総説

細胞スケール不均一弾性場における細胞形状と運動のダイナミクス

江端宏之, 木戸秋悟 九州大学先端物質化学研究所医用生物物理化学分野

Microscopic heterogeneity of the extracellular mechanical environment is an essential factor in controlling cell migration such as in morphogenesis, wound healing, and cancer metastasis. For example, a monotonic, microscopic stiffness gradient can induce directional cell migration, so-called durotaxis. However, it has been unclear how cell migration is modulated under a cell-scale heterogeneity of matrix-elasticity. Here, to understand the cell migration on a matrix with heterogeneous elasticity distribution, we review experiments about the dynamics of cell shape and motion on hydrogels with various elasticity distributions, and theoretical works for the cell migration based on a model of cell-shaping dynamics.

durotaxis / microelastically-patterned substrate / cell migration / migration model

1. はじめに

細胞は細胞外基質の粘弾性などの微視的力学環境に応答し、細胞増殖や分化、細胞運動などの細胞機能を変化させることが知られている¹⁾。これらの機能のうち、細胞運動は形態形成、創傷治癒、癌の浸潤など様々な生理学的、病理学的過程に深く関わる。そのため、細胞運動のメカニズムの解明は重要な課題の一つとなっている。これまで細胞運動について、細胞外基質への接着部位である接着斑や細胞骨格のダイナミクスなどの分子論的な研究や、1細胞スケールでの長時間の軌跡の研究などが行われてきている。これらの研究の多くがプラスチックシャーレなどの均一な基材上の細胞を対象にしている。一方、生体組織の力学的性質の特徴として空間的な不均一性が挙げられるが、生体組織に似た微視的力学環境における細胞運動の知見は少ない。

神経、筋、骨などの組織は種類ごとに弾性率が $10^2 \sim 10^9$ Paと大きく異なっている²⁾。また、同一の組織内でも弾性率の空間分布は典型的には不均一である。脳下垂体では数 μm ～数十 μm の大きさの弾性率の異なるドメインがランダムに分布しており、局所的な弾性勾配は $1\text{ kPa}/\mu\text{m}$ に達することもある³⁾。骨髄内では類洞と呼ばれる非常に軟らかい血管($\sim 10^3$ Pa)と骨梁と呼ばれる繊維状の骨($\sim 10^6$ Pa)が細胞サイズのスケール(100 μm 程度)で混在している。したがっ

て、細胞は数十～数百 μm スケールで力学的に不均一な生体組織内を動き回っていると考えられる。そのため、生体内での細胞運動を理解するためには、細胞外基質の弾性場の細胞スケール不均一性が細胞運動に与える影響を明らかにする必要がある。

不均一弾性場上では、細胞は軟領域から硬領域に向かって遊走する硬領域指向性運動(Durotaxis)を示すことが知られている⁴⁾。しかし、これまでのDurotaxisの研究の多くは緩やかで単調な弾性勾配や単一の弾性率ジャンプに注目しており、マイクロメートルスケールで変化する一般的な弾性率分布に対し細胞がどのように応答するかは分かっていない。そこで、我々は弾性場の細胞スケール不均一性が長時間スケールにおける細胞運動に与える影響を明らかにするために、弾性マイクロパターンニングゲルを用いた実験を行っている。また、長時間スケールの細胞運動に対し、細胞形状の変化に基づくモデルを提案し、弾性場の細胞スケール不均一性に駆動された一般的なDurotaxisの解析を行っている。本稿では細胞形状変化に基づく細胞運動のモデル、そして細胞スケール不均一性がある弾性場におけるDurotaxisの実験とモデルについて紹介する。

2. 持続的な細胞形状変化に基づく細胞運動のモデル

不均一弾性場における細胞運動の対照群として、ま

Dynamics of Cell Shaping and Migration on the Matrix with Cell-scale Stiffness-heterogeneity

Hiroyuki EBATA and Satoru KIDOAKI

Laboratory of Biomedical and Biophysical Chemistry, Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University

ずは均一な基材上での細胞の動きとそのモデルについて紹介する⁵⁾。線維芽細胞のような接着性の細胞は、アクチン繊維の重合による細胞膜突起の成長とアクチンミオシンによる収縮により、仮足の伸長と収縮を繰り返すことで基材表面を移動していく。その結果、数日のタイムスケールでは、多くの細胞が直進的な運動とランダムな方向転換を繰り返す、持続的ランダム運動 (persistent random motion) を示す⁶⁾。このような持続的ランダム運動のモデルとして持続的ランダムウォークモデル (persistent random walk (PRW) model) が最も良く使用されている⁷⁾。しかし PRW モデルでは、前後運動、回転運動、ジグザグ運動などの時空間的な相関の強い運動を説明することはできない。

これらの数時間スケールにおいてしばしば現れる規則的な運動は、細胞の仮足のダイナミクスと強い相関を持つことが報告されている^{8),9)}。したがって一般的な細胞運動を理解するためには仮足の伸長と収縮に伴う細胞形状の揺らぎを考慮する必要がある。しかし、細胞形状揺らぎと細胞運動の関係についての実験的な知見は少なく、形状揺らぎと運動の統計的性質を定量的に説明できる数理モデルは提案されていなかった。

我々は形状揺らぎと運動の関係式を実験的に明らかにするために、様々な弾性率 (30~400 kPa) を持つ光硬化性スチレン化ゼラチン (StG) ゲル表面において線維芽細胞の形状と運動のダイナミクスを解析した (図 1a)。ここでは、細胞形状の定量化方法として、形状のフーリエモード解析を使用している (図 1b)。細胞の重心から縁までの距離 R を角度 θ の関数として表し、 $R(\theta)$ を θ について複素フーリエ展開した時の係数 C_n に注目する。この時、 C_2 は細胞の一軸伸長の大きさとその方向、 C_3 は細胞の三角形の変形 (葉状仮足の伸展度合いと方向) を表す変数となる。また、 C_n は C_n の複素共役を表す。細胞形状のフーリエモードと重心の速度の相関を解析した結果、細胞形状 (仮足) の伸び縮みによる移動速度は、アメーバ遊泳における速度方程式と等価な方程式で表されることを発見した (図 1c)。さらに我々はこのアメーバ遊泳様速度方程式と自己推進粒子のモデル方程式を組み合わせ、ランダムな細胞内力により誘起される持続的な細胞形状の揺らぎが細胞運動を駆動するというモデル (persistent random deformation (PRD) model) を構築した。モデルの詳細は文献 5 を参照されたい。モデルの数値計算の結果、線維芽細胞の速度、形状、軌跡の統計的な性質が定量的に説明できることを示した (図 1d)。特に、ゲル上の線維芽細胞に見られる特徴的な往復運動は従来の持続的ランダム運動モデルでは説明

図 1

(a) ゲル上の線維芽細胞の形状と運動、(b) 細胞形状のフーリエモード展開、(c) 細胞速度の実測値とアメーバ遊泳様速度方程式による速度の予測値。 $v_1 = v_x + i v_y$ が細胞重心の速度 (複素数表現)、 β_1, β_2 が運動性を示すパラメーター。図下のカラーバーの領域内にデータの 99% が含まれる。(d) PRD モデルによる細胞形状と運動の数値計算結果、(e) 線維芽細胞に見られる往復運動の一例、(f) 細胞の軌道の模式図。直線運動と方向転換を繰り返す。 $\Delta\theta$ は直進運動間の回転角。(g) 回転角 $\Delta\theta$ の確率分布。180 度が往復運動を表す。シンボルが実験データ。410 kPa のデータは -0.005 下方にずらしている。実線が PRD モデルによるフィッティング。破線が従来の持続的ランダムウォークモデルによるフィッティング。フィッティングの詳細は文献 5 を参照されたい。文献 5 の図を改変。

することができないが、PRD モデルではアメーバ遊泳様速度方程式が持つ時間反転対称性により自然に往復運動を再現することができる (図 1e-g)。この PRD モデルは間葉系幹細胞の運動も再現できることが分かっており、仮足の伸び縮みによる細胞運動の一般的なモデルになっていることが期待される¹⁰⁾。

3. 細胞スケールで不均一な弾性場での Durotaxis

これまで均一ゲルにおける細胞運動と形状のダイ

ナミクスについて紹介した。それでは、生体組織において良く現れる、弾性場の細胞スケール不均一性は細胞運動にどのような役割を果たしているであろうか？我々はこれまでに、弾性率の空間分布の違いが Durotaxis に与える影響を明らかにしている。例えば、Durotaxis は軟領域の弾性率¹¹⁾や、弾性勾配の大きさ¹²⁾、弾性境界の曲率¹³⁾など弾性率の空間分布の違いにより、誘起される強さや向きが変わる。これらの知見は、細胞がより一般的な弾性率の空間変化を検知し、細胞運動を調節しうることを示唆している。一方で、生体内の硬・軟領域のドメインは数 μm ～数百 μm まで様々な細胞スケールのサイズを持つことが知られているが^{14),15)}、ドメインサイズが細胞の指向性運動に与える影響は系統的に調べられていなかった。そこで我々は、弾性場の細胞スケールの不均一性が細胞運動に与える影響を明らかにするために、異なるドメインサイズを持つ弾性ストライプパターンゲルにおいて、線維芽細胞と間葉系幹細胞 (MSC) の形状と運動を検証した¹⁰⁾。

まず、弾性ストライプパターンゲルにおける典型的な細胞運動を明らかにするため、常に細胞が弾性境界に接する条件である 100 μm 周期のパターニングゲルにおいて細胞運動を測定した。この時、硬・軟領域の弾性率は ~ 20 kPa と ~ 50 kPa とし、やや小さい弾性勾配を与えている。Durotaxis の細胞種依存性も併せて検証するため、細胞運動の実験で良く使われる間葉系の細胞のうち、線維芽細胞と間葉系幹細胞を用いた。実験の結果、線維芽細胞は比較的自由に弾性境界を横切り、硬・軟両方のゲル上を動き回る様子が観察された (図 2a)。この場合、硬領域に向かって細胞が移動していないことから、Durotaxis が誘起されていないことを示している。一方、間葉系幹細胞は硬領域に強く局在し、細胞の形状もストライプに平行に伸びることが分かった (図 2b)。このような硬領域への細胞の局在は、この実験で用いたストライプパターンの弾性勾配 (30 kPa/50 μm) が、四角形パターンゲルで計測した間葉系幹細胞の Durotaxis の弾性勾配閾値 (60 kPa/50 μm) よりも小さいにも関わらず、Durotaxis が強く誘起されていることを表している。したがって、図 2a, b より Durotaxis の閾値が細胞種に強く依存することが分かる。また、間葉系幹細胞では四角形パターンやストライプパターンなど、弾性率の空間分布の違いによっても Durotaxis の閾値が異なることが分かる。

次に、線維芽細胞と間葉系細胞の分布・運動の、ストライプパターンの空間周期依存性を調べた。線維芽

図 2 (a, b) 100 μm 周期ストライプパターン上での線維芽細胞 (a) と間葉系幹細胞 (b) の形状と運動のダイナミクス. (c, d) 異なるパターニング周期での線維芽細胞 (c) と間葉系幹細胞 (d) の細胞位置の分布関数. L がパターニング周期. 灰色の部分が硬領域. 文献 10 の図を改変.

細胞に対しストライプパターンの周期を変えたところ、細いストライプでは硬・軟両方の領域に一樣に分布し、太いストライプほど硬領域に細胞が局在することが分かった (図 2c)。一方、間葉系幹細胞では細いストライプで強く硬領域に局在し、太いストライプでは境界領域に局在する傾向がある。また、硬・軟領域の中央付近に着目すると、太いストライプほど軟領域中央に存在する細胞が増え、硬領域中央の細胞数に近づく (図 2d)。以上のことから、線維芽細胞は太いストライプパターンほど Durotaxis が増強され、間葉系幹細胞は細いストライプパターンほど Durotaxis が増強されることが分かる。

弾性勾配への細胞形状の応答により Durotaxis の一般的な振る舞いが説明できるかを検証するために、PRD モデルに弾性勾配への応答を導入した。我々のこれまでの研究により、弾性勾配に細胞の仮足の運動が応答することが分かっている¹⁶⁾。そこで、弾性勾配 ∇E に比例した細胞内力 F_2 , F_3 が生成され、細胞形状 C_2 , C_3 が変化すると仮定した (図 3a)。図 3b の細胞内力のモデルで、 μ_2 , μ_3 が弾性勾配に対する応答の強度を表す変数となる。モデルの詳細は文献 10 を参照されたい。 $\mu_2 > 0$ で細胞の伸長が弾性勾配により誘起され、弾性境界に沿うような細胞形状の伸長が駆動される。一方、 $\mu_3 > 0$ は硬領域への葉状仮足の伸展を誘起する。モデルでは $\mu_2 > 0$ または $\mu_3 > 0$ を満たす時、単一の弾性境界上において Durotaxis が誘起される。

図 3

(a) モデルの概念図. 細胞内力 F_i により変形 C_i が駆動される. 不均一弾性場 $E(x, y)$ により生じた細胞内力が伸び縮み運動を駆動する. (b) 不均一弾性場 $E(x, y)$ により生じる細胞内力のモデル. (c, d) PRD モデルによる 100 μm 周期ストライプパターン上での線維芽細胞 (c) と間葉系幹細胞 (d) の形状と運動の数値計算結果. (e, f) 異なるパターンニング周期での線維芽細胞 (e) と間葉系幹細胞 (f) の細胞位置の分布関数の数値計算結果. 文献 10 の図を改変.

線維芽細胞と間葉系幹細胞の運動をモデル化するために, 妥当な μ_2, μ_3 の範囲を見積もるために, 弾性ストライプパターンゲル上の線維芽細胞と間葉系幹細胞の細胞形状を測定した. 線維芽細胞はストライプが細くなるほど葉状仮足の形成が増強し, 三角の形状を取りやすくなることが分かった. また, ストライプに沿って伸長する性質は弱い. つまり, 線維芽細胞は $\mu_2 \sim 0, \mu_3 \gg 0$ によりモデル化されることが考えられる. 一方で, 間葉系幹細胞はストライプが細くなるほど, 葉状仮足の形成がやや抑制され, ストライプに沿って伸展した形状を取りやすくなる. したがって, 間葉系幹細胞は $\mu_2 \gg 0, \mu_3 < 0$ によりモデル化されることが考えられる.

モデルを検証するために $\mu_2 \sim 0, \mu_3 \gg 0$ と $\mu_2 \gg 0, \mu_3 < 0$ の各パラメータ領域で, PRD モデルの数値計算を行った (図 3c, d). その結果, 線維芽細胞 ($\mu_2 \sim 0, \mu_3 \gg 0$) は太いストライプで硬領域への細胞の局在が強化されることが分かった (図 3e). 一方, 間葉系幹細胞 ($\mu_2 \gg 0, \mu_3 < 0$) は細い硬領域への局在が強化される (図 3f). また, 太いストライプにおいて観察される間葉系幹細胞の弾性境界への捕捉や, スト

ライプへの配向も再現される. したがって, 仮足の弾性勾配への応答性が, 細胞スケールで不均一な弾性場における, 細胞種・ストライプの空間周期依存的な Durotaxis を決めていると考えられる.

以上の結果から, 比較的緩やかな弾性率変化でも, 弾性場の細胞スケール不均一性に依存して強く Durotaxis が現れることが分かる. さらに, 今回の実験結果は細胞種によって硬領域に局在しやすいドメインサイズが異なることを示している. これは, 同じ組織内でも硬・軟領域のドメインサイズに依存して, 細胞種によって異なる場所に自発的に細胞が集積する可能性を示唆している.

4.

結言

本稿では細胞形状のダイナミクスに着目し, 細胞スケールで不均一な弾性場における細胞運動についての研究を紹介した. 細胞形状の変化は, 接着斑, 細胞牽引力, 細胞骨格のダイナミクスが決めている. したがって, 細胞スケール不均一弾性場ではこれらの細胞の内部構造も均一な基材とは異なる時空間ダイナミクスを示すと考えられる. 細胞の内部構造についても測定を進めることで, 細胞スケール不均一弾性場に特有のメカノシグナルを明らかにできると期待される. 今後は弾性場の細胞スケール不均一性が細胞の機能調節に果たす役割を明らかにしていきたいと考えている.

文 献

- 1) Chaudhuri, O. *et al.* (2020) *Nature* **584**, 535-546. DOI: 10.1038/s41586-020-2612-2.
- 2) Butcher, D. T. *et al.* (2009) *Nat. Rev. Cancer* **9**, 108-122. DOI: 10.1038/nrc2544.
- 3) Bouchonville, N. *et al.* (2016) *Soft Matter* **12**, 6232-6239. DOI: 10.1039/C6SM00582A.
- 4) Lo, C.-M. *et al.* (2000) *Biophys. J.* **79**, 144-152. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76279-5.
- 5) Ebata, H. *et al.* (2018) *Sci. Rep.* **8**, 15153. DOI: 10.1038/s41598-018-23540-x.
- 6) Li, L. *et al.* (2008) *PLoS One* **3**, e2093. DOI: 10.1371/journal.pone.0002093.
- 7) Stokes, C. L. *et al.* (1991) *J. Cell Sci.* **99**, 419-430. DOI: 10.1242/jcs.99.2.419.
- 8) Maeda, Y. T. *et al.* (2008) *PLoS One* **3**, e3734. DOI: 10.1371/journal.pone.0003734.
- 9) Bosgraaf, L., Van Haastert, P. J. M. (2009) *PLoS One* **4**, e5253. DOI: 10.1371/journal.pone.0005253.
- 10) Ebata, H. *et al.* (2020) *Biomaterials* **230**, 119647. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119647.
- 11) Moriyama, K., Kidoaki, S. (2019) *Langmuir* **35**, 7478-7486. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02529.

- 12) Kawano, T., Kidoaki, S. (2011) *Biomaterials* **32**, 2725-2733. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.009.
- 13) Ueki, A., Kidoaki, S. (2015) *Biomaterials* **41**, 45-52. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.11.030.
- 14) Kennedy, K. M. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* **5**, 15538. DOI: 10.1038/srep15538.
- 15) Plodinec, M. *et al.* (2012) *Nat. Nanotechnol.* **7**, 757-765. DOI: 10.1038/nnano.2012.167.
- 16) Kuboki, T. *et al.* (2020) *Cell Struct. Funct.* **45**, 33-43. DOI: 10.1247/csf.19040.

江端宏之

江端宏之 (えばた ひろゆき)

九州大学先端物質化学研究所医用生物物理化学分野特任助教

2013年3月東京大学理学部物理学科博士課程修了, 同年4月千葉大学大学院理学研究院日本学術振興会特別研究員 (PD), 2015年4月九州大学大学院理学研究院日本学術振興会特別研究員 (PD), 2016年4月九州大学先端物質化学研究所学術研究員, 2019年4月より現職.

研究内容: アクティブマター物理

連絡先: 〒 819-0395 福岡市西区元岡 744 CE41 棟 206

E-mail: ebata@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

木戸秋悟

木戸秋悟 (きどあき さとる)

九州大学先端物質化学研究所医用生物物理化学分野教授

1998年3月名古屋大学人間情報学研究科博士課程修了, 同年4月国立循環器病センター研究所流動研究員, 2000年4月京都大学理学部JST-CREST研究員, 2001年6月九州大学医学研究院助教授, 2006年10月より現職.

研究内容: 生命現象における階層間クロストークの時空間ダイナミクスメカニズムの理解と制御
連絡先: 〒 819-0395 福岡市西区元岡 744 CE41-204 号室

E-mail: kidoaki@ms.ifoc.kyushu-u.ac.jp

URL: http://www.cm.kyushu-u.ac.jp/mbbmc_imce_new/