5 結 言	48
参考文献	49

第 3 章 単因子モデルに基づく骨形態形成シミュレーション基盤の構築	52
3.1 緒 言	52
3.2 手 法	55
3.2.1 HE 染色	55
3.2.2 複製期細胞の蛍光染色	55
3.2.3 細胞分化を表現する単因子モデル	56
3.2.4 一次元組織成長モデル	59
3.2.5 骨形態形成における多細胞動態の連続体ベース粒子モデル	60
3.3 結 果	68
3.3.1 単因子モデルにおけるパラメータの決定	68
3.3.2 単因子モデルの検証	70
3.3.3 骨形態形成シミュレーション	72
3.3.4 連続体ベース粒子モデルにおける分裂頻度の検証	74
3.4 考 察	76
3.5 結 言	77
参考文献	78
第 4 章 多細胞動態により生じる応力異方性を介した骨形態制御機構の解明 ..	83
4.1 緒 言	83
4.2 手 法	85
4.2.1 連続体ベース粒子モデルに基づく骨形態形成シミュレーション	85
4.2.2 骨形態形成シミュレーションにおける応力解析	85
4.3 結 果	86
4.3.1 増殖軟骨細胞層の応力異方性による軟骨カラム形成	86
4.3.2 軟骨カラム形成による骨形態制御	89
4.3.3 軟骨細胞の肥大化による増殖層の応力異方性誘導	91
4.4 考 察	93
4.5 結 言	96
参考文献	97

第5章 結 論	100
5.1 本論文のまとめ	100
5.2 今後の展望	102
付録	104
A.1 骨組織内部の流体－構造連成解析による骨細胞膜ひずみ評価	104
A.1.1 緒 言	104
A.1.2 手 法	106
A.1.3 結 果	110
A.1.4 考 察	114
参考文献	117
A.2 EBS におけるグリッド点の分類	121
A.3 拡散解析手法	122
A.4 骨形態形成シミュレーションにおける物質粒子の初期配置設定	123
A.5 長骨の外形状に起因する骨長軸方向の圧縮応力	124
関連学術論文・学術講演	126
謝辞	132

第 1 章

緒 論

本章では、まず、力学的機能に適応した骨形態の工学的重要性について論じる。次に、骨形態形成における多細胞動態と、それを制御する生化学的、および、力学的因子に関する知見を概説する。さらに、骨形態形成メカニズムの理解につながる計算機シミュレーションを用いた研究について概説し、最後に、本論文の目的と構成を述べる。

1.1 力学的機能に適応した骨形態

生体内の骨は、生物種により、また体の部位により、多様かつ独特な形態を有している(Parmenter et al., 2016; Sorrentino et al., 2023)。このような骨の形は、荷重支持や内臓の保護などの力学的機能に適応している(Sharir et al., 2011; Weiner et al., 1999)。また、関節を構成する骨の形態は、生物の運動の様式を決定づけるものである(Shoji et al., 2016)。実際、大腿骨、脛骨、および、中足骨の長さの総和は、その生物のスプリント最大速度と相関することが知られている(Garland and Janis, 1993)。

このように力学的機能に適応した骨形態は、生物の生涯を通じて、細胞のはたらくにより変化し続ける。生物の発生段階において、組織の形や構造がつくられる過程を形態形成(morphogenesis)とよぶ(Fig. 1.1)。形態形成過程の骨は、成長過程の生物の体内で荷重支持や身体運動などの力学的機能を果たしながら、自身の形態を変化させる。成長後においても、骨の形態は、その力学環境に適応し生

涯を通じてつくり変えられる(Adachi et al., 2006; Mittag et al., 2015; Tsubota et al., 2009). この力学的適応メカニズムを骨リモデリングとよぶ. 骨リモデリングは, 骨組織内部に存在する骨細胞による力学刺激の感知, および, それに対する応答を通じて制御される(付録 A.1) (Yokoyama et al., 2021).

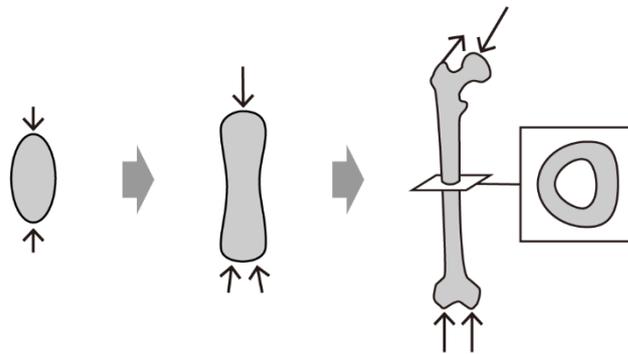


Figure 1.1 Bone morphogenesis: formation of bone shapes with mechanical functions under mechanical loading.

形態形成やリモデリングを通じて骨形態が制御されるメカニズムについては, 生物学のみならず, 工学分野においても研究されている(Marquez-Florez et al., 2023). 骨形態の制御メカニズムを力学的観点から理解することで, 発生段階における力学的手法による骨形態の制御など, 骨形成不全等の骨疾患への治療法を新たな視点により提案することができる. また, 生体外で骨形態を制御しながら骨組織を生成することで, 移植等への応用が期待される. さらに, 骨形態が決定されるメカニズムに通底する力学的制御理論を見出すことにより, 生物をよりどころとする新たな機械工学的設計思想を提案することが期待される. しかしながら, 発生から老化にわたり力学的機能を維持しながら変化する骨形態の統一的な制御理論は未だ存在しない. 特に, 発生段階においては, 形態形成過程の骨組織に生体内で力学的操作を施し観察することが困難であるため, 骨の機能を維持しながら, 力学環境に応じた細胞のはたらきにより骨形態形成が進行するメカニズムの理解は進んでいない.

1.2 骨形態を形成する多細胞動態

生体内の骨は、間葉系細胞(Matsushita et al., 2020)が凝集した骨の鋳型を起点として、軟骨内骨化(endochondral ossification), および、膜性骨化(intramembranous ossification)とよばれる二つの骨化プロセスのうちいずれかを経て形成される(Galea et al., 2021; Green et al., 2015; Kronenberg, 2003; Long and Ornitz, 2013; Salhotra et al., 2020). 頭頂骨や鎖骨などの少数の骨は、間葉系細胞から直接分化した骨芽細胞により骨基質が産生される膜性骨化により形成される. 一方、四肢を構成する全ての骨を含む、生体内の大多数の骨が軟骨内骨化を経て形成される(Fig. 1.2).

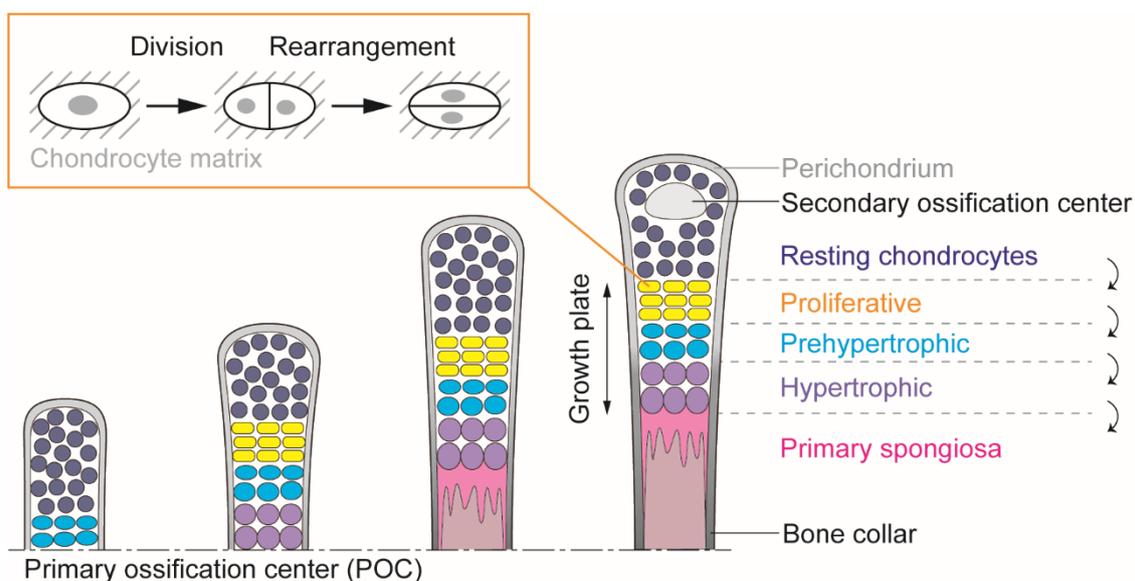


Figure 1.2 Endochondral ossification with growth plate formation and maintenance. Chondrocytes form columns along the bone longitudinal direction through cell rearrangement after division in the proliferative zone.

軟骨内骨化では、まず凝集した間葉系細胞が軟骨細胞に分化し増殖する. 大腿骨や中足骨などの長骨の形態形成においては、この軟骨原器の中心部で、軟骨細

胞が増殖を停止し肥大化した後、アポトーシスし、その領域に血管が侵入するとともに一次海綿骨(primary spongiosa) (Murakami et al., 1994)が形成される。この軟骨細胞の段階的な分化により、骨端から骨中心に向かい、それぞれ異なる分化段階にある軟骨細胞からなる増殖層(proliferative zone), 前肥大層(prehypertrophic zone), 肥大層(hypertrophic zone)が形成される。この層構造全体を「成長板(growth plate)」とよび、成長板の骨中心側では一次海綿骨が継続的に形成される(Green et al., 2015; Kronenberg, 2003).

軟骨原器中心部から始まるこの最初の骨化プロセスを一次骨化、その場所を一次骨化中心(primary ossification center, POC)とよび、より後期の発生段階で骨端部において開始される骨化プロセスを二次骨化とよぶ(Xie and Chagin, 2021)。一次骨化中心と二次骨化中心の間で成長板が維持され、成長板内に残存する軟骨細胞前駆細胞の自己複製(Mizuhashi et al., 2018; Newton et al., 2019)、軟骨細胞の増殖、および、肥大化とともに骨基質の形成が継続されることにより、成長過程にわたり骨の長軸方向への伸長が続く。この機構は、ヒトとマウスをはじめとする様々な生物に共通している(Reno et al., 2006).

成長板の増殖層では、扁平な軟骨細胞が骨長軸方向に積み重なり軟骨カラムを形成する(Dodds, 1930; Rubin et al., 2021)。胚発生の段階においては細胞の整列に乱れが多く、軟骨カラム形成は顕著でないとする報告もあるが、生後には細胞が整列し軟骨カラムを形成することが報告されている(Rubin et al., 2023)。この軟骨カラム内の細胞が、後の分化を経て約 9 倍の体積に肥大化することにより、骨長軸方向への大幅な成長が実現される(Cooper et al., 2013; Rubin et al., 2021)。成長板各層の長さ(Farnum et al., 2008)や増殖層における細胞周期長さ(Wilsman et al., 1996)などの骨伸長を調節する多細胞動態が、生物種や骨の部位に応じて安定的に制御されることにより、生物の運動を可能とする骨格のバランスを維持したまま骨形態形成が進行する。また、腱や靭帯が接合する骨の上部構造の位置が成長板の移動速度を介して制御されるメカニズムが提案されている(Stern et al., 2015)。したがって、形態形成過程にわたり生物の筋骨格系が力学的機能を果たすためには、成長板における多細胞動態の制御が重要である。

1.3 骨形態形成における多細胞動態を制御する因子

上述の骨形態形成における多細胞動態は、さまざまな生化学的、および、力学的因子の複雑な相互作用により安定的に制御される。本節では、長骨の長さを制御するうえで主要な役割を果たす成長板内での細胞活動に着目し、成長板構造の形成と維持を制御する生化学的因子、成長板の増殖層における軟骨カラム形成を制御する生化学的因子、および、それらの制御に影響を及ぼす力学的因子について概説する。

1.3.1 生化学的因子による成長板構造の制御

これまでの遺伝学的、および、分子生物学的研究により、骨形態形成過程における多細胞動態を制御する生化学的因子が多数同定されている(Kozhemyakina et al., 2015; Provot and Schipani, 2005)。Indian hedgehog (Ihh)は、前肥大軟骨細胞、および、肥大軟骨細胞により産生され、軟骨細胞の増殖を促進することが知られている(Green et al., 2015; Kronenberg, 2003; Mak et al., 2008; Oriyasa et al., 2023; St-Jacques et al., 1999; Vortkamp et al., 1996; Wu et al., 2001)。また、Ihhは、一次海綿骨と骨性骨膜襟(bone collar)の形成を促進する(Long et al., 2004)。Ihhによる軟骨細胞の分化制御には、Trps1とGli3が関与している(Wuelling et al., 2009)。成長板におけるIhhの役割については、腱靭帯付着部の形態形成におけるIhhの役割との類似性が指摘されている(Fang et al., 2022)。さらに、Ihhは、関節接合部の軟骨膜、および、二次骨化中心形成後の成長板内の静止軟骨細胞層において、副甲状腺ホルモン関連蛋白(parathyroid hormone-related protein, PTHrP)の産生を直接(Hilton et al., 2007)、および、TGF β 2を介して間接的に(Alvarez et al., 2002)誘導する(Alvarez et al., 2002; Chen et al., 2008, 2007; Hilton et al., 2007)。

一方、PTHrPは、軟骨細胞の肥大化を抑制する(Studer et al., 2012; Vortkamp et al., 1996)ことから、IhhとPTHrPは軟骨細胞の分化を制御するネガティブフィードバックループを形成している。このPTHrPによる軟骨細胞肥大化の阻害は、

スフェロイドを用いた *in vitro* の系において確かめられている(Erickson et al., 2018). また, 二次骨化開始後に成長板内の静止軟骨細胞層に現れる PTHrP 陽性細胞は, Wnt/ β -catenin シグナルの影響により増殖が抑制されている(Hallett et al., 2021). この PTHrP 陽性細胞の中には, 幹細胞マーカーを発現し自己複製する細胞が存在し, それらは成長板の維持に寄与すると考えられている(Mizunashi et al., 2018).

インスリン様成長因子(insulin-like growth factor, IGF)もまた, 成長板における細胞活動を制御する(Al-Far et al., 2017). *Igfl* null マウスにおいては, 脛骨の成長速度, および, 成長板の肥大層の長さが野生型より低下する一方, 増殖層の長さは変化しないことが知られている(Wang et al., 2004, 1999). 血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)は, 後期肥大軟骨細胞において発現し, 成長板における軟骨細胞の生存と血管侵入の促進に不可欠である(Kozhemyakina et al., 2015; Provot and Schipani, 2005; Zelzer et al., 2004, 2002). 静止, および, 増殖軟骨細胞で発現する Sox9 は, 軟骨細胞の分化を阻害することで, 成長板の維持に必須の役割を担う(Akiyama et al., 2004; Haseeb et al., 2021; Zhao et al., 1997). このほかにも, 低酸素条件が *in vitro* 軟骨細胞において肥大化を阻害することが知られている(Portron et al., 2015).

1.3.2 生化学的因子による軟骨カラム形成の制御

成長板の増殖層においては, 軟骨細胞がその長軸を分割する向きに分裂面を形成し分裂した後, 骨の長軸方向へ並ぶよう再配列すると考えられている(Fig. 1.2) (Aszodi et al., 2003; Galea et al., 2021; Li et al., 2017; Li and Dudley, 2009; Romereim et al., 2014). この細胞の再配列には, 分裂後の二細胞間に β -catenin およびカドヘリンが特異的に集積することによる細胞間接着が必要である(Li et al., 2017; Romereim et al., 2014). このような細胞間接着のもとでの細胞形態は, 膜の弾性と接着を考慮したエネルギー関数により表現される(Hilgenfeldt et al., 2008). このエネルギー関数によると, 強力な接着は細胞間接着面の拡大を誘導する(Gemp et al., 2011; Hayashi and Carthew, 2004; Hilgenfeldt et al., 2008; Malmi-Kakkada

et al., 2022). 軟骨細胞においては、分裂後の二つの細胞がそれらを取り囲む軟骨基質による物理的な拘束を受けるため、二細胞が接着面積を最大化するため親細胞形態の短軸方向に並ぶことで、細胞の骨長軸方向への再配列が達成される可能性がある(Fig. 1.2).

細胞極性を制御する可能性のある他の因子として、Wnt シグナルの勾配が挙げられる。発生初期段階のマウスの四肢において、Wnt シグナル勾配が肢の伸長に必要であることが示されている(Gao et al., 2011). *in vitro* 実験においても、Wnt-PCP 経路が軟骨細胞のカラム形成に関与することが知られている(Randall et al., 2012). また、 $\beta 1$ インテグリン遺伝子の発現を阻害した *in vivo* 実験においては、分裂後の細胞の再配列が不十分になり、軟骨カラムが形成されず、その結果、太く短い骨が形成される(Aszodi et al., 2003). 同様の細胞再配列の乱れは *frizzled* シグナル(Li and Dudley, 2009)や N-cadherin (Li et al., 2017), $\alpha 10\beta 1$ integrin (Bengtsson et al., 2005), インテグリン結合キナーゼ(integrin-linked kinase, Ilk) (Grashoff et al., 2003)の発現を阻害する研究においても示されている。さらに、この細胞再配列には、繊毛内タンパク質輸送(intraflagellar transport, IFT)が重要な役割を果たしていることが示唆されている(Song et al., 2007). これらの因子は、分裂後の細胞間接着強度の変化などを介して軟骨カラム形成に影響を及ぼしている可能性がある。

1.3.3 力学的因子による骨形態形成の制御

骨形態形成における多細胞動態の制御には、生化学的因子だけでなく、力学的因子も影響を及ぼす(Felsenthal and Zelzer, 2017; Nowlan et al., 2010; Shwartz et al., 2013). 麻痺により筋力が骨に作用しない条件下では、増殖軟骨細胞による軟骨カラム形成の不全(Shwartz et al., 2012), 骨形態の異常や関節の癒合(Nowlan et al., 2014; Sotiriou et al., 2019), および、石灰化の遅延(Pierantoni et al., 2021)が観察されている。一方で、このような骨形態の異常は発生が進むにつれ部分的に改善されることも報告されている(Sotiriou et al., 2022). また、ニシアフリカコビトワニを用いた実験では、低温環境で育った動物は運動頻度が低く、骨の伸長が抑制さ

れることが示されている(Pollard et al., 2017). 発生過程において遠心分離機により過重力を作用させたゼブラフィッシュでは, 細胞外基質の組成が変化し, 軟骨細胞領域の剛性が上昇することが報告されている(Lawrence et al., 2021). 力に応じた骨形態の変化には, Yes-associated protein (YAP)および transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) (Collins et al., 2023; Kegelman et al., 2020, 2018)や TRPV4 (Khatib et al., 2023)が関与する可能性が指摘されている.

力学的因子の影響は, 細胞レベルでも観察される. 生体内の細胞において, 周期的な荷重が軟骨細胞の増殖を促進することが示されている(Wang and Mao, 2002). また, 培養細胞を用いた *in vitro* 実験では, 周期的な力学負荷が軟骨細胞による *Ihh* の産生, および, 増殖を促進することが示されている(Wu et al., 2001; Wu and Chen, 2000). さらに, 力学感受性 miRNA である miR-365 は, *Ihh* の産生と肥大化マーカーである type X コラーゲンの産生を促進することから, 力学刺激に応じた肥大化を制御する因子のひとつであると考えられる(Guan et al., 2011). 実際, 周期的な機械的張力により軟骨細胞における miR-365 発現が低下し, 細胞増殖が促進されることが観察されている(Zheng et al., 2019). このような細胞の力学応答は一次繊毛を介した力学感知に介在される可能性が指摘されている(Rais et al., 2015).

骨形態形成における力学的因子の影響を調べるため, 動物から摘出した骨に力学負荷や力学的拘束を与える研究が行われている(Khatib et al., 2021; Sathi et al., 2015). このような研究を通じて, 肥大軟骨細胞のアポトーシス, および, 石灰化が, 外力と浸透圧の影響を受けることが示されている(Hara et al., 2018). また, ゲル中で培養された軟骨細胞への圧縮荷重が, type II コラーゲンとアグリカンの産生を促進し, Sox9 の発現レベルを上昇させることが示されている(Juhász et al., 2014; Takahashi et al., 1998). さらに, 骨切片に対する周期的圧縮が, 骨切片の弾性率を上昇させることが報告されている(Maeda et al., 2017).

以上のように, 骨形態形成に対する力学的因子の影響を調べる研究は盛んであるが, その多くにおいては, 全身の麻痺や骨全体への加重により力学負荷を all or nothing 形式で変化させており, 単一の筋肉の不全が骨形態に及ぼす影響や, 骨内部における多細胞動態の時空間的な制御メカニズムについては十分に調べられていない.

1.4 骨形態形成メカニズム解明に向けたシミュレーション研究

形態形成過程の組織内部における生化学的, および, 力学的因子の時空間依存的な影響をより詳細に理解するため, 形態形成過程における生化学的因子の分布に関する数理解析や, 組織成長の力学解析が行われてきた. 力学解析に用いられるモデルは, 連続体モデル(continuum modeling)と離散系モデル(discrete system modeling)に大別される.

硬組織からなる成長後の骨の解析には, 実験的に測定可能な材料の物性を連続体力学における構成則に直接導入可能な連続体モデルが広く用いられてきた(Fig. 1.3a). 骨形態形成の解析においても, 石灰化組織の形成が重要な現象の一つであること, および, 形態形成後の骨リモデリング解析との接続性を考慮すると, 連続体モデルの適用が有効だと考えられる. 一方, 骨形態形成においては, 異なる活動を示す細胞群の組織内における空間分布が, 形成される骨形態を制御するうえで重要である. 多細胞組織を粗視化し連続体として表現する連続体モデルにおいて, このような空間的に不均一な細胞活動に応じた組織形態変化を解析することは難しい. そのため, 個々の細胞活動にともなう組織形態変化の解析には, 離散系モデルが広く用いられてきた(Fig. 1.3b). 本節では, これらのモデルに基づくシミュレーション研究, および, 連続体・離散系モデルそれぞれの長所を活かした連続体ベース粒子法(Fig. 1.3c)の近年の発展について概説する.

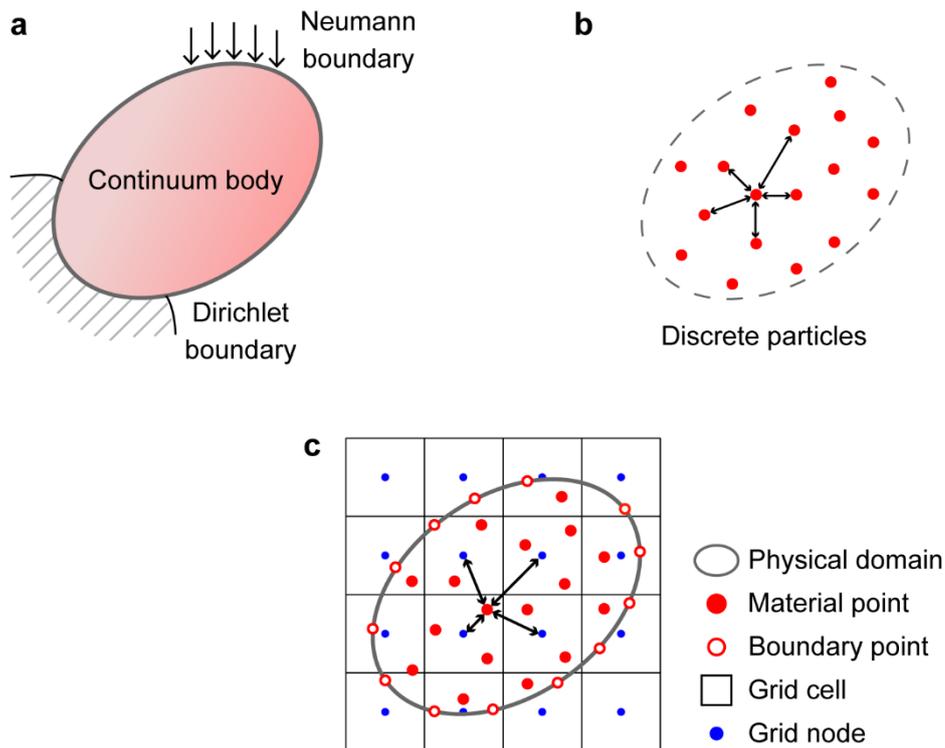


Figure 1.3 Simulation models for biological tissues. **(a)** Continuum modeling. **(b)** Discrete system modeling. **(c)** Material point method combining continuum and discrete system modeling.

1.4.1 生化学的因子の数理解析

多細胞動態を制御する生化学的因子の時空間的な分布をコンピュータ上で再現する数理解析は数多く存在する。そのような数理解析を骨形態形成過程における *Ihh*, *PTHrP*, および, *VEGF* の 3 因子の反応拡散に適用することにより, 一次元環境で成長板の形成が解析されている(Brouwers et al., 2006). また, 二次元環境において *Ihh* と *PTHrP* の 2 因子の反応拡散モデルを用いることで, 形態形成過程における成長板の形成, および, 骨端形状の変化が解析されている (Garzón-Alvarado et al., 2009). さらに, より多くの生化学的因子を考慮することにより, 複数の骨からなる関節の形態形成を二次元環境で解析することが可能となっている(Márquez-Flórez et al., 2018). 一方, より発生初期段階の軟骨原器の

パターンニングについては、実験的に観察された生化学的因子の分布(Malkmus et al., 2021)などをもとに、チューリングモデルを用いて数理的に理解する試みが行われている(Scoones and Hiscock, 2020; Zhang et al., 2013; Zhu et al., 2010).

1.4.2 連続体力学に基づく骨の力学解析

近年では、上述のような生化学的因子の数値モデルを力学解析に導入し、組織成長にともなう応力等の力学状態を解析可能なシミュレーション手法が提案されている。成長後の骨組織の力学解析手法としては、連続体力学に基づく有限要素法が古くから利用されてきた(Fig. 1.3a) (Adachi et al., 2006; Kameo et al., 2020; Tsubota et al., 2009; van Rietbergen et al., 1995)。この連続体力学解析を形態形成過程の骨組織に適用することにより、組織内部における力学状態が明らかにされている(Guevara et al., 2015; Nowlan et al., 2008)。また、連続体力学解析は、脳や植物組織などの形態形成における多細胞組織の成長にともなう変形解析にも広く用いられている(Ambrosi et al., 2019; de Rooij and Kuhl, 2016; Menzel and Kuhl, 2012; Mollier et al., 2023; Ohtsuka et al., 2022; Parada et al., 2022; Rodriguez et al., 1994; Takeda et al., 2021, 2020; Zhang et al., 2021)。

このような連続体力学解析を骨形態形成に適用し、力学的因子に応じた組織成長をモデル化することで、骨形態の経時的変化をシミュレーションすることが可能となっている。1980年代から、Carterらにより、静水圧とせん断応力から計算される骨形成指標に応じた形態形成則が提案されてきた(Carter, 1987; Carter and Wong, 1988; Wong and Carter, 1990)。近年では、この骨形成指標と生化学的因子の効果を組み合わせることで、二次骨化中心や関節形態の形成メカニズムが提案されている(Carrera-Pinzón et al., 2020; Sadeghian et al., 2021)。一方、Carterの法則の他にも、骨組織内の生細胞イメージングをもとに成長則を推定する研究(Godivier et al., 2022)などを通じて、さまざまな力学応答則が提案されている(Carpenter and Carter, 2008; Giorgi et al., 2015, 2014; Godivier et al., 2023; Márquez-Flórez et al., 2018)。これらの研究を通じて、力学的因子と生化学的因子の効果の組み合わせにより、大腿骨形態の形成を再現可能であることが示されている

(Vaca-González et al., 2018).

1.4.3 離散系モデルに基づく多細胞の力学解析

個々の細胞の空間的に不均一な活動は、骨に限らず様々な生体組織の形態形成において重要である(Matejčić and Trepapat, 2022). このような個々の細胞活動の解析には、粒子モデル(Germann et al., 2019; Ghaffarizadeh et al., 2018)やバーテックスモデル(Alt et al., 2017; Eiraku et al., 2011; Honda et al., 2004; Okuda et al., 2015, 2013)などの離散系モデルが広く用いられてきた(Fig. 1.3b). 粒子モデルでは、一細胞を一粒子により表現することで、多細胞からなるスフェロイドにおける収れん伸長や細胞選別の解析が可能である(Germann et al., 2019). また、バーテックスモデルでは、細胞を複数の頂点からなる多面体として表現するため、細胞の変形やその分裂を陽に記述することができ、眼杯や上皮組織などの形態形成シミュレーションに適用されている(Eiraku et al., 2011; Okuda et al., 2013). これらの離散系モデルは、細胞や組織の変形を個々の離散要素間のエネルギー関数をもとに計算する点で、大域的な構成則をもつ連続体モデルと異なる.

1.4.4 連続体ベース粒子法の発展

近年、離散的な粒子を連続体力学に基づく解析に導入することで、連続体モデルと離散系モデルそれぞれの長所を活かすシミュレーション手法が開発されている(Fig. 1.3c). 2000年代初め、連続体力学に基づく有限要素法による大変形解析の安定性向上を目的とし、有限要素メッシュが大きくひずむ領域でのみ粒子による離散化を導入する手法が提案された(Johnson et al., 2002). また、互いに接触する粉末粒子の圧縮変形解析のため、粒子配置をもとに有限要素メッシュを生成し連続体力学解析を行う手法が提案された(Mori and Kuzime, 2002). その後、有限要素解析を行うオイラーメッシュ上にラグランジュ粒子を埋め込み、解析対象の変形をラグランジュ粒子の移動により表現するというコンセプトに基づ

き, finite element method with Lagrangian integration points (FEM-LIP) (Cuomo et al., 2013; Moresi et al., 2003), moving particle finite element method (MPFEM) (Hao et al., 2004), material point method (MPM) (Bardenhagen and Kober, 2004)などが提案されてきた。これらの手法は主に土木工学やコンピュータグラフィックスの分野で動的解析に適用されてきたが, 連続体ベース粒子法として知られる MPM については, 陰的解法を用いた静的解析への拡張が行われている(Charlton et al., 2017; Wang et al., 2016; Yamaguchi et al., 2021)。近年では, この連続体ベース粒子法を生体組織などのソフトマテリアルの成長に適用する例もみられる(Zhang et al., 2021)。したがって, 連続体ベース粒子法は, 骨形態形成における個々の細胞活動にともなう組織全体の力学的ふるまいを解析するうえで有効であると考えられる。

1.5 本論文の目的と構成

本論文では, 骨の形態が力学的因子に応じた多細胞動態により制御されるメカニズムを理解することを目的とした。そのために, まず, 骨形態形成における個々の細胞活動にともなう組織全体の力学的ふるまいを, 連続体力学に基づき解析可能な連続体ベース粒子モデルを構築した。次に, 長骨の伸長を制御するうえで主要な役割を果たす成長板内での細胞活動に着目し, その成長板における細胞分化を制御する単因子モデルを構築した。さらに, 連続体ベース粒子モデルに基づく解析に単因子モデルを適用することで骨形態形成シミュレーション基盤を構築し, 形態形成過程の骨組織内部における力学解析を可能とした。このシミュレーション基盤を用いて成長板における応力場を解析することで, 長骨の形態形成に影響を及ぼす細胞活動の力学的制御メカニズムの理解を試みた。以下に, 本論文の構成を述べる。

第 2 章では, 個々の細胞活動を組織全体の力学的ふるまいに結び付ける連続体ベース粒子モデルを構築した。ここでは, 細胞の成長と増殖のモデルを構築することにより, 力学的拘束条件下での多細胞組織の成長をシミュレーションし, その過程における組織内部の力学状態を解析することが可能となった。また, 細

胞周期における体積チェックポイントの効果を細胞増殖モデルに導入することにより、力学状態に応じた細胞活動の変化が組織全体の力学的ふるまいに及ぼす影響を評価した。

第 3 章では、成長板における細胞分化を制御する単因子モデルを構築し、当該モデルが生理的、および、病理的な成長板構造を再現可能であることを検証した。また、この単因子モデルを、第 2 章で構築した連続体ベース粒子モデルに基づく三次元多細胞シミュレーションに導入することで、マウスの第三中足骨における観察と対応する成長板構造の形成、維持、および、骨組織全体の伸長を個々の細胞活動に基づき解析可能なシミュレーション基盤を構築した。また、この骨形態形成シミュレーションにおいて、細胞の分裂頻度分布がマウスの第三中足骨における観察結果と同様の傾向を示すことを検証した。

第 4 章では、第 3 章で構築した骨形態形成シミュレーション基盤を用いて、形態形成過程の成長板における力学状態を解析した。その結果、成長板の増殖層において、骨の長軸に垂直な面内の引張応力と骨長軸方向の圧縮応力からなる異方的な応力場が生じることが明らかとなった。この応力異方性にともない細胞が骨長軸方向に整列し、摘出骨における観察と同様にシミュレーション内で軟骨カラムが形成されていることを確認した。また、応力異方性にとまなう軟骨カラム形成が、骨形態の制御に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、骨形態を制御する増殖層における応力異方性は、前肥大層、および、肥大層における軟骨細胞の肥大化により誘導されることが明らかとなった。したがって、本研究により、成長板の層ごとに異なる細胞活動が、骨組織内部の応力場、および、細胞の配列を介して骨形態を制御する力学的メカニズムが明らかとなった。

最後に、第 5 章では、本論文の総括を述べる。

参考文献

- Adachi, T., Osako, Y., Tanaka, M., Hojo, M., Hollister, S.J., 2006. Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. *Biomaterials* 27, 3964–3972. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.039>
- Akiyama, H., Lyons, J.P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J.M., Taketo, M.M., Nakamura, T., Behringer, R.R., McCrea, P.D., Crombrughe, B. de, 2004. Interactions between Sox9 and β -catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* 18, 1072–1087. <https://doi.org/10.1101/gad.1171104>
- Al-Far, H., Tjessem, I., Lauszus, F., 2017. Macrosomia and the IGF system. *Focus on Science* ISSN: 2423-8198 3. <https://doi.org/10.21859/focsci-03021422>
- Alt, S., Ganguly, P., Salbreux, G., 2017. Vertex models: from cell mechanics to tissue morphogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20150520. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0520>
- Alvarez, J., Sohn, P., Zeng, X., Doetschman, T., Robbins, D.J., Serra, R., 2002. TGF β 2 mediates the effects of Hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Development* 129, 1913–1924. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1913>
- Ambrosi, D., Ben Amar, M., Cyron, C.J., DeSimone, A., Goriely, A., Humphrey, J.D., Kuhl, E., 2019. Growth and remodelling of living tissues: perspectives, challenges and opportunities. *J. R. Soc. Interface.* 16, 20190233. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0233>
- Aszodi, A., Hunziker, E.B., Brakebusch, C., Fässler, R., 2003. β 1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.* 17, 2465–2479. <https://doi.org/10.1101/gad.277003>
- Bardenhagen, S.G., Kober, E.M., 2004. The generalized interpolation material point method. *CMES-Comp. Model. Eng. Sci.* 5, 477–495.
- Bengtsson, T., Aszodi, A., Nicolae, C., Hunziker, E.B., Lundgren-Åkerlund, E., Fässler, R., 2005. Loss of α 10 β 1 integrin expression leads to moderate dysfunction of growth plate chondrocytes. *Journal of Cell Science* 118, 929–936. <https://doi.org/10.1242/jcs.01678>
- Brouwers, J.E.M., van Donkelaar, C.C., Sengers, B.G., Huiskes, R., 2006. Can the growth factors PTHrP, Ihh and VEGF, together regulate the development of a long bone? *Journal of Biomechanics* 39, 2774–2782. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.10.004>
- Carpenter, R.D., Carter, D.R., 2008. The mechanobiological effects of periosteal surface loads. *Biomech Model Mechanobiol* 7, 227–242. <https://doi.org/10.1007/s10237-007-0087-9>
- Carrera-Pinzón, A.F., Márquez-Flórez, K., Kraft, R.H., Ramtani, S., Garzón-Alvarado, D.A., 2020. Computational model of a synovial joint morphogenesis. *Biomech*

- Model Mechanobiol 19, 1389–1402. <https://doi.org/10.1007/s10237-019-01277-4>
- Carter, D.R., 1987. Mechanical loading history and skeletal biology. *Journal of Biomechanics*, F. Gaynor Evans Anniversary Issue on Bone Biomechanics 20, 1095–1109. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(87\)90027-3](https://doi.org/10.1016/0021-9290(87)90027-3)
- Carter, D.R., Wong, M., 1988. The role of mechanical loading histories in the development of diarthrodial joints. *Journal of Orthopaedic Research* 6, 804–816. <https://doi.org/10.1002/jor.1100060604>
- Charlton, T.J., Coombs, W.M., Augarde, C.E., 2017. iGIMP: An implicit generalised interpolation material point method for large deformations. *Computers & Structures* 190, 108–125. <https://doi.org/10.1016/j.compstruc.2017.05.004>
- Chen, X., Macica, C., Nasiri, A., Judex, S., Broadus, A.E., 2007. Mechanical regulation of PTHrP expression in entheses. *Bone* 41, 752–759. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.07.020>
- Chen, X., Macica, C.M., Nasiri, A., Broadus, A.E., 2008. Regulation of articular chondrocyte proliferation and differentiation by indian hedgehog and parathyroid hormone-related protein in mice. *Arthritis Rheum* 58, 3788–3797. <https://doi.org/10.1002/art.23985>
- Collins, J.M., Lang, A., Parisi, C., Moharrer, Y., Nijssure, M.P., Kim, J.H. (Thomas), Szeto, G.L., Qin, L., Gottardi, R., Dymont, N., Nowlan, N., Boerckel, J.D., 2023. YAP and TAZ couple osteoblast precursor mobilization to angiogenesis and mechanoregulated bone development (preprint). *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.01.20.524918>
- Cooper, K.L., Oh, S., Sung, Y., Dasari, R.R., Kirschner, M.W., Tabin, C.J., 2013. Multiple phases of chondrocyte enlargement underlie differences in skeletal proportions. *Nature* 495, 375–378. <https://doi.org/10.1038/nature11940>
- Cuomo, S., Prime, N., Iannone, A., Dufour, F., Cascini, L., Darve, F., 2013. Large deformation FEM-LIP drained analysis of a vertical cut. *Acta Geotech.* 8, 125–136. <https://doi.org/10.1007/s11440-012-0179-2>
- de Rooij, R., Kuhl, E., 2016. Constitutive Modeling of Brain Tissue: Current Perspectives. *Applied Mechanics Reviews* 68, 010801. <https://doi.org/10.1115/1.4032436>
- Dodds, G.S., 1930. Row formation and other types of arrangement of cartilage cells in endochondral ossification. *The Anatomical Record* 46, 385–399. <https://doi.org/10.1002/ar.1090460409>
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., Sasai, Y., 2011. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472, 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature09941>
- Erickson, A.G., Laughlin, T.D., Romereim, S.M., Sargus-Patino, C.N., Pannier, A.K., Dudley, A.T., 2018. A Tunable, Three-Dimensional *In Vitro* Culture Model of Growth Plate Cartilage Using Alginate Hydrogel Scaffolds. *Tissue Engineering Part A* 24, 94–105. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0091>

- Fang, X., Wen, J., Cheng, L., Yu, D., Zhang, H., Gumbsch, P., 2022. Programmable gear-based mechanical metamaterials. *Nat. Mater.* <https://doi.org/10.1038/s41563-022-01269-3>
- Farnum, C.E., Tinsley, M., Hermanson, J.W., 2008. Forelimb versus Hindlimb Skeletal Development in the Big Brown Bat, *Eptesicus fuscus*: Functional Divergence Is Reflected in Chondrocytic Performance in Autopodial Growth Plates. *CTO* 187, 35–47. <https://doi.org/10.1159/000109962>
- Felsenthal, N., Zelzer, E., 2017. Mechanical regulation of musculoskeletal system development. *Development* 144, 4271–4283. <https://doi.org/10.1242/dev.151266>
- Galea, G.L., Zein, M.R., Allen, S., Francis-West, P., 2021. Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Developmental Dynamics* 250, 414–449. <https://doi.org/10.1002/dvdy.278>
- Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliot, G., Garrett, L., English, M.A., Andre, P., Robinson, J., Sood, R., Minami, Y., Economides, A.N., Yang, Y., 2011. Wnt Signaling Gradients Establish Planar Cell Polarity by Inducing Vangl2 Phosphorylation through Ror2. *Developmental Cell* 20, 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.001>
- Garland, T., Janis, C.M., 1993. Does metatarsal/femur ratio predict maximal running speed in cursorial mammals? *Journal of Zoology* 229, 133–151. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1993.tb02626.x>
- Garzón-Alvarado, D.A., García-Aznar, J.M., Doblaré, M., 2009. A reaction–diffusion model for long bones growth. *Biomech Model Mechanobiol* 8, 381–395. <https://doi.org/10.1007/s10237-008-0144-z>
- Gemp, I.M., Carthew, R.W., Hilgenfeldt, S., 2011. Cadherin-Dependent Cell Morphology in an Epithelium: Constructing a Quantitative Dynamical Model. *PLOS Computational Biology* 7, e1002115. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002115>
- Germann, P., Marin-Riera, M., Sharpe, J., 2019. ya||a: GPU-Powered Spheroid Models for Mesenchyme and Epithelium. *Cell Systems* 8, 261–266.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.02.007>
- Ghaffarizadeh, A., Heiland, R., Friedman, S.H., Mumenthaler, S.M., Macklin, P., 2018. PhysiCell: An open source physics-based cell simulator for 3-D multicellular systems. *PLoS Comput Biol* 14, e1005991. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005991>
- Giorgi, M., Carriero, A., Shefelbine, S.J., Nowlan, N.C., 2015. Effects of normal and abnormal loading conditions on morphogenesis of the prenatal hip joint: application to hip dysplasia. *Journal of Biomechanics* 48, 3390–3397. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.06.002>
- Giorgi, M., Carriero, A., Shefelbine, S.J., Nowlan, N.C., 2014. Mechanobiological simulations of prenatal joint morphogenesis. *Journal of Biomechanics* 47, 989–995. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.01.002>
- Godivier, J., Lawrence, E.A., Wang, M., Hammond, C.L., Nowlan, N.C., 2023. Cyclical

compression loading is the dominant mechanoregulator of synovial joint morphogenesis. <https://doi.org/10.1101/2023.02.09.527957>

- Godivier, J., Lawrence, E.A., Wang, M., Hammond, C.L., Nowlan, N.C., 2022. Growth orientations, rather than heterogeneous growth rates, dominate jaw joint morphogenesis in the larval zebrafish. *Journal of Anatomy* 241, 358–371. <https://doi.org/10.1111/joa.13680>
- Grashoff, C., Aszódi, A., Sakai, T., Hunziker, E.B., Fässler, R., 2003. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO reports* 4, 432–438. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor801>
- Green, J.D., Tollemar, V., Dougherty, M., Yan, Z., Yin, L., Ye, J., Collier, Z., Mohammed, M.K., Haydon, R.C., Luu, H.H., Kang, R., Lee, M.J., Ho, S.H., He, T.-C., Shi, L.L., Athiviraham, A., 2015. Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes & Diseases* 2, 307–327. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.09.003>
- Guan, Y.-J., Yang, X., Wei, L., Chen, Q., 2011. MiR-365: a mechanosensitive microRNA stimulates chondrocyte differentiation through targeting histone deacetylase 4. *The FASEB Journal* 25, 4457–4466. <https://doi.org/10.1096/fj.11-185132>
- Guevara, J.M., Moncayo, M.A., Vaca-González, J.J., Gutiérrez, M.L., Barrera, L.A., Garzón-Alvarado, D.A., 2015. Growth plate stress distribution implications during bone development: A simple framework computational approach. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 118, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2014.10.007>
- Hallett, S.A., Matsushita, Y., Ono, W., Sakagami, N., Mizuhashi, K., Tokavanich, N., Nagata, M., Zhou, A., Hirai, T., Kronenberg, H.M., Ono, N., 2021. Chondrocytes in the resting zone of the growth plate are maintained in a Wnt-inhibitory environment. *eLife* 10, e64513. <https://doi.org/10.7554/eLife.64513>
- Hao, S., Liu, W.K., Belytschko, T., 2004. Moving particle finite element method with global smoothness. *Numerical Meth Engineering* 59, 1007–1020. <https://doi.org/10.1002/nme.999>
- Hara, E.S., Okada, M., Nagaoka, N., Hattori, T., Iida, L.M., Kuboki, T., Nakano, T., Matsumoto, T., 2018. Chondrocyte burst promotes space for mineral expansion. *Integr. Biol.* 10, 57–66. <https://doi.org/10.1039/C7IB00130D>
- Haseeb, A., Kc, R., Angelozzi, M., de Charleroy, C., Rux, D., Tower, R.J., Yao, L., Pellegrino da Silva, R., Pacifici, M., Qin, L., Lefebvre, V., 2021. SOX9 keeps growth plates and articular cartilage healthy by inhibiting chondrocyte dedifferentiation/osteoblastic redifferentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, e2019152118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019152118>
- Hayashi, T., Carthew, R.W., 2004. Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina. *Nature* 431, 647–652. <https://doi.org/10.1038/nature02952>
- Hilgenfeldt, S., Eriskens, S., Carthew, R.W., 2008. Physical modeling of cell geometric order in an epithelial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 907–911. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711077105>

- Hilton, M.J., Tu, X., Long, F., 2007. Tamoxifen-inducible gene deletion reveals a distinct cell type associated with trabecular bone, and direct regulation of PTHrP expression and chondrocyte morphology by *Ihh* in growth region cartilage. *Developmental Biology* 308, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.05.011>
- Honda, H., Tanemura, M., Nagai, T., 2004. A three-dimensional vertex dynamics cell model of space-filling polyhedra simulating cell behavior in a cell aggregate. *Journal of Theoretical Biology* 226, 439–453. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2003.10.001>
- Johnson, G.R., Stryk, R.A., Beissel, S.R., Holmquist, T.J., 2002. An algorithm to automatically convert distorted finite elements into meshless particles during dynamic deformation. *International Journal of Impact Engineering* 27, 997–1013. [https://doi.org/10.1016/S0734-743X\(02\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0734-743X(02)00030-1)
- Juhász, T., Matta, C., Somogyi, C., Katona, É., Takács, R., Soha, R.F., Szabó, I.A., Cserhádi, C., Szódy, R., Karácsonyi, Z., Bakó, É., Gergely, P., Zákány, R., 2014. Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cellular Signalling* 26, 468–482. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.001>
- Kameo, Y., Miya, Y., Hayashi, M., Nakashima, T., Adachi, T., 2020. In silico experiments of bone remodeling explore metabolic diseases and their drug treatment. *Sci. Adv.* 6, eaax0938. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0938>
- Kegelman, C.D., Collins, J.M., Nijssure, M.P., Eastburn, E.A., Boerckel, J.D., 2020. Gone Caving: Roles of the Transcriptional Regulators YAP and TAZ in Skeletal Development. *Curr Osteoporos Rep* 18, 526–540. <https://doi.org/10.1007/s11914-020-00605-3>
- Kegelman, C.D., Mason, D.E., Dawahare, J.H., Horan, D.J., Vigil, G.D., Howard, S.S., Robling, A.G., Bellido, T.M., Boerckel, J.D., 2018. Skeletal cell YAP and TAZ combinatorially promote bone development. *FASEB j.* 32, 2706–2721. <https://doi.org/10.1096/fj.201700872R>
- Khatib, N., Parisi, C., Nowlan, N., 2021. Differential effect of frequency and duration of mechanical loading on fetal chick cartilage and bone development. 545. <https://doi.org/10.22203/eCM.v041a34>
- Khatib, N.S., Monsen, J., Ahmed, S., Huang, Y., Hoey, D.A., Nowlan, N.C., 2023. Mechanoregulatory role of TRPV4 in prenatal skeletal development. *Science Advances* 9, eade2155. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade2155>
- Kozhemyakina, E., Lassar, A.B., Zelzer, E., 2015. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development* 142, 817–831. <https://doi.org/10.1242/dev.105536>
- Kronenberg, H.M., 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–336. <https://doi.org/10.1038/nature01657>
- Lawrence, E.A., Aggleton, J., Loon, J. van, Godivier, J., Harniman, R., Pei, J., Nowlan, N., Hammond, C., 2021. Exposure to hypergravity during zebrafish development alters cartilage material properties and strain distribution. *Bone & Joint Research*

- 10, 137–148. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.102.BJR-2020-0239.R1>
- Li, Y., Dudley, A.T., 2009. Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development* 136, 1083–1092. <https://doi.org/10.1242/dev.023820>
- Li, Y., Li, A., Junge, J., Bronner, M., 2017. Planar cell polarity signaling coordinates oriented cell division and cell rearrangement in clonally expanding growth plate cartilage. *eLife* 6, e23279. <https://doi.org/10.7554/eLife.23279>
- Long, F., Chung, U., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H.M., McMahon, A.P., 2004. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 131, 1309–1318. <https://doi.org/10.1242/dev.01006>
- Long, F., Ornitz, D.M., 2013. Development of the Endochondral Skeleton. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, a008334–a008334. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008334>
- Maeda, E., Nakagaki, M., Ichikawa, K., Nagayama, K., Matsumoto, T., 2017. Effects of cyclic compression on the mechanical properties and calcification process of immature chick bone tissue in culture. *Bone Reports* 6, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2017.04.002>
- Mak, K.K., Kronenberg, H.M., Chuang, P.-T., Mackem, S., Yang, Y., 2008. Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy. *Development* 135, 1947–1956. <https://doi.org/10.1242/dev.018044>
- Malkmus, J., Ramos Martins, L., Jhanwar, S., Kircher, B., Palacio, V., Sheth, R., Leal, F., Duchesne, A., Lopez-Rios, J., Peterson, K.A., Reinhardt, R., Onimaru, K., Cohn, M.J., Zuniga, A., Zeller, R., 2021. Spatial regulation by multiple Gremlin1 enhancers provides digit development with cis-regulatory robustness and evolutionary plasticity. *Nat Commun* 12, 5557. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25810-1>
- Malmi-Kakkada, A.N., Sinha, S., Li, X., Thirumalai, D., 2022. Adhesion strength between cells regulate nonmonotonic growth by a biomechanical feedback mechanism. *Biophysical Journal* 121, 3719–3729. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.04.032>
- Marquez-Florez, K., Arroyave-Tobon, S., Linares, J.-M., 2023. From biological morphogenesis to engineering joint design: A bio-inspired algorithm. *Materials & Design* 225, 111466. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111466>
- Márquez-Flórez, K.M., Monaghan, J.R., Shefelbine, S.J., Ramirez-Martínez, A., Garzón-Alvarado, D.A., 2018. A computational model for the joint onset and development. *Journal of Theoretical Biology* 454, 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.04.015>
- Matejčić, M., Trepac, X., 2022. Mechanobiological approaches to synthetic morphogenesis: learning by building. *Trends in Cell Biology* S0962892422001520. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.06.013>
- Matsushita, Y., Ono, W., Ono, N., 2020. Skeletal Stem Cells for Bone Development and Repair: Diversity Matters. *Curr Osteoporos Rep* 18, 189–198.

<https://doi.org/10.1007/s11914-020-00572-9>

- Menzel, A., Kuhl, E., 2012. Frontiers in growth and remodeling. *Mechanics Research Communications, Recent Advances in the Biomechanics of Growth and Remodeling* 42, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.mechrescom.2012.02.007>
- Mittag, U., Kriechbaumer, A., Bartsch, M., Rittweger, J., 2015. Form follows function: a computational simulation exercise on bone shape forming and conservation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 15, 215–226.
- Mizuhashi, K., Ono, W., Matsushita, Y., Sakagami, N., Takahashi, A., Saunders, T.L., Nagasawa, T., Kronenberg, H.M., Ono, N., 2018. Resting zone of the growth plate houses a unique class of skeletal stem cells. *Nature* 563, 254–258. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0662-5>
- Mollier, C., Skrzydeł, J., Borowska-Wykręt, D., Majda, M., Bayle, V., Battu, V., Totozafy, J.-C., Dulski, M., Fruleux, A., Wrzalik, R., Mouille, G., Smith, R.S., Monéger, F., Kwiatkowska, D., Boudaoud, A., 2023. Spatial consistency of cell growth direction during organ morphogenesis requires CELLULOSE SYNTHASE INTERACTIVE1. *Cell Reports* 42. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112689>
- Moresi, L., Dufour, F., Mühlhaus, H.-B., 2003. A Lagrangian integration point finite element method for large deformation modeling of viscoelastic geomaterials. *Journal of Computational Physics* 184, 476–497. [https://doi.org/10.1016/S0021-9991\(02\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9991(02)00031-1)
- Mori, K., Kuzime, R., 2002. Microscopic approach of powder compaction using finite element method. *International Journal of Mechanical Sciences*.
- Murakami, H., Nakamura, T., Tsurukami, H., Abe, M., Barbier, A., Suzuki, K., 1994. Effects of tiludronate on bone mass, structure, and turnover at the epiphyseal, primary, and secondary spongiosa in the proximal tibia of growing rats after sciatic neurectomy. *Journal of Bone and Mineral Research* 9, 1355–1364. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090906>
- Newton, P.T., Li, L., Zhou, B., Schweingruber, C., Hovorakova, M., Xie, M., Sun, X., Sandhow, L., Artemov, A.V., Ivashkin, E., Suter, S., Dyachuk, V., El Shahawy, M., Gritli-Linde, A., Boudierlique, T., Petersen, J., Mollbrink, A., Lundeberg, J., Enikolopov, G., Qian, H., Fried, K., Kasper, M., Hedlund, E., Adameyko, I., Säwendahl, L., Chagin, A.S., 2019. A radical switch in clonality reveals a stem cell niche in the epiphyseal growth plate. *Nature* 567, 234–238. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0989-6>
- Nowlan, N.C., Chandaria, V., Sharpe, J., 2014. Immobilized chicks as a model system for early-onset developmental dysplasia of the hip. *J. Orthop. Res* 32, 777–785. <https://doi.org/10.1002/jor.22606>
- Nowlan, N.C., Murphy, P., Prendergast, P.J., 2008. A dynamic pattern of mechanical stimulation promotes ossification in avian embryonic long bones. *Journal of Biomechanics* 41, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2007.09.031>
- Nowlan, N.C., Sharpe, J., Roddy, K.A., Prendergast, P.J., Murphy, P., 2010. Mechanobiology of embryonic skeletal development: Insights from animal models. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 90, 203–213.

<https://doi.org/10.1002/bdrc.20184>

- Ohtsuka, D., Kida, N., Lee, S.-W., Kawahira, N., Morishita, Y., 2022. Cell disorientation by loss of SHH-dependent mechanosensation causes cyclopia. *Science Advances* 8, eabn2330. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn2330>
- Okuda, S., Inoue, Y., Adachi, T., 2015. Three-dimensional vertex model for simulating multicellular morphogenesis. *Biophysics and Physicobiology* 12, 13–20. https://doi.org/10.2142/biophysico.12.0_13
- Okuda, S., Inoue, Y., Eiraku, M., Sasai, Y., Adachi, T., 2013. Apical contractility in growing epithelium supports robust maintenance of smooth curvatures against cell-division-induced mechanical disturbance. *Journal of Biomechanics* 46, 1705–1713. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.03.035>
- Orikasa, S., Matsushita, Y., Fogge, M., Mizuhashi, K., Sakagami, N., Ono, W., Ono, N., 2023. Growth plate resting zone chondrocytes acquire transient clonal competency upon Hedgehog activation and efficiently transform into trabecular bone osteoblasts. <https://doi.org/10.1101/2023.05.31.543069>
- Parada, C., Banavar, S.P., Khalilian, P., Rigaud, S., Michaut, A., Liu, Y., Joshy, D.M., Campàs, O., Gros, J., 2022. Mechanical feedback defines organizing centers to drive digit emergence. *Developmental Cell* 57, 854-866.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.03.004>
- Parmenter, M.D., Gray, M.M., Hogan, C.A., Ford, I.N., Broman, K.W., Vinyard, C.J., Payseur, B.A., 2016. Genetics of Skeletal Evolution in Unusually Large Mice from Gough Island. *Genetics* 204, 1559-1572,1–15. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.193805>
- Pierantoni, M., Le Cann, S., Sotiriou, V., Ahmed, S., Bodey, A.J., Jerjen, I., Nowlan, N.C., Isaksson, H., 2021. Muscular loading affects the 3D structure of both the mineralized rudiment and growth plate at early stages of bone formation. *Bone* 145, 115849. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.115849>
- Pollard, A.S., Charlton, B.G., Hutchinson, J.R., Gustafsson, T., McGonnell, I.M., Timmons, J.A., Pitsillides, A.A., 2017. Limb proportions show developmental plasticity in response to embryo movement. *Sci Rep* 7, 41926. <https://doi.org/10.1038/srep41926>
- Portron, S., Hivernaud, V., Merceron, C., Lesoeur, J., Masson, M., Gauthier, O., Vinatier, C., Beck, L., Guicheux, J., 2015. Inverse Regulation of Early and Late Chondrogenic Differentiation by Oxygen Tension Provides Cues for Stem Cell-Based Cartilage Tissue Engineering. *Cellular Physiology and Biochemistry* 35, 841–857. <https://doi.org/10.1159/000369742>
- Provot, S., Schipani, E., 2005. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Vertebrate Skeletal Biology* 328, 658–665. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.068>
- Rais, Y., Reich, A., Simsa-Maziel, S., Moshe, M., Idelevich, A., Kfir, T., Miosge, N., Monsonogo-Ornan, E., 2015. The growth plate's response to load is partially mediated by mechano-sensing via the chondrocytic primary cilium. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 597–615. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1690-4>

- Randall, R.M., Shao, Y.Y., Wang, L., Ballock, R.T., 2012. Activation of Wnt Planar cell polarity (PCP) signaling promotes growth plate column formation in vitro. *Journal of Orthopaedic Research* 30, 1906–1914. <https://doi.org/10.1002/jor.22152>
- Reno, P.L., Mcburney, D.L., Lovejoy, C.O., Horton Jr., W.E., 2006. Ossification of the mouse metatarsal: Differentiation and proliferation in the presence/absence of a defined growth plate. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 288A, 104–118. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20268>
- Rodriguez, E.K., Hoger, A., McCulloch, A.D., 1994. Stress-dependent finite growth in soft elastic tissues. *Journal of Biomechanics* 27, 455–467. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0021-9290(94)90021-3)
- Romereim, S.M., Conoan, N.H., Chen, B., Dudley, A.T., 2014. A dynamic cell adhesion surface regulates tissue architecture in growth plate cartilage. *Development* 141, 2085–2095. <https://doi.org/10.1242/dev.105452>
- Rubin, S., Agrawal, A., Seewald, A., Villoutreix, P., Baule, A., Zelzer, E., 2023. Bone elongation in the embryo occurs without column formation in the growth plate. <https://doi.org/10.1101/2023.11.14.567062>
- Rubin, S., Agrawal, A., Stegmaier, J., Krief, S., Felsenthal, N., Svorai, J., Addadi, Y., Villoutreix, P., Stern, T., Zelzer, E., 2021. Application of 3D MAPs pipeline identifies the morphological sequence chondrocytes undergo and the regulatory role of GDF5 in this process. *Nat Commun* 12, 5363. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25714-0>
- Sadeghian, S.M., Shapiro, F.D., Shefelbine, S.J., 2021. Computational model of endochondral ossification: Simulating growth of a long bone. *Bone* 153, 116132. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116132>
- Salhotra, A., Shah, H.N., Levi, B., Longaker, M.T., 2020. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21, 696–711. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00279-w>
- Sathi, G.A., Kenmizaki, K., Yamaguchi, S., Nagatsuka, H., Yoshida, Y., Matsugaki, A., Ishimoto, T., Imazato, S., Nakano, T., Matsumoto, T., 2015. Early Initiation of Endochondral Ossification of Mouse Femur Cultured in Hydrogel with Different Mechanical Stiffness. *Tissue Engineering Part C: Methods* 21, 567–575. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0475>
- Scoones, J.C., Hiscock, T.W., 2020. A dot-stripe Turing model of joint patterning in the tetrapod limb. *Development* 147, dev183699. <https://doi.org/10.1242/dev.183699>
- Sharir, A., Stern, T., Rot, C., Shahar, R., Zelzer, E., 2011. Muscle force regulates bone shaping for optimal load-bearing capacity during embryogenesis. *Development* 138, 3247–3259. <https://doi.org/10.1242/dev.063768>
- Shoji, T., Yasunaga, Y., Yamasaki, T., Izumi, S., Adachi, N., Ochi, M., 2016. Anterior Inferior Iliac Spine Bone Morphology in Hip Dysplasia and Its Effect on Hip Range of Motion in Total Hip Arthroplasty. *The Journal of Arthroplasty* 31, 2058–2063. <https://doi.org/10.1016/j.arth.2016.02.018>

- Shwartz, Y., Blitz, E., Zelzer, E., 2013. One load to rule them all: Mechanical control of the musculoskeletal system in development and aging. *Differentiation, Mechanotransduction* 86, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2013.07.003>
- Shwartz, Y., Farkas, Z., Stern, T., Aszódi, A., Zelzer, E., 2012. Muscle contraction controls skeletal morphogenesis through regulation of chondrocyte convergent extension. *Developmental Biology* 370, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.026>
- Song, B., Haycraft, C.J., Seo, H., Yoder, B.K., Serra, R., 2007. Development of the post-natal growth plate requires intraflagellar transport proteins. *Developmental Biology* 305, 202–216. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.003>
- Sorrentino, R., Carlson, K.J., Orr, C.M., Pietrobelli, A., Figus, C., Li, S., Conconi, M., Sancisi, N., Belvedere, C., Zhu, M., Fiorenza, L., Hublin, J.-J., Jashashvili, T., Novak, M., Patel, B.A., Prang, T.C., Williams, S.A., Saers, J.P.P., Stock, J.T., Ryan, T., Myerson, M., Leardini, A., DeSilva, J., Marchi, D., Belcastro, M.G., Benazzi, S., 2023. Morphological and evolutionary insights into the keystone element of the human foot's medial longitudinal arch. *Commun Biol* 6, 1061. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05431-8>
- Sotiriou, V., Ahmed, S., Nowlan, N.C., 2022. Prenatal murine skeletogenesis partially recovers from absent skeletal muscle as development progresses. <https://doi.org/10.1101/2022.01.01.473639>
- Sotiriou, V., Rolfe, R.A., Murphy, P., Nowlan, N.C., 2019. Effects of Abnormal Muscle Forces on Prenatal Joint Morphogenesis in Mice. *Journal of Orthopaedic Research* 37, 2287–2296. <https://doi.org/10.1002/jor.24415>
- Stern, T., Aviram, R., Rot, C., Galili, T., Sharir, A., Achrai, N.K., Keller, Y., Shahar, R., Zelzer, E., 2015. Isometric Scaling in Developing Long Bones Is Achieved by an Optimal Epiphyseal Growth Balance. *PLOS Biology* 13, e1002212. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002212>
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A.P., 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Development* 13, 2072–2086. <https://doi.org/10.1101/gad.13.16.2072>
- Studer, D., Millan, C., Oeztuerk, E., Maniura-Weber, K., Zenobi-Wong, M., 2012. Molecular and Biophysical Mechanisms Regulating Hypertrophic Differentiation in Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *Eur. Cells Mater.* 24, 118–135. <https://doi.org/10.22203/eCM.v024a09>
- Takahashi, I., Nuckolls, G.H., Takahashi, K., Tanaka, O., Semba, I., Dashner, R., Shum, L., Slavkin, H.C., 1998. Compressive force promotes Sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1 β expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *Journal of Cell Science* 111, 2067–2076. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.14.2067>
- Takeda, H., Kameo, Y., Inoue, Y., Adachi, T., 2020. An energy landscape approach to understanding variety and robustness in tissue morphogenesis. *Biomech Model Mechanobiol* 19, 471–479. <https://doi.org/10.1007/s10237-019-01222-5>

- Takeda, H., Kameo, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., Adachi, T., 2021. Cerebellar foliation via non-uniform cell accumulation caused by fiber-guided migration of granular cells. *JBSE* 16, 20-00516-20-00516. <https://doi.org/10.1299/jbse.20-00516>
- Tsubota, K., Suzuki, Y., Yamada, T., Hojo, M., Makinouchi, A., Adachi, T., 2009. Computer simulation of trabecular remodeling in human proximal femur using large-scale voxel FE models: Approach to understanding Wolff's law. *Journal of Biomechanics* 42, 1088–1094. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.02.030>
- Vaca-González, J.J., Moncayo-Donoso, M., Guevara, J.M., Hata, Y., Shefelbine, S.J., Garzón-Alvarado, D.A., 2018. Mechanobiological modeling of endochondral ossification: an experimental and computational analysis. *Biomech Model Mechanobiol* 17, 853–875. <https://doi.org/10.1007/s10237-017-0997-0>
- van Rietbergen, B., Weinans, H., Huiskes, R., Odgaard, A., 1995. A new method to determine trabecular bone elastic properties and loading using micromechanical finite-element models. *Journal of Biomechanics* 28, 69–81. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0021-9290(95)80008-5)
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., Tabin, C.J., 1996. Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. *Science* 273, 613–622. <https://doi.org/10.1126/science.273.5275.613>
- Wang, B., Vardon, P.J., Hicks, M.A., Chen, Z., 2016. Development of an implicit material point method for geotechnical applications. *Computers and Geotechnics* 71, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.compgeo.2015.08.008>
- Wang, J., Zhou, J., Bondy, C.A., 1999. Igf1 promotes longitudinal bone growth by insulin-like actions augmenting chondrocyte hypertrophy. *The FASEB Journal* 13, 1985–1990. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.14.1985>
- Wang, J., Zhou, J., Cheng, C., Kopchick, J., Bondy, C., 2004. Evidence supporting dual, IGF-I-independent and IGF-I-dependent, roles for GH in promoting longitudinal bone growth. *Journal of Endocrinology* 180, 247–255. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1800247>
- Wang, X., Mao, J.J., 2002. Chondrocyte Proliferation of the Cranial Base Cartilage upon in vivo Mechanical Stresses. *J Dent Res* 81, 701–705. <https://doi.org/10.1177/154405910208101009>
- Weiner, S., Traub, W., Wagner, H.D., 1999. Lamellar Bone: Structure–Function Relations. *Journal of Structural Biology* 126, 241–255. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4107>
- Wilsman, N.J., Farnum, C.E., Green, E.M., Lieferman, E.M., Clayton, M.K., 1996. Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. *Journal of Orthopaedic Research* 14, 562–572. <https://doi.org/10.1002/jor.1100140410>
- Wong, M., Carter, D.R., 1990. A theoretical model of endochondral ossification and bone architectural construction in long bone ontogeny. *Anat Embryol* 181, 523–532. <https://doi.org/10.1007/BF00174625>

- Wu, Q., Chen, Q., 2000. Mechanoregulation of Chondrocyte Proliferation, Maturation, and Hypertrophy: Ion-Channel Dependent Transduction of Matrix Deformation Signals. *Experimental Cell Research* 256, 383–391. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4847>
- Wu, Q., Zhang, Y., Chen, Q., 2001. Indian hedgehog Is an Essential Component of Mechanotransduction Complex to Stimulate Chondrocyte Proliferation *. *Journal of Biological Chemistry* 276, 35290–35296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101055200>
- Wuelling, M., Kaiser, F.J., Buelens, L.A., Braunholz, D., Shivdasani, R.A., Depping, R., Vortkamp, A., 2009. Trps1, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of Gli3. *Developmental Biology* 328, 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.01.012>
- Xie, M., Chagin, A.S., 2021. The epiphyseal secondary ossification center: Evolution, development and function. *Bone* 142, 115701. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115701>
- Yamaguchi, Y., Moriguchi, S., Terada, K., 2021. Extended B-spline-based implicit material point method. *Int J Numer Methods Eng* 122, 1746–1769. <https://doi.org/10.1002/nme.6598>
- Yokoyama, Y., Kameo, Y., Kamioka, H., Adachi, T., 2021. High-resolution image-based simulation reveals membrane strain concentration on osteocyte processes caused by tethering elements. *Biomech Model Mechanobiol* 20, 2353–2360. <https://doi.org/10.1007/s10237-021-01511-y>
- Zelzer, E., Mamluk, R., Ferrara, N., Johnson, R.S., Schipani, E., Olsen, B.R., 2004. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 131, 2161–2171. <https://doi.org/10.1242/dev.01053>
- Zelzer, E., McLean, W., Ng, Y.-S., Fukai, N., Reginato, A.M., Lovejoy, S., D’Amore, P.A., Olsen, B.R., 2002. Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 129, 1893–1904. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1893>
- Zhang, Y.-T., Alber, M.S., Newman, S.A., 2013. Mathematical modeling of vertebrate limb development. *Mathematical Biosciences* 243, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2012.11.003>
- Zhang, Z., Pan, Y., Wang, J., Zhang, H., Chen, Z., Zheng, Y., Ye, H., 2021. A total-Lagrangian material point method for coupled growth and massive deformation of incompressible soft materials. *Numerical Meth Engineering* 122, 6180–6202. <https://doi.org/10.1002/nme.6787>
- Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., de Crombrughe, B., 1997. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Developmental Dynamics* 209, 377–386. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199708\)209:4<377::AID-AJA5>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199708)209:4<377::AID-AJA5>3.0.CO;2-F)
- Zheng, Q., Li, X., Xiao, L., Shao, S., Jiang, H., Zhang, X., Sun, L., Xu, H., 2019. MicroRNA-365 functions as a mechanosensitive microRNA to inhibit end plate chondrocyte degeneration by targeting histone deacetylase 4. *Bone* 128, 115052.

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115052>

Zhu, J., Zhang, Y.-T., Alber, M.S., Newman, S.A., 2010. Bare Bones Pattern Formation: A Core Regulatory Network in Varying Geometries Reproduces Major Features of Vertebrate Limb Development and Evolution. PLoS ONE 5, e10892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010892>

第 2 章

細胞成長および増殖の 連続体ベース粒子モデル構築

本章では、骨形態形成シミュレーションの基礎となる細胞活動の連続体ベース粒子モデルを構築する。ここで、material point method (MPM)を拡張し、細胞の成長、および、増殖をモデル化することにより、個々の細胞活動を、多細胞からなる組織全体の力学的ふるまいに結び付ける、組織形態形成シミュレーションを可能とする。また、モデルの有用性を示すため、細胞増殖における体積チェックポイントの効果をモデルに導入し、組織全体の力学的ふるまいに対するチェックポイントの影響を評価する。

2.1 緒 言

生物の発生段階において、生体組織の形や構造が形成される過程を組織形態形成という。組織形態形成は、組織を構成する細胞の増殖、肥大化、アポトーシス、収縮などの活動にともない生じる力により駆動される(Green et al., 2015; Heer and Martin, 2017; Matejčić and Trepac, 2022; Trubuil et al., 2021)。形態形成過程の細胞活動が、力学的、および、生化学的環境の影響を受け、組織内部で時空間的に不均一となることにより、生体組織は多様かつ特徴的な形態を獲得する(Chanet et al., 2017; Felsenthal and Zelzer, 2017; Green et al., 2015; Heer and Martin, 2017; Shwartz et al., 2012)。マクロな組織の力学的ふるまいがミクロな細胞活動により制御される組織形態形成のメカニズムは、その多階層性と複雑さのために、*in*

vivo/in vitro 実験により理解することが困難であった。

組織形態形成のメカニズムを調べるうえで、数理モデリングと計算機シミュレーションは有効な手段となりうる (Montes-Olivas et al., 2019; Osborne et al., 2017). バーテックスモデルや subcellular モデル, cellular Potts モデルなどの離散系モデルは、細胞の活動を一細胞単位で解析するために広く用いられている (Alt et al., 2017; Jamali et al., 2010; Voss-Böhme, 2012). これらのモデルでは、ミクロな細胞活動を効果的に表現できる一方で、組織レベルの構成則が定められていないため、実験的に測定される組織の物性に基づき組織全体の力学的ふるまいを定量的に評価することは困難である。それに対し、連続体力学に基づくモデリングでは、組織全体を構成則に従う連続体とみなすことにより、組織の力学的ふるまいを効果的に評価できる (Conte et al., 2008; Takeda et al., 2019; Vaca-González et al., 2018). しかしながら、連続体力学に基づく解析に広く用いられる有限要素法においては、組織を離散化する有限要素メッシュに課せられる幾何的制約のため、時空間的に変化する細胞活動を一細胞単位で評価することが困難である。したがって、個々の細胞活動にともなう組織全体の力学的ふるまいを解析するためには、それらをつなぐ多階層モデルを用いた新たなアプローチが必要不可欠である。

個々の細胞活動と組織全体の力学的ふるまいをつなぐ多階層組織形態形成解析を行うためには、material point method (MPM)を応用することが有効だと考えられる (Bardenhagen and Kober, 2004; Charlton et al., 2017; Pan et al., 2021; Stomakhin et al., 2013; Yamaguchi et al., 2021). 主に土木工学やコンピュータグラフィックスの分野で用いられる MPM は、ラグランジュ法とオイラー法の組み合わせにより双方の利点を活かすハイブリッド手法である。MPM では、解析対象をラグランジュ粒子により離散化する一方で、連続体力学における平衡方程式に従う変位場を、背景オイラーグリッド点を用いて計算する。離散的なラグランジュ粒子を、一細胞を代表する点とみなし、細胞活動を粒子の挙動としてモデル化することにより、個々の細胞活動を組織全体の力学的ふるまいと結びつけることができると考えられる。

本章では、個々の細胞活動を組織全体の力学的ふるまいに結び付け、多細胞組織の形態形成を解析するため、MPM を拡張し、形態形成過程における細胞活動

の連続体ベース粒子モデルを構築することを目的とした。組織形態形成を駆動する細胞活動として、細胞の成長と増殖をモデル化した。提案したモデルの妥当性を示すため、力学的拘束条件に応じた組織形態形成をシミュレーションした。さらに、本モデルの有用性を示すため、細胞増殖モデルに体積チェックポイント (Liu et al., 2018; Xie and Skotheim, 2020)の効果を導入し、力学状態に応じた細胞活動の変化が組織全体の力学的ふるまいに及ぼす影響を評価した。

2.2 手 法

2.2.1 Material point method

連続体としてモデル化した多細胞組織の基準配置を Ω^0 ，現在配置を Ω とする．現在配置における組織の境界 $\partial\Omega$ は Neumann 境界 $\partial\Omega_\sigma$ と Dirichlet 境界 $\partial\Omega_u$ に $\partial\Omega = \partial\Omega_\sigma \cup \partial\Omega_u$ を満たすよう排他的に分割される． \mathbf{t} を表面力ベクトル， \mathbf{u} を変位ベクトル， $\boldsymbol{\sigma}$ を Cauchy の応力テンソル， \mathbf{n} を表面の外向き法線ベクトルとし， $\partial\Omega_\sigma$ における所与の表面力ベクトル $\bar{\mathbf{t}}$ を $\mathbf{t} = \boldsymbol{\sigma}\mathbf{n} = \bar{\mathbf{t}}$ on $\partial\Omega_\sigma$ ， $\partial\Omega_u$ における所与の変位ベクトル $\bar{\mathbf{u}}$ を $\mathbf{u} = \bar{\mathbf{u}}$ on $\partial\Omega_u$ と与えた．体積力ベクトル \mathbf{b} は現在配置 Ω にわたり作用すると仮定した．本研究では，細胞の成長と増殖による組織成長は準静的過程であると仮定した．このとき，仮想仕事の原理式は，仮想変位ベクトルを $\delta\mathbf{u}$ ，Euler–Almansi ひずみテンソルの一次変分を $\delta\mathbf{e}$ ，現在配置における無限小体積要素を dv ，無限小表面要素を ds として

$$\int_{\Omega} \boldsymbol{\sigma} : \delta\mathbf{e} dv = \int_{\partial\Omega_\sigma} \bar{\mathbf{t}} \cdot \delta\mathbf{u} ds + \int_{\Omega} \mathbf{b} \cdot \delta\mathbf{u} dv \quad (2.1)$$

と表される．

形態形成過程の個々の細胞活動にともなう組織全体の力学的ふるまいを解析するため，MPM を拡張した(Bardenhagen and Kober, 2004)．MPM では，連続体としてモデル化された多細胞組織とその境界は，物質粒子と境界粒子によりそれぞれ表現される(Fig. 2.1a)．物質粒子 p は位置ベクトル \mathbf{x}_p ，変形勾配テンソル \mathbf{F}_p ，体積 V_p をもつ．境界粒子 pb は位置ベクトル \mathbf{x}_{pb} ，変形勾配テンソル \mathbf{F}_{pb} ，面積 a_{pb} をもつ．これらの粒子を用いて，式(2.1)の各項は

$$\int_{\Omega} \boldsymbol{\sigma} : \delta\mathbf{e} dv \approx \sum_{p \text{ in } \Omega} \boldsymbol{\sigma}_p : \delta\mathbf{e}(\mathbf{x}_p) V_p \quad (2.2)$$

$$\int_{\partial\Omega_\sigma} \bar{\mathbf{t}} \cdot \delta\mathbf{u} ds \approx \sum_{pb \text{ on } \partial\Omega_\sigma} \bar{\mathbf{t}}_{pb} \cdot \delta\mathbf{u}(\mathbf{x}_{pb}) a_{pb} \quad (2.3)$$

$$\int_{\Omega} \mathbf{b} \cdot \delta\mathbf{u} dv \approx \sum_{p \text{ in } \Omega} \mathbf{b}_p \cdot \delta\mathbf{u}(\mathbf{x}_p) V_p \quad (2.4)$$

と離散化される．ここで，下付き添え字 p と pb はそれぞれ物質粒子 p ，および，境界粒子 pb の変数に付記される．本章では，細胞の成長と分裂を明示的に表現するため，一つの物質粒子が一細胞を代表する点であると仮定した．

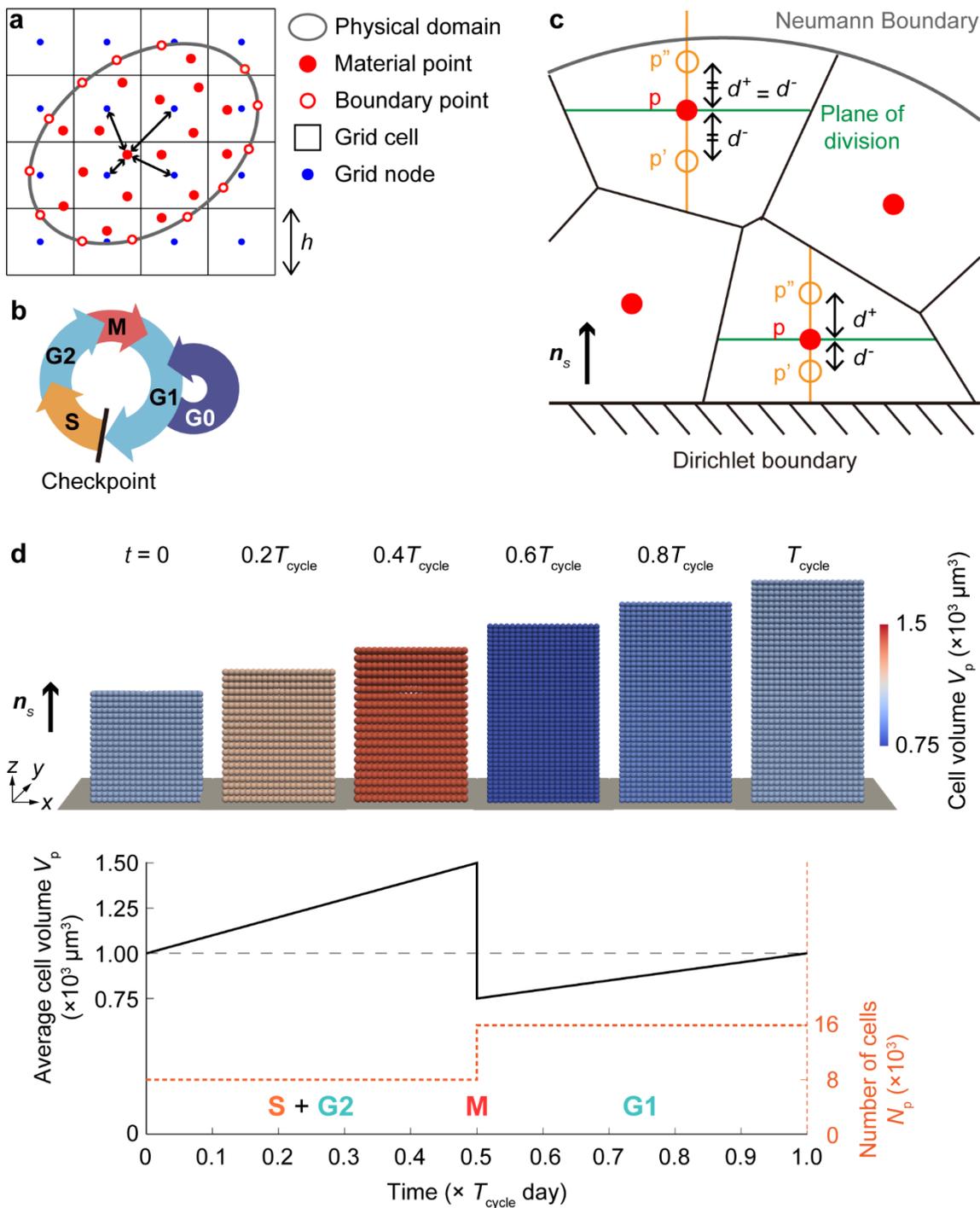


Figure 2.1 Concept of the material point method (MPM) and the cell proliferation model. **(a)** The physical domain and its boundary in the MPM. **(b)** A cell cycle composed of S (DNA replication), G2, M (mitosis), G1, and G0 (quiescence) phases. **(c)** Placement of points after the division in the cell proliferation model. **(d)** Implementation of the cell proliferation model. Change in the average cell volume V_p and number of cells N_p according to the cell proliferation are graphed.

位置 \mathbf{x} における変位場 $\mathbf{u}(\mathbf{x})$ は、オイラーグリッド点により

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}) \approx \sum_{\mathbf{g}} \mathbf{u}_{\mathbf{g}} N_{\mathbf{g}}(\mathbf{x}) \quad (2.5)$$

と離散化される．ここで、 $\mathbf{u}_{\mathbf{g}}$ はグリッド点 \mathbf{g} における変位ベクトル、 $N_{\mathbf{g}}(\mathbf{x})$ はグリッド点 \mathbf{g} の内挿関数である．数値的不安定性を軽減するため、内挿関数 $N_{\mathbf{g}}(\mathbf{x})$ として、グリッド間隔 h の正方グリッド上で定義される quadratic extended B-splines (EBS) (Yamaguchi et al., 2021) を用いた．EBS を定める際のグリッド点の分類に関する詳細を付録 A.2 に記す．また、変位 \mathbf{u} に Dirichlet 境界条件 ($\mathbf{u} = \bar{\mathbf{u}}$ on $\partial\Omega_u$) を適用するため、Nitsche 法を用いた (Yamaguchi et al., 2021)．Nitsche 法のペナルティ項に用いられるペナルティパラメーター β を、 E をヤング率として $\beta = 1.0 \times 10^3 E/h$ と定めた．

個々の細胞活動に応じた組織全体の力学的ふるまいを、離散的な時間ステップ Δt ごとに計算した．仮想仕事の原理式(2.1)は、Newton–Raphson 法を用いて、時間 t における物質粒子と境界粒子の状態変数に基づき、グリッド点の変位 $\mathbf{u}_{\mathbf{g}}$ について計算された．計算された変位に基づき、時間 $t + \Delta t$ における物質粒子 p の位置 \mathbf{x}_p 、変形勾配 \mathbf{F}_p 、体積 V_p を

$$\mathbf{x}_p^{t+\Delta t} = \mathbf{x}_p^t + \sum_{\mathbf{g}} \mathbf{u}_{\mathbf{g}} N_{\mathbf{g}}(\mathbf{x}_p^t) \quad (2.6)$$

$$\mathbf{F}_p^{t+\Delta t} = \left(\mathbf{I} + \sum_{\mathbf{g}} \mathbf{u}_{\mathbf{g}} \otimes \frac{\partial N_{\mathbf{g}}(\mathbf{x}_p^t)}{\partial \mathbf{x}} \right) \mathbf{F}_p^t \quad (2.7)$$

$$V_p^{t+\Delta t} = \det \mathbf{F}_p^{t+\Delta t} V_p^0 \quad (2.8)$$

に従い計算した. また, 時間 $t + \Delta t$ における境界粒子 pb の位置 \mathbf{x}_{pb} , 変形勾配 \mathbf{F}_{pb} , 面積 \mathbf{a}_{pb} を

$$\mathbf{x}_{\text{pb}}^{t+\Delta t} = \mathbf{x}_{\text{pb}}^t + \sum_{\mathbf{g}} \mathbf{u}_{\mathbf{g}} N_{\mathbf{g}}(\mathbf{x}_{\text{pb}}^t) \quad (2.9)$$

$$\mathbf{F}_{\text{pb}}^{t+\Delta t} = \left(\mathbf{I} + \sum_{\mathbf{g}} \mathbf{u}_{\mathbf{g}} \otimes \frac{\partial N_{\mathbf{g}}(\mathbf{x}_{\text{pb}}^t)}{\partial \mathbf{x}} \right) \mathbf{F}_{\text{pb}}^t \quad (2.10)$$

$$\mathbf{a}_{\text{pb}}^{t+\Delta t} \mathbf{n}_{\text{pb}}^{t+\Delta t} = \det \mathbf{F}_{\text{pb}}^{t+\Delta t} (\mathbf{F}_{\text{pb}}^{t+\Delta t})^{-T} \mathbf{a}_{\text{pb}}^0 \mathbf{n}_{\text{pb}}^0 \quad (2.11)$$

に従い計算した. ここで, 上付き添字 $t, t + \Delta t$ はそれぞれ時間 $t, t + \Delta t$ における変数に付記される. また, \mathbf{I} は二階の恒等テンソルであり, V_{p}^0 , \mathbf{a}_{pb}^0 , \mathbf{n}_{pb}^0 は基準配置における体積, 面積, 単位法線ベクトルを表す.

2.2.2 細胞成長の連続体ベース粒子モデル

組織形態形成における細胞成長を表現するため, 有限成長モデルに基づき, MPM に適用可能な細胞成長モデルを構築した(Himpel, G., Kuhl, E., Menzel, A., & Steinmann, 2005; Takeda et al., 2019). 本研究では, 物質粒子 p における変形勾配テンソル \mathbf{F}_{p} を, その弾性変形成分 $\mathbf{F}_{\text{p}}^{\text{e}}$ と成長成分 $\mathbf{F}_{\text{p}}^{\text{g}}$ に

$$\mathbf{F}_{\text{p}} = \mathbf{F}_{\text{p}}^{\text{e}} \mathbf{F}_{\text{p}}^{\text{g}} \quad (2.12)$$

と乗算分解した. 組織を構成する細胞の等方成長は, 当該細胞に相当する物質粒子 p の変形勾配テンソルの成長成分 $\mathbf{F}_{\text{p}}^{\text{g}}$ を

$$\mathbf{F}_{\text{p}}^{\text{g}} = \theta \mathbf{I} \quad (2.13)$$

と設定することにより与えられた. ここで, θ は成長のストレッチである.

生体組織を圧縮性 neo-Hookean モデルに従う超弾性体とモデル化した(Chagnon et al., 2015; Himpel, G., Kuhl, E., Menzel, A., & Steinmann, 2005). このとき, ひずみエネルギー密度関数 Ψ は

$$\Psi = \frac{\lambda}{8} \ln^2 I_3 + \frac{\mu}{2} (I_1 - 3 - \ln I_3) \quad (2.14)$$

と表される. この構成式において, μ と λ はラメの定数, I_1 , および, I_3 はそれぞれ, 変形勾配テンソルの弾性変形成分から計算される Cauchy–Green テンソル $\mathbf{C}_p^e = \mathbf{F}_p^{eT} \mathbf{F}_p^e$ の第一, および, 第三不変量である. 式(2.13)における成長のストレッチ θ を増加させることにより, 物質粒子の体積成長を表現した.

2.2.3 細胞増殖の連続体ベース粒子モデル

形態形成過程における細胞増殖を表現するため, 物質粒子の一方向成長と分割を組み合わせるにより, MPM に適用可能な細胞増殖モデルを構築した. 増殖細胞の状態は, S (DNA 複製), G2, M (分裂), G1, および, G0 (静止) 期に分類される(Fig. 2.1b). 物質粒子 p により代表される細胞が分裂する際の分裂面の単位法線ベクトルを $\pm \mathbf{n}_s$ とした(Fig. 2.1c). 物質粒子 p の変形勾配テンソルの成長成分 \mathbf{F}_p^g を

$$\mathbf{F}_p^g = (\mathbf{I} + (\theta - 1) \mathbf{n}_s \otimes \mathbf{n}_s) \mathbf{F}_{p,\text{pre}}^g \quad (2.15)$$

と表し, S, G2, M, および, G1 期の合計長さ T_{cycle} にわたり, 成長のストレッチ θ を 1.0 から 2.0 へと一定の速度で増加させることにより, 細胞は時間 T_{cycle} にわたり連続的に一方向に成長するとモデル化した. ここで, $\mathbf{F}_{p,\text{pre}}^g$ は S 期開始時点における変形勾配テンソルの成長成分である.

M 期における細胞分裂を, S 期開始から $T_{\text{cycle}}/2$ の時点において, 物質粒子 p を二つの物質粒子 p' および p'' に分割することによりモデル化した(Fig. 2.1d). このとき, 分割後の二つの物質粒子の位置, 変形勾配テンソル, および, 体積を,

$$\mathbf{x}_{p'} = \mathbf{x}_p - d^- \mathbf{n}_s, \quad \mathbf{x}_{p''} = \mathbf{x}_p + d^+ \mathbf{n}_s \quad (2.16)$$

$$\mathbf{F}_{p'} = \mathbf{F}_p, \quad \mathbf{F}_{p''} = \mathbf{F}_p \quad (2.17)$$

$$V_{p'} = \frac{1}{2} V_p, \quad V_{p''} = \frac{1}{2} V_p \quad (2.18)$$

と定めた. ここで, d^- , および, d^+ は分割前の物質粒子から分割後の二つの物質粒子までの距離を表す(Fig. 2.1c). この距離を決定するため, 全ての物質粒子を母点とする三次元 Voronoi 図が細胞形態を表現するものと仮定した. この Voronoi 図において, 分割後の物質粒子 p' および p'' が, 分割前の物質粒子 p と, そこから $-\mathbf{n}_s$, および, $+\mathbf{n}_s$ 方向にある Voronoi もしくは Dirichlet 境界との中点に位置するよう, d^- , および, d^+ を定めた(Fig. 2.1c). 物質粒子の $-\mathbf{n}_s$ 方向と $+\mathbf{n}_s$ 方向のどちらかに Voronoi 境界も Dirichlet 境界も存在しない場合, その方向における分割後の物質粒子の位置を, 分割前の物質粒子から分割後のもう一方の物質粒子までの距離を利用し,

$$d^+ = d^- \quad (2.19)$$

を満たすよう設定した. 物質粒子の $-\mathbf{n}_s$ 方向と $+\mathbf{n}_s$ 方向のどちらにも, Voronoi 境界も Dirichlet 境界も存在しない場合, 物質粒子のもつ代表長さを $\sqrt[3]{V_p}$ と仮定することにより,

$$d^+ = \frac{1}{4}\sqrt[3]{V_p}, \quad d^- = \frac{1}{4}\sqrt[3]{V_p} \quad (2.20)$$

にしたがい分割後の物質粒子の位置を設定した.

一細胞周期の後, 細胞は次の細胞周期の開始まで, 静止期である G0 期にとどまる. G0 期の長さは, 母数 λ の指数分布に従うと仮定した.

底面において面外変位を拘束した立方体組織における細胞増殖シミュレーションの例を Fig. 2.1d に示す. ここでは, \mathbf{n}_s を z 方向の単位ベクトルとし, 組織を構成する全ての細胞を一斉に一方向に分裂させた. このとき, 組織を構成する細胞数 N_p は正確に二倍になり, 一細胞周期後($t = T_{\text{cycle}}$)の各細胞の体積 V_p は初期($t = 0$)の体積と同一であった.

本研究では, 軟骨細胞の物性値(Luo et al., 2016; Trickey et al., 2006)と同一のオーダーとなるよう, 組織のヤング率を $E = 1.0$ kPa, ポアソン比を $\nu = 0.4$ と設定した. 細胞周期の長さ T_{cycle} は 1.0 day とした.

2.3 結果

2.3.1 グリッド間隔依存性の検討

MPMにおいて、仮想仕事の原理式(2.1)はグリッド点の変位について計算される。したがって、計算の精度は主にグリッド間隔 h に依存し、 h が小さいほど精度は向上する。同一の h を使用する場合には、グリッド間隔あたりの物質粒子数 $N_{p/h}$ が大きいほど、解析の精度が向上する(Yamaguchi et al., 2021)。さらに、 $N_{p/h}$ が小さすぎる場合には解析が破綻することが知られている。したがって、先行研究においては、 $N_{p/h} = 5-10$ が用いられてきた(Yamaguchi et al., 2021)。

本章では、物質粒子の代表長さ L_p に相当する、初期状態における物質粒子間隔を、細胞の直径と同程度のオーダーとなるよう $L_p = 10 \mu\text{m}$ と定めた。本項では、この条件のもと、多細胞組織の大変形シミュレーションを行うことで、解析結果のグリッド間隔 h への依存性を評価した。ここで、多細胞組織の初期形状を、格子状に配置された 6.6×10^4 個の物質粒子からなり、 2.6×10^3 個の境界粒子により覆われた直径 $500 \mu\text{m}$ の球とした。組織は、その下半球の表面を固定された条件下で、式(2.13)に示された成長のストレッチ θ の増大にともない等方的に成長した。グリッド間隔 h を $33 \mu\text{m}$ ($N_{p/h} = 3.3$), $50 \mu\text{m}$ ($N_{p/h} = 5.0$), $75 \mu\text{m}$ ($N_{p/h} = 7.5$), および、 $100 \mu\text{m}$ ($N_{p/h} = 10$)に設定し、 $\theta = 1.4$ の時点で組織全体の形状を評価した(Figs. 2.2a–d)。比較のため、物質粒子の代表長さ L_p を $5.0 \mu\text{m}$, グリッド間隔 h を $25 \mu\text{m}$ ($N_{p/h} = 5.0$)とした高精度シミュレーションの結果を Fig. 2.2e に示す。このシミュレーションにおいて、組織は 5.2×10^5 個の物質粒子からなり、 2.6×10^3 個の境界粒子により覆われていた。高精度シミュレーションの結果、拘束されていない組織の上半球は、成長後、ほぼ均一な曲率の半球形状を示した(Fig. 2.2e)。

基本的な $L_p = 10 \mu\text{m}$ に基づくシミュレーション結果(Figs. 2.2a–d)と $L_p = 5.0 \mu\text{m}$ に基づく高精度シミュレーション(Fig. 2.2e)の結果を比較することにより、グリッド間隔 $h = 33 \mu\text{m}$, および、 $50 \mu\text{m}$ を用いた結果が十分な精度を有すると判断した(Figs. 2.2f, g)。グリッド間隔 $h = 75 \mu\text{m}$ や $100 \mu\text{m}$ の場合には、 $N_{p/h}$

は 5–10 の範囲にあるものの、組織形態はいびつになり、精度が不十分であると判断した(Figs. 2.2c, d). したがって、本研究における以下の全てのシミュレーションでは、グリッド間隔 $h = 50 \mu\text{m}$ ($N_{p/h} = 5.0$)を用いた.

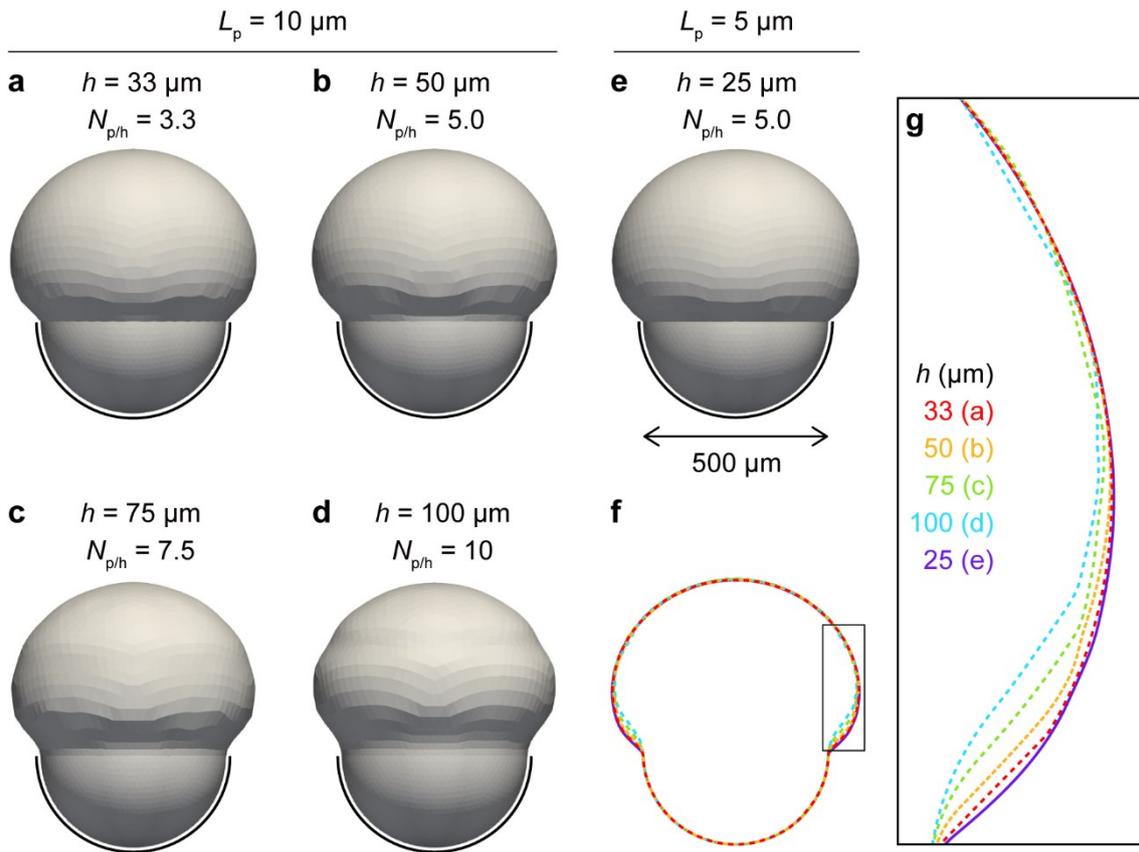


Figure 2.2 Dependency of tissue shapes on the grid spacing h . (a–e) Outer shapes of growing tissues at $\theta = 1.4$ with grid spacings of (a) 33, (b) 50, (c) 75, (d) 100, and (e) 25 μm . The representative length of material points L_p is 10 μm for (a–d) and 5 μm for (e). (f) Outline of the tissues. (g) Magnified image of the boxed area on (f).

2.3.2 細胞成長・増殖モデルの検証

前節で構築した細胞成長および増殖のモデルを検証するため，立方体組織内の細胞の肥大化(Fig. 2.3)，および，増殖(Fig. 2.4)をシミュレーションした．多細胞組織の初期形状を，格子状に配置された 8.0×10^3 個の物質粒子からなり， 2.9×10^3 個の境界粒子により覆われた一辺 $200 \mu\text{m}$ の立方体とし，その底面における面外変位を拘束した．まず，細胞成長モデルに基づき，式(2.13)に示された成長のストレッチ θ を徐々に増大させることにより組織を等方成長させた，細胞肥大シミュレーションの結果を Fig. 2.3 に示す．解析により，細胞体積 V_p の一様な増大，および，それにともなう組織全体の等方成長が観察された．本シミュレーションにおいて，成長後の組織内部の残留応力は無視できる程度に小さく，底面以外の組織表面における自由境界条件が適切に設定されていることが確認された．

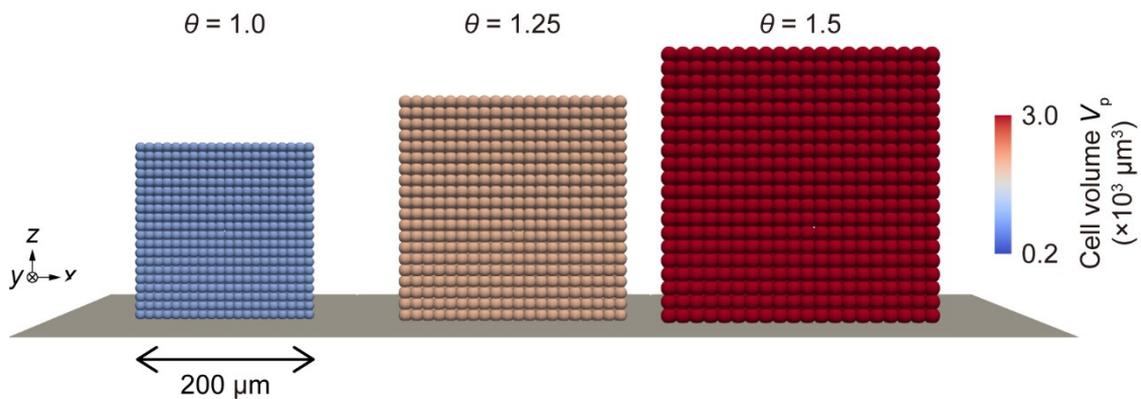


Figure 2.3 Change in the cell volume V_p in the growing tissue because of uniform cell hypertrophy.

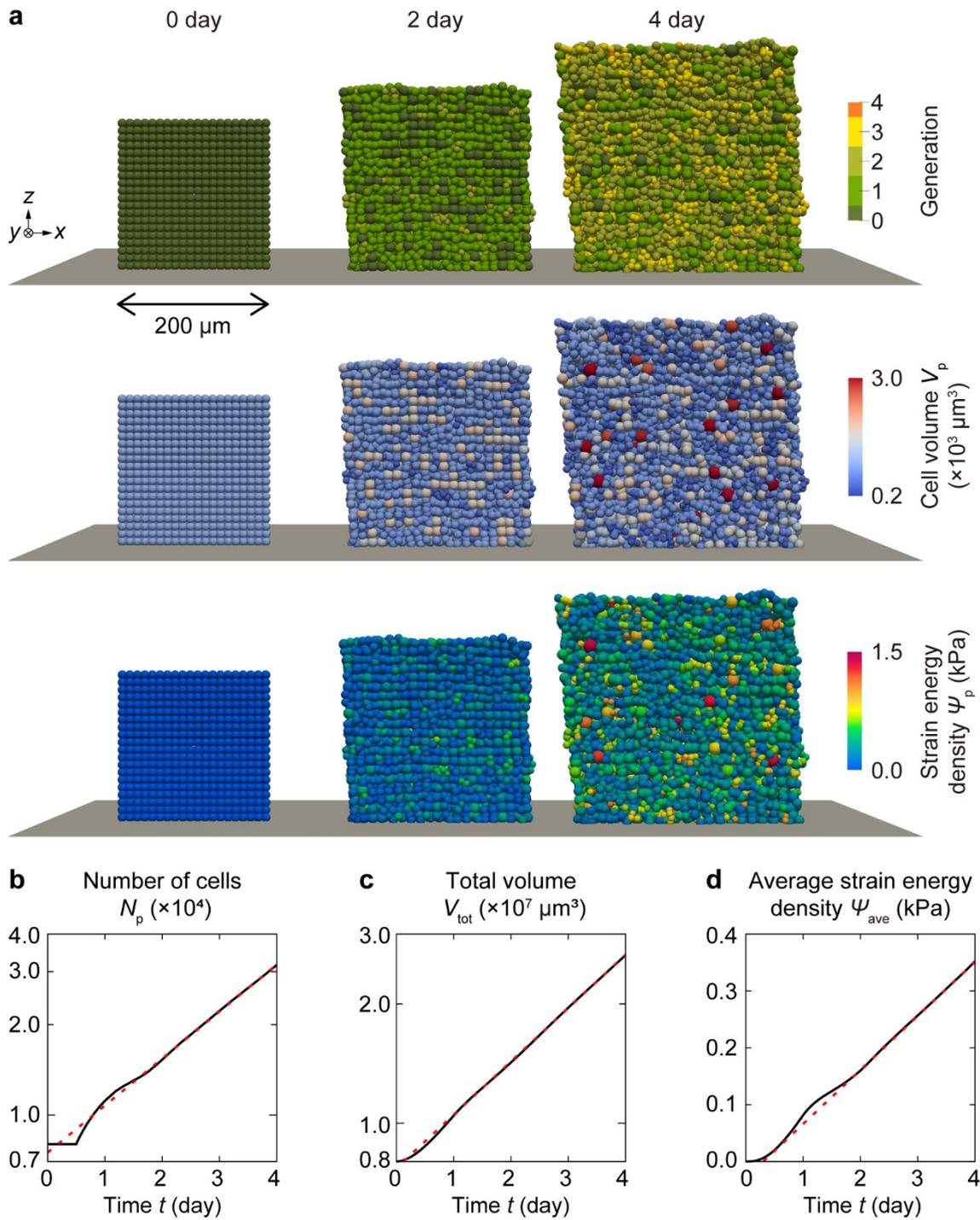


Figure 2.4 Cell proliferation simulation. **(a)** Change in the generation, volume V_p , and strain energy density Ψ_p of cells in growing tissue caused by random proliferation. **(b)** Change in the number of cells N_p , **(c)** total volume V_{tot} , and **(d)** average strain energy density Ψ_{ave} of the growing tissue caused by random proliferation. Dotted orange lines

are exponential approximations $N_p = 7500e^{0.36t}$ in (b), $V_{\text{tot}} = 7.7 \times 10^6 e^{0.31t}$ (μm^3) in (c) and a linear approximation $\Psi_{\text{ave}} = 0.095t - 0.029$ (kPa) in (d), fitted for $2.0 \leq t \leq 4.0$.

次に、組織内の個々の細胞がランダムな分裂面をもち、ランダムなタイミングで分裂する細胞増殖シミュレーションの結果を Fig. 2.4a に示す。細胞増殖のランダムさに起因して、細胞の世代(Fig. 2.4a 上段)、および、体積 V_p (Fig. 2.4a 中段) が一細胞単位で不均一となり、また、ひずみエネルギー密度 Ψ_p の集中が散発的に生じた(Fig. 2.4a 下段)。このランダムな増殖において、組織を構成する細胞数 N_p 、および、組織の総体積 V_{tot} は指数関数的に増大し(Figs. 2.4b, c)、組織全体にわたり空間平均したひずみエネルギー密度 Ψ_{ave} は線形的に増大した(Fig. 2.4d)。これらの組織全体の力学的なふるまいは、分裂面と分裂のタイミングのランダムな選び方によらず共通していた(data not shown)。以上のように、本研究で構築したモデルに基づき、細胞の肥大化、および、増殖を表現し、組織全体の力学的なふるまいを解析することが可能となった。

2.3.3 多細胞組織の形態形成シミュレーション

生体内において、形態形成過程の組織は周囲の組織から力学的拘束を受ける。例えば、多細胞からなる形態形成過程の骨組織は、部分的に、石灰化した骨性骨膜襻に取り囲まれながら成長する(Kronenberg, 2003)。このような状況を考慮し、第 2.3.1 項のシミュレーションと同様の力学的拘束条件のもとで、細胞増殖シミュレーションを行った。ここで、多細胞組織の初期形状を、格子状に配置された 6.6×10^4 個の物質粒子からなり、 2.6×10^3 個の境界粒子により覆われた直径 $500 \mu\text{m}$ の球とした。組織内の細胞は、ランダムな分裂面をもち、ランダムなタイミングで分裂した。組織の下半球の表面を固定した条件下での細胞増殖シミュレーションの結果を Fig. 2.5 に示す。拘束条件の影響により、比較的大きな体積 V_p をもつ細胞は組織の上半球でのみ観察された(red cells in Fig. 2.5)。

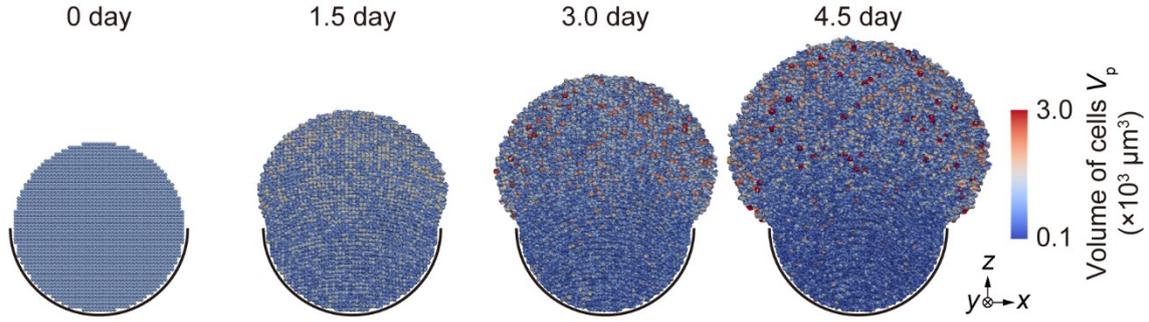


Figure 2.5 Change in cell volume V_p in the growing tissue caused by random proliferation under a constraint condition.

細胞活動の条件に応じた組織全体の力学的ふるまいを解析する本モデルの有用性を示すため、細胞体積チェックポイント(Liu et al., 2018; Xie and Skotheim, 2020)の効果を経細胞増殖モデルに導入した。細胞の体積は、細胞分裂のタイミングを制御することにより組織内で調節されることが知られている(Lloyd, 2013)。この現象を司るメカニズムの詳細に関しては未だ議論の余地があるが、いくつかの実験的証拠により、細胞が S 期に移行するためには十分大きな体積を有する必要があるという、細胞体積チェックポイントとよばれるメカニズムの存在が示唆されている(Fig. 2.1b) (Liu et al., 2018; Xie and Skotheim, 2020)。組織形態形成におけるこのチェックポイントの影響を評価するため、細胞増殖モデルにおいて、物質粒子 p の初期細胞体積に対する体積比 $J_p^e = \det \mathbf{F}_p^e$ が閾値 J_{th}^e 以下の場合 ($J_p^e \leq J_{th}^e$)、当該細胞は S 期に移行することができず、 J_p^e が J_{th}^e を超えるまで静止状態に留まると仮定した。

このモデル化に基づき、Fig. 2.5 と同様の力学条件のもと、 $J_{th}^e = 0.9$ のチェックポイントを導入し細胞増殖シミュレーションを行った(Fig. 2.6a)。組織全体の力学的ふるまいに対するチェックポイントの効果を経強調するため、Fig. 2.5 と同一の、チェックポイントを考慮しない場合のランダムな細胞増殖シミュレーションの結果を Fig. 2.6b に、等方的な細胞肥大シミュレーションの結果を Fig. 2.6c に併せて示す。予想されたように、チェックポイントの影響により、拘束のない組織の上半球においては細胞が活発に増殖した一方、力学的に拘束された

組織の下半球においては細胞増殖が抑制されたことが、細胞の世代の分布から明らかとなった(Fig. 2.6a 上段). 対照的に、チェックポイントのない細胞においては、組織全体でおよそ一様に細胞増殖が進行した(Fig. 2.6b 上段). このような細胞活動の違いにより、チェックポイントのない場合には、特に組織の下半球において一細胞単位でひずみエネルギー密度の蓄積が観察された(Fig. 2.6b 中段)一方、チェックポイントがある場合には、ひずみエネルギー密度の蓄積が抑制されることが明らかとなった(Fig. 2.6a 中段). 肥大細胞(Fig. 2.6c)においては、組織の下半球においてゆるやかなひずみエネルギーの蓄積が観察された(Fig. 2.6c 中段). 結果として、組織を構成する細胞数が増殖により初期細胞数の 1.5^3 倍である $N_p \sim 2.2 \times 10^5$ に達した時点で、それぞれの組織はチェックポイントの影響により異なる外形状を有していた(Figs. 2.6a, b 下段).

これらの傾向は Figs. 2.6d–f において定量的に評価された. チェックポイントの体積閾値 J_{th}^e が大きいほど、細胞数の増加速度は遅かった(Fig. 2.6d). 細胞増殖の結果、組織を構成する細胞数が同一となった時点の組織同士を比較すると、チェックポイントの体積閾値 J_{th}^e が大きいほど、組織全体の体積は大きく (Fig. 2.6e), 平均ひずみエネルギー密度は小さかった(Fig. 2.6f). さらに、本モデルにより、細胞の位置や力学状態の経時変化を追跡することが可能となった(Figs. 2.7a–c). 以上の結果より、本章で構築したモデルが、形態形成過程を通じて、力学状態に応じた細胞活動にともなう多細胞組織全体の力学的ふるまいを解析可能であることが示された.

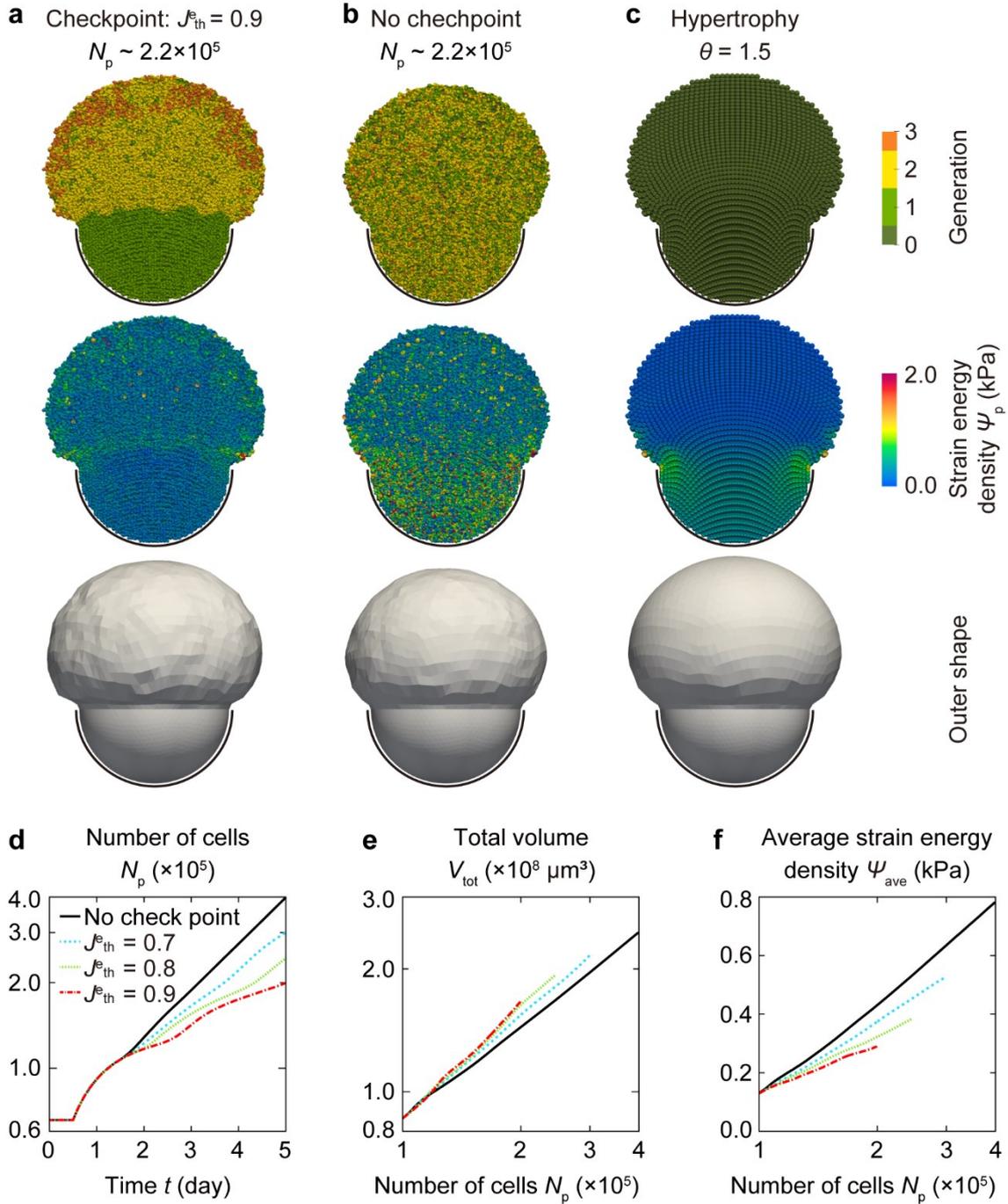


Figure 2.6 Simulation of cell proliferation under a constraint condition. **(a–c)** Cell generation, strain energy density Ψ_p , and outer shapes of the tissue under (a) cell proliferation with a checkpoint when $N_p \sim 2.2 \times 10^5$, (b) cell proliferation without a checkpoint when $N_p \sim 2.2 \times 10^5$, and (c) cell hypertrophy at $\theta = 1.5$. **(d)** Change in the number of cells N_p depending on the checkpoint on a cell cycle. **(e)** Total volume V_{tot}

and **(f)** average strain energy density Ψ_{ave} of the tissue against the number of cells N_p in the tissue, for 5 days, depending on the checkpoint on a cell cycle.

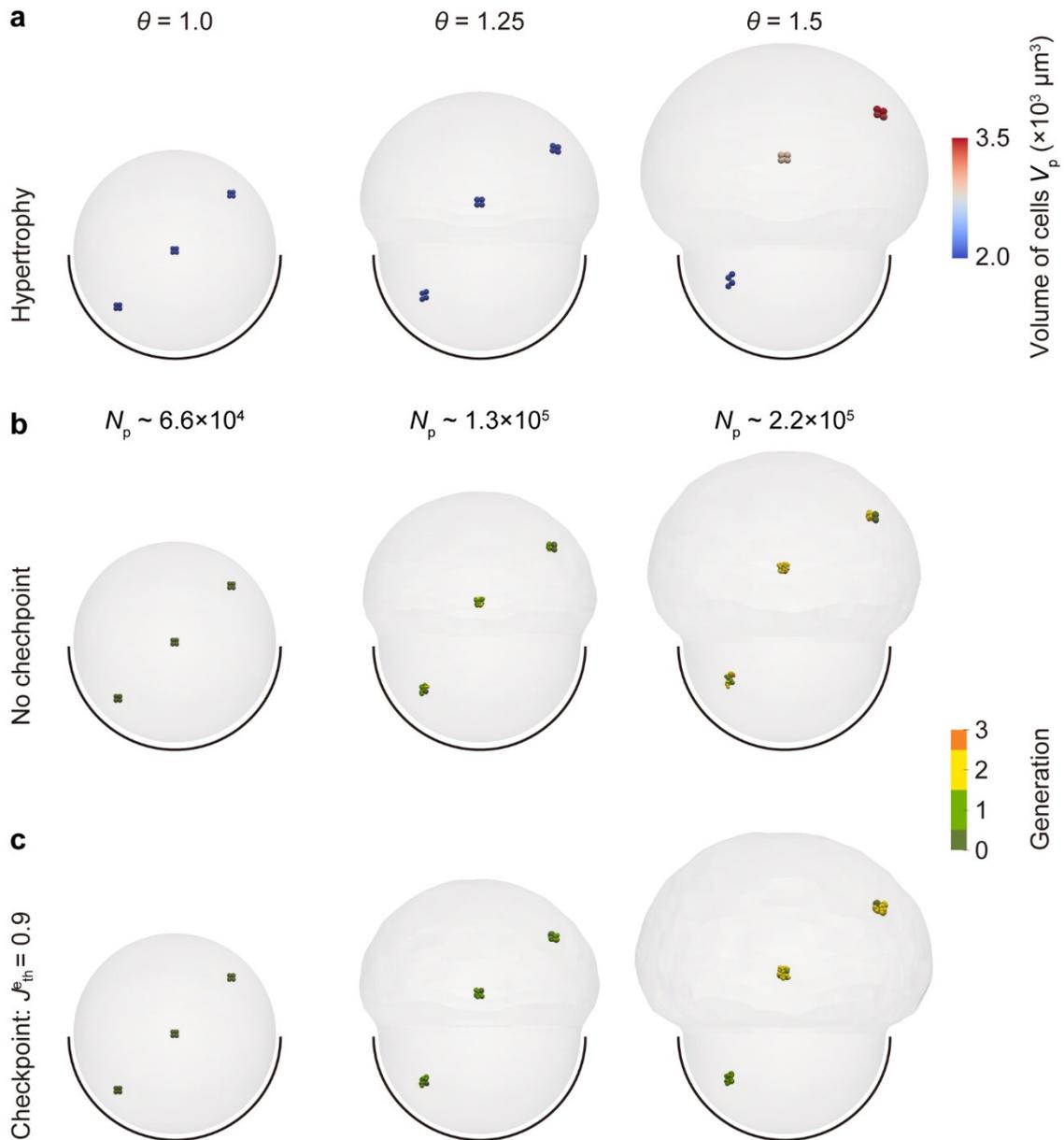


Figure 2.7 Cell tracing during tissue morphogenesis. **(a–c)** Cell tracing in the tissue composed of (a) hypertrophic cells, (b) proliferative cells without a checkpoint, and (c) proliferative cells with a checkpoint.

2.4 考 察

本章では、個々の細胞活動を組織全体の力学的ふるまいに結び付ける連続体ベース粒子モデルを構築することにより、多細胞組織形態形成の多階層シミュレーションを可能とした。本モデルでは、細胞の成長と増殖を、物質粒子の体積成長と分裂により明示的に表現した。本モデルにより、形態形成過程にわたり組織を構成する細胞を追跡し、その力学状態を評価することが可能となった。また、細胞周期における体積チェックポイントの効果を細胞増殖モデルに導入することにより、細胞活動の条件に応じた、組織全体の力学的ふるまいの変化が明らかとなった。

形態形成過程の組織全体の力学的ふるまいを評価するため、さまざまな多細胞動態のモデルが連続体力学に基づき提案され、有限要素法などの数値解析手法に導入されてきた(Giorgi et al., 2014; Lipphaus and Witzel, 2019; Vaca-González et al., 2018)。しかしながら、有限要素メッシュによる離散化を用いたこれらの手法においては、特徴的な組織形態を形成するうえで重要な、空間的に不均一な細胞活動の効果を考慮することが困難である。したがって、連続体力学に基づく解析において、そのような不均一な細胞活動を一細胞単位で表現するため、本研究では、連続体ベース粒子法である MPM を用いた。これまでに、非圧縮ソフトマテリアルの成長にともなう大変形を解析するため、MPM に基づき、体積成長と大変形を連成させる定式化が提案されている(Zhang et al., 2021)。本章では、組織を構成する細胞数の増加をともなう、個々の細胞の成長、および、分裂をモデル化することにより、この手法を拡張した。本モデルにより、個々の細胞活動に起因する組織全体の力学的ふるまいを連続体力学に基づき解析することが可能となった。

本章で行った MPM に基づくシミュレーションでは、形態形成過程の組織を構成する個々の細胞の力学状態を評価できる。したがって、本モデルでは、力学環境に応じ変化する細胞活動を考慮した解析が可能となった。本章では、細胞周期における、細胞体積に依存したチェックポイントの効果を解析した(Fig. 2.6)。また、構築された細胞成長、および、増殖のモデルでは、形態形成過程の組織内の

細胞を、分裂の履歴を含め追跡することが可能となった(Fig. 2.7). したがって、将来、本モデルをさらに拡張することにより、力学的、および、生化学的環境に応じた細胞分化の履歴に依存する細胞活動を考慮することも可能になると考えられる. このような拡張により、多細胞組織形態形成の力学的理解の進展が期待される.

本章で提案されたモデルは、骨形態形成過程の多細胞動態のシミュレーションへの応用が見込まれる. 形成過程の骨組織において、静止軟骨細胞は増殖軟骨細胞、および、肥大軟骨細胞へと段階的に分化し、成長板を構成する(Felsenthal and Zelzer, 2017; Galea et al., 2021; Green et al., 2015; Kronenberg, 2003; Vendra et al., 2018). 形成される骨形態は、力学負荷のもとで、石灰化した骨組織の形成にともなう成長板の移動を通じて決定される. 本章で提案されたモデルを用いることで、力学的、および、生化学的環境の影響を受けた細胞の肥大化と増殖に起因する、形成過程の骨組織の力学的ふるまいを解析することが可能となる. このような解析は、多細胞動態を通じて骨形態が決定されるメカニズムの理解に貢献するであろう. したがって、本章で提案されたモデルは、発生生物学において基本となる、細胞活動の制御により生理的機能をもつ組織形態が形成されるメカニズムを明らかにすると期待される.

また、本モデルは、オルガノイドの形成シミュレーションへの応用が期待される(Dahl-Jensen and Grapin-Botton, 2017; Montes-Olivas et al., 2019). 多細胞からなるオルガノイドの形成を本モデルに基づきシミュレーションすることにより、さまざまな力学条件のもとで、連続的な自己組織化現象を通じて成長するオルガノイドの形態変化を予測できる. このような解析により、形成過程のオルガノイド周囲の力学環境を操作することによる、オルガノイド形態の制御が可能になると考えられる. したがって、本研究は、望ましい形態と機能をもつオルガノイドの作製を通じて、生体医工学、および、再生医療分野の進展に貢献すると期待される.

より幅広い生体組織の発生や恒常性に関する解析を行うには、細胞の成長と増殖だけでなく、細胞選別(Townes and Holtfreter, 1955)や、上皮組織などで死細胞を除去する細胞の押し出し(Katoh and Fujita, 2012)を考慮することも重要である. 本章で提案された力学モデルでは、生体組織を連続体とみなすことにより、

組織全体の変形に応じた細胞の動きを解析した。形成過程の骨組織などの基質に富む組織においては、個々の細胞の相対的な移動が制限されるため、この連続体力学における仮定が妥当性を有する。一方で、本モデルに局所的な細胞再配置の効果を組み込むことで、新たに細胞選別など様々な現象を表現することが可能となる。そのようなモデルの拡張の後には、モデルに基づくシミュレーションで得られた組織形態や細胞の動きを *in vitro* 実験での観察と比較することにより、本モデルを定量的に検証することが可能となる。近年多数提案されている、増殖がん細胞(Yuan et al., 2023)や肥大軟骨細胞(Kim et al., 2022)の三次元 *in vitro* 培養系は、本モデルの検証において有効であると考えられる。

2.5 結 言

本章では、MPM に基づき細胞の成長と増殖の連続体ベース粒子モデルを構築することで、個々の細胞活動にともなう組織全体の力学的ふるまいを解析する組織形態形成シミュレーションを可能とした。また、細胞周期における体積チェックポイントの効果を細胞増殖モデルに導入することにより、力学状態に応じた細胞活動の変化が組織全体の力学的ふるまいに与える影響を評価した。本章で提案した細胞成長、および、増殖の連続体ベース粒子モデルは、多細胞動態による組織形態形成を力学的視点から解析するうえで強力な枠組みを提供する。本モデルは、将来の拡張により、力学的、および、生化学的環境に応じた組織形態形成の制御メカニズム理解の一助となり、発生生物学分野の進展に貢献すると期待される。

参考文献

- Alt, S., Ganguly, P., Salbreux, G., 2017. Vertex models: from cell mechanics to tissue morphogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20150520. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0520>
- Bardenhagen, S.G., Kober, E.M., 2004. The generalized interpolation material point method. *CMES - Computer Modeling in Engineering and Sciences* 5, 477–495. <https://doi.org/10.3970/cmcs.2004.005.477>
- Chagnon, G., Rebouah, M., Favier, D., 2015. Hyperelastic Energy Densities for Soft Biological Tissues: A Review. *J Elast* 120, 129–160. <https://doi.org/10.1007/s10659-014-9508-z>
- Chanet, S., Miller, C.J., Vaishnav, E.D., Ermentrout, B., Davidson, L.A., Martin, A.C., 2017. Actomyosin meshwork mechanosensing enables tissue shape to orient cell force. *Nat Commun* 8, 15014. <https://doi.org/10.1038/ncomms15014>
- Charlton, T.J., Coombs, W.M., Augarde, C.E., 2017. iGIMP: An implicit generalised interpolation material point method for large deformations. *Computers & Structures* 190, 108–125. <https://doi.org/10.1016/j.compstruc.2017.05.004>
- Conte, V., Munoz, J., Miodownik, M., 2008. A 3D finite element model of ventral furrow invagination in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 1, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2007.10.002>
- Dahl-Jensen, S., Grapin-Botton, A., 2017. The physics of organoids: a biophysical approach to understanding organogenesis. *Development* 144, 946–951. <https://doi.org/10.1242/dev.143693>
- Felsenthal, N., Zelzer, E., 2017. Mechanical regulation of musculoskeletal system development. *Development* 144, 4271–4283. <https://doi.org/10.1242/dev.151266>
- Galea, G.L., Zein, M.R., Allen, S., Francis-West, P., 2021. Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Developmental Dynamics* 250, 414–449. <https://doi.org/10.1002/dvdy.278>
- Giorgi, M., Carriero, A., Shefelbine, S.J., Nowlan, N.C., 2014. Mechanobiological simulations of prenatal joint morphogenesis. *Journal of Biomechanics* 47, 989–995. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.01.002>
- Green, J.D., Tollemar, V., Dougherty, M., Yan, Z., Yin, L., Ye, J., Collier, Z., Mohammed, M.K., Haydon, R.C., Luu, H.H., Kang, R., Lee, M.J., Ho, S.H., He, T.-C., Shi, L.L., Athiviraham, A., 2015. Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes & Diseases* 2, 307–327. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.09.003>
- Heer, N.C., Martin, A.C., 2017. Tension, contraction and tissue morphogenesis. *Development* 144, 4249–4260. <https://doi.org/10.1242/dev.151282>
- Himpel, G., Kuhl, E., Menzel, A., & Steinmann, P., 2005. Computational modelling of

- isotropic multiplicative growth. <https://doi.org/J05-02>
- Jamali, Y., Azimi, M., Mofrad, M.R.K., 2010. A Sub-Cellular Viscoelastic Model for Cell Population Mechanics. *PLoS ONE* 5, e12097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012097>
- Katoh, H., Fujita, Y., 2012. Epithelial Homeostasis: Elimination by Live Cell Extrusion. *Current Biology* 22, R453–R455. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.036>
- Kim, J., Tomida, K., Matsumoto, T., Adachi, T., 2022. Spheroid culture for chondrocytes triggers the initial stage of endochondral ossification. *Biotech & Bioengineering* bit.28203. <https://doi.org/10.1002/bit.28203>
- Kronenberg, H.M., 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–336. <https://doi.org/10.1038/nature01657>
- Lipphaus, A., Witzel, U., 2019. Biomechanical Study of the Development of Long Bones: Finite Element Structure Synthesis of the Human Second Proximal Phalanx Under Growth Conditions. *Anat Rec* 302, 1389–1398. <https://doi.org/10.1002/ar.24006>
- Liu, S., Ginzberg, M.B., Patel, N., Hild, M., Leung, B., Li, Z., Chen, Y.-C., Chang, N., Wang, Y., Tan, C., Diena, S., Trimble, W., Wasserman, L., Jenkins, J.L., Kirschner, M.W., Kafri, R., 2018. Size uniformity of animal cells is actively maintained by a p38 MAPK-dependent regulation of G1-length. *eLife* 7, e26947. <https://doi.org/10.7554/eLife.26947>
- Lloyd, A.C., 2013. The Regulation of Cell Size. *Cell* 154, 1194–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.053>
- Luo, Q., Kuang, D., Zhang, B., Song, G., 2016. Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1860, 1953–1960. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.010>
- Matejčić, M., Trepāt, X., 2022. Mechanobiological approaches to synthetic morphogenesis: learning by building. *Trends in Cell Biology* S0962892422001520. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.06.013>
- Montes-Olivas, S., Marucci, L., Homer, M., 2019. Mathematical Models of Organoid Cultures. *Front. Genet.* 10, 873. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00873>
- Osborne, J.M., Fletcher, A.G., Pitt-Francis, J.M., Maini, P.K., Gavaghan, D.J., 2017. Comparing individual-based approaches to modelling the self-organization of multicellular tissues. *PLoS Comput Biol* 13, e1005387. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005387>
- Pan, S., Yamaguchi, Y., Suppasri, A., Moriguchi, S., Terada, K., 2021. MPM–FEM hybrid method for granular mass–water interaction problems. *Comput Mech* 68, 155–173. <https://doi.org/10.1007/s00466-021-02024-2>
- Shwartz, Y., Farkas, Z., Stern, T., Aszódi, A., Zelzer, E., 2012. Muscle contraction controls skeletal morphogenesis through regulation of chondrocyte convergent extension. *Developmental Biology* 370, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.026>

- Stomakhin, A., Schroeder, C., Chai, L., Teran, J., Selle, A., 2013. A material point method for snow simulation. *ACM Trans. Graph.* 32, 1–10. <https://doi.org/10.1145/2461912.2461948>
- Takeda, H., Kameo, Y., Inoue, Y., Adachi, T., 2019. An energy landscape approach to understanding variety and robustness in tissue morphogenesis. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. <https://doi.org/10.1007/s10237-019-01222-5>
- Townes, P.L., Holtfreter, J., 1955. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *Journal of Experimental Zoology* 128, 53–120. <https://doi.org/10.1002/jez.1401280105>
- Trickey, W.R., Baaijens, F.P.T., Laursen, T.A., Alexopoulos, L.G., Guilak, F., 2006. Determination of the Poisson's ratio of the cell: recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration. *Journal of Biomechanics* 39, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.11.006>
- Trubuil, E., D'Angelo, A., Solon, J., 2021. Tissue mechanics in morphogenesis: Active control of tissue material properties to shape living organisms. *Cells & Development* 168, 203777. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2022.203777>
- Vaca-González, J.J., Moncayo-Donoso, M., Guevara, J.M., Hata, Y., Shefelbine, S.J., Garzón-Alvarado, D.A., 2018. Mechanobiological modeling of endochondral ossification: an experimental and computational analysis. *Biomech Model Mechanobiol* 17, 853–875. <https://doi.org/10.1007/s10237-017-0997-0>
- Vendra, B.B., Roan, E., Williams, J.L., 2018. Chondron curvature mapping in growth plate cartilage under compressive loading. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 84, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.05.015>
- Voss-Böhme, A., 2012. Multi-Scale Modeling in Morphogenesis: A Critical Analysis of the Cellular Potts Model. *PLoS ONE* 7, e42852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042852>
- Xie, S., Skotheim, J.M., 2020. A G1 Sizer Coordinates Growth and Division in the Mouse Epidermis. *Current Biology* 30, 916-924.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.062>
- Yamaguchi, Y., Moriguchi, S., Terada, K., 2021. Extended B-spline-based implicit material point method. *International Journal for Numerical Methods in Engineering* 122, 1746–1769. <https://doi.org/10.1002/nme.6598>
- Yuan, J., Li, X., Yu, S., 2023. Cancer organoid co-culture model system: Novel approach to guide precision medicine. *Frontiers in Immunology* 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1061388>
- Zhang, Z., Pan, Y., Wang, J., Zhang, H., Chen, Z., Zheng, Y., Ye, H., 2021. A total-Lagrangian material point method for coupled growth and massive deformation of incompressible soft materials. *Numerical Meth Engineering* 122, 6180–6202. <https://doi.org/10.1002/nme.6787>

第 3 章

単因子モデルに基づく 骨形態形成シミュレーション基盤の構築

本章では、まず、骨形態形成過程の成長板における細胞分化を制御する単因子モデルを構築し、当該モデルが生理的、および、病理的な成長板構造を再現することを検証する。この単因子モデルを、第 2 章で構築した連続体ベース粒子モデルに基づく三次元多細胞シミュレーションに導入することで、マウスの第三中足骨における観察と対応する成長板構造の形成、維持、および、骨組織全体の伸長を、個々の細胞活動に基づき解析することのできる計算機シミュレーション基盤を構築する。

3.1 緒 言

生体内の骨の形態は、関節の動きによる身体運動を可能とするため、発生過程にわたり適切に制御され形成される。大腿骨や中足骨などの多くの長骨は軟骨内骨化とよばれる過程を通じて形成される(Galea et al., 2021; Kozhemyakina et al., 2015; Kronenberg, 2003; Nguyen et al., 2017; Provot and Schipani, 2005)。軟骨内骨化は、軟骨原器の中心部に形成される一次骨化中心(primary ossification center, POC)において、軟骨細胞が肥大化した後に骨基質が形成されることにより開始される。このとき形成される骨基質を一次海綿骨(primary spongiosa)とよび、その両端においては、骨端側から増殖層(proliferative zone)、前肥大層(prehypertrophic zone)、および、肥大層(hypertrophic zone)が積み重なる層構造である成長板(growth plate)

が形成される。静止軟骨細胞(*resting chondrocytes*)が成長板において増殖軟骨細胞, 前肥大軟骨細胞, および, 肥大軟骨細胞へと順に分化することにより, また, 細胞が増殖, および, 肥大化を通じて体積成長することにより, 成長板構造の維持と骨の長軸方向への成長が実現される。

成長板の形成, および, 維持を通じた長骨の伸長には, 腱や靭帯などの周囲組織から与えられる力学負荷が影響することが知られている(Collins et al., 2023; Felsenthal and Zelzer, 2017; Pollard et al., 2017; Shwartz et al., 2012; Wu et al., 2001). 例えば, 筋収縮による骨への力学負荷が作用しない場合, 成長板内での細胞増殖が抑制され, 軟骨カラム形成に異常が生じる(Felsenthal and Zelzer, 2017). このような細胞活動に対する力の影響は骨形態を制御するうえで重要であるにもかかわらず, 力学状態の分布を形成過程の骨組織内部において計測することは困難であるため, 組織内部の力学的因子が細胞活動を時空間的に制御し骨形態に影響を及ぼすメカニズムは明らかではない。骨組織内部における力学状態の分布を解析するうえで, 第 2 章で構築した連続体ベース粒子モデルは有効であると考えられる(Yokoyama et al., 2023). 本モデルを形態形成過程の骨組織に適用することで, 組織内部における力学場の解析を通じて, 細胞活動, および, 骨形態の制御メカニズムを明らかにできると期待される。

連続体ベース粒子モデルを骨形態形成過程に適用するためには, 成長板構造の形成, および, 維持を支配する生化学的制御機構をモデル化する必要がある。成長板における細胞分化や細胞活動は, Indian hedgehog (*Ihh*), 副甲状腺ホルモン関連蛋白(*parathyroid hormone-related protein, PTHrP*), 血管内皮増殖因子(*vascular endothelial growth factor, VEGF*)をはじめとする多数の生化学的因子が関わる複雑なシグナルカスケードに支配される(Kozhemyakina et al., 2015; Long et al., 2004; Provot and Schipani, 2005; St-Jacques et al., 1999; Vortkamp et al., 1996; Zelzer et al., 2004, 2002). *Ihh* は前肥大軟骨細胞, および, 肥大軟骨細胞により産生され, 軟骨細胞の増殖を促進することが知られている(Green et al., 2015; Kronenberg, 2003; St-Jacques et al., 1999; Vortkamp et al., 1996; Wu et al., 2001). *Ihh* はまた, 関節接合部の軟骨膜(*perichondrium*)における *PTHrP* の産生を誘導する(Alvarez et al., 2002; Hilton et al., 2007). それに対して, *PTHrP* は軟骨細胞の肥大化を抑制する(Studer et al., 2012). このようにして, *Ihh* と *PTHrP* は軟骨細胞の分化を制御するネガ

タイプフィードバックループを形成している。VEGF は後期肥大軟骨細胞において発現し、成長板における軟骨細胞の生存と血管侵入の促進に不可欠である (Kozhemyakina et al., 2015; Provot and Schipani, 2005; Zelzer et al., 2004, 2002).

これら多数の因子が関わる成長板形成、および、維持の制御機構を力学モデルに組み込む際には、パラメータ数の増大を防ぐため、機構を単純化することが不可欠である。先行研究においては、二つ、もしくは、三つの生化学的因子による反応拡散のモデル化により、一次元、あるいは、二次元解析により骨形態形成を再現する手法が提案されている (Brouwers et al., 2006; Carrera-Pinzón et al., 2020; Garzón-Alvarado et al., 2009; Vaca-González et al., 2018)。これらの先行研究を参照し、成長板の形成、および、維持の生化学的制御機構を可能な限り簡潔にモデル化することにより、そのモデルを連続体ベース粒子モデルに基づく三次元多細胞組織シミュレーションに導入し、骨形態形成の力学解析を行うことが可能になると考えられる。

本章では、骨形態形成における力学的因子の影響を評価することのできるシミュレーション基盤の構築を目的とする。シミュレーションの基礎として、組織の力学的ふるまいを個々の細胞活動に基づき解析できる連続体ベース粒子モデルを用いる。また、連続体ベース粒子モデルに基づく三次元シミュレーションに導入可能な、成長板における細胞分化を制御する生化学的機構の単純なモデルを構築する。ここでは、多数の生化学的因子の複合的な効果を、ただ一つの「分化因子」の産生、拡散、および、それに対する応答により表現する。構築した単因子モデルに基づき、一次元、および、三次元の骨形態形成シミュレーションを行うことで、モデルの妥当性を検証する。

3.2 手 法

3.2.1 HE 染色

マウスを用いた実験は，京都大学動物実験委員会による承認を受けた(#Z19-2-4). 胎生 14, 16, 18 日齢 (それぞれ E14, E16, E18) の ICR マウス(Shimizu Laboratory Supplies Co., Ltd.) の後肢を単離し，4% パラホルムアルデヒド溶液 (paraformaldehyde phosphate buffer solution, PFA; Nacalai Tesque Inc.) で 2 h 化学固定した後，リン酸緩衝生理食塩水(Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS)で洗浄した．Kawamoto's film method 2020 に従い，Cryofilm type 2C(9), 4D(9) (Cryosection Preparation kit; SECTION-LAB Co. Ltd.) (Kawamoto, 2003; Kawamoto and Kawamoto, 2021), クリオスタット(Leica CM1850; Leica Biosystems), および，マイクローム替刃(A35 type; Feather)を用いて，サンプルを凍結ブロックに包埋した後，10 μm 厚さの切片を作製し，HE 染色を行った．染色された切片を倒立型顕微鏡(BZ-X710 microscope; KEYENCE Co.)により 40 \times 対物レンズ(Nikon Co.)を用いて観察した．

3.2.2 複製期細胞の蛍光染色

複製期細胞の割合を評価するため，5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU; Invitrogen)を用いて新生 DNA の蛍光染色を行った．まず，10%ウシ胎児血清(Gibco)を含む CO₂ independent medium (Gibco)に 2 mM EdU を溶解することにより EdU 溶液を精製した．次に，E18 マウスから単離した中足骨を 37 $^{\circ}\text{C}$ の EdU 溶液中で 24 h 培養した．続いて，中足骨を 4% PFA で 2 h 化学固定した後，DPBS で洗浄し，SCEM を用いて凍結ブロックに包埋した．Cryofilm type 2C(9)を用いて 10 μm 厚さの凍結切片を作製した．0.5% Triton[®] X-100 溶液(MP Biomedicals)で 20 min 脱膜した後，DPBS で洗浄し，Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®] 488 Imaging Kit (Invitrogen)のプロトコルに従い EdU の検出を行った．さらに，細胞核を 4,6-diamidino-2-

phenylindole dihydrochloride (DAPI; Nacalai Tesque Inc.)を用いて染色した。蛍光観察には、共焦点レーザー顕微鏡(FLUOVIEW FV3000; EVIDENT Co.)を用いた。観察結果の解析には、画像処理ソフトウェア ImageJ (NIH)を用いた。

3.2.3 細胞分化を表現する単因子モデル

成長板の形成、および、維持にともなう骨組織の力学的ふるまいを解析するため、種々のシグナル因子の複合的な効果を表現する分化因子(differentiation factor, DF)を想定することにより、成長板における細胞分化を表現する単因子モデルを構築した(Fig. 3.1a)。DFは組織中を拡散するものとし、位置 \mathbf{x} 、時間 t における細胞による DF の産生量 $S(\mathbf{x}, t)$ に応じた DF の濃度 $C(\mathbf{x}, t)$ を

$$\frac{\partial C(\mathbf{x}, t)}{\partial t} = D\nabla^2 C(\mathbf{x}, t) + S(\mathbf{x}, t) - kC(\mathbf{x}, t) \quad (3.1)$$

により計算した。ここで、 D と k はそれぞれ DF の拡散定数と分解速度定数である。

Ihh が軟骨細胞の増殖を促進するという知見(St-Jacques et al., 1999; Wu et al., 2001)を参照し、形態形成初期の軟骨原器全体を構成する静止軟骨細胞は、DF の濃度 $C(\mathbf{x}, t)$ が閾値 C_{prolif} を超えると増殖軟骨細胞へと分化するとモデル化した(Fig. 3.1a)。また、軟骨細胞は Ihh と PTHrP の制御を受け前肥大軟骨細胞へと分化することが知られている(Studer et al., 2012)。この分化過程を表現するため、軟骨細胞は DF の濃度 $C(\mathbf{x}, t)$ が閾値 C_{prehyp} を超えると前肥大軟骨細胞へと分化するとモデル化した。さらに、Ihh は軟骨原器周囲の軟骨膜において骨性骨膜襟(bone collar)の形成を促進すると考えられている(Kronenberg, 2003; St-Jacques et al., 1999)。そのため、骨性骨膜襟は、DF の濃度 $C(\mathbf{x}, t)$ が閾値 C_{BC} を超えると形成されるとモデル化した。

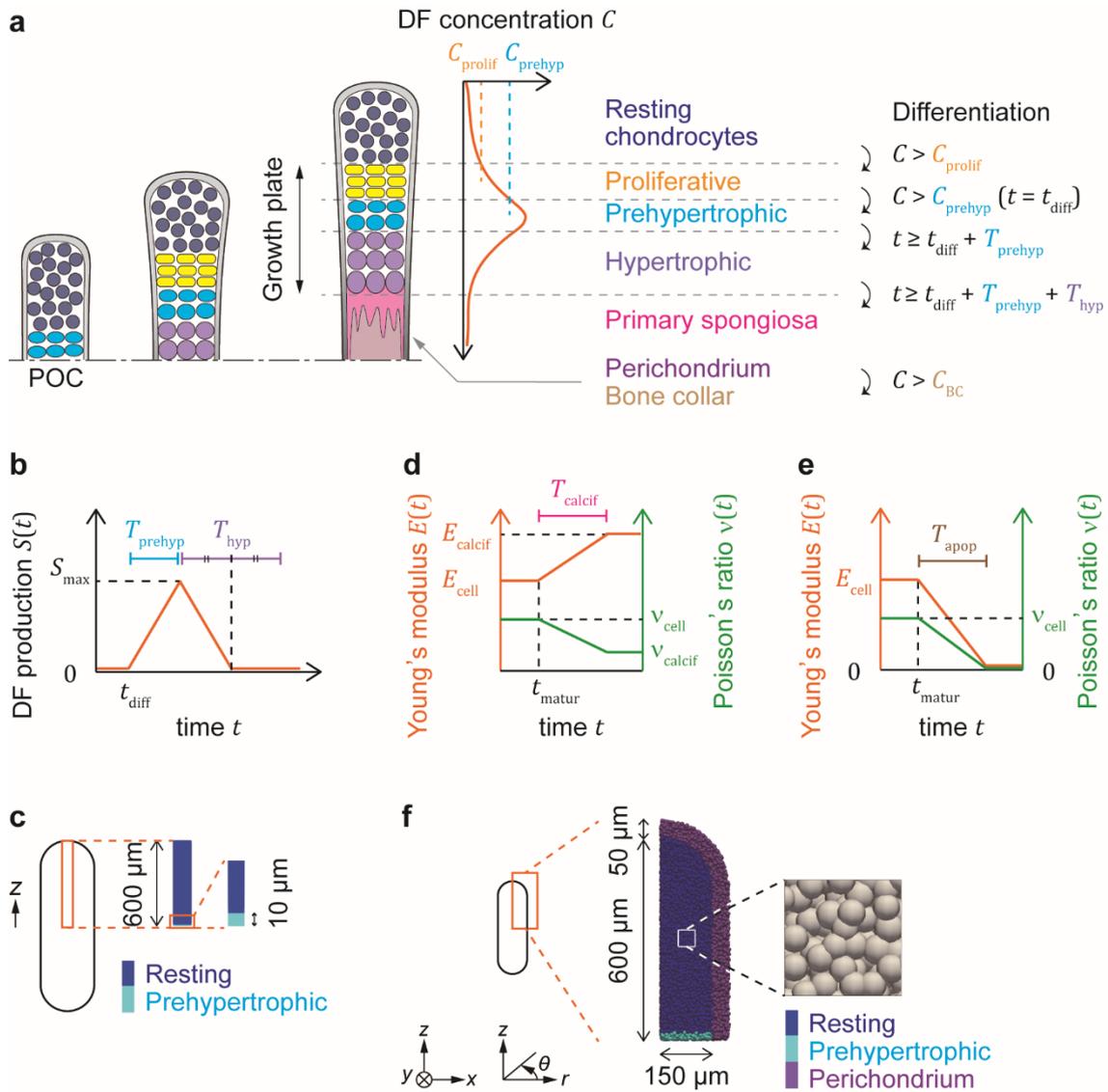


Figure 3.1 One-factor model. **(a)** Development of a growth plate composed of proliferative, prehypertrophic and hypertrophic zones after the onset of POC formation at the center of the bone, and regulation of cell differentiation by DF; here, a half of a long bone is depicted. **(b)** Production of DF by prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes. **(c)** Initial condition of 1D simulation. **(d)** Change in Young's modulus and Poisson's ratio expressing calcification. **(e)** Change in Young's modulus and Poisson's ratio expressing apoptosis. **(f)** Initial condition of 3D simulation. Each sphere indicates a material point, assumed to represent a cell and surrounding chondrocyte matrix.

先行研究においては、骨の種類や成長速度に関わらず、成長板の肥大層が 0.75–1.5 days 程度でターンオーバーすると示唆されている(Farnum et al., 2008). したがって本研究では、前肥大軟骨細胞、および、肥大軟骨細胞は、それぞれ一定の期間 T_{prehyp} および T_{hyp} をかけて成熟すると仮定した(Fig. 3.1a). ここで、時間 t は POC の形成開始時刻($t = 0$)を基準として設定した. 時刻 $t = t_{\text{diff}}$ に前肥大軟骨細胞へと分化した細胞は、時刻 $t = t_{\text{diff}} + T_{\text{prehyp}}$ に肥大軟骨細胞へと分化した後、時刻 $t = t_{\text{diff}} + T_{\text{prehyp}} + T_{\text{hyp}}$ にアポトーシスした. その後、当該領域には一次海綿骨が形成された.

Ihh が前肥大軟骨細胞、および、肥大軟骨細胞により産生される(Green et al., 2015; Kronenberg, 2003; St-Jacques et al., 1999; Vortkamp et al., 1996)ことを考慮し、細胞による DF の産生は、前肥大軟骨細胞の成熟とともに徐々に増加し、肥大軟骨細胞への分化後減少するとモデル化した. 細胞領域内の位置 \mathbf{x} における DF の産生量 $S(\mathbf{x}, t)$ は、Fig. 3.1b に示されるように時間とともに線形的に変化すると仮定することにより、

$$S(\mathbf{x}, t) = \begin{cases} S_{\max} \frac{t - t_{\text{diff}}}{T_{\text{prehyp}}} & (t_{\text{diff}} \leq t < t_{\text{diff}} + T_{\text{prehyp}}) \\ S_{\max} \left(1 - \frac{t - t_{\text{diff}} - T_{\text{prehyp}}}{0.5T_{\text{hyp}}} \right) & (t_{\text{diff}} + T_{\text{prehyp}} \leq t < t_{\text{diff}} + T_{\text{prehyp}} + 0.5T_{\text{hyp}}) \\ 0 & (\text{else}) \end{cases} \quad (3.2)$$

と表された. ここで、 S_{\max} は DF 産生量の最大値である. 拡散解析手法の詳細を付録 A.3 に記す.

先行研究(Basu and Campagnola, 2004; Philpott et al., 1995)において、光褪色後蛍光回復法などの技術を用いて種々の生化学的分子の拡散定数が計測されている. また、骨形態形成における反応拡散システムをシミュレーションした過去の研究においては、 Ihh と PTHrP の拡散定数として 8.2×10^{-12} から $1.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ の値が用いられてきた(Garzón-Alvarado et al., 2009). 本研究では、DF の拡散定数を、上記の先行研究で用いられた値と同程度のオーダーである $D = 1.0 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ と設定した. また、DF の分解速度定数 k を、任意の値 $k = 0.005 / \text{s}$ と設定した. 増殖、および、前肥大軟骨細胞への分化に関する DF 濃度の閾値

C_{prolif} と C_{prehyp} については、後述の第 3.3.1 項にて、一次元成長板シミュレーションにおける増殖層、および、肥大層の長さがともに生理的な長さ(Reno et al., 2006)となるよう決定した。骨性骨膜襟は肥大層付近で形成される(Kronenberg, 2003)ことから、骨性骨膜襟形成に関する DF 濃度の閾値 C_{BC} を、三次元骨形態形成シミュレーションにおいて骨性骨膜襟の形成が肥大層付近で進行するよう $C_{\text{BC}} = 10.0 \text{ pM}/\mu\text{m}^3$ と設定した。肥大軟骨細胞の成熟期間 T_{hyp} は、文献(Farnum et al., 2008)を参照し 1.0 day とした。前肥大軟骨細胞の成熟期間 T_{prehyp} は、任意に T_{hyp} と同程度の長さである 0.5 days とした。DF 産生量の最大値 S_{max} は、任意に $S_{\text{max}} = 1.0 \text{ pM}/\mu\text{m}^3/\text{s}$ とした。

3.2.4 一次元組織成長モデル

単因子モデルにおける DF 濃度の閾値 C_{prolif} 、および、 C_{prehyp} を決定し、モデルの妥当性を検証するため、単因子モデルを一次元シミュレーションに適用した。このとき、組織の成長のストレッチ $g(\mathbf{x}, t)$ を

$$\frac{Dg(\mathbf{x}, t)}{Dt} = \begin{cases} 0 & (\text{in resting zone, primary spongiosa}) \\ g(\mathbf{x}, t) \ln 2 & (\text{in proliferative zone}) \\ g(\mathbf{x}, t) \ln 3 & (\text{in prehypertrophic, hypertrophic zones}) \end{cases} \quad (3.3)$$

に従い変化させることにより、細胞の増殖、および、肥大化にともなう一次元的な組織成長をモデル化した。ここで、増殖軟骨細胞は細胞周期を 1.0 day として連続的に分裂すると仮定し、1 日あたり 2 倍の長さになるよう指数関数的に成長するとモデル化した。また、前肥大軟骨細胞、および、肥大軟骨細胞は、増殖軟骨細胞より急速に成長する(Rubin et al., 2021)ことから、1 日あたり 3 倍の長さになるよう指数関数的に成長するとモデル化した。

計測の容易な長骨の一つであるマウスの第三中足骨を解析対象とし、その中心軸の遠位側半分を、静止軟骨細胞の領域からなる長さ 600 μm の一次元物体としてモデル化した(Fig. 3.1c)。骨の中心に相当するモデルの下端において対称境界条件を適用した。モデルの下端から 10 μm を前肥大層へと分化させること

により，POC の形成開始を表現した(Fig. 3.1c).

3.2.5 骨形態形成における多細胞動態の連続体ベース粒子モデル

成長板における細胞の増殖や肥大化にともなう組織形態形成を解析するため，第 3.2.3 項で構築した単因子モデルを連続体ベース粒子モデル(Yokoyama et al., 2023)に基づく組織形態形成解析に導入した．このとき，連続体ベース粒子モデルにおいて組織の離散化に用いられる一つ一つの物質粒子を，一つの軟骨細胞，および，その周囲の軟骨基質(chondrocyte matrix)を代表する点とみなした．細胞の成長を物質粒子の体積成長として表現するため，物質粒子 \mathbf{p} の変形勾配テンソル \mathbf{F}_p を，その弾性変形成分 \mathbf{F}_p^e と成長成分 \mathbf{F}_p^g に乗算分解し，

$$\mathbf{F}_p = \mathbf{F}_p^e \mathbf{F}_p^g \quad (3.4)$$

と表した(Himpel et al., 2005; Takeda et al., 2020)．また，形成過程の骨組織を圧縮性 neo-Hookean モデル(Rooij and Kuhl, 2018)に従う超弾性体としてモデル化し，基準配置における組織のひずみエネルギー密度関数 Ψ を

$$\Psi = J^g \left(\frac{\lambda}{8} \ln^2 I_3 + \frac{\mu}{2} (I_1 - 3 - \ln I_3) \right) \quad (3.5)$$

と表した．ここで， J^g は \mathbf{F}_p^g のヤコビアン， λ と μ はラメの定数， I_1 と I_3 は変形勾配テンソルの弾性変形成分から計算される右 Cauchy–Green テンソル $\mathbf{C}_p^e = \mathbf{F}_p^{eT} \mathbf{F}_p^e$ の第一，および，第三不変量である．ラメの定数はヤング率 E とポアソン比 ν を用いて $\lambda = \frac{E\nu}{(1+\nu)(1-2\nu)}$ ， $\mu = \frac{E}{2(1+\nu)}$ と表される．

A) 静止・増殖軟骨細胞の挙動

静止軟骨細胞および増殖軟骨細胞による細胞増殖を，G1，S，G2，および，M 期の合計長さ T_{cycle} にわたる分裂方向 \mathbf{n}_s への物質粒子の一方向成長と，M 期に

における物質粒子の分割によりモデル化した(Yokoyama et al., 2023). このとき, 変形勾配テンソルの成長成分 \mathbf{F}_p^g と成長のストレッチ θ を

$$\mathbf{F}_p^g = (\mathbf{I} + (\theta - 1)\mathbf{n}_s \otimes \mathbf{n}_s)\mathbf{F}_{p,\text{pre}}^g \quad (3.6)$$

$$\theta = 1 + \frac{t-t_{\text{pre}}}{T_{\text{cycle}}}, \quad \frac{D\theta}{Dt} = \frac{1}{T_{\text{cycle}}} \quad (3.7)$$

に従い変化させることで, 物質粒子の一方向成長を表した. ここで, \mathbf{I} は二階の恒等テンソル, $\mathbf{F}_{p,\text{pre}}^g$ は S 期開始時点($t = t_{\text{pre}}$)における変形勾配テンソルの成長成分である. これにより, 成長のストレッチ θ を時間 T_{cycle} にあたり 1.0 から 2.0 まで線形的に増加させることで, 一定速度での成長を表現した. 細胞周期 T_{cycle} の後, 細胞は次の分裂を開始するまで G0 期にとどまる. 各細胞の S 期開始が独立に, 一定の確率で連続的に起こると仮定し, G0 期の長さが指数分布に従うとモデル化した(Yokoyama et al., 2023). 静止軟骨細胞における指数分布の母数を R_{rest} , 増殖軟骨細胞における母数を R_{prolif} とした.

増殖軟骨細胞は, 細胞の長軸を分割する向きに分裂面を形成し分裂した後, 骨の長軸方向へ並ぶよう再配列すると考えられている(Aszodi et al., 2003; Li et al., 2017; Li and Dudley, 2009; Romereim et al., 2014). この細胞の再配列には, 分裂後の二細胞間のカドヘリン接着が必要である(Li et al., 2017; Romereim et al., 2014). 細胞間接着のもとでの細胞形態は, 膜の弾性と接着を考慮したエネルギー関数により表現される(Hilgenfeldt et al., 2008). このエネルギー関数によると, 強力な接着は細胞間接着面の拡大を誘導する(Gemp et al., 2011; Hayashi and Carthew, 2004; Hilgenfeldt et al., 2008; Malmi-Kakkada et al., 2022). 軟骨細胞においては, 分裂後の二つの細胞がそれらを取り囲む軟骨基質による物理的な拘束を受けることから, 二細胞が接着面積を最大化するため親細胞形態の短軸方向に並ぶよう再配列すると考えられる. これらの知見(Gemp et al., 2011; Hayashi and Carthew, 2004; Hilgenfeldt et al., 2008; Li et al., 2017; Malmi-Kakkada et al., 2022; Romereim et al., 2014)に基づき, 本モデルでは, 再配列後の細胞の整列方向を表す \mathbf{n}_s を, S 期開始時点において, 細胞が最も圧縮されている方向, すなわち, 最小主応力方向に設定した.

先行研究において, 骨の成長速度と増殖層における細胞周期長さの関係が,

bromodeoxyuridine によるラベリングを用いて解析されている(Wilsman et al., 1996). マウスの第三中足骨の成長速度は約 $300 \mu\text{m}/\text{day}$ であるから(Reno et al., 2006), G0 期を含む細胞周期全体の長さは約 30–34 h と推定される(Wilsman et al., 1996). これらの先行研究をもとに, 本研究では, G1, S, G2, および, M 期の合計長さを $T_{\text{cycle}} = 1.0 \text{ day}$, 増殖軟骨細胞における G0 期長さの指数分布の母数を $R_{\text{prolif}} = 5.0 / \text{day}$ とした. これにより, G0 期の平均長さは $1/R_{\text{prolif}} = 0.2 \text{ days}$ となる. また, 静止軟骨細胞の分裂頻度は増殖軟骨細胞より低いため, 静止軟骨細胞における G0 期長さの指数分布の母数については, 後述の第 3.3.4 項にて, 三次元骨形態形成シミュレーションとマウス第三中足骨における EdU 染色を比較することにより, $R_{\text{rest}} = 1.0 / \text{day}$ (G0 期の平均長さ $1/R_{\text{rest}} = 1.0 \text{ day}$)と定めた.

B) 前肥大軟骨細胞の挙動

成長板の前肥大層においては, 細胞増殖を通じて形成された軟骨カラム内の細胞の体積成長が観察される. 前肥大層における細胞活動を表現するため, 前肥大軟骨細胞へと分化した細胞は, 分化時点で進行中の細胞周期を増殖細胞より速い成長により完了し, その後肥大軟骨細胞と同様の等方成長 (第 3.2.5 項 C) を開始するとモデル化した. 細胞周期を完了するための速い成長を, 式(3.7)に示される成長のストレッチの増加速度を 2 倍にし,

$$\frac{D\theta}{Dt} = \frac{2}{T_{\text{cycle}}} \quad (3.8)$$

と表すことによりモデル化した.

C) 肥大軟骨細胞の挙動

肥大軟骨細胞は浸透圧により体積成長すると示唆されているため(Hara et al., 2018), 肥大軟骨細胞, および, 細胞周期を完了した後の前肥大軟骨細胞は, 等

方的に成長するとモデル化した。肥大層における細胞数密度は、平均して増殖層における細胞数密度の5分の1であると報告されている(Rubin et al., 2021)。したがって、前肥大、および、肥大軟骨細胞は、1日あたり体積が3倍になる速度で成長すると仮定し、変形勾配テンソルの成長成分 \mathbf{F}_p^g と成長のストレッチ θ を

$$\mathbf{F}_p^g = \theta \mathbf{F}_{p_pre}^g \quad (3.9)$$

$$\theta = \sqrt[3]{3}^{t-t_{pre}} \quad (3.10)$$

に従い変化させた。ここで、 $\mathbf{F}_{p_pre}^g$ は等方成長開始時点($t = t_{pre}$)における変形勾配テンソルの成長成分である。これにより、前肥大、および、肥大軟骨細胞のターンオーバーにかかる合計時間である 1.5 days ($= T_{prehyp} + T_{hyp}$)の間に、細胞は約5倍の体積に成長した。

D) 石灰化とアポトーシス

肥大軟骨細胞は時刻 $t = t_{matur} = t_{diff} + T_{prehyp} + T_{hyp}$ に成熟した後アポトーシスし、残された空間には一次海綿骨とよばれる不規則な骨梁構造が形成された(Hara et al., 2018; Kronenberg, 2003)。この構造の形成を表現するため、成熟した肥大軟骨細胞は、確率的に石灰化した骨基質に置き換えられ(50%)、あるいは、アポトーシスし空隙となる(50%)とモデル化した。

肥大軟骨細胞が徐々に石灰化骨基質に置き換えられる過程については、Fig. 3.1d に示されるように、当該細胞を代表する物質粒子のもつヤング率 $E(t)$ とポアソン比 $\nu(t)$ を、時間 T_{calcif} をかけて細胞の物性値から骨基質の物性値へと線形的に変化させることによりモデル化した。

$$E(t) = E_{cell} \frac{(t_{matur} + T_{calcif} - t)}{T_{calcif}} + E_{calcif} \frac{(t - t_{matur})}{T_{calcif}} \quad (t_{matur} \leq t < t_{matur} + T_{calcif}) \quad (3.11)$$

$$\nu(t) = \nu_{cell} \frac{(t_{matur} + T_{calcif} - t)}{T_{calcif}} + \nu_{calcif} \frac{(t - t_{matur})}{T_{calcif}} \quad (t_{matur} \leq t < t_{matur} + T_{calcif}) \quad (3.12)$$

ここで、 E_{cell} と ν_{cell} は細胞のヤング率とポアソン比、 E_{calcif} と ν_{calcif} は石灰化骨基質のヤング率とポアソン比である。この過程において、変形勾配テンソルの成長成分 \mathbf{F}_p^g を

$$\mathbf{F}_p^g = \mathbf{F}_p \quad (3.13)$$

に従い更新し続けることにより、物質粒子の残留応力を取り除いた。これにより、現在配置において残留応力のない、新生骨基質の形成を表現した。

肥大軟骨細胞のアポトーシスについては、Fig. 3.1e に示されるように、当該細胞を代表する物質粒子のもつヤング率 $E(t)$ とポアソン比 $\nu(t)$ を、時間 T_{apop} をかけて 0 へと線形的に減少させることによりモデル化した。

$$E(t) = E_{\text{cell}} \frac{(t_{\text{matur}} + T_{\text{apop}} - t)}{T_{\text{apop}}} \quad (t_{\text{matur}} \leq t < t_{\text{matur}} + T_{\text{apop}}) \quad (3.14)$$

$$\nu(t) = \nu_{\text{cell}} \frac{(t_{\text{matur}} + T_{\text{apop}} - t)}{T_{\text{apop}}} \quad (t_{\text{matur}} \leq t < t_{\text{matur}} + T_{\text{apop}}) \quad (3.15)$$

これにより、細胞を構成していた構造の段階的な分解と除去を表現した。

細胞の物性値は、軟骨細胞における計測値(Luo et al., 2016; Trickey et al., 2006)と同程度のオーダーとなるよう、 $E_{\text{cell}} = 1.0 \text{ kPa}$, $\nu_{\text{cell}} = 0.4$ とした。発生段階の未成熟な骨基質のヤング率は、細胞のヤング率に比べ十分に大きい $E_{\text{calcif}} = 1.0 \text{ MPa}$ とした。骨基質のポアソン比は、骨のシミュレーション研究(Adachi et al., 2006; Kameo et al., 2020)において広く用いられた値である $\nu_{\text{calcif}} = 0.3$ とした。石灰化とアポトーシスにかかる時間 T_{calcif} , および、 T_{apop} は、細胞周期や細胞の肥大化の時間と同程度である $T_{\text{calcif}} = 1.0 \text{ day}$, $T_{\text{apop}} = 1.0 \text{ day}$ と定めた。

E) 骨性骨膜襟の形成

軟骨膜における、骨基質からなる骨性骨膜襟の形成は、肥大軟骨細胞領域の石灰化と同様に、物質粒子のヤング率 $E(t)$ とポアソン比 $\nu(t)$ を

$$E(t) = E_{\text{cell}} \frac{(t_{\text{BC}} + T_{\text{calcif}} - t)}{T_{\text{calcif}}} + E_{\text{calcif}} \frac{(t - t_{\text{BC}})}{T_{\text{calcif}}} \quad (t_{\text{BC}} \leq t < t_{\text{BC}} + T_{\text{calcif}}) \quad (3.16)$$

$$v(t) = v_{\text{cell}} \frac{(t_{\text{BC}} + T_{\text{calcif}} - t)}{T_{\text{calcif}}} + v_{\text{calcif}} \frac{(t - t_{\text{BC}})}{T_{\text{calcif}}} \quad (t_{\text{BC}} \leq t < t_{\text{BC}} + T_{\text{calcif}}) \quad (3.17)$$

に従い変化させることによりモデル化した．ここで， t_{BC} は当該領域において骨性骨膜襟の形成が開始された時刻である．この過程においても，式(3.13)に従い物質粒子の残留応力を取り除いた．

F) 初期条件の設定

本研究では，凹凸の少ない単純な形状を有するマウスの第三中足骨遠位を解析対象とした．E14 マウスの第三中足骨を模擬し，形態形成初期の軟骨原器を，半径 $150 \mu\text{m}$ ，長さ $450 \mu\text{m}$ の円筒と，半径 $150 \mu\text{m}$ の半球を組み合わせたカプセル(Fig. 3.1f 左)としてモデル化した．このモデルは静止軟骨細胞により構成され，厚さ $50 \mu\text{m}$ の軟骨膜に覆われた(Fig. 3.1f 中央)．骨の中央に対応するカプセルの中心を原点とし， z 軸を骨の長軸方向とした． z 軸と垂直に x 軸，および， y 軸を設定した．また，半径(r)方向，および，円周(θ)方向が z 軸と垂直な面内に定められた． $x = 0$ ， $y = 0$ ，および， $z = 0$ 平面における鏡面对称性を仮定することにより，カプセルの 8 分の 1 の領域のみを初期条件としてモデル化し，その $x = 0$ ， $y = 0$ ，および， $z = 0$ 平面に shear-free 境界条件を適用した．この境界条件による意図しない効果を排除するため，境界から離れた領域($x \geq 10$ ， $y \geq 10$ ，かつ $z \geq 10$ (μm))において得られたデータのみを解析に使用した．物質粒子の初期体積は，個体差を考慮しその平均値 V_{ave} と標準偏差 V_{dev} に基づく正規分布 $N(V_{\text{ave}}, V_{\text{dev}}^2)$ に従うと仮定した．初期条件における組織領域に物質粒子をランダムに配置した後，その位置を緩和させることにより，物質粒子の初期配置を定めた(Fig. 3.1f 右)．物質粒子の初期配置設定の詳細を付録 A.4 に記す．

物質粒子の平均体積 V_{ave} を，静止軟骨細胞の細胞数密度(Rubin et al., 2021)の逆数と同程度のオーダーとなるよう $V_{\text{ave}} = 1.0 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ と定めた．物質粒子の体積の標準偏差 V_{dev} を $V_{\text{dev}} = 1.0 \times 10^2 \mu\text{m}^3$ とすることにより，約 95%の物質粒子の体積が 800 から $1200 \mu\text{m}^3$ となる，妥当な確率分布が実現された．さらに，すべての物質粒子が初期条件において $500 \mu\text{m}^3$ 以上， $1500 \mu\text{m}^3$ 以下の体積を有す

ることを確認した。時刻 $t = 0$ において、 $z = 0$ 平面付近の細胞を前肥大軟骨細胞に分化させることにより、POC 形成の開始をモデル化した(Fig. 3.1f 中央) (Kronenberg, 2003)。POC 形成開始以前には DF を産生する前肥大、および、肥大軟骨細胞が存在しないため、初期 DF 濃度 $C(\mathbf{x}, 0)$ を解析領域全体で 0 とした。モデルに使用された全てのパラメーターを Table 3.1 に示す。

Table 3.1 Parameter settings for one-factor and cell-dynamics models

Symbol (unit)	Description	Value
D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	Diffusion coefficient of DF	1.0
k (/s)	Degradation rate constant of DF	0.005
S_{max} ($\text{pM}/\mu\text{m}^3/\text{s}$)	Maximum value of DF production	1.0
C_{prolif} ($\text{pM}/\mu\text{m}^3$)	Threshold of DF concentration for proliferative differentiation	0.5
C_{prehyp} ($\text{pM}/\mu\text{m}^3$)	Threshold of DF concentration for prehypertrophic differentiation	30.0
C_{BC} ($\text{pM}/\mu\text{m}^3$)	Threshold of DF concentration for bone collar formation	10.0
T_{cycle} (day)	Time duration of the cell cycle	1.0
T_{prehyp} (day)	Time duration of prehypertrophy	0.5
T_{hyp} (day)	Time duration of hypertrophy	1.0
T_{calcif} (day)	Time duration of calcification	1.0
T_{apop} (day)	Time duration of apoptosis	1.0
R_{rest} (/day)	Rate parameter of proliferation for resting chondrocytes	1.0
R_{prolif} (/day)	Rate parameter of proliferation for proliferative chondrocytes	5.0
E_{cell} (kPa)	Young's modulus of chondrocytes	1.0
E_{calcif} (kPa)	Young's modulus of bone matrix	1.0×10^3
ν_{cell}	Poisson's ratio of chondrocytes	0.4
ν_{calcif}	Poisson's ratio of bone matrix	0.3
V_{ave} (μm^3)	Average volume of material points	1.0×10^3
V_{dev} (μm^3)	Standard deviation of volume of material points	1.0×10^2
h (μm)	Grid spacing for deformation analysis	50.0
h' (μm)	Grid spacing for diffusion analysis	6.5

3.3 結果

3.3.1 単因子モデルにおけるパラメータの決定

第 3.2.3 項で構築した単因子モデルにおける, 増殖軟骨細胞, および, 前肥大軟骨細胞への分化に関する DF 濃度の閾値 C_{prolif} , および, C_{prehyp} を決定するため, まず, モデルを一次元シミュレーションに適用した. 二つの閾値 C_{prolif} , および, C_{prehyp} を制御することにより, 正常な(Fig. 3.2a), および, 異常な(Figs. 3.2b, c)成長板構造が観察された. パラメトリック解析により, 成長板内の各層の長さが二つの閾値により制御されることが明らかとなった(Figs. 3.2d, e). これらの結果より, $C_{\text{prolif}} = 0.5 \text{ pM}/\mu\text{m}^3$, $C_{\text{prehyp}} = 30.0 \text{ pM}/\mu\text{m}^3$ のもとで, 先行研究(Reno et al., 2006)におけるマウス第三中足骨の計測結果と同等の層長さをもつ成長板の形成, および, 維持が再現されることが明らかとなった(Fig. 3.2a). 一方で, $C_{\text{prehyp}} = 50.0 \text{ pM}/\mu\text{m}^3$ の場合には, 増殖軟骨細胞が分化しないまま増殖層が拡大し続け(Fig. 3.2b), また, $C_{\text{prehyp}} = 10.0 \text{ pM}/\mu\text{m}^3$ の場合には, 肥大層が生理的な条件(Reno et al., 2006)よりも長くなり(Fig. 3.2c), どちらの場合においても成長板構造に異常が生じることが明らかとなった. したがって, 以下の全ての解析において, 閾値 $C_{\text{prolif}} = 0.5 \text{ pM}/\mu\text{m}^3$, および, $C_{\text{prehyp}} = 30.0 \text{ pM}/\mu\text{m}^3$ を使用した.

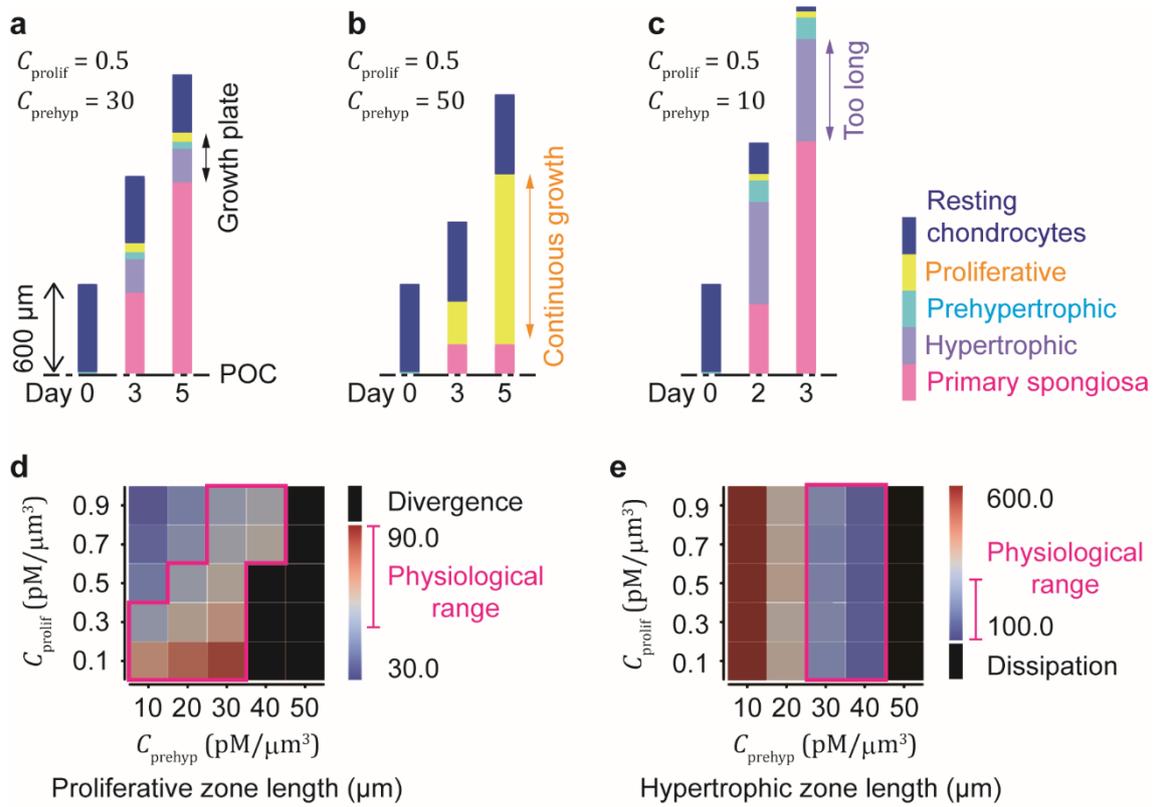


Figure 3.2 1D simulation based on the one-factor model. **(a)** Physiological growth plate dynamics with $C_{\text{prolif}} = 0.5$ pM/ μm^3 and $C_{\text{prehyp}} = 30.0$ pM/ μm^3 . **(b, c)** Abnormal growth plate dynamics with $C_{\text{prehyp}} = 50.0$ pM/ μm^3 and $C_{\text{prehyp}} = 10.0$ pM/ μm^3 , respectively. **(d)** Proliferative and **(e)** hypertrophic zone lengths depending on the values of C_{prolif} and C_{prehyp} .

3.3.2 単因子モデルの検証

単因子モデルの妥当性を検証するため、*Igfl* null マウスにおける成長板構造のシミュレーションを行った。*Igfl* null マウスにおいては、骨全体の伸長速度が低下し、肥大層が短くなる一方、増殖層の長さは生理的な成長板と同等であることが報告されている(Wang et al., 2004)。*Igfl* は成長因子の一つであるため、DF の分化促進効果の一部を担うと考えられる。したがって、前肥大、および、肥大軟骨細胞による DF 産生量の最大値を生理的な場合($S_{\max} = 1.0 \text{ pM}/\mu\text{m}^3/\text{s}$)に比べ減少させ、 $S_{\max} = 0.8 \text{ pM}/\mu\text{m}^3/\text{s}$ とすることで、*Igfl* null マウスにおける成長板の形成シミュレーションを試みた。その結果、骨全体の伸長速度、および、肥大層の長さが生理的なシミュレーションに比べ減少した一方、増殖層の長さは不変であるという、*Igfl* null マウスにおける観察(Wang et al., 2004)と一致する結果が得られた(Figs. 3.3a, b)。

一方で、*Ihh* 過剰発現マウスにおいては増殖層が長くなることが報告されている(Kobayashi, 2005)。増殖層長さの変化は、一次元成長板シミュレーションにおいて、DF の拡散定数 D や分解速度定数 k を変化させた場合に観察された(Figs. 3.3c–e)。以上より、本研究で構築した単因子モデルは、生理的、および、病理的な成長板構造をともに再現可能であることが示された。

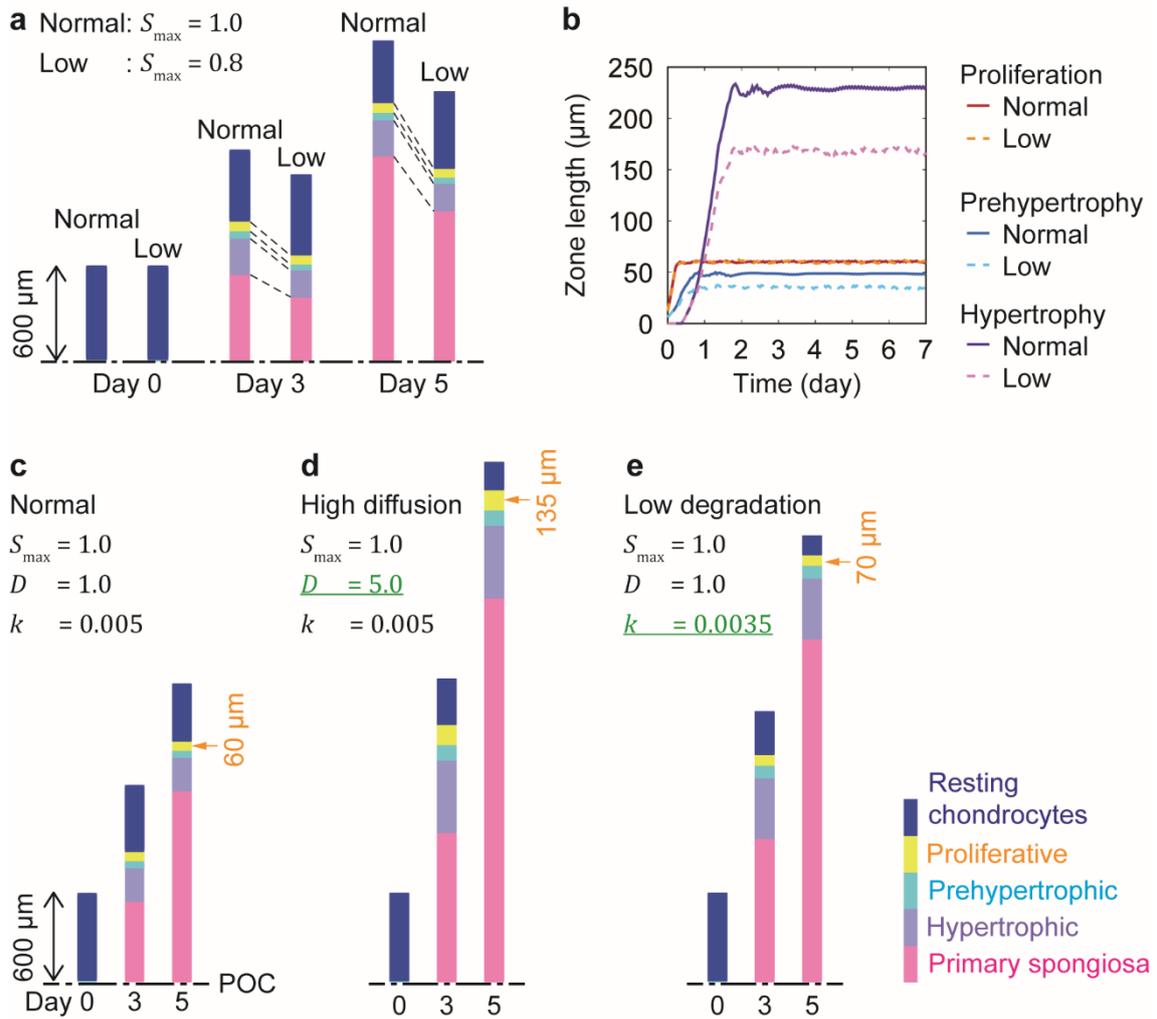


Figure 3.3 Validation of the one-factor model. **(a)** Growth plate dynamics and **(b)** each zone length under the normal condition and low production of DF. **(c–e)** Growth plate dynamics under (c) the normal condition, (d) high diffusion condition with $D = 5.0 \mu\text{m}^2/\text{s}$, and (e) low degradation condition with $k = 0.0035 /\text{s}$.

3.3.3 骨形態形成シミュレーション

次に、形態形成過程における骨組織の三次元的なふるまいを解析するため、連続体ベース粒子モデル（第 3.2.5 項）に基づく三次元シミュレーションに単因子モデルを適用した(Fig. 3.4a). 初期条件における軟骨原器の形態(Day 0 in Fig. 3.4a)は、E14 マウスにおける第三中足骨の形態(E14 in Fig. 3.4b)に対応している. POCの形成開始(Day 0)から 2 日間の形態形成シミュレーションにより、増殖、前肥大、および、肥大層からなる成長板の形成が確認された(Day 2 in Fig. 3.4a). その後 2 日間のシミュレーションにおいては、組織を構成する細胞の分化、増殖、および、肥大化により、成長板構造が維持され、骨組織全体がその長軸方向に成長した(from Day 2 to Day 4 in Fig. 3.4a). このような、シミュレーションにおける成長板の形成、維持、および、骨の伸長は、E16、および、E18 マウス第三中足骨の HE 染色(Fig. 3.4b)において観察されたものと一致していた. HE 染色(Fig. 3.4b)においては、偏平な増殖軟骨細胞が観察される増殖層(P)、段階的に増大する細胞体積により識別される前肥大(PH)、および、肥大層(H)が図示されている. 以上のように、連続体ベース粒子モデルに基づく三次元多細胞シミュレーションに単因子モデルを適用することにより、個々の細胞の活動にともなう成長板の形成、維持、および、骨組織全体の伸長が解析可能となった.

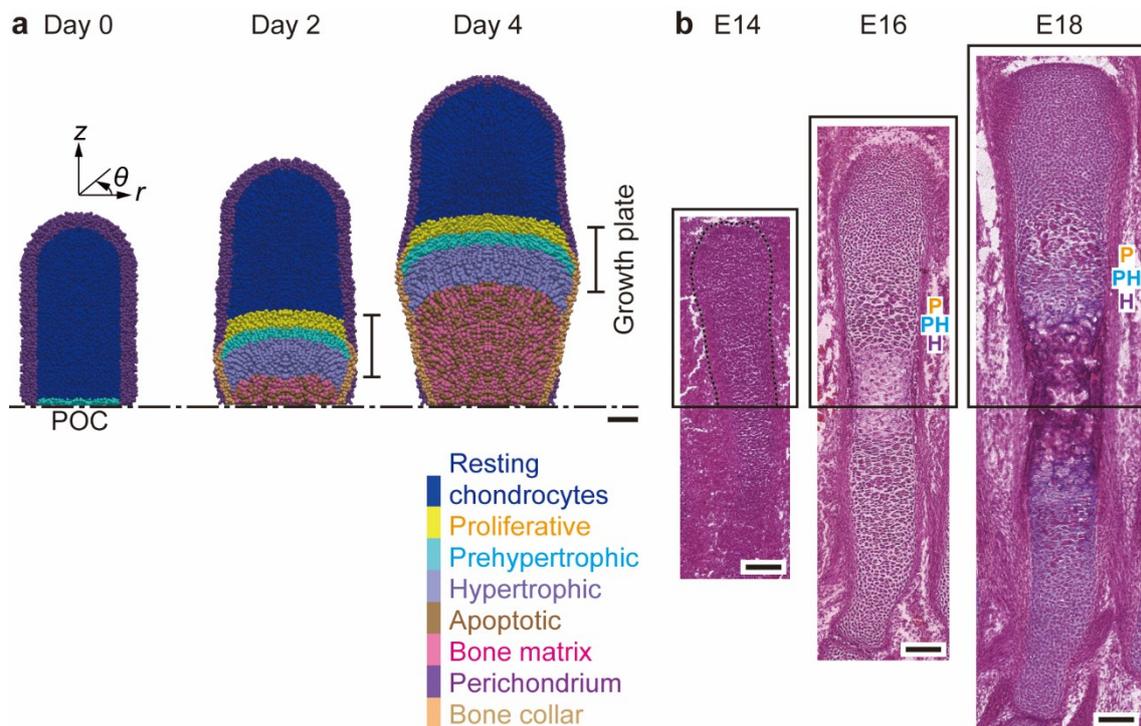


Figure 3.4 Growth plate development and maintenance in the 3D simulation of mouse third metatarsals. **(a)** Development and maintenance of the growth plate in 3D simulation; here, 50 μm offset of the r - z cross-section of half of the tissue at 0, 2, and 4 days after the onset of POC formation (Days 0, 2, and 4) are shown. **(b)** HE staining of third metatarsal of E14, E16, and E18 mice; here, P: proliferative zone, PH: prehypertrophic zone, and H: hypertrophic zone. Scale bars: 100 μm .

3.3.4 連続体ベース粒子モデルにおける分裂頻度の検証

静止軟骨細胞の領域と成長板の増殖層は、細胞分裂頻度の差により識別される。E18 マウスの第三中足骨において、新生 DNA をラベリングする EdU 染色 (Fig. 3.5a)を行った結果、増殖層における EdU 陽性細胞の割合は、静止軟骨細胞における割合の約 2 倍であることが明らかとなった (Fig. 3.5b)。EdU 陽性細胞の割合を表すグラフ (Fig. 3.5b) は、EdU 染色画像 (Fig. 3.5a) 上の白い枠で示された幅 200 μm の領域における解析結果を示している。

また、シミュレーションにおいて、静止軟骨細胞の分裂頻度は、G0 期長さの指数分布の母数 R_{rest} に支配される。連続体ベース粒子モデルに基づく骨形態形成シミュレーションにおいて、静止軟骨細胞と増殖軟骨細胞の分裂頻度の差が適切に表現されることを確かめるため、シミュレーションにおける Day 4 時点で S 期 (DNA 複製期) にある細胞、すなわち、S 期開始から 6 時間以内の細胞の分布を解析した (Fig. 3.5c)。これにより、母数 $R_{\text{rest}} = 1.0 / \text{day}$ のもとで、増殖層における S 期細胞の割合が、静止軟骨細胞における S 期細胞割合の約 2 倍となり (Fig. 3.5d)、EdU 解析 (Fig. 3.5b) においてみられた傾向と一致することが明らかとなった。S 期細胞の割合を表すグラフ (Fig. 3.5d) は、初期条件における組織内のランダムな細胞分布が異なる 3 つのシミュレーションにおいて、Fig. 3.5c の黒い枠で示された幅 100 μm 、奥行き 10 μm の領域における解析結果を示している。この領域は、シミュレーションの対称性を考慮すると、厚さ 10 μm の骨切片の蛍光画像 (Fig. 3.5a) における白い枠で示された解析領域と対応している。以上の結果より、本研究で構築したモデルに基づき、細胞種ごとの適切な分裂頻度に基づく成長板の形成、および、維持のシミュレーションが可能であることが示された。

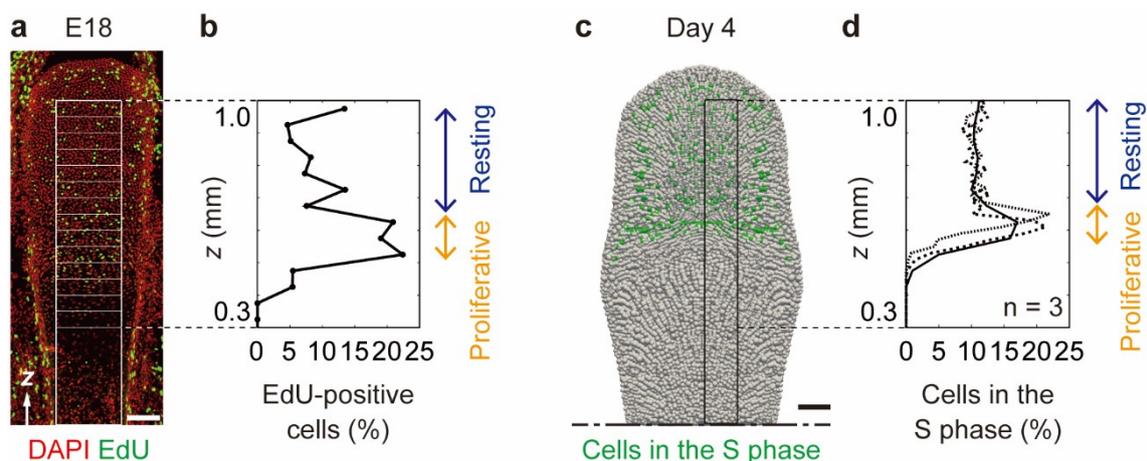


Figure 3.5 Validation of the frequency of division. **(a)** Fluorescent images of an E18 mouse third metatarsal; here, red: DAPI (DNA), whereas green: EdU (newly synthesized DNA). **(b)** Percentages of EdU-positive cells from the area, as indicated by the white frame in the fluorescent image (a) ($0.3 < z < 1.0$ (mm))). **(c)** Cells in the S phase (green) and other cells composing the tissue at Day 4 in the simulation; here, 10 μm offset of the r - z cross-section of half of the tissue is shown. **(d)** Percentages of cells in the S phase from the area, as indicated by the black frame in the cross-section (c) ($0.3 < z < 1.0$ (mm))). Scale bars: 100 μm .

3.4 考 察

本章では、骨形態形成における力学的因子の影響を評価することのできるシミュレーション基盤の構築を目指し、成長板における細胞分化を制御する単因子モデルを構築した。構築した単因子モデルに基づく一次元シミュレーションにより、生理的な長さの増殖層、および、肥大層を有する成長板構造が形成、維持され、骨全体が伸長する過程が再現可能となった。また、単因子モデルが *Igfl null* マウスにおける病理的な成長板構造の形成を表現可能であることが示された。さらに、単因子モデルを連続体ベース粒子モデルに基づく三次元多細胞シミュレーションに導入することで、マウスの第三中足骨における観察と対応する成長板構造の形成、維持、および、骨組織全体の伸長を、個々の細胞活動に基づき解析することが可能となった。最後に、この骨形態形成シミュレーションにおいて、細胞の分裂頻度分布がマウスの第三中足骨における観察結果と同様の傾向を示すことを検証した。

連続体ベース粒子モデルの基礎である material point method (MPM) (Bardenhagen and Kober 2004)は、主に地盤工学やコンピュータグラフィックスの分野で動的解析に用いられてきた(Bardenhagen and Kober, 2004; Pan et al., 2021; Stomakhin et al., 2013)。この MPM を静的な弾性解析に応用することにより、皮膚の伸展(Zhang et al., 2021)や多細胞組織における増殖(Yokoyama et al., 2023)の解析が可能とされてきた。本章では、さらに、単因子モデルの導入により、MPM に基づくシミュレーションにおいて初めて、生化学的因子による細胞活動の制御機構を考慮することが可能となった。これにより、成長板の形成、維持、および、それにとまなう骨組織の伸長という、時空間的に制御された多数の細胞種が関わる現象を再現することに成功した。したがって、本論文は MPM、および、連続体ベース粒子モデルの様々な生体现象への適用可能性を示すものである。

第 3.3.2 項では、単因子モデルにおける DF 産生量を低下させることにより、*Igfl null* マウスで観察される成長板構造が再現された。これは、骨形態形成における *Igfl* のはたらきが、単因子モデルにおける、DF 産生量の最大値 S_{\max} の変化にとまなう DF の濃度分布変化に対応することを意味する。一方で、DF の拡

散定数 D や分解速度定数 k を変化させた場合には, *Ihh* 過剰発現マウスで観察される増殖層長さの増大が再現された. 拡散定数 D や分解速度定数 k は, 拡散の長さスケールを支配するパラメータである. したがって, *Ihh* 過剰発現マウスにおける増殖層長さの変化は, 単因子モデルにおける拡散の長さスケールの変化に相当すると考えられる. 以上のように, 本研究で構築した単因子モデルは, DF の産生量, 拡散係数や分解速度定数の変化により, 複数の異なる病理的な成長板構造の形成を再現可能であることが示された.

本研究において, 三次元シミュレーションの基礎として用いた連続体ベース粒子モデルでは, 細胞活動を物質粒子の成長や分割により一細胞単位で明示的に表現する. そのため, 局所的な力学状態に応じた細胞活動の変化が組織形態に及ぼす影響を評価することが可能である. 先行研究では, 周期的な力学刺激が軟骨細胞による *Ihh* の産生, および, 増殖を促進することが *in vitro* 実験により示唆されている(Wu et al., 2001). また, 筋収縮にともなう骨への力学負荷が増殖軟骨細胞による軟骨カラムの形成に影響することが知られている(Shwartz et al., 2012). 本研究で可能となった三次元骨形態形成シミュレーションにおいて, これらの効果を細胞の力学応答として導入することにより, 力学状態に応じた細胞活動を骨形態の変化と結びつけることが可能となる. したがって, 本章で構築したシミュレーション基盤は, 骨形態形成制御メカニズム解明を推進する強力な解析手法となると期待される.

3.5 結 言

本章では, 成長板における細胞分化を制御する単因子モデルを構築し, 連続体ベース粒子モデルに基づく三次元多細胞シミュレーションに導入することで, 成長板構造の形成, 維持, および, 骨組織全体の伸長を個々の細胞活動に基づき解析するシミュレーション基盤を構築した. 本解析に細胞の力学応答の効果を導入することにより, 骨形態形成における力学的因子の影響を評価することが可能となる. したがって, 本研究は, 成長板の形成, および, 維持を通じた骨形態形成制御メカニズムの解明を推進する強力な解析手法を提案するものである.

参考文献

- Adachi, T., Osako, Y., Tanaka, M., Hojo, M., Hollister, S.J., 2006. Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. *Biomaterials* 27, 3964–3972. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.039>
- Alvarez, J., Sohn, P., Zeng, X., Doetschman, T., Robbins, D.J., Serra, R., 2002. TGF β 2 mediates the effects of Hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Development* 129, 1913–1924. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1913>
- Aszodi, A., Hunziker, E.B., Brakebusch, C., Fässler, R., 2003. β 1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.* 17, 2465–2479. <https://doi.org/10.1101/gad.277003>
- Bardenhagen, S.G., Kober, E.M., 2004. The generalized interpolation material point method. *CMES-Comp. Model. Eng. Sci.* 5, 477–495.
- Basu, S., Campagnola, P.J., 2004. Properties of crosslinked protein matrices for tissue engineering applications synthesized by multiphoton excitation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 71A, 359–368. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30175>
- Brouwers, J.E.M., van Donkelaar, C.C., Sengers, B.G., Huiskes, R., 2006. Can the growth factors PTHrP, Ihh and VEGF, together regulate the development of a long bone? *Journal of Biomechanics* 39, 2774–2782. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.10.004>
- Carrera-Pinzón, A.F., Márquez-Flórez, K., Kraft, R.H., Ramtani, S., Garzón-Alvarado, D.A., 2020. Computational model of a synovial joint morphogenesis. *Biomech Model Mechanobiol* 19, 1389–1402. <https://doi.org/10.1007/s10237-019-01277-4>
- Collins, J.M., Lang, A., Parisi, C., Moharrer, Y., Nijsure, M.P., Kim, J.H. (Thomas), Szeto, G.L., Qin, L., Gottardi, R., Dymont, N., Nowlan, N., Boerckel, J.D., 2023. YAP and TAZ couple osteoblast precursor mobilization to angiogenesis and mechanoregulated bone development (preprint). *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.01.20.524918>
- Farnum, C.E., Tinsley, M., Hermanson, J.W., 2008. Forelimb versus Hindlimb Skeletal Development in the Big Brown Bat, *Eptesicus fuscus*: Functional Divergence Is Reflected in Chondrocytic Performance in Autopodial Growth Plates. *CTO* 187, 35–47. <https://doi.org/10.1159/000109962>
- Felsenthal, N., Zelzer, E., 2017. Mechanical regulation of musculoskeletal system development. *Development* 144, 4271–4283. <https://doi.org/10.1242/dev.151266>
- Galea, G.L., Zein, M.R., Allen, S., Francis-West, P., 2021. Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Developmental Dynamics* 250, 414–449. <https://doi.org/10.1002/dvdy.278>

- Garzón-Alvarado, D.A., García-Aznar, J.M., Doblaré, M., 2009. A reaction–diffusion model for long bones growth. *Biomech Model Mechanobiol* 8, 381–395. <https://doi.org/10.1007/s10237-008-0144-z>
- Gemp, I.M., Carthew, R.W., Hilgenfeldt, S., 2011. Cadherin-Dependent Cell Morphology in an Epithelium: Constructing a Quantitative Dynamical Model. *PLOS Computational Biology* 7, e1002115. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002115>
- Green, J.D., Tollemar, V., Dougherty, M., Yan, Z., Yin, L., Ye, J., Collier, Z., Mohammed, M.K., Haydon, R.C., Luu, H.H., Kang, R., Lee, M.J., Ho, S.H., He, T.-C., Shi, L.L., Athiviraham, A., 2015. Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes & Diseases* 2, 307–327. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.09.003>
- Hara, E.S., Okada, M., Nagaoka, N., Hattori, T., Iida, L.M., Kuboki, T., Nakano, T., Matsumoto, T., 2018. Chondrocyte burst promotes space for mineral expansion. *Integr. Biol.* 10, 57–66. <https://doi.org/10.1039/C7IB00130D>
- Hayashi, T., Carthew, R.W., 2004. Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina. *Nature* 431, 647–652. <https://doi.org/10.1038/nature02952>
- Hilgenfeldt, S., Eriskin, S., Carthew, R.W., 2008. Physical modeling of cell geometric order in an epithelial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 907–911. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711077105>
- Hilton, M.J., Tu, X., Long, F., 2007. Tamoxifen-inducible gene deletion reveals a distinct cell type associated with trabecular bone, and direct regulation of PTHrP expression and chondrocyte morphology by *Ihh* in growth region cartilage. *Developmental Biology* 308, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.05.011>
- Himpel, G., Kuhl, E., Menzel, A., Steinmann, P., 2005. Computational Modelling of Isotropic Multiplicative Growth. *Computer Modeling in Engineering & Sciences* 8, 119–134. <https://doi.org/10.3970/cmcs.2005.008.119>
- Kameo, Y., Miya, Y., Hayashi, M., Nakashima, T., Adachi, T., 2020. In silico experiments of bone remodeling explore metabolic diseases and their drug treatment. *Sci. Adv.* 6, eaax0938. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0938>
- Kawamoto, T., 2003. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Arch. Histol. Cytol.* 66, 123–143. <https://doi.org/10.1679/aohc.66.123>
- Kawamoto, T., Kawamoto, K., 2021. Preparation of Thin Frozen Sections from Nonfixed and Undecalcified Hard Tissues Using Kawamoto’s Film Method (2020), in: Hilton, M.J. (Ed.), *Skeletal Development and Repair: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer US, New York, NY, pp. 259–281. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1028-2_15
- Kobayashi, T., 2005. Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *Journal of Clinical Investigation* 115, 1734–1742. <https://doi.org/10.1172/JCI24397>

- Kozhemyakina, E., Lassar, A.B., Zelzer, E., 2015. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development* 142, 817–831. <https://doi.org/10.1242/dev.105536>
- Kronenberg, H.M., 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–336. <https://doi.org/10.1038/nature01657>
- Li, Y., Dudley, A.T., 2009. Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development* 136, 1083–1092. <https://doi.org/10.1242/dev.023820>
- Li, Y., Li, A., Junge, J., Bronner, M., 2017. Planar cell polarity signaling coordinates oriented cell division and cell rearrangement in clonally expanding growth plate cartilage. *eLife* 6, e23279. <https://doi.org/10.7554/eLife.23279>
- Long, F., Chung, U., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H.M., McMahon, A.P., 2004. Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 131, 1309–1318. <https://doi.org/10.1242/dev.01006>
- Luo, Q., Kuang, D., Zhang, B., Song, G., 2016. Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1860, 1953–1960. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.010>
- Malmi-Kakkada, A.N., Sinha, S., Li, X., Thirumalai, D., 2022. Adhesion strength between cells regulate nonmonotonic growth by a biomechanical feedback mechanism. *Biophysical Journal* 121, 3719–3729. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.04.032>
- Nguyen, J.C., Markhardt, B.K., Mellow, A.C., Dwek, J.R., 2017. Imaging of Pediatric Growth Plate Disturbances. *RadioGraphics* 37, 1791–1812. <https://doi.org/10.1148/rg.2017170029>
- Pan, S., Yamaguchi, Y., Suppasri, A., Moriguchi, S., Terada, K., 2021. MPM–FEM hybrid method for granular mass–water interaction problems. *Comput Mech* 68, 155–173. <https://doi.org/10.1007/s00466-021-02024-2>
- Philpott, C.J., Rahman, N.A., Kenny, N., Londo, T.R., Young, R.M., George Barisas, B., Roess, D.A., 1995. Rotational dynamics of luteinizing hormone receptors and MHC Class I antigens on murine Leydig cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1235, 62–68. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)00277-V](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)00277-V)
- Pollard, A.S., Charlton, B.G., Hutchinson, J.R., Gustafsson, T., McGonnell, I.M., Timmons, J.A., Pitsillides, A.A., 2017. Limb proportions show developmental plasticity in response to embryo movement. *Sci Rep* 7, 41926. <https://doi.org/10.1038/srep41926>
- Provot, S., Schipani, E., 2005. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Vertebrate Skeletal Biology* 328, 658–665. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.068>
- Reno, P.L., Mcburney, D.L., Lovejoy, C.O., Horton Jr., W.E., 2006. Ossification of the mouse metatarsal: Differentiation and proliferation in the presence/absence of a

- defined growth plate. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 288A, 104–118. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20268>
- Romereim, S.M., Conoan, N.H., Chen, B., Dudley, A.T., 2014. A dynamic cell adhesion surface regulates tissue architecture in growth plate cartilage. *Development* 141, 2085–2095. <https://doi.org/10.1242/dev.105452>
- Rooij, R. de, Kuhl, E., 2018. A physical multifield model predicts the development of volume and structure in the human brain. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 112, 563–576. <https://doi.org/10.1016/j.jmps.2017.12.011>
- Rubin, S., Agrawal, A., Stegmaier, J., Krief, S., Felsenthal, N., Svorai, J., Addadi, Y., Villoutreix, P., Stern, T., Zelzer, E., 2021. Application of 3D MAPs pipeline identifies the morphological sequence chondrocytes undergo and the regulatory role of GDF5 in this process. *Nat Commun* 12, 5363. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25714-0>
- Shwartz, Y., Farkas, Z., Stern, T., Aszódi, A., Zelzer, E., 2012. Muscle contraction controls skeletal morphogenesis through regulation of chondrocyte convergent extension. *Developmental Biology* 370, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.026>
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A.P., 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Development* 13, 2072–2086. <https://doi.org/10.1101/gad.13.16.2072>
- Stomakhin, A., Schroeder, C., Chai, L., Teran, J., Selle, A., 2013. A material point method for snow simulation. *ACM Trans. Graph.* 32, 1–10. <https://doi.org/10.1145/2461912.2461948>
- Studer, D., Millan, C., Oeztuerk, E., Maniura-Weber, K., Zenobi-Wong, M., 2012. Molecular and Biophysical Mechanisms Regulating Hypertrophic Differentiation in Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells. *Eur. Cells Mater.* 24, 118–135. <https://doi.org/10.22203/eCM.v024a09>
- Takeda, H., Kameo, Y., Inoue, Y., Adachi, T., 2020. An energy landscape approach to understanding variety and robustness in tissue morphogenesis. *Biomech Model Mechanobiol* 19, 471–479. <https://doi.org/10.1007/s10237-019-01222-5>
- Trickey, W.R., Baaijens, F.P.T., Laursen, T.A., Alexopoulos, L.G., Guilak, F., 2006. Determination of the Poisson's ratio of the cell: recovery properties of chondrocytes after release from complete micropipette aspiration. *Journal of Biomechanics* 39, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.11.006>
- Vaca-González, J.J., Moncayo-Donoso, M., Guevara, J.M., Hata, Y., Shefelbine, S.J., Garzón-Alvarado, D.A., 2018. Mechanobiological modeling of endochondral ossification: an experimental and computational analysis. *Biomech Model Mechanobiol* 17, 853–875. <https://doi.org/10.1007/s10237-017-0997-0>
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., Tabin, C.J., 1996. Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. *Science* 273, 613–622.

<https://doi.org/10.1126/science.273.5275.613>

- Wang, J., Zhou, J., Cheng, C., Kopchick, J., Bondy, C., 2004. Evidence supporting dual, IGF-I-independent and IGF-I-dependent, roles for GH in promoting longitudinal bone growth. *Journal of Endocrinology* 180, 247–255. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1800247>
- Wilsman, N.J., Farnum, C.E., Green, E.M., Lieferman, E.M., Clayton, M.K., 1996. Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. *Journal of Orthopaedic Research* 14, 562–572. <https://doi.org/10.1002/jor.1100140410>
- Wu, Q., Zhang, Y., Chen, Q., 2001. Indian hedgehog Is an Essential Component of Mechanotransduction Complex to Stimulate Chondrocyte Proliferation *. *Journal of Biological Chemistry* 276, 35290–35296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101055200>
- Yokoyama, Y., Kameo, Y., Adachi, T., 2023. Development of continuum-based particle models of cell growth and proliferation for simulating tissue morphogenesis. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 142, 105828. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2023.105828>
- Zelzer, E., Mamluk, R., Ferrara, N., Johnson, R.S., Schipani, E., Olsen, B.R., 2004. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 131, 2161–2171. <https://doi.org/10.1242/dev.01053>
- Zelzer, E., McLean, W., Ng, Y.-S., Fukai, N., Reginato, A.M., Lovejoy, S., D'Amore, P.A., Olsen, B.R., 2002. Skeletal defects in VEGF120/120 mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 129, 1893–1904. <https://doi.org/10.1242/dev.129.8.1893>
- Zhang, Z., Pan, Y., Wang, J., Zhang, H., Chen, Z., Zheng, Y., Ye, H., 2021. A total-Lagrangian material point method for coupled growth and massive deformation of incompressible soft materials. *Numerical Meth Engineering* 122, 6180–6202. <https://doi.org/10.1002/nme.6787>

第 4 章

多細胞動態により生じる 応力異方性を介した骨形態制御機構の解明

本章では，第 2 章で構築した連続体ベース粒子モデルに，第 3 章で構築した単因子モデルを導入することで可能となった骨形態形成シミュレーションにおいて，成長板内の力学解析を行う．特に，成長板における軟骨カラム形成に影響を及ぼす力学的因子に着目する．これにより，多細胞動態による骨形態形成の力学的制御メカニズムの理解を目指す．

4.1 緒 言

大腿骨や中足骨などの長骨の伸長は，適切な長さの四肢を構成し身体の運動を可能とするため，形態形成過程を通じて安定的に制御されている．長骨の伸長を主に制御しているのは，成長板(growth plate)とよばれる，軟骨細胞の増殖層(proliferative zone)，前肥大層(prehypertrophic zone)，および，肥大層(hypertrophic zone)からなる層構造における細胞活動である(Galea et al., 2021; Kozhemyakina et al., 2015; Kronenberg, 2003; Nguyen et al., 2017; Provot and Schipani, 2005)．この成長板は，一次骨化中心において形成される一次海綿骨の両端に存在し，軟骨細胞の段階的な分化，増殖，および，肥大化を通じて，骨形態形成の過程にわたり維持される．成長板の増殖層においては，分裂後の軟骨細胞が扁平化し骨の長軸方向に整列することで，軟骨カラムが形成される(Aszodi et al., 2003; Li et al., 2017; Li and Dudley, 2009; Romereim et al., 2014)．軟骨カラム内の細胞が後に分化し肥

大化することにより、骨の長軸方向への大幅な成長が実現される(Kronenberg, 2003). したがって、成長板内の増殖軟骨細胞によるカラム形成は、骨の伸長を制御する重要な要素である.

成長板における分化や軟骨カラム形成などの細胞活動は、Indian hedgehog (Ihh), 副甲状腺ホルモン関連蛋白(parathyroid hormone-related protein, PTHrP), 血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), Wntをはじめとする多数の生化学的シグナル因子により制御される(Kozhemyakina et al., 2015; Long et al., 2004; Provot and Schipani, 2005; St-Jacques et al., 1999; Vortkamp et al., 1996). また、腱、靭帯や他の骨などの周囲組織から与えられる力学負荷も、細胞活動を制御する重要な因子である(Collins et al., 2023; Felsenthal and Zelzer, 2017; Pollard et al., 2017; Schwartz et al., 2012; Wu et al., 2001). 先行研究においては、*in vitro* の軟骨細胞に周期的な張力を与えることにより、軟骨細胞の増殖を促進する生化学的因子である Ihh の産生量が増加することが示された(St-Jacques et al., 1999; Wu et al., 2001). また、麻痺により筋収縮ともなう力学負荷が骨に作用しない場合には、成長板の増殖層における軟骨カラム形成に異常が生じることが知られている(Schwartz et al., 2012). このように、力学的因子が細胞活動の制御において重要な役割を果たしているにもかかわらず、形成過程の骨組織内部における応力場などの力学状態を計測することが困難であるために、力学的因子が骨形態形成過程における多細胞動態を時空間的に制御するメカニズムは明らかではない.

組織内部の力学状態を推定し、骨形態形成過程の多細胞動態が制御されるメカニズムを明らかにするために、力学モデリング、および、計算機シミュレーションは有力な手段となりうる. 第 3 章では、細胞分化を表現する単因子モデルを、細胞活動の連続体ベース粒子モデルに基づくシミュレーションに導入することにより、成長板の形成、および、維持を通じた骨形態形成の過程において、組織内部における力学解析が可能となった. 本章では、成長板の増殖層における軟骨カラム形成に着目し、骨形態形成シミュレーションを用いて成長板における応力場を解析することにより、長骨の形態形成に影響を及ぼす細胞活動の力学的制御メカニズムを明らかにすることを目的とする.

4.2 手 法

4.2.1 連続体ベース粒子モデルに基づく骨形態形成シミュレーション

骨形態形成過程における組織内部の応力場を解析するため、マウス第三中足骨における成長板の形成、および、維持にともなう骨形態形成シミュレーションを行った。シミュレーションに用いた、細胞分化を表現する単因子モデル、および、細胞活動を記述する連続体ベース粒子モデルについては、第 3.2.3 項、および、第 3.2.5 項をそれぞれ参照する。また、比較のため行ったマウス第三中足骨の HE 染色の手法は、第 3.2.1 項を参照する。

4.2.2 骨形態形成シミュレーションにおける応力解析

連続体ベース粒子モデルに基づくシミュレーションにおいて、細胞に相当する物質粒子 p における応力 σ_p を、式(3.5)に示されるひずみエネルギー密度関数に従い、変形勾配テンソルの弾性変形成分 \mathbf{F}_p^e に基づき計算した。しかしながら、計算された応力場は、個々の細胞活動にともない、一細胞レベルで空間的に不連続になりうる。これは、第 2.3.1 項で述べたように、オイラーグリッドを用いた組織の変形解析の精度が、細胞間隔 (~ 物質粒子の代表長さ $L_p = 10 \mu\text{m}$) より大きいグリッド間隔 $h = 50 \mu\text{m}$ に依存するためである。したがって、本章における応力解析には、第 2.2.1 項の変形解析で用いたものと同じ内挿関数 $N_p(\mathbf{x})$ を用いて計算される平均化応力 σ_{p_smo} を使用した。

$$\sigma_{p_smo} = \frac{\sum_{p'} \sigma_{p'} V_{p'} N_p(\mathbf{x}_{p'})}{\sum_{p'} V_{p'} N_p(\mathbf{x}_{p'})} \quad (4.1)$$

ここで、 \mathbf{x}_p と V_p はそれぞれ物質粒子 p の位置と体積である。

4.3 結果

4.3.1 増殖軟骨細胞層の応力異方性による軟骨カラム形成

成長板内で増殖軟骨細胞が骨の長軸方向に積み重なる軟骨カラムの形成は、骨の伸長を制御するうえで重要である。この軟骨カラムは、E16 マウス第三中足骨の HE 染色において明らかに観察された(Fig. 4.1a)。第 3 章で可能となった骨形態形成シミュレーション(Fig. 4.1b)においては、第 3.2.5 項 A で述べたように、分裂後の再配列の結果として細胞が整列する方向を想定し、細胞の分裂方向 \mathbf{n}_s を最小主応力方向と定めた(Fig. 4.1c)。増殖軟骨細胞の分裂方向 \mathbf{n}_s のヒストグラム(Fig. 4.1d)から、分裂後の細胞の整列方向が一様に z 方向に近いことが確認された。これは、シミュレーションにおいても増殖層で軟骨カラムが形成されていることを示している。ここで、成長板内の各層の辺縁部は、軟骨膜および骨性骨膜襟の影響により、層内の他の部分と異なる力学状態にあるため、Fig. 4.1b 内の赤い枠で示された内部領域($r \leq 150$ (μm))において得られたデータのみが解析に使用された。

軟骨カラムの形成メカニズムを明らかにするため、組織内における半径方向(r)、円周方向(θ)、骨長軸方向(z)それぞれの垂直応力 $\sigma_r, \sigma_\theta, \sigma_z$ の分布を解析した(Fig. 4.2a)。これにより、増殖層における応力状態が肥大層における応力状態と定性的に異なることが明らかとなった。肥大層においては、全ての方向の応力が負（圧縮）であることが示された(Figs. 4.2a, b)。対照的に、増殖層においては、骨長軸方向の応力(σ_z)は負（圧縮）であった一方で、半径方向、および、円周方向の応力(σ_r, σ_θ)は正（引張）であり(Fig. 4.2a)、円盤状の増殖層における面内張力の存在を示していた(Fig. 4.2b)。増殖層における半径方向と円周方向の引張応力、および、骨長軸方向の圧縮応力は、Fig. 4.2c においても確かめられた。これらの結果より、増殖層においては、骨長軸方向(z)に沿った軟骨カラム形成を導く、 r - θ 面内張力と z 方向圧縮力からなる応力異方性が生じることが示された。

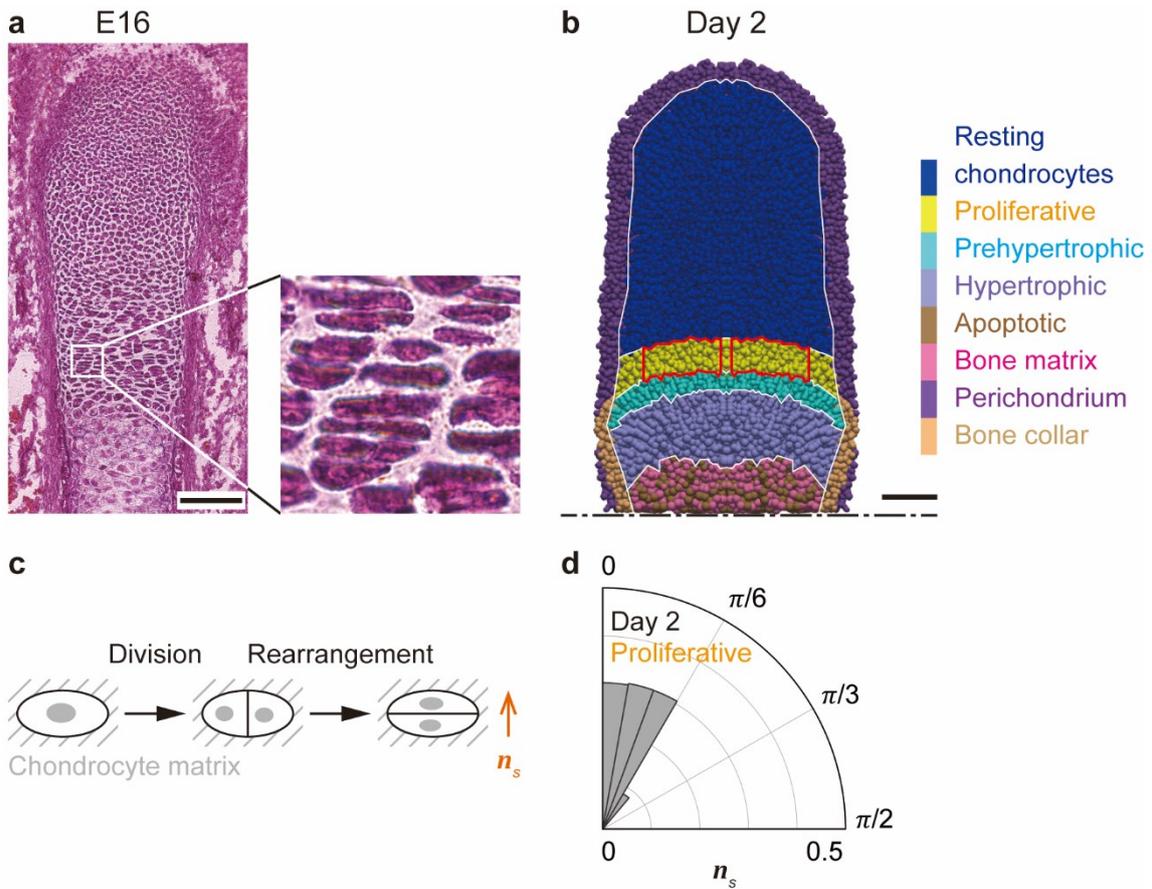


Figure 4.1 Chondrocyte columns within the growth plate. **(a)** HE staining of the third metatarsal of an E16 mouse. **(b)** Growth plate structure in 3D simulation at Day 2; here, 50 μm offset of the r - z cross-section of half of the tissue is shown. **(c)** Diagram of cell division and following rearrangement to align in the most compressive direction of the parent cell. **(d)** Histogram of the division direction n_s of proliferative cells in the region indicated by the red frame in (b) at Day 2, measured from the z -axis; here, cell number is divided by the solid angle of the corresponding direction of division and normalized. Scale bars: 100 μm .

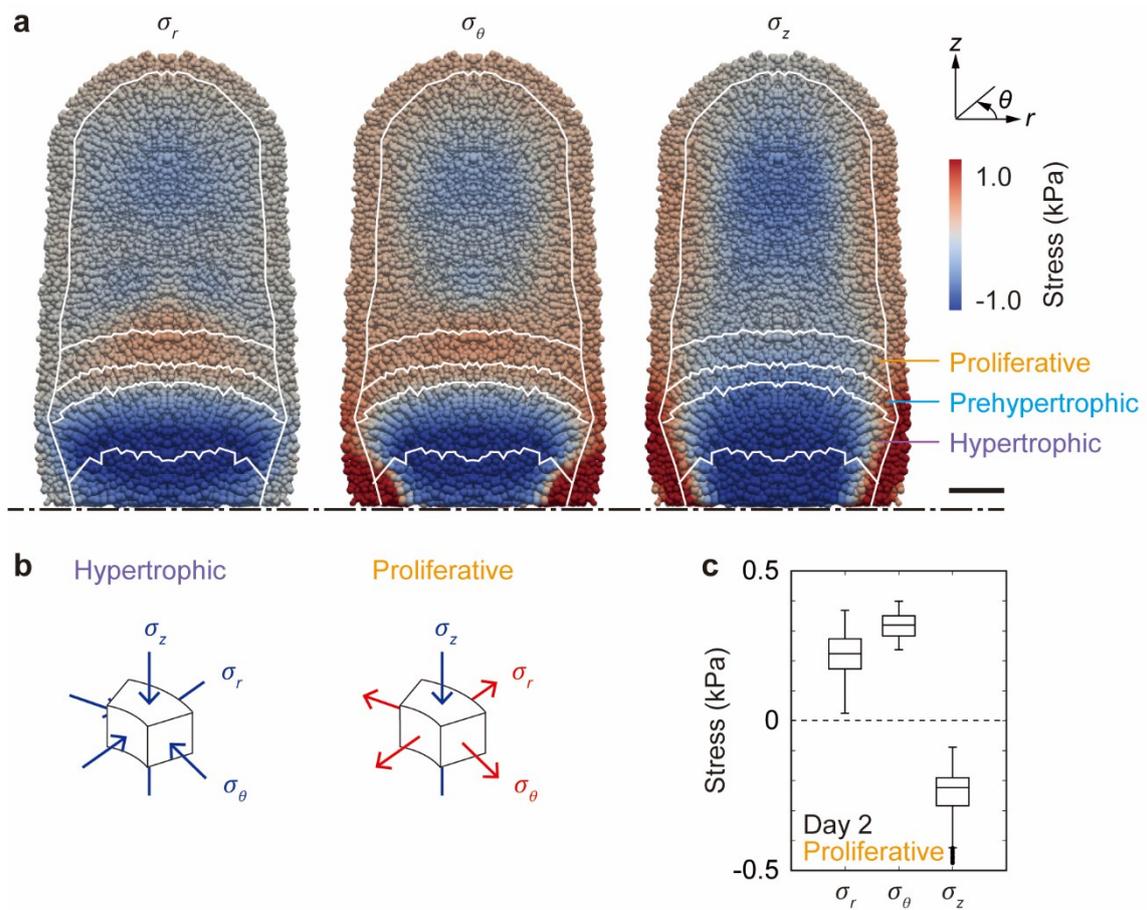


Figure 4.2 Stress field within the growth plate. **(a)** Distribution of stress in radial (σ_r), circumferential (σ_θ), and bone longitudinal (σ_z) directions at Day 2. **(b)** Stress in the hypertrophic and proliferative zones. **(c)** Stress in radial (σ_r), circumferential (σ_θ), and bone longitudinal (σ_z) directions of proliferative cells at Day 2. Scale bar: 100 μm .

4.3.2 軟骨カラム形成による骨形態制御

応力場と軟骨カラム形成の関係が長骨の形態形成に及ぼす影響を評価するため、分裂後の細胞再配列が阻害された条件におけるシミュレーションを行った。細胞再配列の異常は、カドヘリン接着を減少させた実験(Romereim et al., 2014)や、 $\beta 1$ インテグリン遺伝子の発現を阻害した実験(Aszodi et al., 2003)において観察されている。本研究では、細胞の分裂方向 \mathbf{n}_s を親細胞の最も伸長している方向、すなわち、最大主応力方向と設定する(Fig. 4.3a)ことにより、細胞再配列が阻害された No-rearrangement 条件のシミュレーションを行った(Fig. 4.3b)。予想された通り、分裂方向 \mathbf{n}_s は z 方向に配向せず(Fig. 4.3c)、骨長軸方向に沿った軟骨カラム形成の阻害が確認された。この結果は、増殖層における半径方向と円周方向の引張応力(σ_r, σ_θ)、および、骨長軸方向の圧縮応力(σ_z)によるものであった(Fig. 4.3d)。

分裂後の細胞再配列の阻害は、骨形態にも影響を及ぼした(Fig. 4.3b)。Day 0 から Day 4 にわたる成長板の形成、および、維持の過程を通じて、軟骨膜と骨性骨膜襟を含む組織の伸長速度は、細胞再配列を阻害しない Normal 条件に比べ、No-rearrangement 条件において遅かった(Fig. 4.3e)。これに対して、組織全体の太さの成長は、Normal 条件に比べ No-rearrangement 条件において速かった(Fig. 4.3f)。No-rearrangement 条件における、短く太い骨が形成されるという傾向は、 $\beta 1$ インテグリン遺伝子の発現を阻害した実験(Aszodi et al., 2003)における骨形態の傾向と一致していた。以上の結果から、本研究で構築された連続体ベース粒子モデルに基づくシミュレーションにより、細胞活動の違いに応じた骨形態の変化を解析可能であることが示されるとともに、骨形態の制御における、応力場と軟骨カラム形成の関係の重要性が明らかとなった。

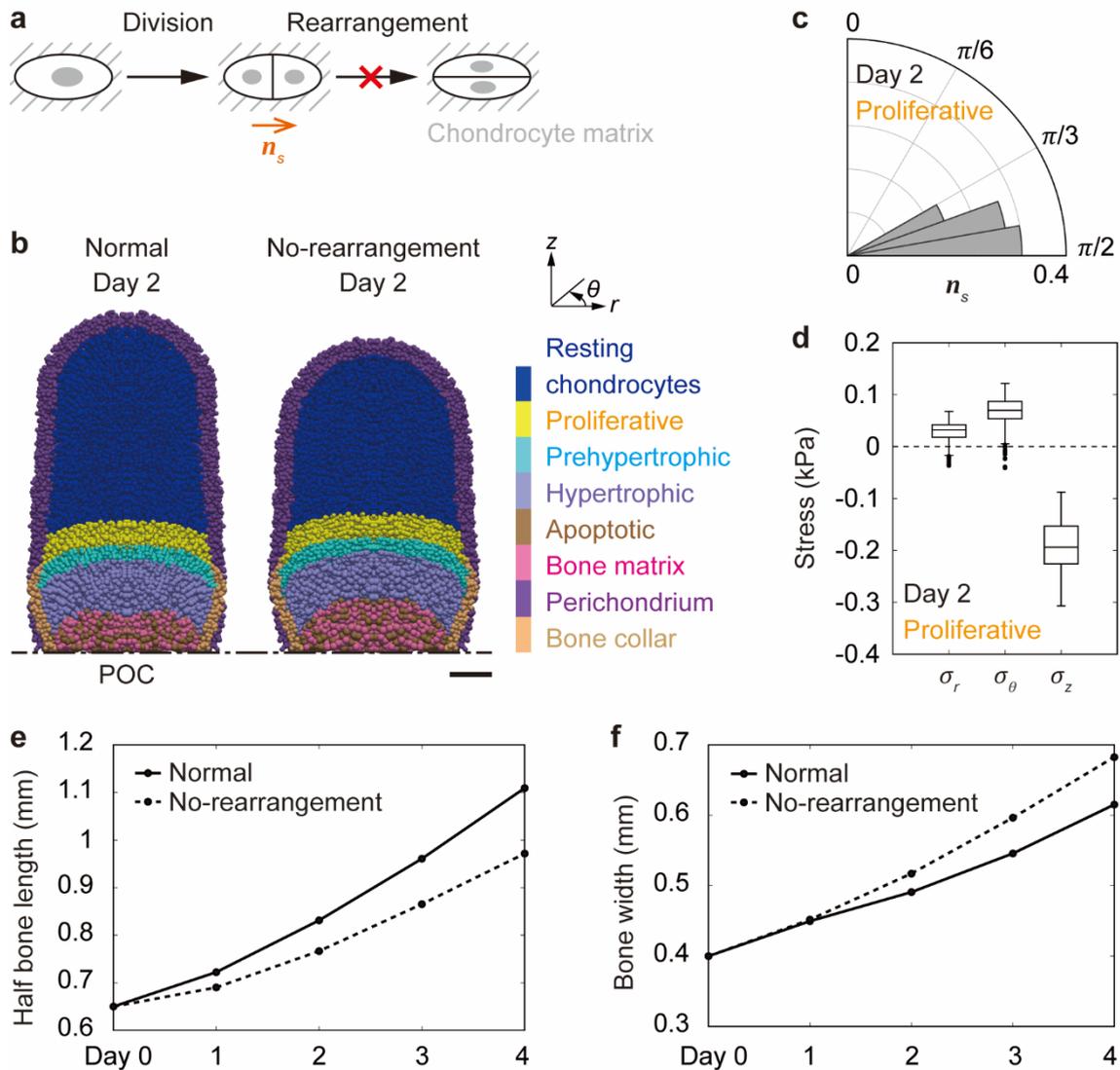


Figure 4.3 Effect of column formation on the development of bone shape. **(a)** Diagram indicating the disruption of cell rearrangement after division. **(b)** Growth plate structure in the simulations with (Normal) and without cell rearrangement (No-rearrangement) at Day 2; here, 50 μm offset of the r - z cross sections of half of the tissues are shown. **(c)** Histogram of the division direction n_s in the proliferative zone at Day 2 in the No-rearrangement simulation, measured from the z -axis. **(d)** Stress in radial (σ_r), circumferential (σ_θ), and bone longitudinal (σ_z) directions of proliferative cells at Day 2 in the No-rearrangement simulation. **(e)** Change in the half-length of tissues in the Normal and No-rearrangement simulations. **(f)** Change in the width of tissues in the Normal and No-rearrangement simulations. Scale bar: 100 μm .

4.3.3 軟骨細胞の肥大化による増殖層の応力異方性誘導

軟骨カラム形成を通じて骨形態形成に影響を及ぼす増殖層の応力異方性の原因を調べるため、増殖層周辺における代表的な細胞活動である軟骨細胞の肥大化に着目した。前肥大層、および、肥大層における細胞の肥大化が増殖層の応力場に及ぼす影響を評価するため、細胞周期を完了した後の前肥大軟骨細胞、および、肥大軟骨細胞による等方成長が阻害された **No-growth** 条件において、骨形態形成シミュレーションを行った(Fig. 4.4a)。その結果、増殖層の大部分において、半径方向と円周方向の応力(σ_r , σ_θ)が、骨長軸方向の応力(σ_z)と同様に負(圧縮)となり(Fig. 4.4b)、**Normal** 条件において生じていた面内張力(Fig. 4.2)が消失したことが明らかとなった。

No-growth 条件における増殖層内の応力場を **Normal** 条件における応力場と比較した解析(Fig. 4.4c)からも、**No-growth** 条件下では半径方向と円周方向の応力(σ_r , σ_θ)の中央値が正值から負値へと大幅に抑制されていることが確認された。結果として、最大主応力(σ_{\max})と最小主応力(σ_{\min})の差として評価される応力異方性は、**Normal** 条件に比べ **No-growth** 条件において小さかった(Fig. 4.4d)。各応力状態に対応する代表的な細胞の変形状態を、Fig. 4.4d 内の黄色い楕円により併せて示している。これらの結果より、**Normal** 条件においては、**No-growth** 条件に比べ強い応力異方性に起因して、細胞がより扁平な形態を有しており、親細胞の圧縮方向へと安定的に細胞が再配列される可能性がある。以上により、軟骨カラム形成を介し骨形態形成に影響を及ぼす、増殖層における面内張力をともなう強い応力異方性は、軟骨細胞の肥大化に起因することが明らかとなった。

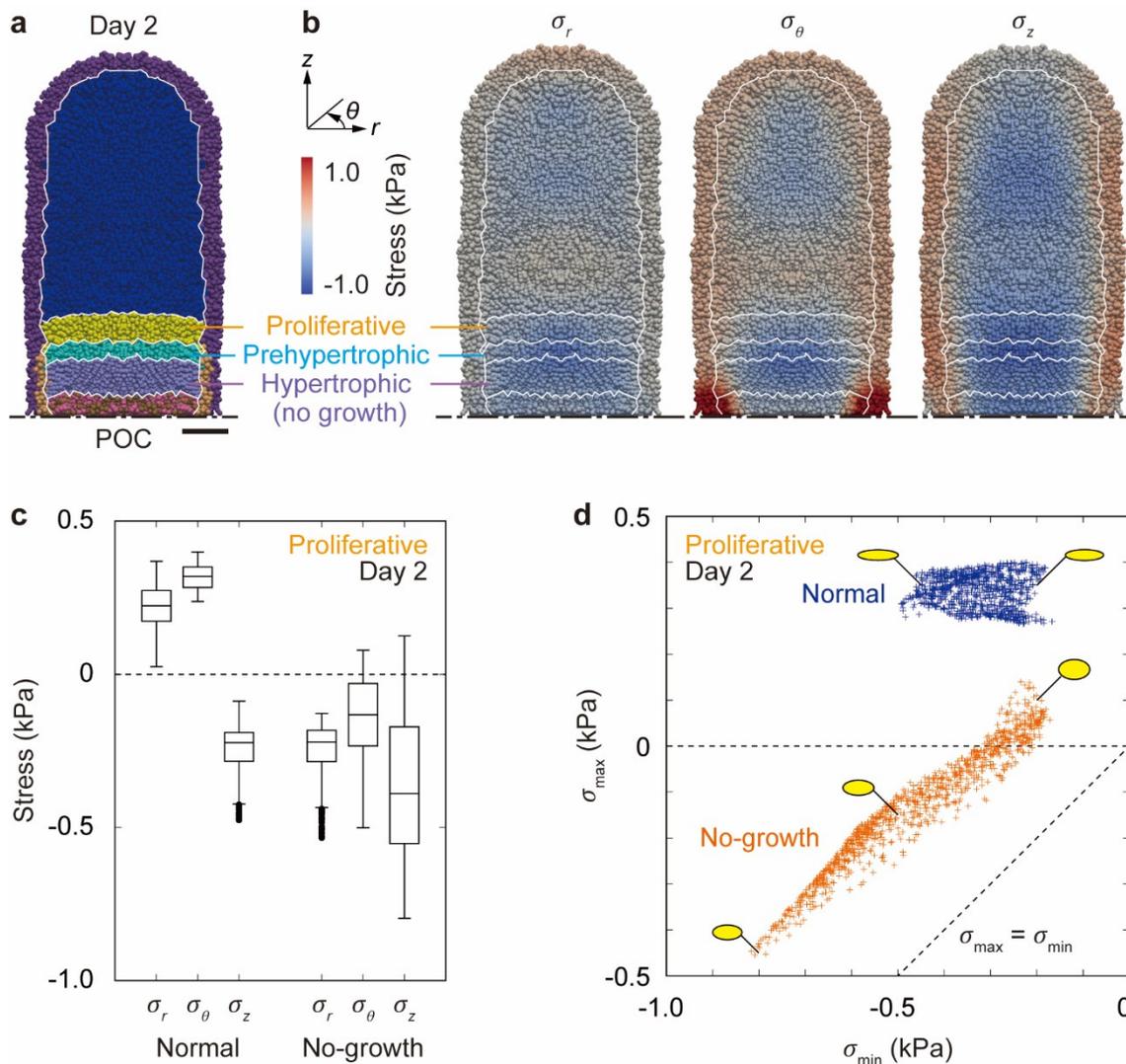


Figure 4.4 Effect of chondrocyte hypertrophy on stress anisotropy. **(a)** Growth plate structure in the No-growth simulation at Day 2; here, 50 μm offset of the r - z cross sections of half of the tissue is shown. **(b)** Distribution of stress in radial (σ_r), circumferential (σ_θ), and bone longitudinal (σ_z) directions at Day 2 in the No-growth simulation. **(c)** Stress in radial (σ_r), circumferential (σ_θ), and bone longitudinal (σ_z) directions of proliferative cells at Day 2 in the Normal and No-growth simulations. **(d)** Relation between maximum (σ_{\max}) and minimum (σ_{\min}) principal stress of proliferative cells at Day 2 in the Normal and No-growth simulations. Representative deformation states of cells are shown by yellow ellipses. Scale bar: 100 μm .

4.4 考 察

本章では、長骨の形態形成に影響を及ぼす細胞活動の力学的制御メカニズムを明らかにするため、第3章で構築した骨形態形成シミュレーション基盤を用いて、成長板における力学状態を解析した。その結果、増殖層には軟骨カラム形成を介し骨形態形成に影響を及ぼす応力異方性が存在し、その応力異方性は軟骨細胞の肥大化に起因することが明らかとなった。

骨形態形成における組織レベルの変形解析には、多くの場合、有限要素法が効果的に適用されてきた(Garzón-Alvarado et al., 2009; Sadeghian et al., 2021; Vaca-González et al., 2018)。しかしながら、有限要素法に基づく解析においては、個々の細胞について異なる方向や異なるタイミングでの分裂など、空間的に不均一な細胞活動を考慮することは困難であった。本研究では、連続体ベース粒子モデルを骨形態形成シミュレーションに適用し、組織の離散化に用いられる物質粒子を、一細胞と周囲の軟骨基質を代表する点とみなした。本モデルでは、細胞の形態や細胞間の接続情報を一細胞単位で得ることはできないものの、個々の細胞の分裂や肥大化などの活動を明示的に表現し、組織レベルの変形解析に組み込むことが可能である。この多階層性により、成長板内の応力解析(Figs. 4.2a, 4.4b)、および、力学条件に応じた個々の細胞活動(Figs. 4.1c, 4.3a)にともなう骨形態変化の予測(Figs. 4.3e, f)が可能となった。本研究で構築したシミュレーション基盤は、様々な多細胞組織の発生および恒常性維持において、一細胞単位の現象と組織レベルの現象をつなぐ強力な手法となると期待される。

増殖層における r - θ 面内張力は、細胞が肥大化しない No-growth 条件において消失した(Figs. 4.4b, c)。このことから、面内張力は、急速に等方成長する肥大層と、軟骨カラムを形成し主に骨長軸方向に成長する増殖層との、 r - θ 面内成長速度の差に起因すると推定される。実際、Normal 条件における面内応力(σ_r and σ_θ in Fig. 4.2a)は、肥大層における負の値(圧縮)から増殖層における正の値(引張)へと、骨長軸方向に沿って急激に変化した。したがって、異なる活動を示す細胞群が層状に分布した成長板構造が、増殖層における面内張力の原因であると考えられる。結果として、本研究により、応力異方性の発生における成長板構造の

重要性が示唆された。

長骨の伸長における軟骨カラム形成の重要性は広く認識されているが、骨組織内部で細胞の配置が制御されるメカニズムや、そのメカニズムにおける力学的因子の役割については未解明な部分が多い(Dodds, 1930; Rubin et al., 2021). 実際、古くからの二次元的な観察に基づき、軟骨カラムは骨長軸方向に細胞が整列し形成されると考えられてきたが、近年の三次元的な解析により、形態形成初期段階の増殖軟骨細胞は配列方向の乱れを有するクラスターを構成することが明らかにされつつある(Dodds, 1930; Rubin et al., 2023, 2021). この細胞配列方向の乱れは、骨形態形成初期段階における応力場や細胞活動のゆらぎに関連している可能性がある。また、増殖層における軟骨カラム形成に必要なシグナル分子やその他の生物学的な因子は、Wnt, N-cadherin, インテグリン結合キナーゼ, Rac1, frizzled を含め多数同定されているものの、それらのシグナル分子が協調的にはたらき、分裂後の細胞を再配列させるメカニズムは明らかではない(Gao et al., 2011; Grashoff et al., 2003; Li et al., 2017; Li and Dudley, 2009; Wang et al., 2007). 本研究では、それらのシグナル分子と細胞の形態変化をつなぐメカニズムとして、細胞の膜弾性と接着を考慮したエネルギーに関する仮説(Gemp et al., 2011; Hayashi and Carthew, 2004; Hilgenfeldt et al., 2008; Malmi-Kakkada et al., 2022)に基づき、分裂後の細胞が、親細胞の最も圧縮されている方向、すなわち、最小主応力方向に再配列すると仮定した(Fig. 4.1c). この一細胞単位の再配列に関する仮定に基づくシミュレーションにより、骨長軸方向に沿った軟骨カラム形成が組織レベルで確認された(Fig. 4.1d). この結果は、最も圧縮されている方向に細胞が再配列するという仮定が、成長板内の軟骨カラム形成を導くメカニズムとして妥当性を有することを示唆している。一方で、先行研究においては、少数ながら、親細胞の形態と無関係な方向に再配列する細胞対も観察されている(Romereim et al., 2014). このような観察結果は、シグナル分子に応じた細胞膜のターンオーバー速度や接着分子の産生量など、細胞再配列のメカニズムにおける追加の要素の存在を示唆している。そのような要素の影響は、細胞活動の観察(Romereim et al., 2014)と本研究におけるシミュレーション結果を比較することにより明らかになると期待される。

本研究における細胞再配列モデルでは、細胞活動のゆらぎが考慮されてい

いため、分裂後の細胞の再配列方向は、親細胞の最も圧縮されている方向、すなわち、最小主応力方向と厳密に決定された(Fig. 4.1c). このように、応力異方性に対する感度を過度に高く仮定したために、第 4.3.3 項で行った No-growth シミュレーションでは、応力異方性が小さい(Fig. 4.4d)にも関わらず、増殖軟骨細胞が軟骨カラムを形成した(Fig. A5.1). この No-growth シミュレーションでは、確かに増殖層の大部分において、骨長軸方向の応力(σ_z)が他の方向の応力(σ_r , σ_θ)よりも強い圧縮を示していた(Figs. 4.4b, c). このような応力場は、付録 A.5 にて示されるように、成長板構造に関わらず、長骨の細長い形態に起因して生じていた. しかしながら、No-growth シミュレーションにおける増殖層のように応力異方性が小さい場合、軟骨カラム形成には細胞のゆらぎに起因する乱れが生じると考えられる. したがって、細胞のゆらぎによるランダムな効果を考慮すると、強い応力異方性の誘導という軟骨細胞肥大化の効果は、軟骨カラムの形成メカニズムにおいて重要であると考えられる.

本研究で示唆された軟骨カラム形成の力学的メカニズムは、スフェロイドを用いた *in vitro* 実験系にて検証されうる. 近年、骨形態形成メカニズム解明に向け、軟骨前駆細胞を用いてスフェロイドを作製する手法が提案されている(Kim et al., 2022). この実験系において、スフェロイドに圧縮や引張の力学負荷を与えることが可能になると期待される. 本研究で可能とした力学解析により推定される、骨組織内部の特定の領域における応力場をスフェロイドに付与することで、当該領域における細胞活動をスフェロイド内で再現し解析できる可能性がある. また、人工的な組織において、形態形成過程の骨組織全体にわたる時空間的な応力場を再現することは困難だが、骨組織内部のさまざまな領域に対応する力学条件のもとで培養したスフェロイドを組み合わせることで、生体外で骨組織を工学的に再構成することが可能になると期待される.

本章で着目した軟骨カラムの構造は、軟骨細胞のアポトーシス後に残される軟骨基質構造と密接に関連することから、軟骨基質を足場として形成される一次海綿骨構造にも影響を及ぼすと考えられている(Hara et al., 2018). 本研究では、成長板における細胞活動に着目するため、一次海綿骨については単純にランダムな構造を形成するとモデル化した. 将来、軟骨細胞と軟骨基質の配置に基づく一次海綿骨構造の形成を現実に即してモデル化することにより、形態形成過程

の骨において、一次海綿骨構造の影響を受ける荷重支持機能などの力学的機能を評価することが可能になると考えられる。

また、本研究では、長骨の伸長メカニズムに着目するため、凹凸の少ない単純な形状を有するマウスの第三中足骨を解析対象とした。一方で、大腿骨頭の大きな凸形状やその頸部の凹形状などの複雑な形態の形成においても、力学的因子による多細胞動態の制御が重要であると考えられる。そのような複雑な形態を形成する多細胞動態は、将来、本モデルにおいて、筋肉から骨に作用する力などの組織間力学相互作用を考慮することで明らかになる可能性がある。このようなモデルの拡張を通じ、骨形態の形成過程にわたり、骨全体の形態を記述し、荷重支持や運動などの骨の力学的機能を経時的に評価することが可能になると期待される。

4.5 結 言

本章では、骨形態形成シミュレーションにおける応力解析により、成長板内の細胞の肥大化が増殖層における応力異方性を誘導することを明らかにした。この応力異方性は、軟骨カラム形成を通じて骨形態の形成に影響を及ぼすことが示唆された。本研究で観察された成長板の層ごとに異なる応力場は、細胞の分化など、軟骨カラム形成以外の細胞活動を制御する役割も担う可能性がある。したがって、本章で行われた多細胞シミュレーションにおける応力解析は、骨形態形成における多細胞動態の力学的制御メカニズムに関し新たな視点を提供する。また、本章で明らかとなった形態形成過程の骨組織内部における応力場を *in vitro* 実験系における軟骨細胞スフェロイドに付与することにより、骨組織の一部を模擬した実験系を構築することが可能になると期待される。さらに、組織間力学相互作用を解析可能とする本シミュレーション基盤の拡張により、多様な生体組織の形態形成過程にわたる力学的ふるまいを解析することが可能になると期待される。

参考文献

- Aszodi, A., Hunziker, E.B., Brakebusch, C., Fässler, R., 2003. $\beta 1$ integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.* 17, 2465–2479. <https://doi.org/10.1101/gad.277003>
- Collins, J.M., Lang, A., Parisi, C., Moharrer, Y., Nijsure, M.P., Kim, J.H. (Thomas), Szeto, G.L., Qin, L., Gottardi, R., Dymont, N., Nowlan, N., Boerckel, J.D., 2023. YAP and TAZ couple osteoblast precursor mobilization to angiogenesis and mechanoregulated bone development (preprint). *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.01.20.524918>
- Dodds, G.S., 1930. Row formation and other types of arrangement of cartilage cells in endochondral ossification. *The Anatomical Record* 46, 385–399. <https://doi.org/10.1002/ar.1090460409>
- Felsenthal, N., Zelzer, E., 2017. Mechanical regulation of musculoskeletal system development. *Development* 144, 4271–4283. <https://doi.org/10.1242/dev.151266>
- Galea, G.L., Zein, M.R., Allen, S., Francis-West, P., 2021. Making and shaping endochondral and intramembranous bones. *Developmental Dynamics* 250, 414–449. <https://doi.org/10.1002/dvdy.278>
- Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliot, G., Garrett, L., English, M.A., Andre, P., Robinson, J., Sood, R., Minami, Y., Economides, A.N., Yang, Y., 2011. Wnt Signaling Gradients Establish Planar Cell Polarity by Inducing Vangl2 Phosphorylation through Ror2. *Developmental Cell* 20, 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.001>
- Garzón-Alvarado, D.A., García-Aznar, J.M., Doblaré, M., 2009. A reaction–diffusion model for long bones growth. *Biomech Model Mechanobiol* 8, 381–395. <https://doi.org/10.1007/s10237-008-0144-z>
- Gemp, I.M., Carthew, R.W., Hilgenfeldt, S., 2011. Cadherin-Dependent Cell Morphology in an Epithelium: Constructing a Quantitative Dynamical Model. *PLOS Computational Biology* 7, e1002115. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002115>
- Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E.B., Fässler, R., 2003. Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO reports* 4, 432–438. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor801>
- Hara, E.S., Okada, M., Nagaoka, N., Hattori, T., Iida, L.M., Kuboki, T., Nakano, T., Matsumoto, T., 2018. Chondrocyte burst promotes space for mineral expansion. *Integr. Biol.* 10, 57–66. <https://doi.org/10.1039/C7IB00130D>
- Hayashi, T., Carthew, R.W., 2004. Surface mechanics mediate pattern formation in the developing retina. *Nature* 431, 647–652. <https://doi.org/10.1038/nature02952>
- Hilgenfeldt, S., Erisken, S., Carthew, R.W., 2008. Physical modeling of cell geometric order in an epithelial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 907–911. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711077105>

- Kim, J., Tomida, K., Matsumoto, T., Adachi, T., 2022. Spheroid culture for chondrocytes triggers the initial stage of endochondral ossification. *Biotech & Bioengineering* bit.28203. <https://doi.org/10.1002/bit.28203>
- Kozhemyakina, E., Lassar, A.B., Zelzer, E., 2015. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development* 142, 817–831. <https://doi.org/10.1242/dev.105536>
- Kronenberg, H.M., 2003. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332–336. <https://doi.org/10.1038/nature01657>
- Li, Y., Dudley, A.T., 2009. Noncanonical frizzled signaling regulates cell polarity of growth plate chondrocytes. *Development* 136, 1083–1092. <https://doi.org/10.1242/dev.023820>
- Li, Y., Li, A., Junge, J., Bronner, M., 2017. Planar cell polarity signaling coordinates oriented cell division and cell rearrangement in clonally expanding growth plate cartilage. *eLife* 6, e23279. <https://doi.org/10.7554/eLife.23279>
- Long, F., Chung, U., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H.M., McMahon, A.P., 2004. *Ihh* signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development* 131, 1309–1318. <https://doi.org/10.1242/dev.01006>
- Malmi-Kakkada, A.N., Sinha, S., Li, X., Thirumalai, D., 2022. Adhesion strength between cells regulate nonmonotonic growth by a biomechanical feedback mechanism. *Biophysical Journal* 121, 3719–3729. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.04.032>
- Nguyen, J.C., Markhardt, B.K., Mellow, A.C., Dwek, J.R., 2017. Imaging of Pediatric Growth Plate Disturbances. *RadioGraphics* 37, 1791–1812. <https://doi.org/10.1148/rg.2017170029>
- Pollard, A.S., Charlton, B.G., Hutchinson, J.R., Gustafsson, T., McGonnell, I.M., Timmons, J.A., Pitsillides, A.A., 2017. Limb proportions show developmental plasticity in response to embryo movement. *Sci Rep* 7, 41926. <https://doi.org/10.1038/srep41926>
- Provot, S., Schipani, E., 2005. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Vertebrate Skeletal Biology* 328, 658–665. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.068>
- Romereim, S.M., Conoan, N.H., Chen, B., Dudley, A.T., 2014. A dynamic cell adhesion surface regulates tissue architecture in growth plate cartilage. *Development* 141, 2085–2095. <https://doi.org/10.1242/dev.105452>
- Rubin, S., Agrawal, A., Seewald, A., Villoutreix, P., Baule, A., Zelzer, E., 2023. Bone elongation in the embryo occurs without column formation in the growth plate. <https://doi.org/10.1101/2023.11.14.567062>
- Rubin, S., Agrawal, A., Stegmaier, J., Krief, S., Felsenthal, N., Svorai, J., Addadi, Y., Villoutreix, P., Stern, T., Zelzer, E., 2021. Application of 3D MAPs pipeline identifies the morphological sequence chondrocytes undergo and the regulatory role of GDF5 in this process. *Nat Commun* 12, 5363. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25714-0>

- Sadeghian, S.M., Shapiro, F.D., Shefelbine, S.J., 2021. Computational model of endochondral ossification: Simulating growth of a long bone. *Bone* 153, 116132. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116132>
- Shwartz, Y., Farkas, Z., Stern, T., Aszódi, A., Zelzer, E., 2012. Muscle contraction controls skeletal morphogenesis through regulation of chondrocyte convergent extension. *Developmental Biology* 370, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.026>
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A.P., 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Development* 13, 2072–2086. <https://doi.org/10.1101/gad.13.16.2072>
- Vaca-González, J.J., Moncayo-Donoso, M., Guevara, J.M., Hata, Y., Shefelbine, S.J., Garzón-Alvarado, D.A., 2018. Mechanobiological modeling of endochondral ossification: an experimental and computational analysis. *Biomech Model Mechanobiol* 17, 853–875. <https://doi.org/10.1007/s10237-017-0997-0>
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., Tabin, C.J., 1996. Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. *Science* 273, 613–622. <https://doi.org/10.1126/science.273.5275.613>
- Wang, G., Woods, A., Agoston, H., Ulici, V., Glogauer, M., Beier, F., 2007. Genetic ablation of Rac1 in cartilage results in chondrodysplasia. *Developmental Biology* 306, 612–623. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.520>
- Wu, Q., Zhang, Y., Chen, Q., 2001. Indian hedgehog Is an Essential Component of Mechanotransduction Complex to Stimulate Chondrocyte Proliferation *. *Journal of Biological Chemistry* 276, 35290–35296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101055200>

第 5 章

結 論

5.1 本論文のまとめ

骨形態形成過程の多細胞動態は、多様な生化学的、および、力学的因子に制御され、骨組織の形態形成を調節する。本論文では、骨の形態が力学的因子に応じた多細胞動態により制御されるメカニズムの理解を目指した。そのために、まず、骨形態形成における個々の細胞活動にともなう組織全体の力学的ふるまいを、連続体力学に基づき解析可能な連続体ベース粒子モデルを構築した。次に、長骨の伸長を主に制御する成長板における多細胞動態のうち、細胞分化を支配する単因子モデルを構築した。さらに、連続体ベース粒子モデルに基づく解析に単因子モデルを適用することで、骨形態形成シミュレーション基盤を構築した。この計算機シミュレーション基盤を用いて、骨形態形成過程の成長板における応力場を解析することで、長骨の形態形成に影響を及ぼす細胞活動の力学的制御メカニズムの理解を試みた。以下に、各章の要約を述べる。

第 2 章では、個々の細胞活動を組織全体の力学的ふるまいに結び付ける連続体ベース粒子モデルを構築することにより、多細胞組織の形態形成を解析可能な多階層シミュレーション手法を開発した。ここでは、細胞の成長と増殖をモデル化することにより、力学的拘束条件下での組織成長をシミュレーションし、その過程における組織内部の力学状態を解析することを可能とした。また、細胞周期における体積チェックポイントの効果を細胞増殖モデルに導入することにより、力学状態に応じた細胞活動の変化が組織全体の力学的ふるまいに及ぼす影響を評価した。第 2 章で提案した細胞成長、および、増殖の連続体ベース粒子モ

デルは、細胞活動にともなう組織形態形成を力学的視点から解析するうえで強力な枠組みを提供するものである。

第3章では、まず、骨形態形成過程の成長板における細胞分化を制御する単因子モデルを構築し、当該モデルが生理的、および、病理的な成長板構造を再現することを検証した。この単因子モデルを、連続体ベース粒子モデルに基づく三次元多細胞シミュレーションに導入することで、マウスの第三中足骨における観察と対応する成長板構造の形成、維持、および、骨組織全体の伸長を、個々の細胞活動に基づき解析するシミュレーション基盤を構築した。また、この骨形態形成シミュレーションにおいて、細胞の分裂頻度分布がマウスの第三中足骨における観察結果と同様の傾向を示すことを検証した。これにより、形成過程の骨組織内部における力学状態を予測し、細胞活動の力学的制御メカニズムを調べることが可能となった。

第4章では、第3章で構築した骨形態形成シミュレーション基盤を用いて、成長板における力学状態を解析した。その結果、成長板の増殖層において、骨の長軸に垂直な面内の引張応力と骨長軸方向の圧縮応力からなる異方的な応力場が生じていることが明らかとなった。この応力異方性にともない細胞が骨長軸方向に整列し、摘出骨における観察と同様に、シミュレーション内で軟骨カラムが形成されていることを確認した。また、この応力異方性にともなう軟骨カラム形成が、骨形態の制御に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、骨形態を制御する増殖層における応力異方性は、前肥大層、および、肥大層における軟骨細胞の肥大化により誘導されることが明らかとなった。したがって、本研究により、成長板の層ごとに異なる細胞活動が、骨組織内部の応力場、および、細胞の配列を介して骨形態を制御する力学的メカニズムが明らかとなった。本論文で行った骨組織内部における力学解析は、形態形成過程を通じて観察される細胞活動と力学的因子を結び付け、骨形態形成における多細胞動態の制御メカニズムに関し新たな視点を提供するものである。

本論文では、個々の細胞活動にともなう組織全体の力学的ふるまいを解析する連続体ベース粒子モデルを構築することにより、多細胞動態による骨形態形成の力学解析を可能とし、成長板内の増殖軟骨細胞による軟骨カラム形成を介した骨形態形成の力学的制御メカニズムを明らかにした。生物の形づくりを担

う細胞活動の制御メカニズムについて力学的視点から新たな知見を提供した本研究は、発生生物学分野の知見を深化させ、生物学と力学との融合分野の発展の一翼を担うものである。

本研究の成果に基づき、発生段階において骨形態を力学的手法により制御することが可能になれば、骨形成不全等の骨疾患への治療法を新たな視点により提案することができる。また、骨組織内部のさまざまな領域に対応する力学条件のもとで培養したスフェロイドを組み合わせ、生体外で骨組織を工学的に再構成するなどの生体医工学的応用が期待される。さらに、骨形態が決定されるメカニズムに通底する力学的制御理論を見出すことにより、生物をよりどころとする新たな設計思想を提案できると期待されることから、本研究は機械工学的意義を有する。

5.2 今後の展望

骨形態形成に限らず、あらゆる生命現象において、力学的因子は重要な役割を果たす。本研究では、細胞の成長や増殖にともない生じる力により、多細胞組織が形づくられる過程に着目した。一方、巨視的な動物の歩行においては、筋力を骨に伝え、関節の運動を引き起こすことが必要である。また、微視的な細胞がエネルギーを得るための化学反応にも、分子間の引力をはじめとする力学的相互作用が必須である。生命現象を理解するための分子生物学的、遺伝学的解析は盛んに行われているが、そのような分子や遺伝子の情報と生命現象との間に存在する力学的作用については、明らかにされていないことが多い。しかし、生命現象を真に理解するためには、力学の視点で生命現象を捉え、そのような力学的な作用の存在を認識し理解することが必須である。

生命現象における、目に見えない力学的因子の役割を明らかにするために、力学モデリングと計算機シミュレーションは有効である。しかしながら、ある因子をモデリングすることは、同時に、関連する他の因子を捨象することでもある。例えば、本研究では多細胞組織を超弾性体としてモデル化し弾性変形解析を行うことにより、組織の粘性挙動を無視している。生命現象を適切に捉えるために

は、実際に起きている現象そのものを注意深く観察し、その現象において重要な力学的因子を抽出し、その効果を評価することが必要となる。このプロセスにおいて、適切な力学的仮定のもと、必要十分な力学モデリングを行うことが、生命科学研究に携わる工学研究者に求められる役割であると考えられる。

そのような力学的視点に基づく研究を通じて明らかにされた、生物が力学を利用する戦略は、工学的応用が大いに期待されるものとなる。特に、生物の形やその内部の組織構造、および、それらが担う力学的機能は、機械工学に直接応用可能であると考えられる。さらには、生物の形づくりに関する設計思想や価値基準を抽出することによる間接的な応用も期待される。本研究では、荷重支持や運動などの力学的機能を担う骨形態の形成を制御するメカニズムの一端を明らかにした。本研究の発展として、より多様な骨形態の形成メカニズムを明らかにすることにより、様々な生物種の、様々な部位の骨形態の形成を制御する普遍的なメカニズムを明らかにすることが期待される。すなわち、適切な軟骨原器の初期形態、および、力学的境界条件を、共通の普遍的なメカニズムに適用することで、様々な骨形態を形成することが可能になると考えられる。そのような普遍的なメカニズムには、生物がその生命維持に関わる機能を実現するための本質的な要素が内包されていると考えられる。したがって、その普遍的な骨形態形成メカニズムに、生物が持たない特殊な形態の軟骨原器、および、任意の力学的境界条件を適用することにより創発されうる新たな「骨形態」は、生命にとって自然、かつ、合理的であるとともに、機械工学的、あるいは、材料工学的に優れた機能を有している可能性がある。このように、生体内に存在するメカニズムの本質的な要素を抽出、拡張し、新たな構造や材料を生み出すことを通じて、力学的視点に基づく生命科学研究は工学分野の発展に大いに寄与すると期待される。

付録

A.1 骨組織内部の流体－構造連成解析による骨細胞膜ひずみ評価

A.1.1 緒 言

石灰化骨組織内部に存在する骨細胞は、骨組織に作用する力学刺激を感知し、骨組織表面における骨芽細胞による骨形成、および、破骨細胞による骨吸収を制御するという、骨リモデリングにおいて重要な役割を担う(Nakashima et al., 2011; Tatsumi et al., 2007; Xiong et al., 2011). 骨細胞は、その細胞体から細長く伸びた細胞突起に作用する局所的な力学刺激に対し敏感に応答する(Adachi et al., 2009; Wu et al., 2011). 骨の廃用などにより骨細胞突起に対する力学刺激が減少すると、骨量が減少し、骨粗鬆症様の骨形態へと変化することが知られている(Aguirre et al., 2006; Knothe Tate et al., 2004). したがって、骨細胞突起における力学刺激感知機構を明らかにすることは、骨形態の維持機構における骨構成細胞のはたらきを理解するうえで必要不可欠である.

骨細胞に対する力学刺激の評価においては、Piezo1 などのイオンチャネルの応答を駆動する細胞表面のひずみが代表的な指標とされている(McMahon et al., 2008; Nakashima et al., 2011; Sachs, 2010; Teufel et al., 2014). 骨細胞がカルシウム応答を示すために必要な細胞膜上の局所的なひずみは約 10% (You et al., 2000)である一方で、通常の運動時に骨組織に生じるひずみは最大で約 0.1%と計測されている(Fritton et al., 2000). したがって、骨組織内にはひずみを増幅する機構が必要である(Han et al., 2004; Wang et al., 2007; You et al., 2001). 骨組織への力学負荷にともない、骨細胞突起周囲の空隙である骨細管内に生じる間質液の流れは、ひずみ増幅機構の重要な要素の一つであると考えられている(Weinbaum et al.,

1994; Zeng et al., 1994). また、骨細管領域を満たすプロテオグリカンなどの細胞周囲マトリックスも、ひずみの増幅に関与している可能性がある(Weinbaum et al., 1994; Zeng et al., 1994). 細胞周囲マトリックスのうち、骨細胞突起と骨細管壁をつなぐ物質は、テザリングエレメント(TE)とよばれ、間質液の流れを受けて骨細胞突起に張力を与えると考えられている(Wang et al., 2014; You et al., 2004).

間質液流れを受けた TE が骨細胞突起のひずみを増幅する機構は、骨細管および細胞突起の形状を理想的な中空円筒と仮定した理論的研究を通じて提案されてきた(Han et al., 2004; Wang et al., 2007; You et al., 2001). 一方で、実際の骨細管および細胞突起は凹凸のある複雑な形状を有している(Kamioka et al., 2012). この複雑な形状は、間質液の流速分布を不均一にすることを通じて、細胞突起膜上の局所ひずみに影響を及ぼすと考えられるため、ひずみ増幅において考慮すべき重要な要素である. さらに、加齢や疾患にともなうこれらの形状の変化(Jast and Jasiuk, 2013; Lai et al., 2015)は、骨細胞の感知する刺激を変化させ、骨リモデリングに重大な影響を及ぼすと考えられる. したがって、骨細胞のひずみ増幅機構を理解するためには、骨細管と細胞突起の複雑な形状が骨細胞突起膜上の局所ひずみに及ぼす影響を調べることが不可欠である.

骨細胞突起への力学刺激を定量的に評価するためには、**image-based** モデルを用いた計算機シミュレーションが有効である. これまでの研究では、共焦点画像を用いて構築された骨小腔全体とその周囲の骨細管の **image-based** モデルに対する解析により、間質液の流速分布や骨細胞表面のひずみ分布が調べられてきた(Verbruggen et al., 2016, 2014, 2012). これらの研究で用いられた共焦点顕微鏡では、骨細管および細胞突起表面の微細な構造を観察することは困難であったが、超高压電子顕微鏡を用いることにより、ナノメートルスケールでそれらの微細構造を観察することが可能とされている(Hosaki-Takamiya et al., 2016; Kamioka et al., 2012). このような高解像度の画像から作製した **image-based** モデルを用いることで、骨細管および細胞突起表面の微細構造が、骨細胞突起膜上の局所ひずみに対し及ぼす影響の解明が期待される.

本研究では、骨細管および細胞突起表面の微細構造が、骨細胞の力学刺激感知機構において果たす役割を明らかにすることを目的とした。そのために、超高压電子顕微鏡画像(Kamioka et al., 2012)を用いて、骨細管および細胞突起の高解像度 image-based モデルを構築した。TE による張力の効果を導入するため、image-based モデルの内部に TE に相当するばねモデルをランダムに配置した。この image-based モデルにおいて流体-構造連成解析を行うことで、間質液流れにともない骨細胞突起膜に生じる局所ひずみを解析し、骨細管および細胞突起の複雑な形状の影響を受けた TE が、骨細胞による力学刺激感知を引き起こす要因である可能性を示した。

A.1.2 手 法

A.1.2.1 流体-構造連成解析の手法

間質液の流れおよび TE の張力により引き起こされる骨細胞突起の変形を解析するため、流体-構造連成解析を行った(Takeishi et al., 2019)。細胞周囲マトリックスで満たされた骨細管内の間質液流れは、Brinkman 方程式に従うと仮定した(Weinbaum et al., 1994)。このとき、流体圧勾配 ∇p および体積力 \mathbf{F} により駆動される間質液流れの流速 \mathbf{u} は

$$\nabla p = -\frac{\mu}{k_p} \mathbf{u} + \mu \nabla^2 \mathbf{u} + \mathbf{F} \quad (\text{A1.1})$$

に従う。ここで、 μ は粘性係数、 k_p は多孔質体の透水係数である。この Brinkman 方程式に従う流れを、格子ボルツマン法(Chen and Doolen, 1998)を用いて数値的に解析した。

また、骨細胞突起の細胞膜を Skalak 則(Skalak et al., 1973)に従う超弾性体の薄膜としてモデル化し、三角形要素により離散化した。Skalak 則におけるひずみエネルギー密度関数は

$$W = \frac{1}{4}G_s(I_1^2 + 2I_1 - 2I_2 + CI_2^2) \quad (\text{A1.2})$$

と表される．ここで， I_1 と I_2 は右 Cauchy-Green テンソルの第一，および，第二不変量， G_s は膜せん断弾性係数， C は面積抵抗を表す定数である．細胞膜のポアソン比 ν_s ，および，ヤング率 E は，膜厚 t を用いて $\nu_s = C/(C + 1)$ ， $E = 2G_s(1 + \nu_s)/t$ と表される．有限要素解析により，変形にともなう，膜の節点における反力 q_m を導出した．さらに，骨細胞突起と骨細管壁をつなぐ TE を線形ばねとして導入した．TE のばね定数 k_{sp} を，TE のヤング率 E_{sp} ，半径 r_{sp} ，および，自然長 l_0 を用いて $k_{sp} = \pi r_{sp} E_{sp} / l_0$ に従い計算した．TE のストレッチより，細胞膜の節点に付与される TE の張力 q_t を導出した．

間質液の流れに対する流体解析と細胞膜の変形に対する構造解析を，immersed boundary 法により連成させた(Peskin, 2002)．膜の節点に作用する力 $q = q_m + q_t$ を，式(A1.1)に示す外力 \mathbf{F} として周囲の流体格子に分配した．また，流体の速度 \mathbf{u} に応じて，膜表面におけるすべりなし条件を満たすよう細胞膜を変形させた．

A.1.2.2 Image-based モデルの構築

超高圧電子顕微鏡により得られた，骨細管および細胞突起の連続断面画像(Kamioka et al., 2012)より，それらの三次元 image-based モデルを構築した(Fig. A1.1a)．骨細管および細胞突起の長さ方向が z 方向となるよう，正規直交基底 (x, y, z) を導入した．連続断面画像の解像度は 1.7 nm/pixel，骨細管および細胞突起の z 方向長さは 453.9 nm であった．

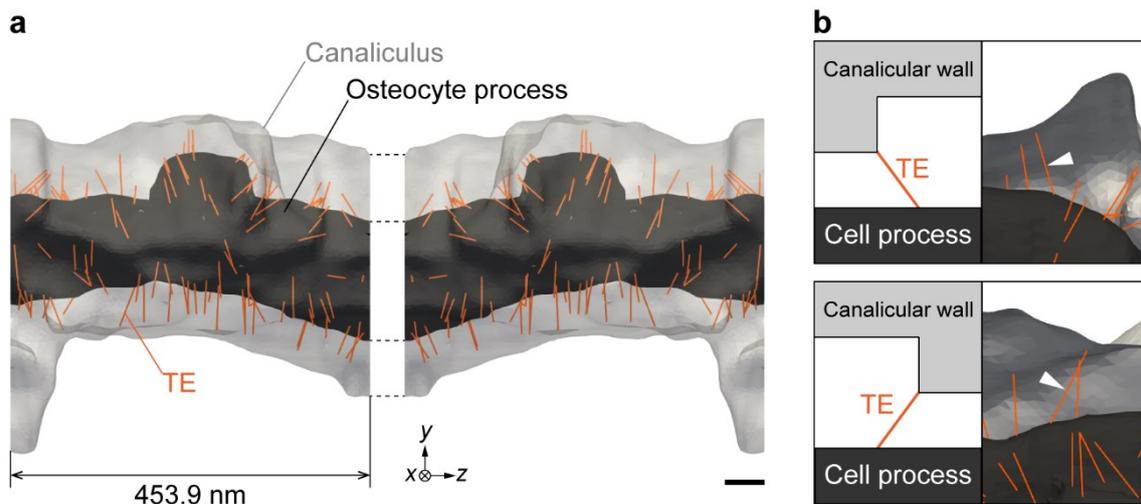


Figure A1.1 Reconstruction of an image-based model. **(a)** The image-based model of the osteocyte process and the canalicular. TEs that connect osteocyte process membrane and canalicular wall were randomly placed in the canalicular space ($n = 5$). **(b)** TEs in the image-based model. The inclination of TEs depends on the surface structure of canalicular wall as indicated by the arrowhead. Scale bar: 50 nm.

流体解析に格子ボルツマン法を用いるため、連続断面画像より得られた骨細管領域を 5.1 nm ($= 3 \text{ pixels}$) 間隔の正方格子により離散化した。また、構造解析に有限要素法を用いるため、連続断面画像より抽出した細胞膜形状を模した超弾性体の膜を、MeshLab (Visual Computing Lab, ISTI-CNR, Italy) を用いて三角形要素に分割した。三角形要素の代表長さは約 4.7 nm であった。さらに、線形弾性ばねとしてモデル化した TE を、 z 方向に $12 / 37.5 \text{ nm}^{-1}$ の数密度で配置した (Han et al., 2004; Wang et al., 2007; You et al., 2004)。TE の一端を骨細胞突起膜上にランダムに配置し ($n = 5$)、他端を骨細管壁上の最近傍点に固定した。これにより、Fig. A1.1b に示されるように、骨細管および細胞突起の複雑な形状に依存して、流れのない条件においても TE の向きにばらつきが生じた。流れのない条件における TE の長さを、その TE の自然長 l_0 とした。骨細管領域における流体解析、およ

び、骨細胞突起細胞膜の構造解析に周期境界条件を適用するため、Fig. A1.1a に示されるように、 x - y 平面に関して鏡面对称なモデルを元のモデルに接続した。

シミュレーションに用いた全てのパラメータの値を Table A1.1 に示す (Kamioka et al., 2012; Sugawara et al., 2008; Takeishi et al., 2014; Weinbaum et al., 1994; Wijeratne et al., 2016). z 軸に沿って正/負方向の流れ (以下, $+z/-z$ 流れ) にともなう骨細胞突起のひずみを解析するため, z 軸に沿う向きに流体圧勾配 $|\nabla p| = 1.0 \text{ Pa/nm}$ を与えた (Kamioka et al., 2012).

Table A1.1 Parameter settings for the fluid - structure interaction simulation. * In reference to the value of red blood cells (Takeishi et al., 2014). ** In reference to the thickness of lipid bilayer.

Symbol (unit)	Description	Value
<i>Fluid properties</i>		
μ (Ns/m ²)	Fluid viscosity	1.0×10^{-3} (Kamioka et al., 2012)
k_p (nm ²)	Permeability of pericellular matrix	7.0 (Weinbaum et al., 1994)
<i>Membrane properties</i>		
C	Area incompressibility coefficient	10 *
E (Pa)	Young's modulus of membrane	4471 (Sugawara et al., 2008)
t (nm)	Thickness of membrane	10 **
<i>TE properties</i>		
E_{sp} (MPa)	Young's modulus of TEs	71 (Wijeratne et al., 2016)
r_{sp} (nm)	Radius of TEs	1 (Wijeratne et al., 2016)

A.1.3 結果

骨細胞突起に生じるひずみを評価するため、骨細管および細胞突起の image-based モデルに対し、 $+z/-z$ 流れのもとで流体-構造連成解析を行った(Fig. A1.2). その結果、 $+z$ 流れと $-z$ 流れの間で、間質液の流速分布に大きな変化は生じなかった(Fig. A1.2a). しかしながら、張力の大きな TE の分布(Fig. A1.2b)や、骨細胞突起膜上の最大主ひずみの分布(Fig. A1.2c)は、流れの向きに応じて大きく異なっていた. また、骨細胞突起膜上では、特に張力の大きな TE の付近にひずみが集中することが明らかとなった(Figs. A1.2b, c). この傾向は TE の配置を変えた場合においても同様であった.

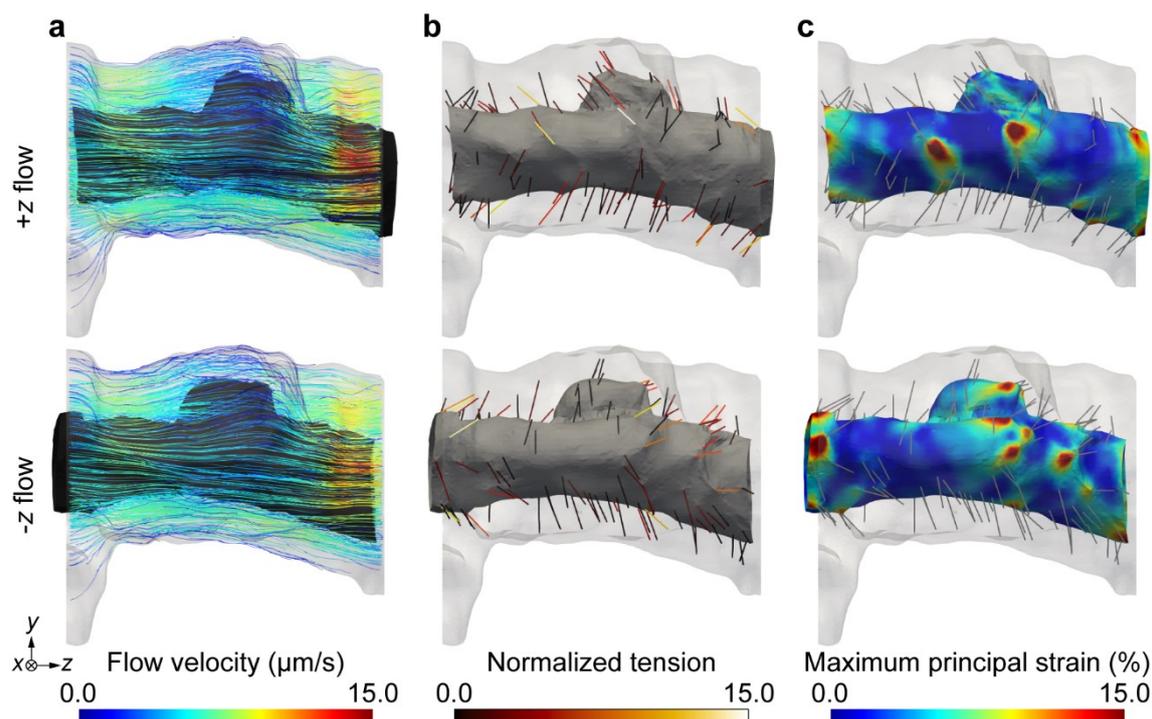


Figure A1.2 Results of fluid-structure interaction simulation under $+z/-z$ flow conditions. **(a)** Flow velocity of interstitial fluid. **(b)** Tension of TEs normalized by its median (0.017 pN). **(c)** Maximum principal strain on the osteocyte process.

TE の周囲とそれ以外の領域との間で、骨細胞突起膜上のひずみを定量的に比較した結果、TE 周囲の膜ひずみは、それ以外の領域の約 1.7 倍の大きさであった(Fig. A1.3a). また、TE の張力が大きいほど、その周囲の骨細胞突起膜上にはより大きなひずみが生じていた(Fig. A1.3b 上段). 興味深いことに、そのような大きなひずみを引き起こす張力の大きい TE は少数であり(Fig. A1.3b 下段), さらには、28%もの TE は、自然長から圧縮を受け、張力を全く生じていないことが明らかとなった. したがって、少数の、張力の大きな TE が骨細胞突起を支持し、骨細胞突起膜上のひずみ集中を引き起こしていることが示された.

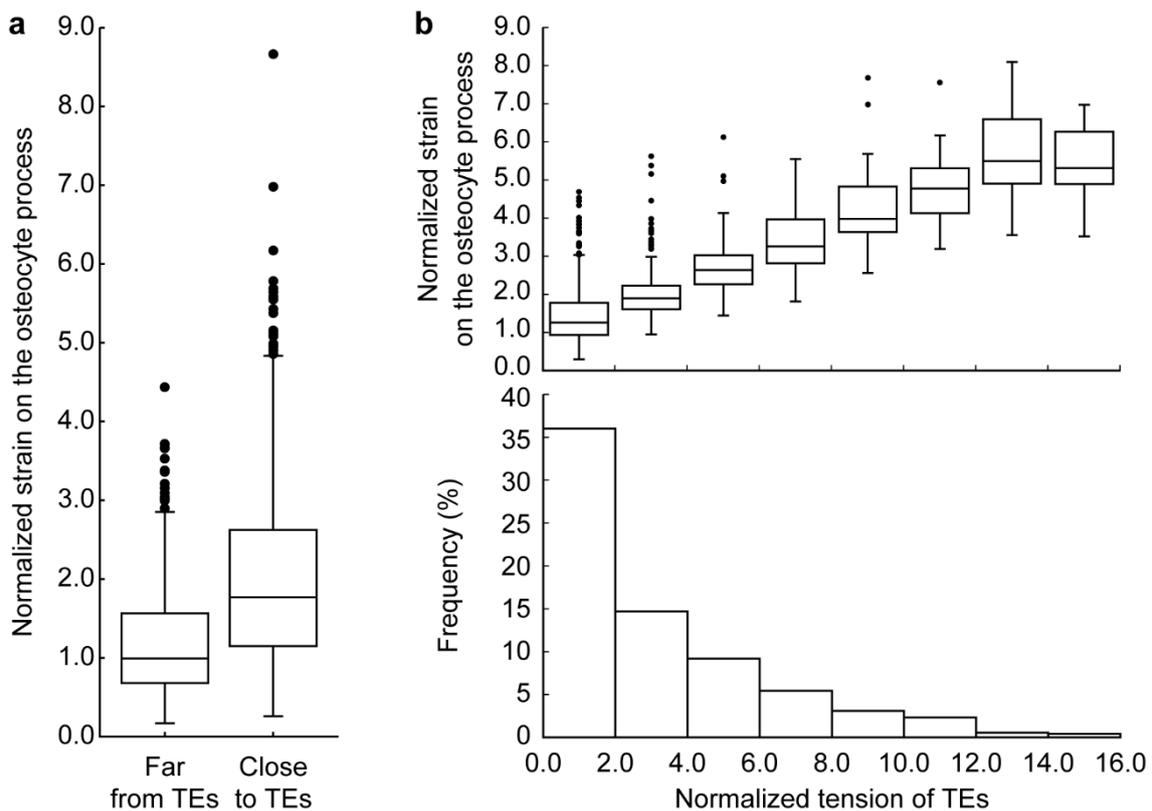


Figure A1.3 Relationship between strain on the osteocyte process and tension of TEs. **(a)** Osteocyte process strain on the regions close to TEs within 10.2 nm and on the other regions far from TEs. **(b)** Osteocyte process strain on the regions close to TEs with various

tension and the histogram of TEs with non-zero tension. Tension is normalized by its median (0.017 pN) and strain is normalized by the median of the strain far from TEs (0.028).

次に、ひずみ集中を引き起こす可能性のある張力の大きな TE の特徴を調べるため、流れのない条件下での、 z 軸正方向に対する TE の角度と、その TE に生じる張力を比較した(Figs. A1.4a, b). その結果, Fig. A1.4a に示されるように, $+z$ 流れでは, θ の大きな, すなわち, 骨細胞突起側から見て流れの上流方向へ傾いた TE に大きな張力が生じることが確認された. 逆に, $-z$ 流れにおいては, θ の小さな TE に大きな張力が生じるという傾向がみられた(Fig. A1.4b). さらに, $+z$ 流れの上流方向へ傾いた TE ($\theta > \pi/2$)は, $+z$ 流れのもとで骨細胞突起膜上にひずみ集中を引き起こしたが, $-z$ 流れのもとでは, その TE 周囲のひずみは小さかった(Fig. A1.4c). 一方で, $-z$ 流れの上流方向へ傾いた TE ($\theta < \pi/2$)は, $-z$ 流れのもとでのみ, 周囲にひずみ集中を引き起こしていた(Fig. A1.4d). これらの結果より, 骨細管および細胞突起の複雑な形状に依存した, 流れに対する TE の傾きが, TE に作用する張力に影響を及ぼすことを通じて, 骨細胞突起膜上のひずみ集中を引き起こすことが明らかとなった.

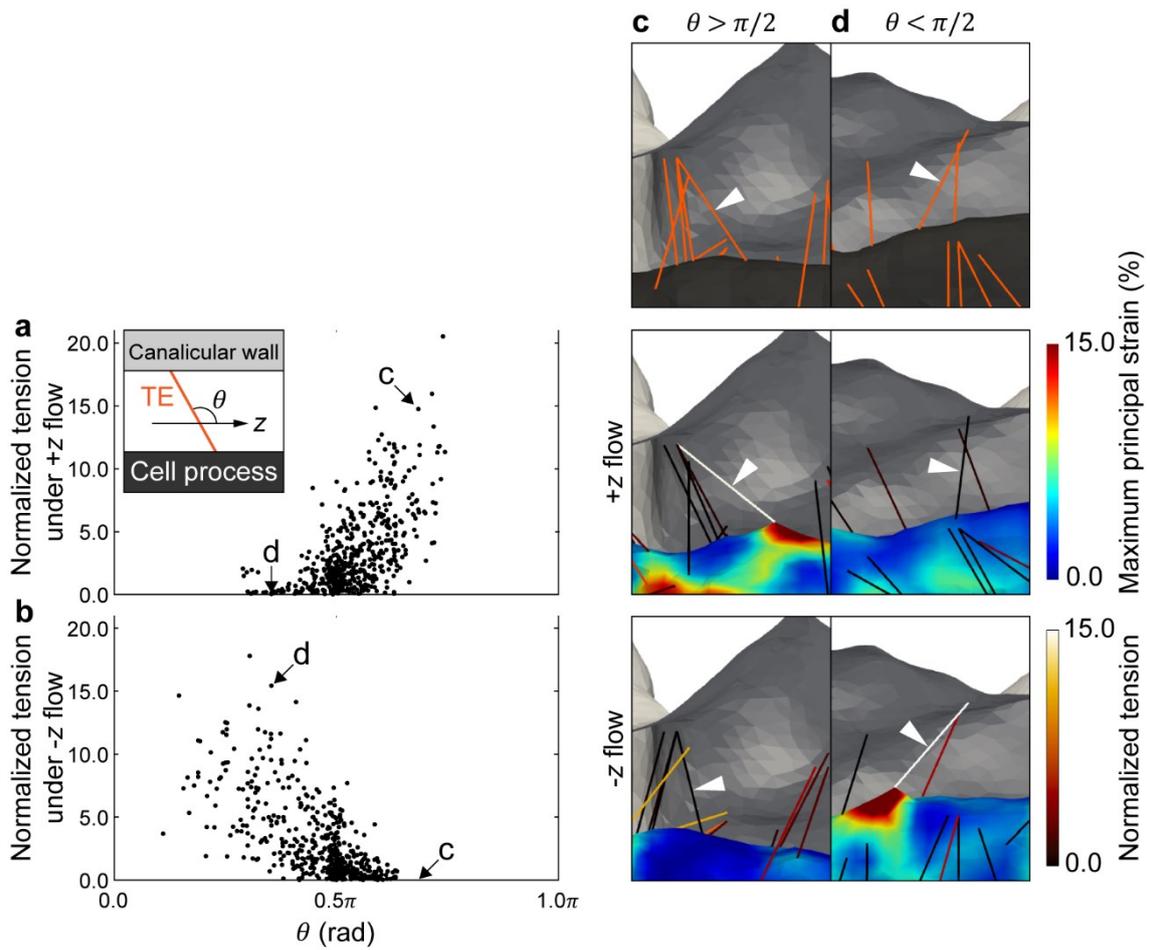


Figure A1.4 Dependence of TEs tension and osteocyte process strain on the inclination of TEs. **(a, b)** Tension of TEs under the condition of +z flow (a) and -z flow (b) plotted against the angle, θ , between the direction of TEs under the no-flow condition and the positive z-direction. **(c, d)** The TE with $\theta > \pi/2$ (arrowhead in c) and the TE with $\theta < \pi/2$ (arrowhead in d) under no-flow, +z flow, and -z flow conditions. Osteocyte process strain and TEs tension are also shown. Tension is normalized by its median (0.017 pN).

A.1.4 考 察

骨細管および細胞突起表面の微細構造が、骨細胞への力学刺激に及ぼす影響を調べるため、高解像度 image-based モデル(Fig. A1.1)を用いた流体-構造連成解析により、間質液流れにともなう骨細胞突起膜上のひずみ分布を評価した。解析の結果、骨細管および細胞突起の複雑な形状に依存して、流れに対し傾いた TE が、自身に生じる大きな張力を介して、骨細胞突起膜上に局所的なひずみ集中を引き起こすことが示された。このような局所ひずみは、付近の細胞膜上に存在するイオンチャネルの構造変化を誘導することにより、細胞の力学応答を引き起こすと考えられる。したがって、骨細管および細胞突起の複雑な形状や TE が、骨細胞突起膜上にひずみ集中を引き起こすことを通じて、骨細胞の力学刺激感知機構において重要な役割を果たす可能性が示された。

これまでの理論的研究では、細胞周囲マトリックスに対する流体の牽引力が、TE を介し骨細胞突起膜上に大きなひずみを引き起こすという機構が提案されている(Han et al., 2004; Wang et al., 2007; You et al., 2001)。このひずみ増幅機構は、細胞レベルと組織レベルにおけるひずみの大きさの差を説明するうえで有効であるものの、これらの研究では骨細管および細胞突起の形状として理想的なモデルを仮定しており、それらの複雑な形状は考慮されていない(Kamioka et al., 2012)。骨細胞の力学刺激感知における、骨細管および細胞突起表面の複雑な微細構造の重要性を明らかにするため、本研究では、超高压電子顕微鏡画像(Hosaki-Takamiya et al., 2016; Kamioka et al., 2012)を用いて、それらの高解像度 image-based モデル(Fig. A1.1)を構築し、流体-構造連成解析を行った。これにより、骨細管および細胞突起表面の微細構造に依存した TE の不規則な配置を考慮し、骨細胞突起膜上の局所ひずみ分布を評価することが可能となった。

本研究における image-based モデルを用いた流体-構造連成解析により、骨細胞突起膜上には、少数の、張力の大きな TE により引き起こされた局所的なひずみ集中が不規則に現れることが明らかとなった。この現象は TE の配置に関わら

ず確認されたことから、TEによる骨細胞突起膜上のひずみ集中は、骨細胞の力学刺激感知において普遍的にみられる重要な機構であることが示唆された。Piezo1などの細胞膜上のイオンチャネルは、近傍の膜ひずみに対し応答を示すと考えられていることから(Diem et al., 2020; Li et al., 2019; McMahon et al., 2008; Zhou et al., 2020), このような局所のひずみ集中は、骨細胞による力学応答の起点として重要な役割を果たす可能性がある。局所ひずみ集中の要因となる、流れに対するTEの傾き(Fig. A1.4)は、骨細管および細胞突起の複雑な形状に依存して生じた(Fig. A1.1b)。したがって、骨細管および細胞突起表面の微細構造の変化は、骨細胞突起膜上のひずみ分布に影響を及ぼすと考えられる。そのため、骨組織内部の構造の変化をともなう骨粗鬆症などの疾患(Knothe Tate et al., 2004)は、骨細管内のTEの配置の変化を介して、骨細胞への異常な力学刺激と密接に関連している可能性が示唆された。

本解析では、骨細管内でTEを観察することが困難であるため、image-basedモデルにおけるTEの配置をランダムに設定した。今後のイメージング技術の発展により、生体内の骨細胞突起の構造に対応したTEの分布を観察することが可能になると期待される。実際のTEの配置を考慮したimage-basedモデルを用いて骨細胞突起膜上のひずみ分布を解析し、走査イオン顕微鏡などにより観察された骨細胞のメカノセンサー候補分子の存在位置(Cabahug-Zuckerman et al., 2018)と比較することで、力学刺激感知において重要な役割を果たす分子を特定することができると期待される。また、本解析は、超高压電子顕微鏡における電子透過能の限界のため、骨細管ネットワークのスケールに比べて小さい領域に制限されている。骨組織内部では多数の骨細胞がその突起を介して複雑なネットワークを形成しており、このネットワーク構造がそれぞれの骨細管内の間質液流速に影響する。したがって、骨細胞ネットワークの中でひずみ集中部位を特定するためには、ネットワークの構造を考慮した解析が必須である。ネットワーク構造を高解像度で可視化する手法の一つに、集束イオンビーム走査電子顕微鏡(FIB-SEM)を用いるものがある(Hasegawa et al., 2018; Hirashima et al., 2020)。この

ような手法により得られた画像を用いて構築された **image-based** モデルを対象とし、流体-構造連成解析を行うことで、ネットワーク構造が骨細胞への力学刺激に及ぼす影響を評価することが可能になると期待される。

本研究における解析の結果、骨細管および細胞突起の複雑な形状に依存して生じる、少数の、張力の大きな TE により、骨細胞突起膜上に局所的なひずみ集中が引き起こされることが示された。この結果は、TE や、骨細管および細胞突起表面の微細構造が骨細胞への力学刺激に及ぼす影響について重要な知見をもたらす。したがって本研究は、骨細胞の力学刺激感知に関わる分子機構の解明に貢献し、骨リモデリングの制御機構を理解するための一助となると考えられる。

参考文献

- Adachi, T., Aonuma, Y., Tanaka, M., Hojo, M., Takano-Yamamoto, T., Kamioka, H., 2009. Calcium response in single osteocytes to locally applied mechanical stimulus: Differences in cell process and cell body. *Journal of Biomechanics* 42, 1989–1995. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.04.034>
- Aguirre, J.I., Plotkin, L.I., Stewart, S.A., Weinstein, R.S., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C., Bellido, T., 2006. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *Journal of Bone and Mineral Research* 21, 605–615. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060107>
- Cabahug-Zuckerman, P., Stout, R.F., Majeska, R.J., Thi, M.M., Spray, D.C., Weinbaum, S., Schaffler, M.B., 2018. Potential role for a specialized β 3 integrin-based structure on osteocyte processes in bone mechanosensation. *Journal of Orthopaedic Research* 36, 642–652. <https://doi.org/10.1002/jor.23792>
- Chen, S., Doolen, G.D., 1998. LATTICE BOLTZMANN METHOD FOR FLUID FLOWS. *Annual Review of Fluid Mechanics* 30, 329–364. <https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.30.1.329>
- Diem, K., Fauler, M., Fois, G., Hellmann, A., Winokur, N., Schumacher, S., Kranz, C., Frick, M., 2020. Mechanical stretch activates piezo1 in caveolae of alveolar type I cells to trigger ATP release and paracrine stimulation of surfactant secretion from alveolar type II cells. *FASEB Journal* 34, 12785–12804. <https://doi.org/10.1096/fj.202000613RRR>
- Fritton, S.P., J. McLeod, K., Rubin, C.T., 2000. Quantifying the strain history of bone: Spatial uniformity and self-similarity of low-magnitude strains. *Journal of Biomechanics* 33, 317–325. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(99\)00210-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(99)00210-9)
- Han, Y., Cowin, S.C., Schaffler, M.B., Weinbaum, S., 2004. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16689–16694. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407429101>
- Hasegawa, T., Yamamoto, T., Hongo, H., Qiu, Z., Abe, M., Kanesaki, T., Tanaka, K., Endo, T., de Freitas, P.H.L., Li, M., Amizuka, N., 2018. Three-dimensional ultrastructure of osteocytes assessed by focused ion beam-scanning electron microscopy (FIB-SEM). *Histochemistry and Cell Biology* 149, 423–432. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1645-1>
- Hirashima, S., Ohta, K., Kanazawa, T., Togo, A., Tsuneyoshi, R., Kusukawa, J., Nakamura, K.I., 2020. Cellular network across cementum and periodontal ligament elucidated by FIB/SEM tomography. *Microscopy* 69, 53–58. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfz117>
- Hosaki-Takamiya, R., Hashimoto, M., Imai, Y., Nishida, T., Yamada, N., Mori, H., Tanaka, T., Kawanabe, N., Yamashiro, T., Kamioka, H., 2016. Collagen production of osteoblasts revealed by ultra-high voltage electron microscopy. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 34, 491–499. <https://doi.org/10.1007/s00774-015-0692-0>

- Jast, J., Jasiuk, I., 2013. Age-related changes in the 3D hierarchical structure of rat tibia cortical bone characterized by high-resolution micro-CT. *Journal of Applied Physiology* 114, 923–933. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00948.2011>
- Kamioka, H., Kameo, Y., Imai, Y., Bakker, A.D., Bacabac, R.G., Yamada, N., Takaoka, A., Yamashiro, T., Adachi, T., Klein-Nulend, J., 2012. Microscale fluid flow analysis in a human osteocyte canaliculus using a realistic high-resolution image-based three-dimensional model. *Integrative Biology (United Kingdom)* 4, 1198–1206. <https://doi.org/10.1039/c2ib20092a>
- Knothe Tate, M.L., Adamson, J.R., Tami, A.E., Bauer, T.W., 2004. The osteocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00241-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00241-3)
- Lai, X., Price, C., Modla, S., Thompson, W.R., Caplan, J., Kirn-Safran, C.B., Wang, L., 2015. The dependences of osteocyte network on bone compartment, age, and disease. *Bone Research* 3. <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.9>
- Li, X., Han, L., Nookaew, I., Mannen, E., Silva, M.J., Almeida, M., Xiong, J., 2019. Stimulation of piezo1 by mechanical signals promotes bone anabolism. *eLife* 8, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.49631>
- McMahon, L.A., Campbell, V.A., Prendergast, P.J., 2008. Involvement of stretch-activated ion channels in strain-regulated glycosaminoglycan synthesis in mesenchymal stem cell-seeded 3D scaffolds. *Journal of Biomechanics* 41, 2055–2059. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.03.027>
- Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J.Q., Bonewald, L.F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E.F., Penninger, J.M., Takayanagi, H., 2011. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine* 17, 1231–1234. <https://doi.org/10.1038/nm.2452>
- Peskin, C.S., 2002. The immersed boundary method. *Acta Numerica* 11, 479–517. <https://doi.org/10.1017/S0962492902000077>
- Sachs, F., 2010. Stretch-Activated Ion Channels: What Are They? *Physiology* 25, 50–56. <https://doi.org/10.1152/physiol.00042.2009>
- Skalak, R., Tozeren, A., Zarda, R.P., Chien, S., 1973. STRAIN ENERGY FUNCTION OF RED BLOOD-CELL MEMBRANES. *Biophysical Journal* 13, 245–264. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(73\)85983-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(73)85983-1)
- Sugawara, Y., Ando, R., Kamioka, H., Ishihara, Y., Murshid, S.A., Hashimoto, K., Kataoka, N., Tsujioka, K., Kajiya, F., Yamashiro, T., Takano-Yamamoto, T., 2008. The alteration of a mechanical property of bone cells during the process of changing from osteoblasts to osteocytes. *Bone* 43, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.02.020>
- Takeishi, N., Imai, Y., Nakaaki, K., Yamaguchi, T., Ishikawa, T., 2014. Leukocyte margination at arteriole shear rate. *Physiological Reports* 2, 1–8. <https://doi.org/10.14814/phy2.12037>
- Takeishi, N., Ito, H., Kaneko, M., Wada, S., 2019. Deformation of a red blood cell in a narrow rectangular microchannel. *Micromachines* 10, 1–15.

<https://doi.org/10.3390/mi10030199>

- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S., Ikeda, K., 2007. Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction. *Cell Metabolism* 5, 464–475. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.001>
- Teufel, S., Grötsch, B., Luther, J., Derer, A., Schinke, T., Amling, M., Schett, G., Mielenz, D., David, J.-P., 2014. Inhibition of Bone Remodeling in Young Mice by Bisphosphonate Displaces the Plasma Cell Niche into the Spleen. *The Journal of Immunology* 193, 223–233. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302713>
- Verbruggen, S.W., Vaughan, T.J., McNamara, L.M., 2016. Mechanisms of osteocyte stimulation in osteoporosis. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 62, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.05.004>
- Verbruggen, S.W., Vaughan, T.J., McNamara, L.M., 2014. Fluid flow in the osteocyte mechanical environment: A fluid-structure interaction approach. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 13, 85–97. <https://doi.org/10.1007/s10237-013-0487-y>
- Verbruggen, S.W., Vaughan, T.J., McNamara, L.M., 2012. Strain amplification in bone mechanobiology: A computational investigation of the in vivo mechanics of osteocytes. *Journal of the Royal Society Interface* 9, 2735–2744. <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0286>
- Wang, B., Lai, X., Price, C., Thompson, W.R., Li, W., Quabili, T.R., Tseng, W.J., Liu, X.S., Zhang, H., Pan, J., Kirn-Safran, C.B., Farach-Carson, M.C., Wang, L., 2014. Perlecan-containing pericellular matrix regulates solute transport and mechanosensing within the osteocyte lacunar-canalicular system. *Journal of Bone and Mineral Research* 29, 878–891. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2105>
- Wang, Y., McNamara, L.M., Schaffler, M.B., Weinbaum, S., 2007. A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15941–15946. <https://doi.org/10.1109/NEBC.2007.4413269>
- Weinbaum, S., Cowin, S.C., Zeng, Y., 1994. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *Journal of Biomechanics* 27, 339–360. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0021-9290(94)90010-8)
- Wijeratne, S.S., Martinez, J.R., Grindel, B.J., Frey, E.W., Li, J., Wang, L., Farach-Carson, M.C., Kiang, C.H., 2016. Single molecule force measurements of perlecan/HSPG2: A key component of the osteocyte pericellular matrix. *Matrix Biology* 50, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.11.001>
- Wu, D., Ganatos, P., C.Spray, D., Weinbaum, S., 2011. On the electrophysiological response of bone cells using a Stokesian fluid stimulus probe for delivery of quantifiable localized piconewton level forces. *Journal of Biomechanics* 44, 1702–1708. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Xiong, J., Onal, M., Jilka, R.L., Weinstein, R.S., Manolagas, S.C., O'Brien, C.A., 2011. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nature Medicine* 17, 1235–1241. <https://doi.org/10.1038/nm.2448>

- You, J., Yellowley, C.E., Donahue, H.J., Zhang, Y., Chen, Q., Jacobs, C.R., 2000. Substrate Deformation Levels Associated With Routine Physical Activity Are Less Stimulatory to Bone Cells Relative to Loading-Induced Oscillatory Fluid Flow. *Journal of biomechanical engineering* 122, 387–393. <http://biomechanical.asmedigitalcollection.asme.org/>
- You, L., Cowin, S.C., Schaffler, M.B., Weinbaum, S., 2001. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. *Journal of Biomechanics* 34, 1375–1386. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(01\)00107-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(01)00107-5)
- You, L.D., Weinbaum, S., Cowin, S.C., Schaffler, M.B., 2004. Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 278, 505–513. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20050>
- Zeng, Y., Cowin, S.C., Weinbaum, S., 1994. A fiber matrix model for fluid flow and streaming potentials in the canaliculi of an osteon. *Annals of Biomedical Engineering* 22, 280–292. <https://doi.org/10.1007/BF02368235>
- Zhou, T., Gao, B., Fan, Y., Liu, Y., Feng, S., Cong, Q., Zhang, X., Zhou, Y., Yadav, P.S., Lin, J., Wu, N., Zhao, L., Huang, D., Zhou, S., Su, P., Yang, Y., 2020. Piezo1/2 mediate mechanotransduction essential for bone formation through concerted activation of NFAT-YAP1- β -catenin. *eLife* 9, 1–38. <https://doi.org/10.7554/eLife.52779>

A.2 EBS におけるグリッド点の分類

本研究では、連続体ベース粒子モデルに基づく変形解析の数値的不安定性を軽減するため、式(2.5)における内挿関数 $N_g(\mathbf{x})$ として、グリッド間隔 h の正方グリッド上で定義される quadratic extended B-splines (EBS)を用いた。EBS を設定するため、各グリッド点を、物質粒子の配置に基づき、内部グリッド点、境界グリッド点、および、外部グリッド点に分類した。その際、グリッド点 g における物質粒子の体積分率 ϕ_g を

$$\phi_g = \frac{\sum_{p \in Q} V_p}{V_g} \quad (\text{A2.1})$$

と定義した。ここで、 Q はグリッド点 g を中心とする一辺 h の立方体領域を表し、 $V_g = h^3$ は領域 Q の体積、 V_p は物質粒子 p の体積である。第 2 章では、occupation parameter Γ を $\Gamma = 0.85$ と定め、グリッド点 g を $\phi_g > \Gamma$ のとき内部グリッド点、 $0 < \phi_g \leq \Gamma$ のとき境界グリッド点、 $\phi_g = 0$ のとき外部グリッド点に分類した。この分類に応じ、内挿関数 $N_g(\mathbf{x})$ が定められた。

第 3 章以降では、アポトーシスによるヤング率の低下にともなう数値不安定性が生じる。そのため、グリッド点 g における物質粒子の重み付き体積分率 ϕ'_g を

$$\phi'_g = \frac{\sum_{p \in Q} E_p V_p}{E_{\text{cell}} V_g} \quad (\text{A2.2})$$

と定義した。ここで、 $E_p = E(t)$ は物質粒子 p のヤング率、 E_{cell} は軟骨細胞のヤング率である。第 3 章以降では、occupation parameter Γ を $\Gamma = 0.25$ 、重み付き occupation parameter Γ' を $\Gamma' = 0.75$ と設定し、グリッド点 g を $\phi_g > \Gamma$ かつ $\phi'_g > \Gamma'$ の場合内部グリッド点、 $\phi_g = 0$ の場合外部グリッド点、それ以外の場合境界グリッド点に分類することで、数値不安定性の軽減を図った。

A.3 拡散解析手法

単因子モデルにおける分化因子(DF)の拡散解析には、連続体ベース粒子モデルにおけるオイラーグリッドを用いた解析を応用した。一つの軟骨細胞と周囲の軟骨基質を代表する点とみなした、位置 \mathbf{x}_p に存在する物質粒子 p は、式(3.2)に従い $S_p = S(\mathbf{x}_p, t)$ の DF を産生する。式(3.1)の拡散方程式に従う DF の濃度分布を正方グリッド上で計算するため、グリッド点 g における DF 産生量 S_g を、連続体ベース粒子モデルにおける変形解析で用いるものと同形式の内挿関数 $N_g(\mathbf{x})$ を用いて

$$S_g = \frac{\sum_p S_p V_p N_g(\mathbf{x}_p)}{(h')^3} \quad (\text{A3.1})$$

により求めた。ここで、 V_p は物質粒子 p の体積、 h' は拡散解析におけるグリッド間隔である。続いて、4次中心差分法を用いて式(3.1)を解くことにより、グリッド点 g における DF の濃度 C_g を求めた。このとき、次元解析では $z = 0$ において(Fig. 3.1c)、三次元解析では $x = 0$, $y = 0$, および、 $z = 0$ 平面において(Fig. 3.1f)、対称境界条件を適用した。また、無限遠における DF の濃度を 0 と設定した。最後に、DF の濃度場 $C(\mathbf{x}, t)$ を

$$C(\mathbf{x}, t) = \sum_g C_g N_g(\mathbf{x}) \quad (\text{A3.2})$$

により求めた。

A.4 骨形態形成シミュレーションにおける物質粒子の初期配置設定

三次元骨形態形成シミュレーションにおける物質粒子の初期配置は、物質粒子をランダムに配置した後、密度が一様となるようその位置を緩和させることにより決定された。まず、軟骨原器モデルの 8 分の 1 の領域を包含する立方体領域を設定した。次に、物質粒子の体積の総和がその立方体領域の体積に達するまで、立方体領域内のランダムな位置に物質粒子を配置した。さらに、物質粒子の位置を、物質粒子 p のエネルギー関数 U_p と位置 \mathbf{x}_p に関する過減衰条件の運動方程式

$$b\dot{\mathbf{x}}_p = -\frac{\partial U_p}{\partial \mathbf{x}_p} \quad (\text{A4.1})$$

に従い緩和させた。ここで、 b は摩擦係数である。エネルギー関数 U_p は、二つの物質粒子 p と p' の間のポテンシャルエネルギー $U(r_{pp'})$ から

$$U_p = \sum_{p'} U(r_{pp'}) \quad (\text{A4.2})$$

と計算した。ここで $r_{pp'}$ は二つの物質粒子 p と p' の間の距離である。ポテンシャルエネルギー $U(r_{pp'})$ を、Lennard-Jones ポテンシャルを援用することにより

$$U(r_{pp'}) = \epsilon \left[\left(\frac{r_0}{r_{pp'}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_0}{r_{pp'}} \right)^6 \right] \quad (\text{A4.3})$$

と表した。ここで、 ϵ は解離エネルギー、 r_0 は平衡粒子間距離である。二つの物質粒子 p と p' の間の平衡粒子間距離 r_0 を、それらの体積 V_p と $V_{p'}$ を用いて

$$r_0 = \frac{1}{2} (\sqrt[3]{V_p} + \sqrt[3]{V_{p'}}) \quad (\text{A4.4})$$

と推定した。立方体表面を構成するの 3 組の向かい合う 2 面に周期境界条件を適用し、物質粒子の変位が収束するまで、運動方程式(A4.1)に従う粒子の移動を計算した。最後に、軟骨原器モデルの 8 分の 1 の領域に含まれる物質粒子を抽出し、その位置に応じ静止軟骨細胞または軟骨膜と設定した(Fig. 3.1f)。

A.5 長骨の外形状に起因する骨長軸方向の圧縮応力

軟骨細胞の肥大化が増殖層の応力場に及ぼす影響を評価するため、第 4.3.3 項で行った No-growth 条件のシミュレーションでは、応力異方性が小さい(Fig. 4.4d)にも関わらず増殖軟骨細胞が軟骨カラムを形成した(Fig. A5.1). これは、増殖層の大部分において、骨長軸方向の応力(σ_z)が他の方向の応力(σ_r , σ_θ)よりも強い圧縮を示していたためである(Figs. 4.4b, c). この応力場が生じる原因を明らかにするため、骨組織内部の応力場に対する骨の外形状の影響を解析した. そのために、肥大軟骨細胞と軟骨膜のみからなり、成長板構造や骨性骨膜襟を形成しない組織の成長シミュレーションを行った(Fig. A5.2a). 軟骨細胞の 1 日間の肥大化の後、軟骨細胞における骨長軸方向の応力(σ_z)が、半径方向や円周方向の応力(σ_r , σ_θ)よりも強い圧縮を示すことが明らかとなった(Fig. A5.2b). したがって、最小主応力方向(\mathbf{n}_{\min})の骨長軸方向への配向(Fig. A5.2c)は、長骨の細長い外形状に起因することが示された.

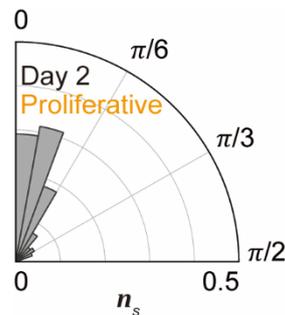


Figure A5.1 Histogram of the division direction n_s in the proliferative zone at Day 2 in the No-growth simulation, measured from the z-axis.

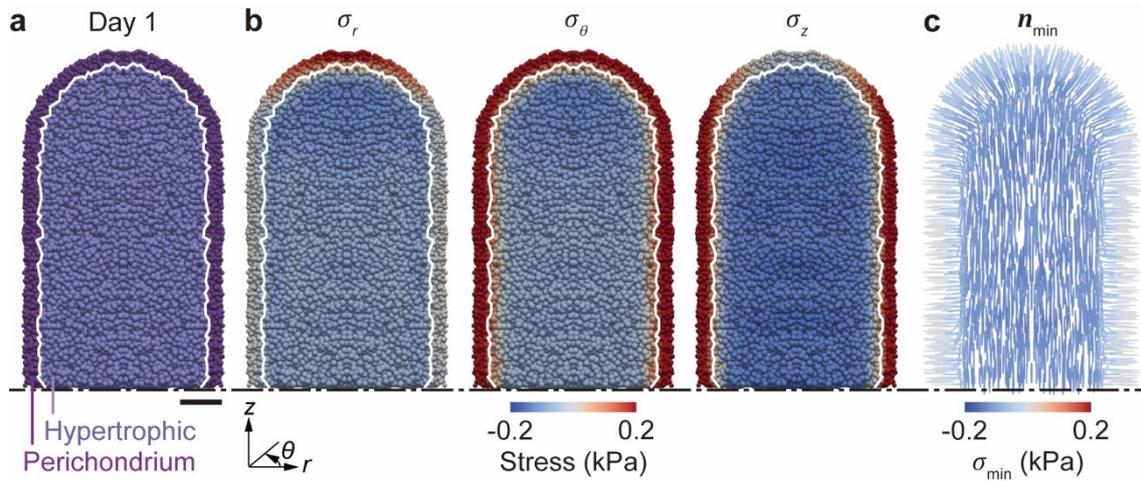


Figure A5.2 Effect of long bone shape on the stress field. **(a)** Tissue consisting of only hypertrophic chondrocytes and perichondrium after 1 day of chondrocyte hypertrophy (Day 1); here, 50 μm offset of the r - z cross section of half of the tissue is shown. **(b)** Distribution of stress in radial (σ_r), circumferential (σ_θ), and bone longitudinal (σ_z) directions at Day 1. **(c)** Minimal principal stress directions (n_{\min}) at Day 1. Scale bar: 100 μm .

関連学術論文・学術講演

a. 学術論文

- a-1. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, and Taiji Adachi, "Development of continuum-based particle models of cell growth and proliferation for simulating tissue morphogenesis," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 142, 105828 (2023). DOI: 10.1016/j.jmbbm.2023.105828 (第2章)
- a-2. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, Junko Sunaga, Koichiro Maki, and Taiji Adachi, "Chondrocyte hypertrophy in the growth plate promotes stress anisotropy affecting long bone development through chondrocyte column formation," *Bone*, in press. (第3, 4章)
- a-3. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, Hiroshi Kamioka, and Taiji Adachi, "High-resolution image-based simulation reveals membrane strain concentration on osteocyte processes caused by tethering elements," *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 20, 2353–2360 (2021). DOI: 10.1007/s10237-021-01511-y (付録 A.1)

b. 学術講演（招待講演）

- b-1. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「力学状態に応じた細胞増殖による組織形態形成の数理解析」, 日本機械学会 第33回バイオフィロントニア講演会, 2F01, 神戸, 2022年12月.
- b-2. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, "Mechanical modeling of multicellular growth for computer simulation of bone morphogenesis," *9th World Congress of Biomechanics (WCB2022)*, O-22098, Taipei, Taiwan (hybrid), July 2022.

c. 学術講演（国際学会）

- c-1. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, "Evaluation of the effect of a cell cycle checkpoint on multicellular tissue growth," *12th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP-BIOMECH) 2023*, Kuala Lumpur, Malaysia, November 2023. (Oral presentation)
- c-2. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, "Multicellular mechanical modeling for investigating bone morphogenesis," *18th International Symposium of The Institute Network*, Tokyo, Japan, October 2023. (Poster presentation)
- c-3. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, "A simulation study reveals the effect of a cell size checkpoint on tissue mechanical behaviors," *6th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics*, Otaru, Japan, August 2023. (Oral presentation)
- c-4. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, "Modeling and simulation of tissue growth caused by cell proliferation during morphogenesis," *28th Congress of the European Society of Biomechanics*, 316, Maastricht, the Netherlands, July 2023. (Oral presentation)
- c-5. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, "Computational analysis of tissue mechanical behaviors according to cell proliferation during morphogenesis," *RIKEN BDR Symposium 2023*, P-53, Kobe, Japan, March 2023. (Poster presentation)
- c-6. Taiji Adachi, Yuka Yokoyama, Hiroshi Kamioka, Yoshitaka Kameo, "Image-based simulation study on mechanosensing amplification mechanism at osteocyte processes in bone canalicular space," *15th World Congress on Computational Mechanics and 8th Asian Pacific Congress on Computational Mechanics (WCCM-APCOM2022)*, MS403, p. 712, Yokohama, Japan (online), July 2022. (Oral presentation)

- c-7. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, "Computer simulation of multicellular dynamics in bone morphogenesis by material point method," *The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics*, PP2-102, Kyoto, Japan (online), December 2021. (Oral and poster presentation)
- c-8. Yuka Yokoyama, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, "Image-based analysis of flow-induced strain on the osteocyte process via tethering elements," *26th Congress of the European Society of Biomechanics*, Milan, Italy (online), July 2021. (Oral presentation)

d. 学術講演（国内学会）

- d-1. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 須長 純子, 牧 功一郎, 安達 泰治, 「骨形態形成中の軟骨カラム形成を制御する組織内応力場の力学解析」, 日本機械学会 第 34 回バイオフィロントニア講演会, 1B19, 山口, 2023 年 12 月. (口頭発表)
- d-2. 増山 諒, 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「組織間の力学的相互作用にともなう形態形成シミュレーション」, 日本機械学会 第 34 回バイオフィロントニア講演会, 1B13, 山口, 2023 年 12 月. (口頭発表)
- d-3. 増山 諒, 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「組織形態形成機構の理解を目指した連続体ベース粒子法による組織間接触モデリング」, 日本機械学会 第 36 回計算力学講演会(CMD2023), OS-0512, 豊橋, 2023 年 10 月. (口頭発表)
- d-4. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「骨形態形成における成長板の形成・移動を表現する一因子モデル」, 日本機械学会 第 35 回バイオエンジニアリング講演会, P207-1, 仙台, 2023 年 6 月. (ポスター発表)
- d-5. 安達 泰治, 横山 優花, 鈴木 龍之介, 亀尾 佳貴, 「骨の形づくりとリモデリングの力学的理解を目指した数理モデリング」, 第 45 回日本分子生物学会年会, 1PW-12-3, 幕張, 2022 年 11 月. (口頭発表)

- d-6. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「細胞の肥大と増殖の粒子モデリングによる骨組織形態形成の連続体力学解析」, 日本機械学会 第 35 回計算力学講演会(CMD2022), 6-05, 鹿児島 (オンライン), 2022 年 11 月.
(口頭発表)
- d-7. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「骨形態形成過程における細胞動態の力学モデリングとシミュレーション」, 第 49 回日本臨床バイオメカニクス学会学術集会, O28-7, 弘前, 2022 年 11 月. (口頭発表)
- d-8. 安達 泰治, 横山 優花, 須長 純子, 牧 功一郎, 亀尾 佳貴, 「メカノセンサー骨細胞の *in vitro/in silico* バイオメカニクス実験」, 第 49 回日本臨床バイオメカニクス学会学術集会, S7-1, 弘前, 2022 年 11 月. (口頭発表)
- d-9. 増山 諒, 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「組織形態形成における細胞増殖の連続体ベース粒子モデリング」, 日本機械学会 M&M2022 材料力学カンファレンス, OS1117, 弘前, 2022 年 9 月. (口頭発表)
- d-10. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「細胞増殖数理モデルによる組織成長の力学解析」, 日本機械学会 第 34 回バイオエンジニアリング講演会, 1P2-02, 福岡, 2022 年 6 月. (ポスター発表)
- d-11. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「骨形態形成における細胞動態を考慮した組織成長の数理モデリング」, 日本機械学会 第 32 回バイオフロンティア講演会, 1B25, 名古屋 (オンライン), 2022 年 1 月. (口頭発表)
- d-12. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「細胞増殖による組織形態形成の力学モデル構築」, 日本機械学会 M&M2021 材料力学カンファレンス, OS1005, 名古屋 (オンライン), 2021 年 9 月. (口頭発表)
- d-13. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 上岡 寛, 安達 泰治, 「骨細胞の流れ刺激感知におけるテザリングエレメントの力学的役割」, 日本機械学会 第 31 回バイオフロンティア講演会, 1C24, 長野 (オンライン), 2020 年 12 月. (口頭発表)
- d-14. 亀尾 佳貴, 横山 優花, 上岡 寛, 安達 泰治, 「イメージベース流体-構造連成解析による骨細管内骨細胞突起の局所的ひずみ評価」, 第 40 回骨形態計測学会, VII-5, 岡山 (紙面開催), 2020 年 6 月.

- d-15. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「Image-based モデルを用いた骨細管内細胞突起の流体－構造連成解析」, 日本機械学会 第 30 回バイオフィロンティア講演会, 1A32, 鹿児島, 2019 年 7 月. (口頭発表)

e. 学術講演 (セミナー等)

- e-1. Yuka Yokoyama, "Stress analysis within the growth plate during bone morphogenesis," *JST-CREST [Degradation and stability] Design of multi-hierarchical and self-assembled composite materials, 4th meeting*, Osaka, Japan, October 2023. (Poster presentation)
- e-2. 横山 優花, 「骨を形作る多細胞動態の力学シミュレーション」, JST-CREST [分解と安定化] 階層性自己組織化複合材料デザイン 第 2 回チーム会議, 京都, 2023 年 4 月. (口頭発表)
- e-3. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「細胞増殖の粒子モデルによる多細胞組織の形態形成解析」, JST-CREST [多細胞] 第 4 回領域会議, 34, 名古屋, 2023 年 1 月. (ポスター発表)
- e-4. Yuka Yokoyama, "Mechanical analysis of cellular activities in bone morphogenesis and remodeling," *Open Seminar*, Kanazawa, Japan, September 2022. (Oral presentation)
- e-5. 横山 優花, 亀尾 佳貴, 安達 泰治, 「骨細管内細胞突起の Image-based 流体－構造連成解析」, 文部科学省研究費補助金 新学術領域研究 脳構築における発生時計と場の連携 第 4 回班会議, 44, 金沢, 2019 年 7 月. (ポスター発表)

f. 受賞

- f-1. 第 34 回バイオフィロントニア講演会 若手講演表彰, 日本機械学会 バイオエンジニアリング部門, 2023 年 12 月.
- f-2. 日本機械学会 女性未来賞, 2023 年 12 月.
- f-3. BEST ABSTRACT AWARD, *12th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP-BIOMECH) 2023*, November 2023.
- f-4. Outstanding Presentation, 日本機械学会 バイオエンジニアリング部門, 2023 年 6 月.
- f-5. Outstanding Poster Presentation, 日本機械学会 バイオエンジニアリング部門, 2022 年 6 月.
- f-6. 令和 3 年度工学研究科長賞, 京都大学, 2022 年 3 月.
- f-7. Outstanding Student Presentation, 日本機械学会 バイオエンジニアリング部門, 2022 年 1 月.

謝辞

本研究の遂行にあたり，指導教員である京都大学医生物学研究所の安達泰治先生には，幾度となく教育的で熱心なご指導を賜りました．ここに，謹んで深甚なる感謝の意を表します．また，芝浦工業大学機械機能工学科の亀尾佳貴先生には，研究活動の開始から今日に至るまで，日々の議論をはじめとする様々な場面で多大なるご指導を賜りました．心より感謝申し上げます．

京都大学医生物学研究所の須長純子氏には，実験の手技をご指導いただくとともに，研究遂行にあたり多数の貴重なご助言をいただきました．ここに，心より感謝の意を表します．また，同研究所の牧功一郎先生には，本研究の遂行のみならず，研究者としてのキャリア形成についてもご助言を賜りました．深く感謝いたします．

京都大学工学研究科の井上康博先生と新宅博文先生には，本論文をご高覧いただき，多数の貴重なご助言を賜りました．心より感謝いたします．

京都大学医生物学研究所バイオメカニクス分野の皆様には，研究生活を通じて大変お世話になりました．Kennedy Omondi Okeyo 先生には，研究に対する数多くの有意義なご助言を賜りました．金英寛先生，および，Jeonghyun Kim 先生には，折に触れて研究生活の励みとなるご助言を賜りました．平良美智代氏，および，森山友紀恵氏には，研究室での生活を通じて温かいご支援を賜りました．深く御礼申し上げます．

博士後期課程の同輩である福手淳平氏には，研究生活における同志としてお世話になるとともに，生物学的な見地から多数の重要なご意見を頂きました．ともに連続体ベース粒子モデルの開発とその妥当性検証に取り組んでくださった増山諒氏，谷尻達哉氏，および，Jorik Stoop 氏には，解析上の課題やその解決策について数多の有益なご指摘やご助言を頂きました．竹田宏典氏，安藤悠太氏，および，仲尾信彦氏をはじめとする諸先輩方には，研究活動のみならず，学生生活や将来の展望について数多くの温かいご助言を賜りました．また，ここに謝意

を表しきれなかった研究室の皆様，および，学術会議等で議論させていただき，ご助言を賜り，アカデミアの魅力を伝えてくださった全ての方々に，深く御礼申し上げます。

最後に，これまで長い間，私の意思を尊重し，心身を支え，温かく見守り続けてくれた両親と，私の進学を喜んでくれた家族や親戚の皆様，心より感謝いたします。

2024年3月 横山優花

