

「数理が紡ぐ新しい科学研究」連携ワークショップ第1回―生命医科学と数理科学― 2019.08.19. @ 北海道大学フロンティア応用科学研究棟



細胞集団挙動の定量による 培養細胞と再生ヒト角膜内皮の 予測的診断法の開発

京都大学 高等研究院 医学物理・医工計測グローバル拠点(CiMPhy) 田中求研究グループ 特定助教 山本暁久



ヒト角膜内皮のための物理バイオマーカー



京都大学・高等研究院



京都府立医科大学・眼科学教室



田中求 教授



上野盛夫 講師



田中寛博士

バプテスト眼科クリニック

中谷科学技術振興財団 日本学術振興会



ヒト角膜内皮のための物理バイオマーカー

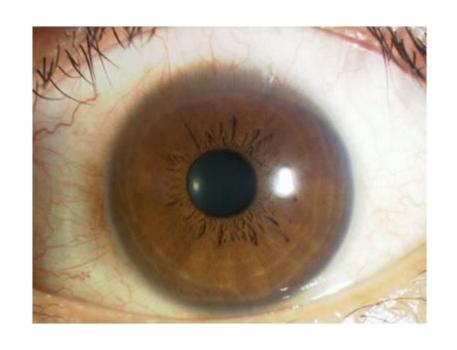
nature biomedical engineering ARTICLES

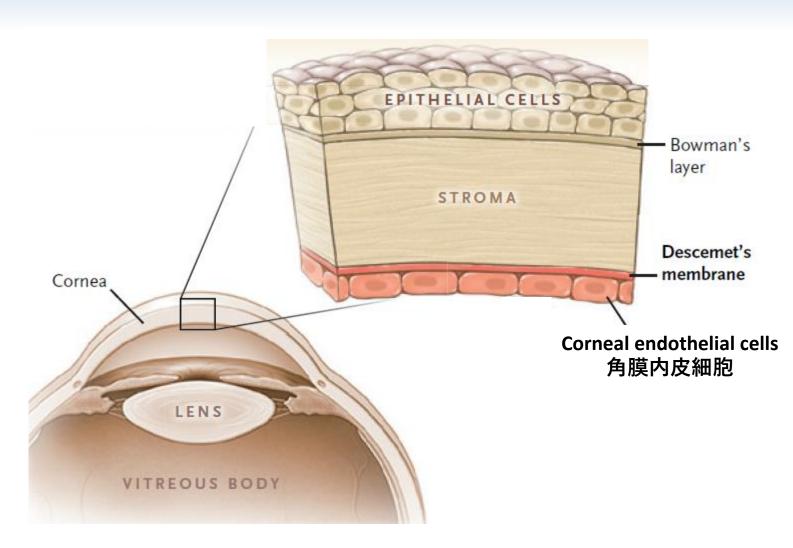
https://doi.org/10.1038/s41551-019-0429-9

A physical biomarker of the quality of cultured corneal endothelial cells and of the long-term prognosis of corneal restoration in patients

Akihisa Yamamoto^{1,5}, Hiroshi Tanaka^{2,5}, Munetoyo Toda², Chie Sotozono², Junji Hamuro², Shigeru Kinoshita³, Morio Ueno^{2*} and Motomu Tanaka^{1,4*}

角膜の構造





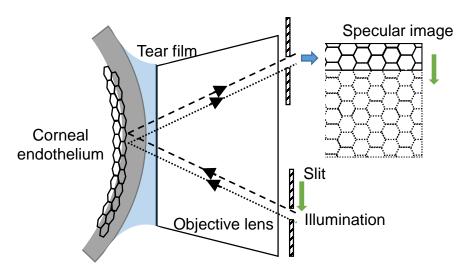
Kinoshita et al., N. Engl. J. Med. 378 (2018)

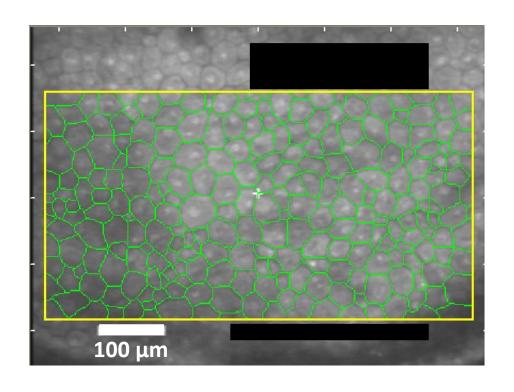
角膜内皮を「診る」

スペキュラー顕微鏡





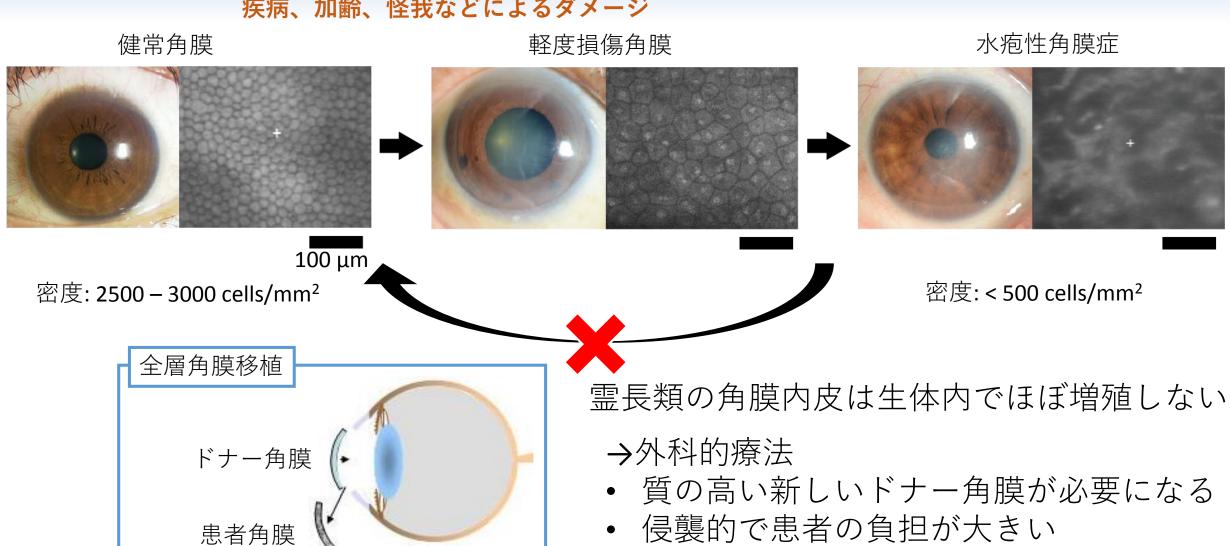




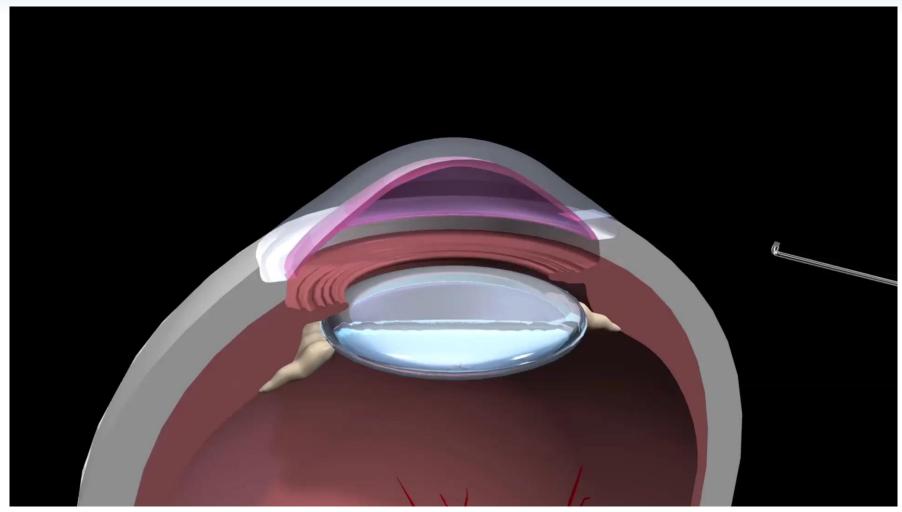
生体内の角膜内皮細胞の輪郭を 生きたまま観察できる

角膜の損傷と治療

疾病、加齢、怪我などによるダメージ



"細胞注入療法"の確立

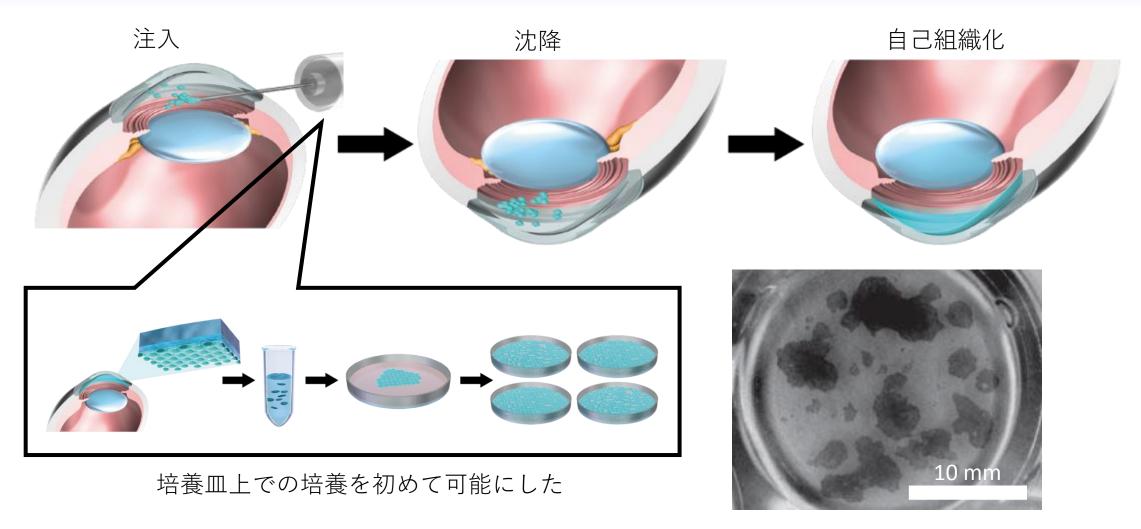




2017年から医師主導治験を開始

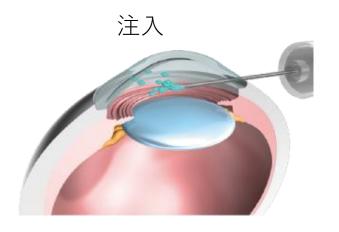
Kinoshita et al., N. Engl. J. Med. 378 (2018)

臨床上の課題(1):細胞選別

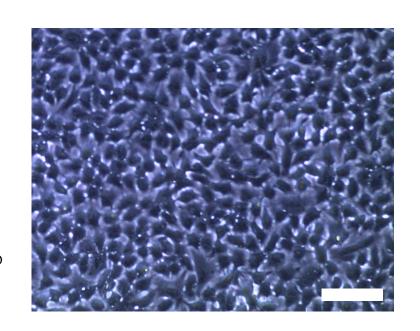


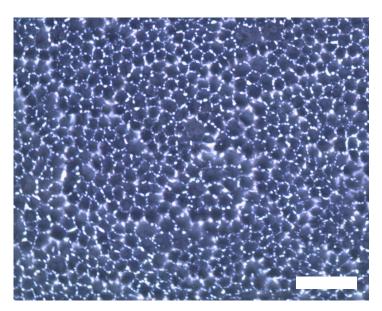
Okumura et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 50 (2009)

臨床上の課題(1):細胞選別



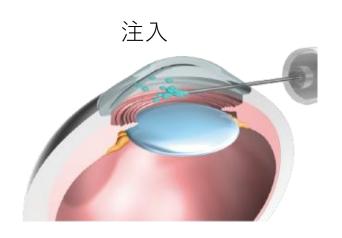
増殖細胞にはさまざまな亜集団がある





Bars: 100 μm

臨床上の課題(1):細胞選別

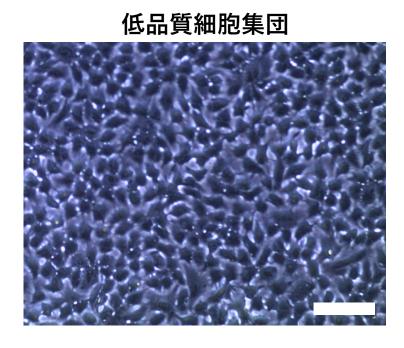


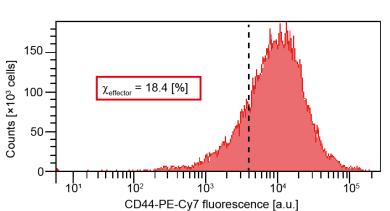
増殖細胞にはさまざまな亜集団がある

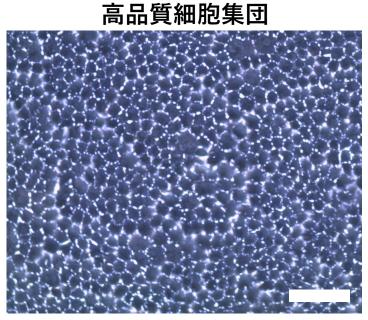
表面マーカーによる細胞の選別:

- 細胞ロスが生じコストが増大
- 細胞機能との相関が不明

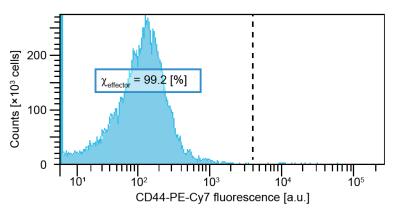
「機能に基づいて」細胞 の品質を非侵襲に管理で きる「定量指標」の確立



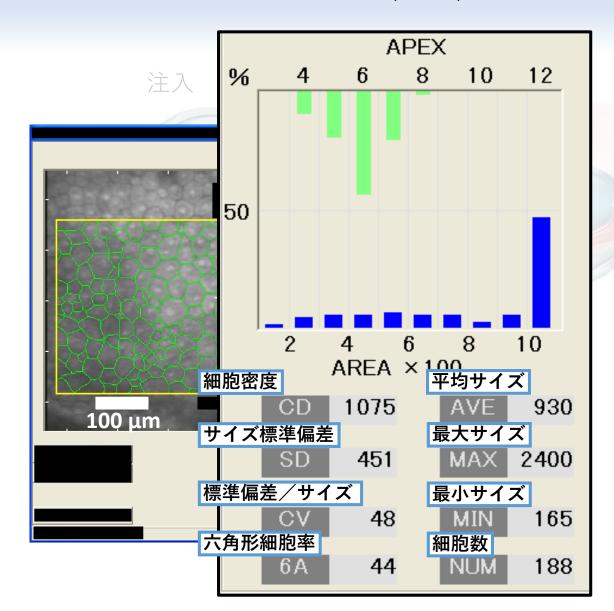


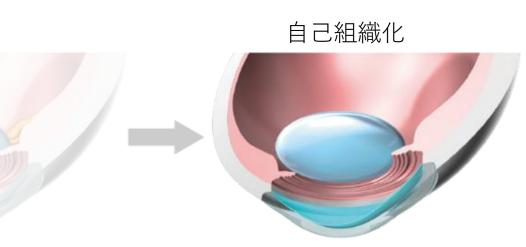


Bars: 100 μm



臨床上の課題(2):角膜内皮の診断





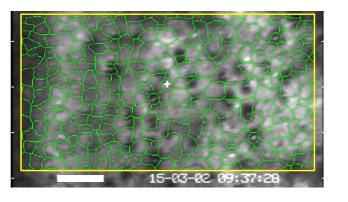
健常角膜内皮の基準:

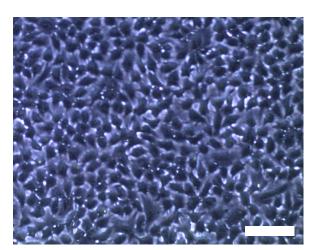
- ✔細胞密度 > 2000 cells/mm²
- ✔変動係数(密度標準偏差/密度) < 0.35
- ✓ 六角形細胞率 > 60%

組織機能との相関は明らかでない より良い定量指標が臨床上期待される

移植細胞・再生角膜内皮に必要な機能

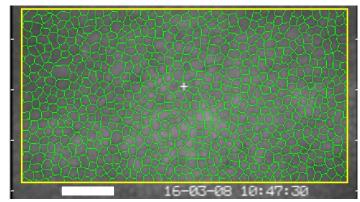
低品質細胞集団

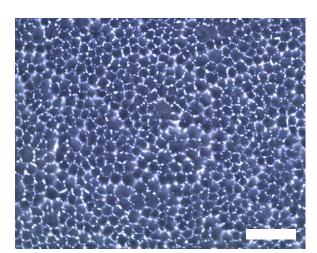




Bars: 100 μm

高品質細胞集団





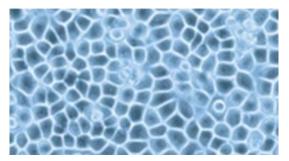
健常角膜内皮はともにサイズの 揃った小さい細胞が基底膜にしっ かり接着している

培養細胞においても高品質細胞群では同様に細胞が揃っている

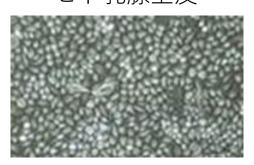
- A) 単一細胞レベルの機能 →基底膜への接着強度
- B) 組織レベルの機能 →細胞の集団秩序

細胞組織の「集団秩序」

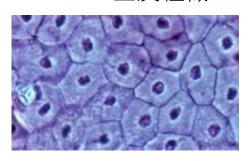
ヒト気道上皮



ヒト乳腺上皮



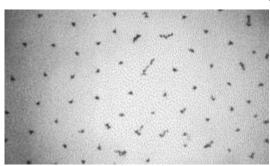
カエル上皮組織



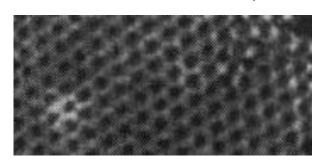
角膜をはじめとする上皮系組織の多くは細胞が六角格子構造をとって安定化する

→2次元コロイド凝集体がつくる秩序構造と類似している

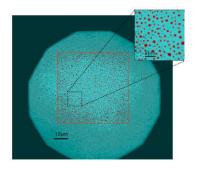
気液界面上の 炭酸カルシウム微粒子(~10 µm)



油水界面上の マイクロビーズ(~1 μm)



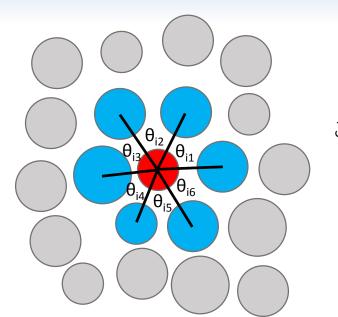
気液界面上の 脂質ドメイン (~10 nm)



Wickman & Korley, *Nature*, **393** (1998) Ramos et al., *Science*, **286** (1999)

Oelke et al., *Appl. Phys. Lett.*, **93** (2008)

六角格子秩序変数Q₆

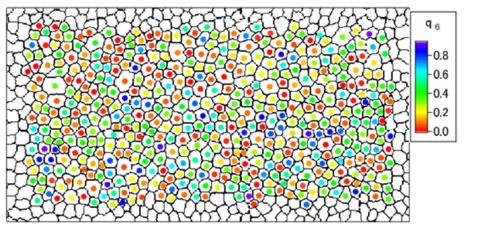


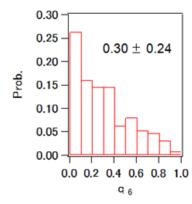
$$Q_6^i = \left| q_6^i \right|^2$$

ここで

$$q_6^i = \frac{1}{6} \sum_{j \in N(i)} e^{i6\theta_{ij}}$$

N(i): 粒子*i*から最も近い6細胞



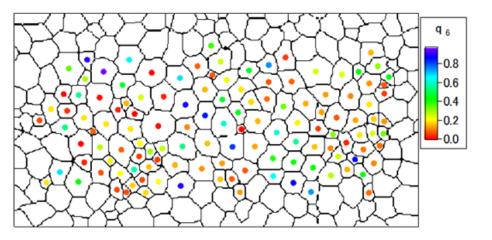


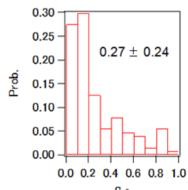


 $Q_6 = 0: ランダム格子$

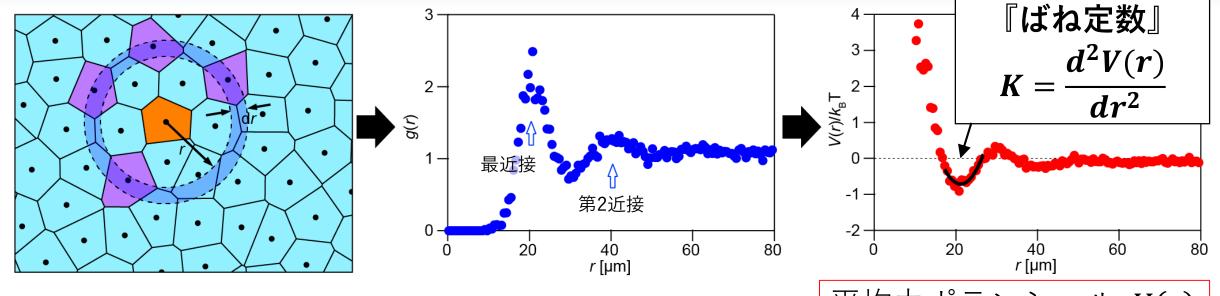
2次元結晶の欠陥誘起型相転移の理論を応用

Nelson & Helperin, *Phys. Rev. B*, **19** (1979). Bialke et al., *Phys. Rev. Lett.*, **108** (2012).





動径分布関数と『ばね定数』



動径分布関数: g(r)

$$g(r) = \langle \frac{n_i(r)}{2\pi\rho r \mathrm{d}r} \rangle$$

ある距離rに他の細胞がいくつあるかの分布関数

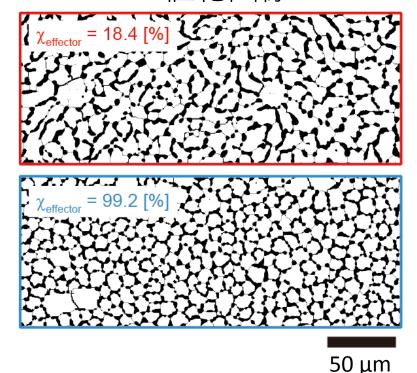
平均力ポテンシャル: V(r)

$$V(r) = -k_B T \ln g(r)$$

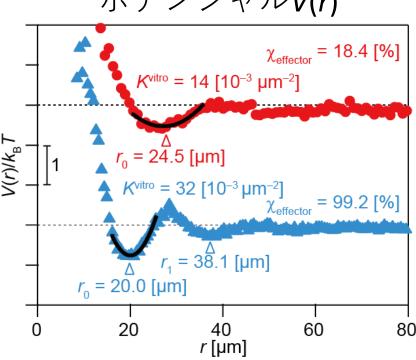
粒子間ポテンシャルがボルツマン則に従うと仮定:最小値のまわりが調和振動子ポテンシャルで近似できる

培養細胞の品質管理

二值化画像



ポテンシャル*V(r)*



(1) ばね定数**K**

 $\chi_{\rm effector}$ = 18.4% ... K = 14 \times 10⁻³ μ m⁻² $\chi_{\rm effector}$ = 99.2% ... K = 32 \times 10⁻³ μ m⁻² $\rightarrow \chi_{\rm effector}$ = 99.2%の集団が高い秩序

(2) ポテンシャル位置 r_0

 $\chi_{\rm effector}$ = 18.4% ... r_0 = 24.5 μm

 $\chi_{\rm effector}$ = 99.2% ... r_0 = 20.0 µm

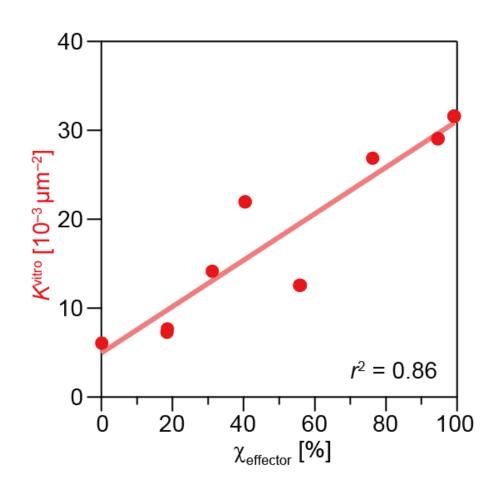
→χ_{effector} = 99.2%の細胞が小さい

(3) **2**次ポテンシャル**r**₁

→ χ_{effector} = 99.2%の集団は遠くの細胞 とも相互作用する

培養細胞の品質管理

ばね定数κとエフェクター細胞率χを比較

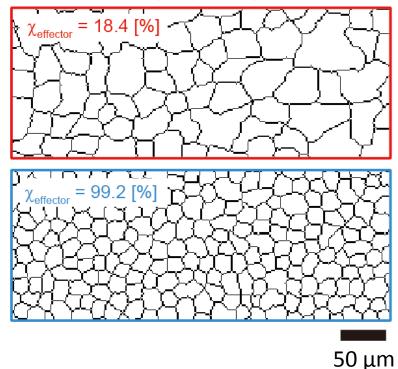


ばね定数はフローサイトメトリー と同等の精度で細胞の品質を評価 できる

フローサイトメトリーによる細胞 ロス(1.6×10⁵ cells/assay)を抑え、 培養コストを節約できる

細胞注入療法により再生した角膜内皮の評価

二值化画像

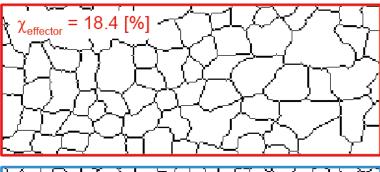


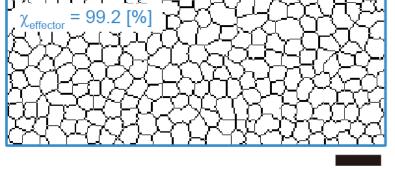


定期検査の画像を使うので患者に余分な負荷をかけない 注入した細胞の品質(X_{effector}) だけでなく、手術の予後その ものを評価できる

細胞注入療法により再生した角膜内皮の評価

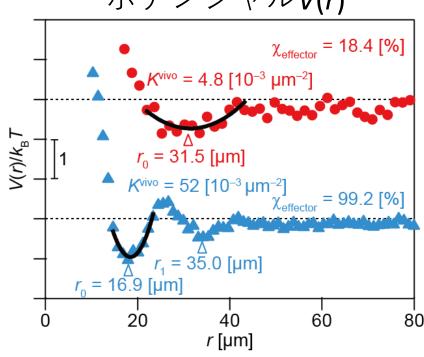
二值化画像





50 μm

ポテンシャルV(r)



(1) ばね定数κ

 $\chi_{\rm effector}$ = 18.4% ... K = 4.8 imes 10⁻³ μ m⁻² $\chi_{\rm effector}$ = 99.2% ... K = 52 imes 10⁻³ μ m⁻² $\rightarrow \chi_{\rm effector}$ = 99.2%の集団が高い秩序

(2) ポテンシャル位置 r_0

 $\chi_{\rm effector}$ = 18.4% ... r_0 = 31.5 µm

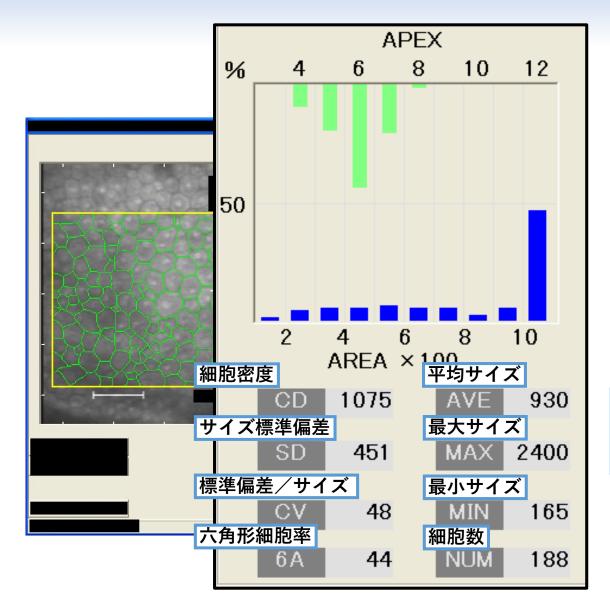
 $\chi_{\rm effector}$ = 99.2% ... r_0 = 16.9 µm

→**χ**_{effector} = 99.2%の細胞が小さい

(3) **2**次ポテンシャル**r**₁

→χ_{effector} = 99.2%の集団は遠くの細胞 とも相互作用する

現在使われている指標との比較



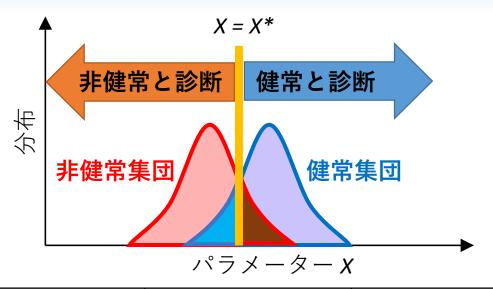
健常角膜内皮の基準:

- ✓細胞密度 > 2000 cells/mm²
- ✔変動係数(密度標準偏差/密度) < 0.35
- ✓ 六角形細胞率 > 60%

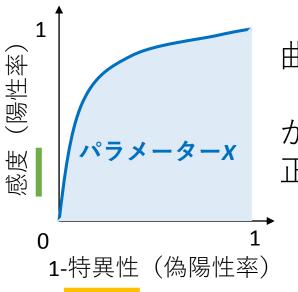
従来の指標とばね定数の精度を比較する →臨床的な診断を正確に補助する能力

ROC解析

ROC: Receiver Operation Characteristics





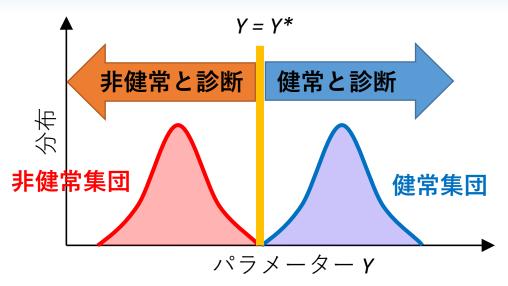


曲線下面積AUC (area under curve) がパラメーターXの 正確度の指標

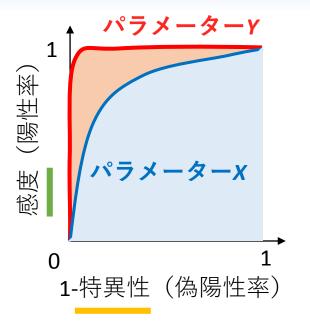
特異度 =
$$\frac{$$
 真陰性 $}{$ 真陰性 + 偽陰性

ROC解析

ROC: Receiver Operation Characteristics

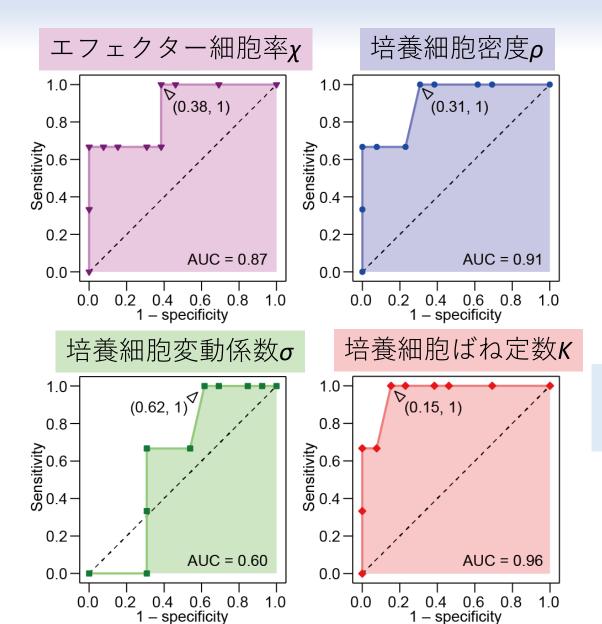






AUCが大きい パラメーター ほど診断指標 として正確

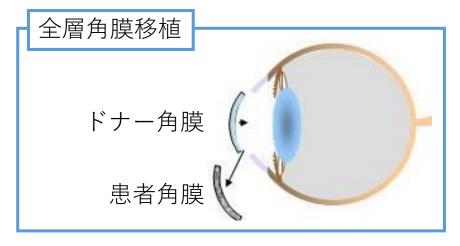
現在使われている指標との比較



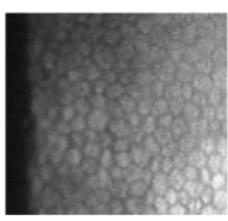
基準:細胞注入療法から6ヶ月時点で 細胞密度が < 2000 cells/mm²

培養細胞のばね定数は、再生角膜の品質 の予測指標として最も精度が高い

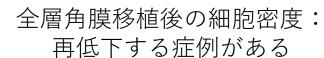
先制医療への挑戦:長期予後の予測

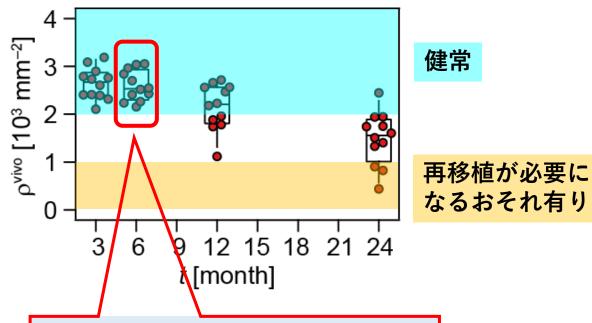






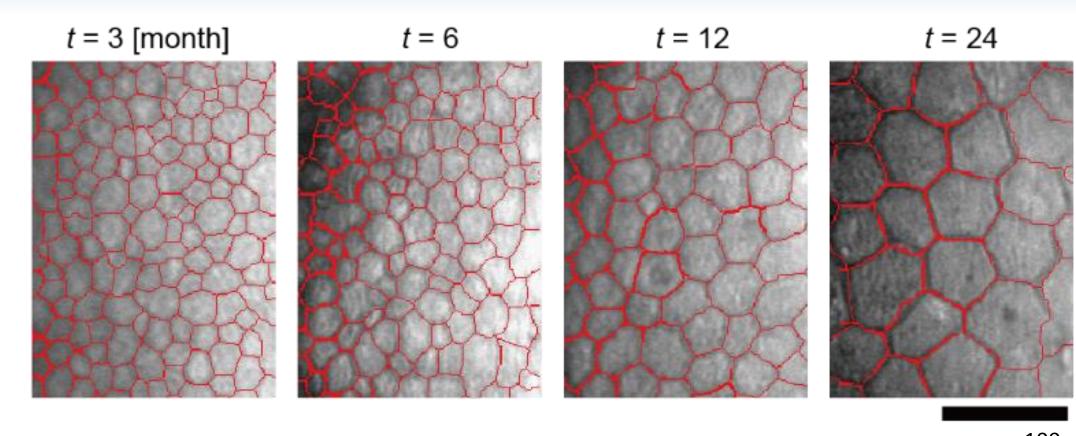
100 μm





細胞密度だけでは見分けが つかない初期に長期予後を 予測できるか?

全層角膜移植の予後経過



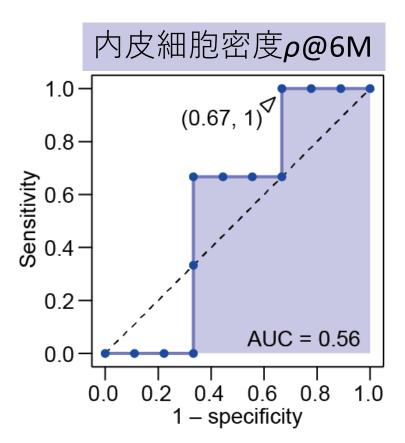
密度: $\rho^{\text{vivo}}_{3M} = 2,787$ $\sigma^{\text{vivo}}_{3M} = 0.42$ 定数: $K^{\text{vivo}}_{3M} = 0.023$ ばね定数:

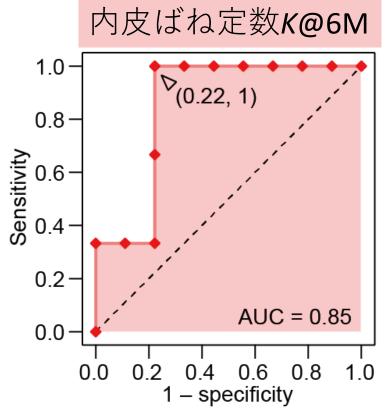
 $\rho^{\text{vivo}}_{6M} = 2,410$ $\sigma^{\text{vivo}}_{6M} = 0.45$ $K^{\text{vivo}}_{6M} = 0.021$

 $\rho^{\text{vivo}}_{12\text{M}} = 1,114$ $\sigma^{\text{vivo}}_{12\text{M}} = 0.29$ $K^{\text{vivo}}_{12\text{M}} = 0.011$

100 μm $\begin{array}{l} \rho^{\text{vivo}} = 439 \\ \sigma^{\text{vivo}} = 0.19 \\ \textit{K}^{\text{vivo}} = \text{N.D.} \end{array}$

ROC解析による密度とばね定数の比較





基準:移植24ヶ月時点での 細胞密度が < 1000 cells/mm²

6ヶ月時点のばね定数を測定 すると、24ヶ月での細胞密度 の低下を高精度で予測できる

「悪いことが分かってから治療する」従来型の医療に対し、 早期介入する先制医療へ

まとめ

移植用細胞の品質管理・再生角膜組織の予後診断を統合的に行える物理的バイオマーカーを開発

- 培養細胞の品質管理に用い細胞のロスを減らす
- 予後診断の精度を改善する
- 長期予後の早期予測による先制医療に応用する

今後さらに有用性を検証・最適化し再生医療に貢献

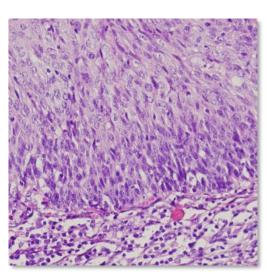
がん病理画像の新たな定量診断基準の探索

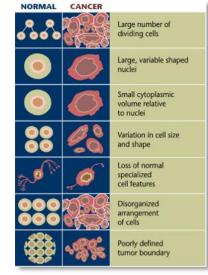
京都大学理学研究科MACSプログラム SG9 「疾患における集団的細胞挙動の数理モデルの開拓」



<u>病理学:</u>

組織にはそれぞれ典型的な構造がある 病気になるとその構造が変化し始める





判断基準

細胞および細胞核の大きさ 細胞の形状・配列秩序

- 1) 医者の経験によって 診断が左右される
- 2) 医者によって異なる診断結果が得られる

病理診断に定量性が 必要不可欠

- ・より正確な診断
- ・コスト低減
- ・医者の拘束時間を軽減

体制

医学部 創薬医学講座

医学



理学部 数学教室





(Svadlenka)

(坂上)



(鶴山)

(平塚)

病理画像診断 の講義

大学院生・学部生 2018年度…14名 2019年度…11名



解析結果のモデル化

界面ネットワークの 数理に関する講義

ハイデルベルク大 物理化学科

高等研究院 医学物理・医工計測



(田中)

物理

病理画像の解析を 体験する実習



(山本)

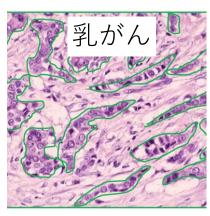


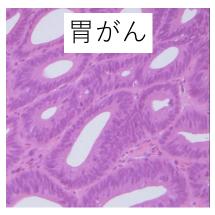
(鈴木)

高等研究院 医学物理・医工計測

今年度の活動

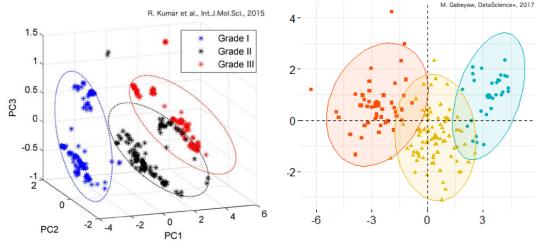
- ・多様な組織における検討
 - ・ 秩序変化の組織依存性



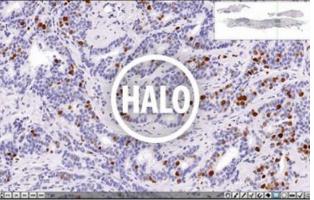


日本病理学会HP: http://pathology.or.jp/

- ・重要なパラメーターの探索
 - ・ 統計的手法 (多変量解析など)



- ・構造抽出の自動化・効率化
 - ・ 機械学習ソフトの活用



今年度の活動

- ・多様な組織における検討
 - ・秩序変化の組織依存性

- ・重要なパラメーターの探索
 - ・ 統計的手法 (多変量解析など)



日本病理学

組織のホメオスタシス(恒常性)の乱れを 定量的に評価し、組織構造の変化を敏感に 抽出できる特徴量を見つける

- 構造抽出の自動化・効率化
 - ・ 機械学習ソフトの活用

