

数理解析による細胞集団性の定量化

－上皮間葉転換の検出への応用－

日大生産工(院) ○深山 達也 千葉大工(院) 菅原 路子
 物材機構 中西 淳 日大生産工 野々村 真規子

1 まえがき

一般に上皮細胞は、細胞が集団となって移動して機能するが、時として集団性が活発に変化することでさまざまな生命現象や病態発生を媒介することが知られている。例として、上皮管腔組織の発生段階などでは、図1で示すように上皮間葉転換(EMT)というプロセスを経て周囲の細胞との集団性を失い、間葉系細胞のようにばらばらに移動していく。一旦ばらばらになった細胞は、適切な位置へ到達すると逆反応の間葉上皮転換(MET)を受けて再び集団に戻る。一方でこのような調節が制御不能に陥ると、がんなどの疾患につながる。したがって、細胞の動きの特徴、特に集団性を定量化することは、その制御機構の理解につながる。一方で、このような基礎研究の観点のみでなく、集団性を定量化することは、その調節を行う薬剤の開発や評価にも有用である¹⁾。本研究では、粒子画像流速(PIV)解析で上皮細胞の動きを記述し、それをもとに細胞集団性の定量化を試みた。

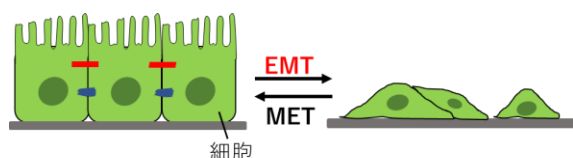


図1. 上皮間葉転換(EMT)および間葉上皮転換(MET)．集団的に移動する上皮細胞(左)が単独で移動する間葉系細胞(右)に変化する過程およびその逆反応。

2 実験方法および測定方法

2-1. 細胞サンプルの調製.

実験には、通常通り継代培養したMDCK細胞(培養上皮細胞株)もしくは予めトランスフォーミング増殖因子(TGF- β)でEMT誘導した細胞を使用した。EMT誘導時には、細胞を10cmディッシュに 7.0×10^5 個播種し、10

ng/mLのTGF- β を含む培地中で一定日数培養した²⁾。これらの細胞をトリプシン処理し、3.5cmディッシュ上に適当細胞数播種した。播種1, 2時間後にそれぞれ、血清培地を添加、培地交換による浮遊細胞の除去を行った。また3時間後には、顕微鏡に付属した培養装置で細胞を培養環境(37°C, 5%CO₂)に保ち、5分ごとに細胞の位相差画像を終夜撮影した。

2-2. PIV解析および集団性の指標の計算.

実験で得られた画像を、MATLAB上に作製したPIV解析プログラムで処理して、細胞の動きの可視化を行った。PIV解析とは、図2のように探査領域(赤枠)を設定し、連続する2つの時相において探索領域(緑枠)で画像ファイルから最も近似している輝度値の場所へ移動ベクトルを表記する手法である。探査領域をずらしながら、移動ベクトルを求めることで、画像全体の移動を可視化することが出来る³⁾。

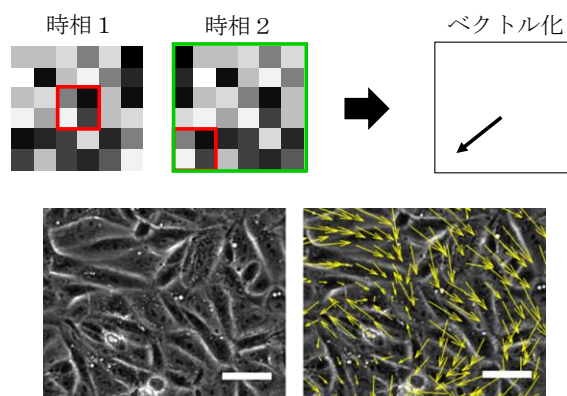


図2. PIVによる細胞集団移動解析。(上) PIV解析の原理の概念図。(左下) MDCK細胞の位相差画像。(右下) 連続する2つの位相差画像から求めた移動ベクトル場。(Scale bar=50 μ m)

Quantification of cell migration by using mathematical analysis
 － Application to detection of epithelial mesenchymal transition －

Tatsuya MIYAMA, Jun NAKANISHI, Michiko SUGAWARA and Makiko NONOMURA

また, 得られた移動ベクトルから細胞の平均移動速度と, 移動ベクトルの空間相関関数 $C(r)$ を求め, 集団性を評価した⁴⁾。

$$C(r) = \frac{\sum_{i,j,l,j'} \vec{a}_{ij} \cdot \vec{a}_{i+l,j+j'} \delta_{l^2+j'^2, r^2}}{\sum_{i,j,l,j'} |\vec{a}_{ij}| |\vec{a}_{i+l,j+j'}| \delta_{l^2+j'^2, r^2}} \quad (1)$$

$\delta_{i,j}$ はクロネッカーのデルタ, $\vec{a}_{ij}$ はピクセル (i,j) における移動ベクトルを示している。

空間相関関数 $C(r)$ を指数関数 $e^{-\lambda r}$ でフィッティングすることによって細胞集団性の指標 λ を求めた。 λ は値が小さいほど細胞の集団性が高い状態を, 値が大きいほど細胞の集団性が低い状態を表す。

3 実験結果および検討

3-1. 細胞密度の移動速度および λ への影響

最初にEMTを誘導していないMDCK細胞を対象に, 細胞播種密度の検討を行った。図3に細胞播種密度が $0.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 個の範囲におけるPIV解析から求めた平均移動速度(図3A)および同時相の λ 値(図3B)を示す。細胞移動速度については, 細胞密度が増大するにつれて単調に遅くなる様子が観察された。これは, 細胞が高密度になると移動速度が低下するContact-inhibition現象を反映している。一方, λ 値は, 低密度領域で高い値をとるのに対して, 高密度領域ではほぼ一定の値を示した。このことから, λ 値を細胞集団性の指標とするためには, 隣接する細胞と十分に相互作用しうる程度まで細胞密度を高める必要があることが分かった。細胞は観察中にも細胞密度が増大し続けることを考慮して, 本研究の以降の検討では, 播種濃度が 1.0×10^6 個の条件で実験を行うことにした。

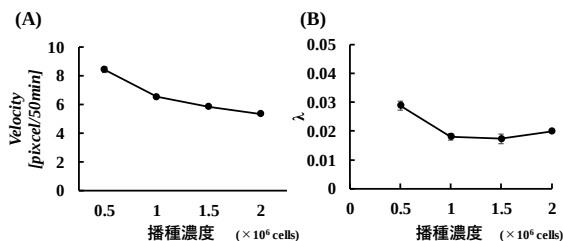


図 3. 播種濃度における移動速度及び集団性の検討。図 3 中の A, B は, 同時相における細胞移動速度と集団性評価 (λ 値) を示す。

3-2. EMT誘導・非誘導細胞の集団性の比較

TGF- β 処理を2日間行い, EMT誘導した細胞(TGF(+))と, 非誘導の細胞(TGF(-))の集団性を検討した。図4AはTGF(+), (-)における, ある同時相の空間相関を示している。TGF(+))は, (-)に比べ初期の減衰が急であることが分かる。また, 図4Bは, それに対する λ 値を示す。結果は, TGF(+))の方が, (-)より λ 値が高くEMTを誘導していることが分かる。以上の結果から, TGF(+))は(-)に比べ, 相関距離が短くなり集団性についても低いことがPIV解析より確認することが出来た。

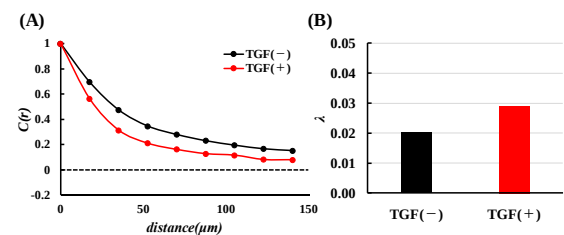


図 4. TGF(-), (+)における空間相関及び, λ 値の検討。図 4 中の A, B は, 同時相での空間相関及び集団性(λ 値)を示す。また, 黒, 赤は TGF(-), (+)を示す。

4 まとめ

以上のように本研究では, 細胞集団移動挙動のPIV解析によって得られた移動ベクトルの空間相関関数から細胞集団性を定量化することに成功した。実際に, EMT誘導薬による集団性変化を λ 値から見積もり, 評価することが出来た。発表では, λ 値と生化学解析との関係に関する検討やより短時間での集団性評価結果についても紹介する。

「参考文献」

- 1) Fabrizio Marcucci, Giorgio Stassi, et al, Biophysical Journal, 98, 1790 (2010).
- 2) L. Petitjean, M. Reffay, et al, Biophysical Journal, 98, 1790 (2010).
- 3) Philip A. Gregorya, Cameron P. Bracken, et al, MBoC, 1686 (2011).
- 4) Thomas E. Angelini, Edouard Hannezo, et al, PHYSICAL REVIEW LETTERS, 104, 168104 (2010).