

修士論文

哺乳類初期胚発生パターンの  
力学モデルを用いた解析

平成31年1月31日 提出

東京大学大学院

工学系研究科 電気系工学専攻

37-176483

松井 崇晃

指導教員 小林徹也 准教授

# 目次

概要	iii
第 1 章 序論	1
1.1 発生学の背景	1
1.2 着床前胚発生の基本知識	2
1.3 関連先行研究	3
1.4 先行研究の問題と本研究の目的	4
第 2 章 発生過程の力学モデリング	5
2.1 運動方程式	5
2.2 割球が受ける力のモデル化	6
2.3 細胞分裂のモデル化	7
第 3 章 実験データとその性質	10
3.1 実験データ (ライブイメージングデータ)	10
3.2 実験データの解析	10
第 4 章 分裂時の力が作用しない場合のシミュレーションによる解析	17
4.1 分裂時の力が生じない場合の発生シミュレーション	17
第 5 章 分裂時の力をモデル化した場合のシミュレーション	26
5.1 分裂時の力を考慮した場合のシミュレーション結果	26
5.2 分裂時の力が加わった場合のシミュレーション結果	26
5.3 総合的なパラメータによる解析と実験データの再現	29
第 6 章 将来の課題	33
6.1 分裂モデルの改良	33
6.2 力学モデリング	33
6.3 シミュレーションにより実現できなかった運動	34
第 7 章 結論	35

对外发表 37

参考文献 38

# 概要

胚発生は受精卵が運命決定された多細胞体を形成する過程である。胚の形成について多くの生物種間でそのメカニズムの解明が行われてきた。特に、近年の臨床医学への応用のために哺乳類胚を対象とした研究が注目されている。哺乳類の胚形成について、ライブイメージング技術により測定された画像から遺伝子発現と細胞位置の関係性が解析されている。この解析により、胚形成には遺伝子発現分野による分化と細胞の相互作用が重要であることが明らかとなっている。画像による推定方法では、細胞分裂や遺伝子発現による細胞間相互作用の解析を行うことが困難であった。しかし、ライブイメージング技術の進展により細胞核のトラッキングデータが入手でき、時系列位置情報を用いた機械的要素による解析が可能となった。本研究は、トラッキングデータとの比較のため、細胞同士の力学モデルによるシミュレートを行った。さらに、分裂時に力が作用することをモデリングしたシミュレーションを行い実験データの内容の再現を行い、割球の物理的要因に夜配置パターンについて解析した。この解析により、胚発生は割球と分裂時の物理的要因により 16 細胞の配置パターンが決定されることが明らかとなった。

# 第 1 章

## 序論

### 1.1 発生学の背景

我々の体は数兆個の細胞によって構成されている。細胞は各器官で役割を担い、他の細胞との複雑な相互作用により生命維持を可能としている。生物を構成する細胞は、元は 1 つの細胞から発生したもので、その機能は発生の過程で決定される。胚は発生初期に観測される形態であり、1 個の受精卵が細胞分裂して形成される多細胞体である。発生が進むと、皮膚や内臓、例えば両生類では尾になる細胞など細かく役割が決定される。では、細胞の役割はいつどのようにして決まるのだろうか？文献 [1, 2] では、細胞移動と遺伝子発現が初期胚形成に重要な役割を果たすことが報告されている。遺伝子発現と細胞移動による発生の機構について、これまで多くの研究が行われてきた。

これまで魚類から哺乳類まで様々な生物種に対する発生の研究が行われてきた。また、近年では、発生研究の不妊治療への応用可能性が注目されている。不妊治療では、体外受精により形成された着床前の胚を用いることから、哺乳類の初期胚発生の解析は、臨床医学的にも重要である。哺乳類の胚発生の研究はマウスを対象とした報告が多い。その理由として、マウスがヒトの近縁種である点や、齧歯類であるマウスは一度の排卵数が多く遺伝子工学的に多く取り扱いやすい点が挙げられる。哺乳類胚は母体内で着床するため、発生のプロセスを直接観察することは難しい。そのため、従来は体外受精を行った後、*in vitro* での観察や遺伝子工学を用いた遺伝子情報についての解析が行われてきた。また、環境条件が発生に与える影響について、*in vivo* と *in vitro* での違いや凍結した卵子と通常の卵子での違いなども研究されてきた。

臨床医学へ向けた応用には、発生に影響する遺伝子の特定や環境による発生の差異についての研究だけでなく、正常な発生に必要な物理的作用についても明らかにする必要がある。そのためには、発生時の細胞の位置データを用いた解析が必要となる。イメージング技術は発生時の細胞の位置を画像としてデータ化することを可能にした。蛍光タンパク質の遺伝子導入技術によって、遺伝子発現と細胞の位置の関係が推測できるが、画像を用いた推定方法では細胞の母娘関係を辿るのが難しく、したがって、分裂に伴う細胞間の物理的相互作用を解析することは困難であった。しかし、近年のイメージング技術の進展により、受精卵から着床する前の細胞の位置を追跡した時系列データを得ることが可能になった。これにより、母娘関係と分裂のタイミング、および、細胞の位置をト

ラッキングすることができ、発生過程のシミュレーションと実データとの比較を行うことが原理的に可能となった [3]. 現在, このデータを用いて遺伝子制御と物理的相互作用を結びつける解析が求められている.

## 1.2 着床前胚発生の基本知識

哺乳類の着床前胚の発達過程の概要を図 1.1 に示す. 受精卵は, 透明体 (ZP: Zona Pellucid) と呼ばれる糖タンパク質の細胞外マトリックス内で発生する. ZP は胚が子宮壁に付着するのを防いでいる. 胚は ZP を破ることで着床できる. 受精卵は, 受精後約 1 日半で卵割を行い 2 つの娘細胞となる. 娘細胞たちは体積の総和を維持しながら分割を行うため, 割球と呼ばれる. 割球が 2 つ存在している 2 細胞期の胚は, 分割して割球の数を増加させる. 8 細胞期から 16 細胞期の胚は, 割球の膜が密に結合しあいその境界が曖昧となる桑実胚と呼ばれる. その後の発生で, 桑実胚の周縁部に位置する割球の多くは, 栄養外胚葉 (TE: Trophectoderm) と呼ばれる種類に分化し, 将来胎児と母体を連絡する器官である胎盤を形成する. 一方で, 中心付近に位置する割球は内部細胞塊 (ICM: Inner Cell Mass) と呼ばれ, 遺伝子発現により様々な役割を持つ細胞に分化する. 着床直前の胚では, 内部細胞塊が栄養外胚葉の一部に局在した構造となり, 内部に胞胚と呼ばれる空洞が生じている. この状態の胚は胚盤胞と呼ばれる. この時, 胚の内部では内部細胞塊と胞胚を分割するように細胞層が生じることが知られている (図 1.1 の青い細胞). この細胞層は原始内胚葉 (PE: Primitive Endoderm) と呼ばれ, 将来骨格を形成することが知られている.

これらの細胞分化は特定の遺伝子発現により生じる現象であることが報告されている [4]. 蛍光タンパク質を用いた画像解析により, その遺伝子ネットワークが推測されてきた. その報告によると, 栄養外胚葉に分化する割球は Cdx2 タンパク質の発現が強く, 一方で内部細胞塊では Oct3/4 が Cdx2 の発現を抑制している. さらに, この遺伝子ネットワークは, 一度栄養外胚葉に分化した割球が, 桑実胚から胚盤胞を形成するまでに, 内部細胞塊に移動し Cdx2 の発現を抑制したという報告がある [2]. この細胞位置依存的な遺伝子発現変化の可能性は, 胚発生における力学応答の解析の必要性を示唆している.

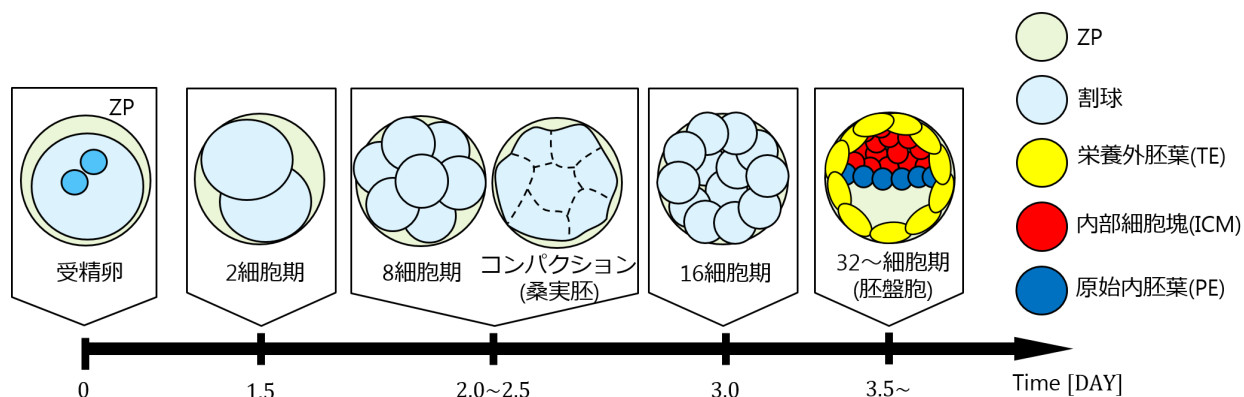


図 1.1: 哺乳類胚の発生過程の概要図 [5].

### 1.3 関連先行研究

哺乳類やそれ以外の生物種の胚発生について、様々な仮説の下、運命決定された細胞の遺伝子ネットワークと細胞の位置関係が議論がされてきた。この位置決定に関わる物理的相互作用を解明するために、割球に働く応答力の測定と、割球の位置のシミュレーションが行われている。本節では、これまで用いられてきた手法の説明を行い、関連研究により解明されたことをまとめる。

割球は、単離されると球形を保つことが知られている。また、外力を与えて変形させた場合でも、時間をかけて球形に戻ろうとするため、弾力的な力を持つ事が知られている。一方で、割球同士が接しているときは、接着因子による接着力が作用する。割球の応答力の解析では、弾性力と接着力の2つを対象とした測定方法が提案されている。弾性応答力については、磁性ビーズを用いた測定方法 [?] と、微小針を用いた ZP と卵子の応答力を測定した報告があり [6]、いずれも非線形弾性応答の結果を報告している。前者の方法では時間経過と共に弾性応答力が減少していくことが観測され、後者では次第に応答力が大きくなることが観測されている。他にもカンチレバーを用いて割球が離れようとする力を測定した方法も提案されている [8]。しかしながら、先行研究では、実験条件や実験環境の違いによって力の測定結果が異なっている。発生中の割球の力学応答を精確に測定する方法は、現在も議論の最中であり、いまだ確立されたものは存在しない。問題は、細胞を構成する要素の内、弾性応答力に影響を与える要素の特定が難しい点、そして接着因子の特定が十分でない点にある。これらの点から、割球の応答力を定量的にモデリングし、シミュレーションを行うことは難しい。従来、単純なモデルリングとシミュレーションが行われてきた。

発生のシミュレーションでは、割球の重心位置を運動方程式で記述する Center-dynamics モデルが主に採用されてきた。Center-dynamics モデルでは、細胞が剛体としてモデル化される。ここでは、割球が受ける力を仮定することで、割球の運動や最終的に形成される配置パターンを計算する。これにより、仮定した力の内、どのパラメータが胚形成に影響を与えているかを明らかにすることができる。先行研究では、ZP 内で割球以外の領域は液体で満たされていると仮定されている、また割球には未知の要因も作用していると考えられることから、決定論的な運動方程式にノイズ項を加えた確率微分方程式が用いられる。特に細胞の質量やサイズをもとにした流体力学的考察から、慣性項は相対的に小さいと考え、慣性項を無視した Over-damped Langevin 方程式が一般に採用される。このモデル化により、線虫における種族毎の発生の違いが割球同士の接着力と ZP の形状に依存して決定されることが明らかとなった [9]。割球同士の接着力の違いは、哺乳類胚の発生、特に細胞層の形成において重要な役割を果たすことが知られている [5]。

Center-dynamics モデルでは、割球が剛体であると仮定されているが、実際には変形する。しかし、Center-dynamics モデルでは、変形の記述は難しい。変形を考慮したシミュレーションとしては Vertex モデルを用いた手法が知られている。Vertex モデルでは、細胞を多面体で表し、各頂点を運動方程式で記述することにより、変形をシミュレーションすることが可能である。Vertex モデルにおける運動方程式は、接着面での弾性応答力や張力、接着力などの様々な仮定を下に定義されたエ

エネルギーの勾配系で記述される。また、各頂点は質量を持たないと仮定するため、Center-dynamics モデルと同様に慣性項を無視した運動方程式が用いられる。初期胚形成過程で、胞胚発生に伴う極性の決定と、分化した割球による細胞層形成の検証が報告されている [1]。さらに、この極性が ZP 形成に依存することが実験により確認されている [10]。

胚発生の割球の位置の解析として、割球同士の力学応答についての測定と、単純なモデルを用いたシミュレーションによる胚形成パターンが報告されてきたが、割球の分裂時に生じる力については未解明であった。多細胞生物の細胞分裂における細胞周期は、前期・中期・後期に別れており、それぞれの期間で DNA 複製・核の分裂・染色体の移動が起こる。核の分裂が起こった後、収縮環と呼ばれるリングが膜上に生じて、リングが縮小することで細胞質が分裂し 2 つの娘細胞を生じる。この過程において、分裂のタイミングと分裂方向は、割球の位置決定に重要な役割を果たす。前述したモデルにおいても、細胞分裂は考慮されているが、分裂に伴う、母娘細胞同士の力学的相互作用は無視されている。例えば、Center-dynamics モデルでは、分裂後の 2 つの娘細胞の重心位置は、母細胞の重心位置からある程度の距離だけ離れた位置にそれぞれ配置されるため、分裂に伴う細胞間相互作用は計算されない。実験報告によると、割球同士は分裂方向に対してある程度の力を作用させることが明らかとなっている。関連研究として、核の分裂による力を測定した報告がある [11]。しかし、これらの実験事実を十分に考慮した理論研究はほとんどない。

## 1.4 先行研究の問題と本研究の目的

発生時の割球の位置について、これまで行われてきたシミュレーションによる解析は実験データと比較する事ができなかった。しかし、ライブイメージング技術の進展により細胞核の時系列位置情報が入手できるようになり、実験データの比較を行う事が可能になった。また、割球同士の物理的相互作用による胚発生についての解析が行われてきたが、分裂時の力を考慮した解析を行う必要がある。そのため、本研究では、割球の単純な力学モデルと分裂時に力が作用する分裂モデルのシミュレーションを行い、実験データと比較して割球の配置パターンについて解析を行った。

本論文では、始めにシミュレーションを行うために割球同士の力学応答と分裂時の力のモデルについて説明した。次に、比較対象となる実験データから解析した結果について述べる。その後、シミュレーションから得られた結果を述べ、実験データとの比較を行い配置パターンに影響を与えている要素について解析をした。



## 第 2 章

# 発生過程の力学モデリング

本章では、本研究で用いたモデリングの内容と解析手法の概要を説明する。シミュレーションと実データとの比較を行い、哺乳類の初期胚発生においてどのような要因が割球の位置に影響を及ぼすかを調べる。まず、本研究で参考にした Center-dynamics モデルについて説明を行う。その後、割球に及ぼす力の数理モデルを説明した後に、分裂モデルを導入する。Center-dynamics モデルは、運動方程式で割球の位置を記述できる。また、割球は剛体球であると仮定する。割球  $i$  の半径を  $R_i$ 、重心位置を  $\mathbf{r}_i$  で表す。また、胚は ZP に拘束された条件の下で発生すると想定した。ZP の半径を  $R_{zp}$  で表し、重心位置は  $\mathbf{r}_0$  で表す。ZP の重心位置は受精卵の重心位置と一致するとした。

### 2.1 運動方程式

割球が外部から受ける力のうち、他の割球と ZP から受ける力を  $\mathbf{F}^{\text{static}}$ 、摩擦力を  $\mathbf{F}^{\text{drag}}$  の二つに分類する。割球の質量を  $m_i$  とすると割球  $i$  の運動方程式は以下の式で表される。

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{F}_i^{\text{static}} - \mathbf{F}_i^{\text{drag}},$$

摩擦力  $\mathbf{F}_i^{\text{drag}}$  は、割球同士によるもの ( $\sum_j \mathbf{F}_{ij}^{\text{drag}}$ ) と ZP の中に満たされた液体との間で生じる力 ( $\mathbf{F}_i^{\text{velocity}}$ ) との和であると想定した。しかし、割球の膜は粘着力をもつため、割球同士の摩擦力は生じないものとする。液体との間で生じる摩擦力は、有効粘度  $\gamma$  と割球  $i$  の速度  $d\mathbf{r}_i/dt$  により、

$$\mathbf{F}_i^{\text{velocity}} = \gamma \frac{d\mathbf{r}_i}{dt},$$

と表される。これを式 (2.1) に代入し以下の方程式を得る。

$$m \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} + \gamma \frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \mathbf{F}_i^{\text{static}}.$$

ここで、割球の質量  $m_i$  は微小のため、式 (2.1) の慣性項を無視できるとする。また、割球は様々な外乱の影響を受ける為、ノイズ項を含めた以下の方程式に書き直す事ができる。

$$\gamma \frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \mathbf{F}_i^{\text{static}} + \boldsymbol{\xi}. \quad (2.1)$$

## 2.2 割球が受ける力のモデル化

割球  $i$  は他の割球  $j$  から力を受ける際変形する。割球が変形した際、互いに離れようとして弾性的な力が作用する。また、割球の膜上の接着因子により接着力も生じる。弾性的な力と接着力は、割球が剛体球であると仮定し、それぞれ、repulsive な力  $\mathbf{F}_{ij}^{\text{rep}}$  と attractive な力  $\mathbf{F}_{ij}^{\text{atr}}$  で表す。割球が剛体球であると過程したとき、repulsive な力は割球が重なった場合に互いに働き、attractive な力は離れた場合に互いに働く。このとき、割球  $i$  が他の割球  $j$  から受ける総和  $\mathbf{F}_i^{\text{tot}}$  は、

$$\mathbf{F}_i^{\text{tot}} = 2 \sum_j (\mathbf{F}_{ij}^{\text{rep}} + \mathbf{F}_{ij}^{\text{atr}}),$$

となる。

実測的観測に基づき、ZP から受ける力は、接着分子による接着力と摩擦力は存在せず、内側に戻そうとする力のみが働くとする。この力は、他の割球から受ける力と同様に弾性応答力であり、この時の力を  $\mathbf{F}_i^{\text{ZP}}$  で表す。

上記の二つの力から式 (2.1) で割球  $i$  が受ける力  $\mathbf{F}_i^{\text{static}}$  は以下の式で表せる。この式で表される力は、ニュートンの第二法則から割球  $i$  は他の割球  $j$  に力  $\mathbf{F}_{ij}$  を作用する場合、反作用力  $-\mathbf{F}_{ij}$  を受けるものとした。そのため、割球  $i$  が ZP に力を作用した場合、割球  $i$  は ZP から力  $\mathbf{F}_i^{\text{ZP}}$  と反作用により自分自身の力  $\mathbf{F}_i^{\text{rep}}$  を受ける。

$$\begin{aligned} \mathbf{F}_i^{\text{static}} &= \mathbf{F}_i^{\text{tot}} + \mathbf{F}_i^{\text{ZP}} + \mathbf{F}_i^{\text{rep}} \\ &= 2 \sum_j (\mathbf{F}_{ij}^{\text{rep}} + \mathbf{F}_{ij}^{\text{atr}}) + \mathbf{F}_i^{\text{ZP}} + \mathbf{F}_i^{\text{rep}}, \end{aligned} \quad (2.2)$$

となる。この力の向きは、重心の位置と配置の関係によって決定されるものとしており、割球  $i$  から割球  $j$  に対して、単位方向ベクトル

$$\frac{\mathbf{r}_{ij}}{|\mathbf{r}_{ij}|},$$

の向きが正とあるとする。以後、

$$\mathbf{F} = F \frac{\mathbf{r}_{ij}}{|\mathbf{r}_{ij}|},$$

であることを想定して、応答力  $F$  について説明を行う。

### 2.2.1 弾性応答力のモデル化

先行研究 [5] では、1 次線形弾性応答と 2 次線形応答力の線形和を用いたモデル化が行われていた。しかし、卵子に挿入する精子の押す力の測定より、非線形応答力を示している事が報告されている [6]。そこで本研究では割球間や ZP との距離  $\Delta r$  に二次に力が依存する式  $F_{ij}^{\text{rep}} = k(\Delta r)^2$  を採用した: より具体的に  $F_{ij}^{\text{rep}}, F_i^{\text{ZP}}$  はそれぞれ、

$$F_{ij}^{\text{rep}} = \begin{cases} k(|\mathbf{r}_{ij}| - (R_i + R_j))^2 & (|\mathbf{r}_{ij}| \leq R_i + R_j) \\ 0 & (\text{otherwise}), \end{cases} \quad (2.3)$$

$$F_i^{\text{rep}} = \begin{cases} k(|\mathbf{r}_i| - (R_{zp} - R_i))^2 & (|\mathbf{r}_i| \leq R_{zp} - R_i) \\ 0 & (\text{otherwise}), \end{cases} \quad (2.4)$$

と表されると仮定した. ここで,  $k$  は弾性係数である.

### 2.2.2 接着力のモデル化

接着力は, 接着面積に依存した割球の離れにくさを表しており, 実際の引きつける力は変形に伴う弾性応答力である. これを剛体モデルで表すには遠力を用いて表すことになるが, 離れた場合の接触面積を求める事はかなり複雑となる. そのため, 粘菌細胞に関するモデルで採用されている方法を参考に, ある距離までは引きつける力が大きくなり, そこから次第に小さくなり最終的に力が及ぼさない力として,  $\cos$  関数を用いた以下の力を採用した. 図 2.1 に, 割球同士の距離  $|\mathbf{r}_{ij}|$  と, repulsive な力と attractive な力の総和の関係を示す:

$$F_{ij}^{\text{atr}} = \begin{cases} 0.5A(1 - \cos \frac{2\pi}{d}(|\mathbf{r}_{ij}| - (R_i + R_j))) & (R_i + R_j \leq |\mathbf{r}_{ij}| \leq R_i + R_j + d) \\ 0 & (\text{otherwise}). \end{cases} \quad (2.5)$$

### 2.2.3 ZP から受ける力のモデル化

本研究は割球が剛体球であると仮定したため, ZP も剛体球であると仮定した. この場合の力学モデリングを考える. 割球は ZP に拘束されているため, ZP はポテンシャルが無限に大きい静障壁として作用する. そのため, 割球が  $i$  が胚の重心から外側方向に移動する際, ZP から以下のような式によって表される力が働くものとする.

$$F_i^{\text{ZP}} = \begin{cases} \frac{k(|\mathbf{r}_i| - (R_{zp} - R_i))^2}{R_{zp} - |\mathbf{r}_i|} & (R_{zp} - R_i \leq |\mathbf{r}_i| < R_{zp}) \\ 0 & (\text{otherwise}). \end{cases} \quad (2.6)$$

ここで,  $F_i^{\text{ZP}}$  は自分自身の弾性応力と仮定したため, パラメータは式 2.3 と 2.4 とで共通したものをを用いる. 図 2.2 に, 式 (2.6) で表される関係を示す.

## 2.3 細胞分裂のモデル化

割球は, 娘細胞の体積が均等になるよう細胞分裂する等割と, そうでない場合の不等割と呼ばれる, 2つの分割方法が知られている. 母細胞の重心位置を  $\mathbf{r}_m$ , 半径を  $R_m$  とし, 娘細胞となる割球の重心位置を  $\mathbf{r}_{d1, d2}$ , 半径を  $R_{d1, d2}$  とする. 分裂後の体積の偏りを  $\alpha (0 \leq \alpha \leq 1)$  とした場合, 分裂時の体積が保存するため以下の関係式が成り立つ:

$$R_m^3 = \alpha R_{d1}^3 + (1 - \alpha) R_{d2}^3. \quad (2.7)$$

正常発生の場合, 割球の分裂はおおよそ等割である為  $\alpha = 0.5$  である.

本モデルでは, 細胞分裂の際に紡錘体が分裂方向に対して力を及ぼす事を仮定する. その為, 分裂

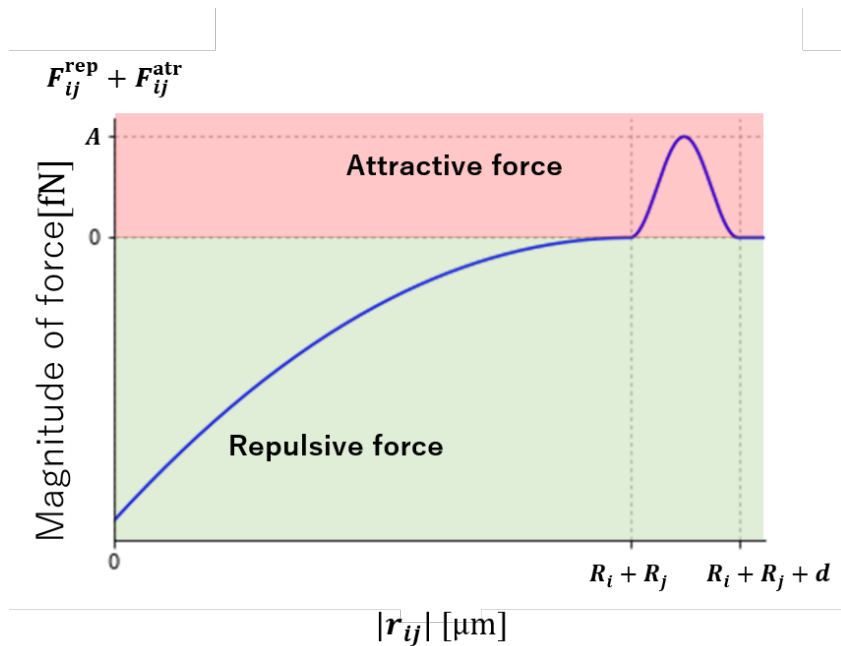


図 2.1: Repulsive な力と attractive な力総和と距離  $|r_{ij}|$  の関係. グラフ内における, 緑色の領域は repulsive な力を表し, 赤色の領域は attractive な力を表す.

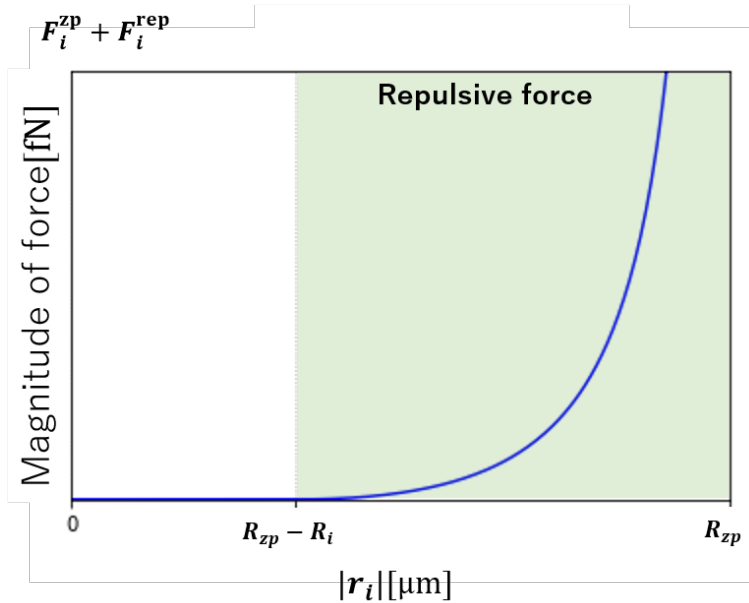


図 2.2: ZP と割球  $i$  の repulsive な力と距離  $|r_i|$  の関係. グラフ内の緑色の領域は図 2.1 と同じ repulsive な力を表す.

周期の際に一定の力  $G$  が加わる事を仮定した. また, 分裂は経過時間ではなく娘細胞の互いの距離が  $l$  になった時に終了するものとした. 以上を踏まえ, 分割モデルを考慮した時の割球の力は, 以下の式で表す事ができる.

$$\mathbf{F}_{d_1 d_2} = \begin{cases} 2 \sum_{d_1: d_1 \neq d_2} (\mathbf{F}_{d_1 j}^{\text{rep}} + \mathbf{F}_{d_1 j}^{\text{atr}}) + G\mathbf{e} & (|r_{d_1 d_2}| \leq l) \\ 2 \sum_{d_1} (\mathbf{F}_{d_1 j}^{\text{rep}} + \mathbf{F}_{d_1 j}^{\text{atr}}) & (\text{otherwise}), \end{cases} \quad (2.8)$$

$$\mathbf{F}_{d_2 d_1} = \begin{cases} 2 \sum_{d_2: d_2 \neq d_1} (\mathbf{F}_{d_2 j}^{\text{rep}} + \mathbf{F}_{d_2 j}^{\text{atr}}) - G\mathbf{e} & (|r_{d_2 d_1}| \leq l) \\ 2 \sum_{d_2} (\mathbf{F}_{d_2 j}^{\text{rep}} + \mathbf{F}_{d_2 j}^{\text{atr}}) & (\text{otherwise}). \end{cases} \quad (2.9)$$

この時,  $\mathbf{e}$  は分裂方向を表す単位ベクトルであり, 娘細胞  $d_1$  と  $d_2$  はそれぞれ逆方向に向かって分裂を行う為, 母細胞から見たときに符号はそれぞれ逆転する.

## 第 3 章

# 実験データとその性質

シミュレーションによる解析を行う前に、ライブイメージング技術により得られた胚の時系列位置データについて説明を行う。本章では、はじめに実験データの計測方法を記述する。その後、シミュレーション結果との比較を行うため、実験データの解析をした結果を記述する。

### 3.1 実験データ（ライブイメージングデータ）

近年、近畿大学発生遺伝子工学研究室の協力によりマウスの初期胚の発生核を追跡したデータを得ることが可能となった。発生過程の核のトラッキングには、ヒストン H2B-mRFP タンパク質をコードする RNA を注入して細胞核を標識する技術が用いられ、計測した 3D イメージングデータから細胞核同定が行われた。3D イメージングデータの計測は、xyz 解像度（それぞれ 0.8, 0.8, 2 $\mu$ m）で 15 分毎に胚内の全ての割球について行われている。高い z 解像度を用いる事で同定誤り率がより小さい結果を得ることができる。また、元の計測した画像との比較を行い誤りを訂正する事で、エラーが無い細胞核同定結果を得ている。核同定の後に、コスト関数として細胞核の距離のみを利用した整数計画法を用いて核をトラッキングした。このトラッキングにより得られたデータは、細胞間距離を計測する際に用いた細胞核の位置についての情報が記載されている為、15 分を 1 単位とした核の時系列位置情報が記載されている。また、このトラッキングデータは 1 細胞期から 32 細胞期までの胚内全ての割球の母娘関係も含まれている [3, 12].

### 3.2 実験データの解析

前述したデータから、細胞の核の位置と分裂するタイミングがわかる。図 3.1 にトラッキングデータの例として、割球の移動速度とその数についての時系列を示す。この発生過程における核の位置の関係を図 3.2 に示す。図 3.2 の画像は全ての割球の核を 8 色で標識している。同図において、同じ色で標識した割球は、8 細胞期で同色で標識した割球から分裂した娘細胞を表している。図 3.1 の可視化により細胞位置の時系列変化を観察したところ、16 細胞期から次の分裂までの間 ( $188 \leq t \leq 220$ ) で、割球たちが ZP 内で全体として回転するような動きが見られた。図 3.2a に時

間  $t = 188, 220 \text{ min}$  で正面・右側・左側から見た場合の画像を示す.  $t = 188 \text{ min}$  と  $220 \text{ min}$  の画像を比較した際, 同じ色で標識された割球の位置が変化することがわかる. この変化により隣接した割球の関係の変化は観測されなかった. 割球たちが ZP 内で全体として移動する際, 隣接した割球の関係に変化がないことを確かめるため, 隣接した割球が同じ方向に位置するように視点を固定した時の結果を確認した. 図 3.2b に割球の相対的な位置関係について固定した静止画像を示す. 同図では, 赤色で標識した割球と橙色で標識した割球の向きを固定している. 図 3.2b から回転中の細胞の隣接関係について, 入れ替わりがほとんどない事が確認できる. また, 回転現象による割球の位置速度は図 3.1 では確認できないほど小さく, 分裂タイミングと区別し, 本研究では分裂時の割球の速度に主に注目する.

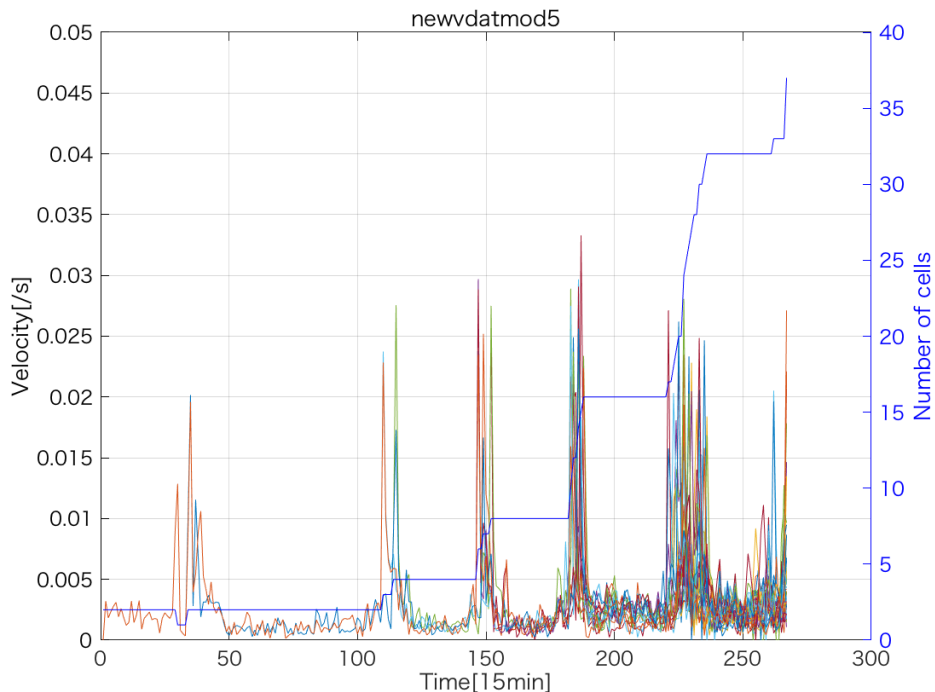
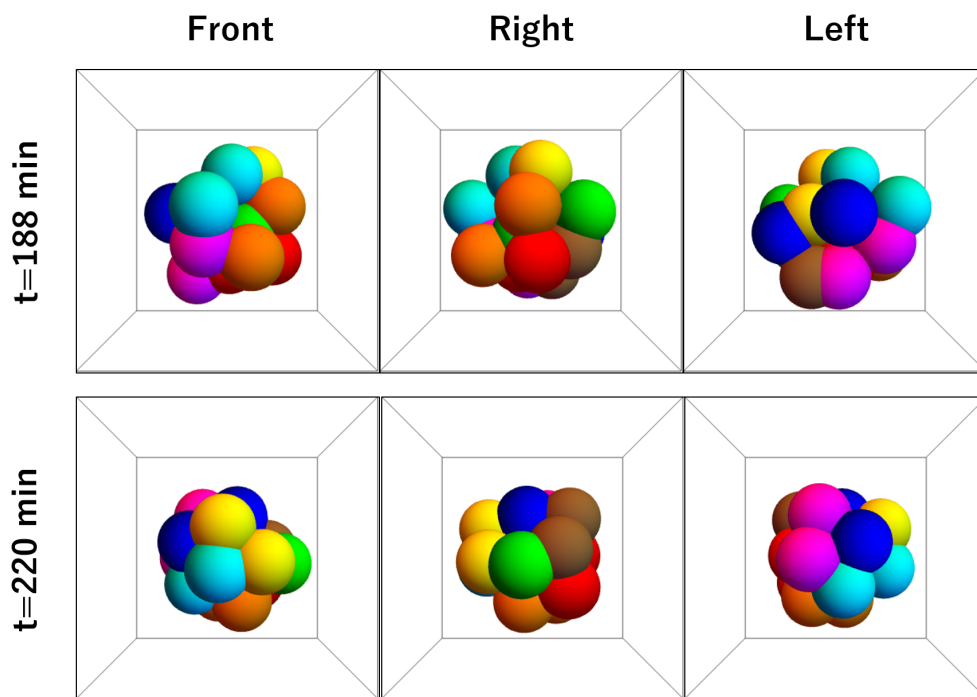


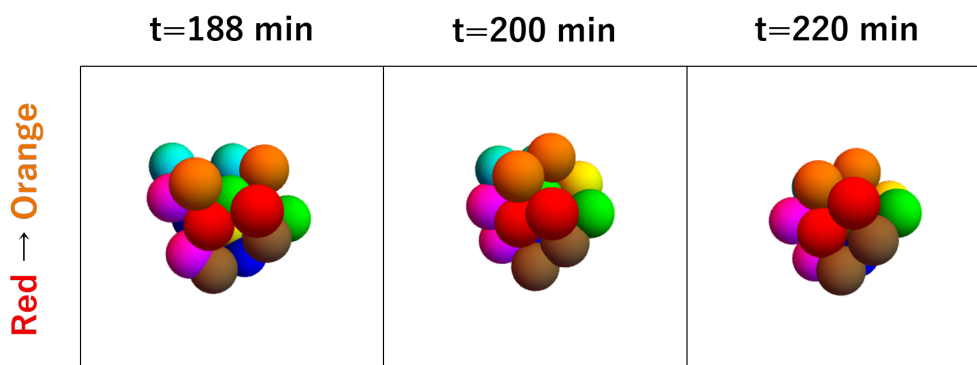
図 3.1: 割球の移動速度とその数の関係. この画像において, 青色で示されたグラフは右軸の割球の数に対応している.

### 3.2.1 正常な初期発生の区別

割球の移動速度の時系列を示した図 3.1 において, 割球の数に注目して正常発生と非正常発生を区別する方法を記す. 図 3.3 に非正常発生と判断した際の割球の移動速度と時系列を示す. 図 3.3a では, 受精卵の状態の前核の数が 2 つではなく, 3 つである事から, 多精子受精が行われた事が



(a) それぞれの方向から見た割球の位置.



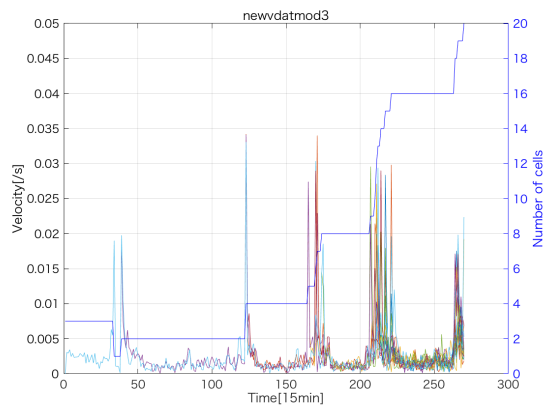
(b) 赤色と橙色で標識した割球の方向を固定した時の時系列画像.

図 3.2: 正常胚発生 (図 3.1) の 16 細胞期の回転と隣接関係についての画像.

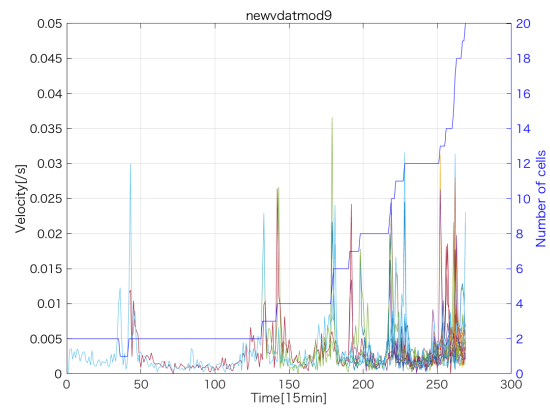
わかる. 胚は通常同期して分裂するため, 割球の数は 2 の累乗だけ増加する. 分裂しない休止期間は, 図 3.1 のように割球の数が一定の期間として確認できる. 一方, 図 3.3b においては, 休止期間が確認される際の割球の数が,  $n = 2, 4, 8, 12$  であるため, 一部の割球で細胞分裂に遅れが生じていることが推測でき, この発生は非正常発生とする. 図 3.3c 左図において, 正常胚発生と同様に割球の数は同期して分裂している. しかし, 図 3.3c 右図に示した系譜図から, 青色で標識した割球が 6 個存在し, 橙色と桃色で標識した割球がそれぞれ 3 個存在した. そのため, 全ての割球が同期して分裂していないことがわかり, 図 3.3c は非正常胚発生であると判断した. 以上の検討により, 実験データから, 受精卵の前核が 2 個であり, 割球が全て同期して分裂して発生した条件を満たす場合



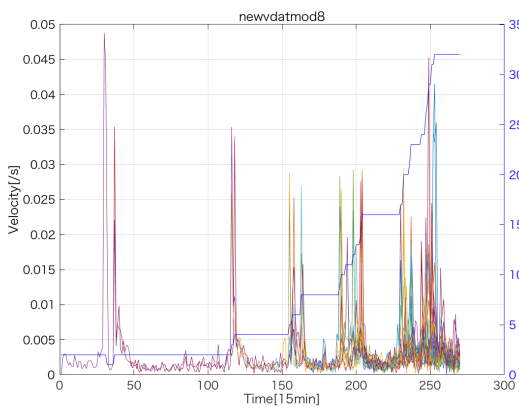
に正常胚発生とした。



(a) 前核が 3 個である異常胚発生.



(b) 分裂が 2 の累乗でない胚発生.



(c) 同期して分裂しない胚発生.

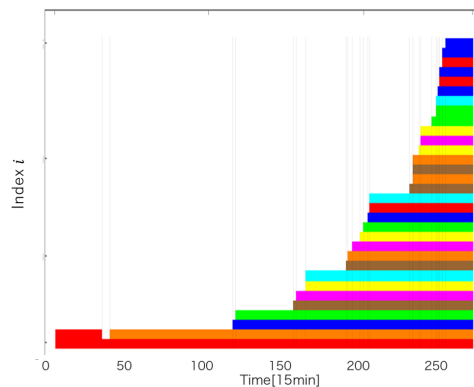


図 3.3: 非正常発生のデータ

### 3.2.2 初期胚発生の割球の位置の関係

実験データにおいて、割球の数が少ない時点の配置パターンについて言及する。割球の数が増加した場合、割球の配置は胚毎に異なるため、割球の集合体として形成される位置パターンやその性質についても記述する。4 細胞期で割球は四面体の頂点に配置されたパターンであった。この配置は非正常発生の場合でも多く観測される配置である。次に 8 細胞期の割球の配置について述べる。この時、ZP の中心に割球、つまり胚の重心に割球が存在しその周囲を囲むように残りの割球が配置された形状をとることを予想していたが、実際には多くの胚で、割球が内側に存在することが確認されず、8 個の割球全てが重心から離れた位置に存在した。この配置は、ZP が楕円形状の場合でも球状の場合についても同じような配置をとることが目測される。割球の胚内での配置はその後

の分化と関係があるが、この観察は 8 細胞期の段階で割球のその後の運命が決定しているとは言えない事を示唆する。一方、16 細胞期の場合、胚の重心近傍に割球が 1 つ存在し、その周囲を残りの割球が囲むような配置が確認された。この形状は 8 細胞期で当初予想していた形状であったが、実際には 16 細胞期で確認された。また、内部に存在する割球は比較的分割タイミングが遅れた親細胞から分裂したものである。このことから、同期して内側に存在するのか、それとも分裂による割球の大きさの減少に伴う空間的な余裕により内側に入る事ができるのか、外側の配置に入り込む余地がないため空間的に押し出された状態であるのかについての解析を行う必要性がある。

胚の重心に対して「内側」と「外側」に位置する割球の判別をするため、内側と外側に位置する割球を判定する指標を設定する。判定する指標として、胚の重心位置を  $\mathbf{r}_{zp}$  とした時、全ての割球  $i$  の核  $\mathbf{r}_i$  の距離の平均  $R_{|N_t|}^d = (1/|N_t|) \sum_i^{|N_t|} |\mathbf{r}_{zp} - \mathbf{r}_i|$  を用いた。この時、 $|N_t|$  はその瞬間の割球の総数であり、胚の重心位置  $|\mathbf{r}_{zp}|$  は実験データから得られた、2 細胞期から観測される全ての割球の位置データを用いて推測した。平均距離  $R_{|N_t|}^d$  は、2 細胞期から 8 細胞期にかけて増加していく傾向が見られる。その為、16 細胞期のタイミングで外側に位置している割球は、 $R_8^d < |\mathbf{r}_{zp} - \mathbf{r}_i|$  を満たす事が推測できる。そこで判定する指標として  $R_8^d$  を用いる。設定した値  $R_8^d$  を用いて、 $N_{in} = \{i | R_8^d > |\mathbf{r}_{zp} - \mathbf{r}_i|\}$  を満たす割球のインデックスの集合を定義する。 $N_{in}$  に含まれる割球の数は、16 細胞期で内側に存在する割球が 1 つであることから、 $|N_{in}| = 1$  であると想定したが、実際に得られた数はそれよりも大きかった。そのため、さらに距離を小さくとり、 $R_{in} = \{i | R_8^d/2 > |\mathbf{r}_{zp} - \mathbf{r}_i|\}$  を満たす割球のインデックスの集合を  $R_{in}$  とした。ここで、 $R_{in}$  は  $N_{in}$  に含まれる割球からさらに内側に存在する割球を含んだ集合である。 $R_{in}$  に含まれる割球は将来的に ICM となり、 $N_{in}$  に含まれる割球は 32 細胞期から胚盤胞を形成するまでに ICM と TE の比率を保つように変動することができると想定した。図 3.4 に、 $|N_{in}|$ ,  $|R_{in}|$  の時系列データを示す。図 3.4 において、8 細胞期のとき全ての割球が  $N_{in}$  に含まれず、一部の割球が外側に存在する集合  $N_t - N_{in}$  に含まれている判定がなされている。これは、胚の形状が完全な球体でない点と胚の重心と割球の位置が変動している事が原因であると考えられる。16 細胞期の時に  $R_{in}$  に含まれる割球が 1 つ存在する事が確認でき、この割球は 32 細胞期でも確認する事ができた。また、32 細胞期から次の分裂にかけて、 $|N_{in}|$  が減少している。これは、この瞬間から胞胚が発生し胚盤胞を形成している事による胚全体の偏りが原因である事が考えられる。

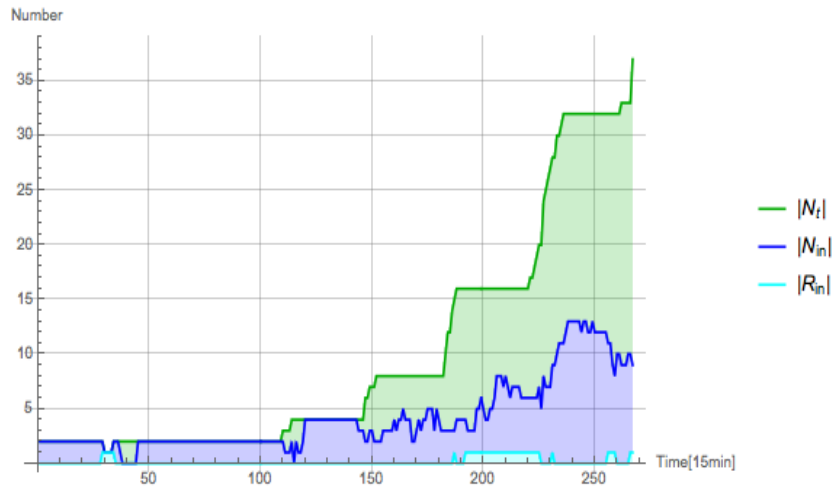


図 3.4: 実験データによる内側と外側の判定結果. 図において  $|R_{in}|$  を水色,  $|N_{in}|$  を青色で表している.  $R_{in} \subset N_{in}$  であり, 時刻  $t$  における全体の割球数  $|N_t|$  を緑色で表している. 外側の割球の数は  $|N_t - N_{in}|$  で, 緑色の領域によって示される.

### 3.2.3 各割球を個別に見たときの速度と位置についてのまとめ

図 3.1 と図 3.4 から, 割球の移動速度と位置の特徴について説明をしたが, 胚の重心位置に分裂する割球を特定するため, 各割球の移動速度・重心位置との距離・系譜図についてまとめたものを図 3.5 示す. 図 3.5 について, 上段は割球の移動速度について, 中段は割球の位置と重心の距離  $|r_{zp} - r_i|$  を表している. また同図の下段で表されているグラフは, 図 3.2 と同様に, 割球を標識した色と時系列の関係を示す系譜図を表している. 図 3.5 で, 割球の移動速度が上昇しているタイミングに注目する事で分裂した割球を特定する事ができる. 例えば, 割球の数が分裂して 18 個になる際, 系譜図から青色で標識した割球が分裂した事がわかる. この時, 16 細胞期の状態で青色で標識した割球は 2 つ存在している為, 系譜図からどちらの割球が分裂したか特定する事ができないが, 分裂した瞬間に割球の移動速度が大きくなっている事に注目すると, 同図上から 3 番目の割球が分裂した事がわかる. しかし, 全く同じタイミングで, 同じ色で標識した割球たちが分裂した場合は, このグラフによる特定ができない. その場合, データの親子関係についてのラベル付けを用い, そこから判断する必要がある. 図 3.4 で,  $R_{in} \geq 1$  に含まれる割球について, 図 3.5 の重心位置と割球の距離の関係を表すグラフ (中段) から特定する事ができる. 8 細胞期から 16 細胞期に分裂する際, 分裂した割球のうち, 緑色で標識した割球と胚の重心との距離が小さく青色で示されている為, 8 細胞期から数えて 7 番目に分裂した割球が内側に移動した事がわかる. その為, この実験データから, 16 細胞期の段階で内側に存在する割球は 8 細胞期から 7 番目に分裂した割球が移動したものである事が確認できる.

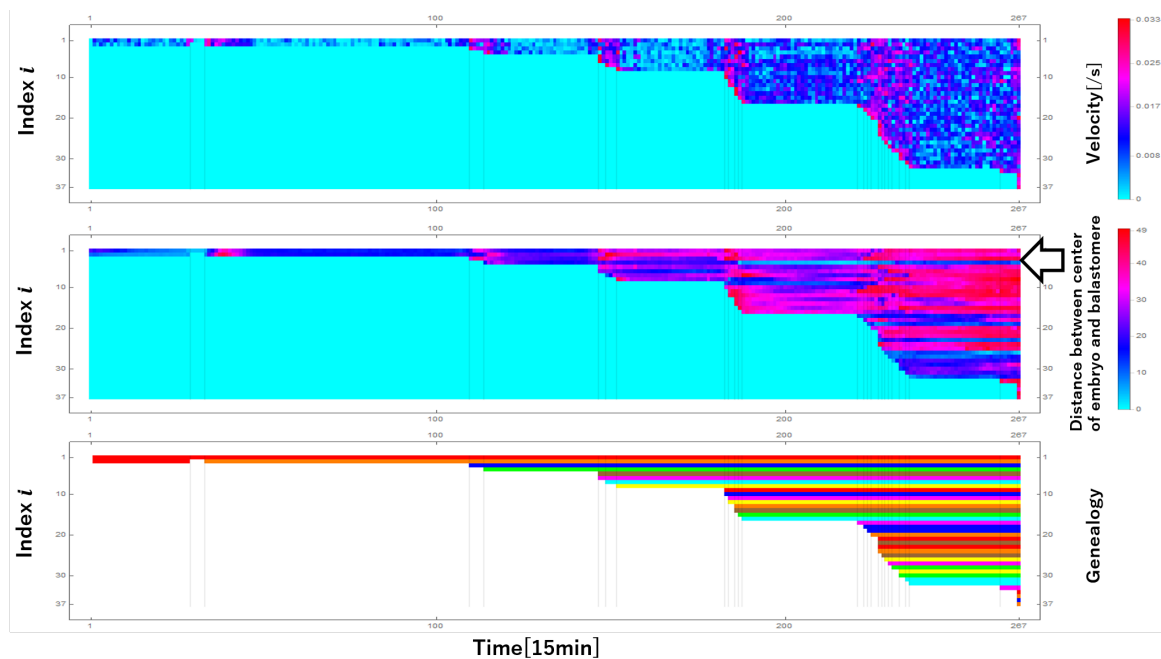


図 3.5: 実験データから得られた各割球についての移動速度 (Velocity[ $\text{m/s}$ ]) , 胚の重心位置との距離 ( $|\mathbf{r}_i^{\text{data}} - \mathbf{r}_g^{\text{data}}|$ ) と系譜図 (Genealogy) の時系列. 図で横軸は時間  $t$ , 縦軸は割球のインデックス  $i$  を表している. 移動速度を表しているグラフ (上段) において, 分裂タイミングの時に速度が上昇し大きい値を示している部分は赤色で示されている. 胚の重心と割球の距離を表したグラフ (中段) において, 重心位置から離れた場合は赤色で示され, 逆に近づいた場合は青色で示される. 割球の系譜図の色はスナップショットで標識した色と対応している. 胚の重心と割球の位置の距離を表すグラフで, 白色の矢印で表されている割球は  $R_{in}$  に含まれる割球で  $i = 3$  である.

## 第 4 章

# 分裂時の力が作用しない場合のシミュレーションによる解析

実験データの解析から得られた結果を再現するために、2 章で記述したモデルによるシミュレーションを行なった。はじめに、式 (2.3) , (2.5) による発生シミュレーションから割球同士の力のみが作用する場合に得られた結果の解析を行った。本章において、細胞分裂については、娘細胞の位置が母細胞の位置に配置されるモデリングを行った。

### 4.1 分裂時の力が生じない場合の発生シミュレーション

シミュレーションを行う時のパラメータとして、有効粘度は  $\gamma = 0.1 \mu\text{N} \cdot \text{s}/\mu\text{m}$ , 受精卵と ZP の半径はそれぞれ  $R_0 = 100 \mu\text{m}$ ,  $R_{zp} = 100 \mu\text{m}$  とした。重心位置は  $\mathbf{r}_{zp} = \mathbf{0}$  を用いた。割球の数は 1 細胞から 32 細胞までとした。各割球が分裂するタイミングとして、図 3.1 から得られる分裂時刻に対して、 $[-200, 200] \text{ s}$  からの独立一様乱数を加えることで、割球毎に独立した細胞分裂を表現した。

#### 4.1.1 Repulsive な力のみが作用する場合

はじめに repulsive な力のみが作用する条件下、すなわち  $\mathbf{F}_{ij}^{atr} = 0$  ( $0 \leq i, j \leq N$ ) , で実験結果が再現できるかを調べるためのシミュレーションを行った。図 4.1 に  $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$  の場合のシミュレーション結果を示す。図 4.1 において、薄い緑色で示されている領域は胚の内部を表している。各細胞の色は図 3.2 と同様である。図 4.1 から、割球は胚の重心  $\mathbf{r}_{zp}$  から外側に向かって移動するため ZP の外周に沿った配置を形成することが確認される。Repulsive な力が小さい場合 ( $k = 0.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ ) , 分裂後の運動が遅いため、図 4.1 で確認される配置に割球が移動する前に次の分裂が起こった。 $k = 0.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$  のときに、次の分裂が起こるまでに割球がどの程度移動するかを確認するため、分裂の周期が十分に長い場合のシミュレーションを行ったところ、図 4.1 と同様に胚の重心  $|\mathbf{r}_{zp}|$  から離れた位置に移動する結果を得た。これらのシミュレーション結果が

ら, repulsive な力のみが作用する場合, 割球が形成する配置パターンは, 分裂のタイミングに依存して変化することが予想される. 安定した位置に移動した後の割球の配置パターンを見る. 4 細胞期までの割球の配置パターンは実験データと同様に正四面体の頂点に配置パターンを形成する事が確認される (図 4.1 の”4-cell stage”). 8 細胞期の場合, 割球の位置は全て胚の重心位置との距離が均等になるような配置パターンを形成していた (図 4.1 の”8-cell stage”). 16 細胞期には, 内側に移動する割球の存在が確認でき (図 4.1 の”16-cell stage”において水色で標識した割球), 残りの割球は全て内側に位置する割球の周囲に均等に並ぶような配置を形成する事が確認される. 32 細胞期の場合の配置パターンについて, 図 4.1 からでは内側に位置する割球を観測するのが難しいため, 次に割球の位置関係について解析を行った結果を説明する.

図 3.4 と同様に  $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$  の時の割球の位置の関係を図 4.2 に示す. シミュレーションにおいて, 割球が「内側」にあるか「外側」にあるかを次のように定義した. まず, 全細胞のインデックスの集合を  $N_t$  とする. 次に, 8 細胞期の割球の配置パターンから, ZP と各割球の重心間距離の平均値を計算し,  $R_8 = (1/8) \sum_i^8 |\mathbf{r}_i|$  とする. この値を用いて, 内側に存在する細胞のインデックスの集合を  $N_{in} = \{i | |\mathbf{r}_i| < R_8\}$ , 外側については  $N_t - N_{in}$  と定義する. また,  $R_{in} = \{i | |\mathbf{r}_i| < R_8/2\}$  とする. この値は以降のシミュレーション結果にも用いている. 図 4.2 に胚の重心と割球の位置関係を示す. 8 細胞期に,  $N_{in}$  の判定が定まらない事が確認できるが, これは 2.1 式のノイズが原因である. 図 4.2 から, repulsion のみが作用する場合の配置パターンは, 8 細胞期でほぼ全ての割球が  $N_{in}$  に含まれる事が確認でき, 16 細胞期のタイミングで外側と内側の区別が現れた. 図 4.2b から, 16 細胞期で  $R_{in}$  に含まれる割球は 1 つであり, 残りの割球は全て外側に位置していることが確認できる. 32 細胞期の状態を確認すると,  $R_{in}$  に含まれていた割球は次第に  $N_{in}$  と判定される領域まで移動したことがわかる. 実験データ (図 3.4) と比較して, 16 細胞期の割球の位置関係として,  $|R_{in}| = 1$  である事が実験データと同様に確認できるが,  $N_{in}$  については実験データとの対応は確認されなかった.

割球の移動速度について, 図 4.3 にシミュレーション結果により得られた時系列を示す. 図 4.3 から, 割球の移動速度は卵割時に最大となり, 割球の数が増加するにつれ速度の減少が確認される. しかし, 図 4.3 のような速度のピークの減少傾向は実験データでは見られていない (図 3.1). そのため, repulsive な力のみが作用するシミュレーションは実験データで得られた移動速度を再現できないことがわかる.

各割球の移動速度と重心位置との距離  $|\mathbf{r}_i|$  の関係についてまとめたものを, 図 4.4 に示す. Repulsion が小さい場合 (図 4.4a), repulsion が大きい場合 (図 4.4b) と比較すると移動速度減少に必要な時間は変わらない.  $|\mathbf{r}_i|$  の関係において, repulsion が小さい場合, 16 細胞期で割球の位置に大きな変化は見らなかった. Repulsion が大きい場合, 16 細胞期で  $|\mathbf{r}_i|$  が小さくなる割球が存在していることが確認できるため, 図 4.2b で内側に移動する割球の分裂タイミングを特定できる. 図 4.4b において,  $|\mathbf{r}_{14}|$  が小さい値をとることから, 8 細胞期から 6 番目に分裂した割球が内側に移動したことがわかる. その後の発生で, 一度内側に移動した割球  $i = 14$  は割球の数が増加するにつれ胚の重心から離れていることがわかる.

Simulation without attractive force

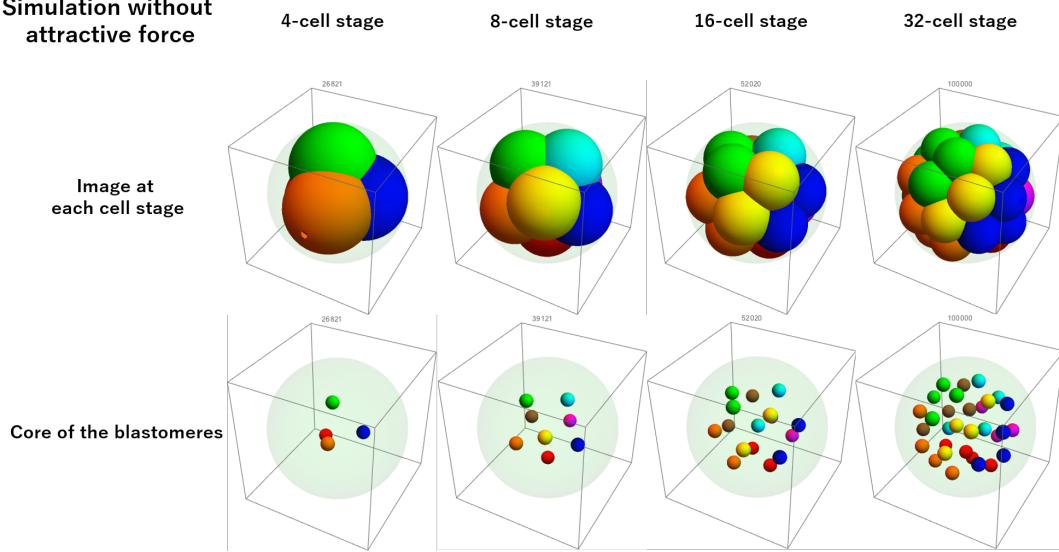


図 4.1: 各細胞期の全割球の配置を動画で再現した時の静止画像. ( $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ )

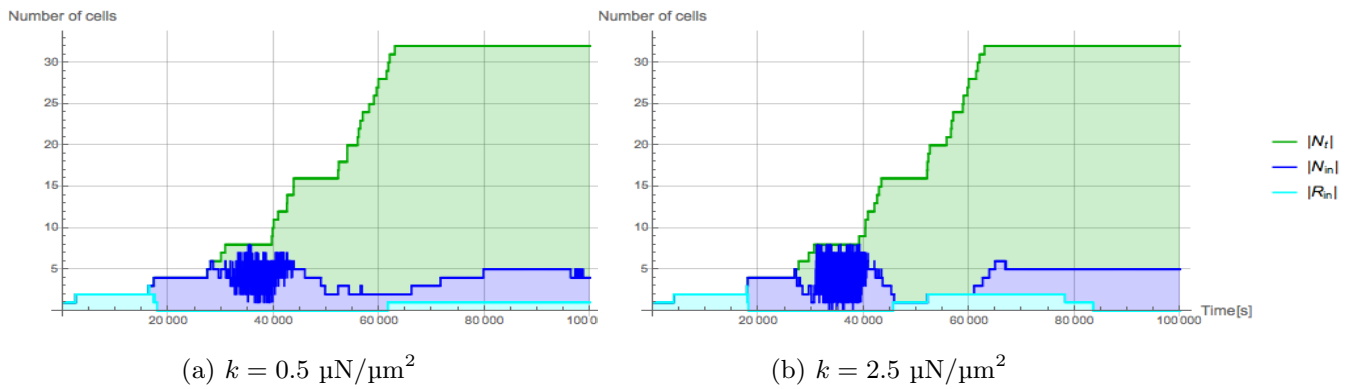


図 4.2: Repulsion のみのシミュレーションの時間応答と内側と外側の判定結果.

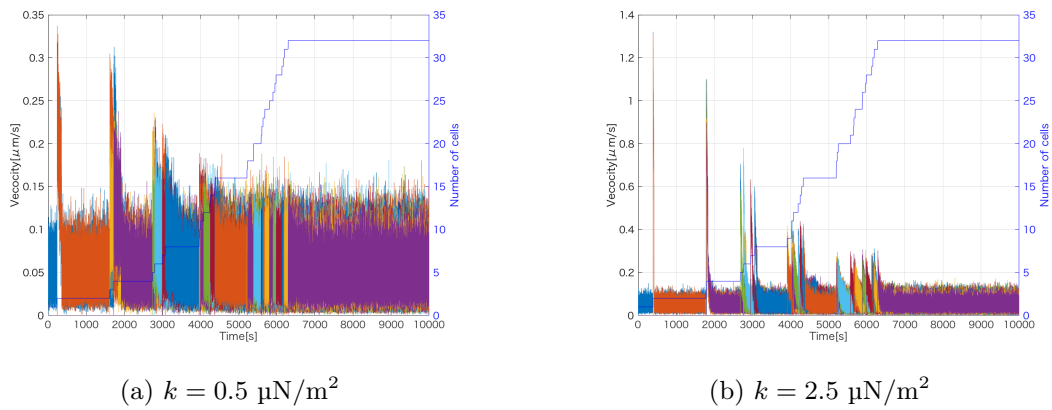
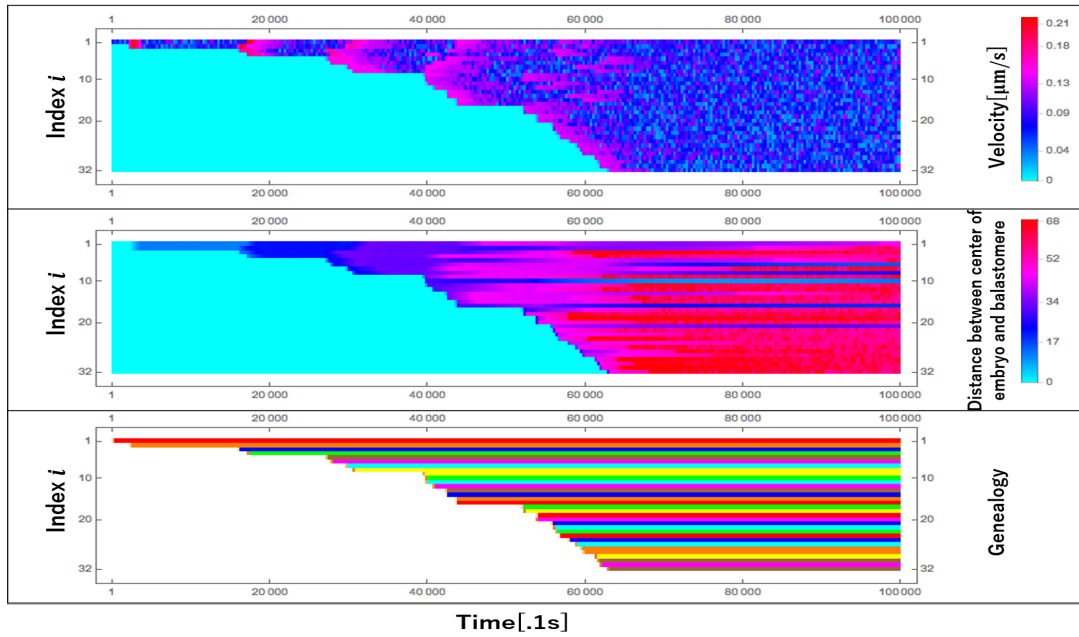
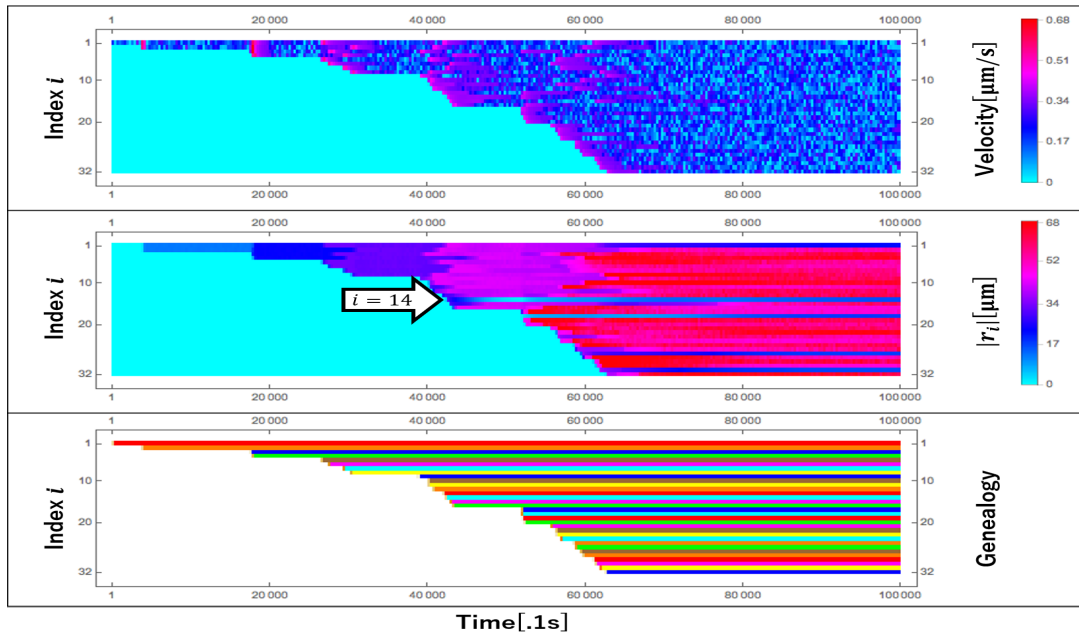


図 4.3: Repulsion のみが作用する時の速度と時間応答の関係図.



(a)  $k = 0.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$



(b)  $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$

図 4.4: Repulsion のみが作用するシミュレーションにおける, 各割球の速度・重心との距離・系譜図をまとめたもの. (b) で矢印で示されている割球のインデックスは  $R_{in}$  に含まれる割球を示している.



#### 4.1.2 Repulsive と attractive な力が作用する時のシミュレーション結果

次に, repulsive な力に加えて attractive な力が作用する場合のシミュレーションを行った. 割球の位置についてのシミュレーション結果を図 4.5 に示す. 図 4.5 において, 8 細胞期までの発生は図 4.1 で観測される配置とほぼ同じ結果を得たが, 16 細胞期からの発生における配置は単純な形状とならないことが観測される. ここで, attractive な力は式 (2.5) のような遠力を用いているため, 引きつける最大距離  $d$  の値が大きい場合, 割球の半径が小さくなると隣接した割球だけでなく, 他の全ての割球に attractive な力が作用してしまう. 特に, 重なり合っている割球について, 隣接している割球を超えて他の割球を引きつけることを避けるように  $d$  の値を設定する必要がある. そのため, attractive な力が repulsive な力よりも十分に強いという条件 ( $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ ,  $A = 50 \text{ fN}$ ) の下,  $d$  の値を変化させたシミュレーションを行なった. その結果を図 4.6 に示す. 図 4.6 に, 16 細胞期以降の発生における割球の配置について得られた結果を図示する. なお, 8 細胞期までの配置は attractive な力が作用しない場合の結果とおおよそ変わらなかった. 図??において,  $d = 10 \mu\text{m}$  の場合全ての割球が互いに引きつけ合うことで, 胚の重心に割球が過集中していることが観測される. この配置は実験データで観測されない配置である. 一方, 同図  $d = 5 \mu\text{m}$  は胚の重心に過集中する現象は見られなかった. そのため, attractive な力  $A$  が大きい場合, 全ての割球が胚の重心に過集中しない条件として, 式 (2.5) で表される attractive な力が作用する距離を  $d = 5 \mu\text{m}$  と固定した. ここで, 図 4.6 において, 16 細胞期における配置は  $d$  の値によらず, 同じような結果となることが確認されるため,  $d$  は割球の大きさに依存して変化する必要がある. 割球の大きさは, 式 (2.7) から受精卵の大きさと分裂回数に依存して変化するが, 本研究のシミュレーションでは受精卵の大きさは変わらないと仮定しているため  $d = 5 \mu\text{m}$  と固定した条件でシミュレーションを行う.

Attractive な力が加わった時, 各細胞期の配置関係について表したものを図 4.7 に示す. この時, 16 細胞期で  $|R_{in}| \geq 1$  となる割球が確認できたことから,  $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$  を固定した時, attractive な力が変化した時の配置パターンについて示す. 最大接着力が  $A = 10 \text{ fN}$  の時, 図 4.2b と比較して,  $|R_{in}| = 0$  であったが  $N_{in}$  に含まれる割球の数は増加していた. また, 最大接着力が増加した  $A = 50 \text{ fN}$  の時, 図 4.7b から,  $|N_{in}|$  は増加したまま,  $R_{in}$  に含まれる割球の出現が確認できる. この結果から, attractive な力が作用する場合, 8 細胞期から割球が分裂する際, 内側へ移動しようとする割球は外側に位置する割球により阻害され  $R_{in}$  に含まれる範囲まで移動する事ができない事が想定される. その接着力が増加した時, 32 細胞期で確認できる内側に存在する事のできる割球の数が増加し,  $|R_{in}|$  も増加している事から, 外側の割球による内部に存在する割球の拘束が原因で全体の配置パターンが変化している事が推測できる.

最大接着力  $A$  を変化した時割球の速度と時間応答についての関係を図 4.8 に示す. この結果から, 図 4.8 で 8 細胞期までの速度は repulsion のみが作用する結果と同様に減少する傾向が観測されたが, 16 細胞期からの速度は増加している事がわかる. しかし, 図 3.1 で確認できるような速度が均一となるような傾向は見られなかった. Attractive な力が作用するシミュレーション結果から速度が増加した原因は分裂した割球の大きさが, 親細胞の大きさと比較して減少した為, 他の割球

が引き付けられたと推測できる。

以上のシミュレーション結果で得られた割球全体の速度と位置関係を、各割球についてまとめたものを図 4.4 と同様に図 4.9 に示す。図 4.9 から、repulsive な力に加えて attractive な力が作用する場合、16 細胞期から割球が分裂する時に、分裂に関与しない割球の速度が赤色に示されるように増加している事が確認でき、attractive な力が大きい時は顕著に現れる事が図 4.9b から確認できる。Repulsion のみが作用するシミュレーション結果（図 4.4）で、速度の増加が確認される割球は、全て分裂した割球が互いに押し合う事で生じたものであった。その為、図 4.8 で見られた移動速度の増加は、分裂時に割球の大きさが小さくなる事で生じた空間に他の割球が引つけられる事が原因である事がわかる。次に図 4.7 で確認できた内側に移動した割球の分裂タイミングについて特定をする。  $A = 10$  fN について、内側に存在していると判定された割球の数は  $|N_{in}| = 3$  であり、それぞれ 8 細胞期から 2, 6, 7 番目に分裂した割球が内側に移動した結果である。その後、内側に位置する割球の内、16 細胞期から数えて 3 番目に分裂した割球が  $R_{in}$  に含まれる割球となり、もう一つの娘細胞も内側に位置していた。  $A = 50$  fN の時、  $R_{in}$  に含まれる割球は、4 番目に分裂した割球が内側に向かい、その後 5 番目の割球の分裂の後にさらに内側に移動したものであった。この結果から、attractive な力が作用したシミュレーションでは早期に分裂した割球が内側に移動する事を確認できる。

Attractive な力が作用する時のシミュレーション結果から、内側と外側に存在する割球の配置パターンにおいて、パラメータ  $A$  が大きい場合、実験データで得られた配置パターンについての再現を行う事ができたが、割球全体の速度について卵割から 8 細胞期の増加を再現する事ができず、16 細胞期以降の速度増加についても分裂に関与しない割球が引き寄せられる事で生じた速度であった事から、実験データで観測される結果を再現できなかった。

図 3.5 の重心と割球の位置の距離についての関係図から、分裂タイミングの時に青色で示された位置から赤色に示された位置へと大きく変化している事がどの細胞期でも観測できる事から、分裂した後の割球の位置は大きく動いていた。また、その時、娘細胞以外の割球について速度変化は見られず、娘細胞のみの速度上昇が確認できる。一方で、図 4.9 から、attractive な力に引き付けられることにより分裂後の位置の移動についての移動は確認できたが、他の割球が受ける力の影響が大きかった。この結果から、分裂する割球のみが速度を持ち、分裂終了時に大きく移動している事を再現する為のシミュレーションとして、分裂時の力が作用するシミュレーションの必要性が示唆される。

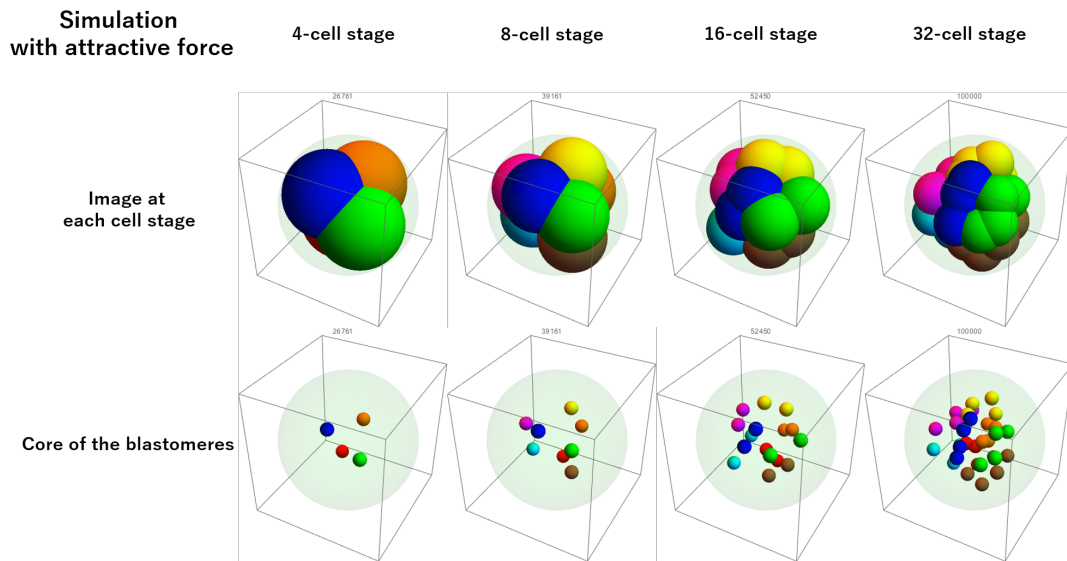


図 4.5: Attractive な力を考慮した各細胞期の全割球の配置 ( $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ ,  $A = 10 \text{ fN}$ ,  $d = 5 \mu\text{m}$ ) .

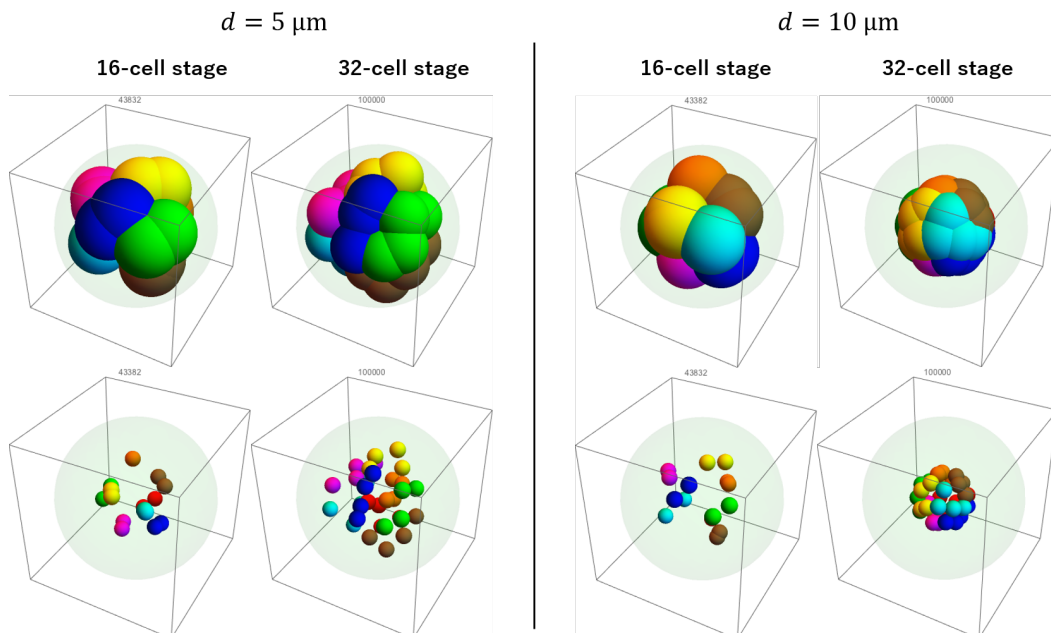


図 4.6: Attractive な力を導入する時の距離  $d$  に依存した関係図 ( $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ ,  $A = 50 \text{ fN}$ ) .

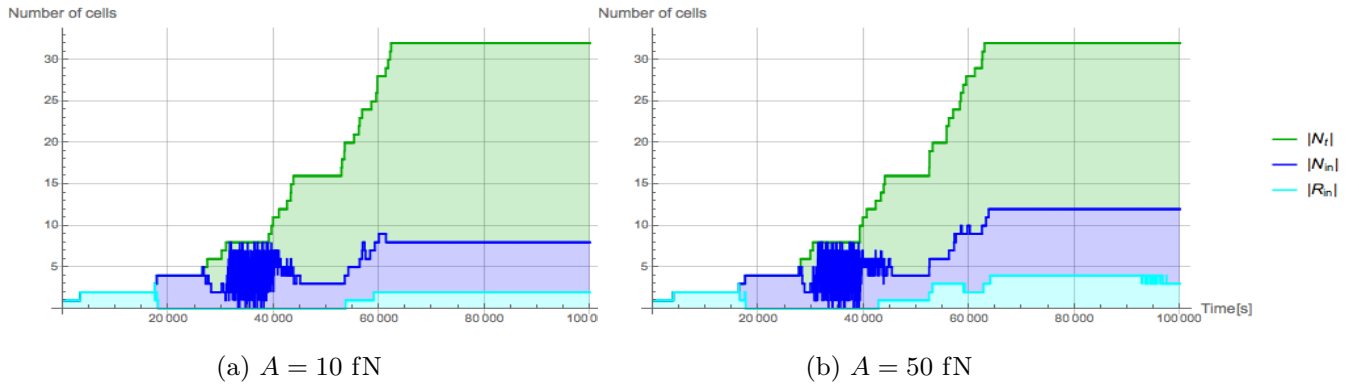


図 4.7:  $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$  の時, attractive な力による内側と外側の配置パターンの関係.

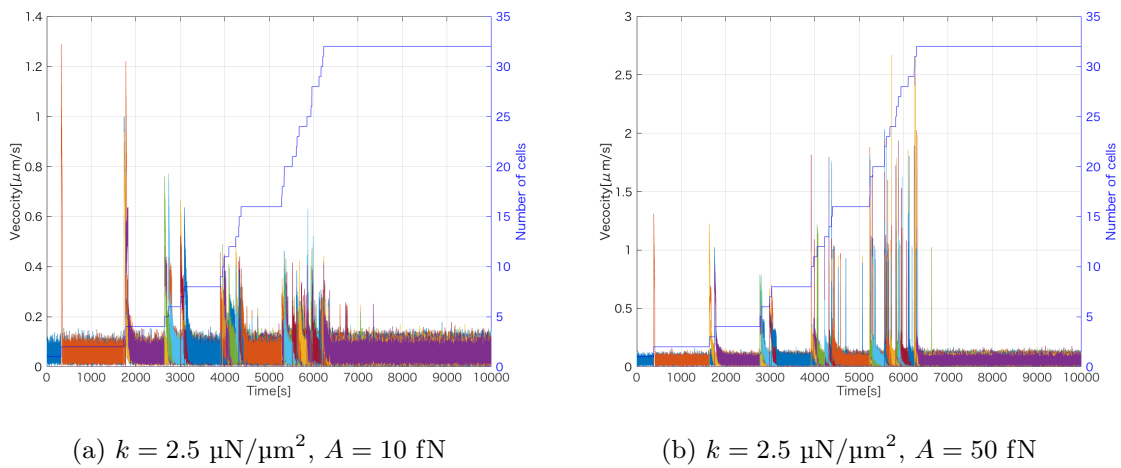
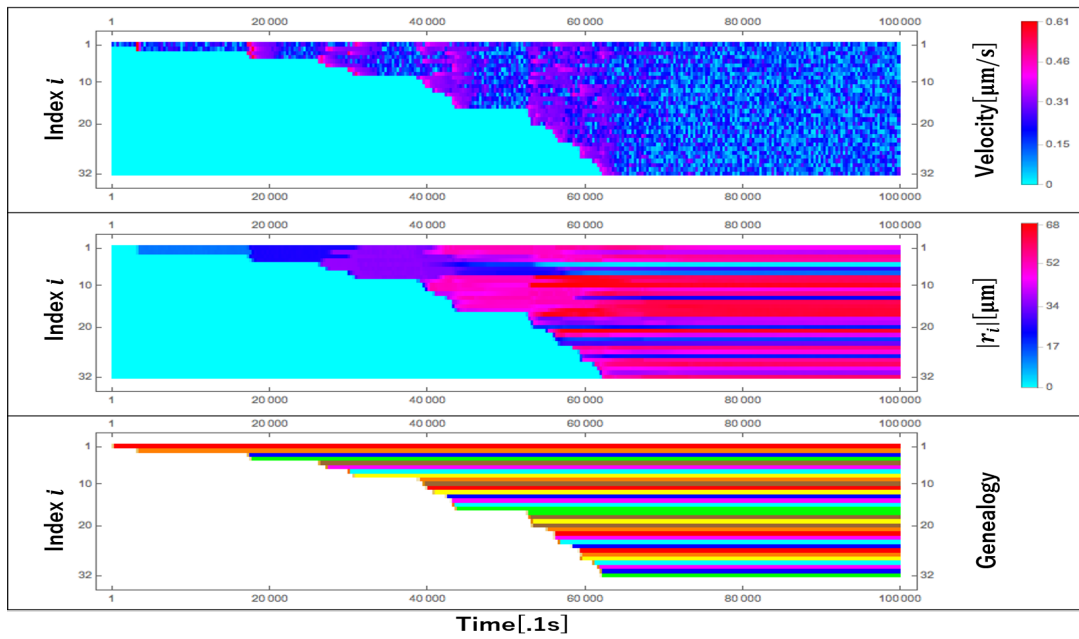
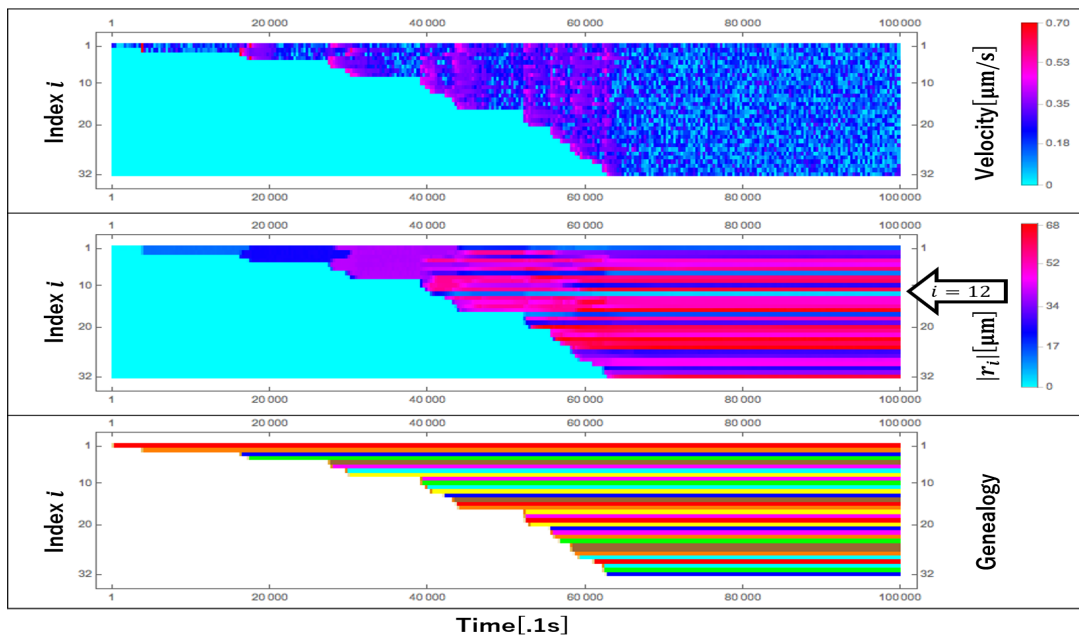


図 4.8:  $d = 5 \mu\text{m}$  を固定した時に, attractive な力を導入したシミュレーション.



(a)  $A = 10$  fN の時, attractive な力による内側と外側の配置パターンの関係



(b)  $A = 50$  fN の時, attractive な力による内側と外側の配置パターンの関係

図 4.9:  $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$  の時, attractive な力を変化した時の各割球の速度・重心との距離・系譜図. (b) で矢印で示されている割球のインデックスは 16 細胞期に  $R_{i_n}$  に含まれる割球を示している

## 第 5 章

# 分裂時の力をモデル化した場合のシミュレーション

4 章では先行研究に沿って、分裂時の力を考慮しない場合、割球同士の力学的相互作用のみの発生シミュレーションを行った。シミュレーションの結果からは、実験データの割球の移動速度を再現することができなかった。本章では、分裂時の力をモデル化した場合のシミュレーションを行う。

### 5.1 分裂時の力を考慮した場合のシミュレーション結果

細胞分裂する時の割球の移動を再現するために、紡錘体が分裂方向に対して力を加えることを考慮したシミュレーションを行う。4 章と同様にパラメータを以下のように設定した。Attractive な力が作用する距離として  $d = 5 \mu\text{m}$ , 有効粘度は  $\gamma = 0.1 \mu\text{N} \cdot \text{s}/\mu\text{m}$ , 受精卵と ZP の半径はそれぞれ  $R_0 = 100 \mu\text{m}$ ,  $R_{zp} = 100 \mu\text{m}$  であるとした。また、胚の重心位置として  $\mathbf{r}_{zp} = \mathbf{0}$  を用いた。分裂終了条件を与える娘細胞間の距離  $l$  については、式 (2.8), (2.9) の中で定義した。ここで、パラメータ  $l$  が取りうる値の範囲を、 $0 \leq l \leq 40 \mu\text{m}$  とした。ここで、 $l$  の最大値は 2 細胞期の割球距離から次のように計算した設定した。  $|\mathbf{r}_{12}| = 2(R_0 - R_1) = (2 - 1/\sqrt[3]{2})R_0 \simeq 40 \mu\text{m}$ . ただし、 $R_1 = R_0/\sqrt[3]{2}$ .

### 5.2 分裂時の力が加わった場合のシミュレーション結果

4 章では、repulsive な力のパラメータが  $k = 2.5 \mu\text{N}/\text{m}^2$  のとき、割球は次の分裂時刻までに安定した配置に移動することができたことから同じ値をここでは用いる。また attractive な力のパラメータは  $A = 10 \text{fN}$  とした。図 5.1 に分裂時の距離  $l$  と力  $G$  をコントロールパラメータとしてシミュレーションを行った結果を示す。図 5.1 より  $k = 2.5 \mu\text{N}/\text{m}^2$ ,  $A = 10 \text{fN}$  の条件下では、 $l, G$  の値によらず、16 細胞期には  $|R_{in}| \geq 1$  となることが確認された。

シミュレーションで得られた割球の位置関係を図 5.1 に示す。図 5.1 において、どのパラ

メータ条件の場合でも、16 細胞期の際に内側に位置する割球は  $|R_{in}| \geq 1$  となることが確認された。しかし、 $l$  の大きさに依存して  $|R_{in}| \geq 1$  となるタイミングが異なることが確認できる。 $l = 40 \mu\text{m}$  の場合、分裂した直後に  $R_{in}$  に含まれる割球が存在することが確認できるが、 $l = 10 \mu\text{m}$  の場合には休止期間で  $|R_{in}| \geq 1$  となることが確認できる。

割球の移動速度についてシミュレーション結果から得られた時系列を図 5.2 に示す。図 5.2 において、割球の数に関わらず移動速度が一定となる結果を得た。また、 $G$  の値が変化した場合に移動速度が増加しているため、分裂時に作用する力は実験データを再現するために重要な役割を持つ事が示唆される。図 5.2 において、卵割時に作用する力は、式 (2.8) , (2.9) から分裂時の相互に作用する力  $G$  だけである。そのため、図 5.2 において、卵割時の移動速度は  $G$  に依存して得られた結果である。そのため、卵割時の移動速度を基準にしたとき、割球の数が増加した際に、移動速度が減少したことは分裂方向に対して ZP や他の割球からの阻害の影響が大きく、移動速度が増加したことは他の割球により助長されたことが原因であると推測できる。16 細胞期からの発生で移動速度に影響を与えるのは、4 章から attractive な力  $A$  とこの結果から分裂時の力  $G$  であることが推測される。ここで、実験データにおいて、正常胚発生で割球の数が増加した場合に移動速度が減少していることが確認される。一方、attractive な力  $A$  が増加した場合は移動速度が増加することが予想される。そのため、実験データで得られた移動速度を再現するためには分裂時の力  $G$  だけでなく attractive な力  $A$  の調整も行う必要がある。

分裂時の力を仮定することで割球の移動速度が均一となるような結果を再現することができた。このシミュレーション結果において、各割球の移動速度と胚の重心と割球の距離についてまとめたものを図 5.2 に示す。図 5.3 では胚の重心に移動する割球について分裂タイミングとその方向について解析を行う。 $l = 10 \mu\text{m}$  の場合、図 5.1a, 5.1b において、 $R_{in}$  に含まれる割球は、分裂した後に休止期間で移動したものであった。図 5.1a では、割球  $i = 6$  の割球が重心に向かって分裂をしていた。その後、他の割球が分裂することで  $|r_{10}|$  が次第に小さくなることから内側に移動したと判断できる。図 5.1b では、先に割球  $i = 5$  が重心方向に向かって分裂したが内側に移動することがなく、割球  $i = 1$  が重心方向に向かって分裂しその後に内側に移動したことが確認される。この結果から、分裂距離  $l$  が短い場合、8 細胞期から先に重心方向に分裂した割球が内側に移動することが確認されるが、特に分裂順番について特定されるような現象は確認されなかった。この原因は、先に分裂し外側に位置する割球が、内側に移動する割球を阻害していることが推測される。そのため、 $l$  が小さい場合、隣接した割球の分裂する順番と分裂方向についての解析が今後の課題となる。

$l$  が大きい場合について解析を行う。 $R_{in}$  に含まれた割球は、いずれも、重心方向に向かって分裂した割球であったが、 $l$  が小さい場合、分裂による移動が十分でない為  $R_{in}$  に含まれなかった。その後、他の割球が分裂する事で  $R_{in}$  に含まれる事が確認できる。 $l = 40 \mu\text{m}$  の場合、移動距離が十分の為、分裂後に  $R_{in}$  に含まれる可能性が高くなる。図 5.2c において、8 細胞期で 4 番目に分裂した割球が  $R_{in}$  に含まれているが、これは胚の重心方向に向かった分裂であった。その後、5 番目と 6 番目に分裂した割球が胚の重心方向に移動したが、先に  $R_{in}$  に含まれている割球により内側への移動が阻害されている事が推測できる。分裂の力  $G$  が大きい場合 (図 5.2d) , 4 番目に分裂した割球が胚の重心方向へ移動をした事が確認できる。しかし、図 5.2a と同様に、この分裂で割球は  $R_{in}$  に

含まれず、他の割球が分裂する事で次第に内側に移動している事が確認できる。その為、この解析から、内側に移動する事のできる割球は、分裂方向と移動距離に依存している事がわかる。この仮説を検証するには、分裂方向について操作を加えた上で、内側に入り込む事のできる割球についての解析を行うべきだが、本研究では分裂方向はランダムであると想定している為、今後の課題として後述する。

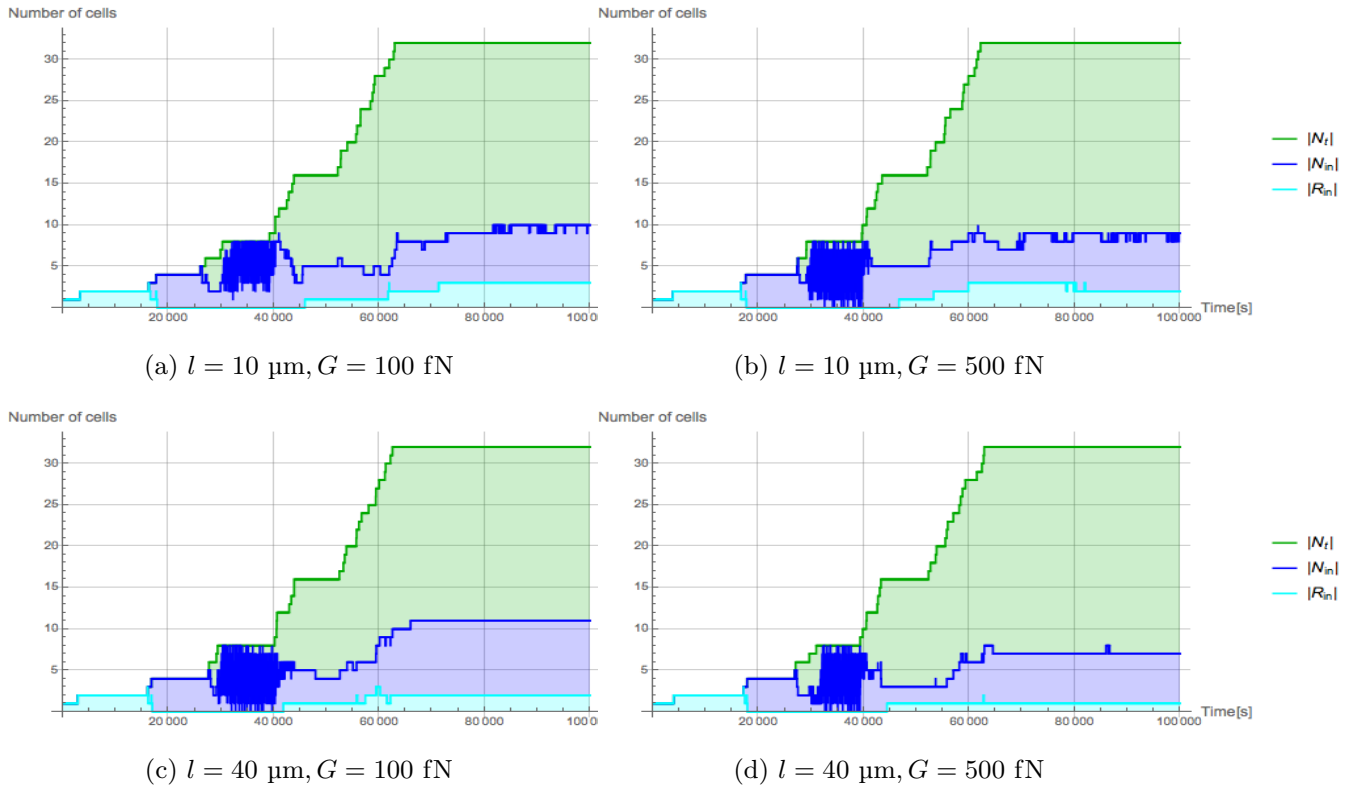
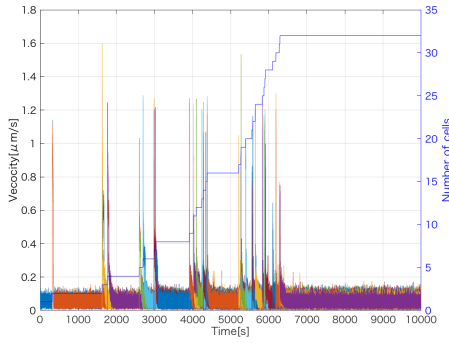
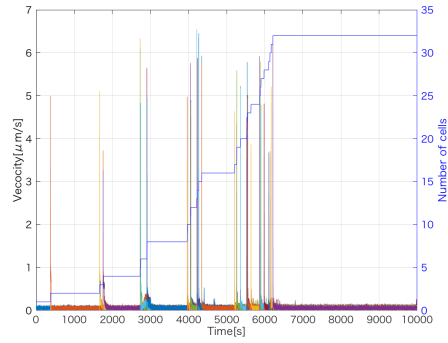


図 5.1:  $k = 2.5 \mu\text{m}, A = 10 \text{ fN}$  の時の時間応答と内側と外側の判定結果.

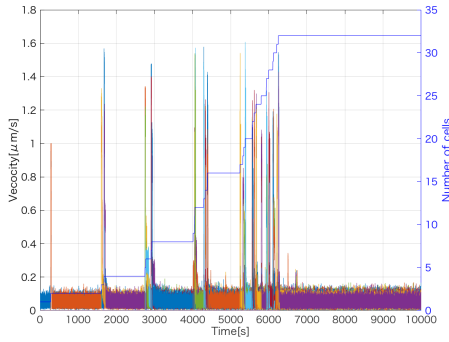




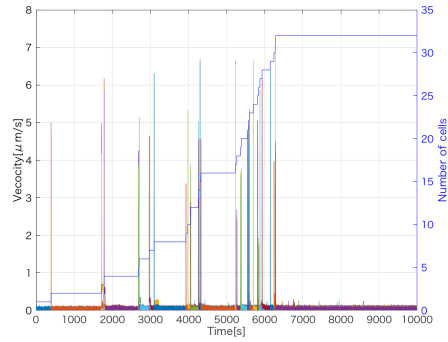
(a)  $l = 10 \mu\text{m}, G = 100 \text{ fN}$



(b)  $l = 10 \mu\text{m}, G = 500 \text{ fN}$



(c)  $l = 40 \mu\text{m}, G = 100 \text{ fN}$

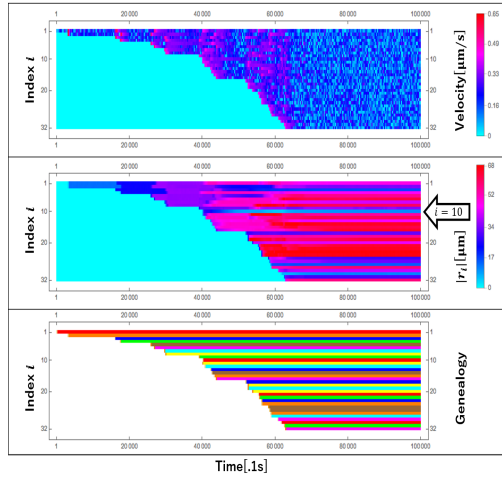


(d)  $l = 40 \mu\text{m}, G = 500 \text{ fN}$

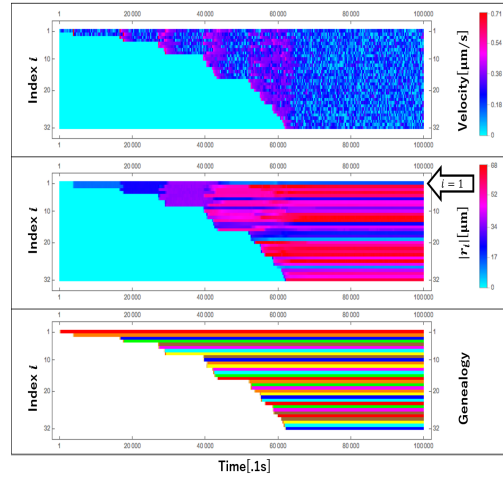
図 5.2:  $k = 2.5 \mu\text{m}, A = 10 \text{ fN}$  の時の速度と時間の関係. グラフ内の矢印で表されたインデックスは全て 16 細胞期に  $R_{in}$  に含まれる割球を表す.

### 5.3 総合的なパラメータによる解析と実験データの再現

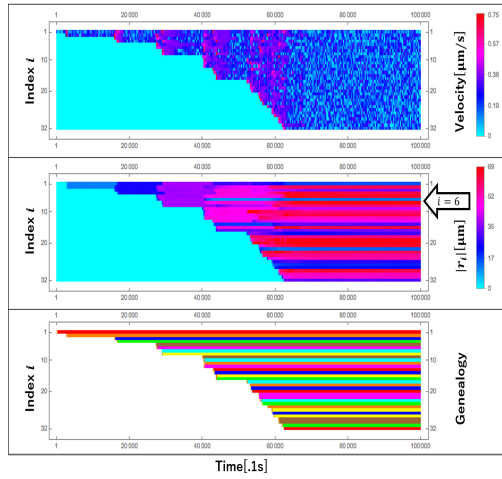
実験データで観測された結果について、割球の移動速度と、内側と外側の位置関係を再現できるパラメータを、シミュレーション結果と比較する事で推定した. この推定を行う時、実験データに沿うように以下の条件を設定した. 実験データで得られた結果のうち、図 3.4 から、割球の内側と外側の位置関係について、16 細胞期で  $|R_{in}| \geq 1$ , 32 細胞期で  $8 \leq |N_{in}| \leq 16$  を満たす必要がある. 次に、8 細胞期で数えて 5 番目から 8 番目に分裂した割球が内側に移動し  $R_{in}$  に含まれる事に注目した. この内側に分裂した割球を特定する為に、胚の重心と割球の距離を表すグラフと、シミュレーションから得られた割球の位置を再現した動画を利用した. 以上の条件から、実験データを再現するパラメータとして、 $k = 2.5 \mu\text{N}/\mu\text{m}^2$ ,  $A = 10\text{fN}$ ,  $G = 200 \text{ fN}$  が最も妥当であると判断した. この条件について、割球の移動速度の時系列を図 5.4, 割球の位置関係を 5.5, 各割球の移動速度・胚の重心と割球の距離関係・系譜図を図 5.6 にそれぞれ示す. 図 5.5 において  $R_{in}$  に含まれる割球は、8 細胞期から 2 番目に分裂して内側に移動した割球であった. この割球は、胚の重心に向かって分



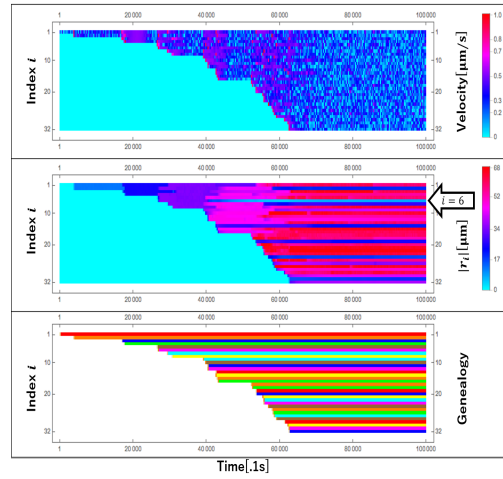
(a)  $l = 10 \mu\text{m}$ ,  $G = 100 \text{ fN}$



(b)  $l = 10 \mu\text{m}$ ,  $G = 500 \text{ fN}$



(c)  $l = 40 \mu\text{m}$ ,  $G = 100 \text{ fN}$



(d)  $l = 40 \mu\text{m}$ ,  $G = 500 \text{ fN}$

図 5.3:  $k = 2.5 \mu\text{m}$  の時の重心位置と割球の距離の関係。

裂した割球であった。しかし、他の割球の repulsive な力により  $R_{in}$  の判定から押し出される事で  $N_{in}$  に含まれた事が観測できる。図 5.6 において、この  $R_{in}$  に含まれてその後移動した割球は、上から数えて 10 番目、黄色で標識した割球であった。その後、その割球は同図の胚の重心との距離を見ると、それ以降の位置の変化は見られなかった。このことから、押し出された割球は  $R_{in}$  の判定近くに位置している事がわかる。この状態の場合、他の割球が分裂した後に内側に再び移動する事が今までの結果から推測される。しかし、次に  $R_{in}$  に含まれた割球は、8 細胞期から 6 番目の分裂により移動した割球であった。この割球は胚の重心に向かって分裂していた。8 細胞期から遅れて内側に分裂する割球は repulsive な力から押し出される事がなく、そのまま内側に留まれる事がわかる。6 番目の分裂が終了した時、図 5.6 の胚の重心と割球の距離について見ると、 $R_{in}$  に含まれる

割球を特定するのは難しいが、シミュレーション結果により得られたデータから動画で再現し、 $R_{in}$  に含まれる割球を特定した。8細胞期から早期に分裂した割球が内側に移動する事ができず、遅れて分裂した割球が内側に移動して  $R_{in}$  に含まれる現象は、実験データでも観測する事ができる（図 3.4）。

以上のとおり、力学モデルを用いて、正常胚発生で確認できる割球のと割球全体の移動速度と配置パターンについて解析を行った。その結果、割球の分裂時の速度の大きさは、分裂する際の紡錘体が原因である事が強く示唆された。分裂の力を考慮した時のシミュレーションから、実験データを再現するパラメータを特定した。そのパラメータから、16細胞期に内側へ移動する割球は、周囲の物理的要因により分裂が遅れる事で内側へ移動できる事が示唆された。内側へ移動した割球は将来 ICM に分化する事が予測され、8細胞期から16細胞期にかけて ICM となる割球は物理的要因が原因である事を示唆された。しかし、本研究は分裂方向がランダムである事を想定しており、内側へ移動する割球は分裂方向に影響して決定される事もわかっている。その為、物理的要因による分裂方向の決定も行われるようなモデリングをする事が今後の課題となる。

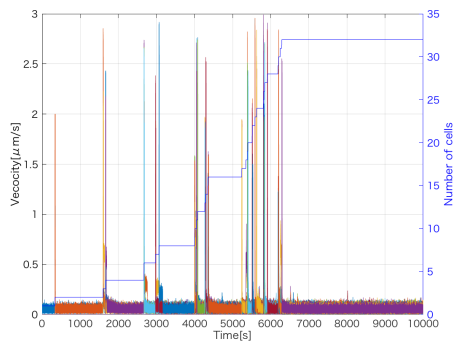


図 5.4: 全ての割球の移動速度.

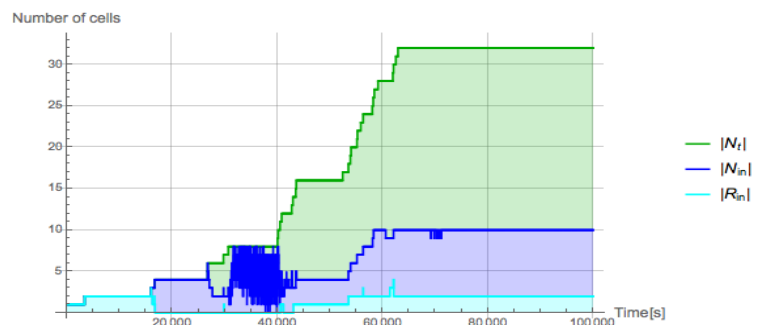


図 5.5: 内側と外側の位置関係.

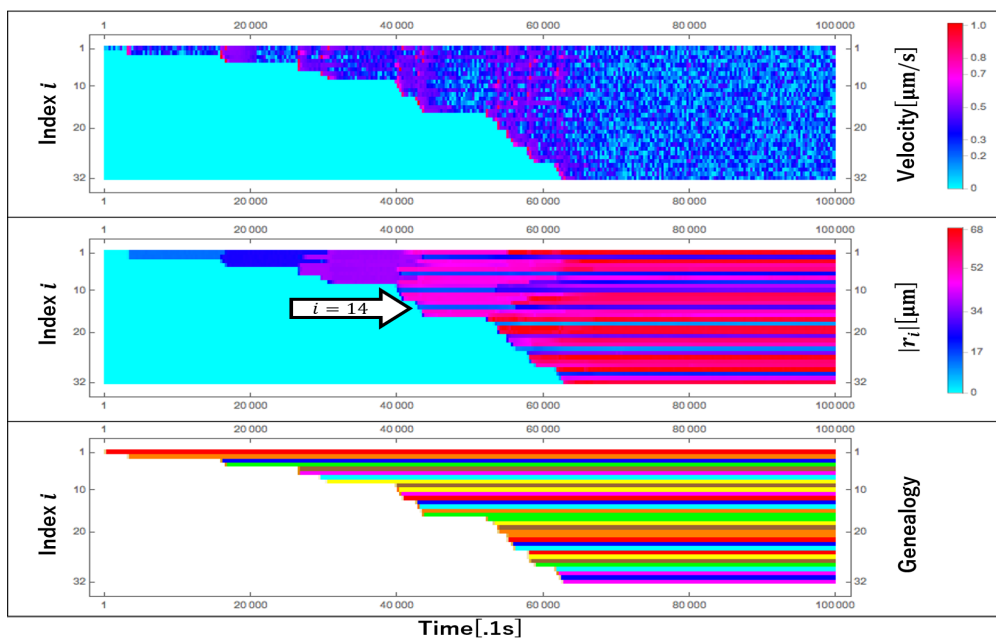


図 5.6: 各割球の速度, 重心との距離, 系譜図をまとめたグラフ. グラフ内の矢印で表されたインデックスは 16 細胞期に  $R_{in}$  に含まれる割球を表す.

## 第 6 章

# 将来の課題

本研究のシミュレーション結果は、分裂方向と分裂タイミングが一様ランダムであると仮定した条件の下で得られた内容であった。このシミュレーション結果より、内側へ移動する割球が物理的要因であることを明らかにしたが、分裂方向に依存して結果が変わる事が予想される。そのため、今後の課題として、分裂方向が隣接した割球の力学応答に影響して決定される事を仮定したモデリングを行う必要がある。また、本研究で使用したモデルパラメータを実験データから定量的に推定することも必要である。

### 6.1 分裂モデルの改良

文献 [13] によると、分裂方向は割球内部の微小管のダイナミクスから影響を受ける。また、文献 [14] では分裂距離は割球の大きさに依存して変化する事が報告されている。本研究では、分裂により生じる娘細胞の位置を母細胞の重心位置から一様ランダムな方向に定めていたが、微小管の影響を考慮することで、分裂方向にバイアスがかかることが予想される。このような場合に、どのような発生パターンが得られるのかを検討することは今後の課題である。

### 6.2 力学モデリング

本研究の力学モデルでは、全てのパラメータを適当な値に固定していたが、実際には互いに独立かどうかわからない。Attractive な力では仮想的な弾性応答力を仮定しているが、変形は考慮していない。変形を考慮する場合、attractive な力の大きさパラメータ  $A$  は repulsive な力のパラメータ  $k$  に影響されるはずである。また、限界距離  $d$  は repulsive な力と接着力により変化するはずである。したがって、今後は割球の大きさに依存したパラメータ  $k$  のモデリングを行う必要がある。

文献 [1, 5] によると、細胞分化に伴う割球毎の接着力のばらつきが細胞層の形成にとって重要であることが示されている。したがって、分化を伴う発生のシミュレーションを行う際には、細胞同士の接着力の違いに注意する必要がある。これに関連して、接着面積に比例した力による割球の変形

問題を解決する必要がある [5].

### 6.3 シミュレーションにより実現できなかった運動

実験データでは, 16 細胞期に割球全体が回転するような動きが観測された. しかし, 本研究のシミュレーションでは再現できなかった. 実験データで割球全体が回転するタイミングは 16 細胞期で観測された. この運動が生じる原因として, 分裂により生じた慣性力が割球に働いている場合と, 16 細胞期の内部に存在する割球が角運動量を持ち, 接着している割球に影響を及ぼしている場合が考えられる. 前者の場合, 分裂時の移動速度と慣性力を記述する為に Langevin 方程式を解き, 32 細胞期までの発生シミュレーションを行う必要がある. この運動を記述する際, 接着力により生じる角運動についても考える必要がある. 後者の場合, 16 細胞期の内部に存在する割球の運動量が変化していることが予想される.

## 第7章

### 結論

哺乳類の初期胚発生についてトラッキングデータから得られた時系列データから、単純な力学モデルを用いて位置情報と配置パターンについて解析を行った。その結果から、分裂の力についての重要性について明らかにし、16細胞期で観測された配置パターンが物理的要因によって形成された事を明らかにした。この結果から、将来分化する割球の位置について、内側に移動した割球の遺伝子発現は物理的要因によって決定される事が示唆された。今後の課題として、物理的要因による分裂方向の決定と内側に移動する事のできるパラメータを定量的に解析する事が重要となる。

# 謝辞

本研究を行うにあたり、指導教員である小林徹也准教授には、研究テーマに沿った生物学の知識と研究テーマについてご指導いただきました。研究の進め方や数理的な手法についてご助言をいただいたことに深く感謝いたします。

本稿と発表スライドの作成に数々の助力をいただき、研究のお力添えをいただいた定量生物学研究室の飯田溪太様に深く感謝いたします。研究生活において様々な示唆をいただいた斎藤陽平様に深く感謝いたします。本研究を含め日頃からお世話になった定量生物学研究室の杉山友規様、金子和正様に深く感謝いたします。また、元定量生物学研究室の横田亮様、梶田真司様と合原研究室の宮原英之様にお世話になったことに深く感謝いたします。

修士2年の錦野敬三郎様、中島蒼様、修士1年の中村絢斗様には、研究を行うにあたり多くの刺激と示唆を得ることができ、日々の生活を支えてくださったことに深く感謝いたします。

本研究で用いたデータは近畿大学発生遺伝子工学研究室のご協力の下作成されたものであり、データを提供していただいた山縣一夫准教授に深く感謝いたします。



# 対外発表

- [1] 松井崇晃. 初期胚発生における力学モデルの解析. 第 15 回生物数学の理論とその応用: 次世代の数理科学への展開. 京都, 9 月 12 日, 2018 年, 口頭発表.
- [2] Takaaki Matsui, Tetsuya J. Kobayashi. Analyzing and modeling early embryo development. The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. Okayama, September 15, 2018, ポスター発表.

## 参考文献

- [1] H. Honda, N. Motosugi, T. Nagai, M. Tanemura and T. Hiiragi, "Computer simulation of emerging asymmetry in the mouse blastocyst," *Development*, vol. 135, no. 8, pp.1407-14, 2008.
- [2] Yayoi Toyooka, Sanae Oka, Toshihiko Fujimori "Early preimplantation cells expressing Cdx2 exhibit plasticity of specification to TE and ICM lineages through positional changes," *Developmental Biology*, vol. 411, Issue 1, pp. 50-60, 2016.
- [3] T. Kobayashi, M. Ozeki, K. Yamagata and A. Funahashi, "Reconstitution of Developmental Dynamics of Mammalian Embryogenesis from 3D Confocal Microscope Images," *IEICE Technical Report*, vol. 114, no. 482, pp.1-6, 2015
- [4] H. Wang and S. K. Dey, "Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models," *Nat Rev Genet*, vol. 7, no. 3, pp.185-199, 2006.
- [5] P. Krupinski, V. Chickarmane and C. Peterson, "Simulating the Mammalian Blastocyst Molecular and Mechanical Interactions Pattern the Embryo," *PLoS computational biology*, May 5, 2011.
- [6] Y. Sun, K.-T. Wan, K. P. Roberts, J. C. Bischof and B. J. Nelsen, "Mechanical Property Characterization of Mouse Zona pellucida," *IEEE*, vol. 2, no. 4, 2003.
- [7] Andreas R. Bausch, Florian Ziemann, Alexei A. Boulbitch, Ken Jacobson and Erich Sackmann, "Local Measurements of Viscoelastic Parameters of Adherent Cell Surfaces by Magnetic Bead Microrheometry," *Cell*, Vol. 75, no. 4, pp.2038-2049, 1998
- [8] M. Thie, R. Rospel, W. Dettmann, M. Benoit, M. Ludwig, H. E. Gaub and H. W. Denker, "Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces," *Human Reproduction*, vol. 13, no. 11, pp. 3211-3219, 1998
- [9] K. Yamamoto and A. Kitamura, "An asymmetric model for the diversity and robustness of cell arrangement in nematodes," *Development* 2017, 144: 4437-4449, doi: 10.1242/dev.154609
- [10] Y. Kurotaki, K. Hatta, K. Nakao, Y. Nabeshima, T. Fujimori, "Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape," *Science*, vol. 316, no. 5825, pp. 678-1297, 2007.

- [11] Y. Shimamoto, Yusuke T. Maeda, S. Ishiwata, Albert J. Libchaber, Tarun M. Kapoor, "Insights into the Micromechanical Properties of the Metaphase Spindle," *Cell Press*, Vol. 145, no. 7, pp. 1062-1074
- [12] M. K. Bashar, K. Komatsu, T. Fujimori, and T. J. Kobayashi, "Automatic Extraction of Nuclei Centroids of Mouse Embryonic Cells from Fluorescence Microscopy Images," *PLoS ONE*, Vol. 7, no. 5, pp.e35550, 2012
- [13] A. Pierre, J. Sall, M. Whr and N. Minc, "Generic Theoretical Models to Predict Division Patterns of Cleaving Embryos," *Developmental cell*, Vol. 39, No. 6, pp. 667-682, 2016
- [14] Y. Hara, and A. Kimura, "Cell-Size-Dependent Spindle Elongation in the *Caenorhabditis elegans* Early Embryo," *Current Biology*, Vol. 19, pp. 1549-1554, 2009
- [15] E. Palsson and Othmer, H.G., "A model for individual and collective cell movement in *Dictyostelium discoideum*," *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol. 97, no. 19, 2000.
- [16] Dallon, J.C. and Othmer, H.G., "How Cellular movement determines the collective force generated by the *Dictyostelium discoideum* slug," *Journal of theoretical Biology*, vol. 231, Issue 2, pp.203-222, 2004
- [17] M. Zernicka-Goetz, Samantha A. Morris and Alexander W. Bruce, "Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo," *Nature reviews*, vol. 10, no.7 , pp.467-477, 2009.
- [18] K. Cockburn and J. Rossant, "Making the blastocyst: lessons from the mouse," *J Clin invest*, vol. 120, no. 4, pp. 995-1003, 2010.
- [19] S. B. Nissen, M. Perera, J. M. Gonzalez, S. M. Morgani, M. H. Jensen, K. Sneppen, J. M. Brickman and A. Trusina, "Four simple rules that are sufficient to generate the mammalian blastocyst," *Plos Biology*, vol. 15, no.7, 2017.
- [20] C. Staessen, M. Camus, I. Khan, J. Smits, L. Van Waesberghe, A. Wisanto, P. Devroey, A. C. Van Steirteghem, "An 18-month survey of infertility treatment by in vitro fertilization, gamete and zygote intrafallopian transfer, and replacement of frozen-thawed embryos," *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, Volume 6, Issue 1, pp.22-29, 1989.
- [21] S. Go, H. Kiyonari, T. Abe and S. Aizawa, "A Mouse Reporter Line to Conditionally Mark Nuclei and Cell Membranes for in Vivo Live-Imaging," *Article in genesis* 49(7), 570-578, 2011
- [22] B. Alberts, A. Johnson and et al., "Molecular Biology Of The CELL : 細胞の分子生物学 第4版," 中村桂子, 松原謙一監訳, Newton Press, 2004