

NAIST-IS-DD0861019

博士論文

計算機を用いた複数の階層にわたる細胞移動の研究

山尾 将隆

2012年2月2日

奈良先端科学技術大学院大学  
情報科学研究科 情報生命科学専攻

本論文は奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科に  
博士(工学) 授与の要件として提出した博士論文である。

山尾 将隆

審査委員：

池田 和司 教授	(主指導教員)
湊 小太郎 教授	(副指導教員)
作村 諭一 准教授	(副指導教員)
別所 康全 教授	(副指導教員)
石井 信 教授	(京都大学)

# 計算機を用いた複数の階層にわたる細胞移動の研究\*

山尾 将隆

## 内容梗概

多細胞生物における発生過程を始めとして，細胞移動は非常に重要な役割を担っており，そのシステムがどのように制御され，力学的にどのような性質かを知ることは，生物への理解を深めるためには必要不可欠である．従来手法においては，簡単なモデルにおける理論解析や，タンパク発現解析といった手法に頼った研究がおこなわれてきたが，形態変化を始めとするダイナミックな振舞いに関しては，力不足が否めない状態であった．しかしながら近年における計算機能力の著しい向上や，生きた細胞内における分子のモニタリング技術の出現といった，動的な細胞システムの理解を大きく手助けするツールが整いつつある．一方，それらを十分に生かすための手法は，未だ発展途上と言わざるを得ない．本研究は，これらの利点を生かしつつ，今までにない視点から細胞移動の研究を行うための技術開発と，その結果について述べる．

まず発生過程における細胞集団移動における物理的特徴に焦点を当て，それがどのような影響をもたらすのかに着目した．そのため，まず単純な移動細胞のモデルから，多細胞系における細胞集団移動のモデルシミュレーションを行った．その結果，細胞集団移動のモードが，移動性細胞，非移動性細胞の揺らぎの強度に依存して変化することを突き止めた．さらに，移動細胞同士のダイナミクスを縮約する手法を開発し，その結果から，どのように揺らぎが細胞移動のモードを決定しているのかを明らかにした．しかしながら本研究で用いたモデルは，細胞の形状が完全に固定されており，より現実的なシミュレーションを行うためには，一細胞レベルでの形態変化のダイナミクスを知ることが必要不可欠である．そこで，3量体 G タンパクである Rho ファミリーの Cdc42 の活性をモニタした動画から，シグナル検出，動きの定量化技術の開発を行った．さらにダイナミクスの同定にむけた，伸びの予測技術開発を行った．その結果，細胞の動きのおおよその

\* 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 情報生命科学専攻 博士論文, NAIST-IS-DD0861019, 2012年2月2日.

未来の形態をある程度予測することができた．これらの結果をつなぐことによって，より現実的な発生過程シミュレーションを行えることが期待される．

キーワード

細胞移動，生物物理，データ解析，多細胞シミュレーション，細胞形態予測

# Computational research for cell migration in multiphysical levels\*

Masataka Yamao

## Abstract

For understanding developmental processes, how the cell migration behavior is controlled is critical for understanding developmental processes such as formation of body organs and wiring neural networks. Traditionally, it has been done by using theoretical analysis of simple model, or static biochemical experiment, but these are not enough for studying dynamic behavior of cells such as morphodynamic change of cell. Recently, however, drastic increase of calculation speed of computer and development of live cell imaging technology provide us to gain more insight into cell morphodynamic behavior. On the other hand, to use more efficiently these tools, new algorithms or methods are required. In this thesis, I developed the new method for studying cell migration and provide a new perspective for cell migration.

First, I focused on how physical properties affect the cell migration in multicellular system in developmental processes. To this end, I modeled such a system as simple as possible, and performed simulation. Then, it is shown that multi-cellular migration mode depends on noise intensities of migratory and non-migratory cells. To simulate more realistic system, it is necessary to examine morphodynamical system of migratory cell at single cell level. To do this, I developed the technique to quantify a signal activity from Cdc42 which is monitored by using FRET technique, and cellular morphological changes. In addition, to validate the dynamics which I extract, prediction of cell morphological changes is

---

\* Doctoral Dissertation, Department of Bioinformatics and Genomics, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, NAIST-IS-DD0861019, February 2, 2012.

performed. To combine these results, it is expected that more realistic simulation of multicellular system such as developmental system will become available in the future.

**Keywords:**

cellular migration, biophysics, data analysis, multi-cellular simulation, cell morphology prediction

# Contents

1. はじめに	1
1.1 過去における研究	1
1.2 研究の目的と意義	3
2. 多細胞系における移動細胞の振舞い	6
2.1 はじめに	6
2.2 多細胞シミュレーションモデル	8
2.3 ノイズ強度の変化に対する細胞輸送の特性変化	12
2.4 細胞移動間の実効的相互作用	16
2.5 その他の特性に対する移動度の依存性	20
2.6 考察	25
3. FRETtime lapse images からの細胞ダイナミクスの同定	29
3.1 はじめに	29
3.2 FRET について	30
3.3 FRET シグナル検出	31
3.4 輪郭線検出	34
3.5 フレーム間の輪郭線補間	38
3.6 レベルセット法	39
3.6.1 理論とアルゴリズム	39
3.6.2 結果	40
3.7 マーカー間の距離を保つ輪郭線補間法	41
3.8 特徴量抽出	44
3.9 シグナル活性による細胞形態制御と細胞形態予測	48
3.9.1 モデル	50
3.10 結果	51
3.11 考察	58
4. 結論と今後の課題	61
4.1 結果のまとめ	61
4.2 今後の課題	61
謝辞	63

参考文献	65
付録	70
A. モデルの無次元化	70
B. 二体細胞間の実効的ダイナミクスの同定	70



## List of Figures

1	シミュレーションに用いる細胞モデルと反発力 . . . . .	9
2	細胞移動の駆動力モデル . . . . .	10
3	可視化したシミュレーションのスナップショット . . . . .	13
4	移動性, 非移動性細胞のノイズ強度に対する, 多細胞系における 細胞移動の特徴量の依存性 . . . . .	15
5	移動性, 非移動性細胞のメソスコピックな視点からの挙動 . . . . .	16
6	それぞれの移動パターンにおけるスナップショットと, 細胞同士の 接触の有無 . . . . .	17
7	移動細胞周辺における, 細胞密度と実効的ポテンシャル場の推定 方法 . . . . .	19
8	シミュレーションを用いて推定された非移動性細胞の密度と実効 的ポテンシャル . . . . .	21
9	細胞移動速度の物理的パラメータ依存性 . . . . .	22
10	移動モードの駆動力と細胞接着依存性 . . . . .	24
11	全ての画像における CFP, YFP の分布 . . . . .	33
12	CFP, YFP の時系列 . . . . .	35
13	第一主成分, 第二主成分の時系列 . . . . .	36
14	比, 第二主成分/第一主成分の時系列 . . . . .	37
15	第一主成分のヒストグラム . . . . .	38
16	輪郭線をもとに計算されたレベルセット関数 . . . . .	42
17	レベルセット法を用いた補間結果 . . . . .	43
18	レベルセット法による補間結果の拡大図 . . . . .	44
19	レベルセット法を使って補間した結果を用いてマーカー追跡を行っ た結果 . . . . .	45
20	レベルセット法を使って補間した時の飛び地 . . . . .	46
21	レベルセット法を使って補間した結果を用いてマーカー追跡を行っ た結果. 丸印がマーカーの初期位置を表す . . . . .	47
22	各標準偏差値を用いて抽出した特徴量間の相関 . . . . .	48
23	シグナル活性と, 伸びのマップ . . . . .	49
24	各 $\tau$ に予測値と, 現実の伸びの比較 . . . . .	52
25	予測するステップ数 $\tau$ に対する予測誤差の変化 . . . . .	53
26	$\tau = 1$ における細胞膜の伸びの円周上における比較 . . . . .	54

27	$\tau = 6$ における細胞膜の伸びの円周上における比較 . . . . .	54
28	実空間におけるマーカー位置の予測 ( $\tau = 1$ ) . . . . .	55
29	実空間におけるマーカー位置の予測 $\tau = 5$ . . . . .	56
30	予測するステップ数 $\tau$ に対する予測誤差の変化 . . . . .	57
31	単純な閾値処理における問題 . . . . .	59

# 1. はじめに

生き物の最小単位である細胞の持つ重要な機能の一つに細胞移動がある。すべての細胞種がその機能を持つわけではないものの、発生過程や、創傷治癒、免疫、がん転移といった事象にとって重要な機能を果たしている。本研究は、特に細胞が多細胞系において集団で移動するときの挙動に着目することによって、より現実の系に近い状態におけるシミュレーションと解析を目指すものである。その機能がどのように制御され、どのような性質を持つのかを知ることは、理学的、医学的、工学的、いずれの見地からも非常に重要である。

## 1.1 過去における研究

多細胞系の運動に関する研究において数多くのモデルが提案されているが、最も基本的なものは、反応拡散方程式を基にしたモデルであろう。単位体積当たりの細胞密度の挙動について、増殖・死亡といった挙動を反応項で、移動を各参考において表現することによって細胞集団移動の挙動を再現している。主に、粘菌の移動、特にパターン形成において良く用いられる手法ではあるが、発生過程における現象を再現したものもある。

他の代表的なもののひとつは、1992年に提案されたセルラーポッツモデルであろう [1]。これは、複数の値を取ることのできるスピン系において、同じ値を取るスピンの集合を一つの細胞と取り扱うモデルである。モデルが発表された論文においては、細胞同士が接触した時のエネルギー関数の異なる二つの細胞種の集団が自発的にソーティングされていく様子をシミュレーションする為に考案されており、その後、体積や表面積といったエネルギー関数の導入といったモデルの拡張や、癌細胞の挙動のシミュレーションへの応用が行われている。

実際の発生過程のモデルに着目した研究としては、Simpson らや、Kulesa によって行われた研究がある [2, 3]。Simpson は、発生過程内における細胞集団移動のモデルシステムの一つである、神経堤細胞の移動に着目し、拡散方程式を応用したモデリングを基に、その挙動の再現に成功した非常に意義深い研究である。また、Kulesa らのグループは、神経堤細胞が形成するストリームに着目し、どのような条件下においてストリーム形成が行われるのかについて調べた。

一つ一つの細胞に、より現実的かつ詳細なモデルを導入したより近代的な研究の代表として、Pallson らが発表したモデルが挙げられる [4]。彼らは、細胞の形こそ、楕円球体にとどめてはいるものの、その体積の保存、機械力学的特性、化

学物質を用いたコミュニケーションといった数多くの要素を導入してシミュレーションを行い、細胞集団の物資手うの特徴や運動の挙動といったマクロな特性を再現して見せた。

ここまで、多細胞系のモデルについて述べてきたが、そのモデル構築のためには、もちろん、一細胞レベルでの挙動に基づいたモデルをどのように構築するのかが重要となってくる。細胞の動きは、様々な分子によって制御されているが、特に重要とされているのが三量体 G タンパクの Rho ファミリーに属する、Rho A, Rac 1, Cdc42 である。これらの重要性は、Hall によって示された [5, 6, 7]。これらが細胞形態のダイナミックな制御にどのように貢献するのかについては、その活性をモニタし、定量化する必要があるが、これらの分子は、活性、不活性の二状態を取ることが知られており、単純に GFP を用いた発現量解析などでは、シグナルの活性状態をモニタすることができない。そこで用いられるのが FRET と呼ばれる技術である [8]。これを用いることによってタンパクの活性・不活性状態をモニタすることが可能になり、細胞形態の動態との同時計測が可能になった。

細胞内の Rho ファミリーの挙動は、FRET を用いることによって計測できるようになったが、動態制御メカニズム解明のためには、細胞形状変化の定量化をおこなうことも必要である。これに関して、重要な研究が Danuser らによって発表されている [9]。それまで、画像の差分や、局所的に直線上の膜の動きを追跡するキモグラフを始めとする、原始的な細胞動態の定量化手法が中心であった中、彼らはレベルセット法を用いることによって細胞膜全体における垂直方向の伸びを、長時間にわたって定量化することを可能にした。これによって細胞膜上の動きとシグナル活性を同時に定量化することが可能なり、彼らは、細胞膜の制御メカニズムの一端を紐解くことに成功した。

また、同じく Danuser のグループから、Rho ファミリーのシグナルと細胞の形態変化に対する相関に着目することによって、細胞形態の制御メカニズムの解明を目指す研究が発表されている [10]。また、Tsukada らは、細胞膜の伸びを追跡するにあたって発生するマーカー密度の変化を解決するための方法として Edge Evolution Tracking (EET) を開発し、これより細胞膜の激しい運動に対しても細胞膜上のマーカー密度を一定に保つ事を可能とした [11]。

これらの技術によって細胞形態の制御方法が少しずつ明らかになってきているが、モデルシミュレーションに応用するためには、一細胞レベルのモデルもより、現実的かつ詳細にする必要がある。一つの細胞のモデル化について着目した研究は数多くなされている。Shao らは、実験的に細胞の速度と形態の相関があ

ることが以前より知られていたのだが，これを Phase-field をベースとしたモデルシミュレーションを用いることによって再現している [12] . Yang らも，同様に形態と移動に着目しているのであるが，こちらは，Level Set Method を基にしたモデルを用いている [13] . Level Set Method 自体は，もともと輪郭線検出やその追跡に用いられていた手法であるが，その手法をシミュレーションに応用した . ここまで述べた二つの論文は，細胞の物理的モデルをある程度縮約したモデルを用いてシミュレーションを行っていると言えるが，Nonaka らは，細胞膜や細胞骨格といったモデルを，粗視化はしてあるものの，ミクロなモデルを基に一つの細胞移動の様子をシミュレーションしている [14] . これらのモデルは，上で述べた知識を導入するのに十分な表現能力を持っており，それを踏まえたとえで，より大規模なシミュレーションに用いることによって，現在用いられているモデルよりもはるかに現実に近い状態でのシミュレーションを行うことが可能になるであろう .

## 1.2 研究の目的と意義

近年の技術発展は，様々な分野において飛躍的發展を遂げ，細胞移動研究についても例外ではない . ここでは，細胞移動研究のための二つの技術発展について述べたい .

一つ目は，細胞の挙動に関する計測技術の向上である . GFP (Green Fluorescent Protein) に代表される蛍光タンパクは，特定のタンパク質の発現を生きた細胞中において観察することを可能にした . それをさらに発展させた技術の一つである FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) を用いることによって，ある分子の活性，不活性状態のモニタすら可能になった . このほかにも，カルシウム濃度を測る為の *camaleon*, 光を当てることによって色を変化させることのできる *kaede* といった数多くの技術的發展が細胞の研究を加速させている . このような技術によって，細胞の状態のダイナミックの変化を観察することができるようになり，今までにない新たな知識を我々に与えることとなった .

もう一つの注目すべき技術発展は，計算機処理能力の向上である . 従来の理論的，計算機的研究においては，簡単なモデルを用いたものが多く，細胞膜，細胞骨格，シグナルカスケードなど，様々な要素を細胞はそのうちに持つものの，それらを同時に含むような研究や，さらには，そのような細胞を要素とする集団の挙動に着目した研究は，従来不可能で会った . しかしながら，近年，IBM 製の Blue Gene や，日本が代表する世界最速計算機「京」に代表される超並列型計算

機を用いたプロジェクトにおいて、より現実に即した細胞数でのシミュレーション、より現実に近いモデルにおける細胞シミュレーションが行われるようになってきている。

上記二つの技術発展は、勿論それぞれ素晴らしいものではあるものの、より細胞移動研究を発展させるためには、これらを組み合わせたさらなる技術開発を行うのが必要不可欠である。Blue Geneを用いたプロジェクトにおいては、その巨大な計算機パワーと用いられるモデルに注目されがちであるが、さらに特筆すべき点として、シミュレーションに用いる神経細胞モデルの特性を実験によって求めている点である。神経細胞の、チャンネルの性質やシナプス伝達特性といった特性をあらかじめ実験的に求めることによってより現実的な細胞モデルを導出し、より現実的な脳機能のシミュレーションを行うことができる。一方、細胞移動の動的特性については、実験的に調べられるようになってきており、細胞移動シミュレーションにも応用されるようになってきてはいるものの、簡単なモデルにおけるパラメータの参考程度にとどまっていることがおおい。同様に一細胞レベルにおけるシミュレーションモデルに関しても、そもそもどのようなモデル化を行えばよいのかについて統一された見解もなく、様々なモデルが乱立した状態である。

そこで本研究では、生物学的実験から導かれた細胞移動モデルを基にした、大規模多細胞システムのダイナミックな挙動のシミュレーションを目指す。これにより、多細胞系のダイナミックな生命現象をより現実的なモデルを用いて再現することができる。

第二章では、細胞集団移動のモードの物理的パラメータの依存性に着目する。細胞集団が移動するときにストリーム、クラスタ、チェーンといったモードを取るが、それがどのようなダイナミクスをもち、どのように制御されているかは、分かっていない。そこで、単純な細胞集団移動モデルを構築し、そのシミュレーションを行った。さらに、そのシミュレーションデータを解析するための技術開発も同時におこなうことによってそのメカニズムの一端を解明することができた。

第三章では、FRET細胞動画からのダイナミクスの同定と、その妥当性テストのための予測をおこなった。そのために、まず、FRETからシグナルを検出するための新たな手法を開発した。次に、細胞形態を定量化、およびその時系列を求めるための手法を開発した。そして、そのデータを基に、未来の細胞の動態の、シグナル活性から予測をこころみた。その結果、大まかにではあるが、シグナル活性の時系列から細胞の動きを予測することができ、そこから導出されたダイナミクスについて、ある程度妥当であるということができた。

第四章で、本論文で行った研究のまとめと、それを基に今後どのような研究が展開されるべきかを中心に結びを述べる。

## 2. 多細胞系における移動細胞の振舞い

発生過程における器官の形成には，細胞集団レベルでの細胞移動が大きな役割を担っている．多細胞システムにおいては，細胞移動はあたかも，満員電車の中を移動するかのような状況であり，周辺細胞との機械力学的，化学的相互作用により，非常にその移動経路に非常に強い制限を受けている．一方このとき，観察される細胞群の挙動は非常に確率的であり，しばしばランダムウォークとしてモデル化されている．このため，細胞集団中の移動細胞は，非常にノイジーな環境にさらされていることになる．しかしながら，発生過程は，遺伝子に記された設計図に忠実に行われる．一細胞レベルでの細胞移動に関する研究は過去多くなされてきたが，このような，集団レベルにおける細胞移動がどのように設計図に忠実に制御されているのかに着目した研究は，行われてこなかった．本研究では，簡単な多細胞系におけるシミュレーションモデルを構築し，計算機シミュレーションを基に，多細胞移動の挙動を観察した．これより，移動細胞，およびその周辺細胞のノイズ強度により多細胞移動のモードが変化することを突き止めた．また，細胞移動間の実効的な相互作用を，シミュレーションから得られたデータを基に推定することに成功した．この結果から，移動細胞は，非移動細胞との相互作用を通じて，遠距離相互作用をしていることを明らかにした．

### 2.1 はじめに

細胞集団の移動は，発生過程のいたるところで観察することができる．これらの移動の規模や速度は，脳内の神経細胞ネットワークの構築や，生殖系を始めとした臓器や組織の適切な発生のために正確に制御されている [15]．本章では，神経堤細胞の移動に代表される細胞集団の協調的な移動をモデルシステムとして着目し，マクロな視点からどのようにそれが制御されているのかについての理解を目指す．これらの細胞移動は，リペラント，アトラクタントと呼ばれる細胞外の化学物質の勾配によって誘導されることが多く，移動性細胞の持つこのような性質を走化性と呼ぶ．発生過程における細胞集団移動は，組織を形成する非移動性の細胞集団の中を縫うように移動する必要がある．これは，満員電車のような込み合った雑踏の中，周りの人を押しよけて移動するがごとくであり，細胞もおおよそ似たようなシステムを形成していると考えられる．このような環境下における細胞移動に着目した研究はあまり例がなく，そのメカニズムについては，不明な点が数多く残っている．



一細胞レベルにおける細胞移動や軸索伸長は、しばしばシグナル勾配によってバイアスのかけられたランダムウォークとして扱われるように、その挙動は、決定論的なものではなく確率論的である。この原因は、細胞内の分子数がアボガドロ数に比べてはるかに少ないことに起因すると考えられている [16, 17]。しかしながら、不思議なのは、発生過程がそのような確率論的な挙動を示す要素から成り立っているにもかかわらず、その影響を受けないがごとく非常に高い再現性を保っている点である。このことから、発生過程における多細胞系においては、その外乱を何らかの方法で吸収・無効化するようなメカニズムを内包していると考えられる。一方で、発生過程においては、非常に数多くのパターン形成がなされていることを考えると、システムには、ある程度の不安定性も求められることとなり、可塑性と安定性のジレンマが存在するといえる [18]。このような観点から、発生過程を観察した時、細胞集団レベルでのマクロスコピックな観点からの特性が、一細胞レベルのミクロな観点からの細胞移動の特性に、どのように特徴づけられているのかを明らかにする必要性が出てくる。

発生過程において移動細胞集団は、その場所、時間そして種類に依存して様々なモード様々なモードを取ることが知られている。これらのモードは、まず、個別に移動するか、協調的に移動するかの二種類に大きく分けれる [19]。個別に移動する場合、移動細胞同士の距離が開くことによって、広い範囲をカバーすることができる、これは、免疫細胞や始原生殖細胞の一部のステージなどにおいてこれが当てはまる [20]。一方で協調的な移動は、お互いが身を寄せ合うような移動をすることが知られており、複雑な組織の発生においてこのような移動様式を観察することができる。代表的なものとしては、神経堤細胞において観察される砂時計のような移動経路をたどるストリーム [21]、神経前駆細胞等においてみられる細く一直線上に移動するチェーン [22]、ハエの生殖系の細胞において観察されるクラスタ移動などがある。これらの移動モードがどのように制御されているのかを知ることはたさいオブ系の発生過程のメカニズムを理解する上で非常に重要である。

最近の研究によってこれらモードは、細胞のタンパクの発現量を意図的に変化させることによって、実験的にある程度モードを相互に変化可能であることが示された。これは、細胞接着分子の発現量変化によって示され、個別に移動している移動細胞において発現量を増加させると協調的な移動に変化し [23]、逆に協調的な移動をしている集団における発現量を下げることによって個別な移動へと変化させることが示されたことによる [24, 25]。これらの結果から、細胞集団移動

のモードは、細胞特異的なシステムによってコントロールされているわけではないことが分かる。さらにそれだけでなく、細胞移動の駆動力や、細胞の硬さ、動きに内包されている揺らぎといった物理的なパラメータにも依存していることが示唆されている [26]。これらのミクロスコピックな細胞の特性がマクロスコピックな移動特性にどのように影響を与えるのかは、わかっていない。

そこで本章においては、込み合った細胞の中を協調的に移動する細胞システムに着目し、そのメカニズムの解明を目指す。このためのモデルシステムとして、神経堤細胞の移動に着目する。この系は、細胞移動集団の両サイドからのリペラントシグナルによって移動経路が途中絞りこまれるような形になっていると言われてきたものの、実はその影響を受けずともそのような経路を取ることが分かったという経緯があり、どのようにその経路が形作られているのかはわかっていない [21]。この系を再現するために走化性細胞が、混雑した細胞集団を押しのけつつ化学物質の勾配に沿って移動する系の、物理的モデルを構築した。神経堤細胞の移動自体は、走化性だけでなく、細胞が分裂することによる集団の圧力上昇によっても移動することが知られているが、本研究は、あくまで細胞自身の移動能による移動に着目する [2, 3]。構築したモデルを用いて計算機シミュレーションを行い、その結果から、細胞集団移動は、その動きに含む確率性を用いることによって移動を容易にし、自発的ストリームの形成に用いているのではないかという仮説を立てた。さらに新たにシミュレーションデータを解析する手法を開発し、その結果から、細胞集団移動がノイズを積極的に利用するメカニズムを明らかにした。最後に、細胞集団移動の特徴についてシミュレーションデータを基にした議論を行う。

## 2.2 多細胞シミュレーションモデル

多細胞系における細胞移動の挙動を観察するために、多細胞移動モデルを構築した。本研究においては、確率的な挙動を示す細胞同士が反発しあいながら移動する系に着目するため、モデルもこれらの要素を必要最低限含むように構築した。細胞の形状は、円として変形は考えず、そこへ、(1) 細胞間反発、(2) 細胞移動、(3) 確率的挙動の三つの現象を再現する力を導入した。また、慣性に対して粘性が十分大きいと仮定し、これらの力と粘性抵抗が釣り合うようなモデル化を行った。

これらを基に移動細胞の位置  $r_i$  の挙動を記述する方程式を以下のように設定

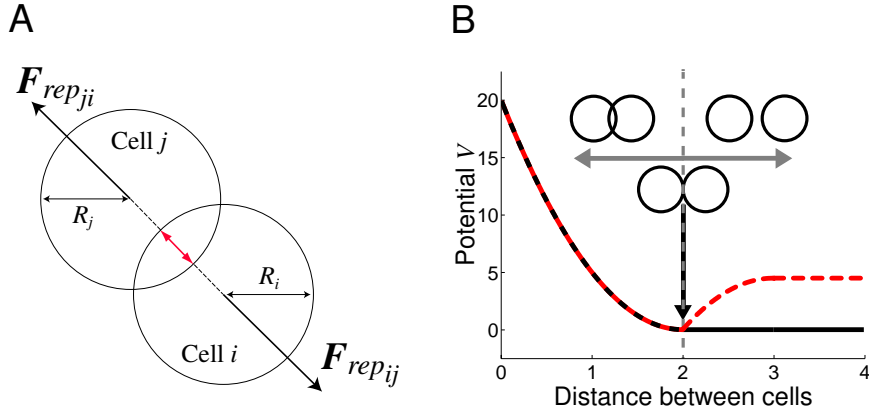


Figure 1 シミュレーションに用いる細胞モデルと反発力 .

白い円で示されたのがモデル細胞である . 二つの細胞が重なり合ったとき , その距離に応じて (図内赤線) 反発力を生じる (A) . (B) 細胞間の相互作用を決めるポテンシャル関数  $V$  . 黒線 , 赤の破線は , それぞれ式 (2) , (9) が作るポテンシャルを示している .

した .

$$\mu \frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \sum_{j \in \mathcal{N}_i} \mathbf{F}_{\text{rep}_{ij}} + \sum_{j \in \mathcal{M}_i} \mathbf{F}_{\text{mig}_{ij}} + \mathbf{F}_{\text{flu}_i} \quad (1)$$

$$\mathbf{F}_{\text{rep}_{ij}} = k \{ (R_i + R_j) - \|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j\| \} \frac{\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j}{\|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j\|} \quad (2)$$

$$\mathbf{F}_{\text{mig}_{ij}} = \begin{pmatrix} F_{\text{mig}_x} \\ F_{\text{mig}_y} \end{pmatrix} = s(i) F_m \begin{pmatrix} \frac{\|\Delta y_{ij}\|}{\|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j\|} \\ -\frac{\|\Delta y_{ij}\|}{\Delta y_{ij}} \frac{\Delta x_{ij}}{\|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j\|} \end{pmatrix} \quad (3)$$

$$\mathbf{F}_{\text{flu}_i} = \sigma_i \begin{pmatrix} \xi_{xi} \\ \xi_{yi} \end{pmatrix} \quad (4)$$

$$s(i) = \begin{cases} 1 & \text{if cell } i \text{ is migratory} \\ -1 & \text{if cell } i \text{ is non-migratory} \end{cases}, \quad (5)$$

ここで ,  $k$  : ヤング率 ,  $R_i$  細胞  $i$  の半径 ,  $\sigma_i$  : 細胞  $i$  のノイズ強度 ,  $\xi_{xi}$  ,  $\xi_{yi}$  : 平均 0 の独立なランダム関数 ,  $\langle \xi(t) \xi(t - \tau) \rangle = \delta(\tau)$  : 自己相関関数 ,  $\mathcal{N}_i$  : 細胞  $i$  と接触している細胞のセット ,  $\mathcal{M}_i$  : 細胞  $i$  と違う種類の細胞のセット (細胞  $i$  が移動性細胞なら , 非移動性細胞のセット) ,  $(\Delta x_{ij}, \Delta y_{ij})^T = \mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j$  ,  $\mu$  : 粘性係数である .

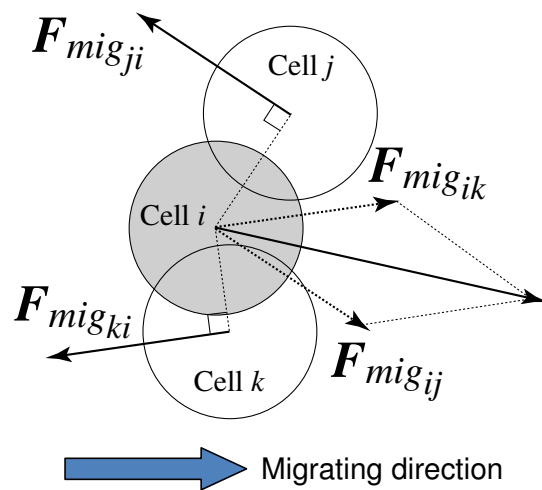


Figure 2 細胞移動の駆動力モデル .

移動性細胞 (灰色の円) は, 誘引物質勾配に沿って移動していると仮定している . 駆動力は非移動性細胞 (白色の円) と接触しているポイントで発生し, またその反発力が非移動性細胞にかかることによってお互いが逆方向に動く .

細胞の反発力  $F_{\text{rep}_{ij}}$  は，接触している細胞間の距離のうち，二つの細胞 (円) が重なっている部分に含まれている長さに線形に比例するように設定した (図 1A) . この反発力は，細胞の変形に対抗するための弾力によるものを仮定している . 実際には，細胞を構成する要素の中には，アクチンフィラメントを始めとする細胞骨格や，細胞膜といった細胞形状を支持するための構造物を数多く含んでおり，これらの機械力学的特性も良く調べられている [27] .

細胞移動は，移動細胞の仮足を隣接する細胞や基質に接着させて引き込むことによって移動することが知られている [28] . そこで，本モデルでは，まず，移動性と，非移動性の二種類の細胞種を仮定し，移動性細胞は，非移動性細胞に接触した時のみ，それを足場として移動力を発揮できるとした (図 2) . この力は，お互いの位置をずらすように発揮されるはずなので，力の向きは，お互いの中心を結ぶ線に対して，垂直な方向に常に発揮されるように設定した . また，移動の方向は，細胞外の誘引，反発シグナルの勾配を検知し，それに沿って移動することが知られている . 本モデルでは， $x$  軸に沿って誘引分子の勾配が形成されていると仮定したが，簡単化のため，勾配検知の詳細なメカニズムについては無視し，力の  $x$  成分が常に正の方向を向くように設定した . また，作用，反作用の法則に則って，非移動性細胞にも，同時に逆向きに同じ大きさの力が加わるようにした . これらの仮定は，次のような簡単な幾何学的なルールによってあらわされる .  $\mathbf{F}_{\text{mig}_{ij}} \cdot \mathbf{F}_{\text{rep}_{ij}} = 0, \|\mathbf{F}_{\text{mig}}\| = F_m, \text{ and } F_{\text{mig}_x} > 0$ . これを基に (3) の時間発展方程式を構築した .

移動細胞や発生過程中的数多くの細胞は，確率的挙動を示しており，細胞内ダイナミクスによって自発的に生成されていることが知られている [16, 17] . 本モデルでは，それを再現する力， $F_{\text{flu}}$  は，上記二つの力とは独立に，ガウス分布で与えられる乱数を加えることによって表現した . 上記二つの力の項に加える形で入れるべきであるが，細胞密度が十分高いことを考慮して，外力としてモデル化した .

以上を基に，本研究のモデル式は，(1)-(5) で与えられたわけであるが，自由パラメタの数は，実際の見た目の数より少ない . よりモデル式の見通しを良くするために，無次元化を行うことによって，さらに自由パラメタの数を減らすことができる . 無次元化の詳細な内容は，Appendix に譲るとするが，その結果，残る自由パラメタは，ヤング率と移動性，非移動性細胞それぞれに対するノイズ強度のみである . ここで，無次元化されたヤング率は， $kR_i/F_m$  であらわされる . 基のパラメタ， $k, R_i, F_m$  は，生物学的におおよそ， $k = 10^{-2} \sim 10^{-3} \text{N/m}$  [27, 4],

$R = 10^{-5}\text{m}$ ,  $F_m = 10^{-8} \sim 10^{-7}\text{N}$  [4], の値を取ることが知られている．同様に無次元化されたノイズ強度は, 移動性, 非移動性細胞ともに  $\sigma/F_m$  であらわされ,  $\sigma = 10^{-9} \sim 10^{-8}\text{N}\sqrt{\text{s}}$  となることが知られている [4, 29]．これを基に, 本研究においては, 生物学的に妥当な値として,  $k = 10$ ,  $\sigma = 0 \sim 1$  を採用した．

シミュレーションをするにあたって, モデル細胞は, 長方形の二次元空間内を移動するように設定した．境界は, その影響をなくすために上下, 左右がトーラス状になった周期境界を用いた．移動性細胞 100 個を中央に配置し, その周りを非移動性細胞で囲んだ状態を初期状態とし, モデル式 (1-5) をもとに時間発展させることによってシミュレーションを行った (図 3)．シミュレーションプログラミングは, C 言語を用い, 微分方程式の時間発展アルゴリズムには, 一番基本的なスキームである, オイラー・丸山法を用いた．

### 2.3 ノイズ強度の変化に対する細胞輸送の特性変化

移動性細胞は, その移動能によって発生過程において決まった目的地に向かって輸送され, その後分化することが知られている．このときの輸送される速度, および正確さは, 発生過程そのものを特徴づける重要な因子であると考えられる．そこで, 本研究では, まずこれらをシミュレーションを用いた検証を行った．まず, 速度について, 移動性, および非移動性細胞のノイズ強度を変化させながらどのように変化するのかを観察した．初期状態における移動細胞集団の重心座標を  $(x, y) = (0, 0)$  とした時, ゴールラインを座標が  $x = 150$  と設定し, ここに到達するまでにかかった平均時間を測ることによってどの程度動きやすいのかを評価した (図 4A)．その結果, 各細胞に対するノイズ強度に比例するように, 移動のしやすさが増加していることが分かったが, 特に非移動性細胞のノイズ強度に対する変化が顕著であることが示された．非移動性細胞のノイズ強度が変化した時に細胞移動に何が起きているのかを知るために, 各時刻における移動細胞の位置座標に対するカーネル密度推定をかけた (図 5A)．その結果, 非移動性細胞のノイズ強度が弱い時は, 細胞移動は, 細胞の隙間をジャンプするように移動している一方, ノイズ強度が強い時は, あたかも, 周りに何もなにかのようなスムーズかつ速い動きを示すことが示された．また, このときの非移動性細胞間の距離の分布を調べてみると, ノイズ強度の増加に従ってその分散が増加することが分かった (図 5B)．このことから, 細胞移動は, 非移動性細胞間の隙間というポテンシャルの谷をジャンプするように行われており, 各種細胞に乗っているのノイズは, そのジャンプ率を増加されることによって速度を増加させているが, ポテ

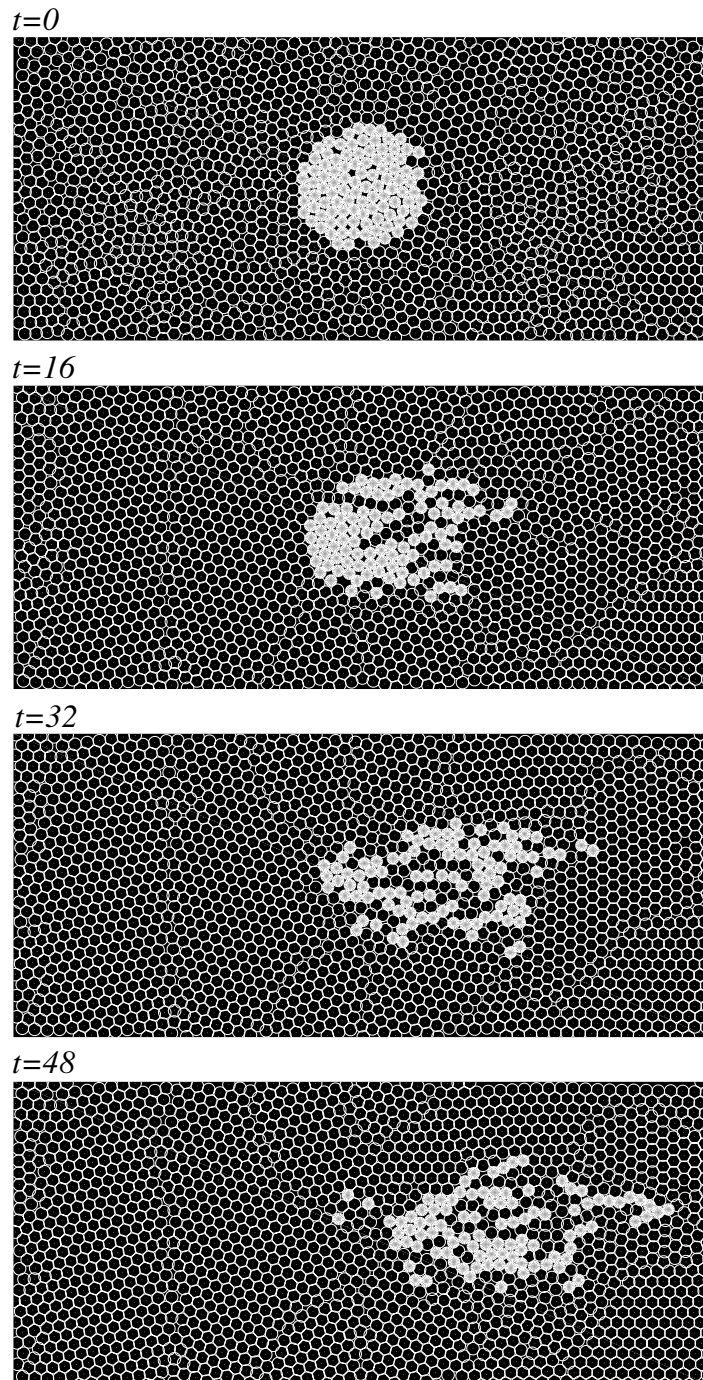


Figure 3 可視化したシミュレーションのスナップショット。  
 白い円，黒い円がそれぞれ，移動性，非移動性細胞を示す．移動性細胞は初期状態 ( $t = 0$ ) において中央部分で集団を形成しており，シミュレーションのスタートと同時に右方向に動き出す．ここでノイズ強度はそれぞれ  $\sigma_{\text{mig}} = 0$ ,  $\sigma_{\text{n}} = 0$  である．

ンシャルの壁の高さを下げる方向に働く非移動性細胞のノイズが支配的に速度増加に働くことが分かった。

次に、細胞輸送の正確性を評価するためにゴールライン上における  $y$  方向の分散を計算し、その逆数を正確さの指標として用いた (図 4B)。その結果、移動性細胞のノイズがある程度大きく、逆に非移動性細胞のノイズ強度が小さい値に収まっているときに正確さが最大化されることが示された。先のカーネル密度推定より、ノイズ強度の増加は、ジャンプレート増加を通じて、移動のしやすさを向上させる事から、非移動性細胞のノイズが正確性を下げることは、自然な現象であると思われるが、移動性細胞のノイズ強度がその細胞移動の正確性を向上させたのは、非常に興味深い。以上の結果より、各種細胞のノイズ強度が細胞集団移動を特徴づけていることが分かった。

先の解析は、初期状態において、移動性細胞集団が  $(x, y) = (0, 0)$  に凝集した状態からの解析であり、かつ、その結果が初期状態依存性を打ち消すのに十分な時間が経過していない可能性がある。この初期状態依存性をより明確に打ち消すために、さらに長い時間シミュレーションを走らせた後に、改めて、細胞集団移動の特徴について調べた。このとき、最早ゴールラインの設定はなんら意味を持たないため、速度や、凝集度といった集団そのものの特徴に注目した。速度は、全ての細胞の平均移動速度より求めた (図 4C)。また、凝集度は、以下の式より計算される。

$$\phi = \frac{1}{\#\mathcal{C}} \sum_{i,j \in \mathcal{C}} \frac{1}{1 + \exp\{\theta(d_{ij} - \bar{R})\}}, \quad (6)$$

ここで、 $\mathcal{C}$ ,  $\#$ ,  $d_{ij}$ ,  $\theta$ ,  $\bar{R}$  は、それぞれ、移動性細胞を示すインデックスの集合、集合の要素数を数えるオペレータ、細胞  $i, j$  の中心間距離、シグモイド関数の傾きとバイアス半径である。この関数は、移動性細胞の周り半径  $\bar{R}$  内に平均何個の移動性細胞があるかを近似的に数えることができる。図 4D は、先の図 4B と非常によく似ているが、特に凝集度については、先の図より非常に滑らかになっている。この図から、凝集度が、高い、中間、低いという三つの特徴的なパラメータ空間を見つけることができる (図 4D,  $\alpha, \beta, \gamma$ )。

図 6A は、図 4D における各パラメータ領域  $\alpha, \beta, \gamma$  における典型的な細胞移動パターンを示している。一番上のパネルは、移動細胞自身の揺らぎによって移動細胞集団が一つの集団に収束し協調的に移動するストリームパターンを示している ( $\alpha$ )。外部からの因子このような因子を抜きに自発的に集団が集まるような挙動は、神経堤細胞において知られており、移動パターンも類似している [21]。



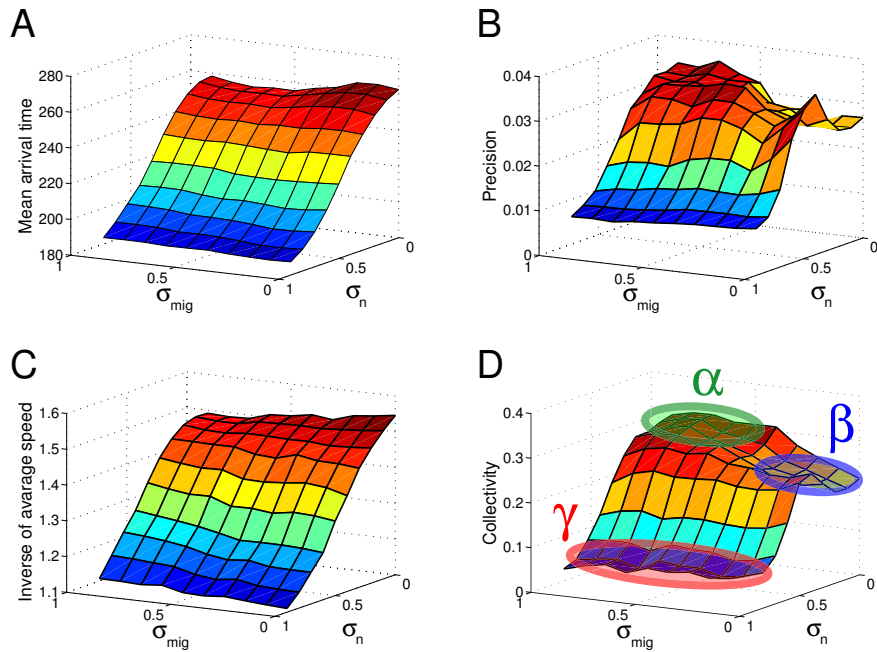


Figure 4 移動性，非移動性細胞のノイズ強度に対する，多細胞系における細胞移動の特征量の依存性．

$x = 150$  をゴールラインと設定した時，そこにたどり着くまでの平均時間 (A) と，そこにたどり着いた時の  $y$  座標の分散の逆数 (B) . 定常状態における速度の逆数 (C) と凝集度 (D) . ここで凝集度は式 (6) で計算される . このとき，パラメータの値として， $\bar{R} = 5$  ,  $\theta = 4$  を用いた . D 図において，特徴的な三つの領域 ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) が確認できる .

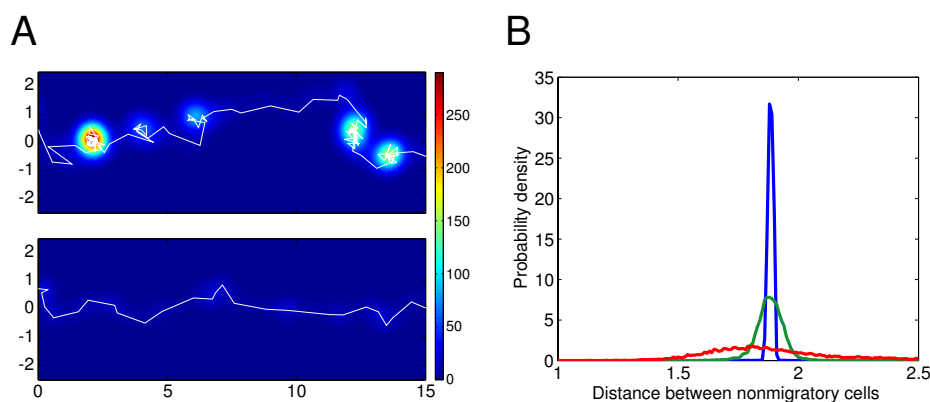


Figure 5 移動性，非移動性細胞のメソスコピックな視点からの挙動．

(A) 移動性細胞の数を一つにしてシミュレーションを行った．白線は，二次元空間内における移動性細胞の軌跡を示している．また，バックグラウンドの色は，ガウシアンカーネルを用いた移動性細胞の位置のカーネル密度推定値を示している．

真ん中のパネルは，図 4C における  $\beta$  の領域における移動パターンを示している．この領域においては，細胞の凝集度にはほとんど影響を受けずに，細胞移動が起こる．最後のパネルは， $\gamma$  に対応する領域での移動の様子を示しており，この領域においては，移動性細胞は，速やかに分散し個別に移動する (dispersive migration)．この領域は，非移動性細胞のノイズ強度がある程度以上の領域であり，この領域においては，移動性細胞のノイズ強度は，細胞移動に影響を与えない．

これらの結果から，移動性細胞がお互いを認識したり，外部からのシグナル情報処理機構等によらずとも，内因的，外因的なノイズの強度によってお互い協調的に動いたり，逆に個別に移動するような細胞移動パターンを示すことができることが，示された．

## 2.4 細胞移動間の実効的相互作用

前節までにおいて，様々な細胞移動のパターンが移動性，非移動性細胞のノイズ強度のペアによって実現されることを示したが，このパターンのノイズ強度依存性はどのように実行されるのであろうか？シミュレーション動画を注意深く観察すると移動性細胞は，前を動く移動性細胞の後をついていくかのような挙動を示すことが分かる．仮説として，前方の移動性細胞が前進することによって，非移動

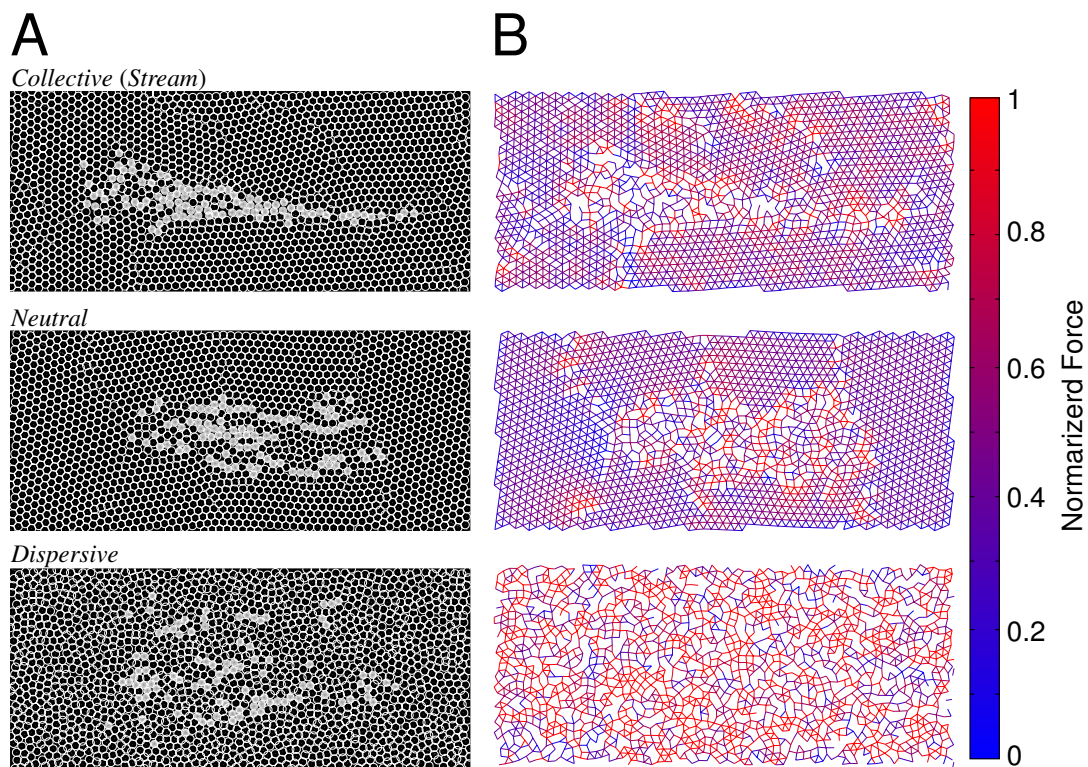


Figure 6 それぞれの移動パターンにおけるスナップショットと、細胞同士の接触の有無。

上, 中, 下のそれぞれの図は, Figure 4 における  $\alpha, \beta, \gamma$  に対応する (A) ある時刻における細胞移動パターン。白丸と黒丸がそれぞれ移動性細胞, 非移動性細胞に対応する (B) (A) 図と時空間的に等しい場所における細胞間の接触を示す。線分がそれぞれの細胞間の反発力の有無を示し, 色は, その強さを示している。

性細胞が左右に押し分けられて空間が開き，非移動性細胞が作り出すポテンシャルの壁が下がり，後続の細胞が侵入しやすくなるという描像を挙げることができる．そこで，シミュレーション内で本当にこのようなことが起こっているのかを検証するためのシミュレーションと解析を行った (図 7)．まず，多数の非移動性細胞に対し移動性細胞一個だけを含むシミュレーションを行い (図 7A)，その結果得られた非移動性細胞の位置座標データに対してカーネル密度推定をかけることによって移動性細胞の周りの非移動性細胞の密度プロファイルを得ることができた (図 7B)．これは，疑似的に細胞の圧力を示しているとも考えられ，密度の低い場所へ細胞が移動しやすくなっているものと考えられる．協調的移動を示すパラメータ領域において，非移動性細胞の密度プロファイルは，移動性細胞の後ろ側で非常に低くなっている (図 8A)．この結果から，後続の移動性細胞は，前方の移動性細胞の後ろ側へ，非常に入りやすくなっていることが示される．一方，ニュートラルな移動を示す領域 ( $\beta$ ) における密度プロファイルは，移動細胞後方の密度の落差が浅く，協調的移動を示す場合に比べて幾分侵入しにくくなっていると考えられる (図 8B)．散逸的な移動を示す領域 ( $\gamma$ ) においては，最早，ほぼ平坦なプロファイルとなっており，後方の移動細胞へなんら影響を与えることができなくなっている (図 8C)．この結果から，移動細胞のノイズは，非移動性細胞を大きくこじ開けることによって追走する移動性細胞を後ろにつきやすくし，非移動性細胞のノイズは，その配置をランダムに動かすことによって移動性細胞が移動したことによる配置の変化の目盛を速やかに消去しているのではないかと考えられる．上記の結果から，移動細胞同士のダイナミクスについて一定の示唆が得られたわけであるが，あくまでその物理的特徴量を計算したのみで，移動細胞同士がお互いどのように作用しているのかは未知である．特に移動細胞同士が引き込みあえる距離はどの程度なのか，引き込みやノイズの強度はお互いの位置に対してどのように変化するのかといった，詳細なダイナミクスについては全く議論できていない．そこで，さらに踏み込んだ解析として，移動細胞間のダイナミクスを推定を行った．

まず簡単化のため，ここでは，二つの移動性細胞間の相互作用に着目する．そして，移動性細胞のダイナミクスは，近似的に，お互いの相互作用を決める実効的なポテンシャル  $U$  の中を動くブラウンダイナミクスで近似できると仮定した．このときの，移動性細胞の位置座標  $(r_x, r_y)$  のダイナミクスは，

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} r_x \\ r_y \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} \partial U / \partial x \\ \partial U / \partial y \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \sigma_x & 0 \\ 0 & \sigma_y \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \xi_x \\ \xi_y \end{pmatrix}, \quad (7)$$

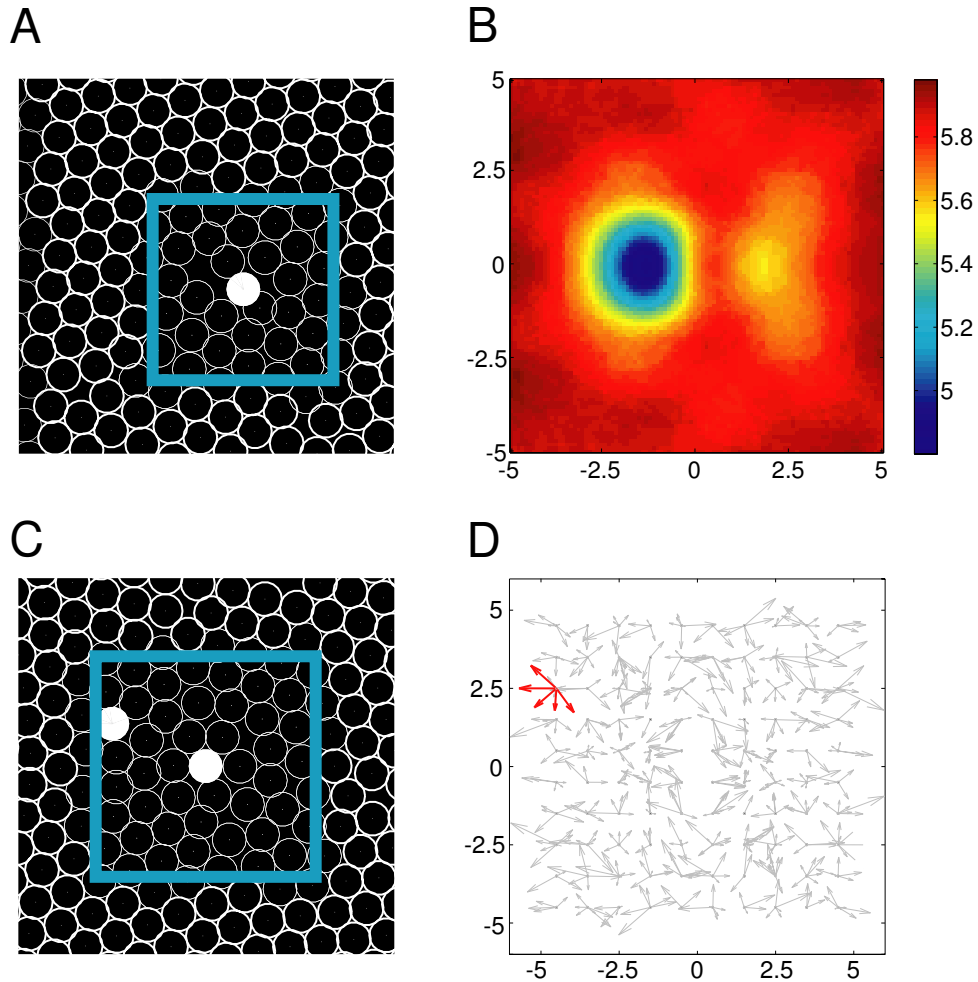


Figure 7 移動細胞周辺における，細胞密度と実効的ポテンシャル場の推定方法．移動性細胞が一つの場合（A），および二つの場合（B）についてシミュレーションを行う．白丸と黒丸は，それぞれ，移動性，非移動性細胞を示す．（B）非移動性細胞の平均密度は移動性細胞を原点とした相対的な座標について行われる．平均密度は，その偏差が細胞半径に等しいガウシアンカーネルを用いたカーネル密度推定によって求められる．（A）図における青枠が（B）図における領域に対応する．（D）シミュレーション結果からサンプルされた速度ベクトル場．短時間におけるシミュレーションを行った後の相対的位置変化を，格子状に初期値を変えながら行うことによって計算した．この図の領域は，（C）図における青枠に対応する．

のように書けるとした。ここで、 $\sigma_x, \sigma_y$  は、 $x, y$  各方向の実効的なノイズ強度である。この  $U$ 、および  $\sigma_x, \sigma_y$  を求めるために、まず、移動性細胞を二つだけ含む系のシミュレーションを、お互いの初期位置を少しずつ変えながら行う (図 7C)。そして、一定時間後の相対的な位置変化から、速度ベクトルをサンプルし (図 8D)、このデータを基に推定を行った (Materials and Methods を参考)。図 8(D-F, G-I) は、協調的、中立的、散逸的移動を示すパラメータにおいて推定した実効的ポテンシャル  $U$  と、 $y$  方向の実効的ノイズ強度  $\sigma_y$  である。全てのパラメータの場合において、 $U$  は、二つの安定点を持つ。これは、移動性細胞がお互い接している状態に対応している。協調的移動を示すパラメータの場合、 $U$  は他の二つに比べて、深い傾斜をしており、 $\sigma_y$  は、安定点では小さいが、それ以外の場所では大きくなっている。これより、相対的な位置がある程度離れている場合は、深い傾斜と大きなノイズ強度を使って安定点を探索し、一旦安定点に入ると、低いノイズ強度と高いポテンシャルの壁によってそこから抜け出すことが非常に困難となることから、お互い接触している状態が非常に安定であることが分かる。中立的移動を行うパラメータの場合、共同的移動の場合に比べてポテンシャルの傾斜は浅く、ノイズ強度についても、低い値でほぼ一定となっているため、相対位置の変化に乏しいダイナミクスを持っていると言える。最後に散逸的移動の場合についてであるが、ポテンシャルは、他の二つに比べて全体的にフラット、特に  $y$  方向への障壁が非常に低くなっており、また、ノイズ強度は、安定点を含め全体的に高くなっており、容易に安定点から脱出し、お互いに離れることができると考えられる。

## 2.5 その他の特性に対する移動度の依存性

今までは、移動性、非移動性細胞のノイズ強度と、その変化が集団移動にどのような影響を与えるのかについて着目してきたが、それ以外にも、系を特徴づけているパラメータは、本研究で用いたような簡単なモデルにおいても数多く存在する。本節では、それらのパラメータ変化が細胞集団移動にどのような影響を与えるのかについて検証する。

まず始めに、移動細胞の数の変化に対して、移動速度がどのように変化するかを調べた (図 9A)。協調的、中立的移動のときは、移動性細胞の数が少ない時は、速度はその数に比例し、大きくなるにつれて一定の値に落ち着く。これは、数が少ない時には、個々の細胞が非移動性細胞を横方向へ大きく押しつける必要があるのに対して、集団での移動時には、横方向への押し出し量が小さくなるた

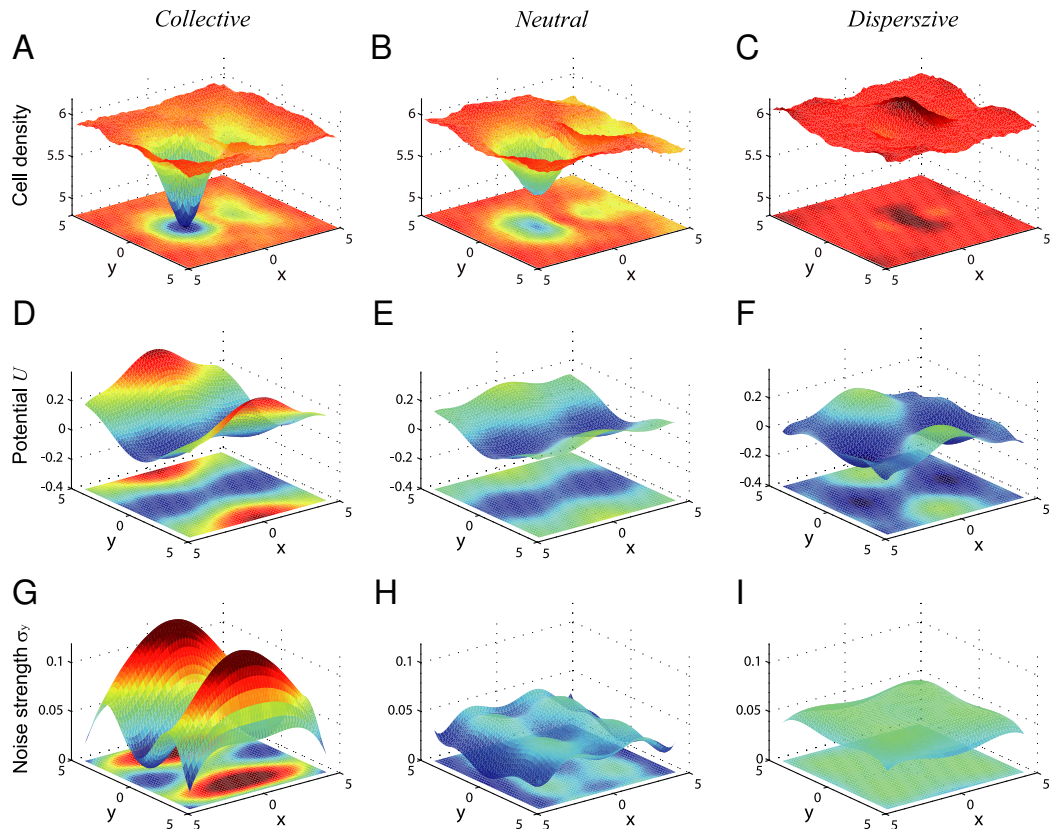


Figure 8 シミュレーションを用いて推定された非移動性細胞の密度と実効的ポテンシャル。

(A, D, G), (B, E, H), (C, F, I) は, それぞれ協調的, 中立的, 散逸的移動モードの場合を表している.  $x, y$  は, 移動性細胞の位置を原点とした相対的位置座標を示す. (A-C) 図 7B と同じ方法で求められた非移動性細胞の平均密度. 実効的ポテンシャル (D-F) と  $y$  方向の実効的ノイズ強度は, 多項式をモデルとした最小二乗法を用いて行った. (付録参照)

め、速度が上がるものと思われる．このような現象は実際の生物の系においても観測されており非常に興味深い [30]．一方，散逸的移動のときには，移動性細胞が押しのけなくとも，非移動性細胞の大きなノイズが，瞬間的に道をあけるため，一レベルの移動でも速い速度で移動することができる．

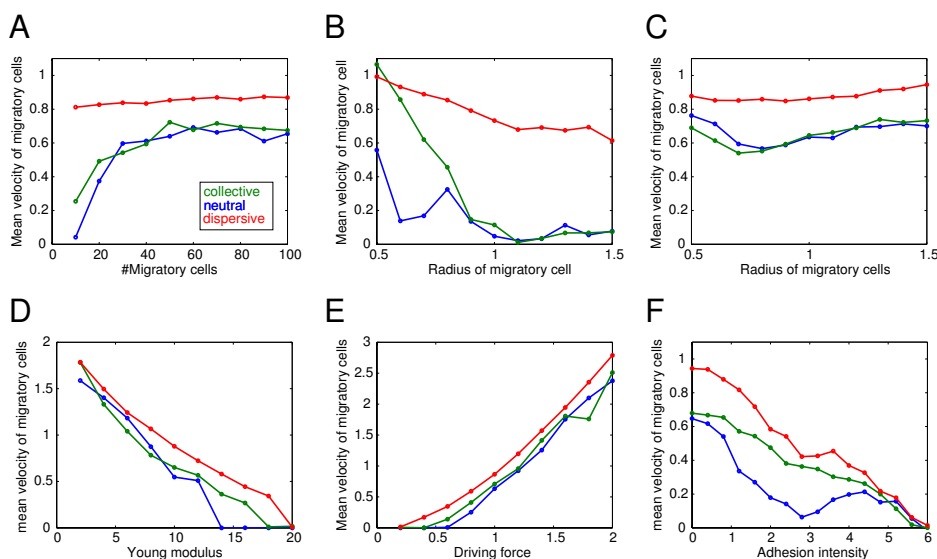


Figure 9 細胞移動速度の物理的パラメータ依存性．

緑，青，赤それぞれの線が協調的，中立的，散逸的移動に対応している．移動細胞の数 (A)，移動性細胞の半径 (B,C)，細胞移動の駆動力 (D)，ヤング率 (E) をそれぞれ変化させたときの，細胞移動速度の変化をそれぞれ示す．(F) 式 (9) を基に，移動細胞間の相互作用に細胞接着力として引力を追加した時の誘引強度  $a$  の変化に対するプロット．図 (A-E,F) においては，移動性，非移動性細胞の数は，図 (??) に同じであり，(B) においてのみ，移動性細胞の数を 1 とした．

発生過程においては，細胞の大きさは一定でなく，分裂をしながら移動する系も存在するためその大きさが移動にどのような影響を与えるのかを知ることも重要である．そのため，細胞の半径が変化した時の移動に与える影響を検証した．移動性細胞一個レベルでの移動時に着目する (図 9B)．協調的，中立的移動時に



は，細胞の大きさが大きくなるに従って速度が下がり，最終的には移動することができなくなる．散逸的移動時においても，移動できなくなることはないが，速度は，半径に比例して下がっていく．これは，半径の増加が，非移動性細胞を押し除ける量，引いては，ポテンシャル障壁の増加を招いていることが原因であると考えられる．次に集団移動時に着目する (図 9C)．協調的，中立的移動時においては，移動速度を最小化するような半径が存在することが確認できる．これより半径が小さい時は，先ほどと同じように，半径の大きさがポテンシャル障壁の増加を招き速度を低下させていると考えられる．一方で，大きな半径を持つ細胞は，その分，通った時に作る後方のスペースも大きいいため，後ろの細胞が入りやすくなり，速度が増加しているものと考えられる．

発生過程を始めとする細胞移動は，外部からのシグナルを受け取り，それを細胞内部で処理し，アクチンを始めとする細胞骨格系や膜タンパクといった．これにより，細胞の硬さや，発揮する力，接着といった物理的な特徴量を変化させることができる．ここでは，これらがどのように細胞集団移動に影響を与えるのかについて検証する．まず細胞の硬さについて検証するために，ヤング率を変化させながらシミュレーションを行い，その時の速度を調べた (図 9D)．その結果，協調，中立，散逸的移動いずれの場合も，硬さに反比例するように速度が低下し，ある閾値以上においては，全く動けなくなってしまうことが示された．これは，ポテンシャル障壁の増加という描像を考えると極めて自然な現象である．細胞移動を駆動する力の増加もまた，それに比例するように速度が増加するという自明な結果を与えた (図 9E)．しかしながら，細胞移動を駆動する力が大きくなると，細胞後方における低密度領域の有無にかかわらず単細胞レベルにおいても移動することが容易となり，個々の細胞がばらばらに移動する傾向がみられた (図 10A)．これは，一種の速度と協調性のトレードオフと言える．

本研究に用いたモデルにおいて，細胞移動の駆動力を発揮する時に細胞同士が接着していることを，暗に仮定しているが，より明確に細胞同士を引き付け合うような力が陽に入った時にどのような挙動の変化が見られるのかは非常に興味深い．これを検証するために，移動細胞同士のインタラクションに，細胞同士の距離が  $L$  以下の時に引き付け合うようなモデルの拡張を以下のように行った．

$$\mu \frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \sum_{j \in \mathcal{N}_i} \mathbf{F}_{\text{rep}ij} + \sum_{j \in \mathcal{M}_i} \mathbf{F}_{\text{mig}ij} + \sum_{j \in \mathcal{L}_i} \mathbf{F}_{\text{adh}ij} + \mathbf{F}_{\text{flu}i} \quad (8)$$

$$\mathbf{F}_{\text{adh}ij} = -a \{L + (R_i + R_j) - \|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j\|\} \frac{\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j}{\|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j\|}, \quad (9)$$

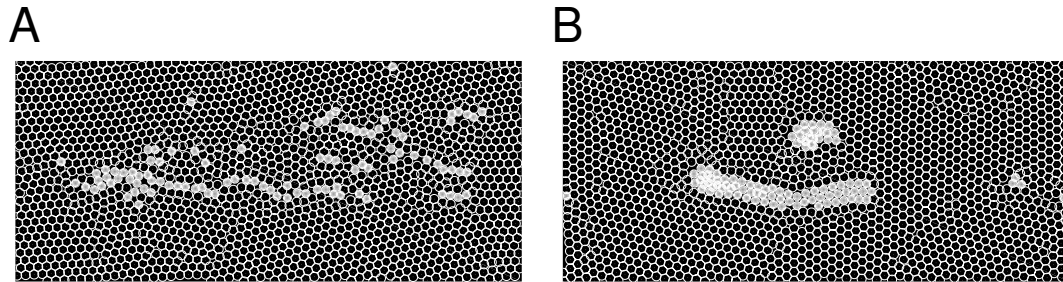


Figure 10 移動モードの駆動力と細胞接着依存性 .

(A) 細胞移動の駆動力が強くなりすぎると細胞移動の協調性が崩れる . パラメータの値は , 駆動力を除いて図 (6A) と同じであり , 駆動力のみ二倍の値を用いている . (B) 細胞接着力をモデルに導入することによって得られた , チェーンやクラスタ様のパターン . ここで式 (9) において用いたパラメータ値は  $a = 4$  ,  $L = 1$  である . その他のパラメータは , 中立的移動モードと同じ値である .

ここで ,  $a$  は , 移動性細胞間の接着力の強度であり ,  $\mathcal{L}_j$  は ,  $R_i + R_j < \|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j\| \leq R_i + R_j + L$  の条件を満たす移動性細胞のインデックスの集合である . 式 (9) は , 接着を示す式であり , 距離が近づくほど接着力が増加するような形になっているが , これは , 近さに比例して , 接触面積が増加することを考慮し結果である . この拡張によって , 移動細胞同士は , 単なる反発力だけでなく ,  $R_i + R_j < \|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j\| \leq R_i + R_j + L$  の条件下においてお互いに引き合うことができる .

$a$  と  $L$  は , おおよそ  $10^{-3} \text{N/m}$  ,  $10^{-5} \text{m}$  の値を取ることが知られており [4, 31] , 無次元化された場合 , これらの値は , それぞれ  $10^0 \sim 10^1$  ,  $10^0$  程度となる .

この拡張したモデルを用いることによって , 導入した接着力が移動速度を抑えることが分かった (図 9F) . これは恐らく , 細胞の半径の増加と同様の理由と考えられる . さらにこのモデルにおいては , 先ほど中立的な移動を示していたパラメータ領域において , クラスタ , もしくは , チェーンと呼ばれる細胞移動様式を取ることが分かった (図 10B) . これは , 癌細胞の移動でみられる現象と一致している [24] . これまでの結果と併せた考察を行うと , チェーンやクラスタといった移動様式においては , 細胞接着が必須と考えられる .

## 2.6 考察

多細胞系の発生過程において，細胞内の生化学系に加えて，隣接細胞同士の物理的接触によってその挙動が特徴づけられる．本研究においては，単純な細胞モデルを用いた多細胞シミュレーションによって，細胞集団移動におけるモードのパターンがその細胞一つ一つの揺らぎというミクロスコピックな物理量によって特徴づけられることが分かった．

本研究で示した結果によって，いくつかの発生過程における細胞移動現象が説明できるようになる可能性がある．代表的なものが神経堤細胞のストリーム移動である．神経堤細胞の一部は，移動しながらその集団の幅を縮めていくストリーム移動を示すことが知られている．これは，細胞外反発因子を経路の両端におくことによって，移動経路を狭めているものと考えられてきた [32]．しかしながら，近年，反発因子であるニューロフィリン-1 の効果を打ち消した実験系においても神経堤細胞はストリームを示すことが見出された [21]．我々の研究結果は，移動細胞自身の強い揺らぎと，その周辺における弱い揺らぎがストリーム移動を誘起することを示しており，この結果と矛盾するものではない．移動性細胞がもつシグナル伝達系においてその揺らぎを抑制するメカニズムについては，ある程度の研究されてはいるものの [17]，確率的な個々の細胞移動が集団移動における機能をどのように果たしているのかは，未だ実証されていない．

本研究において用いたモデルは，セルセンターモデルと呼ばれるモデルに分類されるが，そのほかにも数多くのモデルが提案されている [1, 33]．細胞集団のダイナミクスを記述するのに，よく用いられているものの一つに反応拡散方程式がある [34]．反応拡散方程式を用いたモデリングにおいては，詳細な，特に一細胞レベルにおける特徴は，しばしば無視される傾向がある．しかしながら，マクロなメカニズムに着目して，その特性を検証するには，今なお有効な手法である．腸における神経堤細胞の移動に着目した先行研究においては，このモデリング手法を用いて細胞増殖の効果に着目し，その重要性について検証している [2]．細胞増殖の重要性は，移動性細胞の数に着目することによって本研究においても述べる一方，実験的にも移動中における高い細胞増殖の活性は観察されており，細胞集団移動において非常に重要な要素と考えられる [3]．そのため，今後の課題の一つとして，細胞移動モデルに陽に増殖効果を導入する事は，より現実なシミュレーションを行う為には非常に重要である．本研究で用いたモデルへの細胞増殖の導入方法の一つは，増殖する細胞の近辺に新たに細胞を置くことである．これは，先行研究においても用いられている手法で [35]，比較的容易に実装すること

ができる．他の候補としてあげられる手法に，フェーズフィールドモデルが挙げられる [12]．このモデルにおいては，細胞のある部分を 1，それ以外の部分を 0 と表現される．時間発展は，偏微分方程式であらわされるが，その方程式は，より細胞膜のミクロスコピックな描像におけるエネルギー関数を基に導出されるため，数多くの要素を考慮することができる．また，高い細胞形態表現能力があり，細胞分裂をも取り扱えるため [36]，細胞移動と細胞増殖を同時に取り扱うという場合，非常に有効なモデリング法であると考えられる．

本研究のモデルには，(1) 細胞間に働く反発力，(2) 細胞移動を駆動するための力，(3) 細胞の確率的な挙動を再現する力を導入したが，これらは生物学的に妥当なのであろうか？まず，(1) の反発力であるが，細胞そのものは，弾性を持っていることが知られており，細胞を圧縮する力がかけられると細胞が変形し，細胞膜や細胞骨格の弾性がそれに対抗するように力を発揮することによって反発力が発生する [27]．細胞移動の駆動力は，移動細胞は仮足を用いて隣接する細胞に接着し，引き込むように移動することが知られている [28]．また，細胞の確率的な力は，細胞内のシグナル等のダイナミクスによって自発的に発生することが分かっている [16, 17]．これらの理由から本モデルは，生物学的にもある程度妥当であると言える．実際には，細胞の機械力学的特性は，より複雑な挙動を示すことが知られているが [22]，より単純な本モデルを用いても，多細胞系レベルにおける系の挙動の理解のためには，十分であると考えられる．細胞移動モデルのシミュレーション結果の解析手法の一つとして，実効的な細胞間相互作用を同定する手法を開発したが，この手法は，比較的単純な系であれば実際の発生過程に着目した，実験データに対して適用することができるであろう．そのような条件に当てはまる一例として，線維芽細胞や神経前駆体，ハエの胚発生におけるボーダーセルといった細胞種が挙げられる．

もちろんではあるが，発生過程を始めとする現実の細胞移動システムは，本モデルとは比べ物にならないほど非常に複雑なシステムである．現実の細胞は，複雑な形態変化を示し，フィロポディアやラメリポディアといった構造体を伸長することによって，細胞骨格系が細胞膜を押し出して移動することができる [14]．現実に見られる他の現象の一つに，細胞接触阻止と呼ばれる現象がある [37]．これは，神経堤細胞においてみられる現象で，移動細胞同士が接触すると，一時的に移動が停止し，その後細胞の前後を示す極性を再構成して，再び移動し始めるという現象である．マクロな視点からどのような機能を示すのかは，未だ不明であるが非常に興味深い．また，神経前駆体や神経堤細胞を始めとする細胞種にお

ける発生過程において、増殖・分化といった機能は、細胞移動にとっても重要な機能であり、これらは、おもに Wnt を始めとする細胞外シグナルの勾配によって制御されている。神経管においては、増殖と分化は、それぞれ、Wnt シグナルによって高い活性と低い活性に制御されており、さらにその Wnt シグナルは、勾配をなしておりこれより Wnt シグナルがパターン形成に寄与していることが分かる [38]。神経堤細胞においては、Wnt シグナルは、背側におけるそれ自身の誘導や [39]、そこからの乖離 [40] や運動性の獲得に必要とされている [40]。発生過程のより現実的なモデルを構築するためには、このような重要な要素が数多く残っており、協調的細胞移動の理解のためには、これらの効果も考慮することが今後の重要な課題としてあげられる。

本研究において、数多くのデータ解析手法を用いて研究を進めてきたが、その一部は、実際の実験データにも適用可能であることは、特筆すべき点である。本研究で用いた手法は、細胞の軌跡や、位置を基にデータの解析を行うので、そのデータさえあれば、適用が可能である。実際に、発生過程における細胞移動の軌跡を記録した研究は、数多く報告されており、今後の応用が期待される。一方、本研究で示した細胞移動能力の物理パラメータ依存性、特にノイズ強度依存性については、実験において示すことが難しい。移動細胞の数や大きさについては、実験との比較が比較的容易であると考えられるが、実験的に細胞移動の揺らぎの強度を変化させることはある程度可能であるが、それを *in vivo* において実行するのは困難であると考えられる。特に、多細胞系において観測される揺らぎは、細胞自身の揺らぎのみでなく、その細胞にかかる圧力などにも依存していると考えられ、特に定量的に示すのが難しいと考えられる。その他の手法としては、硬さや駆動力といった他の物理パラメータを通した、相対的な揺らぎの強度のコントロールが考えられ、これによって定性的な実験を行うことが期待される。

本研究で用いたモデルは、細胞を形状固定の粒子と考え、そこに駆動力を与えた、自己推進粒子としてモデルを構築したが、このようなモデルは、鳥の群れ [41]、蟻の行列 [42, 43]、車の渋滞 [44] や粘菌 [4] といった生物学的、社会的現象の解析のためにも多く使われている。このような系においては、個々の粒子は、周りの粒子の情報を受け取りアクティブな情報処理を行って、共同的な振舞いを示すことができる。一方我々が着目したモデルにおいては、込み合いによる効果を通した情報のやり取りを行うものの、そのような情報処理を用いずに協調的移動を獲得している。本研究で得られた知見は、歩行者の流動や [44]、電場における荷電粒子 [45]、他の発生過程における多細胞システムなど [46]、より一般的な

込み合った系における自己推進粒子の振舞いに対する適用も期待される。

### 3. FRETtime lapse imagesからの細胞ダイナミクスの同定

前章では，多細胞系における細胞集団というマクロな視点からの挙動について研究を行ってきたが，本章では，近年の技術発展によって可能になったFRET技術を用いた細胞動画から，細胞内システムの同定にむけた，細胞形態の予測について述べる．

#### 3.1 はじめに

細胞形態制御は，細胞移動を始め，増殖・細胞死といった細胞機能に深くかかわっており，その挙動がどのように制御されているのかは，非常に重要な問いである．細胞形態は，細胞内シグナルネットワークが細胞骨格や細胞膜といった支持構造物のダイナミクスを制御することによって決定されており，それらに関わる分子の機能を同定することによって，細胞形態制御の方法を明らかにすることができる．しかしながら，その動きは，非常に複雑な挙動を示し，取り扱いは非常に難しい．特に問題になってくるのが，その動きの定量化である．細胞形態制御における分子の機能を知るには，例えば，細胞膜の伸び縮みといった特徴量を計算することによって初めて可能となる．しかしながら，そのような特徴量の計算するための決定的なアルゴリズムは，未だ存在せず，簡単な手法や，実験観察者の主観において決定されることが多かった．

細胞の動きを定量化するため，先行研究においては，数多くの試みがなされてきた．単純なものとしては，二つのフレーム間における二値化画像の差分や[47]，ある線状における膜の位置を記録するキモグラフなどが挙げられる[48]．これらは，直観的な定量化手法であるが，そもそも細胞膜の伸びを定量化できていない，局所的な細胞膜の動きしか定量化できないなどの欠点がある．しかしながら，近年より発展的な手法として，非常に強力な動的輪郭追跡法であるレベルセット法を用いた伸びの定量化手法が開発されたことによって，細胞膜全体の伸び縮みを定量化できるようになった[9]．その後も強力な手法が複数のグループから提案され，細胞形態の取り扱いが比較的容易になってきている．

細胞内においては，数多くの分子がお互いに相互作用をすることによって外部からの刺激を内部に伝え，情報を処理し，形態変化や細胞移動といった機能を制御することが知られている．細胞形態の制御にかかわる分子は，数多く知られて

いるが、特に重要とされているのが、RhoA, Rac1, Cdc42 という 3 つの分子である [5, 6, 7, ?]。これらの分子は、Rho ファミリーと呼ばれる分子群に属する分子である。その機能は、細胞骨格と密接に関わっており、それぞれストレスファイバー、ラメリポディア、フィロポディアといった細胞内における機械力学的、形態的に特徴的な構造物の形成に関わっている。これらの発見当初は、静的な解析のみが行われていたが、近年、その動的な挙動についても研究が進んでいる。しかしながら、これらの研究は分子と細胞膜の伸びの間の相関をベースにその機能が議論されているのみであり [9, 10]、どの程度解明された機能が信頼できるのかについては、未だ不明瞭である。

実験及びその解析結果から同定した分子の動的な機能が、十分信頼に足るものであることを実験的に示すのは困難であると思われるが、もし、本当に同定した機能が正しいならばその未来の状態を予測することによって、その妥当性を主張することができる。そこで本章では、生きた細胞内における Cdc42 の活性状態を記録した動画を基に、細胞形態の予測を行うことを目的とする。そのためにまず、FRET 動画から、その動きをよく説明できるシグナルの検出方法について述べる。次に、細胞の動きを定量化するために輪郭線検出を行う。細胞の伸びは、この輪郭線状に仮想的なマーカーを設置し、時間経過に対するマーカー位置の変化を追跡することによって、細胞膜の伸び縮みを定量化する。また、それぞれ対応するマーカーにおけるシグナル活性を定量化することによって、シグナルと伸びの関係を明らかにする。そして、それを基に細胞形態についての予測を行う。

本研究で用いるデータは、中村岳史東京理科大学教授らによって測定された実験データを用いている。細胞移動のモデル細胞としてしばしば用いられる HT1080 細胞を用いて Cdc42 の動態を FRET で観測した画像データを用いる。撮像間隔は、一分間であり、フレーム数は、80 である。

## 3.2 FRET について

FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer: 蛍光共鳴エネルギー移動、または、Förster Resonance Energy Transfer: フェルスター共鳴エネルギー移動) は、生きた細胞内のシグナルタンパク活性の観測に用いられる実験技術である。目標であるタンパクの発現量を観測したいだけなら、タンパク質に GFP を始めとする蛍光たんぱくで標識し、その蛍光強度を観測することで発現量を測定することができる。しかしながらタンパクの中には、発現したタンパクがリン酸やイオンを始めとする原子・分子に修飾を受けてその機能を変化させるものも少なくない。本研



究で着目している 3 量体低分子量 G タンパクもそのような分子群のひとつであり、この場合 GTP(Guanosine triphosphate, グアノシン三リン酸) や GDP(Guanosine diphosphate) に修飾を受けることによって分子の形態が変化し、活性・不活性の状態を行き来する。このような分子の機能を同定したい場合、観測したいのは、全体の発現量ももちろん重要であろうが、さらに重要なのはどのくらいの割合が活性状態になっているのかである。単純に蛍光分子をタンパクにつけるだけでは、その割合を知ることができない。しかしながらこの問題は、FRET を用いることによって解決することができる。

FRET の要点は、励起エネルギーの異なる二種類の蛍光分子がお互い十分近い距離にあるときに励起エネルギーの高い方の蛍光分子を励起させると、その分子は蛍光を発せず、エネルギーがもう片方の蛍光分子に移り、そこから蛍光を発するという現象にある。低分子量 G タンパクにおける活性・不活性状態の観測もこの原理を利用する。手順としては、まず目標タンパクの遺伝子配列の両端に CFP (Cyan Fluorescent Protein:シアン蛍光タンパク) と YFP (Yellow Fluorescent Protein:黄色蛍光タンパク) を接続する。発現した G タンパクの両端にも CFP, YFP 双方がくっついている。しかしながら G タンパクは、その活性・不活性状態において形態を大きく変えることにより、CFP, YFP の距離も大きく変えることになる。このため、G タンパクが不活性状態のときは、両者の距離が十分離れているため、CFP の吸収スペクトルに合わせた励起光を当てると CFP の蛍光のみが放出される。一方活性状態においては、二つの蛍光たんぱくの距離が非常に近いいため、CFP を励起してもそのエネルギーはその傾向に使われずに YFP に移り、黄色の蛍光が放出されることになる。つまり、CFP の励起光をあてたとき、不活性状態の G タンパクは、シアンを、活性状態の G タンパクは、黄色の蛍光を放出することになり、これによって同じタンパクの活性・不活性状態を観測することができる。

### 3.3 FRET シグナル検出

FRET を用いることによって、ほぼ同じ位置、時間における二種類の画像が得られる。一つは、活性状態のタンパクをモニタした動画、もう一つは、不活性状態のタンパクをモニタした動画である。この二種類の画像に、さらに何らかの処理をかけて、シグナル検出を行う必要がある。先行研究においては、二つの画像の比、つまり、ある画素におけるシグナル強度  $S(x, y)$  は、その画素における CFP,

YFP 強度をそれぞれ  $C(x, y), Y(x, y)$  としたとき,

$$S(x, y) = \frac{Y(x, y)}{C(x, y)} \quad (10)$$

をシグナル検出関数として用いてきた。この関数を用いる大きな利点の一つは、シグナル強度が目標タンパクの全体量、つまり活性・不活性状態の和によらないということである。また、以下のような単純な化学反応、



を考えたとき、平衡状態において、

$$S(x, y) = \frac{Y(x, y)}{C(x, y)} = \frac{k_b}{k_f} \quad (12)$$

が成り立つことから、比をシグナル検出関数として用いた場合、近似的に、反応係数の比を見ているともいえる。これはつまり、どの程度の活性化・不活性化シグナルが上流からきているかに対応しており、生化学的にも意義のある量を観測しているといえる。しかしながら、この分子の下流シグナルも同様にその比によって活性化・不活性化の制御がかかっているのかと言えば必ずしもそうでなく、むしろ、活性状態の分子の絶対数や、濃度に依存すると考えるのが自然である。そこで、本研究では、細胞形態の動態予測を行う前処理として、まず、FRET 動画からより細胞の形態のダイナミクスをよりよく説明するためのシグナルを検出するための関数の設計に着目した。

FRET 動画のもつ性質を視るため、まずは、その蛍光強度の散布図に着目した。図 11 にそれを示す。この図より、双方の蛍光は、ある直線状に分布していることが分かる。もし、タンパクの活性・不活性状態が常に定常状態付近にしていると仮定すると、この直線の傾きは、その平衡係数を表していると考えられる。そして、この直線からの距離がどれだけ、平衡状態からの離れているか示していると考えられる。そこで、まずは、このデータに PCA (Principal Component Analysis: 主成分分析) を適用することによってそれらの量を導出した。

このデータに PCA を適用した時、その第一主成分は、平衡状態における活性・不活性状態それぞれにおけるタンパクの総数、第二主成分がその活性・不活性状態のバランスのずれを表していると考えられる。図 12 に基画像である CFP, YFP の画像を、図 13 の画像がそれぞれ、第一主成分、第二主成分を表している。図

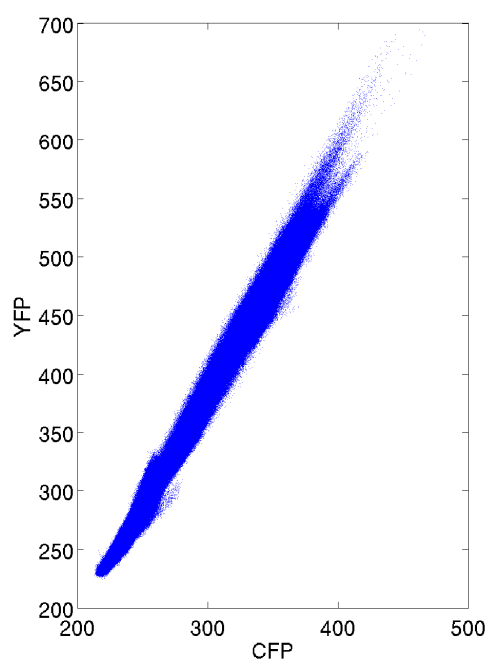


Figure 11 全ての画像における CFP,YFP の分布

を見ての通り，第一主成分は，基の CFP, YFP 画像 (図 12) に対して見た目上ほとんど差異がない．これは，第一主成分が特徴量として，そのタンパクの総数に当たる蛍光強度を検出していることが原因であると考えられる．それに対して第二主成分は，基の CFP, YFP 画像に対して非常に異なった様相を呈している．しかしながら，この成分はよく，その動きと相関しており，相関の高いシグナルが検出されていると思われる．実際，先行研究で良く使われてきた比 (図 14 左) と比較しても伸びている部分周辺のシグナル活性度が高くなっており，より伸びに対する高い相関が期待される．

さらに，細胞内においてタンパクの濃度が常に一定だと仮定すると，第一主成分は，細胞の厚み，引いては，その点における体積を表していると考えられる．一方，第二主成分は，あくまでシグナルの数と考えられるため，第二主成分を第一主成分で割ることによってシグナルの濃度を導出できると考えられる．濃度という量は，シグナル伝達のモデルを考えるときに用いる最も基本的な量であり，この可視化を行うことによってより相関の高いシグナルを検出できることが期待される．実際に可視化したものが，図 14 の右側のパネルである．これより，今までの第二主成分や，比を用いたシグナル検出器よりもさらにコントラストが上がっており，細胞形態の動態を一番よく説明することができるように思われる．これ以降本稿においては，とくに断りがなければ，シグナル検出関数に，この第二主成分と第一主成分の比を用いるものとする．

### 3.4 輪郭線検出

細胞の動きを定量化するためには，その膜の動態を追わなければならない．そのために，まず膜を細胞の内外の境界を示す輪郭線と定義し，その検出を行う．恐らく一番簡単な方法は，人間の手で行うことであるが，今後大量のデータを扱うことを前提にしているため，ある程度自動化できることが好ましい．本研究においては，画像のヒストグラムを基に閾値を設定し，そこを境に細胞の内外が分離されるものとした．用いる画像であるが，CFP, YFP とともに似たような傾向を持つため，どちらを用いても恐らく大きな違いは出ないであろうが，前節においてすでに細胞の厚みの指標となるであろう第一主成分を求めているため，今回はそれを用いた．計算した第一主成分のヒストグラム (図 15) によると，蛍光強度は大きく二つのクラスタに分けられ，一つは細胞，もう一つはバックグラウンドを表している．本研究では，二つのクラスタ間においておおよそ最小値を取る 500 を閾値として全てのフレームに用いた．システムティックな手法を用いるならば，

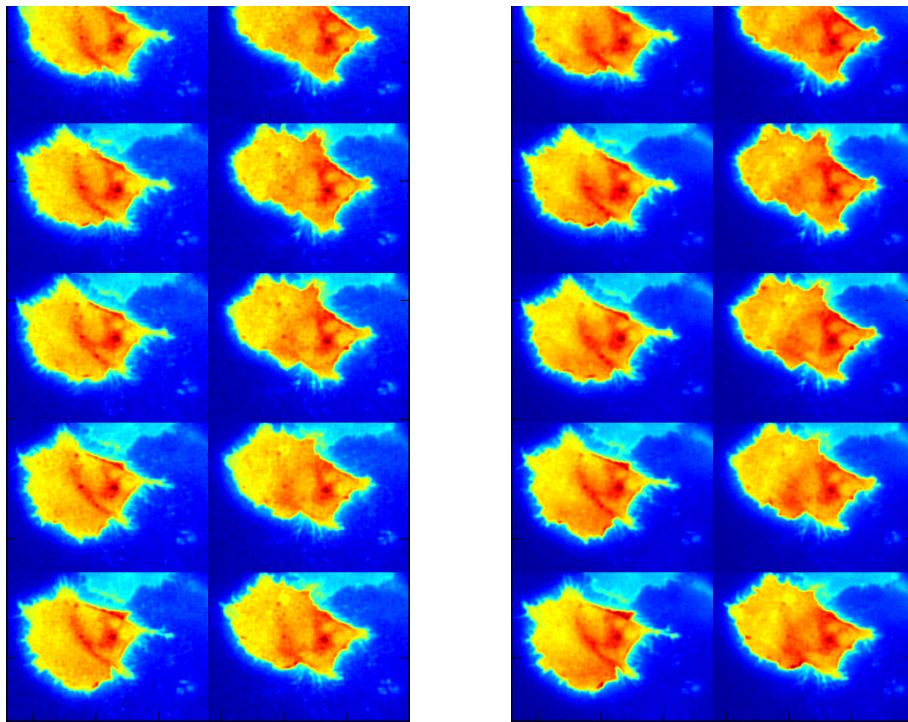


Figure 12 CFP,YFP の時系列

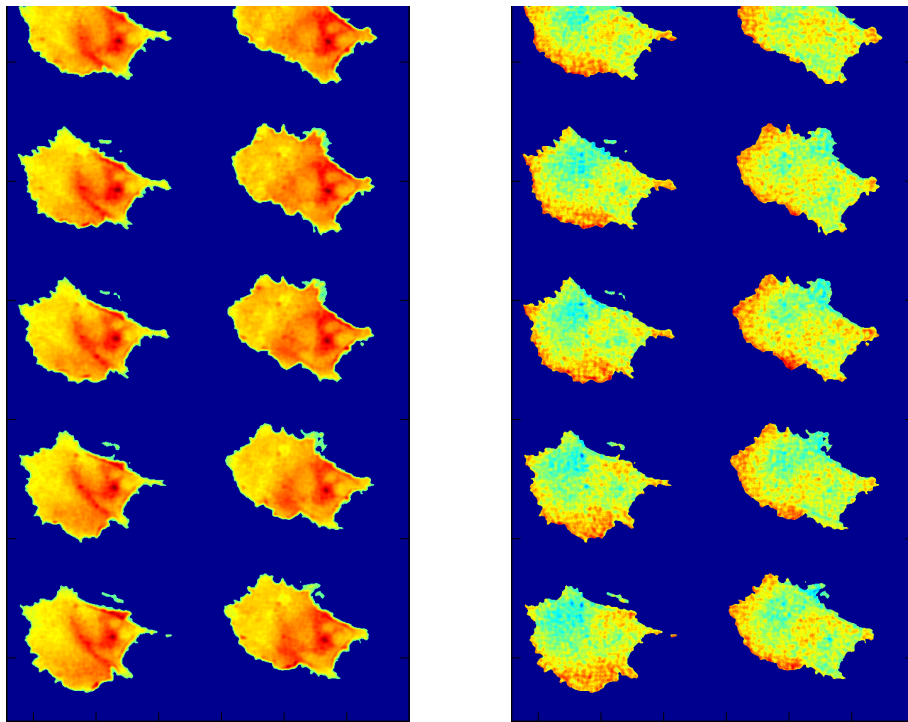


Figure 13 第一主成分，第二主成分の時系列

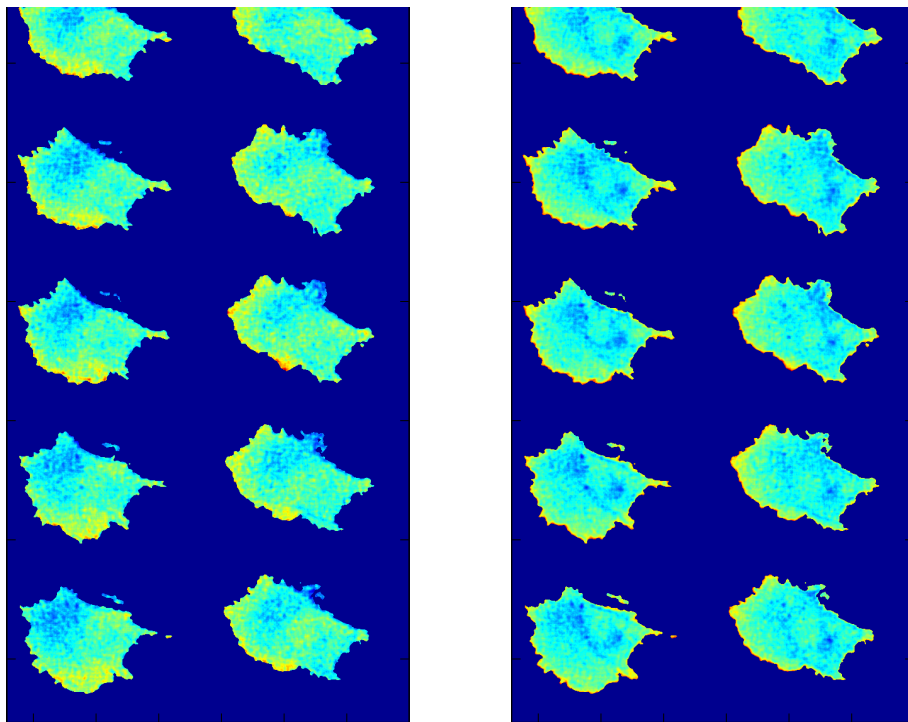


Figure 14 比, 第二主成分/第一主成分の時系列

二つのクラスタの分散を最小化する閾値を求めるのが常であるが、これより小さな値をとると、エッジがぼやけすぎること、細胞外領域を大量に検出してしまうことから、ある程度大きめの値を主観的評価で決定した。

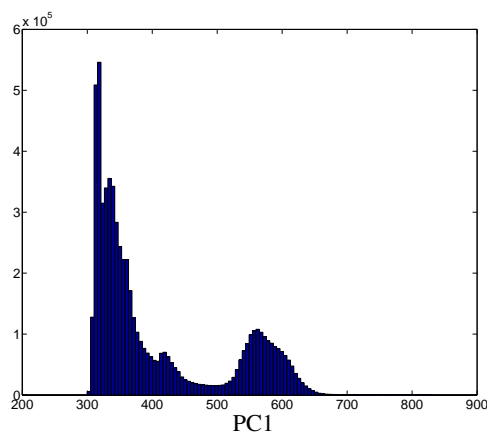


Figure 15 第一主成分のヒストグラム。  
左側のクラスタは、背景に、右側のクラスタが細胞に対応する。

### 3.5 フレーム間の輪郭線補間

生きた細胞の動画を撮影する際の大きな制約の一つが、フレームレートの低さである。これは、生きた細胞に強い光を当て続けると、細胞が傷ついて動きが弱まってしまう、データが取れなくなるためである。このため、各フレームの細胞画像は、1分程度間隔をあけて撮影されねばならない。この間に細胞は、おおよそ自分自身の大きさと同程度のオーダーを動くことができる。動きの定量化のためには、輪郭線上に追跡マーカを仮想的に設置し、そのマーカの軌跡から動きの定量化を行う。しかしながら、一フレーム当たりの細胞の移動距離が大きくなりすぎると、追跡アルゴリズムの適用が困難となる。典型的な例の一つにトポロジカルバイオレーションがある。膜の伸びは、通常、膜に対して垂直方向に定義される。あるマーカに着目した時、そのマーカの次のフレームにおける点は、前のマーカを通り、膜に対して垂直な直線と、次のフレームにおける膜の交点で定義される。しかしながら、しばしば、膜は細かく波打つような形状をしており、非常に離れた点を検出したり、場合によっては、交点そのものが存在しない



場合がままある．これらの問題は，二つのフレームにおける輪郭線を何らかの方法できめ細かに補間することによって，そのような状況を引き起こさせないようにすることによって解決することができる．このような場合に有効な手法として知られているのが，レベルセット法 (Level Set Method) である．

### 3.6 レベルセット法

レベルセット法は，Chan らによって対象のトポロジー変化に対応できる輪郭線追跡アルゴリズムとして開発され??，そののち，Danuser らによって細胞動画の解析に用いられた??．本手法の骨子は，輪郭線状で 0 を取る二つの関数 (レベルセット関数) を，境界がその垂直方向に動くという制約のかかった微分方程式の初期値と解として導出されることである．レベルセット関数の時間発展を追うことによってフレーム間の補間をおこなうことができる．各フレームの形状やトポロジーに影響されないため，非常に強力な手法として知られており，細胞動画に限らず数多くのシミュレーションや解析に用いられている．

#### 3.6.1 理論とアルゴリズム

時刻  $T, T+1$  の時の輪郭線を表す二次元平面上の点の集合を  $\Gamma_T, \Gamma_{T+1}$  とする．輪郭線が常に垂直方向  $N$  に速度  $F$  で動くと仮定すると，輪郭線上の点  $p = (p_x, p_y)$  は，

$$\frac{\partial p}{\partial t} = FN(p) \quad (13)$$

というダイナミクスに従うことになる．ここで  $F$  は，輪郭線状の点の移動速度を規定する関数であり，成長速度と呼ばれる関数である．二つのフレームを滑らかに接続するためにはこの  $F$  を上手く決める必要がある．

そこで，時刻  $T$  における新たな補助関数として， $\phi(x, y, t)$  を導入する．このとき  $\phi(x, y, t)$  は，時刻  $t$  における領域 (ex. 細胞内)  $\Omega_t$  に対して，

$$\phi(x, y, t) > 0 \quad (x, y) \in \Omega_t \quad (14)$$

$$\phi(x, y, t) = 0 \quad (x, y) = (p_x, p_y) \quad (15)$$

$$\phi(x, y, t) < 0 \quad (x, y) \notin \Omega_t \quad (16)$$

を満たすとする．このとき式 (15) を  $t$  で変微分すると，

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \nabla \phi \mathbf{r}(t) = 0 \quad (17)$$

となる．また，曲線上の単位法線ベクトルは，

$$\mathbf{N} = \frac{\nabla\phi}{\|\nabla\phi\|} \quad (18)$$

である．輪郭線は，その法線方向に速度  $F$  で発展していると仮定しているので，

$$\mathbf{r}(t) \cdot \mathbf{N} = F \quad (19)$$

が成り立つ．これより，

$$\frac{\partial\phi}{\partial t} = -F\|\nabla\phi\| \quad (20)$$

が得られる．この偏微分方程式を初期条件および終端条件，

$$\phi(\mathbf{r}_t, t) = \phi_T(\mathbf{r}), \quad (21)$$

$$\phi(\mathbf{r}_{T+1}, T+1) = \phi_{T+1}(\mathbf{r}) \quad (22)$$

のもとにおいて解を計算機的に導出し， $\phi(\mathbf{r}(t), t) = 0$  となる点集合を求めることによって，任意の時刻  $t$  における輪郭線を求めることができる．

### 3.6.2 結果

一般的にレベルセット関数は，条件式 (14)-(16) をとる関数であればよいが，ここでは，レベルセット関数として以下を用いた．

$$\phi_T(x, y) = \min(d_2((x, y), \Gamma_T)) (2H(\Omega) - 1). \quad (23)$$

ここで， $H(\Omega)$  は，領域  $\Omega$  において 1 を，それ以外で 0 を取る関数である．この関数により，錘状のレベルセット関数が得られる本研究で用いるデータの一部にレベルセット法を適用した結果を 16 に示す．この図より，二つの輪郭線が非常に滑らか，かつ自然に補間されていることが分かる．次に，この結果を用いてマーカー追跡を行って結果を図 19 に示す．各丸印で示されているのが，マーカーの初期位置であり，そこから膜に対して垂直方向に線を伸ばした時の次の輪郭線との交点を追跡した結果である．マーカー追跡の軌跡は非常に滑らかな曲線となっており，また，それらがお互いに交差することもない．このことから，この手法はマーカー追跡において非常に有効な手法の一つと思われる．

しかしながら欠点も多い．まず，補間した輪郭線は必ず，各フレームにおけるそれぞれの輪郭線に囲まれた領域にしか存在することができない，これは，一見

自然なように思える．しかしながら，図 18 に示すように細かく波打った形状から直線状の形状に移行するとき，お互いの交点が固定され，動かないというのは極めて不自然である．次に，追跡用マーカの間隔が，追跡を勤めるごとに変化してしまうことである．図 19 を見てもわかるように，主に，曲率の高いところから，低いところへ移動するマーカー群は，お互いの距離を縮める傾向がある．これは，比較的長い距離にわたって分布しているマーカー群を，より短い領域に移すことによって発生していると考えられる．さらに，マーカー追跡を長時間行うと，マーカーが収束してしまい，実効的なサンプルの数が減ってしまうという欠点が存在する．この欠点を補う方法については，先行研究において速度関数  $F$  の設計によってある程度改善されることが指摘されているが，根本的な解決とはなっておらず，長時間の追跡では，やはり収束してしまう．さらなる欠点として，二つのフレーム間におけるそれぞれの輪郭線の変化量が大きい場合にレベルセット法を適用すると，輪郭線追跡が追いつかずトポロジーの変化が生じてしまい，いわゆる“飛び地”の発生を引き起こしてしまう場合がある(図 20)．これは，トポロジー変化をも追跡できるというレベルセット法の長所が裏目に出た形の欠点である．

そこで，本研究では，新たに，マーカー間の距離を保ちつつそのフレーム間の輪郭線を補間するアルゴリズムを開発した．次節はこれについて述べる．

### 3.7 マーカー間の距離を保つ輪郭線補間法

レベルセット法の種々の欠点は，安定したサンプリングを長時間にわたって行うに当たっては，重大である．そこで本節では，その解決方法として新たに提案したマーカー追跡法について述べる．まず，欠点の一つである，交点での固定問題であるが，これは，マーカー追跡を膜に対して垂直方向にのみ行うのではなく，水平方向にも行うことによって解決できる．また，マーカー間隔を一定にするためには，それらの水平方向に反発力を導入，もしくは，マーカーが常に輪郭線の周長の等分割するような配置にすることによって，間隔を一定に保つような制約を入れてやればよい．最後に，飛び地の問題であるが，これは，レベルセット法の表現能力の高さからくるものであり，あえて，表現能力の低い一本の輪郭線を用いることによって解決できるものと考えられる．

これらを踏まえて，新たにマーカー追跡アルゴリズムを提案した．まずは，各フレームにおける輪郭線の長さを測り，そこに等間隔に追跡用マーカーを置き，時計回りに番号を振っておく．そして，各フレーム間において，同じ番号のマ

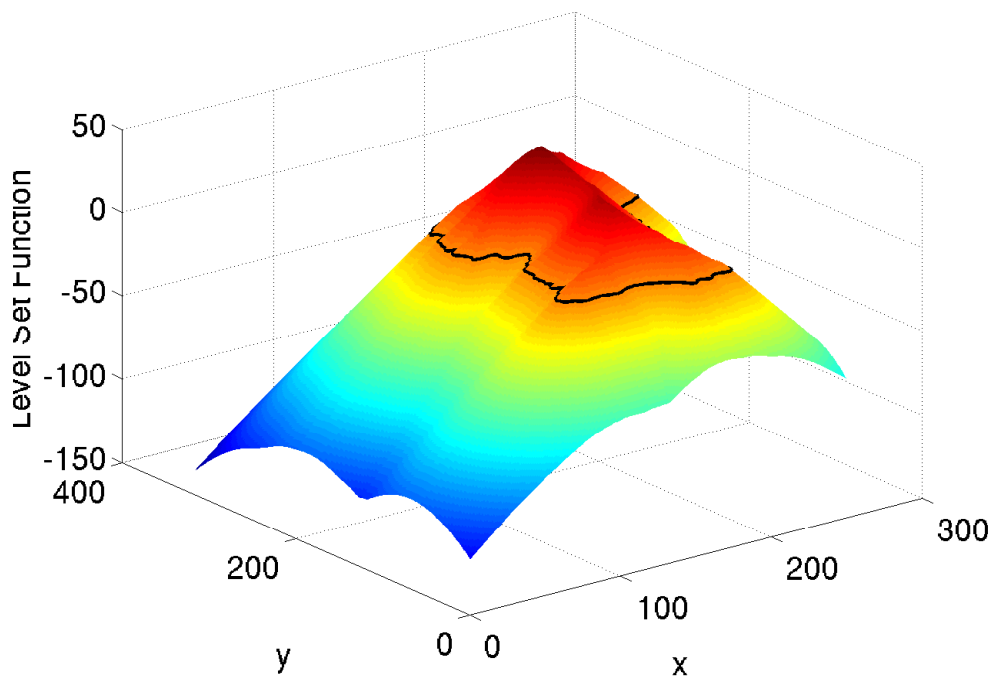


Figure 16 輪郭線をもとに計算されたレベルセット関数 .  
 式 (23) を基に計算した . 値の絶対値は , 最も近い輪郭線状の点までのユークリッド距離に等しい . 細胞に対応する部分では , 正の値を取り , 背景部分においては , 負の値を取る .

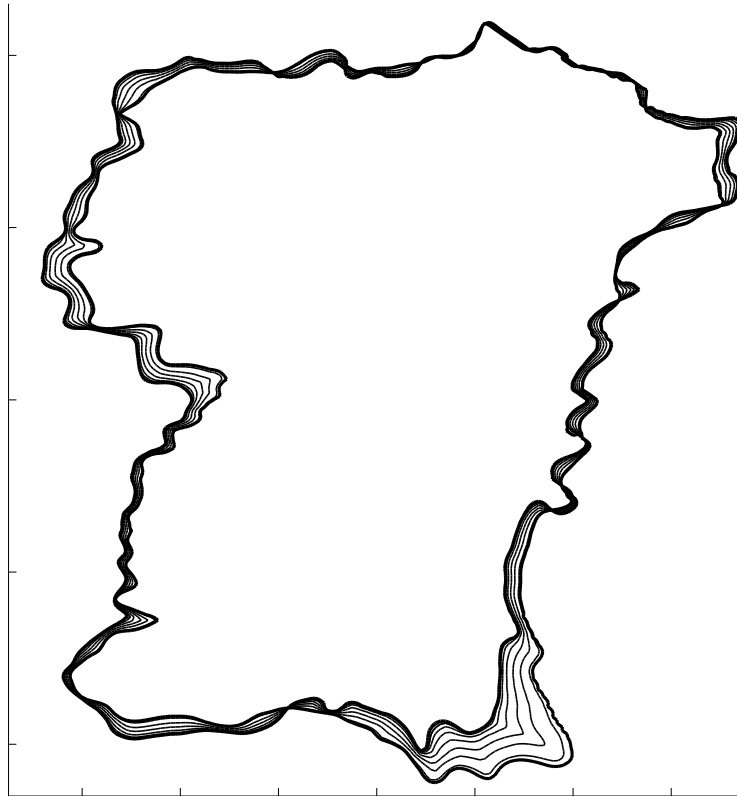


Figure 17 レベルセット法を用いた補間結果 .  
二本の太線が画像データから計算された基の輪郭線を示す . 細い線は , レベルセッ  
ト法を用いて補間された曲線の一部を示す .

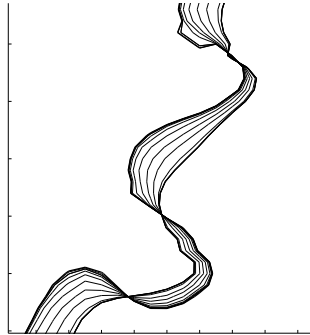


Figure 18 レベルセット法による補間結果の拡大図．

二本の太線が画像データから計算された基の輪郭線を示す．細い線は，レベルセット法を用いて補間された曲線の一部．補間された曲線は，基の輪郭線の間にもみ存在する．

カー間を自然長0の仮想的なばねで結ぶ．そして，各マーカー間を結ぶばねに沿った距離の和を最小化するようにマーカーを配置する．そうすることによって二つのフレーム間の輪郭線を滑らかに結ぶことができる．対応するマーカー間の距離を最小化することは，レベルセット法における，輪郭線が常に垂直方向に動いている，という仮定を反映している．この手法によって，マーカーは垂直方向に動けるために，交点が固定されることはない．また，マーカー間隔は常に固定されているため，その密度が追跡とともに変化することはない．輪郭線は，ループした一本のみが常に存在するので，飛び地は発生しえない．これより，先のレベルセット法によって発生した欠点をすべて解決することができた．本手法においてマーカー追跡を行った結果を図21に示す．先の結果と比べて，マーカーの間隔が常に一定になっているのが分かる．

### 3.8 特徴量抽出

先の手法によって各フレームにおける細胞の膜上のマーカーの位置を決めることができた．本節では，そのマーカーから細胞形態の動態を予測するための入出力の基となる，特徴量の計算方法について述べる．

まず，入力として，最も重要であるのが，マーカー周辺のシグナル活性である

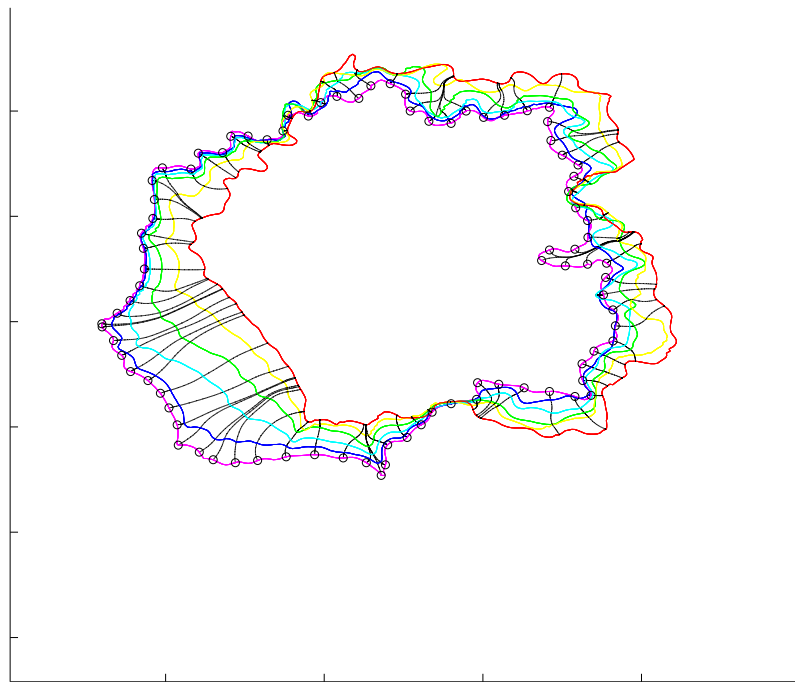


Figure 19 レベルセット法を使って補間した結果を用いてマーカー追跡を行った結果。  
丸印がマーカーの初期位置を表し，そこから追跡した結果のパスを黒線で示す。

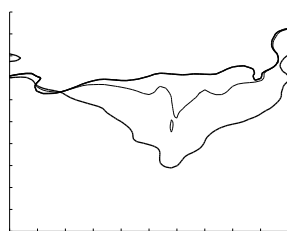


Figure 20 レベルセット法を使って補間した時の飛び地 .

二本の太線が画像データから計算された基の輪郭線を示す．細い線は，レベルセット法を用いて補間された曲線の一部を示す．細線による小さな輪が，偏微分方程式による時間発展時に，千切れて飛び地となった箇所．

う．細胞の形態は複雑かつ刻一刻と変化し，厚さも一定でないため，ある点におけるシグナル活性が，マーカーから実効的にどれだけの距離離れているのかを計算するのは難しい．本研究では簡単のために，マーカーの中心を平均とする二次元ガウシアンカーネルとの内積を様々な，分散について計算し，シグナル活性として用いた．これは，シグナルが，細胞内を一樣な拡散係数において拡散すると仮定した時，その点のシグナルがどれだけそのマーカーに到着するのかに対応する．標準偏差は0から，0.1刻み前で9.9までの場合について計算した．しかしながら，すべてのデータを利用すると入力次元が大きくなりすぎることによって学習の汎化性能が落ちることが期待される．そこで，入力次元を減らすため，各標準偏差において導出されたシグナル活性同士の相互相関を計算した．図22が，各標準偏差間の相関地の等高線を示している．ここでは，できるだけ相関値の離れている， $\sigma = 0, 3.7, 9.9$ の3セットのみを入力として用いることにした．また，細胞膜上の物理的特徴量として，細胞の曲率にも着目した．ここでは着目するマーカーと両隣のマーカーに関する外接円を求め，その半径の逆数を曲率とした．シグナルは，様々な分散に対する二次元ガウス関数との内積を特徴量とし用いた．これは，細胞内シグナルが一樣な媒質中を拡散すると仮定したとき，着目したマーカーにたどり着く量を測ることと，等価である．シグナル活性と伸びを各時刻とマーカーについて表示したマップを図23に示す．これより，細胞膜上の伸びやシグナル活性の時空間的なパターンを可視化することができた．



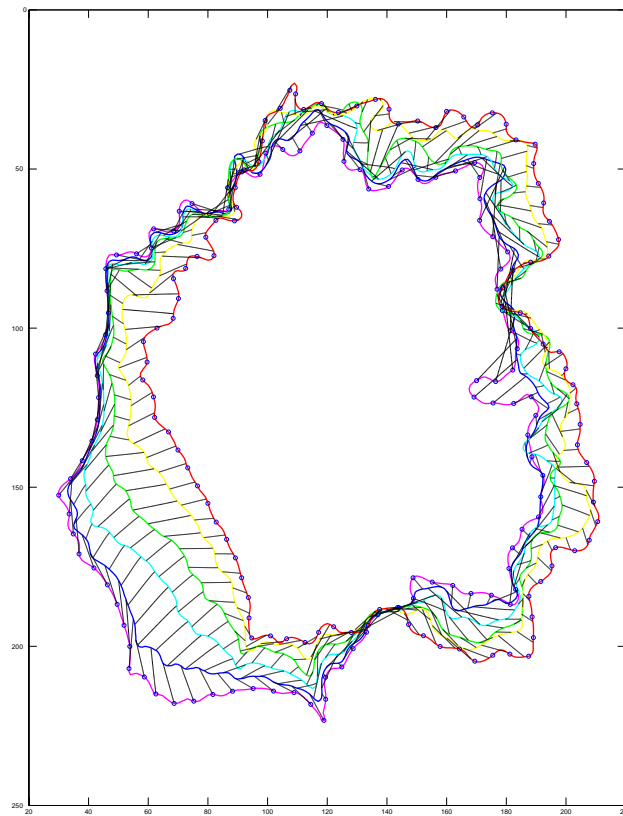


Figure 21 レベルセット法を使って補間した結果を用いてマーカー追跡を行った結果．丸印がマーカーの初期位置を表す．

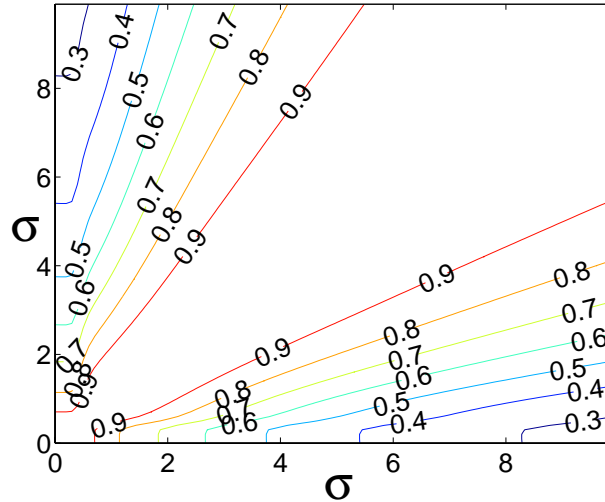


Figure 22 各標準偏差値を用いて抽出した特徴量間の相関．  
縦横のそれぞれの軸がガウス関数の偏差を表す．

### 3.9 シグナル活性による細胞形態制御と細胞形態予測

以上で，細胞形態と関連するシグナル活性の定量化が完了した．ここからは，これら定量化したデータを基に細胞形態がどのように制御されているのかについて述べていく．本研究で知りたいのは，細胞膜のダイナミクスにおける細胞内シグナルの機能である．しかしながら，実際の細胞において，シグナル活性の情報を細胞骨格に伝えるには，いくつかのシグナル伝達系を介して伝えられることがわかっており，ある程度の時間遅れが発生することが想定される．また，先に示した活性度，ならびに細胞膜の伸びのマップを見ると，時刻が経過するとともに，膜に沿って活性が伝播している様子を視ることができる．このことから，マーカーの伸びは，そのマーカー周辺のシグナル活性のみではなく，その周辺のマーカーにおけるシグナル活性にも依存すると考えられる．そこで時刻  $T$  における，マーカー  $i$  に着目した時，時空間的に局所的な情報のみを用いるのではなく，それ以降  $T + 5$  までの時刻におけるマーカー  $i - 3 \sim i + 3$  におけるシグナル活性の値を入力として用いる．つまり，時刻  $T$ ，マーカー  $i$  における入力データ， $X_{i,T}$  は，

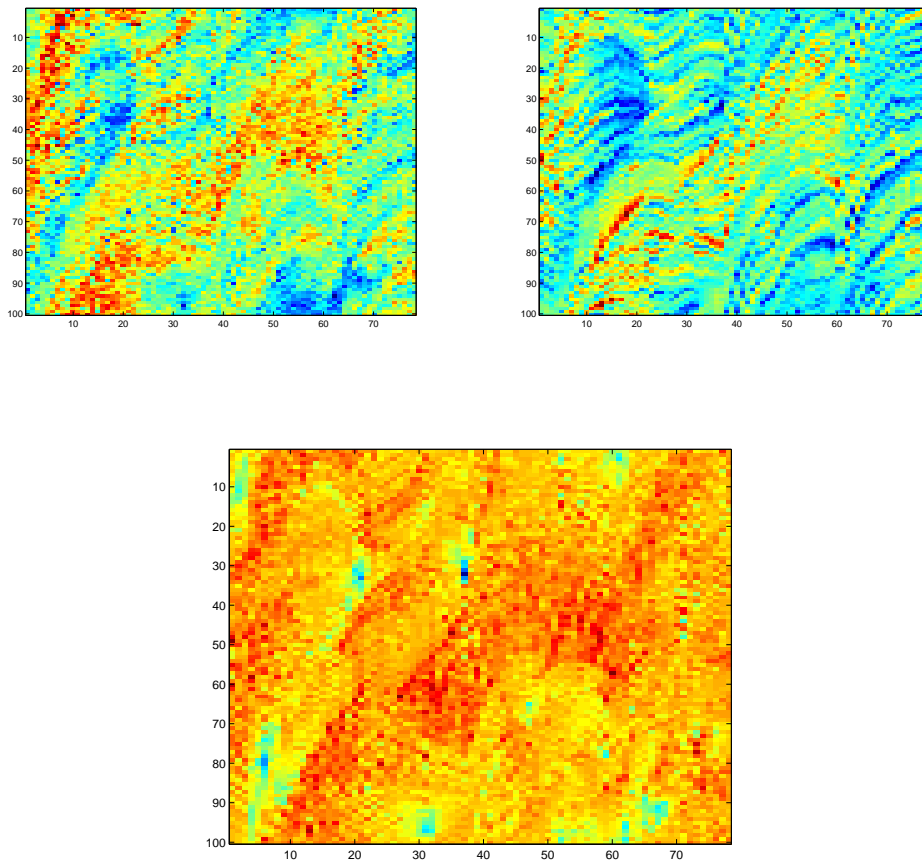


Figure 23 シグナル活性と，伸びのマップ．  
横軸は時間，縦軸はマーカーのインデックスを示す．

$X_{i,T}^j$  を

$$X_{i,T}^j = \left( x_{i-3,T}^j \quad x_{i-2,T+1}^j \quad \cdots \quad x_{i+3,T}^j \quad x_{i-3,T+1}^j \quad \cdots \quad x_{i+3,T+4}^j \right) \quad (24)$$

と定義したもとので、

$$X_{i,T} = \left( C_{i,T} \quad X_{i,T}^0 \quad X_{i,T}^{3.7} \quad X_{i,T}^{9.9} \right) \quad (25)$$

とする。ただしここで、 $C_{i,T}$  は、時刻  $T$  におけるマーカー  $i$  における曲率である。

一方、入力データをこのように決定した時、説明したい出力は、それ以降膜がどれだけ伸び縮みしたかである。つまり、 $T \sim T+4$  までのシグナル時系列が手元にあるときに、 $T+5$  以降の時刻において膜がどれだけ伸びたのかを知りたい。そこで時刻  $T$ 、マーカー  $i$  における出力データ、 $Y_{i,T}$  は、各フレーム間にどれだけ伸びたかを示す変数  $l_{i,T}$  を用いて、

$$Y_{i,T}^\tau = \sum_{t=T}^{T+3+\tau} l_{i,t} \quad (26)$$

で定義する。

まずは、テストケースとして比較的簡単な問題を取り扱うため、着目するフレームは、比較的ダイナミクスが安定している  $T = 49 \sim T = 59$  とした。本研究で用いたデータの前半部分は、他の細胞と接触することにより、シグナルと動きの関係が一致しておらず、また時間がたつにつれて細胞の動きが鈍くなっていくことから、今回は、この領域のデータを用いた。これらのフレームにおけるすべてのマーカー、 $i = 1 \sim 100$  についてデータをサンプリングすることによって、データセットを作成した。 $\tau$  は、 $1 \sim 7$  を用いて、それぞれの場合について着目した。これらの入出力セットを、さらに学習用とバリデーションテスト用の二つの組に分けて用意する。学習用データセットとして、 $T = 49 \sim T = 54$  を用い、学習したパラメータが本当に予測に使えるのかを  $T = 55 \sim T = 59$  におけるデータを用いて検証する。

### 3.9.1 モデル

前節までで、入出力データセットの準備が整った。ここでは、それを用いた予測器として用いたモデルと、そのパラメータ推定について述べる。ある入出力データの組があったとき、それを学習するための手法については、数多く提案されてお

り、現在も活発に研究されている。本研究で用いるデータセットの特徴の一つに入力次元が、今後非常に大きくなりうる点が挙げられる。本稿においては、Cdc42の活性という種類のシグナルにのみ着目しているため、入力次元はそれほど大きくならないが、それでも時空間的な幅を持たせているため、一つのマーカに対する入力次元は、100をこえている。既存の実験技術においても二つ以上のシグナル活性を同時に観測する技術は、すでに存在しており、実験も数多くされている。さらに、その非線形性などを考慮に入れると、入力次元は、指数関数的に増加し、10000を超える入力となることが容易に想像される。生物学的に興味のあるのは、この入力から、どの要素が細胞形態動態に重要な役割を見つけたことである。そのため、将来への応用を考慮に入れるなら、カーネル法やスパース回帰、さらには、カルマンフィルタやパーティクルフィルタといった時系列に強い手法を用いることが本来は望ましい。しかしながら、本稿に用いた実験データは比較的小さく、原始的な手法においても必要十分であり、かつその挙動を把握しやすいことから、今回は、単純な線形モデルを用いた。つまり、上記で用意した入出力データに対し、

$$X = \left( X_{1,49}^0 \quad X_{2,49}^0 \quad \dots \quad X_{1,49}^{3.7} \quad \dots \quad X_{1,49}^{9.9} \quad \dots \quad X_{1,50}^0 \right)^T \quad (27)$$

とした時、モデルを

$$XA = Y \quad (28)$$

とし、 $A$ を求めることによって、その機能同定と動態予測を行うものとする。ここで、 $A$ は、

$$A = X^\dagger Y \quad (29)$$

より直ちに求めることができる。ただし、 $X^\dagger = (X^T X)^{-1} X^T$ であり、ムーア・ペンローズの疑似逆行列である。

### 3.10 結果

以上を持って細胞形態動態の予測の準備が整った。学習データを用いて線形モデルのパラメータを学習し、その結果を用いて実際どの程度形態の予測が可能であったかを述べる。図24において、 $\tau = 1 \sim 6$ それぞれの場合において、予測と実際の伸びの散布図を示す。今回用いたデータセットにおいては、おおよそデータ点

は直線の周りに分布していることが見て取れる． $\tau = 5$ を超えたあたりから，分布が徐々に崩れだしているのが見て取れるが，これだけ長い時間スケールにおいて，形態予測がうまくいっているのは非常に驚きである． $\tau$ の変化に対する，予測性能の変化を定量化するため，各 $\tau$ における予測値と実際の値の相関係数をプロットしたものを図 25 に示す．これらの $\tau = 1 \sim 4$ においては，相関係数の値は 0.8 を大きく超えてほとんど変わらず， $\tau = 5$ を超えたあたりから急激に下がりだしているのが見て取れる．つまり，これはつまり，あるマーカにおけるシグナル活性情報があれば，さらにその先 4 フレーム分，つまり 4 分程度先の細胞形状まで精度よく予測できるであろうことが期待される．

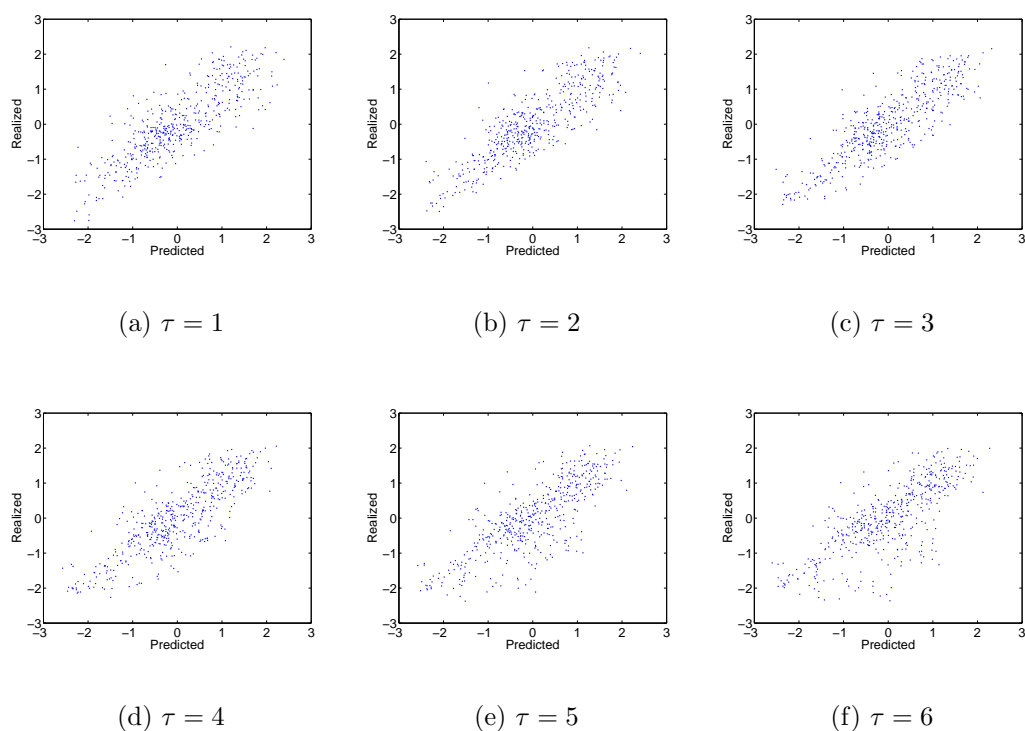


Figure 24 各 $\tau$ に予測値と，現実の伸びの比較．  
横軸が予測された伸びの値，縦軸がその時実際に測定された値．

細胞形態の予測がある程度可能であることがこれらの結果化から示されたが，形態予測が本当にうまくいっているのかは先の図からはわかりづらい．そこで，

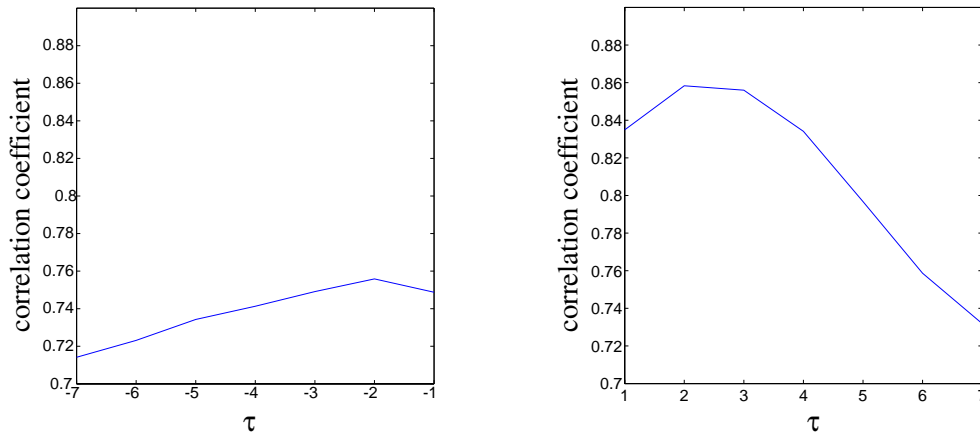


Figure 25 予測するステップ数  $\tau$  に対する予測誤差の変化．横軸に， $\tau$ ，縦軸に予測値と実現値間の相関係数を示す．青，赤，緑線は，それぞれシグナル活性に，PC2/PC1，PC2，YFP/CFP を用いた場合に対応する．

より形態の変化をとらえやすいよう，円周上に実際のマーカーの配置にならった伸びのプロットを行うと直観的な形態変化の様子を  $\tau = 1$  の場合について可視化したものを図 26 に示す．ここで黒線は，伸び縮み 0 の場合を示しており，青線が，実際のデータから定量化した伸び，赤線が予測した時の伸びを示す．この図から，本稿で伸びた手法を用いることによって，ところどころ予測が外れているものの，大まかな細胞形態動態を予測できていることが分かる．図 27 に， $\tau = 6$  の場合について，同様に可視化を行った結果を示す．この図より，一部ずれがあるもののおおむね予測は良好であり，相関係数の下がり具合ほどに形態予測が外れていないことがこれで示された．

先の結果は円周上にマーカーの伸びをプロットした結果で会ったが，実際の細胞形態にその伸びを載せたときの例を図 28 に示す．ここで緑の線は，細胞の輪郭線の初期値を表しており，赤線は，5 フレーム後細胞の輪郭線を示しており，黒の線分が予測した伸びに対応しており，その方向は細胞膜に対して垂直に向いている．この図から，やはり細胞全体の動きの傾向を良くとらえており，右側に移動している様子が良く予測されている．特に，細胞の後ろ側（図左側），および右側（図下側）における縮む動態で，定量的にも良くあっているのに対し，前側（図右側）においては，傾向はあっているものの，比較的まとまって定量的に

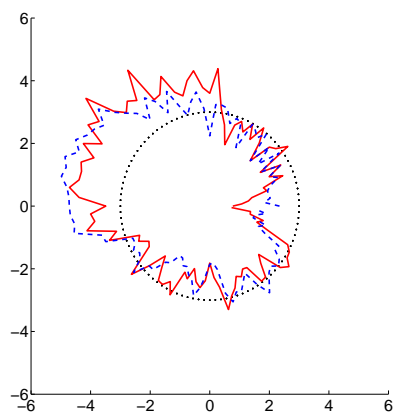


Figure 26  $\tau = 1$  における細胞膜の伸びの円周上における比較．  
赤線，青線，黒線がそれぞれ，予測値，実現値，0 に対応する．

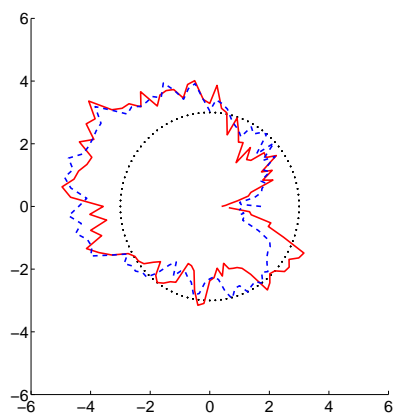


Figure 27  $\tau = 6$  における細胞膜の伸びの円周上における比較．  
赤線，青線，黒線がそれぞれ，予測値，実現値，0 に対応する．



ずれているのが見て取れる．同様に，10 フレーム先における予測結果についても同様に行ったのが，図 29 である．こちらは，6step 先ということもあって，全体的な伸び・縮みにおける誤差が大きくなっている．しかしながら，それ以上にここで問題となるのは，伸びを示す線分が数多く交差している点であろう．これは，定量化においても同様の問題があったように，フレーム間隔が大きすぎるためであり，伸びを垂直方向にのみ仮定するのではなく，何らかの補外方法を導入して，滑らかにその形状を変化させるようなモデルや制約を導入することによって解決すると考えられる．

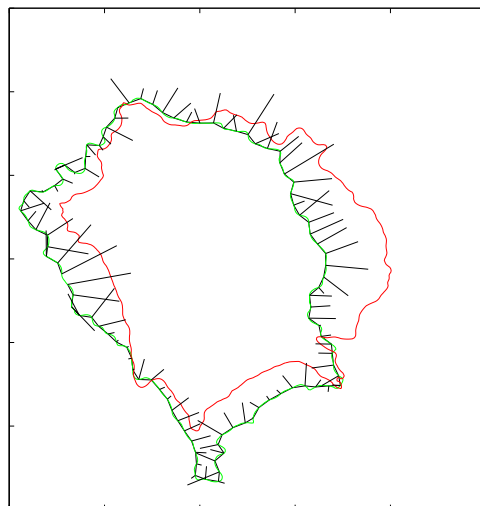


Figure 28 実空間におけるマーカー位置の予測 ( $\tau = 1$ ) .

緑線，赤線は，それぞれ基準となる輪郭線，5 ステップ後の輪郭線を示す．また，黒線は，各マーカーにおける伸びを示しており，緑の輪郭線に対し垂直を向いている．

ここまでは，シグナル活性として第二主成分と第一主成分の比を用いてきた．しかしながら，このシグナル活性が他のシグナル活性と比べた時にどのような違いがあるのかについては，未だ比較を行ったこなかった．そこで，第二主成分そのものや，先行研究において用いられてきた YFP 強度と CFP 強度の比が，第二第一主成分の比に対して，どの程度の予測性能を持っているのかについて検証する．

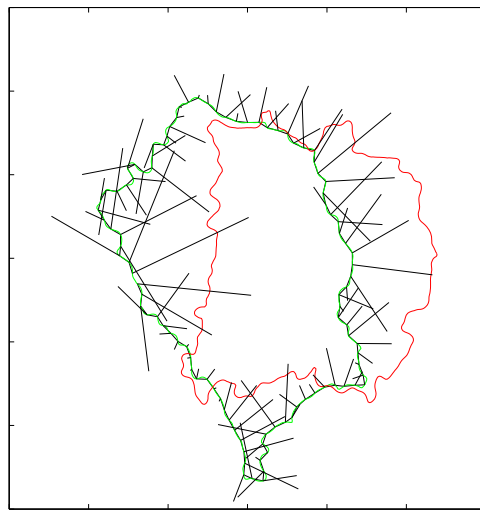


Figure 29 実空間におけるマーカー位置の予測  $\tau = 5$  .  
緑線, 赤線は, それぞれ基準となる輪郭線, 10ステップ後の輪郭線を示す. また,  
黒線は, 各マーカーにおける伸びを示しており, 緑の輪郭線に対し垂直を向いて  
いる.

それぞれのシグナルについて，各  $\tau$  における RMSE(Root Mean Square Error) をプロットしたものを図 30 に示す．比較的近い未来における ( $\tau = 1 \sim 2$ ) 伸びの予測は，本稿において用いてきた主成分の比が最も誤差が少なく，YFP/CFP が最も誤差が大きい．第二主成分は，その中間である．この結果は，本稿において提案したシグナル検出器が，短時間における予測性能を最も高めることができていることを示している．しかしながら，より遠い未来の予測 ( $\tau = 3 \sim 7$ ) における予測性能については，第二主成分が一番性能がよく，逆に主成分比の性能が一番わるくなってしまっている．YFP/CFP 比は，第二主成分そのものの誤差と挙動が良く似ているものの，全体的に誤差が大きく，シグナル検出器としては，余り優秀でないことが見て取れる．シグナルを可視化した動画が第二主成分のそれと比較的よく似ていることから，その誤差も第二主成分と似た挙動をすることが予測されていたが，全体的な性能としては，大きな差が開くこととなった．

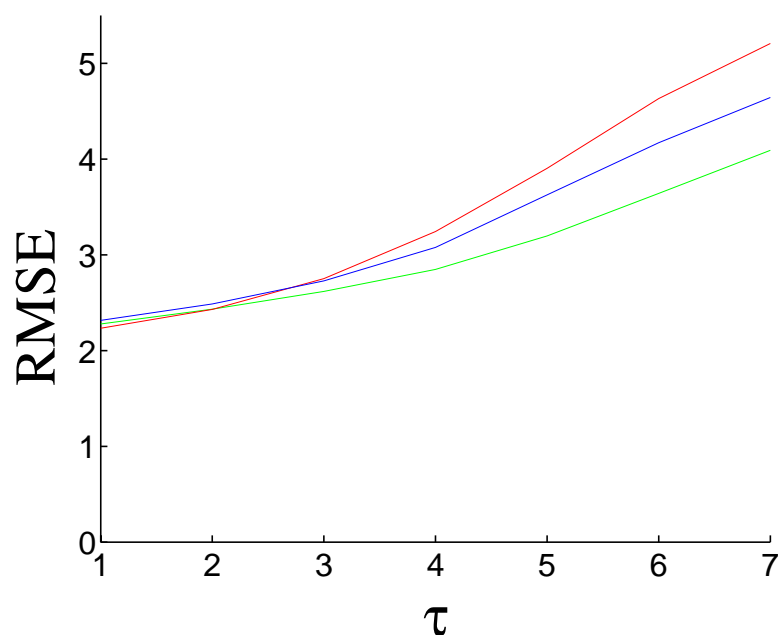


Figure 30 予測するステップ数  $\tau$  に対する予測誤差の変化．横軸に， $\tau$ ，縦軸に RMSE(Root Mean Squared Error) を示す．赤，緑，青線は，それぞれシグナル活性に，PC2/PC1，PC2，YFP/CFP を用いた場合に対応する．

### 3.11 考察

細胞形態変化において、非常に重要な役割を担っているとされる三量体 G タンパクである RhoA, Rac1, Cdc42 のうち、今回は Cdc42 に焦点を絞ってシグナル検出、輪郭線検出、輪郭線補間、伸び・シグナルの定量化、形態予測と順を追って解析を行ってきた。このように細胞形態に着目してそのシステムを同定するためには、数多くのステップを踏む必要があり、研究を進めるのには、非常に煩雑な処理を行い続けなければならない。加えて一つ一つのステップは、それだけで一つの研究テーマとなる程奥が深く、どのような処理が細胞形態変化の追跡に有効なのかは、未だコンセンサスを得るようなものは出現していない。現状としては、研究者自身が手探りで模索しつつ、解析を進めているのが現状と言えよう。

シグナル検出関数は、先行研究において比が用いられてきたが、本研究においては、PCA を CFP, YFP 散布図データに適用することによってより予測誤差の小さいシグナル検出器を設計することができた。しかしながら、PCA 自体もまた非常に基本的なデータ解析手法であり、さらに高度な解析手法を用いることによってより説明能力の高いシグナルを検出することが期待される。特に、ある程度非線形性は、その予測能力を飛躍的に増加させる可能性があるため今後は是非検証すべき要素である。より一般的には、YFP, CFP それぞれの時空間的な特徴量を引数とするシグナル検出器の設計が求められる。

輪郭線検出は、設定した値の等高線を輪郭線としたが、実際にはそれだけでは数多くの問題が発生する。そのうちの一つは、閾値にふさわしいであろう値が場所ごとによって違うという点である (図 31)。すなわち、単なる閾値処理のみでは、輪郭線が細胞から離れてしまったり、逆に内側にめり込む形で引かれてしまう。このような問題を解決する方法の一つは、画像に対して何らかのエネルギー関数を導入し、それを最小化するような輪郭線を求めることである。エネルギー関数の候補としては、輪郭線内外それぞれの領域における画素の分散、輪郭線の曲率、画像の微分、およびその絶対値といったものが挙げられる。このようなエネルギー関数を用いることで、画素強度の異なる場所においても輪郭線を上手く検出できることが期待される。

本稿において細胞膜上の伸びの定量化は、補間は、レベルセット法、ならびに提案手法を用いた後に、推薦方向の伸びを計算することによって行ってきたが、これ以外にも、数多くの手法が提案されている。もっとも単純なものは、画像間の差分であろう。時刻  $T$  における二値化画像  $I(T)$  に対して、 $I(T+1) - I(T)$ 、もしくは、 $I(T+1) - I(T-1)$  を計算し、正の値を取る場所をのびた部分、逆に

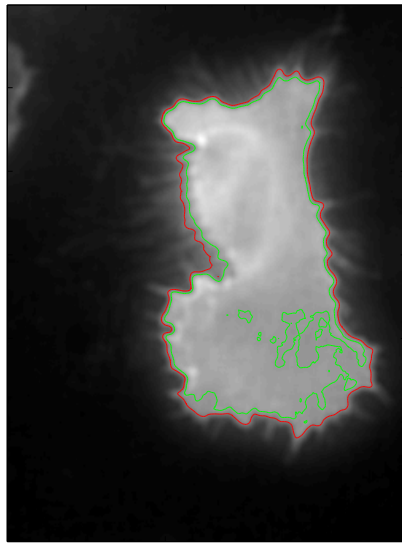


Figure 31 単純な閾値処理における問題．  
二本の線は異なる閾値を用いて輪郭線検出を行った結果を示す．赤線，緑線はそれぞれ，閾値が 500，450 の場合である．

負の値を取る場所を縮んだ部分として定義することによって形態変化を定量化する。この手法は非常に簡単に計算できる利点があるものの、実際に細胞膜が伸びの定量化を行っているわけではないので、その速度の定義などが難しいという欠点がある。キモグラフは、画像のある線分上の動きのみを追跡する手法であり、比較的小さな動きに対しては、有効な手法となりうるが、細胞移動のような大きく動く画像においては、固定した線分に意味はない。細胞膜上におけるマーカー追跡において、マーカー間隔がマーカー追跡をするにつれて不等間隔になってしまうという欠点がある。本稿においては、その一つの解決策を提案したが、先行研究においてもこの問題には言及されており、いくつかの解決策を提案している。Danuserらは、細胞膜の機械力学的モデルをベースとした手法を提案しており、マーカー間に反発力を置くことによってその間隔が変化することを防いでいる。また、Tsukadaらは、マーカー間の間隔を監視しながら追跡を行い、間隔が空きすぎた場合にマーカーを追加、逆に狭くなりすぎた場合にマーカーを除去するという操作を自然な形で行うことによって、常にマーカー間隔がある範囲内に収まるようなアルゴリズムを開発している。また、膜の動きが活発なところと動かないところが陽に存在するような系であれば、動かない場所を基準に上手く、サンプル窓を設定することができる。このように、数多くの伸びの定量化手法が存在するが、実験ごとにみあった手法を選択するのが現状において最も良い選択であるように思われる。このため、より数多くの系に適用できるような動きの定量化手法の開発は、今後解決すべき大きな問題の一つである。

## 4. 結論と今後の課題

### 4.1 結果のまとめ

本研究は、発生過程を始めとする多細胞系細胞移動のより現実的なシミュレーションを行うための手法の開発に重きをおいて進めてきた。そのために、まず、第二章において細胞集団移動におけるモード形成のメカニズムに着目し、多細胞系の細胞移動シミュレーションを行うためのモデル構築について考察した。これによって多細胞系における移動という従来焦点が余り当たっていなかった分野におけるシミュレーションを行うことができた。また、この結果から、細胞集団移動におけるノイズの役割の重要性を示すことができた。また、そのメカニズムを明らかにするためのデータ解析手法を新たに提案し、実際に用いることでノイズが実効的な移動細胞の体積の増加と、移動経路のメモリ消去という二つの効果について明らかにすることができた。また、細胞移動速度が物理パラメータにどのように依存するのかについても知ることができた。

第三章においては、そのようなモデルをより現実的にするために、細胞動画からのその形態動態を同定した。そのために、まず FRET 動画からシグナルを検出するための手法を新たに開発した。また、それを基に細胞の輪郭線を導出した。そして、その輪郭線の動きを追跡することによって細胞の動きの定量化を行った。そして、その輪郭線周辺のシグナル活性を同時に定量化した。定量化したシグナル活性を入力とし、その後の伸びを出力とする線形モデルを仮定し、そのパラメータを導出することによってシステムの同定を行った。また、導出したパラメータを用いて、細胞動態の予測をすることによってその妥当性を示すことができた。

### 4.2 今後の課題

本研究において、細胞動態の予測にはある程度成功したものの、実際のマーカーのダイナミクスモデルの導入をしていないため、非常にラフなものになってしまっている。また、モデルの導入は、多細胞システムへの応用を見据えると、必要不可欠であり、モデルベースで細胞の動きの予測を行うことは必須である。将来的に導入するモデルは、細胞の膜の動きのみではなく、細胞内に存在するシグナル伝達系やその周辺に関しても含まれるべきであり、そうすることによってより分子生物学的な理解を計算機シミュレーションから進めることが可能になる。

細胞同士のインタラクションのより現実的なモデル化も同様に必須である。細

胞同士のインタラクションは、つまりマーカー間のダイナミクスに対応するが、細胞に乗っている数多くのマーカー同士の全ての組み合わせを考慮すると、莫大な計算量となってしまう、何らかの方法で計算量を抑え込む技術を開発することが必要である。

本研究においては、非常に単純なモデルを用いた多細胞シミュレーションで会ったため、計算量はそこまで大きくなり、一台の計算機で十分に計算を行うことができた。しかしながら、今後より現実的なモデルを用いたシミュレーションを行う際には、上で述べた計算量の問題も含め、その計算量は一台の計算機が賄える量ではなくなっているであろう。このことから、複数の計算機を用いた効率的な並列化手法の開発も必要になってくることが予想される。



## 謝辞

大学院における研究生生活は、私の要領の悪さから、多くの人たちにずいぶんと御迷惑をかけ続け、また、自分自身の研究も遅々として進まないことが幾度となくありました。それでも、無事学生生活を終えることができたのは、ひとえに多くの有能な指導者が私を助けていただけたからです。全ての方に謝意を述べたいところではありますが、特にお世話になった方々にそれを伝えようと思います。

京都大学の石井信教授に、感謝します。私が博士課程2年の終わりに奈良先端外の職を辞し、京都大学に移ってしまわれましたが、その後も変わらず御指導、御鞭撻いただきました。特に拙文である論文を校正していただいたときや、ミーティングにおいてその豊富な研究のアイデアを披露された時などには、非常に驚愕、感動した覚えがあります。各方面におけるその能力の高さは、私の理想であり、目標でもあります。まだまだ、未熟な自分はその背中を追い続けたいと思います。

池田和司教授に、感謝します。博士課程後半からの短い期間ではございましたが、今となって思えば、ずいぶんとお世話になりました。また、何につけても要領の悪い私は、そのおかげでずいぶんと御迷惑をおかけも致しました。

バイオサイエンス研究科の作村諭一准教授に感謝します。作村先生とは、修士課程から博士課程を通じ、研究等の指導だけではなく、様々な面を通して研究生生活を支えてくださいました。また、SNSS等のイベントのお手伝いを通して、研究以外での数多くの経験をさせていただきました。

京都大学の本田直樹博士研究員に感謝します。私が修士課程に入学したころ、本田さんは、奈良先端大における博士課程の学生でありましたが、そのころから、数多くの御指導をいただきました。特に生物学の知識と、それを理論的研究にどう結び付けるかを話し合う時には、常に大きな驚きと感動がありました。本研究の多細胞移動パートは本田博士なくしては、あり得ない研究でした。間違いなく、私の研究の下地を大きく基礎づけていただきました。また、研究生生活全般においても、その経験から様々な面において私の研究生生活をサポートしていただきました。

FRET画像解析においては、数多くの人たちの協力のもとでなくば成り立たなかったでしょう。東京理科大学の中村岳史教授とそのグループの方がたには実験データを提供していただきました。私の先輩であり関連テーマについて研究をされていた名古屋大学の塚田祐基助教には、相談にも乗っていただくなど、数多くのサポートをいただきました。

五十嵐康伸，今基織の両博士に感謝します。最早，研究者を辞されてはしまいましたが，それでもなお，多大な御助力をいただきました。特に五十嵐博士には，自らの研究における資料の一部を提供いただきました。また，今博士には，数多くの相談に乗っていただき，また，研究者生活についてのあり方を示唆していただきました。

数多くの石井研究室のスタッフ・学生たちにも，研究面・生活面で数多く助けられてきました。特に計算機のトラブルなどについては，行縄直人博士研究員に数多くの御助力をいただきました。

最後に両親に感謝します。思えば長い時間，半ば私がわがままを押し通す形で博士課程に進んだ後も，不肖の息子にずいぶん心配をしたこと，一度や二度ではなかったと思います。それでもなお，暖かく見守り続けてくれた両親に，心より感謝の意を表したいと思います。ありがとうございました。

## 参考文献

- [1] François Graner and James A. Glazier. Simulation of biological cell sorting using a two-dimensional extended potts model. *Physical Review Letters*, 69(13):2013–2016, 1992.
- [2] M. J. Simpson, D. C. Zhang, M. Mariani, K. A. Landman, and D. F. Newgreen. Cell proliferation drives neural crest cell invasion of the intestine. *Dev Biol*, 302(2):553–68, 2007.
- [3] P. M. Kulesa, J. M. Teddy, D. A. Stark, S. E. Smith, and R. McLennan. Neural crest invasion is a spatially-ordered progression into the head with higher cell proliferation at the migratory front as revealed by the photoactivatable protein, KikGR. *Dev Biol*, 316(2):275–87, 2008.
- [4] E. Palsson and H. G. Othmer. A model for individual and collective cell movement in dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(19):10448–53, 2000.
- [5] A.J. Ridley, H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. The small gtp-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70(3):401–410, 1992.
- [6] A.J. Ridley and A. Hall. The small gtp-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70(3):389–399, 1992.
- [7] C.D. Nobes and A. Hall. Rho, rac, and cdc42 gtpases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81(1):53–62, 1995.
- [8] T. Förster. Intermolecular energy transference and fluorescence. *Ann Physik*, 2:55–75, 1948.
- [9] M. Machacek and G. Danuser. Morphodynamic profiling of protrusion phenotypes. *Biophysical journal*, 90(4):1439, 2006.

- [10] M. Machacek, L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, G.L. Johnson, K.M. Hahn, and G. Danuser. Coordination of rho gtpase activities during cell protrusion. *Nature*, 461(7260):99–103, 2009.
- [11] Y. Tsukada, K. Aoki, T. Nakamura, Y. Sakumura, M. Matsuda, and S. Ishii. Quantification of local morphodynamics and local gtpase activity by edge evolution tracking. *PLoS computational biology*, 4(11):e1000223, 2008.
- [12] D. Y. Shao, W. J. Rappel, and H. Levine. Computational model for cell morphodynamics. *Physical Review Letters*, 105(10):108104, 2010.
- [13] L. Yang, J. Effler, B. Kutscher, S. Sullivan, D. Robinson, and P. Iglesias. Modeling cellular deformations using the level set formalism. *BMC systems biology*, 2(1):68, 2008.
- [14] S. Nonaka, H. Naoki, and S. Ishii. A multiphysical model of cell migration integrating reaction-diffusion, membrane and cytoskeleton. *Neural Networks*, 2011.
- [15] C. Klambt. Modes and regulation of glial migration in vertebrates and invertebrates. *Nat Rev Neurosci*, 10(11):769–79, 2009.
- [16] H. Naoki, Y. Sakumura, and S. Ishii. Stochastic control of spontaneous signal generation for gradient sensing in chemotaxis. *J Theor Biol*, 255(2):259–66, 2008.
- [17] M. Ueda and T. Shibata. Stochastic signal processing and transduction in chemotactic response of eukaryotic cells. *Biophys J*, 93(1):11–20, 2007.
- [18] H. Naoki, S. Nakamura, K. Kaibuchi, and S. Ishii. Flexible search for single-axon morphology during neuronal spontaneous polarization. *Plos One*, 6(4):e19034, 2011.
- [19] P. Friedl and K. Wolf. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*, 188(1):11–9, 2010.
- [20] C. Arriemerlou and T. Meyer. A local coupling model and compass parameter for eukaryotic chemotaxis. *Dev Cell*, 8(2):215–27, 2005.

- [21] R. McLennan and P. M. Kulesa. In vivo analysis reveals a critical role for neuropilin-1 in cranial neural crest cell migration in chick. *Dev Biol*, 301(1):227–39, 2007.
- [22] C. Lois, J. M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla. Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 271(5251):978–81, 1996.
- [23] J. P. Thiery. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2(6):442–54, 2002.
- [24] Y. Hegerfeldt, M. Tusch, E. B. Brocker, and P. Friedl. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res*, 62(7):2125–30, 2002.
- [25] K. Wolf, Y. I. Wu, Y. Liu, J. Geiger, E. Tam, C. Overall, M. S. Stack, and P. Friedl. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*, 9(8):893–904, 2007.
- [26] P. Friedl and D. Gilmour. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(7):445–57, 2009.
- [27] C. T. Lim, E. H. Zhou, and S. T. Quek. Mechanical models for living cells—a review. *Journal of Biomechanics*, 39(2):195–216, 2006.
- [28] L. Ji, J. Lim, and G. Danuser. Fluctuations of intracellular forces during cell protrusion. *Nature Cell Biology*, 10(12):1393–U38, 2008.
- [29] P. Dieterich, R. Klages, R. Preuss, and A. Schwab. Anomalous dynamics of cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2):459–463, 2008.
- [30] H. M. Young, A. J. Bergner, R. B. Anderson, H. Enomoto, J. Milbrandt, D. F. Newgreen, and P. M. Whittington. Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev Biol*, 270(2):455–73, 2004.
- [31] M. Frojmovic, K. Longmire, and T. G. van de Ven. Long-range interactions in mammalian platelet aggregation. ii. the role of platelet pseudopod number and length. *Biophys J*, 58(2):309–18, 1990.

- [32] B. J. Eickholt, S. L. Mackenzie, A. Graham, F. S. Walsh, and P. Doherty. Evidence for collapsin-1 functioning in the control of neural crest migration in both trunk and hindbrain regions. *Development*, 126(10):2181–9, 1999.
- [33] H. Honda. Description of cellular patterns by dirichlet domains: the two-dimensional case. *J Theor Biol*, 72(3):523–43, 1978.
- [34] J.D. Murray. *Mathematical Biology: Spatial models and biomedical applications*, volume 2. Springer, 2008.
- [35] Y. Morishita and Y. Iwasa. Growth based morphogenesis of vertebrate limb bud. *Bull Math Biol*, 70(7):1957–78, 2008.
- [36] J. S. Lowengrub, A. Ratz, and A. Voigt. Phase-field modeling of the dynamics of multicomponent vesicles: Spinodal decomposition, coarsening, budding, and fission. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 79(3 Pt 1):031926, 2009.
- [37] C. Carmona-Fontaine, H. K. Matthews, S. Kuriyama, M. Moreno, G. A. Dunn, M. Parsons, C. D. Stern, and R. Mayor. Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature*, 456(7224):957–61, 2008.
- [38] S. G. Megason and A. P. McMahon. A mitogen gradient of dorsal midline wnts organizes growth in the cns. *Development*, 129(9):2087–2098, 2002.
- [39] C. Schmidt, I. M. McGonnell, S. Allen, A. Otto, and K. Patel. Wnt6 controls amniote neural crest induction through the non-canonical signaling pathway. *Dev Dyn*, 236(9):2502–11, 2007.
- [40] T. Burstyn-Cohen, J. Stanleigh, D. Sela-Donofeld, and C. Kalcheim. Canonical wnt activity regulates trunk neural crest delamination linking bmp/noggin signaling with g1/s transition. *Development*, 131(21):5327–39, 2004.
- [41] J. Toner and Y. H. Tu. Flocks, herds, and schools: A quantitative theory of flocking. *Physical Review E*, 58(4):4828–4858, 1998.

- [42] K. Nishinari, D. Chowdhury, and A. Schadschneider. Cluster formation and anomalous fundamental diagram in an ant-trail model. *Physical Review E*, 67(3):036120, 2003. Part 2 663TB Times Cited:25 Cited References Count:33.
- [43] I. D. Couzin and N. R. Franks. Self-organized lane formation and optimized traffic flow in army ants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 270(1511):139–146, 2003.
- [44] T. Nagatani. The physics of traffic jams. *Reports on Progress in Physics*, 65(9):1331–1386, 2002.
- [45] J. Dzubiella, G. P. Hoffmann, and H. Lowen. Lane formation in colloidal mixtures driven by an external field. *Physical Review E*, 65(2):021402, 2002.
- [46] E. Raz and M. Reichman-Fried. Attraction rules: germ cell migration in zebrafish. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(4):355–359, 2006.
- [47] C.M. Waterman-Storer, R.A. Worthylake, B.P. Liu, K. Burridge, ED Salmon, et al. Microtubule growth activates rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat. Cell Biol*, 1(1):45–50, 1999.
- [48] B. Hinz, W. Alt, C. Johnen, V. Herzog, and H.W. Kaiser. Quantifying lamella dynamics of cultured cells by saced, a new computer-assisted motion analysis. *Experimental cell research*, 251(1):234–243, 1999.

## 付録

### A. モデルの無次元化

式(1-5)において記述された多細胞系細胞移動モデルは，全ての  $i$  に対して  $R_i = R$  とすることによって以下のように無次元化することができる．

$$\frac{d\left(\frac{1}{R}\mathbf{r}_i\right)}{d\left(\frac{F_m}{\mu R}t\right)} = \sum_{j \in \mathcal{N}_i} \mathbf{F}'_{\text{rep}_{ij}} + \sum_{j \in \mathcal{M}_i} \mathbf{F}'_{\text{mig}_{ij}} + \mathbf{F}'_{\text{flu}_i} \quad (30)$$

$$\mathbf{F}'_{\text{rep}_{ij}} = \frac{kR}{F_m} \left\{ 2 - \left\| \frac{\mathbf{r}_i}{R} - \frac{\mathbf{r}_j}{R} \right\| \right\} \frac{\mathbf{r}_i/R - \mathbf{r}_j/R}{\|\mathbf{r}_i/R - \mathbf{r}_j/R\|} \quad (31)$$

$$\mathbf{F}'_{\text{mig}_{ij}} = \begin{pmatrix} F_{\text{mig}_x} \\ F_{\text{mig}_y} \end{pmatrix} = s(i) \begin{pmatrix} \frac{\|\Delta y_{ij}/R\|}{\|\mathbf{r}_i/R - \mathbf{r}_j/R\|} \\ -\frac{\|\Delta y_{ij}/R\|}{\Delta y_{ij}/R} \frac{\Delta x_{ij}/R}{\|\mathbf{r}_i/R - \mathbf{r}_j/R\|} \end{pmatrix} \quad (32)$$

$$\mathbf{F}'_{\text{flu}_i} = \frac{\sigma_i}{F_m} \begin{pmatrix} \xi_{xi} \\ \xi_{yi} \end{pmatrix} \quad (33)$$

$$s(i) = \begin{cases} 1 & \text{if cell } i \text{ is migratory} \\ -1 & \text{if cell } i \text{ is non-migratory} \end{cases}. \quad (34)$$

ここで無次元変数を，以下のように定義した． $\mathbf{r}' = \frac{\mathbf{r}}{R}$ ， $t' = \frac{F_m}{\mu R}t$ ， $k' = \frac{kR}{F_m}$ ， $\sigma'_i = \frac{\sigma_i}{F_m}$ ．この無次元化を行うことによって自由パラメータは， $k'$  および，移動性，非移動性細胞それぞれに対する  $\sigma'_i$  の三つに削減することができる．

同様に，細胞接着力についても以下のように無次元化できる．

$$\mathbf{F}'_{\text{adh}_{ij}} = -\frac{aR}{F_m} \left\{ \frac{L}{R} + 2 - \left\| \frac{\mathbf{r}_i}{R} - \frac{\mathbf{r}_j}{R} \right\| \right\} \frac{\mathbf{r}_i/R - \mathbf{r}_j/R}{\|\mathbf{r}_i/R - \mathbf{r}_j/R\|}. \quad (35)$$

ここで， $a' = \frac{aR}{F_m}$  および  $L' = \frac{L}{R}$  である．

### B. 二体細胞間の実効的ダイナミクスの同定

ここでは，式(7)で定義される．実効的ポテンシャル  $U$  の推定を行う手法について述べる．各サンプルポイントにおいてノンパラメトリックな推定を行うことによって推定は可能であるが，連続的なモデルを導入することによってより滑ら



かな形で，ポテンシャル関数を推定することが期待される．そこでポテンシャル  $U$  を，多項式で以下のようにモデル化する．

$$U(x, y) = \sum_{i,j} a_{ij} x^i y^j, \quad (36)$$

ここで  $a_{ij}$  は， $x^i y^j$  に対するパラメータであり， $\mathbf{x} = (x, y)^T$  は，二次元平面上の相対的な位置座標である． $a_{00}$  は，求めたいダイナミクスに対してなんら影響を及ぼさないので，ここでは，単純に 0 と設定した．これらを用いることによって移動細胞間の相対速度は，

$$v_x = -\frac{\partial U}{\partial x} = a_{10} + 2a_{20}x + a_{11}y + \dots \quad (37)$$

$$v_y = -\frac{\partial U}{\partial y} = a_{01} + a_{11}x + a_{02}y + \dots \quad (38)$$

と書き表すことができる．これらの係数は，シミュレーションから求めた速度場を用いて (図 7(D))，最小二乗法から，

$$\begin{pmatrix} a_{10} \\ a_{01} \\ a_{20} \\ a_{11} \\ \vdots \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} 1 & 0 & 2x_1 & y_1 & \dots \\ 0 & 1 & 0 & x_1 & \dots \\ 1 & 0 & 2x_2 & y_2 & \dots \\ 0 & 1 & 0 & x_2 & \dots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{pmatrix}^\dagger \begin{pmatrix} v_{x1} \\ v_{y1} \\ v_{x2} \\ v_{y2} \\ \vdots \end{pmatrix}, \quad (39)$$

のように求めることができる．ここで， $\dagger$  は，ムーア・ペンローズの疑似逆行列を示している．

実効的ノイズ強度についても同様に推定することができる．ここでは，特に細胞集団移動の協調性に重要であると思われる． $\sigma_y$  に着目する． $\sigma_y$  は，サンプルされた速度ベクトル  $v_{yi}$  とその期待値  $-\partial U_{\text{est}}/\partial y_i$  との平均二乗誤差である．位置変数に対して滑らかな形で推定したいため，先ほど同様多項式フィッティング：

$$\sigma_y^2(x, y) = \sum_{i,j} b_{ij} x^i y^j, \quad (40)$$

から推定を行う．係数  $b_{ij}$  についても先ほど同様，シミュレーションサンプルか

らの最小二乗法より以下のように求まる .

$$\begin{pmatrix} b_{00} \\ b_{10} \\ b_{01} \\ b_{20} \\ b_{11} \\ \vdots \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & x_1 & y_1 & x_1^2 & x_1 y_1 & \dots \\ 1 & x_2 & y_2 & x_2^2 & x_2 y_2 & \dots \\ 1 & x_3 & y_3 & x_3^2 & x_3 y_3 & \dots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{pmatrix}^\dagger \begin{pmatrix} \left\| v_{y1} - \left( -\frac{\partial U_{\text{est}}}{\partial y_1} \right) \right\|^2 \\ \left\| v_{y2} - \left( -\frac{\partial U_{\text{est}}}{\partial y_2} \right) \right\|^2 \\ \left\| v_{y3} - \left( -\frac{\partial U_{\text{est}}}{\partial y_3} \right) \right\|^2 \\ \vdots \end{pmatrix}. \quad (41)$$

## 業績リスト

### 査読付学術論文

1. Yamao M, Naoki H, Ishii S, Multi-Cellular Logistics of Collective Cell Migration, PLoS ONE, 6(12): e27950, (2011)
2. Kim W, Matsui T, Yamao M, Ishibashi M, Tamada K, Takumi T, Kohno K, Oba S, Ishii S, Sakumura Y, and Bessho Y, The period of the somite segmentation clock is sensitive to Notch activity, *Mol. Biol. Cell*, 22:18 3541-3549, 2011.

### 査読付国際会議発表

1. Masataka Yamao, Honda Naoki, Shin Ishii, Noise-Induced Collective Migration for Neural Crest Cells, International Conference on Artificial Neural Networks 2010,
2. Masataka Yamao, Honda Naoki, Shin Ishii, Model Simulation for Multicellular Migration, International Conference on Systems Biology 2010

### その他

1. 山尾将隆, 本田直樹, 作村諭一, 石井 信. 多細胞系における確率的揺らぎによる細胞遊走能力の向上, 第 18 回日本数理生物学会大会, p128, 2007.
2. 河野(金兒)貴子, 本田直樹, 塚田祐基, 山尾将隆, 作村諭一, 石井信, Rho/Rho-kinase によるミオシンの動的リン酸化制御システム, 第 31 回日本分子生物学会年会, 2008.
3. 伊坂弥花子, 山尾将隆, 作村諭一, 金雄, 松井貴輝, 別所康全, 石井信, 脊椎動物の発達過程における分節時計の分子システム, NLP2008-163, 71-76, 2009.