

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H01870

研究課題名(和文) 二次元細胞集団の相状態とダイナミクス：局所秩序構造の定量手法の開拓

研究課題名(英文) Phase states and dynamics of two dimensional cell ensembles: Exploration of methodology to quantify local order structures

研究代表者

山本 暁久 (Yamamoto, Akihisa)

京都大学・高等研究院・特定助教

研究者番号：90706805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再生医学において使用される培養角膜内皮細胞集団と、実際に再生された角膜内皮組織の顕微鏡画像について、パーシステントホモロジーの手法を用いて細胞配列の局所的な構造秩序の解析を行った。その結果、高品質な細胞群では数十程度から成る細胞集団が協同的に秩序だった領域を形成することが示された(山本ら、発表準備中)。

さらに、再生した角膜内皮組織の術後3年時点における長期予後の評価を行った。その結果高品質細胞率の高い患者群においては、術後6ヶ月だけでなく術後3年においても細胞配列秩序が高水準で維持されることを明らかにした。(上野、山本ら(2022))。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、これまで研究代表者・山本、研究分担者・上野らが取り組んできた「再生医療における細胞品質と細胞配列構造秩序の関係」の理解を更に深め、細胞集団における局所的な配列秩序と相状態を定量評価する方法論を新たに提唱した。実際に高品質細胞群によって再生した角膜内皮組織では、配列秩序のより高い領域が局所的に形成されていることを明らかにした。更にこれまでの成果に加え、再生組織の長期予後を評価する物理的バイオマーカーとしても細胞配列秩序が重要な定量指標となることも実証した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we shed light on both of the in vitro cultured human corneal endothelial cells and the regenerated corneal endothelial tissues in vivo, and proposed a novel methodology to quantify the degree of local collective order of cellular arrangement based on the persistent homology analysis. We found that the corneal endothelial tissues regenerated with the higher proportions of mature cell subpopulation display the local structures composed of tens of cells that exhibit high degree of collective order locally (Yamamoto et al, in preparation). Moreover, we evaluated the long-term prognosis of regenerated human corneal endothelial tissues by the cell injection therapy, and demonstrated that patients treated with higher proportion of mature cell subpopulations sustained the higher collective order compared to those with lower proportion of mature cell subpopulations (Ueno, ... Yamamoto, et al. (2022)).

研究分野：ソフトマター物理

キーワード：細胞集団 自発構造秩序 位相的データ解析 医学物理 上皮組織

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は互いに接着して協同的に運動しながら生物の組織を形作る。各組織では固有の細胞配列構造の実現により機能を発現し、恒常性によりその秩序が維持される。しかし癌のような遺伝子変異や外傷などが加わると本来の秩序が乱れ、組織機能が喪失する。上皮組織のひとつである角膜内皮においても、組織の正常性の指標として細胞密度やサイズ分布、六角形細胞率などが検証されてきたが、このような細胞の形状と組織機能との相関は不明であった(総説: McCarey, et al., *Cornea* (2008)など)。一方、研究代表者・山本はこれまでの研究において研究分担者・上野らと共に、細胞集団の配列秩序をコロイド物理の手法で解析することで、「培養されたヒト角膜内皮細胞」の品質と「これを用いてヒト生体内で再生した角膜内皮組織」の機能が正確に評価できることを示し、高品質・高機能な細胞集団ほど高い空間秩序を形成することを明らかにしてきた(Yamamoto, et al., *Nature Biomedical Engineering* (2019))(図1)。このように多細胞集団の配列秩序は組織の生体機能に重要な意味を持つことが示唆されるが、この秩序がどのように発生・維持されるのかをソフトマター物理や非線形物理の観点から定量解析し明らかにするという研究はこれまでになかった。

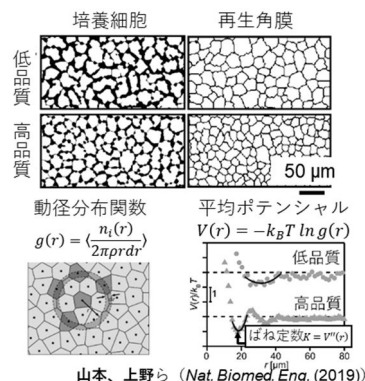


図1: ヒト角膜内皮細胞の配列秩序評価法の開発。培養細胞および再生角膜の両方を統一的に評価する手法として、細胞重心の動径分布関数に基づく平均力ポテンシャルを計算し、細胞品質が正確に評価できることを示した。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、『上皮系細胞集団における細胞配列秩序の局所的な構造を定量し、その発生と維持を細胞スケールの精度で定量的に記述する新たな物理モデルを構築することができるか』を明らかにするために、多細胞集団がつくる局所的な配列秩序を測定・定量し、そこから集団全体の相状態と安定性を記述する新たな枠組みを提案することを目的とした。細胞集団の秩序形成過程において、細胞間の配列の変化および各細胞の形状変化・運動のデータを取得し、局所的な秩序が維持・喪失するダイナミクスの評価を行った。細胞サイズや張力などを変数とした従来の物理モデルでは、細胞形状や配列が実験結果を正しく記述できないという課題があったが、一方ソフトマター物理学においては、系の秩序を記述する重要な概念としてオーダーパラメーターが挙げられる。近年は液晶などのみならず自己駆動型コロイドの集団においても、隣接粒子同士的位置関係を秩序変数として定義することでその相転移挙動が記述されている。また細胞集団においても配列秩序が系全体の状態を記述する重要な指標となることを申請者が示してきた。本研究ではこの知見をさらに発展させ、細胞集団の配列秩序時空間パターンを細胞スケールの精度で記述し、細胞集団における局所的な配列秩序と系全体の相状態の関係を解明するための新たな物理モデルの創出を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では再生医療の基準で管理された品質のヒト角膜内皮細胞を用いて、その細胞集団が作る秩序構造を局所的に特徴付ける方法を開拓した。細胞集団に含まれる高品質細胞の割合と細胞配列の空間パターンの関係に着目し、集団秩序の自発的な形成過程をタイムラプス観察し、細胞の形状・運動と局所的な秩序のダイナミクスを解析した。局所的な細胞配列秩序に基づく新たなオーダーパラメーターと秩序の安定性を記述するために、特にパーシステントホモロジーによる解析を行った。パーシステントホモロジー(例えば Edelsbrunner, et al., *Discrete & Computational Geometry* (2002), Hiraoka, et al., *PNAS* (2016)など)は空間内の点の集合に対する位相幾何学の手法である。図2のように複数の細胞重心から描かれる円の重なりがつくる“空洞”の生成と消滅からパーシステント図を構成することで、集団の秩序をマルチスケールに記述することができる。そこで本研究では細胞輪郭を抽出し、各細胞の重心位置からパーシステントホモロジー解析を行った。パーシステント図を比較することで、細胞亜集団ごとに特徴的な位相構造を抽出した。これらの特徴的な位相構造を有する細胞配列を「逆問題」の手法で可視化する(Obayashi, *Bulletin of the Japan Society for Industrial and Applied*

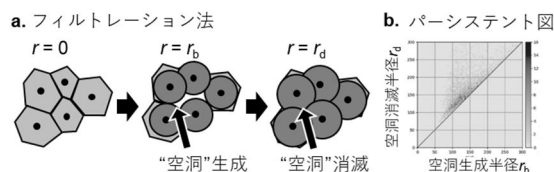


図2: パーシステントホモロジー解析の概要。a. フィルトレーション法によって細胞重心から半径  $r$  の円を成長させ、複数の円の重なりによって“空洞”が生成・消滅するときの半径の組  $(n_b, r_a)$  を取得する。b. 点集合  $P = \{p_k\}_{k=1}^N$  に対するフィルトレーション法で得られる全ての  $(n_b, r_a)$  の組をパーシステント図上にプロットすることで、点集合  $P$  がもつ位相構造の特性を可視化し適切な情報の縮約を行う。

Mathematics (2016))ことで、組織内における局所秩序の分布を表現する手法の確立を試みた。さらに、細胞配列秩序の定量化の臨床的意義を更に発展させるため、再生角膜内皮組織の長期予後を細胞重心の動径分布関数によって評価し、再生角膜内皮組織の安定性との関係を検討した。

#### 4. 研究成果

本研究ではまず、角膜内皮組織の再生医学で新規に開発されてきた「細胞注入法」(Kinoshita et al., *New England Journal of Medicine* (2018))において使用される培養角膜内皮細胞集団の顕微鏡画像と、それらを用いて実際に再生された術後 6 ヶ月時点における角膜内皮組織のスペキュラー顕微鏡画像について、パーシステントホモロジーによる解析を行った。2次元細胞形状から各細胞の重心位置を抽出し、この点集合(point cloud)  $P = \{p_k\}_{k=1}^N$  に対してフィルトレーション法を適用してパーシステントダイアグラム  $\{(b_k, d_k)\}_{k=1}^N$  を作成した。ここでは構造の差異に特に焦点を当てるため、それぞれの画像において平均細胞サイズによる規格化を行った。細胞品質を反映する局所構造を抽出するために、高品質細胞の割合によって全サンプルを 2 群分割し、重みづけ関数  $w(b, d) = \tan^{-1}\{C(d - b)^p\}$  を用いたパーシステントイメージ

$$\hat{\rho}(x, y) = \sum_k w(b, d) \cdot \exp\left\{-\frac{(b_k - x)^2 + (d_k - y)^2}{2\sigma^2}\right\} / \iint \sum_k \left[ w(b, d) \cdot \exp\left\{-\frac{(b_k - x)^2 + (d_k - y)^2}{2\sigma^2}\right\} \right] dx dy$$

において最大の差異が与えられるパラメーターセット  $(C, p, \sigma)$  をグリッドサーチ法により探索した。2群の分離度の評価にはロジスティック回帰を用い、Leave-One-Out 法を活用した交差検証法により精度評価を行った。この方法により、高品質細胞率 80% 以上または 80% 以下の 2 群に分類した場合、それぞれの群に特徴的な局所構造を反映した分布を持つ再構成パーシステント図を得ることができた(図 3a)。さらに再構成パーシステント図から逆問題を解くことで各群の特徴を反映する実空間構造を取得し、スペキュラー顕微鏡画像に対して高品質細胞群・低品質細胞群それぞれに特徴的な位相構造をマッピングすることに成功した(図 3b)。特筆すべき事項として、高品質群に特徴的な位相構造(図 3a における領域 A に対応)では、1 つのリング構造を形成する細胞数が有意に大きいことが明らかになり、高品質細胞によって再生した角膜内皮組織では数十個の細胞が協同的に秩序だったドメインを形成することが示された。この結果により、これまでに研究代表者・山本、研究分担者・上野が見出してきた「高品質・高機能な細胞集団ほど、コロイド物理の手法に基づいて解析した配列秩序が高くなる」という挙動において、配列秩序の特に高い領域が寄与していることが明らかになった。現在、これらの成果をもとにした論文発表の準備を行うとともに、移植前の細胞集団のタイムラプス画像におけるパーシステントホモロジー解析の結果との比較検討を行っている。

さらに、細胞注入療法によって再生した角膜内皮組織の長期予後を評価するために、術後 3 年時点でのスペキュラー顕微鏡画像を取得し、細胞重心位置の動径分布関数から平均力ポテンシャルを計算した。その結果高品質細胞率の高い患者群においては、平均力ポテンシャルのうち隣接細胞間に由来する極小値の周りの曲率(「バネ定数」)  $K = V''(r_0)/k_B T$  の値が、術後 6 ヶ月だけでなく術後 3 年においても高い値で維持されることを明らかにした。実際にこの群では角膜組織の臨床的指標も高水準で維持されていることが示され、研究代表者・山本と研究分担者・上野らはこれらの結果をまとめ国際誌に発表した(Ueno et al., *American Journal of Ophthalmology* (2022))(図 4)。

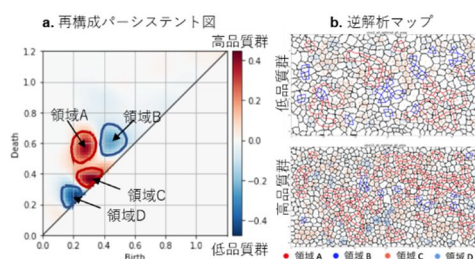


図 3: a. 細胞注入療法による再生角膜内皮のスペキュラー顕微鏡画像を高品質細胞率に基づいて 2 群に分割したときの高品質群(赤)・低品質群(青)にそれぞれ特徴的な構造を示す再構成パーシステント図。 b. 再構成パーシステント図で得られた領域 A~D に所属する点  $(b_k, d_k)$  について、逆解析により得られたリング構造の実空間マッピング。

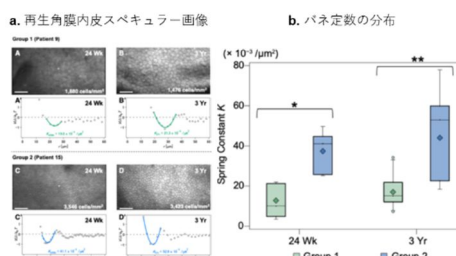


図 4: a. 細胞注入療法による再生角膜内皮の術後 6 ヶ月および 3 年のスペキュラー顕微鏡画像。Group 1(上段; 高品質細胞率 80% 以下)では  $K_{24Wk} = 19 \times 10^{-3} / \mu m^2$ 、 $K_{3Yr} = 21 \times 10^{-3} / \mu m^2$ 、Group 2(下段; 高品質細胞率 80% 以上)では  $K_{24Wk} = 41 \times 10^{-3} / \mu m^2$ 、 $K_{3Yr} = 53 \times 10^{-3} / \mu m^2$  となり、より秩序だった配列構造が長期にわたり保たれることを示した。 b. バネ定数  $K$  の分布の箱ひげ図。術後 6 ヶ月と 3 年のどちらでも、Group 2(高品質細胞率 80% 以上)の群でバネ定数が有意に高く保たれることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 UENO MORIO, TODA MUNETOYO, NUMA KOHSAKU, TANAKA HIROSHI, IMAI KOJIRO, BUSH JOHN, TERAMUKAI SATOSHI, OKUMURA NAOKI, KOIZUMI NORIKO, YAMAMOTO AKIHISA, TANAKA MOTOMU, SOTOZONO CHIE, HAMURO JUNJI, KINOSHITA SHIGERU	4. 巻 237
2. 論文標題 Superiority of Mature Differentiated Cultured Human Corneal Endothelial Cell Injection Therapy for Corneal Endothelial Failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 267 ~ 277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2021.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本暁久
2. 発表標題 細胞集団秩序に基づくヒト角膜内皮組織再生の長期予後評価
3. 学会等名 京大ーハイデルベルク大 - 理研ワークショップ 第3回 医学と数理（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本暁久、田中寛、戸田宗豊、外園千恵、羽室淳爾、木下茂、上野盛夫、田中求
2. 発表標題 ヒト角膜内皮再生医療における細胞品質・予後予測の統合的バイオマーカーの開発
3. 学会等名 第69回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本暁久
2. 発表標題 Local Collective Ordered Structure of Restoring Human Corneal Endothelium Characterized by Persistent Homology and Its Function
3. 学会等名 TDA-MI workshop 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本暁久、田中求
2. 発表標題 ヒト角膜内皮の培養細胞と再生組織における細胞集団秩序に基づいた予測的診断法の開発
3. 学会等名 京大-ハイデルベルク大-理研ワークショップ 第2回 医学と数理(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	上野 盛夫	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師	
	(Ueno Morio)		
	(40426531)	(24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	ハイデルベルク大学		