

Cellular Potts Modeling for Mechanical Wave Propagation in Multicellular Migration

平島剛志¹, 日野直也², 松田道行^{1,2}

Tsuyoshi Hirashima¹, Naoya Hino², and Michiyuki Matsuda^{1,2}

1. 京都大学・医学研究科・病態生物医学

Dept. Pathology and Biology of Diseases, Grad. Sch. Medicine, Kyoto Univ

2. 京都大学・生命科学研究科・生体制御学

Lab. of Bioimaging and Cell Signaling, Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ

1. はじめに

生物の発生や創傷治癒過程では、細胞集団がまとまりをもって一方向に遊走する現象が数多く観察される。この協調的な細胞集団遊走過程では、集団内のすべての細胞が能動的に力を発揮し(Trepat et al., 2009)、互いに接着する隣接細胞間で力を伝え合うことが知られている(Serra-Picamal et al., 2012; Tambe et al., 2011)。細胞が集団で協調的に遊走するには、集団内の力の伝達が何かしらの制御機構に支えられていると考えられるが、未だ不明な点が多い。

細胞は、細胞内シグナル伝達経路を介して、受容した力を能動的な力生成に変換する機構を有している(van Helvert et al., 2018)。このような応答機構を備えた素子の集合体として細胞集団を捉えると、細胞内のシグナル伝達とそれに起因する細胞間の力伝達を統合的に扱うアプローチが必要となる。問題解決に向けた一つのアプローチとして、実験結果に基づき構築された仮説や概念的なモデルを数理モデルによって具体化し、モデルの解析を通して仮説の十分性を検証することが挙げられる(te Boekhorst et al., 2016)。

本講演録では、細胞集団遊走を表現する数理モデルのひとつとして、細胞集団を一細胞解像度で表現する Cellular Potts Model (CPM) について紹介する。はじめに、細胞集団遊走に関する実験について簡単にまとめる。次に、CPM の基本的な解説を行う。細胞生物学的知見に基づき、細胞の前後極性を CPM に導入したのちに、最後に、実験条件に対応した数値シミュレーションの結果を示す。

2. 細胞集団遊走の実験

細胞集団遊走の実験系として、私たちは、イヌ腎臓尿管上皮細胞由来の細胞株である Madin-Darby canine kidney cell (MDCK) を用い、細胞遊走アッセイを行った。ここでの細胞遊走アッセイとは、シリコンゴム製の仕切り枠の中に MDCK を高密度で播種し、仕切りを外すことで細胞集団が自由空間に向かって遊走する実験系のことである。

MDCK 細胞の集団遊走過程における重要なシグナル分子として、多様な生命活動に関与する MAP (mitogen-activated protein kinase) キナーゼ/ERK (extracellular signal-regulated kinase) が注目されている。2004 年に松林らは、ERK 活性が MDCK の細胞集団遊走に必須であること、ERK 活性の空間パターンが時間的に非一様であることを報告した(Matsubayashi et al., 2004)。2017 年に青木らは、ERK 活性を可視化するバイオセンサーを用いることで、ERK 活性が細胞集団中を波のように伝播することを報告した。さらに、ERK 活性の伝播方向に逆らうように細胞が運動することを見出し、ERK 活性と細胞遊走との関係性を論じている(Aoki et al., 2017)。

私たちは青木らの研究を発展させるかたちで、細胞遊走時の ERK 活性制御に関わる力学因子を調べている。本稿では詳細な実験については記さない。実験データの定量的な解析と種々の阻害剤やロックアウト実験により、『細胞の伸展→ERK 活性の亢進→細胞の収縮→ERK 活性の減弱』の順序で細胞の形態変化と ERK 活性変化が進行することを明らかにした。

この実験事実をもとに、細胞集団の力伝達や ERK 活性の伝播について以下のような作業仮説を考えている。細胞集団先頭の細胞(慣習的にリーダー細胞と呼ばれる)は自由領域に能動的に遊走し後方の細胞(フォロワー細胞)を牽引する。フォロワー細胞はリーダー細胞に引っ張られるために、細胞が伸びる。これにより、ERK 活性が亢進する。ERK 活性に依存する収縮力が隣接細胞に伝えられることで、隣接細胞が伸展し、ERK 活性の伝播が起こる。一方で、収縮した細胞は ERK 活性が次第に減弱する。この仕組みにより、細胞の伸縮とそれに基づく ERK 活性の変化が生まれ、ERK 活性の細胞-細胞間の伝播が生じる。

次章以降で、この概念的なモデルを数理モデルとして表現し、実験観察される ERK 活性の波の伝播を説明できるのか、検証してみる。

3. 細胞集団遊走の Cellular Potts Model (CPM)

3-1. CPM の概要

Cellular Potts Model (CPM) は、細胞の形態を格子の集合で表現する空間離散モデルである(Glazier and Graner, 1993; Graner and Glazier, 1992)。複雑な細胞形態を表現

できる点とモデル実装が簡便な点から、さまざまな生命現象に適用されている (Hirashima et al., 2017)。たとえば、表皮細胞や血管内皮細胞、細胞性粘菌などの集団運動の記述にも用いられてきた (Hirashima et al., 2013; Marée and Hogeweg, 2001; Szabó et al., 2012)。

CPM では、細胞のかたちを格子の集合によって表す。各格子にはスカラー値 $\sigma \in (0, \dots, n)$ が割り当てられており、たとえば、 $\sigma = 0$ の格子を非細胞領域、正の σ を持つ格子を細胞領域とする。 σ の値は細胞のインデックスである。CPM では、細胞の形態や配置に依存して、系全体のエネルギー H が定まる。系の状態更新は、あるランダムに選ばれた計算格子とその隣接格子とを置き換えることで H の差分 ΔH を計算し、 ΔH が負であれば置き換えを、 ΔH が正であっても確率的に置き換えが起こることで、実現する。格子の置換を繰り返すことで、徐々に系のエネルギー最小状態に近づく。詳細なアルゴリズムに関しては他の文献をご参照いただきたい (Balter et al., 2007; Glazier and Graner, 1993; Hirashima, 2013)。また、実際に数値計算をしてみたい方は、商用スクリプト言語である MATLAB で書いたプログラムを公開しているので、お試しいただきたい (Hirashima, 2017)。

本研究のモデルでは H を下記のように定めた。

$$H = H_{adhesion} + H_{elasticity} + H_{migration} \quad \text{式 (1)}$$

第1項は、細胞-細胞間、もしくは細胞と非細胞領域の界面に生じる表面自由エネルギーに相当するものであり、細胞間接着や細胞膜直下の細胞骨格に由来する表面張力を含むものである。第2項は、細胞の体積弾性に基づく項であり、細胞の大きさを適当に維持する効果がある。第3項は、細胞遊走に相当する項であり、能動的な力生成の項となる。後述の通り、細胞遊走は細胞の収縮と突出によって構成されているものであり、ERK 活性の強度に依存する。

第1項と第2項は、基本的にはどの CPM にも含まれるものであり、紙面の都合上解説を避ける。詳しくは他の文献を参照いただきたい (Glazier and Graner, 1993)。第3項は、3-3. で詳しく解説する。

3-2. ERK 活性のダイナミクス

細胞の伸展・収縮に応じて調整される ERK 活性は、

$$\frac{dC_\sigma}{dt} = U(\varepsilon_\sigma - \varepsilon^*)k_1 - k_2C_\sigma \quad \text{式 (2)}$$

のように微分方程式で表した。 C_σ は ERK 活性の強度、 k_1 、 k_2 はリン酸化・脱リン酸化を規定する反応速度パラメーター、 ε_σ は細胞のひずみであり、 $\varepsilon_\sigma = (A_\sigma/A_0) - 1$ で定

義される。また、 $U(x)$ は下記の単位ステップ関数である。

$$U(x) = \begin{cases} 1 & x \geq 0 \\ 0 & x < 0 \end{cases} \quad \text{式 (3)}$$

式 (2) は、ERK 活性の制御に関しひずみの閾値があることを意味しており、細胞の伸展実験の結果に基づく。これは、細胞のひずみがある閾値 ε^* より大きくなると ERK 活性が亢進し、閾値 ε^* より小さくなると自然な脱リン酸化により ERK 活性が減弱することを意味する。

3-3. 細胞の前後極性と細胞移動に伴う収縮・突出

遊走する細胞は、前後極性 (front-rear polarity) を持つことが知られている (Ladoux et al., 2016; Nelson, 2009)。たとえば、細胞の遊走方向後端では、細胞骨格であるアクチンとモータータンパク質であるミオシンが協同することで自発的な収縮力が生じ、細胞膜の局所的な収縮が起こる。一方で、遊走方向前端では、アクチンが盛んに重合し、葉状仮足と呼ばれる細胞膜が大きく突出した構造を形成する。つまり、細胞遊走時には、前後極性に沿って細胞膜の「前」と「後ろ」が規定され、後端収縮と前端突出が組み合わさることで細胞が遊走すると考えられている。

本モデルでは、個々の細胞に対し前後極性を単位ベクトル $\vec{\phi}_\sigma$ で与え、細胞遊走を

$$H_{migration} = \lambda^{\text{ct}} \sum_{\sigma=1} C_\sigma \sum_{l_\sigma} (-a_{l_\sigma}) U(-a_{l_\sigma}) - \lambda^{\text{ex}} \sum_{\sigma=1} C_\sigma \sum_{l_\sigma} a_{l_\sigma} U(a_{l_\sigma}) \quad \text{式 (4)}$$

で表す。 $a_{l_\sigma} = \vec{\phi}_\sigma \cdot \vec{\rho}_{l_\sigma}$ で、 l_σ は細胞 σ の周囲を構成する格子であり、 $\vec{\rho}_{l_\sigma}$ は細胞 σ の重心位置を起点とする l_σ までの単位ベクトルである。なお、 $\sum_{l_\sigma}$ は細胞 σ の周囲を構成する格子の総和を意味する。 λ^{ct} と λ^{ex} は、それぞれ後端収縮、前端突出の重み付けパラメーターである。式 (4) の第 1 項が収縮に、第 2 項が突出に対応し、これらは ERK 活性の強度 C_σ に依存している。

3-4. 細胞極性のダイナミクス

細胞の前後極性の向きは時事刻々と変化する。本節では前後極性のダイナミクスを導入する。どのような規則で前後極性のダイナミクスが決まるのかは未解明であるが、前後極性と細胞間の張力との関係についてはいくつか報告がある (Das et al., 2015; Hayer et al., 2016)。たとえば、細胞-細胞間にかかる張力が小さいときは、腫瘍抑制タンパクである Merlin が細胞膜直下に局在し前後極性を決める Rac1 の活性を抑制するが、細胞-細胞間にかかる張力が大きくなると、Merlin が細胞質に遊離し Rac1 の局所

的な活性化を促すことが明らかとなっている(Das et al., 2015)。つまり、細胞間に張力がかかった局所領域で **Rac1** が活性化する。これにより、細胞集団遊走過程において、リーダー細胞がフォロワー細胞を牽引することで細胞-細胞間に張力がかかり、これが引き金となって集団先頭から徐々に前後極性が集団遊走方向に向きついて整列していくであろうことが示唆されている。

上記の通り、細胞の前後極性の向きは、集団内で各細胞がダイナミックに運動する過程で自然に揃えられるものと考えられる。ここでは、各細胞の前後極性のダイナミクスを下記のように与えた。

$$\Delta \vec{\phi}_\sigma = \omega \Delta \vec{m}_\sigma \quad \text{式 (5)}$$

Δ は単位時間あたりの変化分を表し、 $\vec{m}_\sigma$ は細胞 σ の重心位置の変化を表す単位ベクトルである。細胞が動いた正味の位置の変化に対し、前後極性がどの程度影響を受けるのかはパラメーター ω によって決まる。つまり、 ω は前後極性変化の細胞の位置変化に対する感度とみなすことができる。

式 (5) によって生まれる前後極性の集団としての振る舞いは以下の通りである。たとえば、ある細胞 A が隣の細胞 B から引っ張られることで、細胞 A の前後極性とは逆向きに細胞が動いたとする。 ω が大きいときには、細胞 A の前後極性は、細胞 B に引っ張られた方向へ向きつく。一方で、 ω が小さいと、細胞 B の影響に依存せずに、細胞 A の前後極性の向きは時間とともに変わらない。式 (5) は、細胞の押し合い引っ張り合いによって前後極性が整列する現象を表現する一つの形式であり、類似の規則は他の研究でも採用されている(Szabó et al., 2010)。なお、適切に ω の値を選ぶことでたとえば、少数の細胞のクラスターで観察される周回運動をシミュレーションで生成することができ(Hirashima, 2013; Hirashima et al., 2013)、式 (5) は多様な細胞集団の運動を生み出す前後極性のダイナミクスといえる。

4. 数値シミュレーション

実験に対応したシミュレーションを行うために、下記の通りに条件設定した。

- 細胞の大きさ：65 ピクセル（格子）（ $A_\sigma^0 = 65$ ）、 $2.5 \mu\text{m}$ /ピクセルとみなした。
- 計算領域：1000×400（x 軸×y 軸）ピクセル。
- 初期配置：x 軸方向に端から細胞 95 個分、y 軸方向に細胞 50 個分を配置。
- 境界条件：x 軸方向は反射境界、y 軸方向は周期境界。

また、自由空間に接している細胞は全てリーダー細胞とみなし、a. 前後極性は常に自由空間に向いている、b. 収縮・突出は **ERK** 活性に依存せず常に一定、とした。また、細胞遊走の影響のみを調べるため、細胞分裂は含めていない。

5. 結果

細胞移動の要素は後端収縮と前端突出に分けることができ、それぞれ片方の要素のみを含んだシミュレーションの結果を示す。下図 A は、ERK 活性の上昇によって後端収縮のみが誘導される場合の結果である。細胞集団遊走時の ERK 活性の大小が色の濃淡で表されており、時間とともに ERK 活性の波が集団先頭から後方に伝播していることがわかる。また、ERK 活性の波は一度のみならず、複数回生成されている。

我々が注目しているのは x 軸方向に沿った波の伝播であるため、y 軸方向に ERK 活性を平均した時間-x 軸のカイモグラフを図 B と図 C に示す。図 B は後端収縮のみの場合、図 C は前端突出のみの場合である。いずれの場合においても、集団先頭から後方にかけて複数回の ERK 活性の波が伝わっていることがわかる。

後端収縮の場合に波が伝播する理由は、2 章で提示した仮説通りである。前端突出の場合は、細胞伸展により亢進した ERK 活性がさらに細胞の伸展を促すのだが、細胞が大きさを維持しようとする弾性の効果によりいずれ収縮し、後方の細胞が引っ張られる。これにより、細胞間で力が伝達し、ERK 活性の波が作られることとなる。

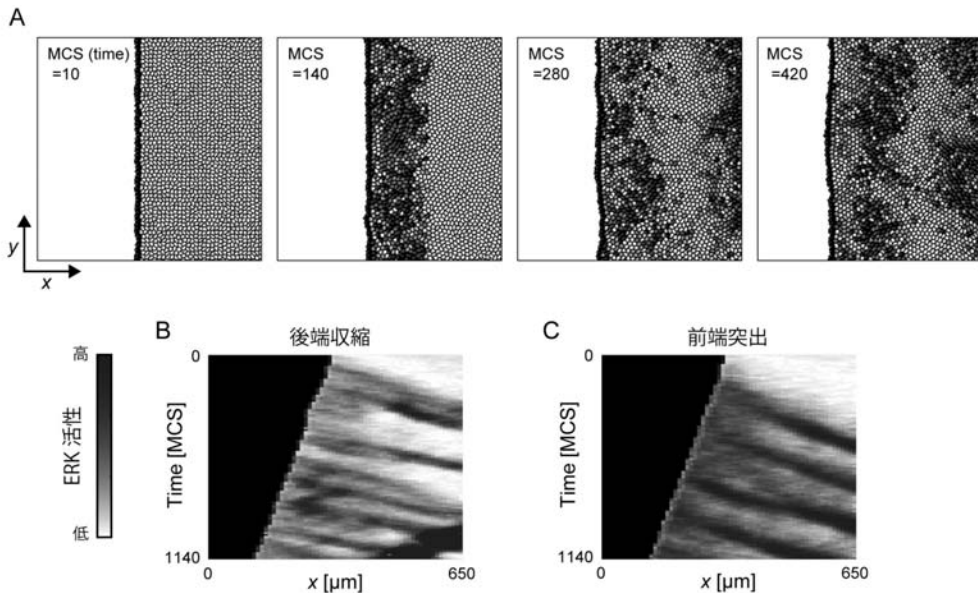


図 細胞集団遊走過程における ERK 活性の変化 (CPM シミュレーション)

A. 左から右に時間 (MCS は CPM の時間単位に相当する) が進む。色の濃淡は ERK 活性の大小を表す。パラメーター: $\lambda^a=10$, $\omega=0.1$, $k_1=k_2=0.05$, $J_c=2$, $J_m=2$, $T=1$. B. 後端収縮のカイモグラフ。C. 前端突出のカイモグラフ。 $\lambda^{ex}=2$.

6. おわりに

本稿では、細胞集団遊走を表現する数理モデルの枠組みとして、CPM を紹介した。『細胞の伸展→ERK 活性の亢進→細胞の収縮→ERK 活性の減弱』の実験事実を取り入れた CPM のシミュレーションにより、ERK 活性が集団先頭から後方へ伝わる仕組みを説明することができた。実験結果から構築した仮説は、観察される ERK 活性の波の伝播を説明するのに十分妥当なものであるといえる。

シミュレーションに用いたパラメーターは現象を説明するために適切な値を選んではいないものの、測定によって得られたものではない。そもそも、細胞集団運動を扱う数理モデルにおいて、測定可能なパラメーターはほとんどない。実験に基づく数理モデリング研究のためにも、計測技術の進展が期待される。また、計測によって得られた量をいかに数理モデルと繋げることができるかは、今後の大きな課題である。

7. 参考文献

- Aoki, K., Kondo, Y., Naoki, H., Hiratsuka, T., Itoh, R.E., Matsuda, M., 2017. Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration. *Dev. Cell* 43, 305–317.e5. doi:10.1016/j.devcel.2017.10.016
- Balter, A., Merks, R.M.H., Poplawski, N.J., Swat, M., Glazier, J. a, 2007. The Glazier-Graner-Hogeweg Model: Extensions, Future Directions, and Opportunities for Further Study. *Single-Cell-Based Model. Biol. Med.* 2, 17. doi:10.1007/978-3-7643-8123-3_7
- Das, T., Safferling, K., Rausch, S., Grabe, N., Boehm, H., Spatz, J.P., 2015. A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 17, 276–287. doi:10.1038/ncb3115
- Glazier, J.A., Graner, F., 1993. Simulation of the differential adhesion driven rearrangement of biological cells. *Phys. Rev. E* 47, 2128–2154. doi:10.1103/PhysRevE.47.2128
- Graner, F., Glazier, J.A., 1992. Simulation of Biological Cell Sorting Using Two-Dimensional Extended Potts Model. *Phys. Rev. Lett.* 69, 2013–2016. doi:10.1103/PhysRevLett.70.694
- Hayer, A., Shao, L., Chung, M., Joubert, L.M., Yang, H.W., Tsai, F.C., Bisaria, A., Betzig, E., Meyer, T., 2016. Engulfed cadherin fingers are polarized junctional structures between collectively migrating endothelial cells. *Nat. Cell Biol.* 18, 1311–1323. doi:10.1038/ncb3438
- Hirashima, T., 2017. Primer for cellular Potts model [WWW Document]. *Matlab File Exch. URL*
https://jp.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/64207-primer-for-cellular-potts-model?s_tid=srchtitle
- Hirashima, T., 2013. Cellular Potts Model on Collective Cell Movement. 第9回生物数学の

理論とその応用: RIMS研究集会報告集 49–55.

- Hirashima, T., Hosokawa, Y., Iino, T., Nagayama, M., 2013. On fundamental cellular processes for emergence of collective epithelial movement. *Biol. Open* 2, 660–6. doi:10.1242/bio.20134523
- Hirashima, T., Rens, E.G., Merks, R.M.H., 2017. Cellular Potts modeling of complex multicellular behaviors in tissue morphogenesis. *Dev. Growth Differ.* 59. doi:10.1111/dgd.12358
- Ladoux, B., Mège, R.M., Trepap, X., 2016. Front-Rear Polarization by Mechanical Cues: From Single Cells to Tissues. *Trends Cell Biol.* doi:10.1016/j.tcb.2016.02.002
- Marée, A.F.M., Hogeweg, P., 2001. How amoeboids self-organize into a fruiting body: multicellular coordination in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3879–83. doi:10.1073/pnas.061535198
- Matsubayashi, Y., Ebisuya, M., Honjoh, S., Nishida, E., 2004. ERK Activation Propagates in Epithelial Cell Sheets and Regulates Their Migration during Wound Healing. *Curr. Biol.* 14, 731–735. doi:10.1016/j.cub.2004.03.060
- Nelson, W.J., 2009. Remodeling Epithelial Cell Organization: Transitions Between Front-Rear and Apical-Basal Polarity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000513–a000513. doi:10.1101/cshperspect.a000513
- Serra-Picamal, X., Conte, V., Vincent, R., Anon, E., Tambe, D.T., Bazellieres, E., Butler, J.P., Fredberg, J.J., Trepap, X., 2012. Mechanical waves during tissue expansion. *Nat. Phys.* 8, 628–634. doi:10.1038/nphys2355
- Szabó, A., Ünneper, R., Méhes, E., Twal, W.O., Argraves, W.S., Cao, Y., Czirók, A., 2010. Collective cell motion in endothelial monolayers. *Phys. Biol.* 7. doi:10.1088/1478-3975/7/4/046007
- Szabó, A., Varga, K., Garay, T., Hegedűs, B., Czirók, A., 2012. Invasion from a cell aggregate—the roles of active cell motion and mechanical equilibrium. *Phys. Biol.* 9, 16010. doi:10.1088/1478-3975/9/1/016010
- Tambe, D.T., Corey Hardin, C., Angelini, T.E., Rajendran, K., Park, C.Y., Serra-Picamal, X., Zhou, E.H., Zaman, M.H., Butler, J.P., Weitz, D.A., Fredberg, J.J., Trepap, X., 2011. Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. *Nat. Mater.* 10, 469–475. doi:10.1038/nmat3025
- te Boekhorst, V., Preziosi, L., Friedl, P., 2016. Plasticity of Cell Migration In Vivo and In Silico. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 491–526. doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125201
- Trepap, X., Wasserman, M.R., Angelini, T.E., Millet, E., Weitz, D.A., Butler, J.P., Fredberg, J.J., 2009. Physical forces during collective cell migration. *Nat. Phys.* 5, 426–430. doi:10.1038/nphys1269
- van Helvert, S., Storm, C., Friedl, P., 2018. Mechanoreciprocity in cell migration. *Nat. Cell Biol.* 20, 8–20. doi:10.1038/s41556-017-0012-0