

博士論文

細胞の形状を考慮した牽引力推定

Traction force estimation by introducing cell shape prior

藤川 良祐

奈良先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科

データサイエンスプログラム

主指導教員：作村 諭一 教授

データ駆動型生物学研究室（バイオサイエンス領域）

令和 5年 1月 16日提出

目次

目次.....	2
緒言.....	4
研究の背景.....	4
既知の問題点.....	4
解決策.....	5
第1章.....	6
序論.....	6
方法.....	10
ベイズ推定の枠組みによる牽引力推定.....	10
基質変形の尤度.....	10
牽引力の事前確率分布.....	11
Step 1 細胞全域依存の大きさと方向の設計。.....	11
Step 2 局所性依存性の導入.....	14
牽引力の事後分布と推定.....	15
人工データ生成.....	15
性能評価指標.....	18
実測データ.....	19
画像解析.....	20
結果.....	21
力推定はアルゴリズムとビーズ位置に依存する.....	21
力推定精度の統計的評価.....	23
TFM 画像を用いた力推定比較.....	25
考察.....	28
MCF による牽引力の事前分布.....	28
ベイズアプローチ、ビーズ位置の計測の問題.....	28
他の手法の問題点、比較.....	29
今後の展開.....	29
補足資料.....	30
提案手法の技術的内容の補足.....	30
Level Set Method を用いた力の方向の設計.....	30
EM アルゴリズム.....	30
定量化とベイズ推定のソフトウェア.....	32
補足資料の図.....	32
第2章.....	37
序論.....	37
背景.....	37

不明な点と解決策	38
研究の目的	39
研究の意義	39
材料と方法	40
生物学的知見.....	40
軸索ガイダンス分子 Laminin と L1-CAM.....	40
細胞移動のための力の発生源と分子「クラッチ」の概念.....	41
膜張力の重要性.....	41
L1-CAM の流動と F アクチンのレトログレードフロー	41
数理モデル	42
数理モデルの概要.....	42
広義の摩擦力の意味	44
数理モデルの表式.....	44
パラメータの同定方法	45
結果.....	46
ポリリジン上の分子の流動速度と牽引力を再現するパラメータの同定.....	46
Laminin 上の分子の流動速度と牽引力を再現するパラメータの同定	46
考察.....	48
数理モデルの妥当性.....	48
本研究の問題点.....	48
今後の展開.....	49
結言.....	50
謝辞.....	51
Reference.....	52

緒言

研究の背景

細胞は機械的力（以降は「力」）を使って移動や変形を行う。例えば、アメーバのように動き回る細胞には共通して、細胞外のリガンド物質の濃度勾配を検出して、特定の方向を向いた運動が誘起される特性が見られる。この特性は走化性の細胞遊走として知られ、キイロタマホコリカビが同種の細胞が出す cAMP を検知して集合したり、好中球が最近の出すペプチドなどを感知して感染源に向かって移動したりするといった、様々な生命現象にとって本質的な物理過程となっている。走化性に関わる拡散性の化学物質の他にも、様々な細胞外シグナルが、細胞の方向性を持った運動を誘起する。細胞外基質に存在する接着因子に沿った運動（走触性）や、硬い基質あるいはやわらかい基質に向かう運動（走硬性）なども、よく知られている。これらの細胞外シグナルを検知するセンサーの実体は次々と同定されているが、細胞が受け取ったシグナルから進むべき方向を決定し、必要な力を出して運動するメカニズムは良く分かっていない。その理由は、

- 細胞外シグナルは、生化学反応経路に加え、細胞骨格や細胞外基質の力学的相互作用によって、力に変換される。
- 細胞は容易に変形する、やわらかい物体であるため、細胞の移動方向は局所的に生じた力を合算した向きとは異なる。
- 細胞の移動方向の決定プロセスは、完全に正確ではないため、実験による細胞の運動を観察すると、誤った方向に移動するケースもみられる。

以上3点の困難に対処し、細胞走性メカニズムの理解を進めるためには、細胞の形状や、機械的な特性、生体分子の量や出す力といった様々な物理量の、時 - 空間的な変動とばらつきを詳細に定量する方法が必要である。そこで、近年は、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy; AFM)¹ を用いた細胞の機械的な性質の測定や、細胞が出す力を計測する方法 (Traction Force Microscopy; TFM など)^{2,3} が発達してきた。また、細胞走性のメカニズムを明らかにするための別のアプローチとして、数理モデリングによる研究⁴⁻⁷ も盛んに行われてきた。

既知の問題点

しかし、細胞の機械的な特性や、出す力などを計測する方法は、いずれも手法にも、その精度や、コストといった点で改善の余地がある。そのため、完全に正確な測定技術は確立していない。特に、細胞が出す力を直接観測する方法はないため、細胞の力

が作用した結果として生じる、基質の変形から力を推定する必要がある。力推定の方法の一つである TFM では、基質表面に蛍光ビーズをランダムに配置し、細胞の牽引力による基質の歪みを部分的に観測するとともに、それらを数理的解析により力に変換する⁸。しかし、これまでの推定法は生物学ではない、他の分野から輸入した最適化アルゴリズムの応用であり、生物学的知見を反映してこなかった。そのため、力推定の精度を向上させるための方法としては、ビーズの密度を高くするか、高分解能の顕微鏡を用いるほかになかった。しかし、細胞の一部の構造体が出す力の推定などでは、相対的に利用できるビーズの数が限られてしまう。そのため低密度なビーズで精度の良い力推定も必要である。

また、近年の数理モデリングによる研究によって、細胞の移動方向決定の仕組みをモデリングするために、細胞内部の分子の動態や、シグナル伝達のみならず、細胞の膜張力や牽引力、分子間の力学的相互作用の重要性が指摘されてきた⁹⁻¹¹。ゆえに、測定技術の限界は、そのまま定量的な数理モデルの構築の可能性を限定する。

解決策

本研究では、細胞の形状を事前知識として導入したベイズ力推定法を提案し、先行研究の手法では十分な精度が得にくいとされた、ビーズが少ない場合において有効であることを示した。また、神経軸索の成長円錐が、F アクチンのレトログレードフローから推進力を取り出す仕組みをモデリングした。特に、ポリリジンと Laminin の上で移動する成長円錐のパラメータの値を比較することで、神経成長円錐が細胞外基質の接着因子を認識して、大きな力を出すために、接着分子と細胞外基質の結合のみならず、クラッチと F アクチンとの結合も強まる可能性があることを示した。

第1章

序論

変形や移動といった細胞運動は生命機能にとって不可欠な物理過程である。細胞運動を理解することは、がんの浸潤^{12,13}や、免疫応答^{14,15}、神経の回路網形成¹⁶⁻¹⁹の原理解明に役立つ。先行研究は牽引力を計測する様々な方法を開発してきた²⁰⁻²³。主な方法の1つは弾性マイクロピラーデバイスを用いるもので、そこではピラーがヘアブラシのように並んでいる。細胞はピラー先端で運動してピラーをたわませるので、それから細胞の力が推定できる²⁴。ピラーの先端が2Dで配列した環境は連続的な細胞基質とは異なるため、推定精度に議論が残る^{24,25}。もう一つの手法は、基質の変形を定量し、力発生を検出する。Harrisらは、シリコン薄膜上で細胞を培養し、シリコン薄膜に出来るしわを観察した^{26,27}。近年では、細胞が取りつきにくく、また、製作条件を変えて硬さを変えることが出来ないという、シリコン薄膜の難点を克服した、ポリアクリルアミドゲルが用いられている。力検出のための特殊なポリアクリルアミドゲルを用いた方法は、Traction force microscopy (TFM) と呼ばれている。弾性基質表面に蛍光ビーズが分布しており、TFMは細胞の力で変形した基質をビーズの変位として観測する(図1A)。ビーズ変位は複数の力の荷重和で数学的に記述されるので²⁸、先行研究は、逆算によりビーズの変位から細胞の力を推定してきた⁸。ほとんどの場合で、ビーズ変位の観測数は推定対象の力点の数よりも少ない。未知変数(力)の数より式(ビーズ変位)の数が少ないため、力の連立一次方程式を解くことができない

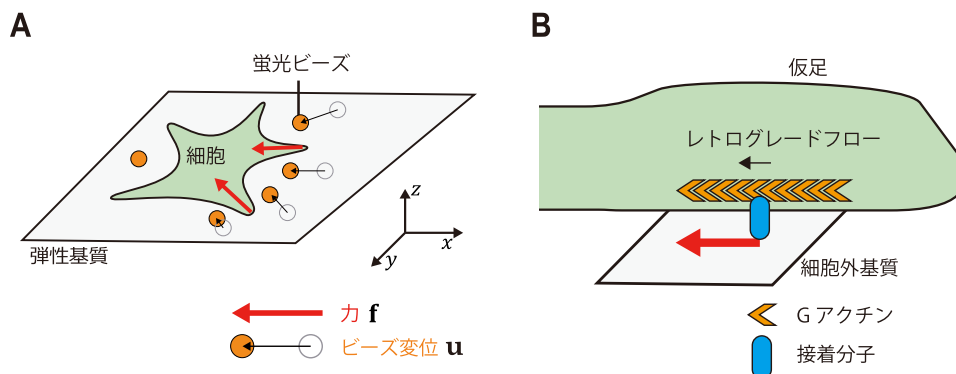


図1 Traction Force Microscopy (TFM) の概念図と、F アクチンのレトログレードフローが力を出すメカニズム。(A) 細胞(緑)が基質に牽引力(赤線矢印)を発生すると、基質表層の蛍光ビーズが変位する(黒線矢印)。TFMはビーズの変位から細胞が生む牽引力を逆に推定する。(B) 細胞の力の主な発生方法。細胞エッジでアクチン分子が重合してアクチンフィラメントを形成し膜を押し出す。その反作用力はアクチンフィラメントを細胞内部方向への逆行流(黒矢印)の原因の1つである。アクチンフィラメントと細胞外基質との接着分子による機械的接続により、逆行流が牽引力(赤矢印)を発生する。

い。この問題を解くため、先行研究は実験技術と力推定アルゴリズムを発展させてきた。しかし、未だ推定精度の改善の余地がある。

実験的な改良の1つは、細胞骨格線維と focal adhesion を計測し細胞の力推定に利用することである^{2,29}。線維芽細胞などの大きな細胞は、インテグリンと基質の機械的リンクにより強力な力を生み出す。ゆえに細胞骨格線維と focal adhesion の観察は力を推定するのに役立つ。神経成長円錐や免疫細胞などの小さな運動性の細胞は異なる方法で力を生んでいる。それらは主にエッジ付近において、アクチン逆行流によりクラッチ分子を介して基質に牽引力を与える^{30,31} (図 1B)。小さな運動性細胞が速く移動するためには、強力な接着よりクラッチによる弱い接着を用いた結合と乖離の速いサイクルが適している。ゆえに小さな細胞においては、アクチン逆行流に基づいた力推定が有効と考えられる。他の改良はビーズ密度を上げることである。ビーズ変位の観測数が増えれば未知変数の力を一意に求めることができる。問題は高密度で隣接する複数のビーズの蛍光が融合することである。これを防ぐため、先行研究は、2種類の蛍光色素を用いたり²、高分解能の顕微鏡で計測したりしてきた³²。しかし高密度ビーズでは、基質のポアソン比などの物性特性を不均一に変化させるというトレードオフが発生する。弾性体中の包摂物は弾性特性を変える可能性があり³³⁻³⁵、これは観測行為が対象の特性を変えることを示唆する。また高密度であっても、小さい細胞や神経成長円錐などの小さい細胞部位の力を計測する場合、ビーズの数は相対的に少ない。したがって、少数のビーズ条件でも精度の良い力推定をするアルゴリズムが必要である。

これまでの力推定アルゴリズムは Boundary element method^{8,36}、Fourier-transform

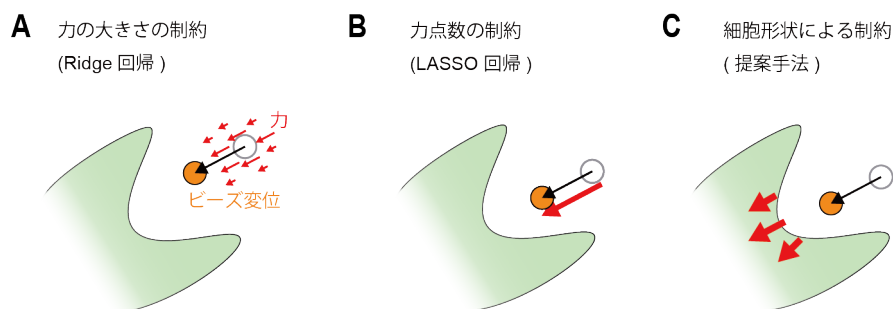


図 2 Ridge 回帰、LASSO 回帰、提案手法が導入するそれぞれの制約。(A) Ridge 回帰は、力の大きさを小さくするように制約し、ビーズ変位の観測誤差に対して過適合することを抑制する。(B) LASSO 回帰は、なるべく少ない力点のみで、観測したビーズ変位を再現しようとする。(C) 提案手法は、細胞内側のみに力を出し、細胞膜の内側を向くような制約を導入する。

traction cytometry^{32,37-39}、Finite element method⁴⁰などがある。いずれも、力を推定する上で制約を導入する。Boundary element method が用いる Ridge 回帰は力の 2 乗の大きさに制約を与え、広い範囲で小さな力を推定する^{2,41,42} (図 2A)。Boundary element method における LASSO 回帰や Fourier-transform traction cytometry はビーズ変位を説明するために、それぞれ少ない非ゼロの力や少ない数の力を選択する。これらの制約は狭い範囲で大きな力を推定する⁴¹ (図 2B)。全ての制約は細胞の形状と無関係であり、ビーズの位置の周辺で力が発生すると仮定する。そのため、推定した力は基質の弾性応力に相当し、細胞が生成した力とは異なる。細胞が基質を変形すると、その変形は距離に応じて減衰する。細胞領域の外にあるビーズが動いたとき、細胞はビーズ近辺の応力よりも大きな力を発生しているはずである (図 2C)。また、同じビーズ変位でも、細胞形状が違えばそのビーズ変位を生み出す力は異なるはずだ。この事実は、TFM 画像による力推定に個々の細胞形状の情報が必須であることを示す。細胞形状を考慮した力推定の先行研究は存在するが、力点の存在範囲⁴³や力の向き^{36,44}について細胞共通の制約を用いており、個々の細胞の形状を導入してはいない。

生物学は、細胞の機械的力と形状に関する多くの発見をしてきた。細胞の力はアクチン重合が活発なエッジ付近で大きく^{20,45-47}、内向き^{20,48-51}に向いていることが多い。アクチン重合を阻害すると細胞はシャボン玉のような球形になり⁵²、それはエネルギー的に最も安定するからだ。ゆえに能動的に拡張する力がなければ、また、細胞は基質から力を得られなければ広がることができず⁵³、仮足は退縮方向の大きな力を発生して細胞全体を球形にしようとする⁵⁴。これらの生物学的発見は力推定の精度向上に役立つに違いないが、力推定に利用することは困難であった。力推定に形を利用するためには、力の大きさと方向について細胞形状依存の制約を数式で設計しなければならない。しかし、細胞形状はあまりに複雑であり個性が強いため、細胞形状から力の大きさと方向の数学的記述に変換する方法が存在しなかった。このボトルネックが解決できれば力推定のブレイクスルーとなる。

本研究は、細胞形状から抽出した力の事前知識を導入し、ベイズ統計の枠組みで観測ビーズ変位から細胞の力の推定を行った(図 3)。私は力の大きさの事前知識を細胞エッジからの距離の減衰関数で表現した。力の方向の事前知識については、私は細胞形状を level set method (LSM) で記述し、LSM の勾配方向を利用した。複雑な細胞エッジ曲線に対しては、私は mean curvature flow (MCF)⁵⁵⁻⁵⁷ をそれに適用し、簡素な形状の LSM 勾配を抽出した。これらの手続きにより、私は細胞内のすべての場所の力の方向を数学的に定義ができた。この定義に基づき、私は力の事前知識とビーズ変位の尤度から事後分布を計算した。次に私は細胞と基質の数理モデルで作成した人工データで、推定された力の精度を評価した。3つの精度指標を用いてベイズアプローチ

(提案手法)、Ridge 回帰、LASSO 回帰を比較したところ、私は提案手法が最も精度が良いことが分かった。また、私は神経成長円錐、細胞性粘菌、ケラトサイトの TFM 画像を用いて力推定を行った。推定結果は、Ridge 回帰や LASSO 回帰に比べて提案手法がより現実的な力推定を行っていることを示した。

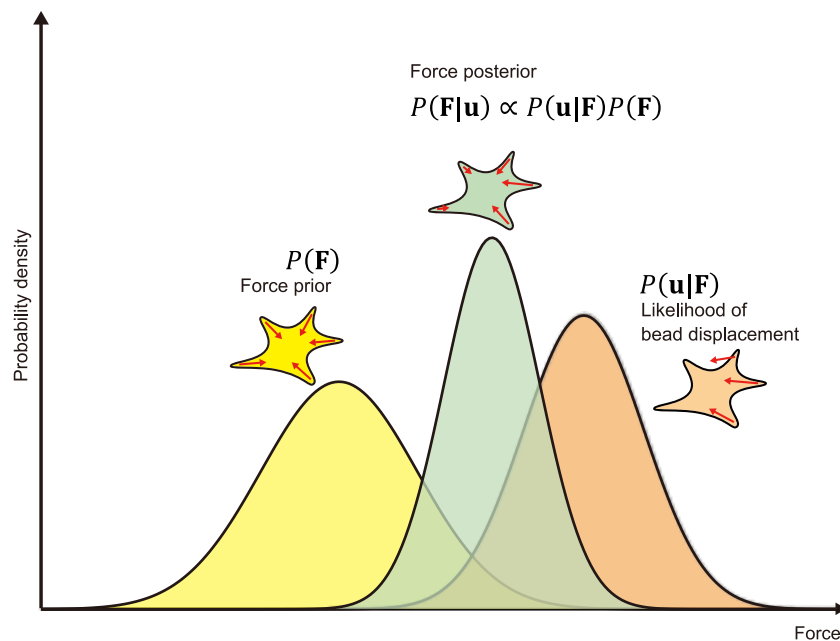


図 3 ベイズの枠組みに基づく力推定の概念図。力 F によって生じるビーズ変位 u の確率密度（尤度 $P(u|F)$ 、黄色）と、細胞形状から推測した、細胞が出しているだろう力の確率密度（事前分布 $P(F)$ 、オレンジ）から、事後分布（ $P(F|u)$ ；緑色）を導出する。事後分布をもっとも大きくするような力を算出することで、測定したビーズ変位と、細胞形状による制約の両方に適合する推定値を得た。

方法

ベイズ推定の枠組みによる牽引力推定

基質変形の尤度

基質上の座標を $\mathbf{x} = (x, y)^T$ とする（上付き T は転置を意味する）。 \mathbf{x} において与えられた機械的力 $\mathbf{f}(\mathbf{x}) = (f_x(\mathbf{x}), f_y(\mathbf{x}))^T$ が基質を $\mathbf{u}(\mathbf{x}) = (u_x(\mathbf{x}), u_y(\mathbf{x}))^T$ だけ変形したとする。すべての場所で発生した力の総和が各座標の変形量を決定する。ゆえに、基質が等方的に均一であり、かつ $\mathbf{u}(\mathbf{x})$ が微小である場合、私は $\mathbf{u}(\mathbf{x})$ を $\mathbf{f}(\mathbf{x})$ の空間積分

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}) = \int_{\Omega} \tilde{G}(\mathbf{x} - \mathbf{x}') \mathbf{f}(\mathbf{x}') d\mathbf{x}', \quad (1)$$

で記述できる²⁸。ここで、 Ω は基質全域を表し、 $\tilde{G}(\mathbf{x})$ は基質の弾性特性を記述するブシネスクーグリーン関数

$$\tilde{G}(\mathbf{x}) \equiv \frac{1 - \nu}{\pi E r^3} \begin{pmatrix} (1 - \nu)r^2 + \nu x^2 & \nu xy \\ \nu xy & (1 - \nu)r^2 + \nu y^2 \end{pmatrix}, \quad (2)$$

であり、この式が力の及ぶ範囲と基質の変形量を規定する。定数 ν と E はそれぞれ基質のポアソン比とヤング率、 r は力点と任意の基質上の点の間の距離 $r = |\mathbf{x}|$ である。私は変位 $\mathbf{u}(\mathbf{x})$ から力 $\mathbf{f}(\mathbf{x})$ をベイズの枠組みで逆算することを目的とするが、 $\mathbf{f}(\mathbf{x})$ を $\mathbf{u}(\mathbf{x})$ の連続的な関数として得ることは技術的に不可能である。そこで、私は基質上の座標を有限 N 個の座標 $\mathbf{x}'_n = (x'_n, y'_n)^T$ ($n = 1, \dots, N$) で離散化し、式(1)の右辺を総和による近似に置き換えることが出来る。

$$\mathbf{u}(\mathbf{x}) \approx \frac{A}{N} \sum_{n=1}^N \tilde{G}(\mathbf{x} - \mathbf{x}'_n) \mathbf{f}(\mathbf{x}'_n), \quad (3)$$

ここで、 A は細胞領域 Ω の面積であり、 A/N は離散化した 1 要素の面積である。基質上の力推定点数 N が多いほど力の空間解像度は良い。しかし、 N が大きいことは推定すべき未知の力の数を多くするので、 N をあまり大きくすることはできない。

TFM は、ランダムに配置された蛍光ビーズの変位を使用して、基質の変形を部分的に観測する (図 1A)。 B 個のビーズの真の変位を、 i 番ビーズの座標 $\mathbf{x}_i = (x_i, y_i)^T$ ($i = 1, \dots, B$) を用いて、 $\mathbf{u}_{bead} = (u_x(\mathbf{x}_1), u_y(\mathbf{x}_1), \dots, u_x(\mathbf{x}_B), u_y(\mathbf{x}_B))^T$ と表すことにする。これを、式(3)を用いて記述すると、

$$\mathbf{u}_{bead} = G\mathbf{f}$$

$$\mathbf{f} = \left(f_x(\mathbf{x}'_1), f_y(\mathbf{x}'_1), \dots, f_x(\mathbf{x}'_N), f_y(\mathbf{x}'_N) \right)^T \times \frac{A}{N}$$

$$G = \begin{pmatrix} \tilde{G}(\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}'_1) & \cdots & \tilde{G}(\mathbf{x}_1 - \mathbf{x}'_N) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \tilde{G}(\mathbf{x}_B - \mathbf{x}'_1) & \cdots & \tilde{G}(\mathbf{x}_B - \mathbf{x}'_N) \end{pmatrix}$$

となる。ガウシアンを観測ノイズがあるとすると、私はビーズ変位の計測値 \mathbf{u}_{obs} を、平均が真の変位 $\mathbf{u}_{bead} = G\mathbf{f}$ の確率モデルで記述できる。

$$P(\mathbf{u}_{obs}|\mathbf{f}) = N(\mathbf{u}|G\mathbf{f}, \alpha^{-1}I_{2B}) \quad (4)$$

私は、異なるビーズに加わる観測ノイズは独立で、なおかつ、それぞれのビーズに関する観測ノイズの x と y 成分も、互いに独立と仮定した。そのため、 I_{2B} は $2B$ 次元の単位行列である。 α^{-1} は精度パラメータ（分散の逆数）である。本研究では、 $\alpha = 1$ とした。

牽引力の事前確率分布

私は牽引力の事前分布を 2D ガウシアンとし、その平均を細胞形状に依存するように大きさと方向の積で表した。最初のステップで私は細胞全領域で共通のアルゴリズムに基づいて大きさと方向を定義した。次のステップで、私は局所依存のばらつきをその大きさと方向に導入し、EM アルゴリズムを用いてそれらを推定した。牽引力の事前分布も、基質変形の尤度と同じく、確率モデルである。ゆえに、推定結果を平均の値に束縛するわけではない。代わりに、推定にバイアスを与える効果を持つ。特に、牽引力の事前分布を定義する、ガウシアンの分散を大きくする場合は、ビーズ変位が事前分布の効果を無効化する可能性が高くなる。

Step 1 細胞全域依存の大きさと方向の設計。

細胞エッジの近くでは、細胞内部より大きく、細胞内部方向を向いた牽引力が生み出されやすい^{25, 58-60} (図 4A)。私は、牽引力の事前分布における、平均の牽引力 $\mathbf{f}_\mu(\mathbf{x}'_n)$ を大きさ $m(\mathbf{x}'_n)$ と単位ベクトル $\mathbf{d}(\mathbf{x}'_n)$ の積で記述した。

$$\mathbf{f}_\mu(\mathbf{x}'_n) = m(\mathbf{x}'_n)\mathbf{d}(\mathbf{x}'_n). \quad (5)$$

牽引力発生の原動力として、F アクチンの細胞内向きの流動が重要である。特に、軸索の成長円錐の糸状仮足では、エッジ付近の流動速度は、突起先端で最も大きく、細胞内向きに進むにつれて減速することが知られている⁶¹。そこで、力の大きさの相対比率は、座標 \mathbf{x}'_n のエッジから細胞内向きの距離 r の減衰関数でモデル化した (図

4B)。

$$m(r) = \exp(-r^2/\sigma^2) \quad (6)$$

ここで r はエッジからの (符号を考えない) 距離である。私はハイパーパラメータ σ^2 を細胞面積の 10% に設定したが、これにより大きい細胞はエッジから広い範囲で力を発生する。例として、HT1080 細胞の形状 (図 5a) の牽引力の大きさのモデルは図 5b のようになる。

次に、平均の牽引力の方向 $\mathbf{d}(\mathbf{x}'_n)$ を形状依存的な内向きの方向として定義するため、私は LSM^{58,59} を用いて細胞形状を記述した。私が採用した LSM では、基質上の各座標 \mathbf{x} から最近傍細胞エッジまでの符号付き距離 (細胞内で負、細胞外で正、エッジ上で 0) $r(\mathbf{x})$ を z 座標として、2D の細胞形状を 3D 空間で表現する。結果として、LSM は HT1080 細胞の形状 (図 5a) を図 5c にみられるような 3D 曲面に変換する。この曲面全体を表すために、基質上の座標 \mathbf{x} と仮想時間 t の関数 $\phi(\mathbf{x}, t)$ を導入して、level set function (LSF) と呼ぶこととする。仮想時間とは、後述する MCF を定義するために必要な余剰次元である (補足資料)。簡単にいえば、私はこの後 MCF を用いて LSF に「変形」を加えるが、その変形をどれほど長く与えるかをコントロール

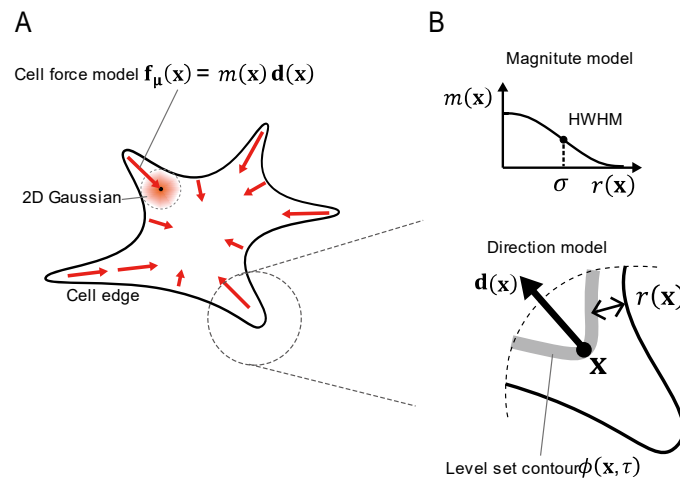


図 4 力推定のための牽引力の事前分布。(A) 2D ガウシアンによる、牽引力の事前分布の定義。牽引力の事前分布の平均は、細胞内側を向いて、細胞突起を小さくするような向きを持ち、エッジ付近で大きな力として定義した。突起のない部分では、牽引力の事前分布の平均の向きと大きさを、その近傍から滑らかに変化するように定めた。(B) それぞれの座標における、牽引力の事前分布の平均の計算式。大きさは、細胞内の座標からエッジまでの最短距離 $r(\mathbf{x})$ に関する減衰関数 $m(r) = \exp(-r^2/\sigma^2)$ を用いて定めた。従って、エッジから離れるにつれて、事前分布の平均の力は小さくなる。向きは、細胞の形状を表現するレベルセット関数を、平均曲率流によって変形させた後の勾配の向き (図 5 を見よ) として定義した。

するための変数である。HT1080 細胞の形状は、LSF を使用して表す場合、仮想時刻 $t = 0$ での初期値とみなす。すなわち、2D の細胞エッジの形状は $\phi(\mathbf{x}, t = 0) = 0$ を満たす座標集合 $\{\mathbf{x}\}$ である。関数 $z = \phi(\mathbf{x}, t = 0)$ が負の領域は細胞内部を示すため、その勾配を平均の牽引力の方向 $\mathbf{d}(\mathbf{x}'_n)$ として使える可能性がある。しかし、複雑な細胞形状の LSF 勾配は複雑で連続性を欠く (図 5d)。エッジ付近はエッジに垂直方向の勾配を持つが、逆にそのことは特に細い仮足状の部分で互いに逆向きの勾配を近くに生成する。細胞の牽引力はエッジに対して垂直方向とは限らない。実際、F アクチンの流動速度を観察すると、まっすぐなエッジ近傍でも流動の向きがばらついていることが報告されている^{59,62}。特に、細い仮足では、全体としての牽引力は仮足の方向に平行な向きを向きやすい⁶³ (図 1B)。ゆえに、元の細胞の LSF 勾配は牽引力の事前分布の平均としてふさわしくない場合があると考えられる。

そこで、私は細胞膜の物理的な性質を利用して、牽引力の向きに関する情報を取り出すことができると考えた。細胞膜を構成する、脂質二重膜を曲げるためには、エネルギーが必要である^{64,65}。したがって、細胞はエネルギーを消費して複雑な形状を構築および維持する必要がある。より詳しくは、細胞膜は閉じた形状を作るため、平面形状は取れないために、局所的な曲率の変化がない球が、細胞膜にとってはエネルギー的に最も安定した形状であり⁶⁶、細胞はエネルギーを消費して球形になる方向の力に抵抗する。この考えが正しければ、細胞がエッジ付近で出す牽引力は、細胞膜が曲げに抵抗して自発的に生み出す形状依存の力を相殺するため、似たような向きになる可能性がある。そこで、細胞膜の形状依存の力を方向モデルとして導入するために、一般の図形の近傍の位置同士で、局所的な曲率の差を小さくして滑らかなにする、mean curvature flow (MCF)⁵⁵⁻⁵⁷ を、もとの細胞の形状から得られる LSF $\phi(\mathbf{x}, 0)$ を初期条件とし、短時間 τ だけ、シミュレーションを行った (補足資料)。結果として、MCF は細胞形状を球形に向かうように変形させ、シミュレーションで得られたエッジ $\phi(\mathbf{x}, \tau) = 0$ は、突出部分を排除し滑らかな形状を見せた (図 5a の点線および e)。3D 曲面 $z = \phi(\mathbf{x}, \tau)$ の勾配分布から元の細胞領域を切り取ることで、スムーズな勾配分布が得られた (図 5f)。私は図 5f の勾配を力の方向のモデル $\mathbf{d}(\mathbf{x}'_n)$ と定義した。すなわち、

$$\mathbf{d}(\mathbf{x}'_n) = \frac{\nabla\phi(\mathbf{x}'_n, \tau)}{|\nabla\phi(\mathbf{x}'_n, \tau)|}$$

と定義した。

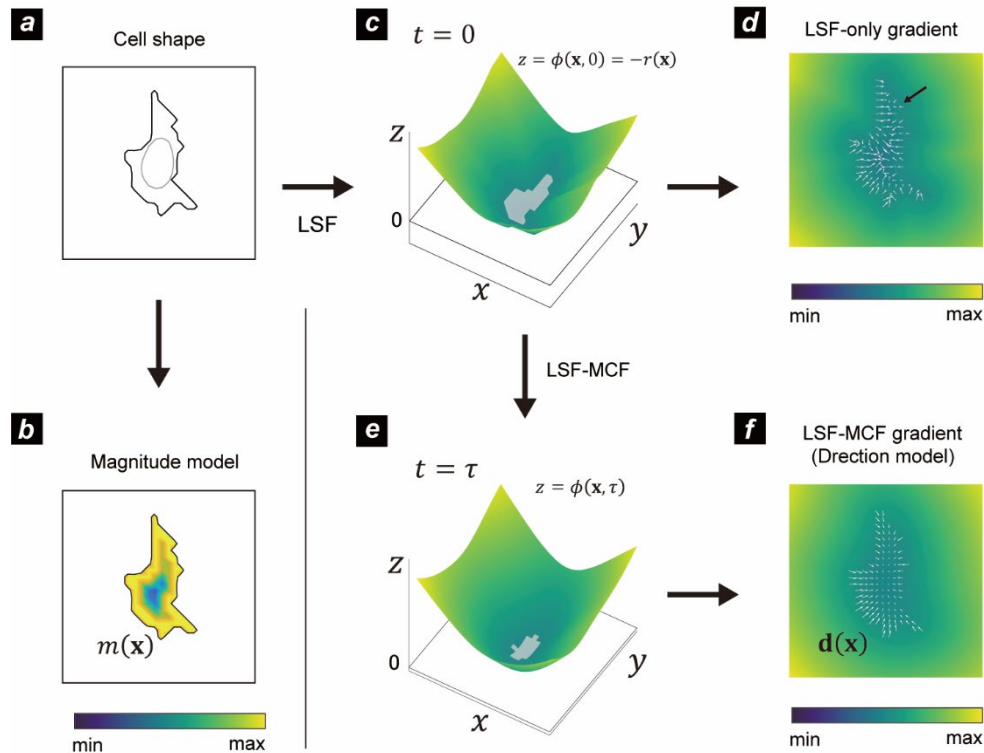


図 5 牽引力の事前分布の平均を細胞の形状から計算するための手続き。(a) もとの細胞の形状 (黒実線) と、後述する平均曲率流 (MCF) により変形した形状 (図中の灰実線。パネル e にて後述)。(b) もともとの細胞形状の内側の座標から細胞エッジまでの距離 $r(\mathbf{x})$ に応じた減衰関数 $m(r(\mathbf{x}))$ を使用して平均の力の大きさを得た。色は、力の大きさの相対値を可視化したものである。(c) レベルセット関数 (LSF) $z = \phi(\mathbf{x}, 0)$ による、もともとの細胞の形状の表現。ここで、 z 軸は細胞エッジからの距離を表し、細胞内部では $-r(\mathbf{x})$ 、外部では $r(\mathbf{x})$ 、細胞エッジ上では 0 となる。グレーの領域は、細胞の内部である。(d) もともとの細胞形状の LSF の勾配の向き。白矢印が、勾配の向きを向いた単位ベクトルであり、背景色は LSF が z 軸に取った値の相対値を表している。黒矢印で示した突起のある領域では、勾配の向きが牽引力としては不適當となった。(e) もともとの細胞形状の LSF を初期状態とし、そこから MCF によって変形させた LSF $\phi(\mathbf{x}, \tau)$ (補足資料)。灰色の領域は、MCF によって変形した細胞の内側の領域であり、(a) の灰実線が変形後のエッジの形状 $\phi(\mathbf{x}, \tau) = 0$ を示している。(f) MCF によって変形した LSF の勾配の向き。白矢印は、勾配の向きを持った単位ベクトルである。牽引力の事前分布の平均が持つ向きは、この単位ベクトル $\mathbf{d}(\mathbf{x})$ として定義した。

Step 2 局所性依存性の導入

牽引力の実際の大きさと方向は、細胞形状の他に、細胞内の様々な物理化学的環境に依存する。それは、細胞エッジから遠い部位でも F アクチンの流動が起こる場合がある⁶² ことから明白である。したがって、Step1 によって得られた、牽引力の相対強度 $m(r)$ や、LSF の勾配 $\mathbf{d}(\mathbf{x}'_n)$ が、牽引力の事前知識として完全に正しい保証はない。そのため、私は $\mathbf{f}_\mu(\mathbf{x}'_n)$ に補正要素を導入した。補正パラメータ $\{\theta_n, s_n\}$ ($n =$

$1, \dots, N$)を n 番目座標 \mathbf{x}'_n における力の方向と大きさに関する補正パラメータとし、私は $\mathbf{f}_\mu(\mathbf{x}'_n)$ をこのように変換した。

$$\mathbf{f}_n(\mathbf{x}'_n, \theta_n, s_n) \equiv s_n \begin{pmatrix} \cos \theta_n & -\sin \theta_n \\ \sin \theta_n & \cos \theta_n \end{pmatrix} \mathbf{f}_\mu(\mathbf{x}'_n).$$

これら平均の力の集合 $\mathbf{F}_\mu\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N = (\mathbf{f}_1(\mathbf{x}'_1, \theta_1, s_1)^T, \dots, \mathbf{f}_N(\mathbf{x}'_N, \theta_N, s_N)^T)^T$ を用いて細胞の力の事前知識は2D ガウシアンで定義できる。

$$P(\mathbf{f}|\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N) = N(\mathbf{f}|\mathbf{F}_\mu\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N, \beta^{-1}I_{2N}) \quad (7)$$

ここで、ハイパーパラメータ β はガウシアン分散であり、 I_{2N} は $2N$ 次元の単位行列である。私は、 $\beta = 0.1$ とした。補正パラメータ $\{\theta_n, s_n\}$ についても、事前確率分布 $P(\{\theta_n, s_n\})$ を定義した。力の角度と大きさの分布は独立とみなせるため、 $P(\{\theta_n, s_n\}) = P(\{\theta_n\})P(\{s_n\})$ とし、 $P(\{\theta_n\})$ は無情報、すなわち $\{\theta_n\}$ に依らず一定の値であるとした。 $\{s_n\}$ の事前確率分布はラプラス分布、

$$P(\{s_n\}_{n=1}^N) = \exp\left\{-\gamma \sum_{n=1}^N |s_n|\right\},$$

で定義した。

牽引力の事後分布と推定

ベイズの定理から、牽引力の事後分布は尤度 (式(4)) と事前分布 (式(7)) の積に比例する。したがって、

$$P(\mathbf{f}|\mathbf{u}_{obs}, \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N) \propto P(\mathbf{u}_{obs}|\mathbf{f}) \times P(\mathbf{f}|\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N), \quad (8)$$

を得る (図 3)。事後確率密度が最大となる力がビーズの変位 (尤度) と細胞形状の制約 (事前知識) の両方を満たす (最大事後確率推定、あるいは、MAP 推定)。補正パラメータ $\{\theta_n, s_n\}$ を定められれば、この式の対数を取り、MAP 推定値を得ることができる。

$$\begin{aligned} \mathbf{f}_{est} &= \operatorname{argmax}_{\mathbf{f}} \{\log P(\mathbf{f}|\mathbf{u}_{obs}, \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N)\} \\ &= \operatorname{argmax}_{\mathbf{f}} \left\{ -\frac{\alpha}{2} |\mathbf{u}_{obs} - G\mathbf{f}|^2 - \frac{\beta}{2} |\mathbf{f} - \mathbf{f}_\mu\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N|^2 - \gamma \sum_{n=1}^N |s_n| \right\}. \end{aligned} \quad (9)$$

私は EM アルゴリズムを用いて補正パラメータ $\{\theta_n, s_n\}$ と \mathbf{f} の近似解を数値的に計算した (補足資料)。

人工データ生成

アルゴリズムの力推定の精度を評価するためには、正解の力との比較が必要である。

しかし、実際の顕微鏡下で、生きている細胞の正確な力を知ることは困難である。そこで、私は細胞および、ビーズが埋め込まれた基質の数理モデルを用いて、モデル細胞の牽引力とビーズ変位の人工データセットを生成した (図 6A)。まず、推定の答えとなる牽引力を設定するために、モデル細胞の内部で、近傍のエッジに対して垂直で、エッジ近傍からの距離に応じて、式(6)に従って減衰するベクトルを生成した。その後、それぞれのベクトルの向きを $\pm 30^\circ$ 、大きさを 0.1~2 倍の範囲でランダムに変更して、モデル細胞の牽引力とした。そして、モデル基質表面にランダムに配置されたビーズをモデル細胞の牽引力と式(3)に従って移動させた。牽引力とビーズの配置は互いに独立とした。私は変位したビーズを用いて牽引力を推定し、モデル細胞が生成した牽引力との差を評価した。ワークフローは次の通りである。

- (1) HT1080 細胞のエッジ形状を抽出しモデル細胞に適用 (図 6A-a)
- (2) モデル細胞の内側の 20 個の座標で牽引力を生成 (図 6A-b)
- (3) モデル基質上に低密度なビーズをランダムに配置 (図 6A-c)
- (4) モデル細胞の牽引力でビーズ変位を計算 (式 2) (図 6A-d)
- (5) ビーズの変位に観測ノイズを付加 (図 6A-e)

細胞形状の違いによる、推定性能の変化を調べるため、私は 5 種の細胞形状を用いた (図 6A-a と B)。そして、得られたノイズ付きビーズ変位から提案したベイズ推定法で力推定を行った。さらに、比較のために、Ridge 回帰と LASSO 回帰による推定も行った。Ridge 回帰や LASSO 回帰は、正則化パラメーターを推定に先立って定めることを要求する。そこで、本研究では交差検証によって、推定結果によって再構成したビーズ変位が、観測したビーズ変位 (つまり、観測ノイズを含んでいる) に近くなるよう、力推定の度に都度、最適化した。比較する力推定アルゴリズムの候補として、ほかにも高速フーリエ変換 (Fourier Transfer Traction Cytometry; FTTC) なども考えられる。これらは、力を推定したい座標の基質の変形を牽引力の推定に用いるため、ビーズが存在しない座標の牽引力を推定する場合は、その座標の情報を基質の変形を、周囲のビーズの変位から補完するための前処理を行うことになる。したがって、ビーズ密度が高くないと十分に機能しない。例えば、よく用いられる ImageJ のプラグインを、プラグインの作者が使用してビーズ画像を解析した実験では、基質変位情報は、 $2 \text{ bead}/\mu\text{m}^2$ 以上のビーズ密度のもと、 $1.63 \mu\text{m}$ の空間解像度で再構成されたと報告されている⁶⁷。本研究では、実際の細胞がだす牽引力を推定する事例として、 $1 \text{ bead}/\mu\text{m}^2$ を下回る低ビーズ密度条件も対象とした (後述)。よって、本研究は Ridge 回帰と LASSO 回帰との比較のみを行うこととした。生物実験は細胞形状を同時観測できるので、本研究のモデル細胞の形状も観測できると仮定し、提案手法のみは、それらを事前知識として導入した。

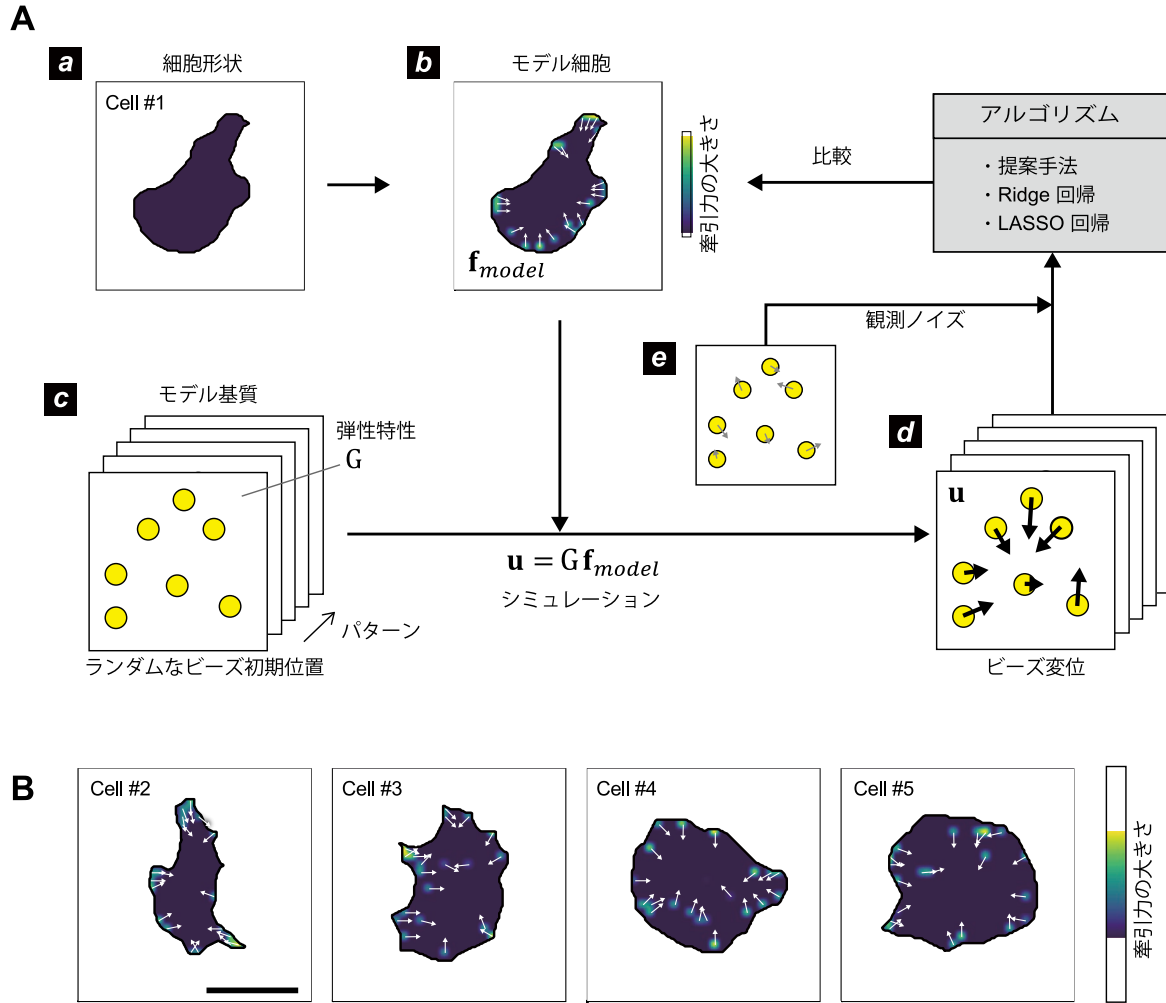


図 6 力推定法の性能評価のための、人工データと力推定のワークフロー。(A) 人工データ作成から、力推定までのワークフロー。私はまず、培養細胞の形状をもとに、モデル細胞の形状 (a) を生成し、その内部に仮定の牽引力 f を発生させた (b)。白矢印は力の向きを表しており、背景色が力の大きさを示す。次に、私は所与の弾性特性をもつモデル基質の表面で、ランダムにビーズの初期位置を決定し (黄色い円) (c)、ブシネスク近似 ($u = Gf$) に基づいてモデル細胞の牽引力によるそれぞれのビーズの変位を算出した (d)。最終的に得られる人工データは、(d) によって得られたビーズ変位と、2D ガウシアン (すべてのビーズの x 成分と y 成分は独立している。それぞれの標準偏差は 0.1 mm) からサンプリングした観測ノイズ (e) の和である。ノイズを含んだビーズ変位の値に、提案手法、Ridge 回帰、LASSO 回帰のそれぞれを適用して推定結果を得て、モデル細胞の出した力と比較することで、推定性能を評価した。(B) パネル (A) に示したものとは別の、モデル細胞の形状。私は 5 つの細胞形状と、形状のそれぞれに 5 つずつの異なる力発生パターンを用意した、25 種類のモデル細胞を使用した。

性能評価指標

私は推定精度を 3 つの指標 Area under the ROC curve (AUC)、Deviation of Traction Magnitude (DTM)²²、Deviation of Traction Magnitude in the Background (DTMB)⁶⁰、で評価した。AUC の計算において、本研究では、モデル細胞が実際に牽引力を発生したグリッド点を陽性、細胞内部のそれ以外のグリッド点を陰性点とした。力推定アルゴリズムの推定結果から、私は偽陽性率と真陽性率を計算できる。しかし、力はアナログ値であり二値ではない。したがって、私はアルゴリズムが推定した力の大きさにしきい値を導入することで、陽性か陰性かの二値判別とした。しきい値が大きければ大きい力だけが陽性であり、それが小さければ偽陽性を増やす。小さいしきい値で偽陽性率が低く、かつ真陽性率が高い場合に AUC が大きくなる（詳細は図 S1 を参照）。

DTM は真陽性の推定された力の質を評価する指標である。それは M_p 個の positive points ($\mathbf{x}_i^p; i = 1, \dots, M_p$) において推定された力 $\mathbf{f}_{est}(\mathbf{x}_i^p)$ と真の力 $\mathbf{F}_{true}(\mathbf{x}_i^p)$ の大きさの誤差の割合の平均値として定義される。

$$DTM = \frac{1}{M_p} \sum_{i=1}^{M_p} \frac{|\mathbf{f}_{est}(\mathbf{x}_i^p)| - |\mathbf{F}_{true}(\mathbf{x}_i^p)|}{|\mathbf{F}_{true}(\mathbf{x}_i^p)|} \quad (10)$$

DTM は、推定された力の大きさの精度がよいほど 0 に近づく。それは推定力が真の力より大きい場合は正、小さい場合は負の値をとる。

3 番目の指標 DTMB は偽陽性の推定された力のノイズレベルを評価する指標である。その定義は、 M_n 個の negative points ($\mathbf{x}_j^n; j = 1, \dots, M_n$) において、推定された力の大きさ $|\mathbf{f}_{est}(\mathbf{x}_j^n)|$ の真の力の大きさの平均値 $E\langle \mathbf{F}(\mathbf{x}_j^n) \rangle$ に対する割合の平均値である。

$$DTMB = \frac{1}{M_n} \sum_{j=1}^{M_n} \frac{|\mathbf{f}_{est}(\mathbf{x}_j^n)|}{E\langle \mathbf{F}_{true}(\mathbf{x}_j^n) \rangle} \quad (11)$$

DTMB はゼロ以上の値を取り、偽陽性の力が真の力の平均値に近いほど 1 に近づく。それがゼロに近い小さい値である場合は、偽陽性の力が大きくないことを意味する。

牽引力の xy 成分のように、複数の成分を同時に推定する場合には、次式の mean squared error (MSE) が良く用いられる。その定義は、 $M_p + M_n$ 個の細胞内部の座標 ($\mathbf{x}_k; k = 1, \dots, M_p, \dots, M_p + M_n$) において、推定された力と、その場所での真の力のベクトルとしてのずれの大きさを、真の力の大きさの平均値 $E\langle \mathbf{F}(\mathbf{x}_k) \rangle$ と比較した割合

の平均値である。

$$MSE = \frac{1}{M_p + M_n} \sum_{k=1}^{M_p + M_n} \frac{|\mathbf{f}_{est}(\mathbf{x}_k) - \mathbf{F}_{true}(\mathbf{x}_k)|^2}{E(\mathbf{F}_{true}(\mathbf{x}_i^p))^2}$$

推定が完全に正しい時、MSE は 0 となる。しかし、MSE は力の分布比較をする上では、あまり適当な指標であるとはいえない。なぜなら、MSE は細かいノイズを過大評価してしまうことが報告されているからである⁶¹。また、生成した人工データに対して行った牽引力推定では、MSE が 0 に近い場合であっても、DTM は 0 にならない上に、DTMB との相関が強かった (図 S2)。DTM や DTMB は、真の力の分布に従って求める値であり、MSE よりも意味が分かりやすい。したがって、本研究では MSE の比較はしないことにした。

実測データ

提案する手法の有効性を確かめるために、私は協力研究室の厚意により提供を受けた、蛍光ビーズの画像と、細胞の顕微鏡画像に基づいて力を推定した。奈良先端科学技術大学院大学の稲垣研究室からは、馬場らの研究⁶⁸で得られた、位相差顕微鏡で観察した、ラットの海馬のニューロン神経軸索の成長円錐の実験データの提供をうけた。山口大学の岩楯研究室からは、細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) に GFP を結合したミオシン II を発現させ、TIRF 顕微鏡で観察した実験データ⁶⁹および、微分干渉顕微鏡で観察した、魚類ケラトサイト (Central American Cichlid の鱗由来) の実験データ⁷⁰の提供を受けた。それぞれ、力推定に大きくかかわる実験条件を表にまとめている。

表 1 実験条件

細胞	ビーズの大きさ (nm)	ビーズ密度 (beads/ μm^2) *	ヤング率 (Pa) **
成長円錐	200	0.47	269
細胞性粘菌	200	3.34	281
ケラトサイト	20	0.38	13800

* 力推定のために設けた ROI の内部に存在し、かつトラッキングできたビーズの個数を求め、ROI の面積に対する比率によって求めた値。

** 実験データの提供者から個別の基質のヤング率をヒアリングしたため、論文に記載されたプロトコルで得られる基質の、典型的なヤング率と異なる。

画像解析

軸索の成長円錐の実験に関する蛍光ビーズの画像は、細胞周辺で凝集してしまっていたビーズが見られた (図 9A) ため、私の所属する研究室の過去の研究で開発された、Dantzig selector⁷¹ を使用して可能な限りスポットを分離した。その後、細胞がないときの蛍光スポットと、もっとも近い位置に各時点のスポットを対応させる方法でトラッキングを行った。その後、多くのスポットが同じ位置に動いていると判定された場合に、それをマニュアルで補正した。そのほかの実験の蛍光ビーズ画像に関しては、MATLAB (MathWorks) で 2D 画像のスポット追跡をするために開発された U-track⁷² というソフトウェアを適用した。細胞のエッジは、目視で測定し、MATLAB の drawfreehand 関数によってプログラムから利用可能なデータ形式に変換した。

結果

力推定はアルゴリズムとビーズ位置に依存する

私は、まず力推定アルゴリズムの推定結果の特徴と調べた。同一のモデル細胞の牽引力 (図 7A) と 2 種のモデル基質 (ビーズ密度が 0.2 と 0.4 beads/ μm^2) を用い、提案手法、Ridge 回帰、および LASSO 回帰による力推定を行った (図 7B-H)。提案手法は、細胞内側だけの力を推定し、その分布も正解の力 (図 7A) に類似した (図 7C と F)。細胞エッジ付近に荷重が大きい事前知識を導入したが、本手法はエッジから離れた細胞内部の力も推定できた。他の 2 つの手法は細胞形状に無関係に細胞外に多くの力を推定した。ビーズ変位の観測ノイズがそれらの手法に細胞外の多くの小さな力を推定させたと考えられる。Ridge 回帰は力を小さく制約するため、局所的で大きな力を、細胞エッジをまたいだ広い範囲の力場として推定した (図 7D と G)。LASSO 回帰は細胞内外の多くの場所で力をゼロにする制約をするため、Ridge 回帰よりは大きな力を推定し、力の有無のコントラストを強くした (図 7E と H)。細胞は接触しない基質に対して力を加えることはできない。しかし、Ridge 回帰と LASSO 回帰による推定は、細胞領域の外の離れた基質で過剰な牽引力を推定することを示した。

また、TFM ではビーズの位置を制御できないので、それらに対する依存性はなるべく小さくしなければならない。これを検証するため、私は、同一の力分布に対して異なる配置のビーズを用いて力推定を行った。Ridge 回帰と LASSO 回帰の推定はビーズの配置で大きく異なったが、提案手法は比較的安定した (図 S3 と S4)。Ridge 回帰と LASSO 回帰は力の大きさや個数に制約を持つがビーズの位置の周辺で力を推定するため、推定結果はビーズの位置に依存する。Bayes 力推定は細胞の形に基づく力の位置、方向、大きさを制約する。ゆえに、Bayes 力推定はビーズの位置の違いに対してよりロバストである。力推定の精度を正確に論じるには、複数種の細胞形状、ビーズ分布、力分布で推定し、精度を統計的に検証する必要がある。

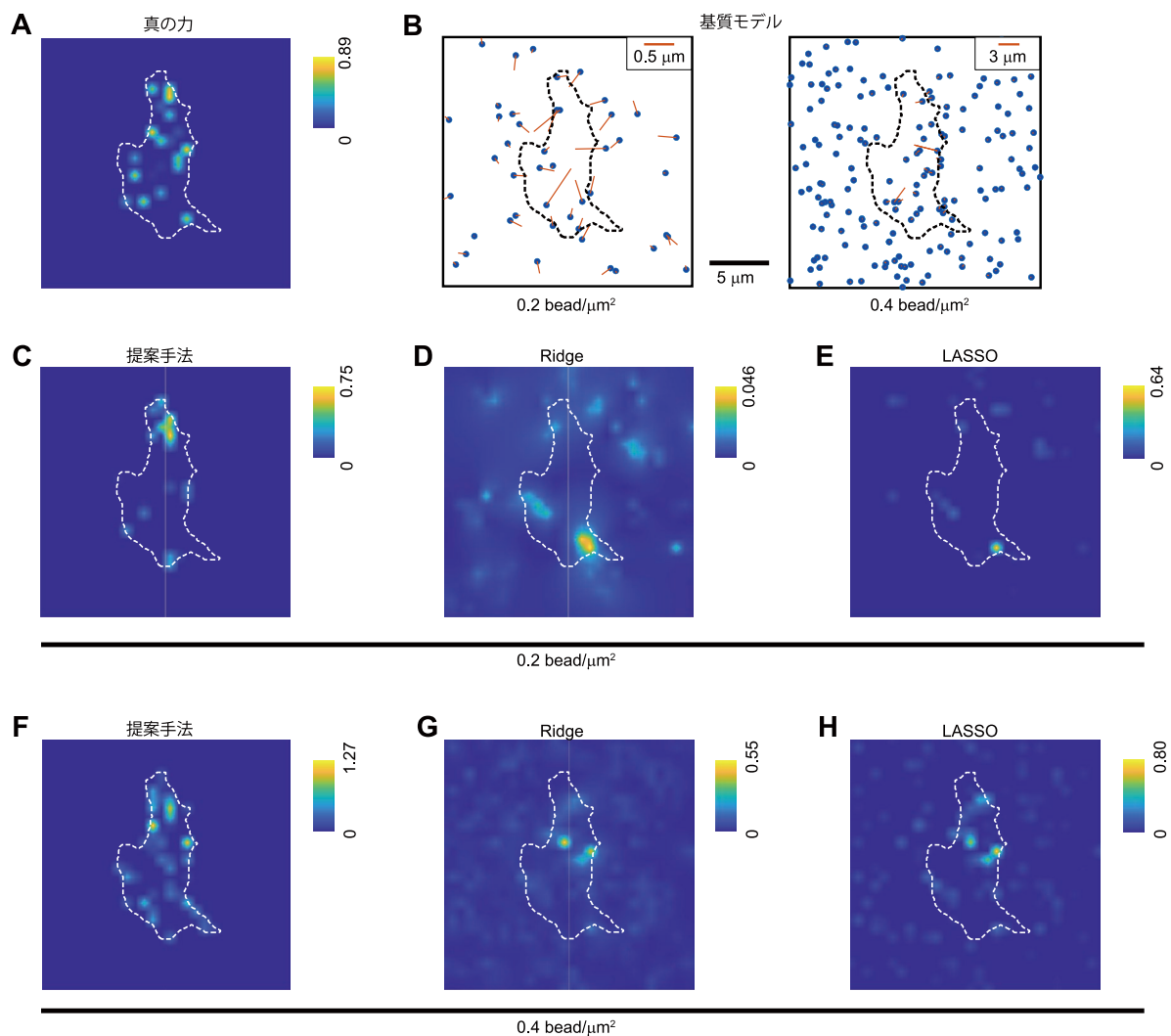


図 7 モデル細胞とモデル基質を用いた、力推定の結果の比較。(A) 真の力。モデル基質に配置したビーズを動かした、力の真の値である。背景色は力の大きさを表している。(B) モデル基質上にランダムに配置された、ビーズの初期位置(青い点。ビーズ密度はそれぞれ 0.2 および 0.4 bead/μm²)。それぞれのビーズの位置から伸びた実線は、ビーズの変位を示している。(C-E) ビーズ密度 0.2 bead/μm² の基質モデルにおける、3 つの異なる力推定法の、推定結果の比較 (C : 提案手法、D : Ridge 回帰、E : LASSO 回帰)。(F-H) ビーズ密度 0.4 bead/μm² の基質モデルにおける、3 つの異なる力推定法の、推定結果の比較。ビーズ密度の他は (C-E) と同じ。

力推定精度の統計的評価

私はアルゴリズムの精度を AUC、DTM、DTMB を用いて統計的に比較した (図 8A-C)。AUC を算出するため、私は推定された力を true positive (TP), false negative (FN), false positive (FP), true negative (TN) の 4 種に分類した (図 8A、詳細は図 S1 に記述)。DTM は TP 力の大きさがどれだけモデル細胞の真の大きさに近かったかを示す (図 8B)。DTMB は FP の力の大きさが真の力の大きさの平均に対してどの程度であったかを示す (図 8C)。まず、私は図 6 の 5 つの細胞形状についてそれぞれ 1 種の力パターンに対して 10 種のビーズ配置パターンを導入し、3 つの指標を算出した (図 8D)。細胞形状が複雑な場合 (cell #1-3)、Bayes アプローチは他の 2 つと同等以上の性能を見せた。特にビーズ密度が低い場合に Bayes アプローチの優位性は顕著であった。全てのアルゴリズムは、ビーズ密度が高いほど AUC が改善した。基質変形の情報が多ければ力推定の精度が向上するためであると考えられる。LASSO 回帰は、低密度のビーズで AUC が 0.5 程度であり、ランダムな二値判別と差がないことを示す。低密度ビーズ条件では、力の発生場所はビーズから離れている場合が多くなりやすい。LASSO 回帰は変位したビーズがある場所で大きな力を推定しようとするので、ビーズから離れた場所で発生した力を推定することは難しい。細胞形状が丸に近い場合 (cell #4 & 5)、Ridge と LASSO 回帰の精度はどの密度においても AUC が 0.5 前後であったが、Bayes アプローチのそれらは 0.6 程度となった。私は、モデル細胞が出す牽引力を生成する場所を、ランダムに設定した。つまり、丸に近い細胞の真の力の分布は、比較的等方的になった。そのため、どのビーズがどこの力によって動かされたかを正しく見分けることが難しくなる。ゆえに、どの手法も性能が低下したと考えられる。等方的なビーズ変位を生む力も等方的で、力の場所が回転方向にずれていても等方的なビーズ変位を生む。

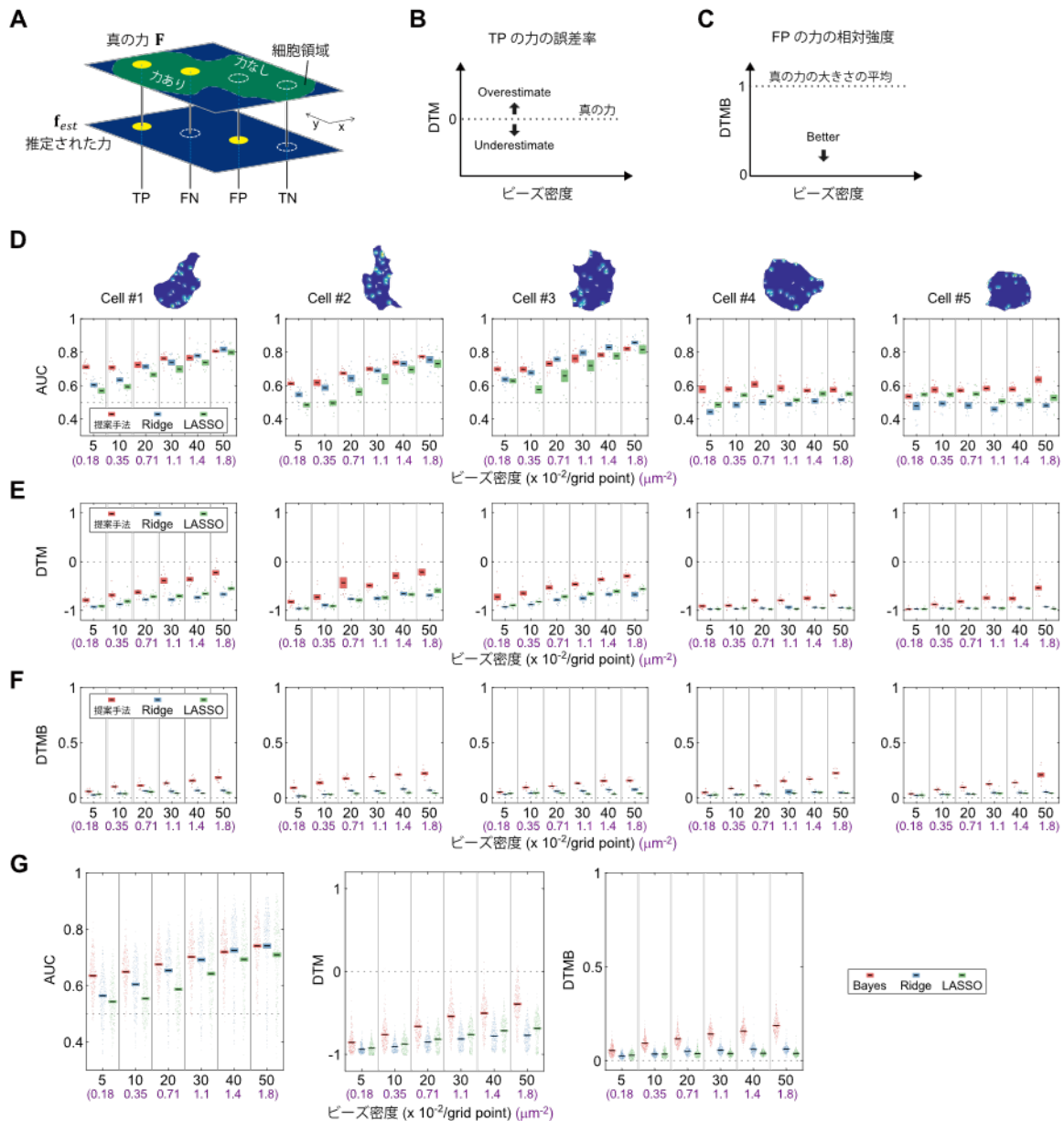


図 8 力推定アルゴリズムの推定精度の比較。(A) クラシフィケーションによる力の検出の正否の定義と、検出性能の評価指標の概念図。私は、力の検出について生じる場合を 4 つに分類 (それぞれ、true positive (TP)、false negative (FN)、false positive (FP)、true negative (TN)) し、ROC 曲線を引いて、力の検出性能を評価した。具体的な ROC 曲線の引き方と、AUC の計算法については、図 S1 に記述した。いずれの性能の評価指標についても、細胞内部の力のみを対象とし、細胞の外で生じたエラーについては評価に入れなかった。(B) Deviation of traction magnitude (DTM) は、推定された TP にあたる力を、同じ場所の真の力の大きさと比較した時の、誤差率である。0 に近い値であるほど、推定が正確であったことを示す。1 に近い時は、2 つの場合があり、1 つは、力推定のアルゴリズムが真の力よりも大きな力を推定したケースである。もう 1 つは、逆に、とても小さな力を推定したケースである。(C) Deviation of traction magnitude in the background (DTMB) は、FP の力が、真の力の平均と比較してどれほど大きかったかを示す。0 に近い場合に、推定が正確であったことを示す。(D) 図の 5 つの形状の細胞

(図 8 の続き)

のそれぞれについて、ビーズ密度をいろいろに変えたときの、AUC の値。ここでは、ビーズ密度はグリッド点 1 に対するビーズの数を示している。紫の値で、 $1 \mu\text{m}^2$ あたりのビーズの数も表示した。それぞれのグラフについて、細胞形状と、力の発生パターンは 1 つに固定し、10 パターンのビーズ初期位置を生成した。5 つの細胞形状のうち、細胞モデル 1~3 は比較的複雑な形状をしていた一方、4~5 は丸い形状をしていたこと。(E) (D) と同じように、DTM の比較。

(F) (D) と同じように、DTMB の比較。(G) 複数の細胞モデルやビーズ初期位置のパターンから生成した人工データ ($n=250$; 5 つの細胞形状、形状ごとに 5 パターンの力、ビーズ密度の値ごとに 10 通りのビーズ初期位置) より算出した、3 つの評価指標の比較。Error bar: SE。

次に私は真陽性として推定された力の大きさがモデル細胞のそれにどれだけ近かったかを調べた (図 8E)。DTM は、どの推定アルゴリズムも力を過小評価したが、Bayes アプローチは他の手法より推定値を下げる効果が弱かったことを見せた。細胞形状が複雑でビーズ密度が低い場合や、細胞形状が丸っぽい場合は、Ridge や LASSO 回帰による推定は、DTM がほとんど -1 となり、それは大きさの評価でほとんど力を推定できていないことを意味する。また、偽陽性として推定された力がモデル細胞の平均的な力に対してどの程度であったかを調べた (図 8F)。DTMB は、Bayes アプローチによる推定が最も大きな偽陽性の力であったことを示した。しかし、真の力の平均 (DTMB=1) に対してベイズアプローチによる偽陽性の力は最大で 0.3 程度の割合であり、それは真陽性の力より小さい値であることが多かったことを示す。最後に、私は、細胞形状や力とビーズの分布の 250 種類 (細胞形状 5 種類についてそれぞれ、異なる牽引力が 5 パターン、ビーズ分布は濃度ごとに 10 パターン) の組み合わせについて、3 つの指標を比較したところ (図 8G)、それらは 1 つの力の分布の結果 (図 8D-F) と同様の特徴を見せた。これらの結果は、ベイズアプローチによる力推定が特に低密度のビーズ環境において優れていることを示す。

TFM 画像を用いた力推定比較

次に私は、3 種の運動性細胞の TFM 画像に対して力推定アルゴリズムを適用し、推定された牽引力を比較した。解析した細胞は、神経細胞の成長円錐、細胞性粘菌、ケラトサイトであり、細胞内のグリッド点ごとのビーズ数でカウントすると、ビーズ密度はそれぞれ、0.021、0.30、0.38 beads/grid point (0.47 、 3.34 、 $0.38 \text{ beads}/\mu\text{m}^2$)であった (図 9)。私は、人工データを用いた力推定と同様に、 60×60 のグリッド状に力を推定する点を 3600 個配置したが、これはどの細胞の画像においてもビーズの数より多かった。私は、ビーズ変位の計測と力推定の一連の作業を行えるソフトウェアで画像解析を行い (補足資料)、3 つの推定アルゴリズムそれぞれの特徴を見出した。

神経成長円錐では、私はビーズ画像からビーズ分布 (Fig. 9A の上) とその変位 (not shown) を定量し、力の事前分布 (図 9A の下) を適用して、牽引力を推定した (図 9B、提案手法; 図 9C、Ridge 回帰; 図 9D, LASSO 回帰)。人工データでの結果と同じく、ベイズアプローチによる提案手法は、細胞領域で大きな力を推定した。Ridge 回帰は全体的に小さな力を推定し、LASSO 回帰は大きい力のスパースな推定結果を見せた。提案手法は成長円錐の突出部など大きな力を推定し (図 9B の下)、それらは他のアルゴリズムで見られなかった (図 9C と D の下)。成長円錐は神経突起を歪ませて伸長させるほどに大きな牽引力を生み出す。提案手法はそれに見合う大きな力を推定した。

細胞性粘菌においても、私はビーズ画像 (図 9E の上) からビーズ変位を計測し、事前分布を用いて (図 9E の下)、牽引力を推定した。ここでも私は牽引力の分布に大きな差を見出した。特に、提案手法は細胞の移動方向に対する後ろ部分で大きな牽引力を推定した (図 9F)。Ridge と LASSO 推定も後方部で相対的に大きな牽引力を推定したが、それは前方部と同程度であり、後方の細胞外で大きな牽引力を推定した (図 9G と H)。成長円錐の移動とは異なり、細胞性粘菌は後方部の接着を基質から剥がしながら移動する⁶³。ゆえに、後方で大きな牽引力が推定された。

ケラトサイトのビーズ分布 (図 9I の上)、および事前分布 (図 9I の下) を用いると、提案手法はケラトサイトの進行方向に対して両翼先端と中央前方のラメリポディアで目立った力を推定した (図 9J)。Ridge 推定は両翼の広い範囲で弱い力を推定し、それは形態の中央まで及ぶ広さだった (図 9K)。しかしそれは中央の前後部の力 (それらは提案手法で推定された) を推定しなかった。LASSO 推定は細胞性粘菌と同様に、大きくてムラの大きい力を推定した (図 9L)。ケラトサイトは左上方向に移動するが (図 9J の緑矢印)、Ridge と LASSO 推定は細胞の前方部でほとんど力を推定しなかった。

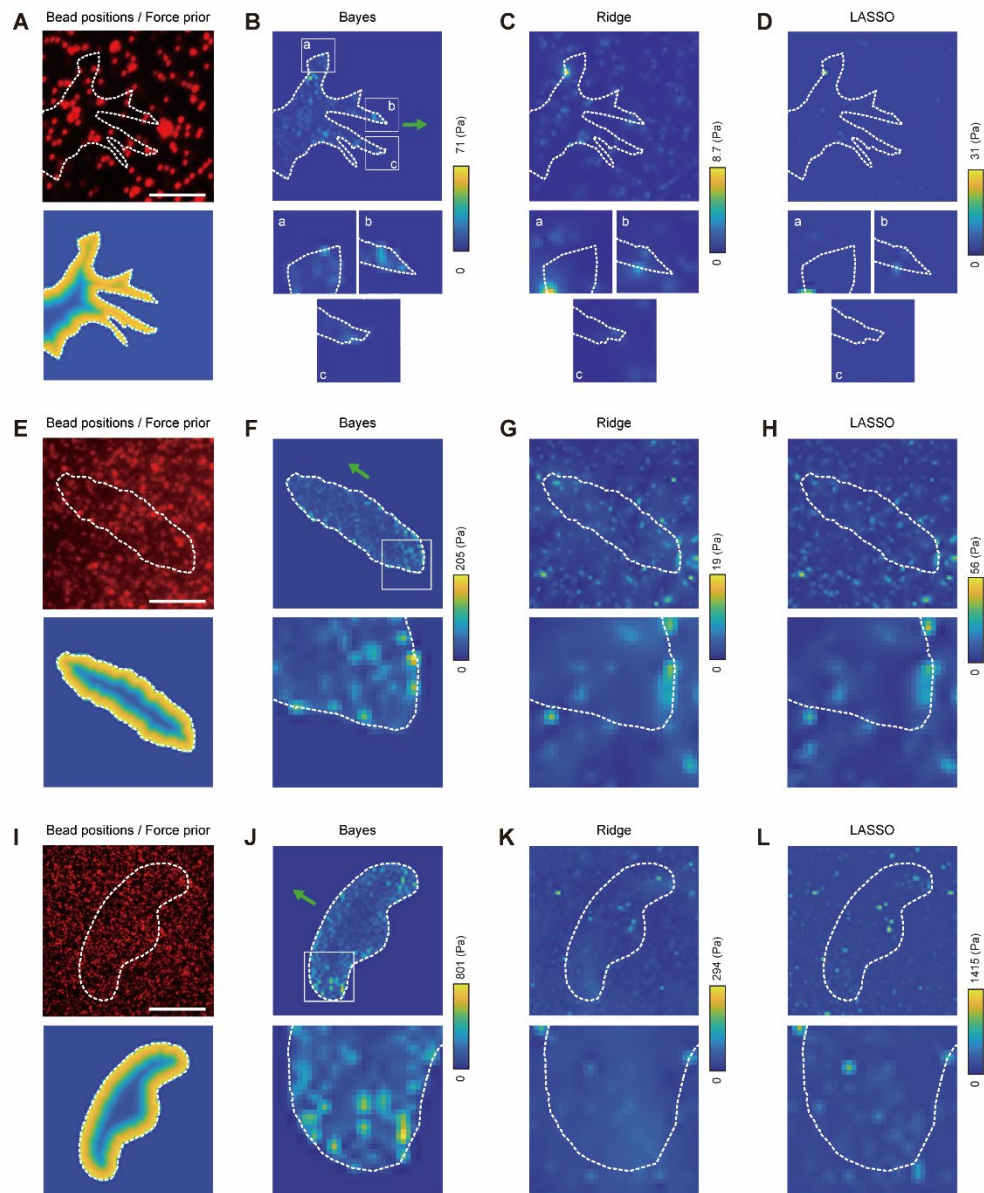


図 9 神経軸索の成長円錐、*Dictyostelium* およびケラトサイトの力推定の結果。(A–D) 成長円錐の力推定の結果。(A) 蛍光ビーズの顕微鏡画像 (上) と、提案手法で使用した事前分布の平均の力 (下)。背景色は力の大きさの相対強度を表す。(B) 提案手法による力推定の結果 (上) と、仮足先端の拡大図 (下部の a、b、c)。(C) と (D) はそれぞれ、Ridge 回帰による推定結果と、LASSO 回帰による推定結果を示している。(B) と同様に、仮足先端の拡大図 (a、b、c) も合わせて表示している。白い点線は細胞の形状であり、緑色の矢印は、成長円錐が運動していた方向を指している。(E–H) は、*Dictyostelium* の力推定の結果である。(F–H) の下側に配置したパネルのそれぞれは、(F) 中の矩形領域の拡大図である。(I–L) ケラトサイトの力推定の結果である。スケールバー：(A) 13 μm 、(E) 3 μm (I) 10 μm 。

考察

MCF による牽引力の事前分布

本研究は、少ないビーズ変位の観測から細胞の牽引力を推定するために、細胞形状を制約としたベイズアプローチを導入した。力が細胞形状を制御するため、形を力推定の制約条件として利用することは妥当である。しかし、細胞形状は複雑すぎて定式化することが困難であり、これまでの力推定は細胞形状を制約として用いてこなかった。実験的に細胞形状の取得が容易であるため、細胞形状は推定精度を高めるための安価な情報源である。本研究は、MCF による細胞変形を用いた LSM による形状表現が細胞形状の事前分布の定式化に向いていることを実証し、細胞形状の制約により妥当な力推定の実現性を示した。ベイズアプローチは力の制約の自由度が高いアルゴリズムである。力の事前分布を細胞形状に関係のない正規分布やラプラス分布とすれば、それぞれ Ridge 回帰と LASSO 回帰に帰着する。ベイズアプローチでは複雑な形状に基づく力の事前分布を導入できた。また、例えば GFP-actin を用いて細胞内のアクチンフィラメントを同時計測すれば、アクチンフィラメントの密度を導入して力の事前分布を拡張することも可能である。そのときには、補正パラメータ $\{s_n\}$ の事前分布を GFP-actin の密度に依存させることが一つの方法として考えられる。こうした柔軟さも私が提案するベイズアプローチの長所である。特に、エッジ付近で発生する牽引力は、アクチンフィラメントの動きと関係する⁵⁸。したがって、アクチンフィラメントの密度の測定も力推定の精度向上に貢献すると考えられる。さらに、MCF は 3D の力推定のための事前分布を計算することも可能である。また、MCF 以外の他の数学的アルゴリズムで、細胞の力をより良く表現する事前分布を設計することが可能であろう。

ベイズアプローチ、ビーズ位置の計測の問題

提案手法では主に力の事前知識を設計する際に多くの補正パラメータを導入する必要があった。しかし、補正パラメータの多さは大きな問題にならない。私は、力の推定の際に EM アルゴリズムを使用して、補正パラメータの最適化を行えたからである。一方で、事前分布の平均の力が向く方向を定義する、MCF のシミュレーションは、曲率の拡散係数や細胞を収縮する時間間隔のパラメータを持つ。これらのパラメータを最適にするアルゴリズムは存在しない。しかし、MCF 利用の目的は、細胞内側のラフな方向の定義を数学的に記述することである。数値シミュレーションの結果からは、MCF による事前分布は、必ずしも真の力とは一致しなかったが、それでも推定の精度を向上させたといえる。したがって、MCF に関わるハイパーパラメータは推定結果に大きな影響を持たないであろうが、細胞に依存してある程度のチューニングを

行うことで、よりもっともらしい力を推定することが可能になるかもしれない。細胞形状とビーズの位置の定量化の精度はハイパーパラメータよりも推定結果に重大な影響を持つ。特にビーズの位置は基質の変形を評価する重要な変数である。私は、TFM 画像からビーズの位置を検出する自動化処理とマニュアルによる修正機能を持つソフトウェアを開発し (補足資料)、ビーズの位置の精度を高めた。

他の手法の問題点、比較

Ridge 回帰や LASSO 回帰は、ビーズが存在する場所で力が発生したと仮定し、モデル式(3)に合うように基質の応力を推定する。この仮定はビーズ密度と関係しないので、高いビーズ密度を用いても採用され続ける。それは低いビーズ密度の場合にビーズ位置のばらつきが大きくなるので力の推定結果を不安定にする (図 S3 and S4)。ベイズアプローチは細胞形状にもとづく事前知識が強く力の制約をするので、ビーズ配置に起因する確率性を抑えることができる。TFM 画像からの力推定も、ベイズアプローチの優位性を示唆する。ケラトサイトは横長の形状をもち、左右両端で局所的にインテグリンによる強力な力を発生させながら移動する^{58,70}。私も3つの手法で同様の力を推定した (図 9I-L)。Maxime の報告によれば、ケラトサイトの前方のラメリポディアにおいては、アクチンの流動速度が比較的緩やかである一方で、その速度と、基質の変形方向がよく揃う⁵⁸。同様の現象は他の研究^{20,73}でも見られ、ラメリポディアで基質と細胞の接着が強くなっていることが原因であると言われている。実際、ビーズはラメリポディアに引き込まれるような動きを見せた。したがって、ケラトサイトの前方の広いラメリポディアにおいて、小さくとも広い範囲に広がる力が存在するはずである。Ridge 回帰や LASSO 回帰がそのような力を前方のラメリポディアで推定しなかった。これは、これらの回帰による力推定の精度がよくなかった可能性があることを意味する。一方で、ベイズアプローチはラメリポディア部位で他の部位と比較可能なレベルで力を推定した。これらの結果は、ベイズアプローチの有意性を示すと考えられる。

今後の展開

細胞形状を用いたベイズ力推定は、他の手法と組み合わせることで大きな発展を見せるであろう。Mean deformation metrics (MDM) は細胞形状の変化から基質の変形を推定した⁷⁴。MDM も本研究のベイズアプローチも細胞形状を正確に抽出することが重要である。近年、深層学習で顕微鏡画像の細胞をセグメンテーションできるようになった^{75,76}。MDM で推定した基質変形と、本研究による細胞形状による力の prior を併用すれば、細胞の牽引力推定の精度を改善できる可能性がある。このような技術統合はオープンな課題として今後解決され、メカノバイオロジーの発展に大きく貢献するであろう。

補足資料

第一章の内容を補足するための資料をここにまとめている。この補足資料では、

1. 提案手法の技術的内容の補足（補足資料本文および、[図 S1](#)）
2. MSE と他の性能評価指標（AUC、DTM、DTMB）との相関（[図 S2](#)）
3. 補足となる数値シミュレーションの結果（[図 S3](#) と [S4](#)）

の2点の内容をカバーする。

提案手法の技術的内容の補足

Level Set Method を用いた力の方向の設計

LSF を用いた細胞形状の変化は Hamilton-Jacobi 方程式で記述できる。

$$\frac{\partial \phi(\mathbf{x}, t)}{\partial t} = F(\mathbf{x}, t; \phi) |\nabla \phi(\mathbf{x}, t)|, \quad (12)$$

ここで、 $F(\mathbf{x}, t; \phi)$ および $|\nabla \phi(\mathbf{x}, t)|$ は、各エッジポイントにおけるエッジの移動速度および法線ベクトルの長さである。エッジ点は $\phi(\mathbf{x}, t) = 0$ を満たす集合なので、 $\phi(\mathbf{x}, t)$ が増加して $\phi(\mathbf{x}, t) > 0$ となることは細胞の収縮を意味する。ゆえに速度 $F(\mathbf{x}, t; \phi)$ が正のとき細胞は収縮する。速度 $F(\mathbf{x}, t; \phi)$ は速度 $F(\mathbf{x}, t; \phi)$ を Mean curvature flow (MCF) ⁷⁷ を使って定義した。MCF は曲線または曲面の曲率を拡散して均一化するアルゴリズムである。各時刻のエッジ点における平均曲率の変化は次のように定義される。

$$\kappa(\mathbf{x}, t; \phi) = -\frac{1}{2} \nabla \cdot \left(\frac{\nabla \phi(\mathbf{x}, t)}{|\nabla \phi(\mathbf{x}, t)|} \right), \quad (13)$$

ここで $\nabla \phi(\mathbf{x}, t) / |\nabla \phi(\mathbf{x}, t)|$ は単位法線ベクトルであり、突出しているエッジでは $\kappa(\mathbf{x}, t; \phi)$ は負となり曲率を下げる。私はエッジ移動速度を以下のように定義した。

$$F(\mathbf{x}, t; \phi) = -D \kappa(\mathbf{x}, t; \phi) \quad (14)$$

ここで、 D は場所に依存しない拡散係数である。この定義により、曲率が大きい突出部ほど私は、式(S3)を式(S1)に代入し、十分に曲率が拡散する時刻 $t = \tau$ までエッジを移動させた。本研究では細胞の面積の 10% を基準に $\tau > 0.1[\text{Cell area}] / D$ となるように τ を設定した。この条件は、大きな面積を持つ細胞に対しては、曲率を拡散する時間を長くする。私は細胞変形のシミュレーションに MATLAB を使い、MCF の計算のために Mitchell のプログラムパッケージ ⁷⁸ を使用した。

EM アルゴリズム

私は EM アルゴリズムを使用し、各力の角度と大きさ $\{\theta_n, s_n\}$ ($n = 1, \dots, N$) の対数

事後確率分布 $\log P(\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N | \mathbf{u}_{obs})$ の最大化と、牽引力 \mathbf{f} の事後確率分布 $P(\mathbf{f} | \mathbf{u}_{obs}, \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N)$ の近似を同時に行った。 \mathbf{f} の事後確率分布を含んだ尤度

$$P(\mathbf{u}_{obs} | \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N) = \frac{P(\mathbf{u}_{obs} | \mathbf{f}) \times P(\mathbf{f} | \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N)}{P(\mathbf{f} | \mathbf{u}_{obs}, \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N)}$$

を用いて、力の角度と大きさの事後確率分布は

$$P(\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N | \mathbf{u}_{obs}) \propto P(\mathbf{u}_{obs} | \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N) \times P(\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N), \quad (S7)$$

と書ける。ゆえに、 $\{\theta_n, s_n\}$ の対数事後確率分布は、

$$\log P(\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N | \mathbf{u}_{obs}) = \log P(\mathbf{u}_{obs} | \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N) + \log P(\{s_n\}_{n=1}^N) + \text{const.}, \quad (S8)$$

となる。ここで私は方向事前知識を第三項に含めた。ビーズ変位の観測 \mathbf{u}_{obs} に対し、私は EM アルゴリズムを導入して \mathbf{f} を推定する近似関数を求めつつ、式(S8)からそのハイパーパラメータ $\{\theta_n, s_n\}$ の推定を行った。

式(S8)の第1項と第2項の和が対数事後分布の最大値を決める。第1項について、私は \mathbf{f} 事後分布 $P(\mathbf{f} | \mathbf{u}_{obs}, \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N)$ を近似する確率密度関数 $q(\mathbf{f})$ を用いて以下のように式変形を行った。

$$\begin{aligned} \log P(\mathbf{u}_{obs} | \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N) &= \int_{\mathbb{R}^{2N}} q(\mathbf{f}) \log \frac{P(\mathbf{u}_{obs} | \mathbf{f}) \times P(\mathbf{f} | \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N)}{P(\mathbf{f} | \mathbf{u}_{obs}, \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N)} d\mathbf{f} \\ &= - \int_{\mathbb{R}^{2N}} q(\mathbf{f}) \log \frac{q(\mathbf{f})}{P(\mathbf{u}_{obs} | \mathbf{f}) \times P(\mathbf{f} | \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N)} d\mathbf{f} \\ &\quad + \int_{\mathbb{R}^{2N}} q(\mathbf{f}) \log q(\mathbf{f}) d\mathbf{f} \\ &\quad - \int_{\mathbb{R}^{2N}} q(\mathbf{f}) \log P(\mathbf{f} | \mathbf{u}_{obs}, \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N) d\mathbf{f}. \end{aligned} \quad (S3)$$

式(S3)の第1項の積分は、カルバックライブラーダイバージェンスとして知られる非負の値であり、 $q(\mathbf{f}) = P(\mathbf{u}_{obs} | \mathbf{f}) \times P(\mathbf{f} | \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N)$ の場合に0となる。私は EM アルゴリズムに基づき、この条件を満たしながら \mathbf{f} 事後分布の近似 $q(\mathbf{f})$ と $\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N$ を交互に更新し、式(S2)を最大化した。 k 回目の更新における $\{\theta_n, s_n\}$ の値を $\{\theta_n^k, s_n^k\}$ と書くこととする。expectation ステップでは $\{\theta_n^k, s_n^k\}$ を固定し、 $q(\mathbf{f})$ を正規分布で近似する。

$$q(\mathbf{f} | \boldsymbol{\mu}_f, \Sigma_f) \propto \exp \left\{ -\frac{1}{2} (\mathbf{f} - \boldsymbol{\mu}_f)^T \Sigma_f^{-1} (\mathbf{f} - \boldsymbol{\mu}_f) \right\}$$

パラメータの平均 $\boldsymbol{\mu}_f$ と共分散 Σ_f は、式(S3)の第1項がゼロとなる値とする。

$$\Sigma_f = (\alpha G^T G + \beta I_{2N})^{-1}$$

$$\boldsymbol{\mu}_f = \Sigma_f (\alpha G^T \mathbf{u}_{obs} + \beta \mathbf{f}_\mu \{\theta_n^k, s_n^k\}),$$

ここで、各パラメータと変数についてはテキストを参照せよ。maximization ステップでは、対数尤度 (式(S6)) に近似分布 $q(\mathbf{f} | \boldsymbol{\mu}_f, \Sigma_f)$ を代入すると、対数事後分布 (式(S5)) はこれになる。

$$Q^k(\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N) = - \int_{\mathbb{R}^{2N}} q(\mathbf{f} | \boldsymbol{\mu}_f, \Sigma_f) \log P(\mathbf{f} | \mathbf{u}_{obs}, \{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N) d\mathbf{f} - \gamma \sum_{n=1}^N |s_n|, \quad (S4)$$

私はこれを最大にする $\{\theta_n^k, s_n^k\}$ を求めた。EステップとMステップを繰り返すことで、

$$\mathbf{f}_{est} = \arg \max_{\mathbf{f}} q(\mathbf{f} | \boldsymbol{\mu}_f, \Sigma_f)$$

$$\{\theta_n^{k+1}, s_n^{k+1}\} = \arg \max_{\{\theta_n, s_n\}} Q^k(\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N) \quad (S5)$$

をそれぞれ逐次計算し、 \mathbf{f}_{est} が十分収束したときの $\{\theta_n, s_n\}_{n=1}^N$ を採用した。初期条件はそれぞれ、 $\theta_n^0 = 0$ 、 $s_n^0 = 1$ 、($n = 1, \dots, N$)だった。

定量化とベイズ推定のソフトウェア

私は、ベイズ推定、Ridge 回帰、LASSO 回帰による力推定を行うソフトウェアを MATLAB で実装した。以下の URL (<https://github.com/sakulab-software/>) から利用可能の予定である。本ソフトウェアは、顕微鏡画像を確認しながら操作できるグラフィカルなインターフェースを備える。画像の前処理や細胞領域の抽出などが直観的な操作で行える。本ソフトウェアの動作には、バージョン R2021a 以降の MATLAB 本体と Image Processing Toolbox が必要である。またこのソフトウェアは Parallel Computing Toolbox による計算効率化もサポートしている。

補足資料の図

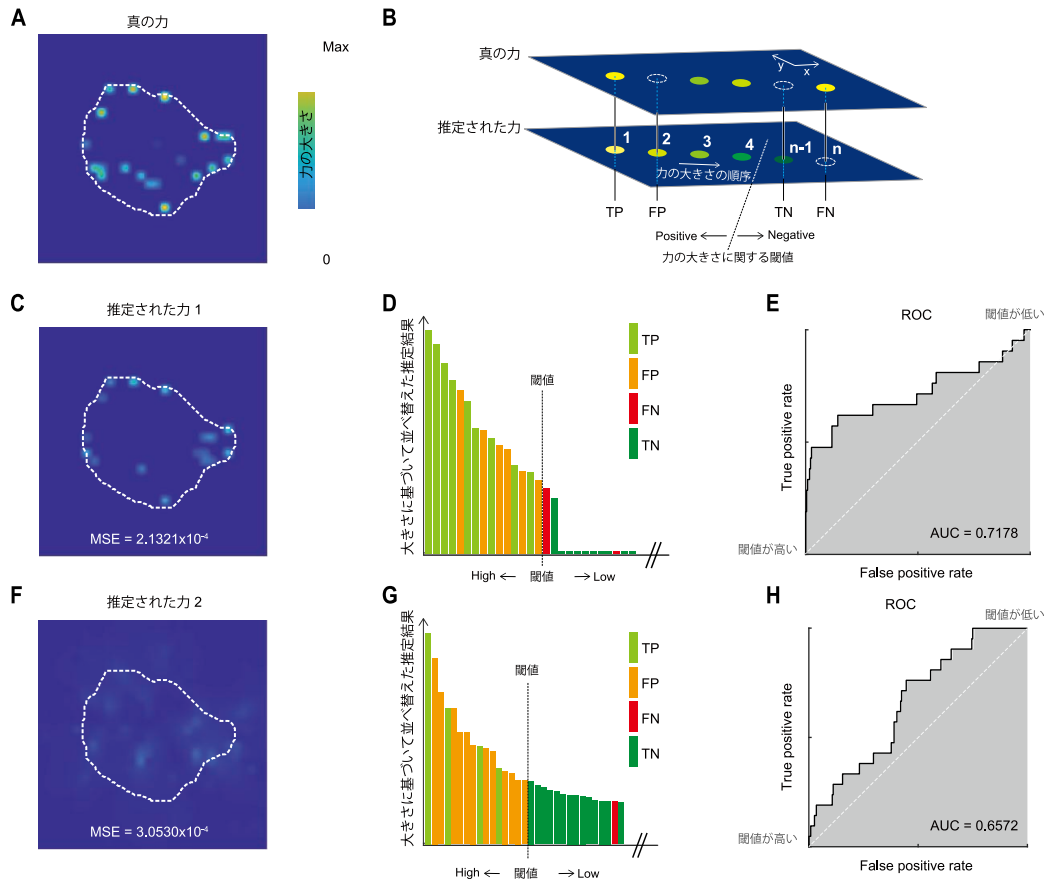


図 S1 力推定精度の評価のための、ROC 曲線の導出法。 (A) モデル細胞の力発生パターン。(B) 推定された力の内、検出可能な力とそうでないものを分ける閾値。私は、閾値を下回る大きさの力については、検出不能な力とし、negative に分類した。反対に、閾値を上回る大きさの力を、推定結果から検出可能な力とし、positive に分類した。また、真の力が発生した地点を True、しなかった地点を False と定義した。すると、推定結果の力は、4つの場合のいずれかに分類することが出来る。例えば、True positive (TP) は、True の地点で生じた positive な力である。True の点の内、True positive の力点の割合と、False の点の内、False positive の力点の割合から、ROC 曲線がプロットできる。(C) 提案手法によって推定された結果の 1 例。(D) (C) 内の力の大きさが降順に棒グラフで示されている。4つのラベルを棒の色によって表示した。(E) (D) から計算される、ROC 曲線。True positive rate は、 $TP / (TP + FN)$ によって与えられ、False positive rate は、 $FP / (FP + TN)$ によって与えられる。閾値が最大の時は、推定されたすべての力が negative となり、縦軸と横軸が同時に 0 を取る。反対に、閾値が最小の時は、推定されたすべての力が positive となり、結果、縦軸の値と横軸の値が同時に 1 を取る。閾値を変えながら、True positive rate と False positive rate を算出することで、ROC 曲線を引くことが出来る。ROC 曲線の下部の面積が Area under the curve (AUC) である。力推定の検出性能が良い時、AUC の値は 1 に近づき、悪い時は、0.5 に近い値となる。(F-H) は、Ridge 回帰によって推定した力を用い、(C-E) と同じようにして ROC を引く過程を示す。

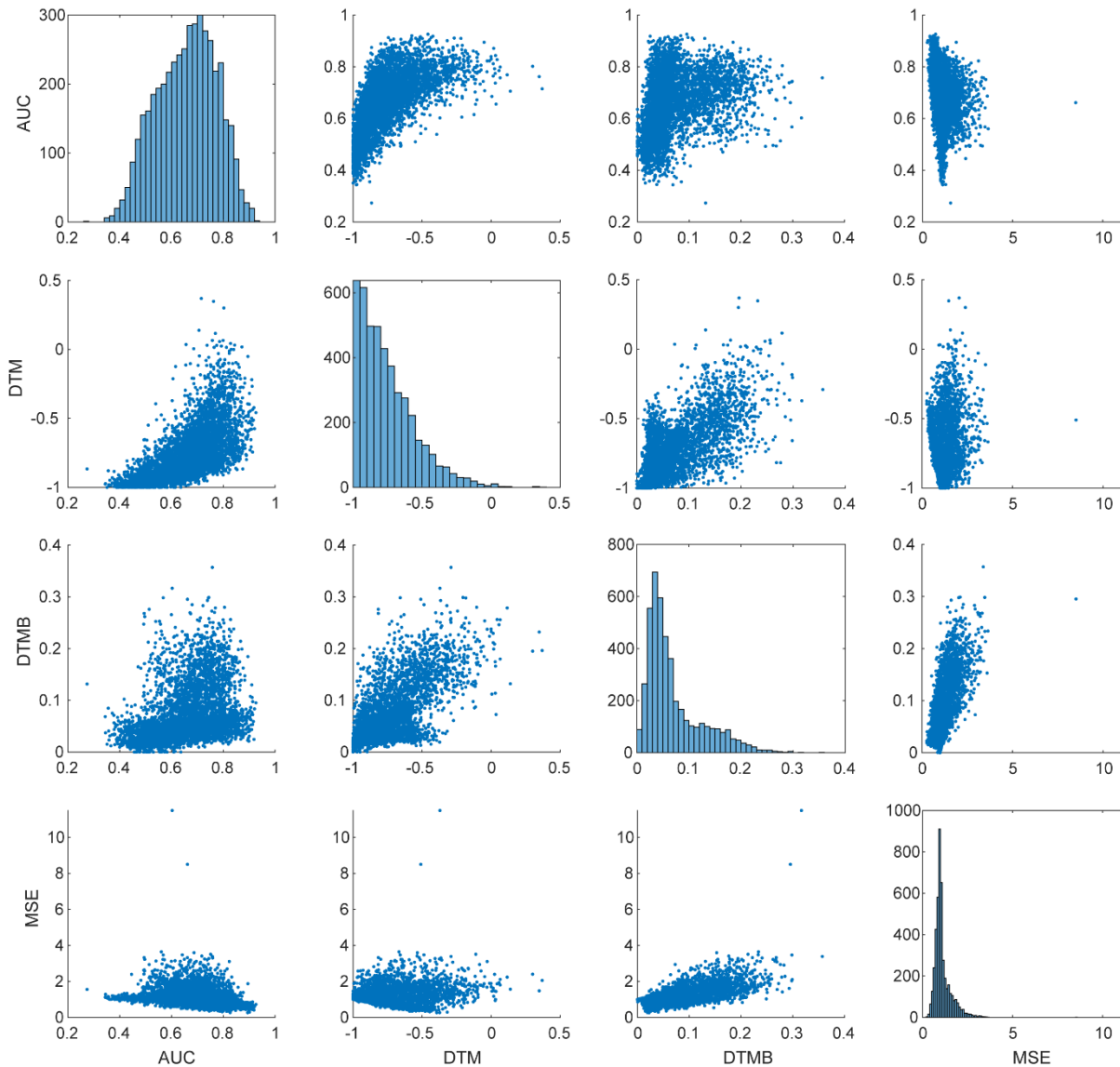


図 S 2 AUC、DTM、DTMB、MSE のペアプロット。4つの精度評価指標のうち、2つからなる可能なペアを網羅し、散布図にしたものである。例えば、1番上の段の左から2番目では、AUCを縦軸、DTMを横軸としてプロットした散布図が配置されている。対角線には、それぞれの精度評価指標のヒストグラムが示されている。それぞれの散布図やヒストグラムは、[図 8G](#)と同じ推定結果から算出された ($n=125$)。AUCが1に近い時でも、DTMは負の値を取ることがあり、DTMBが比較的大きい時があった。MSEに関してみれば、AUCが1に近い時、概ね0に近い値となっていた。DTMとDTMBの関係からは、それら2つを同時に0にするような推定結果は無かったことを示し、それぞれにトレードオフが生じていたことが読み取れる。また、MSEはDTMBとほとんど線形に相関した。総合して、4つの指標全てをよくするような推定は、本研究で行ったシミュレーションでは達成されなかったといえる。

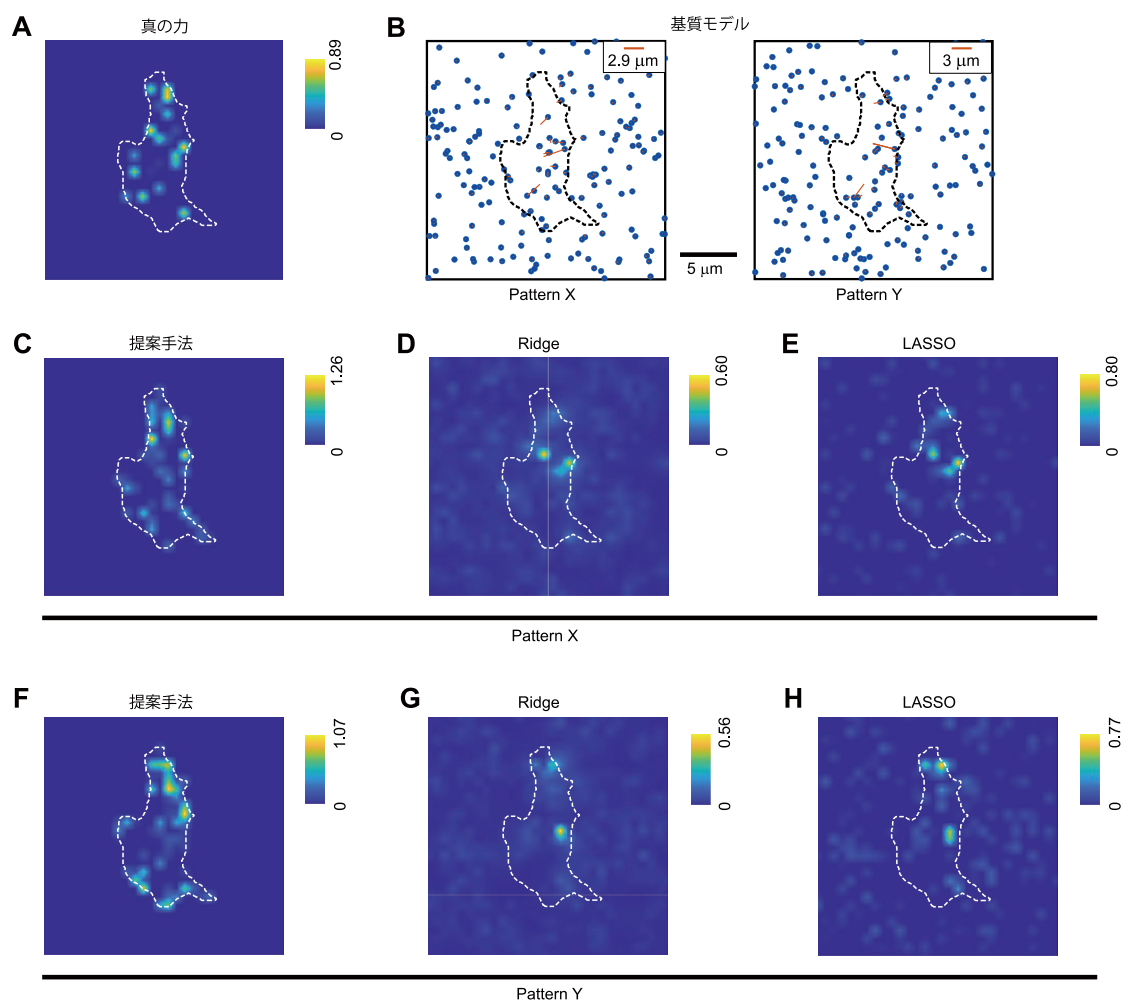


図 S 3 ビーズ密度が $0.05 \text{ beads}/\mu\text{m}^2$ の場合の、力推定結果のビーズ初期位置依存性。(A) 8A と同じ、力の真値。推定結果との比較のためにここでも再掲している。(B) ビーズ密度が $0.05 \text{ beads}/\mu\text{m}^2$ の場合の 2 つのビーズ初期位置。(C–E) Pattern X のビーズ初期位置における、3 つの力推定法による力推定結果の比較 (C : 提案手法、D : Ridge 回帰、E : LASSO 回帰)。(F–H) (C–E) と同様で、Pattern Y を用いた場合の力推定の結果。

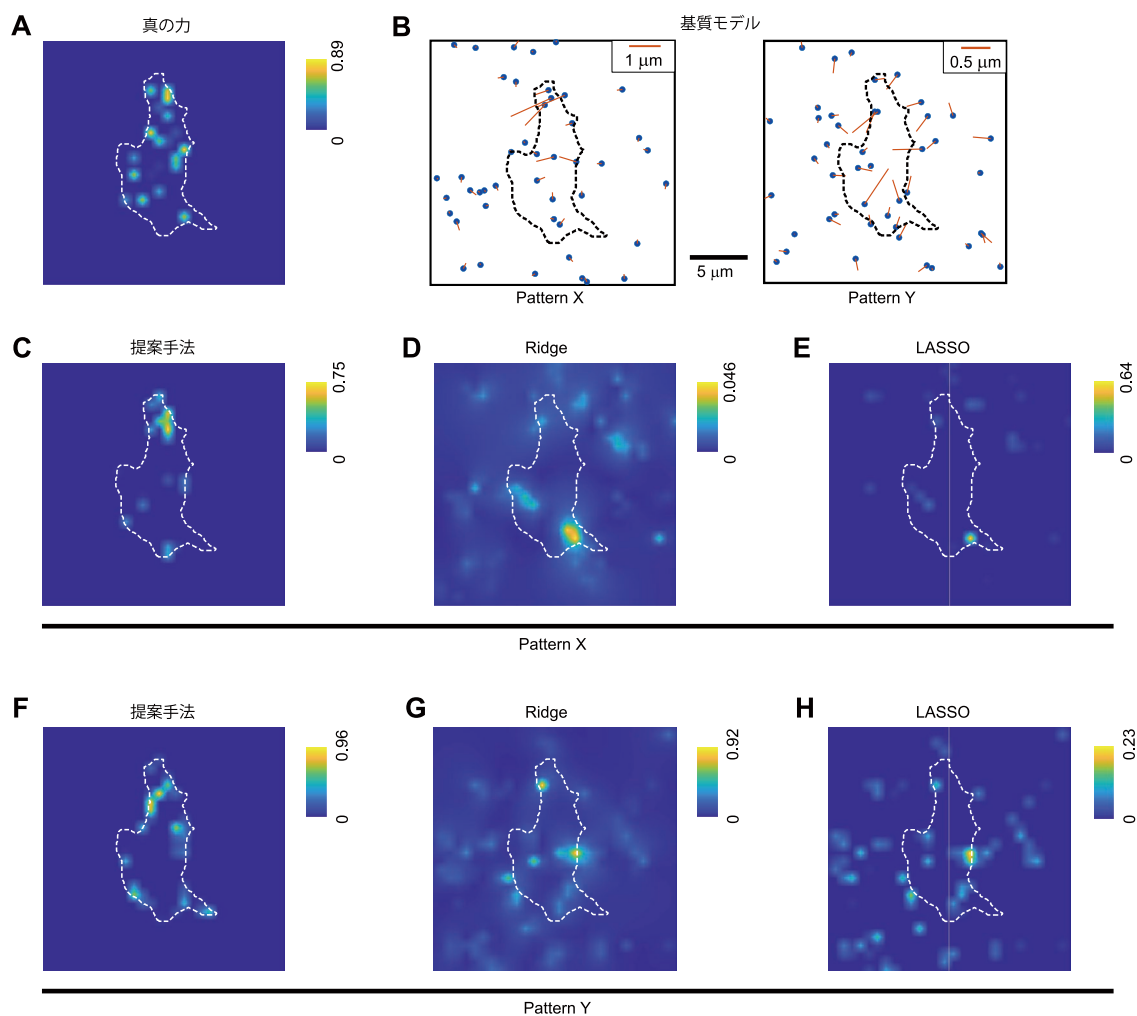


図 S 4 ビーズ密度が $0.15 \text{ beads}/\mu\text{m}^2$ の場合の、力推定結果のビーズ初期位置依存性。(A) [8A](#) と同じ、力の真値。推定結果との比較のためにここでも再掲している。(B) ビーズ密度が $0.05 \text{ beads}/\mu\text{m}^2$ の場合の 2 つのビーズ初期位置。(C–E) Pattern X のビーズ初期位置における、3 つの力推定法による力推定結果の比較 (C : 提案手法、D : Ridge 回帰、E : LASSO 回帰)。(F–H) (C–E) と同様で、Pattern Y を用いた場合の力推定の結果。

第2章

序論

背景

生物が生命活動を続ける上で、個々の細胞の運動（移動や変形）は不可欠である。例えば、1個の卵細胞の卵割から多細胞へ発達するとき、細胞は特定の細胞に分化し移動する。成体の体内においても細菌やがん細胞に対して、防御機構である各種免疫細胞がそれらを認識して追跡し、攻撃を行う。このような細胞の移動や変形は神経回路形成でも見られる。神経細胞が特定の場所まで移動し、数百 μm 以上の突起、軸索を適切な場所まで伸長させる。軸索が伸長する時、様々な誘導因子が軸索先端の成長円錐を誘引して、複雑な神経回路網が形成される。

基質上のある特定の接着分子を細胞が認識して、方向性のある移動をすることをそれぞれ *haptotaxis*（走触性）という。走触性の発現のためには、基質と直接接着する、細胞接着因子の機能や膜上における動態、および、細胞の形状を決める細胞骨格と基質に与える牽引力が決定的な役割を持つ。

神経軸索で強く発現する細胞接着因子として、よく知られているタンパクの一つが、L1-CAM である^{79,80}。誘因性の軸索ガイダンス因子である、Laminin とは直接結合することが知られている⁸⁰⁻⁸³。L1-CAM が関与する成長円錐が基質上の Laminin を認識して、強力な牽引力を生み出す仕組みについては、研究が進められ、2つの分子シグナリングによる仮説モデルが提示されている。1つは、Laminin によって、Fアクチンの重合の亢進と、ミオシン II の活性化が引き起こされ、Fアクチンのレトログレードフローが速くなることで大きな推進力が生じる仮説である^{84,85}。もう一つは、Laminin によって Fアクチンと L1-CAM の結合が強くなり、L1-CAM が基質を滑る速さが増し、大きな推進力が出るという仮説である^{21,86}。しかし近年、ポリリジン上に印刷した Laminin のマイクロパターンを印刷した特殊な基質（[図 10A](#)）と、1分子計測技術により、Laminin 上で Fアクチンと L1-CAM の流動が低速化し、牽引力が大きくなることが明らかとなった⁷³。それゆえ、最近では、Shootin1a や Cortactin、L1-CAM、アクチン繊維、ミオシン II からなる分子マシーナリー（[図 10B](#)）が Laminin による軸索の走触性を引き起こすために必要であるという第3の仮説モデル⁷³が提起されている。

不明な点と解決策

既存の研究により、Laminin による走触性の分子メカニズムについては詳細に明らかにされてきた。しかし、Laminin 存在下で強い推進力が出ることと、Laminin を認識した指向性の運動が生じることは等しいものではない。なぜなら、力発生は細胞周縁部をはじめ、細胞と基質が触れ合う面のいたるところで行われ、それぞれが異なる方向の推進力を同時に生み出している^{25, 62, 73}からである。そのため、軸索ガイダンスのメカニズムを正確に理解するためには、成長円錐で生み出された牽引力が、いかにして細胞接着分子の位置や細胞骨格の流れの速さを変え、細胞膜を変形させるかという、物理過程を検討する必要がある。この目的のためには、発生した牽引力と膜の移動量を結びつける、定量的な数理モデルを作成し、様々な基質条件下で成長円錐全体の変形をシミュレートすることが役に立つと考えられる。

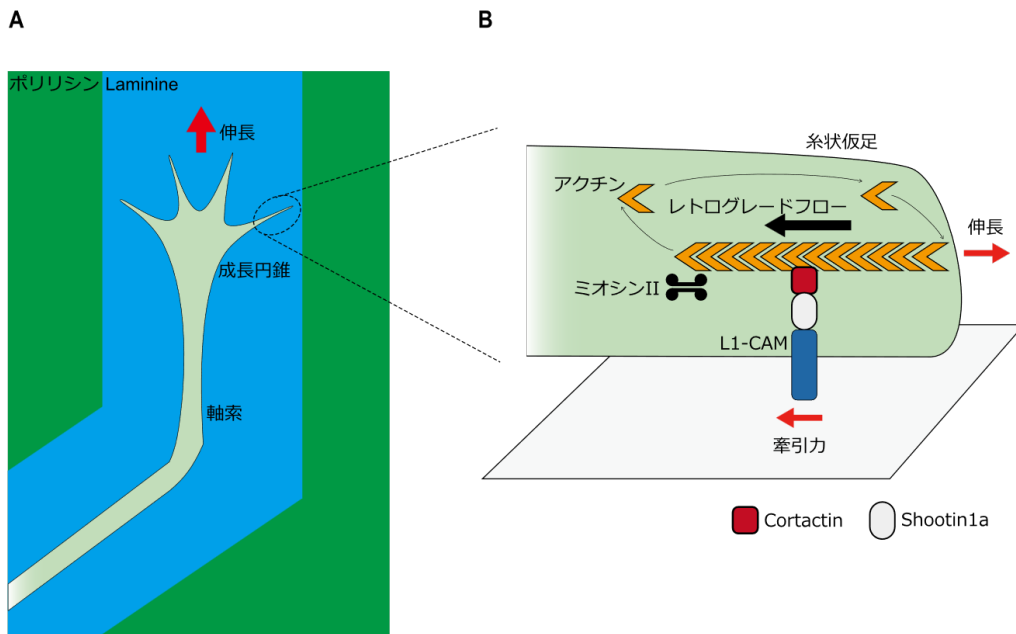


図 10 Laminin が誘起する、神経軸索の成長円錐の走触性。(A) 神経軸索は成長円錐に発現した L1-CAM によって細胞外基質上の Laminin を認識し、Laminin に沿って軸索を伸長させる。

(B) 神経軸索の Laminin 依存性のガイダンスのために必要な、牽引力を生み出す分子マシーナリー。Cortactin、Shootin1a によって L1-CAM が F アクチンに連結されている。F アクチンの重合・脱重合反応や、膜張力および、ミオシン II の機能によって引き起こされた F アクチンのレトログレードフローに伴い、L1-CAM も細胞中心に向かって移動する。L1-CAM が細胞外基質に結合しているなら、接着部位を起点として、細胞外基質に局所的なひずみを生じさせる。その結果、牽引力が生まれ、その反作用として、細胞膜の伸長のための推進力が生成される。

研究の目的

そこで、本研究の目的は、Fアクチンと L1-CAM を含む分子マシーナリーが牽引力を出す物理過程をモデリングし、その妥当性を評価する。特に、数理モデルが含む Fアクチン-L1-CAM の間の結合および、L1-CAM-細胞外基質の間の結合に関するパラメータのみを変更することで、ポリリジン上および、Laminin 上で生じる分子の流動速度と、牽引力を定量的に再現する。本モデルそのものは、単一の接着部位に注目し、L1-CAM の流動と発生する牽引力については、Fアクチンに沿って平行な 1次元の成分のみを考慮する。本モデルを細胞形状に沿って配置することで、成長円錐全体の変形をシミュレートするための数理モデルの足掛かりとする。

研究の意義

本研究では、Laminin による走触性が、Fアクチンと L1-CAM を中心とした分子マシーナリーと、その構成要素の力学によって定量的に説明できることを示す点で意義がある。本研究で提示する数理モデルを利用して、成長円錐全体の変形・移動のシミュレーションを行うことで、より一般の走触性因子による軸索ガイダンスの仕組みの理解につながることを期待される。また、L1 の遺伝子変異は、L1 症候群として総称される、水頭症と MASA 症候群（精神発達遅延、失語症、痙性歩行、母指の内点屈折）の原因となることが報告されている⁸⁰。そのため、本研究で得た知見が、L1 症候群の治療法の開発につながる可能性がある。

材料と方法

生物学的知見

軸索ガイダンス分子 Laminin と L1-CAM

神経成長円錐の細胞接着因子である L1-CAM が、細胞外基質に付着している Laminin と結合すると、L1-CAM の流動速度が遅くなることが、阿部らにより報告された⁷³。この報告によれば、L1-CAM のポリリジン上での流動速度と、Laminin 上での流動速度は有意に異なっていたが、L1-CAM の変異体を発現した成長円錐では、L1-CAM の流動速度は、ポリリジン上と Laminin 上で変化がなかった。また、成長円錐の L1-CAM の動態は、およそ一定の流動速度を保つ Slip と、一時的に流動がストップする Grip の2つの状態をスイッチしながら変動することが知られている⁷³(**図 11**)。同様の現象は、モーリーフィッシュ (*Poecilia shpenops*) の鱗由来のケラトサイトのエッジ付近でも見られた⁶⁰。ポリリジン上では、野生型 L1-CAM はほとんど Slip 状態をとって、連続的な流動を持続しているが、Laminin 上では Grip 状態をとる時間が増え、Slip 状態と同程度になったが、一方で、L1-CAM の変異体を発現した成長円錐では、変異型 L1-CAM は野生型がポリリジン上で Slip 状態をとった時間と同じだけ、ポリリジン上と Laminin 上で Slip 状態をとった⁷³。

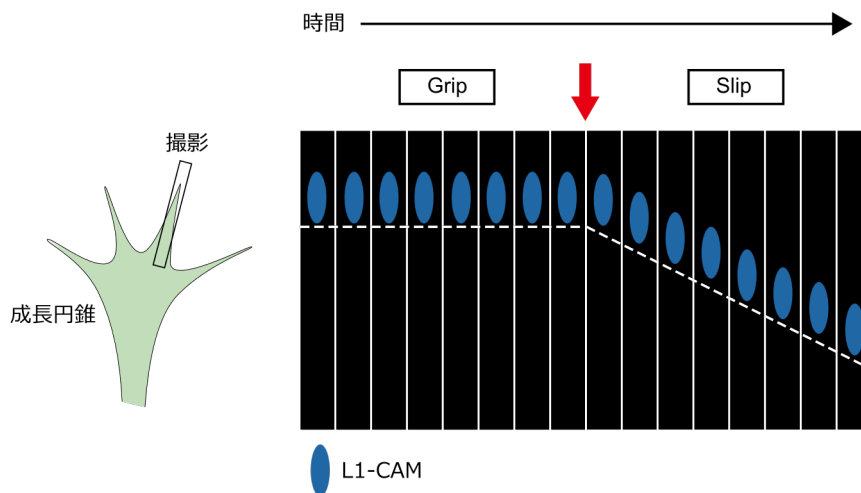


図 11 神経軸索の成長円錐における、Grip と Slip という 2つの状態。成長円錐の糸状突起の 1つに注目して、L1-CAM の位置をトレースすると、ほとんど停止する Grip 状態と、一定の速度で移動する Slip 状態の2つの間をスイッチしながら細胞中心に向かって流れていく様子が観察される。図の例では、赤矢印の時点で Grip から Slip に移行している。

細胞移動のための力の発生源と分子「クラッチ」の概念

細胞が移動するためには、細胞骨格を変形させて、細胞膜を進行方向に押す必要がある。そのために重要な力を発生させる仕組みの一つとして、Fアクチンのレトログレードフローが挙げられる。細胞周縁部では、Fアクチンは反矢じり端での重合によって、細胞膜から遠ざかるようにして流動する。この流動は、ミオシンIIによって媒介される。接着班 (focal adhesion; FA) が形成されない場合は、Fアクチンのレトログレードフローの速さは、細胞体全体で速く、均一になる^{87,88}。FAの形成は、Fアクチンのレトログレードフローを遅くし⁸⁷、同時に、細胞外基質での応力の蓄積を引き起こす²³。このプロセスは、FAがFアクチンと細胞外基質の間で力を伝達する、一種の分子「クラッチ」のように働くという考え^{20,60}を導いた。自動車に搭載されたクラッチでもそうであるが、FAはFアクチンの流動を一方向的に細胞外基質に伝達するわけではなく、細胞外基質に蓄積した応力が、アクチン繊維にフィードバックする可能性も十分あると考えられる。

膜張力の重要性

Fアクチンが細胞膜を押し出すことで、細胞膜は局所的に伸びることとなり、伸びに逆らうようにして、膜張力が発生する⁵⁵。また、私が所属する研究室で過去に行った研究では、走化性が誘引する軸索ガイダンスにおいて、成長円錐が1%程度の走化性誘因因子の化学勾配を検知するために、膜張力が細胞の全体に伝搬することが必要である可能性を示した⁸⁹。ゆえに、アクチン繊維の運動力学を考えるうえで、ミオシンIIによる引き込みと同等に、膜張力の存在も考慮に値すると考えられる。膜張力については、膜上に吸着したビーズをピペットで動かすことで測定した値が報告されている⁹⁰。

L1-CAMの流動とFアクチンのレトログレードフロー

L1-CAMは、Shootin1とCortactinの複合体(クラッチ)を介してFアクチンと結合し、Fアクチンのレトログレードフローに伴って細胞の中心の方に流動する。しかし、L1-CAMの平均的な流動速度は、Fアクチンよりも遅い⁷³。この事実は、次のように説明できると考えられる。図10Bで示した分子マシーナリーの構造では、L1-CAMはアクチン繊維と細胞外基質の両方と結合している。そのため、細胞外基質に蓄積した応力は、いったんL1-CAMに作用すると考えられる。その結果、L1-CAMの流動速度が遅くなると同時に、脂質二重膜の粘性流体としての性質によって、応力のエネルギーが一部拡散することになる。したがって、Fアクチンは細胞外基質からフィードバ

ックしてきた応力のエネルギーのうち、一部に抵抗するだけで、レトログレードフローを続行できる。

数理モデル

数理モデルの概要

本研究の目的は、F アクチン-L1-CAM-細胞外基質の間でやり取りされる力に注目して、発生する牽引力と膜張力、分子の流動速度との関係を定量的に再現することである。F アクチンの流動は、アクチン繊維の方向に沿って、概ね一方向であり、L1-CAM は F アクチンに結合して同じ方向に動くと考えた。よって、L1-CAM が基質をとらえて動くときに生じるひずみと、その際に発生する牽引力については、アクチン繊維と平行な成分のみを考慮することとして、私は 1 次元のモデリングを採用した。

軸索の成長円錐が出す、1 つの糸状仮足の断面に見立てた数理モデルが [図 13](#) である。モデルにおける設定、素過程が起きる順番をまとめたものが以下のリストとなる。

1. 初期状態では、F アクチン、L1-CAM の流動は起きていないとする。さらに、細胞外基質のひずみもなく、牽引力も発生していないこととする。
2. シミュレーションの最中は、膜は静止しているとし、膜張力は一定の大きさでアクチン繊維を後ろ向きに押すとする。
3. シミュレーション開始後は、膜張力によって F アクチンが押し返されるのに伴

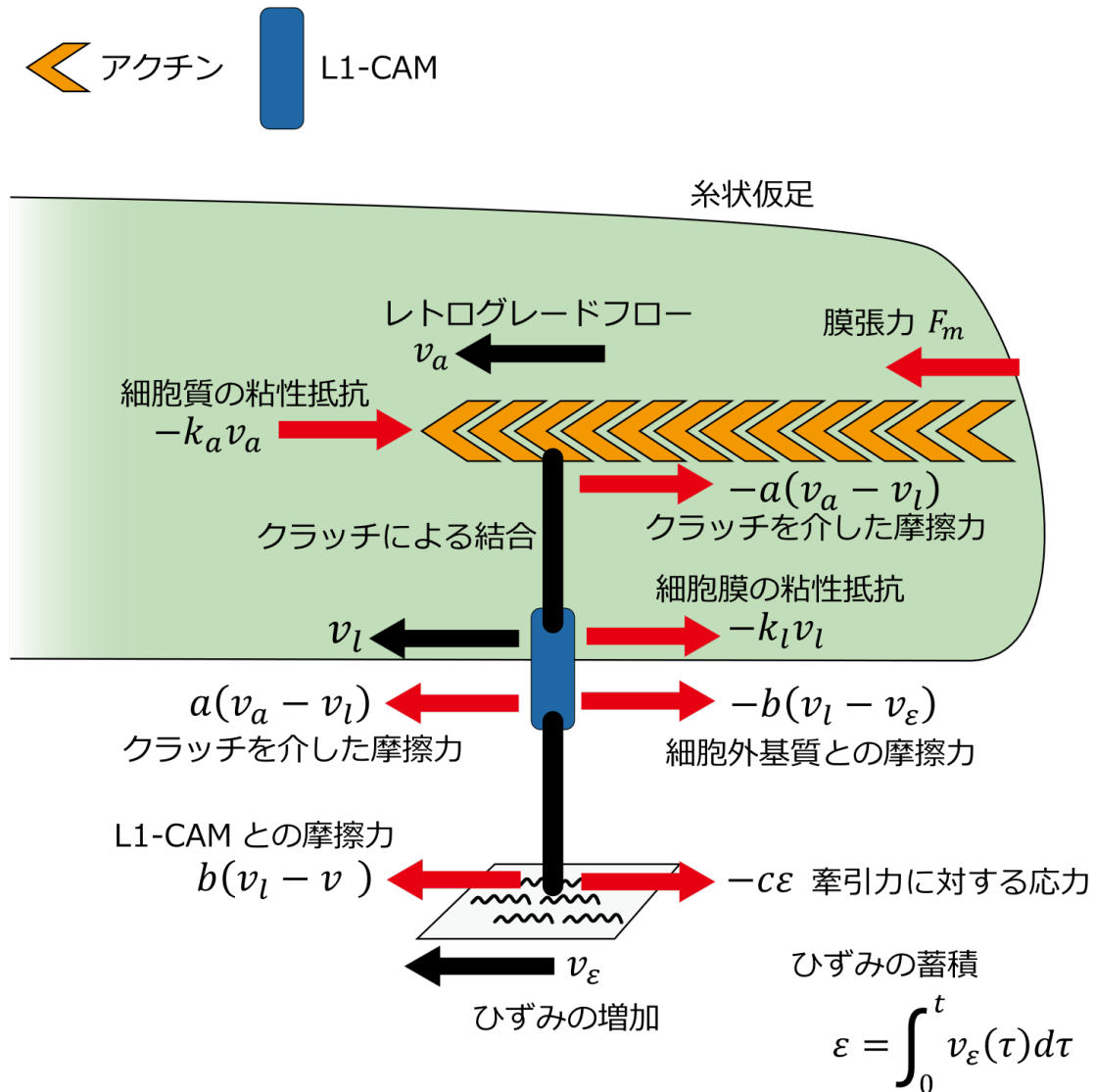


図 12 F アクチンと L1-CAM を中心とした、分子マシーナリーによる力発生の数値モデル。F アクチンには、膜張力 F_m と、細胞質からの粘性抵抗 $-k_a v_a$ に加えて、クラッチを介して結合した L1-CAM との速度差依存の力（摩擦力） $-a(v_a - v_l)$ が同時に作用する。その結果、速度 v_a で細胞膜から後ろ向きに流動する。他方で、L1-CAM には細胞膜からの粘性抵抗 $-k_l v_l$ が作用するのみならず、L1-CAM の流動速度の調整 v_l には、F アクチンとの間接的な摩擦による力 $a(v_a - v_l)$ と、直接結合する細胞外基質との摩擦力 $-b(v_l - v_\epsilon)$ も寄与する。L1-CAM と細胞外基質との接着点では、L1-CAM との摩擦力 $b(v_l - v_\epsilon)$ によって生じた瞬間的なひずみ v_ϵ が蓄積し、応力 $-c\epsilon$ が生じる。

って、静止していた L1-CAM との間に相対速度に比例する力（本研究では、これを広義の摩擦力と定義した）が生じる。

4. L1-CAM と細胞外基質との間でも相対速度が生まれ、生じた摩擦力によって基質がひずむ。
5. 基質のひずみが蓄積するのに伴って、応力が発生する。

広義の摩擦力の意味

本研究では、F アクチンと L1-CAM 間および、L1-CAM と細胞外基質の間で、相対速度に比例する力が発生するとした。その理由について説明する。Odde らによって提出された数理モデルは、F アクチンの流動速度と、基質にかかる牽引力との間の関係をよく再現することが確かめられている²⁰。特に、F アクチンの流動が速いときに、牽引力が小さくなり、流動が遅い時に、牽引力が強くなる現象をよく再現する。このモデルでは、FA を一つの「クラッチ」とみなし、それが直接 F アクチンと基質を架橋するばねであると考えられている。そして、F アクチンが流動するに伴い、ばねの両端の距離が長くなり、FA が F アクチンから脱離しやすくなる。脱離した FA は長さが元に戻り、時間が経つにつれて確率的に F アクチンと再結合する。結果として、F アクチンの流動が続く限り、FA は架橋、引張、脱離のサイクルを繰り返すことになる。ここで、FA の引張に使われたエネルギーは、1 サイクルごとに脱離の過程で失われることに注目すると、この数理モデルのクラッチは、入力されたエネルギーを散逸しながら出力に伝達する仕組みとなっていると言える。粘性流体中で物体が動くときも、速度の変化を妨げるように粘性力が生じると同時に、物体の運動エネルギーの一部を渦発生などのために消費する。力伝達に伴ってエネルギーが散逸するという点で、粘性抵抗と分子クラッチの仕組みは類似している。そこで、私は F アクチンと L1-CAM 間でやり取りされる力と、L1-CAM と細胞外基質の間でやり取りされる力を、相対速度に比例するように定義することとして、広義の摩擦力と定義した。

数理モデルの表式

本研究で使用する数理モデルは、ニュートンの第 3 法則に基づいて、F アクチンや L1-CAM、基質と L1-CAM の接着点の加速度と力が等しい事を数式で表現した連立方程式である。具体的には、

$$\begin{cases} m_a \frac{dv_a}{dt} = F_m - k_a v_a - a(v_a - v_l) \\ m_l \frac{dv_l}{dt} = a(v_a - v_l) - k_l v_l - b(v_l - v_\varepsilon) \\ m_\varepsilon \frac{dv_\varepsilon}{dt} = b(v_l - v_\varepsilon) - c\varepsilon \\ \varepsilon = \int_0^t v_\varepsilon(\tau) d\tau \end{cases} \quad (10)$$

という4本の数式となる。ここで、 v_a 、 v_l 、 v_ε 、 ε はそれぞれ、Fアクチンのレトログレードフローの速度、L1-CAMの流動速度、基質とL1-CAMの接着点の速度（すなわち、ひずみの増加速度）、および、基質のひずみである。式(10)は、時間がたっても変化しないパラメータを含んでいる。順番に k_a 、 k_l 、 a 、 b 、 c であり、それぞれ、細胞質の粘性抵抗係数、細胞膜の粘性抵抗係数、アクチンフィラメントとL1-CAM間の力の伝達効率、L1-CAMと基質間の力の伝達効率、および、基質の弾性係数である。本モデルを、行列とベクトルを用いて、次のように書き直すことが出来る。

$$M \frac{d}{dt} \mathbf{v} = K \mathbf{v} + \mathbf{f} \quad (11)$$

where,

$$\begin{aligned} \mathbf{v} &= (v_a, v_l, v_\varepsilon, \varepsilon)^T \\ M &= \begin{pmatrix} m_a & 0 & 0 & 0 \\ 0 & m_l & 0 & 0 \\ 0 & 0 & m_\varepsilon & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \\ K &= \begin{pmatrix} -k_a - a & a & 0 & 0 \\ a & -k_l - a - b & b & 0 \\ 0 & b & -b & -c \\ 0 & 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} \\ \mathbf{f} &= (F_m, 0, 0, 0)^T \end{aligned}$$

パラメータの同定方法

数理モデルの妥当性を検証するためには、実際の実験で得られた実測値を再現できることを確かめる必要がある。実験で観測される値が、系の十分に安定な状態を反映しているとすると、式(11)の左辺を0とおいた条件式（次の式(12)）を満たす、定常状態 \mathbf{v}^* が実測値に一致する。そこで、式(12)の \mathbf{v}^* を固定し K （に含まれる k_a 、 k_l 、 a 、 b 、 c ）と \mathbf{f} を求めることで、実際の細胞が持つパラメータを推定した。 F_m の値については測定値 (13.6 pN)⁹⁰を採用したため、 \mathbf{v}^* から推定したのは K のみである。

$$K \mathbf{v}^* + \mathbf{f} = \mathbf{0} \quad (12)$$

式(12)から直ちに、 $\mathbf{v}_\varepsilon^* = \mathbf{0}$ が言える。私は、MATLABの最適化ツールを用いて解を探索し、その値を数理モデルのパラメータとした。

結果

ポリリジン上の分子の流動速度と牽引力を再現するパラメータの同定

はじめに、私は、1分子計測によって得られた、ポリリジン上の軸索の成長円錐における、FアクチンおよびL1-CAMの流動速度と、生み出された牽引力の実測値（それぞれ、 $4.7 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$ 、 $3.0 \pm 0.5 \mu\text{m}/\text{min}$ 、 $2.1 \pm 0.4 \text{ Pa}$ ）⁷³を再現するパラメータを同定した。図14は、私が得たパラメータの値（図14A）と、そのパラメータの下で与えられる定常状態（図14B）を示しており、定常状態は実測された値によく一致したといえる。細胞質の粘性抵抗係数 k_a や、細胞膜の粘性抵抗係数 k_l よりも、FアクチンとL1-CAM間の力の伝達効率 a や、L1-CAMと細胞外基質間の力の伝達効率 b が大きな値を取った。

Laminin 上の分子の流動速度と牽引力を再現するパラメータの同定

次に、Laminin 上の軸索の成長円錐における、FアクチンおよびL1-CAMの流動速度と、生み出された牽引力の実測値（それぞれ、 $2.6 \pm 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$ 、 $1.0 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$ 、 $8.2 \pm 0.4 \text{ Pa}$ ）⁷³を再現するパラメータを同定した。本研究では、FアクチンとL1-CAMの結合と、L1-CAMと細胞外基質の結合の強さが変わることによって、Laminin 上における

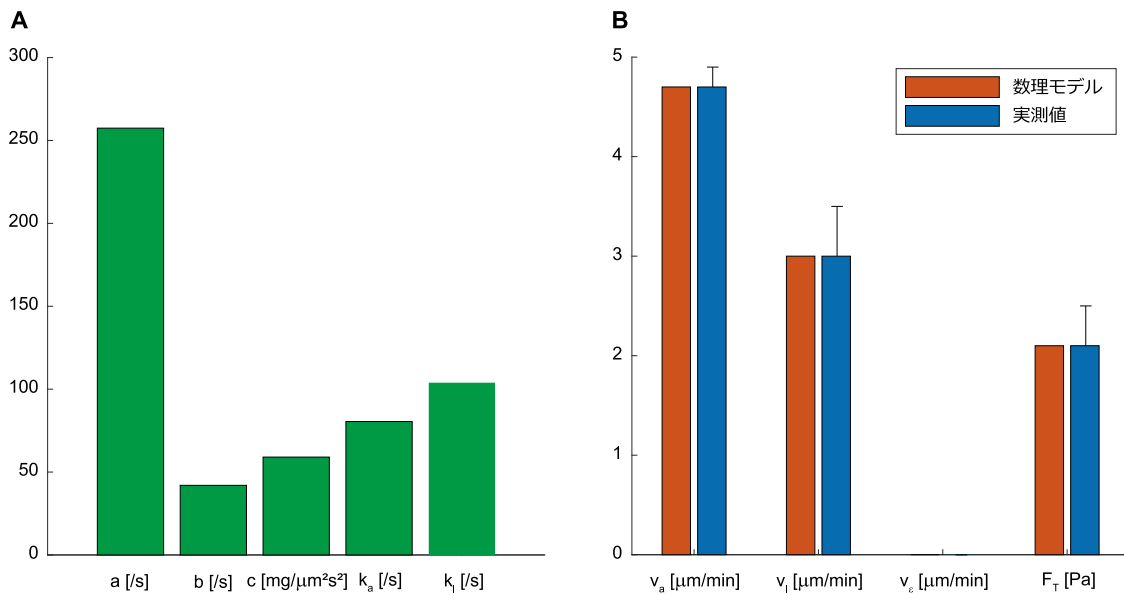


図13 ポリリジン上の軸索の成長円錐における、数理モデルのパラメータと、定常状態。(A) ポリリジン上の軸索の成長円錐における、数理モデルのパラメータ。(B) 実測値と比較した、数理モデルの定常状態。ひずみの増加速度については、実測値がないので数理モデルとの比較はできないが、数理モデルの定常状態を示すためにあえて表示している。実測値についてのエラーバーは、報告された標準誤差の値である。

分子の流動の低速化と、牽引力の増加が同時に引き起こされることを示すことが目的である。また、細胞質や細胞膜の粘性抵抗である k_a 、 k_l が、直接基質に依存して調節を受けるとは考えにくい。したがって私は、 a と b 以外のパラメータについては、ポリリジン上の実測値を再現する場合の値をそのまま用いることとした。図 15A は、Laminin 上の軸索の成長円錐における a と b の値を示している。比較のため、前項でポリリジン上の成長円錐について同定した値も一緒に示した。私の数理モデルで実測値を再現するために、F アクチンと L1-CAM 間の力の伝達効率 a は、Laminin 上の成長円錐ではポリリジンの場合と比べて 1.38 倍に増加した。また、L1-CAM と細胞外基質間の力の伝達効率 b は、11.5 倍に増加した。5 つの内 3 つのパラメータの値は、ポリリジン上の場合と共通としたにも関わらず、数理モデルは Laminin 上の軸索の成長円錐で観測された、F アクチン、L1-CAM の流動速度および、発生した牽引力をよく再現した (図 15B)。

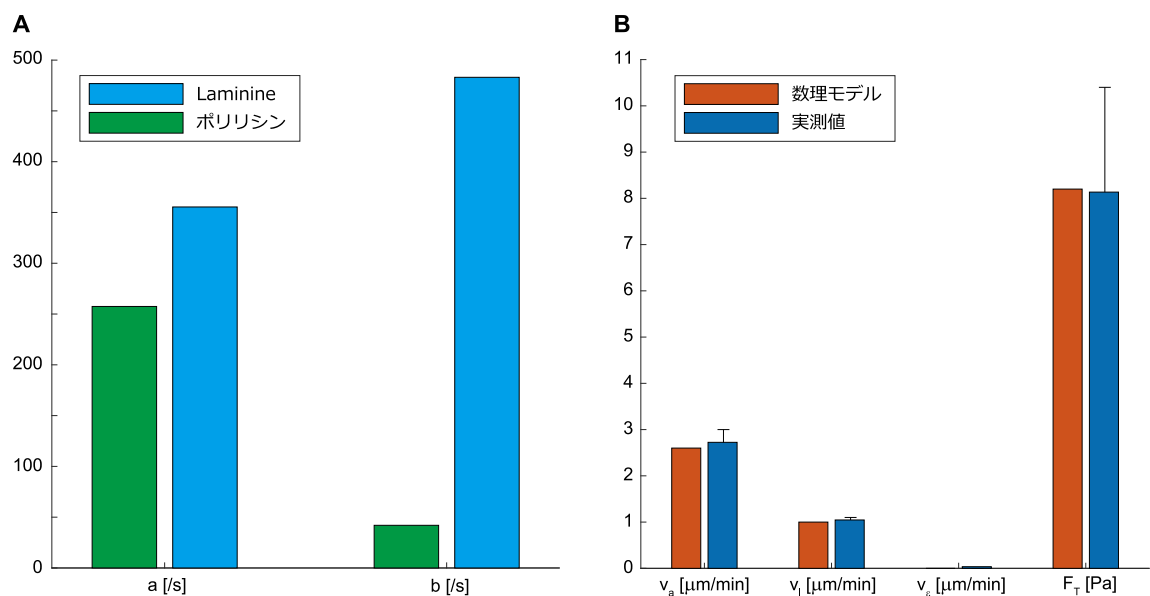


図 14 Laminin 上の軸索の成長円錐における、数理モデルのパラメータと、定常状態。(A) Laminin 上の軸索の成長円錐における数理モデルのパラメータのうち、ポリリジン上の場合と異なる 2 つのパラメータ a と b だけを示している。比較のために、ポリリジン上の場合の値も、図から再掲して示している。Laminin 上の軸索の成長円錐では、ポリリジン上の場合と比べて、 a が 1.38 倍、 b が 11.5 倍に増加した。(B) 実測値と比較した、数理モデルの定常状態。ひずみの増加速度については、実測値がないので数理モデルとの比較はできないが、数理モデルの定常状態を示すためにあえて表示している。実測値についてのエラーバーは、報告された標準誤差の値である。

考察

数理モデルの妥当性

本研究では、糸状仮足で推進力を生むための、F アクチン、クラッチ、L1-CAM からなる分子マシーナリーの動作原理を数理的にモデリングし、数理モデルの定常状態が実測値を再現できる可能性を示した。実測値が系の定常状態を表すことは、本研究の段階では仮説にすぎないが、糸状仮足の構造が 10 秒程度持続し、また、Grip 状態の F アクチンおよび L1-CAM の流動速度が概ね一定に保たれる⁷³ことから、実際に成立している可能性はある。モデルが含むパラメータの内、F アクチン-L1-CAM 間の力の伝達効率と、L1-CAM-細胞外基質間の力の伝達効率のみを変更することで、ポリリジンと Laminin という 2 つ異なる細胞外接着因子の上での、軸索の成長円錐が生む牽引力の違いを再現できた。さらに、F アクチンと L1-CAM の流動速度についても、数理モデルは定量的に一致した。この 2 つのパラメータが大きくなることは、Laminin と L1-CAM が接着することと、Laminin が F アクチンと L1-CAM の物理的相互作用を強くする^{21,86} ことと符合している。また、モデリングの際に仮定した、F アクチンや L1-CAM の流動を抑える、媒質の粘性抵抗の存在は、細胞が持つ一般のタンパクや構造体について成り立つと考えられる。ゆえに、膜張力が、F アクチンのレトログレードフローと、それに伴って移動する膜受容体を通じて細胞外基質に伝達するという、本研究の数理モデルの動作原理は、実験値をよく再現する仮説モデルとして有効である可能性がある。

本研究の問題点

しかし、F アクチンと L1-CAM の間でやり取りされる力が、相対速度に比例すると仮定したことは再考する余地がある。本研究で導入した、広義の摩擦力という概念の正当性が担保できないことは大きな理由の一つである。ほかの理由として、F アクチンと L1-CAM はクラッチによって間接的に接続しており^{21,73,86}、クラッチそのものの機械的特性によっても、F アクチンと L1-CAM との間でやりとりされる力が調節をうける可能性も考えられる。また、ポリリジン上や Laminin 上のいずれの場合についても、同定したパラメータの値が正しいとはまだ言えない。なぜなら、複数の細胞および、接着班で測定した実測値の平均に対してフィッティングした値だからである。また、本研究の数理モデルのフィッティングの際に用いた牽引力の値は、成長円錐が出した力を、成長円錐の全体の面積にわたって平均した値である。したがって、フィッティングの際に用いた値は、分子マシーナリーが出す力を正しく反映していない可能性がある。その上、ポリリジン上の場合と Laminin 上の場合とで、パラメータ b の値に 11.5 倍もの差が生じる理由についても本研究では分からない。

今後の展開

今後とりくむべき課題として、まず、分子マシーナリーが出した牽引力の値をより正確に定量することが挙げられる。そのためには、成長円錐の糸状仮足が出す局所的な力を推定する必要があるだろう。例えば、第1章でふれた力推定法を用いたり、TFMの他の方法を使用する、あるいは、新規な力の定量方法を開発したりすることが有効な手段となる。さらに、個別の細胞あるいは接着班について同様のフィッティングを行い、細胞ごと、接着班ごとにパラメータを求めることで、それぞれのパラメータのばらつきも合わせて同定する必要がある。ばらつきの情報が得られて初めて、ポリリジン上およびLaminin上での a と b の値の差について、統計的に検討することが可能となるからだ。

本研究の数値モデルの動作原理は、より一般の走触性因子依存の軸索ガイダンスに寄与する可能性がある。そこで、Lamininの他の走触性因子を使用した実験を行って、数値モデルの汎化性能を調べることに意義がある。また、軸索の成長円錐の移動方向を決定する仕組みを知るためには、単一の糸状仮足や分子マシーナリーの出す力を研究するのみでは不十分である。今後は、本研究の数値モデルが複数同時に動作する、成長円錐全体のモデリングを行い、細胞外接着因子や、牽引力（および反作用としての推進力）の他に移動方向決定のための因子がないか明らかにしたいと考えている。特に、本研究で考慮しなかった、GripとSlipの2つの状態間の遷移は、ロバストな走触性の実現のためには本質的であると考えられる。もしも成長円錐の各所で成立した分子マシーナリーがGripの状態のままであれば、成長円錐はいつまでも動くことが出来ないからである。したがって、成長円錐が正しくガイダンスされるためには、それぞれの分子マシーナリーが適切な時刻にSlip状態をとる必要があると考えられる。しかし、Slip状態の分子マシーナリーは、大きな牽引力を生み出すことが難しい²⁰。そのため、Slip状態の必要性を論じるためには、複数の分子マシーナリーの「綱引き」状態をシミュレートすることが不可欠となる。他には、成長円錐の形状も、軸索ガイダンスのために重要な因子として考えられる。走触性誘引物質をまんべんなく検出して力を出すためには、分子マシーナリーが偏りなく様々な方向に配置されることが理想的であるからである。したがって、私が今後取り組むモデルは、単純な成長円錐が分子マシーナリーに誘導される仕組みのほかに、成長円錐そのものによる、糸状仮足の破壊・生成のプロセスを含むこととなるだろう。

結言

本論文では第1章で、細胞の形状を使用した新たな力推定法について紹介し、第2章では、力学的な相互作用に基づく、神経軸索ガイダンスに寄与する走触性メカニズムのモデリングを行った。本研究では至らなかったが、今後、私の提案する力推定法を用い、成長円錐の走触性のみならず、さまざまな細胞走性のメカニズムを明らかにすることが出来るだろう。さらに、定量的な数理モデリングを、単に科学的な課題を解決する手段としてではなく、本文にも触れた L1 症候群をはじめとする、様々な疾患の治療法の開発などにも役立てていきたいと考えている。

謝辞

本論文を書き上げるにあたっては、本当に様々な方の手助けをいただきました。

特に、博士前期課程、博士後期課程の5年間、私と同じ歩幅で力推定の研究に向き合っていたいただいた、作村諭一教授には、まず初めに感謝の気持ちを述べたいと思います。さらに、神経システム生物学研究室の稲垣直之先生や、山口大学の岩館好昭先生をはじめとする、他の研究室の方々のご厚意により、たくさんの生データをいただきました。他にも、プロジェクトメンバーの様々な協力があったおかげで、細胞を使った実験を含むプロジェクトではありましたが、私は力推定のためのアルゴリズムの開発や、数理モデリングのための勉強などに専念することが出来ました。特に、実験を行った方全員のお名前を挙げることはできませんが、この場でお礼申し上げます。

また、稲垣直之先生と、数理情報学研究室の池田和司先生には、副指導教員として、都度都度のミーティングにご出席いただき、助言をしていただきました。稲垣先生からは、実験手法を紹介する国際論文誌 JoVE のためのお仕事にかかわる機会をいただき、とても感謝しております。池田先生とは、数理情報学研究室が年に一度主催するラボ旅行にご一緒させていただいたと思います。発表の準備のために大変緊張しておりましたが、とても良いトレーニングになりました。

研究室の学生の皆様にも、大変お世話になったと思っております。配属当時、作村教授は計算生物学研究室を主宰されており、教授の人柄と研究テーマにとっても惹きつけられたことを思い出します。その後、今のデータ駆動型生物学研究室へと名前が変わりましたが、一貫して作村教授の主催する研究室に在籍しておりました。そういうわけで、学生の中では一番の古株でありましたから、後輩諸君からは非常に扱いづらかったと思います。にもかかわらず、日々の雑事はもちろんのこと、私の話を聞いてくださったり、時には一緒に外出したりして、学生生活に大きなゆとりを与えていただきました。またしても、この場で全員のお名前を挙げることは叶いませんが、皆様それぞれに、深く感謝申し上げます。

Reference

1. Dufrêne, Y., Viljoen, A., Mignolet, J., and Mathelié - Guinlet, M. (2021). AFM in cellular and molecular microbiology. *Cell Microbiol*, e13324. 10.1111/cmi.13324.
2. Sabass, B., Gardel, M.L., Waterman, C.M., and Schwarz, U.S. (2008). High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances. *Biophys J* *94*, 207--220. 10.1529/biophysj.107.113670.
3. Plotnikov, S.V., Sabass, B., Schwarz, U.S., and Waterman, C.M. (2014). Methods in cell biology. *Methods Cell Biol* *123*, 367–394. 10.1016/b978-0-12-420138-5.00020-3.
4. Tranquillo, R., Lauffenburger, D., and Zigmond, S. (1988). A stochastic model for leukocyte random motility and chemotaxis based on receptor binding fluctuations. *The Journal of Cell Biology* *106*, 303–309. 10.1083/jcb.106.2.303.
5. Mogilner, A., Marland, E., and Bottino, D. (2001). A minimal model of locomotion applied to the steady gliding movement of fish keratocyte cells. In *The IMA Volumes in Mathematics and its Applications.*, P. K. Maini and H. G. Othmer, eds. (Springer), pp. 269–293. 10.1007/978-1-4613-0133-2_12.
6. Levchenko, A., and Iglesias, P.A. (2002). Models of eukaryotic gradient sensing: application to chemotaxis of amoebae and neutrophils. *Biophys J* *82*, 50–63. 10.1016/s0006-3495(02)75373-3.
7. Zheng, Y., Nan, H., Liu, Y., Fan, Q., Wang, X., Liu, R., Liu, L., Ye, F., Sun, B., and Jiao, Y. (2019). Modeling cell migration regulated by cell extracellular-matrix micromechanical coupling. *Phys Rev E* *100*, 043303. 10.1103/physreve.100.043303.
8. Dembo, M., Oliver, T., Ishihara, A., and Jacobson, K. (1996). Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method. *Biophys J* *70*, 2008--2022. 10.1016/s0006-3495(96)79767-9.
9. Maxian, O., Mogilner, A., and Strychalski, W. (2020). Computational estimates of mechanical constraints on cell migration through the extracellular matrix. *PLOS Comput Biol* *16*, e1008160. 10.1371/journal.pcbi.1008160.
10. Mogilner, A., Wollman, R., and Marshall, W.F. (2006). Quantitative modeling in cell biology: what is it good for? *Dev Cell* *11*, 279–287. 10.1016/j.devcel.2006.08.004.

11. Mogilner, A., and Edelstein-Keshet, L. (2002). Regulation of Actin Dynamics in Rapidly Moving Cells: A Quantitative Analysis. *Biophys J* *83*, 1237–1258. 10.1016/s0006-3495(02)73897-6.
12. Kleeberger, W., Bova, G.S., Nielsen, M.E., Herawi, M., Chuang, A.-Y., Epstein, J.I., and Berman, D.M. (2007). Roles for the stem cell-associated intermediate filament nestin in prostate cancer migration and metastasis. *Cancer Res* *67*, 9199--9206. 10.1158/0008-5472.can-07-0806.
13. O'Hayre, M., Salanga, C.L., Handel, T.M., and Allen, S.J. (2008). Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J* *409*, 635--649. 10.1042/bj20071493.
14. Calandra, T., and Bucala, R. (1997). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a glucocorticoid counter-regulator within the immune system. *Crit Rev Immunol* *17*, 77--88. 10.1615/critrevimmunol.v17.i1.30.
15. Luster, A.D., Alon, R., and Andrian, U.H. von (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* *6*, 1182--1190. 10.1038/ni1275.
16. Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* *274*, 1123--1133. 10.1126/science.274.5290.1123.
17. Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., and Springer, T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc National Acad Sci* *95*, 9448--9453. 10.1073/pnas.95.16.9448.
18. Dickson, B.J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* *298*, 1959--1964. 10.1126/science.1072165.
19. Charron, F., and Tessier-Lavigne, M. (2005). Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* *132*, 2251--2262. 10.1242/dev.01830.
20. Chan, C.E., and Odde, D.J. (2008). Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* *322*, 1687--1691. 10.1126/science.1163595.
21. Toriyama, M., Kozawa, S., Sakumura, Y., and Inagaki, N. (2013). Conversion of a signal into forces for axon outgrowth through Pak1-mediated Shootin1 phosphorylation. *Curr Biol* *23*, 529--534. 10.1016/j.cub.2013.02.017.

22. Stricker, J., Sabass, B., Schwarz, U.S., and Gardel, M.L. (2010). Optimization of traction force microscopy for micron-sized focal adhesions. *J Phys Condens Matter* *22*, 194104. 10.1088/0953-8984/22/19/194104.
23. Gardel, M.L., Sabass, B., Ji, L., Danuser, G., Schwarz, U.S., and Waterman, C.M. (2008). Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed. *J Cell Biology* *183*, 999--1005. 10.1083/jcb.200810060.
24. Tan, J.L., Tien, J., Pirone, D.M., Gray, D.S., Bhadriraju, K., and Chen, C.S. (2003). Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Proc National Acad Sci* *100*, 1484--1489. 10.1073/pnas.0235407100.
25. Lemmon, C.A., Sniadecki, N.J., Ruiz, S.A., Tan, J.L., Romer, L.H., and Chen, C.S. (2005). Shear force at the cell-matrix interface: enhanced analysis for microfabricated post array detectors. *Mech Chem Biosyst MCB* *2*, 1–16.
26. Harris, A.K., Wild, P., and Stopak, D. (1980). Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* *208*, 177–179. 10.1126/science.6987736.
27. Lee, J., Leonard, M., Oliver, T., Ishihara, A., and Jacobson, K. (1994). Traction forces generated by locomoting keratocytes. *J Cell Biology* *127*, 1957--1964. 10.1083/jcb.127.6.1957.
28. Landau, L.D., and Lifshitz, E.M. (1970). *Theory of elasticity Second Revised and Enlarged.* (Pergamon Press Ltd.).
29. Soiné, J.R., Brand, C.A., Stricker, J., Oakes, P.W., Gardel, M.L., and Schwarz, U.S. (2015). Model-based Traction Force Microscopy Reveals Differential Tension in Cellular Actin Bundles. *PLOS Comput Biol* *11*, e1004076. 10.1371/journal.pcbi.1004076.
30. Chan, C.E., and Odde, D.J. (2008). Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* *322*, 1687–1691. 10.1126/science.1163595.
31. Bornschlögl, T., Romero, S., Vestergaard, C.L., Joanny, J.-F., Nhieu, G.T.V., and Bassereau, P. (2013). Filopodial retraction force is generated by cortical actin dynamics and controlled by reversible tethering at the tip. *Proc National Acad Sci* *110*, 18928–18933. 10.1073/pnas.1316572110.
32. Stubb, A., Laine, R.F., Miihkinen, M., Hamidi, H., Guzmán, C., Henriques, R., Jacquemet, G., and Ivaska, J. (2020). Fluctuation-based super-resolution traction force microscopy. *Nano Lett* *20*, 2230--2245. 10.1021/acs.nanolett.9b04083.

33. Kushch, V.I. (2019). Elastic ellipsoidal inhomogeneity with imperfect interface: Complete displacement solution in terms of ellipsoidal harmonics. *Int J Solids Struct* *166*, 83–95. 10.1016/j.ijsolstr.2019.02.007.
34. Jasiuk, I., Sheng, P.Y., and Tsuchida, E. (1997). A spherical inclusion in an elastic half-space under shear. *J Appl Mech* *64*, 471–479. 10.1115/1.2788917.
35. Delfani, M.R., and Shahandashti, M.L. (2017). Elastic field of a spherical inclusion with non-uniform eigenfields in second strain gradient elasticity. *Proc Royal Soc* *473*, 20170254. 10.1098/rspa.2017.0254.
36. Dembo, M., and Wang, Y.-L. (1999). Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J* *76*, 2307--2316. 10.1016/s0006-3495(99)77386-8.
37. Butler, J.P., Tolic-Nørrelykke, I., Fabry, B., and Fredberg, J.J. (2002). Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* *282*, C595–C605.
38. Li, D., Colin-York, H., Barbieri, L., Javanmardi, Y., Guo, Y., Korobchevskaya, K., Moendarbary, E., Li, D., and Fritzsche, M. (2021). Astigmatic traction force microscopy (aTFM). *Nat Commun* *12*, 2168. 10.1038/s41467-021-22376-w.
39. Barbieri, L., Colin-York, H., Korobchevskaya, K., Li, D., Wolfson, D.L., Karedla, N., Schneider, F., Ahluwalia, B.S., Seternes, T., Dalmo, R.A., et al. (2021). Two-dimensional TIRF-SIM–traction force microscopy (2D TIRF-SIM-TFM). *Nat Commun* *12*, 2169. 10.1038/s41467-021-22377-9.
40. Yang, Z., Lin, J.-S., Chen, J., and Wang, J.H.-C. (2006). Determining substrate displacement and cell traction fields—a new approach. *J Theor Biol* *242*, 607--616. 10.1016/j.jtbi.2006.05.005.
41. Han, S.J., Oak, Y., Groisman, A., and Danuser, G. (2015). Traction microscopy to identify force modulation in subresolution adhesions. *Nat Methods* *12*, 653–656. 10.1038/nmeth.3430.
42. Suñé-Auñón, A., Jorge-Peñas, A., Oosterwyck, H.V., and Muñoz-Barrutia, A. (2016). L1-regularized reconstruction for traction force microscopy. 2016 IEEE 13th Int Symposium Biomed Imaging ISBI, 140–144. 10.1109/isbi.2016.7493230.
43. Suñé-Auñón, A., Jorge-Peñas, A., Aguilar-Cuenca, R., Vicente-Manzanares, M., Oosterwyck, H.V., and Muñoz-Barrutia, A. (2017). Full L1-regularized traction force microscopy over whole cells. *BMC Bioinformatics* *18*, 365. 10.1186/s12859-017-1771-0.

44. Kozawa, S., Sakumura, Y., Toriyama, M., Inagaki, N., and Ikeda, K. (2013). Bayesian cell force estimation considering force directions. *Neural Process Lett* *41*, 191--200. 10.1007/s11063-013-9320-y.
45. Gardel, M.L., Sabass, B., Ji, L., Danuser, G., Schwarz, U.S., and Waterman, C.M. (2008). Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed. *J Cell Biology* *183*, 999--1005. 10.1083/jcb.200810060.
46. Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S.L., Waterman-Storer, C.M., and Danuser, G. (2004). Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* *305*, 1782--1786. 10.1126/science.1100533.
47. Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453--465. 10.1016/s0092-8674(03)00120-x.
48. Forscher, P., and Smith, S.J. (1988). Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Cell Biology* *107*, 1505--1516. 10.1083/jcb.107.4.1505.
49. Lin, C.H., Espreafico, E.M., Mooseker, M.S., and Forscher, P. (1996). Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron* *16*, 769--782. 10.1016/s0896-6273(00)80097-5.
50. Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453--465. 10.1016/s0092-8674(03)00120-x.
51. Pantaloni, D., Clainche, C.L., and Carlier, M.-F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* *292*, 1502--1506. 10.1126/science.1059975.
52. Janetopoulos, C., Ma, L., Devreotes, P.N., and Iglesias, P.A. (2004). Chemoattractant-induced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation is spatially amplified and adapts, independent of the actin cytoskeleton. *P Natl Acad Sci USA* *101*, 8951--8956. 10.1073/pnas.0402152101.
53. Li, J., Han, D., and Zhao, Y.-P. (2014). Kinetic behaviour of the cells touching substrate: the interfacial stiffness guides cell spreading. *Sci Rep-UK* *4*, 3910. 10.1038/srep03910.
54. Lemmon, C.A., and Romer, L.H. (2010). A predictive model of cell traction forces based on cell geometry. *Biophys J* *99*, L78--L80. 10.1016/j.bpj.2010.09.024.

55. Helfrich, W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Zeitschrift Für Naturforschung C* *28*, 693--703. 10.1515/znc-1973-11-1209.
56. Helfrich, W. (1974). The size of bilayer vesicles generated by sonication. *Phys Lett A* *50*, 115–116. 10.1016/0375-9601(74)90899-8.
57. Helfrich, W. (1974). Blocked lipid exchange in bilayers and its possible influence on the shape of vesicles. *Zeitschrift Für Naturforschung C* *29*, 510–515. 10.1515/znc-1974-9-1010.
58. Fournier, M.F., Sauser, R., Ambrosi, D., Meister, J.-J., and Verkhovsky, A.B. (2010). Force transmission in migrating cells. *J Cell Biology* *188*, 287–297. 10.1083/jcb.200906139.
59. Aratyn-Schaus, Y., and Gardel, M.L. (2010). Transient frictional slip between integrin and the ECM in focal adhesions under myosin II tension. *Curr Biol* *20*, 1145–1153. 10.1016/j.cub.2010.05.049.
60. Jurado, C., Haserick, J.R., and Lee, J. (2005). Slipping or gripping? fluorescent speckle microscopy in fish keratocytes reveals two different mechanisms for generating a retrograde flow of actin. *Mol Biol Cell* *16*, 507–518. 10.1091/mbc.e04-10-0860.
61. Schaefer, A.W., Kabir, N., and Forscher, P. (2002). Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J Cell Biology* *158*, 139–152. 10.1083/jcb.200203038.
62. Hu, K., Ji, L., Applegate, K.T., Danuser, G., and Waterman-Storer, C.M. (2007). Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science* *315*, 111–115. 10.1126/science.1135085.
63. Iwadate, Y., and Yumura, S. (2008). Molecular dynamics and forces of a motile cell simultaneously visualized by TIRF and force microscopies. *Biotechniques* *44*, 739–750. 10.2144/000112752.
64. Evans, E.A. (1980). Minimum energy analysis of membrane deformation applied to pipet aspiration and surface adhesion of red blood cells. *Biophys J* *30*, 265–284. 10.1016/s0006-3495(80)85093-4.
65. Deuling, H.J., and Helfrich, W. (1976). Red blood cell shapes as explained on the basis of curvature elasticity. *Biophys J* *16*, 861–868. 10.1016/s0006-3495(76)85736-0.
66. Evans, E.A. (1974). Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers. *Biophys J* *14*, 923–931. 10.1016/s0006-3495(74)85959-x.

67. Tseng, Q., Duchemin-Pelletier, E., Deshiere, A., Balland, M., Guillou, H., Filhol, O., and Théry, M. (2012). Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell–cell junction positioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 1506–1511. 10.1073/pnas.1106377109.
68. Baba, K., Yoshida, W., Toriyama, M., Shimada, T., Manning, C.F., Saito, M., Kohno, K., Trimmer, J.S., Watanabe, R., and Inagaki, N. (2018). Gradient-reading and mechano-effector machinery for netrin-1-induced axon guidance. *Elife* *7*, e34593. 10.7554/elife.34593.
69. Iwadate, Y., and Yumura, S. (2008). Actin-based propulsive forces and myosin-II-based contractile forces in migrating Dictyostelium cells. *J Cell Sci* *121*, 1314–1324. 10.1242/jcs.021576.
70. Sonoda, A., Okimura, C., and Iwadate, Y. (2016). Shape and area of keratocytes are related to the distribution and magnitude of their traction forces. *Cell Struct Funct* *41*, 33–43. 10.1247/csf.15008.
71. Kozawa, S. (2014). Bayesian cell force estimation considering force. Doctoral Thesis, Nara Institute of Science and Technology.
72. Jaqaman, K., Loerke, D., Mettlen, M., Kuwata, H., Grinstein, S., Schmid, S.L., and Danuser, G. (2008). Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nat Methods* *5*, 695–702. 10.1038/nmeth.1237.
73. Abe, K., Katsuno, H., Toriyama, M., Baba, K., Mori, T., Hakoshima, T., Kanemura, Y., Watanabe, R., and Inagaki, N. (2018). Grip and slip of L1-CAM on adhesive substrates direct growth cone haptotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *115*, 201711667. 10.1073/pnas.1711667115.
74. Stout, D.A., Bar-Kochba, E., Estrada, J.B., Toyjanova, J., Kesari, H., Reichner, J.S., and Franck, C. (2016). Mean deformation metrics for quantifying 3D cell–matrix interactions without requiring information about matrix material properties. *Proc National Acad Sci* *113*, 2898–2903. 10.1073/pnas.1510935113.
75. Al-Kofahi, Y., Zaltsman, A., Graves, R., Marshall, W., and Rusu, M. (2018). A deep learning-based algorithm for 2-D cell segmentation in microscopy images. *BMC Bioinformatics* *19*, 365. 10.1186/s12859-018-2375-z.
76. Majurski, M., Manescu, P., Padi, S., Schaub, N., Hotaling, N., Simon, C., and Bajcsy, P. (2019). Cell image segmentation using generative adversarial networks, transfer learning, and

- augmentations. 2019 Ieee Cvf Conf Comput Vis Pattern Recognit Work Cvprw 00, 1114–1122. 10.1109/cvprw.2019.00145.
77. Colding, T.H., Minicozzi, W.P., and Pedersen, E.K. (2015). Mean curvature flow. *B Am Math Soc* 52, 297–333. 10.1090/s0273-0979-2015-01468-0.
78. Mitchell, I.M. (2008). The flexible, extensible and efficient toolbox of level set methods. *J Sci Comput* 35, 300–329. 10.1007/s10915-007-9174-4.
79. Mercurio, A.M. (1990). Laminin: multiple forms, multiple receptors. *Curr Opin Cell Biol* 2, 845–849. 10.1016/0955-0674(90)90082-p.
80. Kamiguchi, H., Hlavin, M.L., Yamasaki, M., and Lemmon, V. (1998). Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Neuroscience* 21, 97–125. 10.1146/annurev.neuro.21.1.97.
81. Colombo, F., and Meldolesi, J. (2015). L1-CAM and N-CAM: from adhesion proteins to pharmacological targets. *Trends Pharmacol Sci* 36, 769–781. 10.1016/j.tips.2015.08.004.
82. Brümmendorf, T., and Rathjen, F.G. (1996). Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* 6, 584–593. 10.1016/s0959-4388(96)80089-4.
83. Hall, H., Carbonetto, S., and Schachner, M. (1997). L1/HNK-1 carbohydrate- and β 1 integrin-dependent neural cell adhesion to Laminin-1. *J Neurochem* 68, 544–553. 10.1046/j.1471-4159.1997.68020544.x.
84. Medeiros, N.A., Burnette, D.T., and Forscher, P. (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat Cell Biol* 8, ncb1367. 10.1038/ncb1367.
85. Craig, E.M., Van Goor, D., Forscher, P., and Mogilner, A. (2012). Membrane tension, myosin force, and actin turnover maintain actin treadmill in the nerve growth cone. *Biophys J* 102, 1503–1513. 10.1016/j.bpj.2012.03.003.
86. Kubo, Y., Baba, K., Toriyama, M., Minegishi, T., Sugiura, T., Kozawa, S., Ikeda, K., and Inagaki, N. (2015). Shootin1–cortactin interaction mediates signal–force transduction for axon outgrowth. *J Cell Biology* 210, 663–676. 10.1083/jcb.201505011.
87. Alexandrova, A.Y., Arnold, K., Schaub, S., Vasiliev, J.M., Meister, J.-J., Bershadsky, A.D., and Verkhovskiy, A.B. (2008). Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions:

formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLOS One* 3, e3234. 10.1371/journal.pone.0003234.

88. Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, S.J., Critchley, D.R., and Sheetz, M.P. (2008). Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol* 10, 1062–1068. 10.1038/ncb1765.

89. 入谷紗瑛 (2019). 緩やかな勾配に対するロバストな走化性のメカノバイオロジー. 修士論文, 奈良先端科学技術大学院大学.

90. Bornschlöggl, T., Romero, S., Vestergaard, C.L., Joanny, J.-F., Nhieu, G.T.V., and Bassereau, P. (2013). Filopodial retraction force is generated by cortical actin dynamics and controlled by reversible tethering at the tip. *Proc National Acad Sci* 110, 18928–18933. 10.1073/pnas.1316572110.