



Title	エージェントベースモデルを用いた角膜上皮細胞培養における細胞流動性の時空間的解析に関する研究
Author(s)	上岡, 惇也
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105404
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

エージェントベースモデルを用いた角膜上皮細胞培養
における細胞流動性の時空間的解析に関する研究

上岡 惇也

2026 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

第1章 序論.....	1
1.1 生物学における数理モデルの役割.....	1
1.2 システムバイオロジーとシステムバイオテクノロジー.....	2
1.3 エージェントベースモデル.....	4
1.4 セルラーオートマトンモデル.....	5
1.5 本研究におけるモデルのデザイン.....	6
1.6 細胞組織における細胞流動性の変化.....	9
1.7 角膜上皮細胞シート.....	10
1.8 本研究の目的と構成.....	11
第2章 角膜上皮細胞の細胞挙動モデルとパラメータ値推定方法の構築.....	13
2.1 緒言.....	13
2.2 実験方法.....	15
2.2.1 <i>In vitro</i> 実験データの解析.....	15
2.2.2 角膜上皮細胞の培養シミュレーション.....	17
2.2.3 <i>in silico</i> における細胞移動速度の解析.....	18
2.2.4 モデル出力の解析.....	18
2.3 モデルのデザイン.....	19
2.3.1 エージェントベースモデルの構築.....	19
2.3.2 モデルパラメータ値推定方法.....	29
2.4 結果.....	32
2.4.1 モデルパラメータ値の推定.....	32
2.5 考察.....	40
2.5.1 モデルの選択と実装.....	40
2.5.2 パラメータ値推定方法.....	40
2.5.3 本研究で構築したエージェントベースモデルによる現象の表現.....	41

2.6 小括.....	44
第3章 角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性の経時変化の機構解明.....	45
3.1 緒言.....	45
3.2 実験方法.....	46
3.2.1 角膜上皮細胞の培養シミュレーション.....	46
3.2.2 モデル出力の解析.....	47
3.3 結果.....	52
3.3.1 角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性の変化.....	52
3.3.2 細胞状態遷移の速度論的解析.....	54
3.3.3 細胞流動性変化における chain migration と細胞シート構造の変化	56
3.4 考察.....	58
3.4.1 角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性変化の機構.....	58
3.4.2 角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性変化を支配する因子	59
3.4.3 角膜上皮細胞シートの細胞流動性変化における chain migration	59
3.4.4 エージェントベースモデルの特性を活かした現象の可視化.....	60
3.5 小括.....	61
第4章 総括と今後の展望.....	62
4.1 本研究の総括.....	62
4.2 今後の展望：細胞製造プロセスに対するシステムバイオテクノロジー的アプローチ	64
4.2.1 細胞挙動シミュレータによる細胞培養プロセスの理解.....	64
4.2.2 培養操作を考慮したモジュール群の実装による細胞製造プロセス全体の表現	65
4.2.3 シミュレーションデータの解析による細胞製造プロセス最適化.....	65
略語リスト.....	67
記号表 (Nomenclature)	68
参考文献.....	74
謝辞.....	89

第1章 序論

1.1 生物学における数理モデルの役割

数理モデルを用いた論理的推論を通して複雑なシステムの本質の理解を目指す試みは、科学の広範な分野で行われてきた。論理的推論は既知または真であると想定される前提から論理的な結論を導出するプロセスであり、その手法は演繹的推論・帰納的推論・仮說的推論に大別される (Kell & Oliver, 2004; Salvador-Carulla et al., 2014)。演繹的推論は、先験的な仮定を数学的技法により再定義し、仮定からすぐには明らかにならなかった結論を導き出す手法 (Watt, 1962) であり、20 世紀初頭に生態学の分野で生物の個体数の変動を表した Lotka-Volterra 方程式 (Wangersky, 1978) が挙げられる。帰納的推論は、具体的な事例における測定や評価から一般的な結論を導き出す手法であり、生物学を含む複雑な現象を説明しようとする科学において、伝統的に利用されてきた (DeGracia et al., 2014)。中でも数理モデルの適用例としては回帰分析をはじめとした統計学的モデルを使用したものが挙げられ (Mitchell-Olds & Shaw, 1987)、また近年では機械学習を用いた研究も行われている (Bzdok et al., 2018)。仮說的推論は、事前の知識に基づいて事象に対する最適な説明を選択する手法である。これは 1867 年に Peirce により提案されたもので、事象の測定と評価に基づく点において帰納的推論と同じであるが、そこから得られた知見を新たな事象に適用することで確率や妥当性に基づいた説明を選択し、予測を生成する点で異なるものである (Douven & Igor, 2021; Flach & Kakas, 2000; Menzies, 1996)。この論理的推論法は、システム生物学における代謝フラックスの解析 (Quek et al., 2010) やマルチエージェントシステムを使用した複雑系の解析 (Ferber & Weiss, 1999) など、生物学に限らない様々な分野に適用されてきた (Bettinger & Eastman, 2017)。また計算機科学の発展に伴い、論理プログラミングにより実験データ・数理モデル・仮説の関係を記述したコンピュータプログラムとして実行し、推論を行うことが可能になった (Gabbay & Woods, 2014)。このような計算機を用いた論理的推論はこれまで生態学 (Thessen, 2016)・動物行動学 (Berdahl et al., 2018)・進化生物学 (De Vladar & Barton, 2011; Hammerstein & Selten, 1994)・発生学 (Jaeger, 2009; Lindenmayer, 1968)・神経科学 (Gerstner et al., 2012)・疫学 (Brauer, 2017) などより複雑なシステムに対する洞察を与えてきた。さらに、近年数理モデルを用いた推論から構築した仮説を実際の実験で検証し、

証明された事実や新たに得られた仮説を数理モデルに反映するサイクルによる知識発見がなされている (Ray, 2005). この手法は基礎的研究に限らず, 創薬・再生医療分野などにおける応用的研究にも適用されており (Kitano, 2002a; Waters et al., 2021), 今後も数理モデルや実験技術の発展とともに貢献していくことが期待されている.

1.2 システムバイオロジーとシステムバイオテクノロジー

生命現象の機構解明を目的とし, 遺伝子やたんぱく質などの生物を構成する要素の性質や生化学的相互作用を理解する, 分子生物学的なアプローチは古くから行われてきた (Bertram, 2000; Leemans et al., 2011; Smith et al., 2000). 一方で, 分子・細胞・細胞組織・臓器・個体といった系の構成要素の性質や相互作用などのシステムの構造に加えて, それらの挙動を理解することが重要である (Kitano, 2002b). またシステムバイオロジーで用いられるモデルの多くは, 生命現象の階層内・階層間における構成要素の相互作用を表現するマルチレベルモデルである. これらの特徴から, 細胞内における分子の挙動 (Soheilypour & Mofrad, 2018) から発生における自己組織化 (Sharpe, 2017), がん組織内における代謝や転移機構 (Suhail et al., 2019; Wang, Butner, Cristini, et al., 2015), 全身における薬物動態 (Eissing, 2011) など様々な現象に対して適用されてきた. これまでシステムバイオロジー的アプローチに用いられてきたモデルは, 着目する系を構成する要素の質や状態のばらつきと空間的不均一性を考慮しているか否かで4つのタイプに分類することが出来る (Cosgrove et al., 2015; Fisher & Henzinger, 2007). 系の構成要素のばらつきと空間的不均一性を考慮しないモデルとして, 常微分方程式による薬物やその代謝物濃度の時間変化を表現する生理学的薬物動態モデルが挙げられる (Cordes et al., 2016). また, 系における酸素濃度の時空間的变化やとしては偏微分方程式モデル (Bernabeu et al., 2020; Popel, 1989) が, 細胞集団の不均一性を考慮したモデルとしては状態ベースモデル (Fordyce & Rawlings, 1996; Harel, 1987) が用いられてきた. さらに, 系の構成要素のばらつきと空間的不均一性の両方を考慮可能なモデルとしては, 個々の細胞に特性を与え, それぞれの細胞の位置や状態の経時変化を解析するエージェントベースモデルが用いられてきた (Thorne et al., 2007; Wang, Butner, Kerketta, et al., 2015). 近年では, 偏微分方程式モデルによる酸素や代謝物の不均一な空間分布の表

現とともに，エージェントベースモデルを用いた細胞挙動解析を行うハイブリッドアプローチが行われている (Ghaffarizadeh et al., 2018; Glen et al., 2019).

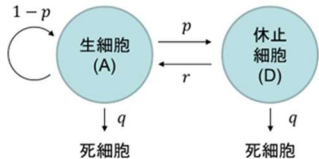
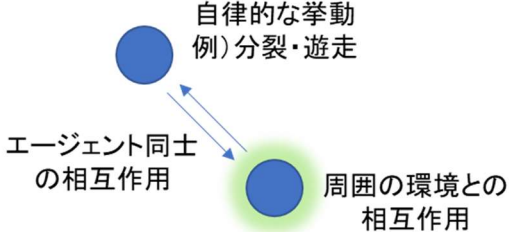
		空間的不均一性の表現	
		なし	あり
集団的不均一性の表現	なし	常微分方程式モデル 細胞増殖モデル $\frac{dX}{dt} = \mu X$	偏微分方程式モデル 時間発展や定常状態における濃度分布を計算 $\frac{\partial X(x, y, t)}{\partial t} = \frac{\partial^2 X(x, y, t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 X(x, y, t)}{\partial y^2}$
	あり	状態ベースモデル 離散時間における細胞増殖モデル 	エージェントベースモデル 

図 1.1 数理モデルの分類

システムバイオテクノロジーはウェット実験とドライ実験で得られたデータを統合し，環境変化などの外的変動や細胞応答などの内的変動の下での系の挙動を理解・予測することで，産業応用などの実用面における応用を目的とするものである．このアプローチは実用面における応用に重きをおく点で，現象を精緻に表現し着目する系の挙動の理解に重きをおくシステムバイオロジー的アプローチとは異なる．システムバイオテクノロジー的なアプローチによって，バイオテクノロジープロセスを従来の「試行錯誤型」のアプローチと比較して合理的かつ体系的に開発することが可能となる (Lee et al., 2006).

1.3 エージェントベースモデル

エージェントベースモデルは、システムを「エージェント」の集合体としてモデル化したものである (Bonabeau, 2002). ここでエージェントは、一連の特性やルールに従って自律的に行動や意思決定を行う独立した個体である. そしてモデル内のエージェントは他のエージェントを含む周囲の環境と相互作用し、その結果として自身の行動や特性の変化を自律的に決定することもある (Ferber & Weiss, 1999). さらに、異なる特性を持ち自律的に行動するエージェント同士の局所的な相互作用が、系全体における規則性を生み出すことが出来る. このようなボトムアップ型モデルの特徴から、これまでシステム科学・コンピュータ科学・経済学・社会科学・生物学を含む多くの分野の複雑適応系における適応と創発に関する研究に適用されてきた (Epstein, 1999, 2006; Macal & North, 2005). また生物学の中でも、細胞組織における自己組織化やがん細胞の転移の機構などの複雑な現象の解明を目指して、細胞をエージェントとしたモデルを用いたシミュレーション研究が行われている. これまで数個の細胞からなる詳細なモデルから単純化された細胞からなる三次元組織レベルのモデルまで、様々なモデルが開発されており、それぞれの特徴を活かして現象に対する洞察を与えてきた (Metzcar et al., 2019). シミュレーションは細胞配置・状態などの与えられた初期条件から始まり、離散的なタイムステップの間における各細胞の細胞挙動と周囲の細胞との相互作用の計算を繰り返すことで行われる. これらのモデルは、決定論モデルでは表現されない現象の不確定性や、連続体モデルでは表現されない細胞組織の空間的不均一性を表現可能である (Byrne & Drasdo, 2009). また最大の特徴として、細胞挙動や細胞の相互作用から創発してくる現象をとらえて解析することで、複雑な現象のトリガーとなる因子が引き起こす現象の機構解明や予測に貢献できることが挙げられる (Rocha et al., 2021; Yu & Bagheri, 2020). システムバイオロジーの発展に伴い表現力の高いモデルが多く開発されているが、シミュレーションに使用するモデルの抽象度と扱うことの可能な情報量はトレードオフの関係にある. モデルを選択する際には、それぞれのモデルの特性を理解し目的に応じた適切なモデルを選択する必要がある.

1.4 セルラーオートマトンモデル

セルラーオートマトンモデルは、特定の形の格子で区切られたセルの状態が、定義されたルールに従い、近傍のセルの状態によって離散的な時間で変化する計算モデルである。このモデルの歴史は、1950 年代に John von Neumann が Stanislaw Ulam の助言を受けて考案した生物学的な自己増殖を表現する 2 次元のモデルが始まりとされている。また、セルの形状は四角形や六角形などの 2 次元的なものに限らず、立体的な多面体である場合も存在する。さらに、セルの状態変化を定義するルールは決定論的なものに加えて、確率論的なものである場合がある。モデルの適用対象は流体の動きをはじめとする物理学的な現象や生物学的な現象など、広範な分野で利用され、知見をもたらしてきた。また、特定の形の格子で区切られたセルの集合で構成される空間内に 1 つのセルで表現されるエージェントを配置し、その位置変化を含めた挙動を計算するといった、エージェントベースモデルとセルラーオートマトンモデルを組み合わせたアプローチも存在する。このアプローチにおいて、培養環境を模した計算空間を用意し、エージェントを細胞とすることで細胞培養における個々の細胞挙動をシミュレートすることが可能となる。細胞培養をセルラーオートマトンモデルで表現した場合の長所として、実測が難しいモデルパラメータの数を減らすことが可能な点と計算速度の速さが挙げられる。一方で細胞形態が固定されてしまうことで細胞組織における細胞密度の変化や細胞の集団遊走などの表現に制限が生じる。

1.5 本研究におけるモデルのデザイン

本研究では、対象とする系を対称系に入力を与える操作である「入力」・入力に対する対象と環境の反応である「応答」・対称系から情報を取り出す操作である「出力」からなるものとする。対象系を培養系とした場合、培養系は細胞群と細胞群を取り巻く環境からなり、その挙動は細胞個々の応答である細胞挙動の結果である (図 1.2).

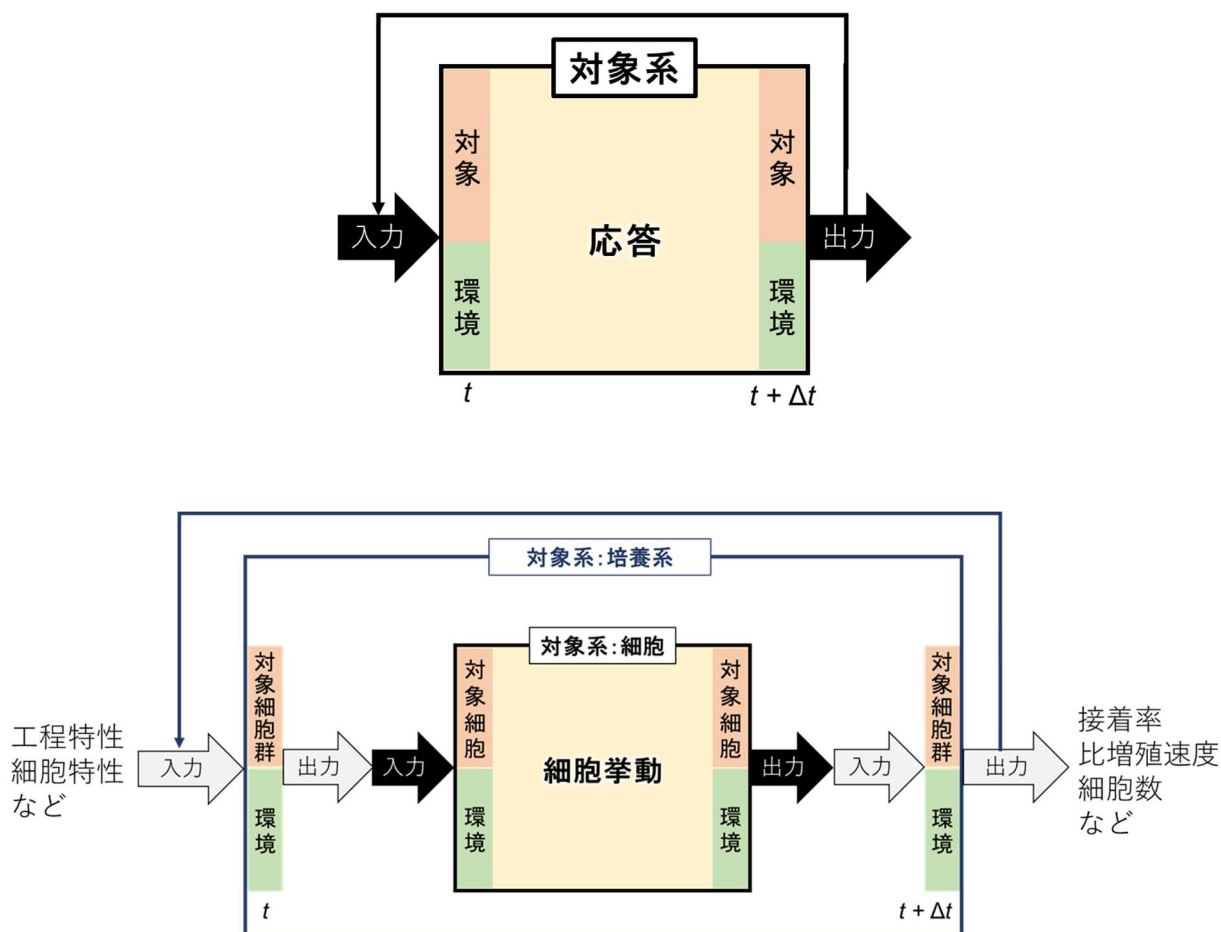


図 1.2 本研究における系の考え方と培養系の考え方

本モデルでは細胞培養における細胞挙動を表現することを目的として、各培養操作、細胞挙動、培養環境のモデルがそれぞれ独立した単位である「モジュール」として構築されている。そのため、必要に応じたモジュールの選択と組み合わせにより様々な培養における細胞挙動のシミュレーションが可能であり、実験条件の変更はモジュールの「切り貼り」で表現される (図 1.3)。さらに、新たに表現したい要素がある場合には新たなモジュールとして追加することが出来るため、容易に対象を拡張していくことが可能である。

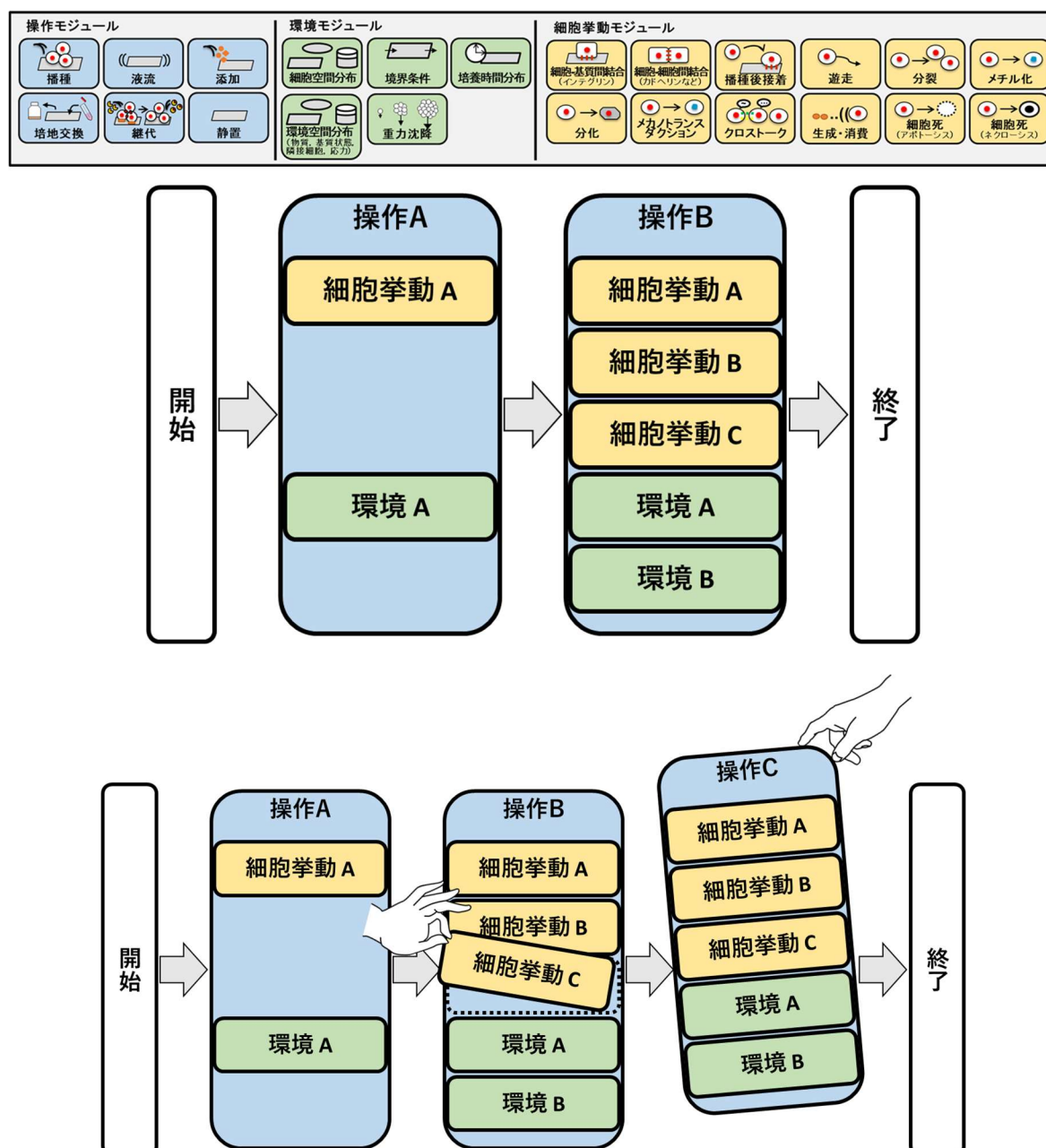


図 1.3 モジュールの「選択」による細胞培養の表現と「切り貼り」による実験条件変更時のデータ生成

培養環境と細胞挙動は、エージェントベースモデルとセルラーオートマトンモデルを組み合わせたアプローチで表現される。培養面上に吸着している基質は六角柱の配列で表現され、基質面上の細胞を配置可能な格子で区切られたセルに、エージェントである細胞が配置される。そして、細胞の振る舞いは、確率論モデルや速度論的モデルによって細胞挙動を表現したルールに従って決定される。細胞は隣接する細胞や基質との間に細胞 - 細胞間、細胞 - 基質間結合を形成し、その強さはエネルギーで表される。また、細胞遊走はその細胞が形成している細胞 - 細胞間結合と細胞 - 基質間結合の強さによって制御される。このルールは、細胞挙動が 3 つの要素 (細胞遊走・細胞-細胞間接着・細胞-基質間接着) により制御されるという仮説 (M. H. Kim & Kino-oka, 2018) に基づいたものである (図 1.4)。

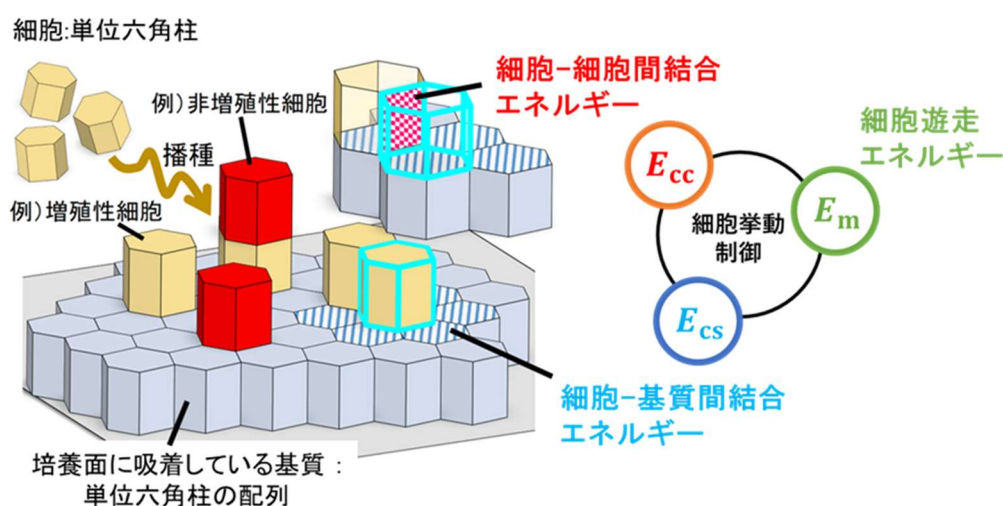


図 1.4 本研究におけるモデルのデザイン

さらに、構築した細胞培養における単細胞レベルの細胞挙動と周囲の細胞との相互作用のモデルを用い、細胞間相互作用から上の階層である細胞組織までのスケールで起こる現象の機構を解析することが可能である (図 1.5)。



図 1.5 単細胞レベルの細胞挙動から細胞組織全体としての挙動・特性が生じる過程

1.6 細胞組織における細胞流動性の変化

細胞組織における細胞流動性の変化は、発生・創傷治癒・がんの転移など様々な生命現象において重要な役割を果たしていると考えられている (Farooqui & Fenteany, 2005; Friedl & Wolf, 2003; Kurosaka & Kashina, 2008). 細胞流動性の変化機構は、胚、がん組織、偽重層上皮、単層上皮などの系で研究されてきた。これまでの研究から、細胞密度、遊走、細胞間接着、張力、細胞形態など様々な因子が関与していることが示唆されている。中でも、細胞の流動性が高い相 (unjamming phase) から低い相 (jamming phase) への転移は jamming transition または unjamming-jamming 転移 (UJT) と呼ばれており、ガラス転移に似た現象として生物物理学の分野で注目されてきた (Angelini et al., 2011; La Porta & Zapperi, 2020). これまでの研究で、細胞組織における UJT には細胞密度 (Angelini et al., 2011), 細胞遊走性 (Bi et al., 2016), 細胞 - 細胞間接着の強さと張力によって変化する細胞形態 (Bi et al., 2015; Chiang & Marenduzzo, 2016; Park et al., 2015) といった様々な要素が関係していることが示唆されている。また一方で、jamming 状態から細胞流動性が増加し、細胞流動性が高い状態 (unjamming 状態) へと遷移する現象は jamming-unjamming 転移 (JUT) と呼ばれ、UJT に関わる因子に加えて上皮 - 間葉転換やエンドサイトーシスなどが関係していることが示唆されている (Malinverno et al., 2017; Oswald et al., 2017).

これまで、細胞組織における細胞流動性の経時変化に関するシミュレーション研究には、細胞形態の変化を表現可能な Cellular Potts モデル (Chiang & Marenduzzo, 2016) や vertex モデル (Bi et al., 2015; Malinverno et al., 2017) をはじめとした、細胞挙動を力学ベースの数式で記述したモデルが用いられてきた。これらのモデルは細胞が周囲から受ける力を考慮した、二次元の上皮細胞シートにおける細胞流動性の経時変化の機構解析に用いられてきた。一方で本研究では、細胞挙動を反応速度論的または確率論的な数式で表したモデルを構築することで、三次元の細胞組織における細胞流動性の経時変化の機構解析を行った。

1.7 角膜上皮細胞シート

角膜上皮細胞の移植は、化学熱傷や Steven-Johnson 症候群などの角膜上皮に存在する幹細胞の消失により起こる眼疾患に対する治療法の 1 つとして 1997 年に報告された (Pellegrini et al., 1997). 角膜上皮は 5-7 層の細胞層で構成されており、その中で幹細胞は角膜と結膜の境界部の基底層に存在すると考えられている (Cotsarelis et al., 1989; Oie & Nishida, 2013; Schermer et al., 1986). また、幹細胞の分裂により生まれた一過性増幅細胞は角膜の中心部に移動していく。これらの細胞挙動は角膜上皮の構造維持に重要である (Pellegrini et al., 2009; Thoft et al., 1983). このことから、角膜上皮に存在する幹細胞の消失に対する治療において細胞シート基底層に存在する幹細胞が重要な要素であるといわれている (Rama et al., 2010). さらに、角膜組織に期待される本来の細胞微細構造を保ったまま移植することも重要であると考えられている。これらの背景から、羊膜 (Tsai et al., 2000) やフィブリンゲル (Rama et al., 2001) などの担体上や、高分子グラフト温度応答性細胞培養面上 (Matsuda et al., 2007; Yamato et al., 2007) で細胞を培養して細胞シートを作製する方法が提案された (Nishida, Yamato, Hayashida, Watanabe, Maeda, et al., 2004). 日本では 2020 年に自家培養角膜上皮ネピック®が承認されている。また、当初から行われてきた自家角膜上皮細胞の移植では両眼性の疾患の場合に適用が難しいことから、現在では口腔粘膜上皮 (Burillon et al., 2012; Nishida, Yamato, Hayashida, Watanabe, Yamamoto, et al., 2004) や、iPS 細胞から分化させた細胞で作成された細胞シート (Hayashi et al., 2016, 2017) を移植する方法も提案されている。

自家の角膜上皮細胞の移植方法の 1 つとして、角膜輪部から採取された角膜輪部幹細胞を X 線照射によって増殖能をはく奪されたフィーダー細胞とともに培養して作製した細胞シートを移植する方法がある (Nishida, Yamato, Hayashida, Watanabe, Maeda, et al., 2004; Pellegrini et al., 1997). この培養において、培養面上に播種された細胞が集団で遊走しながら増殖し、コンフルエントに達した後の細胞流動性と細胞シートの積層化が検体間で異なり、細胞流動性の低下 (jamming phase) が観察された検体では、jamming 状態が観察されなかった検体と比較して顕著な積層化が観察されたことが報告されている (Baba et al., 2020). 細胞シート積層構造の安定性や細胞分化と細胞流動性の関係は表皮組織における先行研究

でも示唆されており (Miroshnikova et al., 2018), これらの関係を理解することは角膜上皮細胞シート形成過程や検体間の差を理解するのに重要であると考えられる.

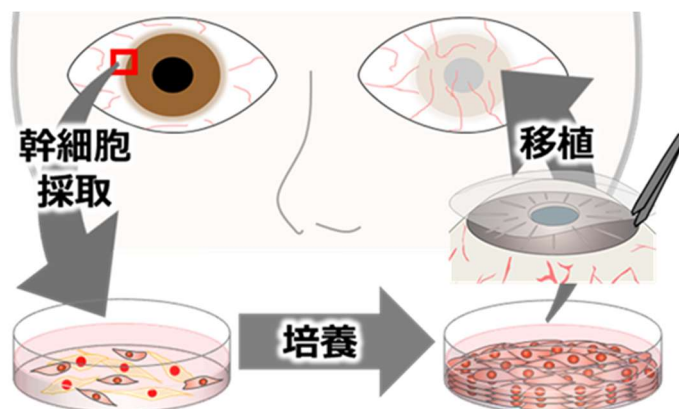


図 1.6 自家角膜上皮細胞シートの移植

1.8 本研究の目的と構成

本博士論文では, エージェントベースモデルのモデルパラメータ値の推定方法を構築し, 角膜上皮細胞シートが培養を通して形成される過程において生じる現象を表現したうえで, 1 細胞レベルの時空間的解析により培養プロセスにおける細胞集団の挙動の理解に寄与することを目的とした.

第 1 章では, エージェントベースモデルの特性と種々の数理モデルにおける位置づけに加えて, 本研究における培養系のモデル化の考え方を示し, 角膜上皮細胞シート形成培養を対象とした本研究の方針について述べた.

第 2 章では, 角膜上皮細胞の細胞挙動を表現するために, 細胞挙動モデルを構築した. さらに, モデルパラメータ値の推定方法を構築し, エージェントベースモデルによる 3 次元の計算空間における個々の細胞挙動と細胞同士の相互作用の計算を行うことで, 角膜上皮細胞の培養における細胞流動性の経時変化が表現されることを示した.

第 3 章では, 角膜上皮細胞シートの培養における細胞流動性変化の機構を解釈するために, 1 細胞レベルの時空間的な解析や細胞状態の速度論的解析を行った.

総括では第 2, 3 章で得られた結果をまとめ, エージェントベースモデルを用いたアプローチの意義を示し, 今後の展望として細胞培養プロセスに対するシステムバイオテクノロジー的アプローチについて述べた.

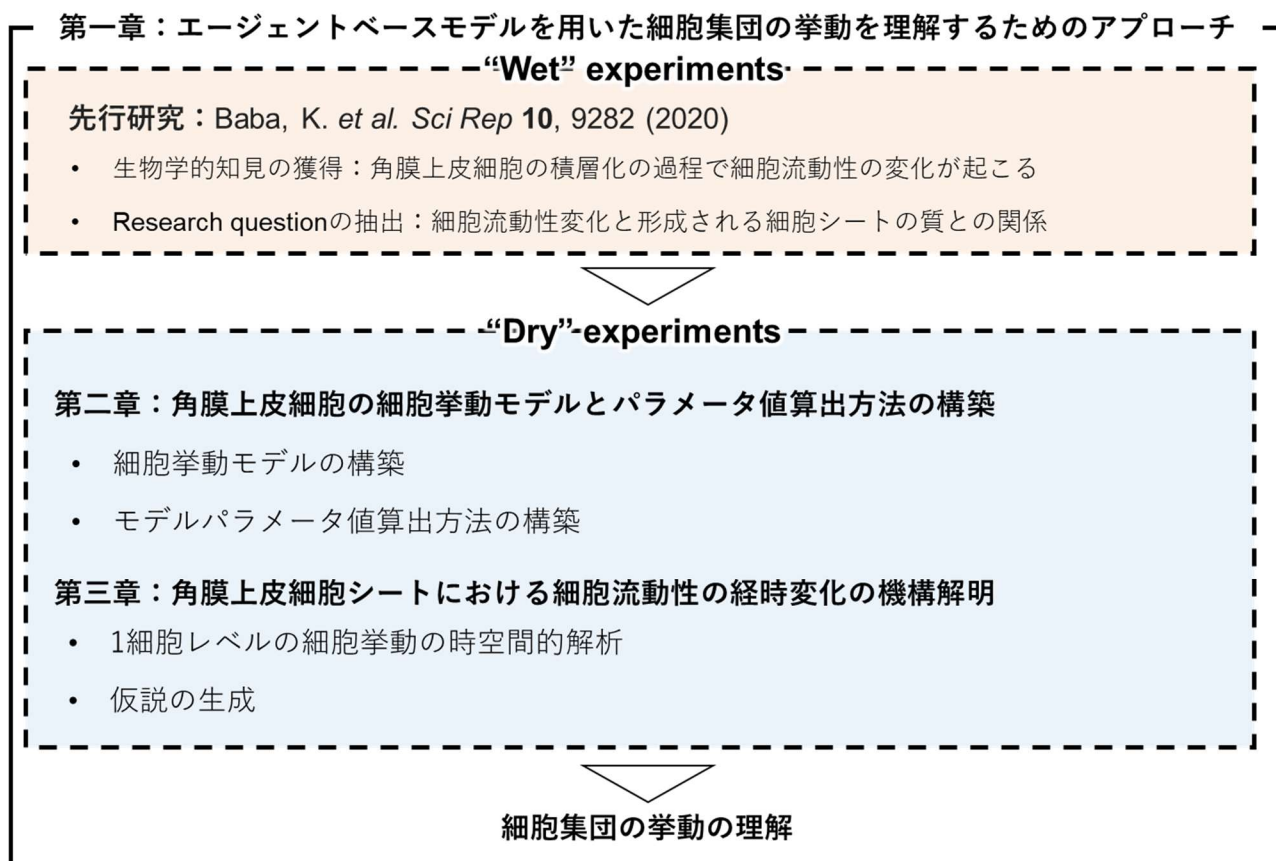


図 1.7 本研究の概要

第2章 角膜上皮細胞の細胞挙動モデルとパラメータ値推定方法の構築

2.1 緒言

エージェントベースモデルは、系を構成するエージェントが他のエージェントを含む周囲の環境と相互作用し、自律的にその行動や特性が変化する様子をシミュレートするモデルである (Bonabeau, 2002). このモデルの特性として、エージェント同士の局所的な相互作用により、エージェント単体の挙動を定義する規則よりもはるかに複雑な現象が表現されることが挙げられる (Macal & North, 2010). その特性から生物学の分野では、細胞をエージェントとした細胞の挙動や周辺環境の変化を表現する数理モデルを構築し、個々の細胞の挙動や細胞組織全体の変化をシミュレートすることで、胚発生における自己組織化やがん細胞の挙動などの複雑な生命現象のメカニズムに多くの洞察をもたらしてきた (Deisboeck et al., 2011; Glen et al., 2019). このようなアプローチは対象とする現象に応じて、数個の細胞の形態変化を表現した詳細なモデルから、単純化された細胞からなる三次元組織を表現するモデルまで、様々なモデルに利用されている (Metzcar et al., 2019). エージェントベースモデルは複雑な現象を表現することができる一方で、複雑な現象を表現するために多くのパラメータを含むモデルを構築する必要がある。また理想的には、すべてのモデルパラメータ値が実際の実験で求められるべきであるが、技術的に難しい場合も存在する。そのような場合においても、着目する現象を表現するために可能な限り確度の高い手法でモデルパラメータ値を求める必要がある。

角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性の経時変化は、自家移植のための角膜上皮細胞シートを形成する培養において報告されている (Baba et al., 2020). この先行研究では、患者自身から採取した角膜輪部幹細胞がフィーダー細胞とともに播種されたのちに、15日間培養された。この際、角膜輪部幹細胞の増殖とともに形成されるコロニーでは細胞流動性が高く集団遊走がみられる。その後コンフルエントに達し、細胞シート構造の積層化に伴って細胞流動性は低下し、その後再び上昇する傾向がみられる。これらの細胞流動性の経時変化は形成される細胞シートの構造の変化に深く関わっていると考えられているが、それらの関係の理解のためにはさらなる研究が必要である。

本章では，角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性の経時変化を表現するエージェントベースモデルとパラメータ値推定方法を構築することを目的とした．培養中の角膜上皮細胞の細胞挙動を表現するために，先行研究で用いられた 2 次元のセルラーオートマトンモデル (Nguyen et al., 2021) を 3 次元モデルに拡張し，細胞 - 細胞間結合の形成と劣化を考慮した速度論的モデルおよび，細胞分裂・細胞分化・細胞死を表現する確率モデルを構築した．さらにモデルパラメータ値推定方法を構築し，角膜上皮細胞のモデルパラメータ値推定に適用した．推定されたモデルパラメータ値を使用したシミュレーションにおいて，細胞の自律的な挙動によって角膜上皮細胞シートが形成される過程とそれに伴う細胞流動性の経時変化が表現された．

2.2 実験方法

2.2.1 *In vitro* 実験データの解析

モデルパラメータ値を推定し、モデル出力を検証するために、先行研究 (Baba et al., 2020) で行われた角膜上皮細胞の *in vitro* 培養で取得されたデータを解析した。培養に使用された細胞はヘルシンキ宣言に従って Rocky Mountain Lions Eye Bank (Aurora, CO, USA) から取得された。凍結された角膜上皮細胞は、解凍後に温度応答性培養皿 (UpCell® 3.5cm dish, Cell Seed, Japan) を用いて 3T3-J2 feeder cells と共に 37°C, 5% CO₂ の条件下における 15 日間共培養された。

2.2.1.1 細胞密度の推定

培養日数 6, 9, 12, 15 日目において上皮系の幹細胞マーカーである p63 と細胞核マーカーである Hoechst を使用した免疫染色を行った。その後、免疫蛍光染色 60×対物レンズを通して共焦点レーザー走査顕微鏡 (FV-1000; Olympus) を用いて 3 次元画像を取得した。画像は 256×256 pixel (212×212 μm²), *z* 方向には 0.45 μm ごとに取得した。この 3 次元画像を Image-Pro Plus version 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) を用いて画像解析により角膜上皮細胞核及び p63 (+) 細胞核の重心位置を測定した。基底層は先行研究で行われた方法により決定した (M.-H. Kim et al., 2011)。6 日目の細胞核が *z* 方向に重なっていない領域において測定された細胞核の重心位置から閾値 (平均+2SD) を決定し、それよりも低い高さの重心位置を持つ細胞核を基底層とした。基底層の高さは、底面から 7.55 μm とした。底面の位置は培養容器の自家蛍光により決定した。上記の手法で培養日数 6, 9, 12, 15 日目における、基底層 p63 陽性細胞密度 ($X_{\text{pro, in vitro}}$) と全細胞密度 ($X_{\text{tot, in vitro}}$) を推定した。免疫染色に関する詳細な情報は先行研究に記載 (Baba et al., 2020)。

2.2.1.2 細胞単位六角柱の中心間の距離 (細胞サイズ, l_c) の推定

培養日数 6, 9, 12, 15 日目において共焦点顕微鏡により撮影された蛍光画像から算出した基底層細胞密度の平均値から, 同一平面上における細胞単位六角柱の中心間距離 (l_c) を推定し, $l_c = 22.7 \mu\text{m}$ とした.

$$l_c = \sqrt{(2/\sqrt{3}) \frac{1}{X_{\text{basal, in vitro}}}} \quad (1)$$

2.2.1.3 *in vitro* における細胞移動速度の解析

角膜上皮細胞の培養期間中に, 観察装置 (Biostudio-T; Nikon Engineering, Kanagawa, Japan) を用いて 20 分毎に撮影を行った位相差画像 (4×対物レンズ) を使用した. 培養開始から角膜上皮細胞がコンフルエントに達するまで, 培養面には角膜上皮細胞が存在する領域とフィーダー細胞が存在する領域が存在する. そのため, 培養時間 $t = 72 - 78 \text{ h}$ については ImageJ の plugin である M Track J を使用して細胞をトラッキングし, それぞれの細胞の 6 時間での総移動距離を算出することで細胞の平均遊走速度 ($\bar{V}_{\text{mig, in vitro}}$) を推定した ($n = 100$). また, 角膜上皮細胞がコンフルエントに達した後の 120 h 以降について, ImageJ の PIV plugin を使用した Particle image velocimetry (PIV) 解析により, 細胞集団の移動速度を推定した. 追跡対象の検査窓 (Interrogation window) の大きさは $64 \times 64 \text{ pixel}$ ($84.8 \times 84.8 \mu\text{m}$) とした. PIV により入力画像に対して複数の測定点を得られるが, これらの測定点での速度の大きさ (スカラー量) の中央値を入力画像の代表値として, ある時刻における細胞集団の平均移動速度 ($\bar{V}_{\text{mov, in vitro}}$) とした.

2.2.1.4 コンフルエンシーの解析

角膜上皮細胞の培養期間中に, 観察装置 (Biostudio-T; Nikon Engineering, Kanagawa, Japan) を用いて撮影を行った位相差画像 (4×対物レンズ) を使用した. 培養時間 72, 84, 96, 108, 120 h に撮影された位相差画像を, 手動で角膜上皮細胞のコロニーを囲むことで二値化することで算出した.

2.2.2 角膜上皮細胞の培養シミュレーション

角膜上皮細胞の培養時間 $t = 72 - 360$ h のシミュレーションは Visual Studio 環境で C# 言語で実装されたプログラムにより行われた。単位六角柱の 3 次元配列から構成される計算空間の x 軸と y 軸には周期境界条件を適用した。また、培養面上に吸着した基質は $z = 0$ の xy 平面を占める単位六角柱の 2 次元配列で表現した。計算開始時、培養時間 $t = 72$ h において撮影された位相差画像を用い、手動で角膜上皮細胞のコロニーを囲むことで二値化した画像を読み込み、計算空間における各格子の中心座標 (x, y) が、角膜上皮細胞が存在する領域に含まれている場合、その (x, y) 座標の基質上 ($z = 1$) に細胞を配置した。位相差画像の二値化には、Image-Pro Plus version 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) を使用した。計算を開始する時間 $t_{\text{start}} = 72$ h に基質面上に配置される細胞は増殖性細胞である。細胞の初期配置後、計算を終了する時間 $t_{\text{end}} = 360$ h までタイムステップ $t_{\text{step}} = 0.1$ h ごとに細胞挙動と重力沈降の計算を行った (図 2.1)。

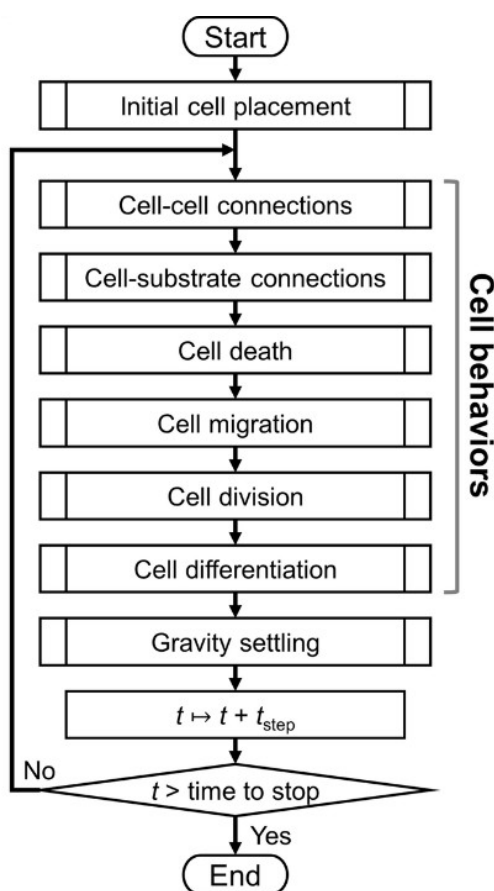


図 2.1 培養シミュレーションのフローチャート。

2.2.3 *in silico* における細胞移動速度の解析

細胞の平均移動速度の計算値 ($\bar{V}_{\text{mov, in silico}}$) は以下の式で算出した。培地交換や培地成分の枯渇による影響を無視するため、 $t = 120 \text{ h}$ から $t = 336 \text{ h}$ まで 24 h 毎に行われる培地交換後 1 時間から 6 時間における細胞集団の移動速度を使用した。

$$\bar{V}_{\text{mov, in silico}} = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{M} \sum_{n=1}^N \sum_{m=1}^M \frac{\sqrt{\left(x_{t+m \cdot t_{\text{step}}} - x_{t+(m-1) \cdot t_{\text{step}}}\right)^2 + \left(y_{t+m \cdot t_{\text{step}}} - y_{t+(m-1) \cdot t_{\text{step}}}\right)^2}}{t_{\text{step}}} l_c \quad (2)$$

$$M = \frac{\Delta t}{t_{\text{step}}} \quad (3)$$

ここで、 N は計算時間 t に計算空間に存在する細胞数、 M は細胞集団の移動速度を解析するタイムステップ数、 Δt は細胞の移動速度を解析する時間、 (x_t, y_t) は計算時間 t における細胞の中心座標である。また、本研究では $\Delta t = 6 \text{ h}$ とした。

2.2.4 モデル出力の解析

推定されたモデルパラメータ値を用いたシミュレーションによるモデル出力に対して、培養中の細胞シート内における細胞遊走速度と細胞 - 細胞間結合エネルギーについて解析を行った。モデル出力の解析と可視化は、Visual Studio 環境で C# 言語で実装されたプログラムを使用して行われた。

2.2.4.1 細胞 - 細胞間結合エネルギーの解析

各細胞の最大遊走エネルギーに対する細胞 - 細胞間結合のエネルギーの和の割合 ($\varepsilon_{\text{CC, total}}$) は、すべての隣接する単位格子 (方向数: N_{nn}) について、ある方向 (d) に存在する細胞との間に形成している細胞 - 細胞間結合のエネルギー ($E_{\text{CC}, d}$) を計算した値を用いて算出された。

$$\varepsilon_{\text{CC, total}} = \sum_{d=0}^{N_{\text{nn}}-1} \frac{E_{\text{CC}, d}}{E_{\text{max}}} \quad (4)$$

2.3 モデルのデザイン

2.3.1 エージェントベースモデルの構築

角膜上皮幹細胞の培養を表現するため、先行研究 (Nguyen et al., 2021) で構築された細胞 - 細胞間結合モデルと細胞遊走モデルを使用した。計算空間を x 軸と y 軸に周期境界条件を適用した単位六角柱の 3 次元配列とした。また、培養面上に吸着した基質は $z = 0$ の xy 平面を占める単位六角柱の 2 次元配列で表現した。さらに、細胞の非対称分裂 (垂直分裂)・細胞分化・密着結合・細胞死を表現する細胞挙動モデルを新たに構築した。本研究では、先行研究 (Nguyen et al., 2019, 2021) と同様に、同一培養面で共培養されたフィーダー細胞が、着目する細胞の挙動に与える影響を無視することが可能であると仮定してモデルを構築した。本研究で考慮した細胞挙動について、モデルによる表現の代表例を図 2.2 にそれぞれ示した。

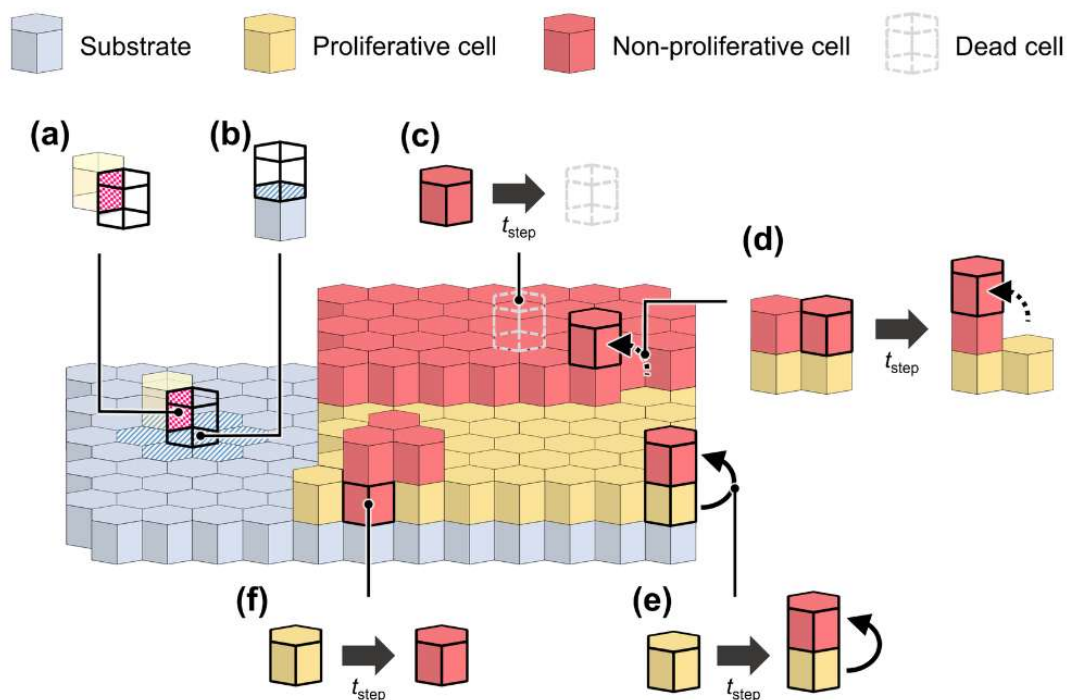


図 2.2 構築したモデルにおける細胞 - 細胞間結合 (a), 細胞 - 基質間結合 (b), 細胞死 (c), 細胞遊走 (d), 細胞分裂 (e), 細胞分化 (f) の代表例。

2.3.1.1 細胞 - 細胞間結合モデル

角膜上皮細胞において、E-cadherin を介した接着結合 (AJ) と、claudin や occludin, ZO-1 等を介した密着結合 (TJ) の形成されており、角膜上皮細胞からなる組織のバリア機能に寄与している (Kimura et al., 2009). 密着結合の形成に関与するタンパク質である claudin-1 や occludin は、角膜上皮細胞が重層した組織の apical 側 1-2 層目の細胞間で強く発現し、ZO-1 は apical 側表面の細胞間に発現が局在していることが観察されている (Ban, Dota, et al., 2003). 上記の細胞 - 細胞間接着分子の局在は、上皮組織における密着結合の形成は細胞が基底層から表層へと移動しながら分化する過程で生じる (Rice & Rompolas, 2020; Simpson et al., 2011). さらに、角膜上皮組織の表層では角化後に細胞間結合が失われることによる脱落 (落屑) が起こる. この一連の過程は、培養された角膜上皮細胞シートにおいても観察されている (Ban, Cooper, et al., 2003a; Miyashita et al., 2013). また、p63 は終末分化を抑制し、基底層のケラチノサイトの増殖能力を維持することが知られている (Yin et al., 2023). これらの報告から、密着結合の形成は非増殖性の細胞 (p63 陰性細胞) で起こり、角膜上皮細胞の分化が進むにつれて、細胞 - 細胞間結合を維持する AJ や TJ を構成するタンパク質のターンオーバーが損なわれ、周囲の細胞との結合能力を失うことで表層から剥離すると仮定した. 本研究では、上記の仮定に基づき細胞-細胞間結合に関するルールを構築した (図 2.2 (a)).

細胞が他の細胞と隣接している場合、互いの細胞は接着結合 (AJ) と密着結合 (TJ) の 2 種類からなる細胞-細胞間結合を形成し、結合の強さはそれぞれ接着結合エネルギー (E_{AJ}), 密着結合エネルギー (E_{TJ}) として表現される. 本研究では、AJ を形成する能力をすべての細胞が有しており、TJ を形成する能力は分化細胞のみが有するものとした. 隣接する 2 つの細胞 j と細胞 k の間に形成される細胞 - 細胞間結合のエネルギーは、接着結合と密着結合のエネルギーの和で表される.

$$E_{CC} = E_{AJ} + E_{TJ} \quad (5)$$

ここで、 E_{AJ} は細胞 j と細胞 k がそれぞれ有する接着結合のために使用可能なエネルギー ($E_{AJ,j}$, $E_{AJ,k}$) の最小値であり、2 つの細胞が隣接した場合に瞬時に最大値をとる.

$$E_{AJ} = \min(E_{AJ,j}, E_{AJ,k}) \quad (6)$$

一方、 E_{TJ} はAJの持続時間 ($\theta_{j,k}$) に応じて形成され、1次系のステップ応答の式 (7) によって与えられる。

$$E_{TJ} = E_{TJ,\max} \left[1 - \exp\left(-\frac{\theta_{j,k}}{\tau_{TJ}}\right) \right] \quad (7)$$

ここで、 $E_{TJ,\max}$ は細胞 j と細胞 k がそれぞれ有する密着結合のために使用可能なエネルギー ($E_{TJ,j}, E_{TJ,k}$) の最小値である。また、 τ_{TJ} はTJ形成の時定数である。

基質との結合を失った細胞 c が細胞 - 細胞間結合形成に使用可能なエネルギー量は、基質との結合を形成していない時間に比例して減少する。また、結合形成に使用可能なエネルギー量は0未満にはならないものとした。これらの仮定より、ある細胞 c が細胞 - 細胞間結合に使用可能なエネルギー量 ($E_{AJ,c}, E_{TJ,c}$) は式 (8, 9) で与えられる (式中の i はAJまたはTJ)。

$$E_{i,c}(t) = \begin{cases} \max(f_{i,c}(t), 0), & E_{CS} = 0 \\ E_{i,c}(t - t_{\text{step}}), & E_{CS} > 0 \end{cases} \quad (8)$$

$$f_{i,c}(t) = E_{i,c}(t - t_{\text{step}}) - k_{d,cc} E_{i,0} t_{\text{step}} \quad (9)$$

ここで、 $E_{i,0}$ は細胞の年齢が0hの時の $E_{i,c}$ であり、 E_{CS} は細胞と周囲の基質との間に形成されている細胞 - 基質間結合エネルギーである。

2.3.1.2 細胞 - 基質間結合モデル

細胞は培養面上に吸着している基質であるコラーゲンやフィブロネクチン等の細胞外マトリックス (ECM) とインテグリンを介した結合を形成する。細胞 - 基質間結合モデルは先行研究 (Nguyen et al., 2021) で構築されたものを用いた。ある細胞 c は隣接する基質単位六角柱と細胞 - 基質間結合を形成する (図 2.2 (b))。そのとき、細胞 - 基質間結合エネルギー (E_{CS}) は細胞 c が有する、細胞 - 基質間結合のために使用可能なエネルギー ($E_{CS,c}$) で与えられる。

2.3.1.3 細胞死モデル

重層角膜上皮細胞シートでは、細胞シート表層から細胞が剥離していることが示唆されている (Miyashita et al., 2013). 細胞シートから剥離した細胞は死細胞となり、培養液中を浮遊した後に培地交換により培養系から取り除かれると仮定し、ルールを構築した. 細胞の持つ細胞-細胞間結合および細胞-基質間結合の結合エネルギーがすべて 0 になったとき、細胞は細胞死を起こす. 細胞死は 1 タイムステップの間で起こり、結合エネルギーが 0 の細胞を計算空間から消失させることで表現する (図 2.2 (c)).

2.3.1.4 細胞遊走モデル

細胞は周囲の基質や細胞との接着・自身の形態変化を伴いながら、培養面上及び細胞組織内を遊走する. また、細胞の遊走方向及び速度は周囲の環境との相互作用を介して自律的に変化する. 本モデルの特性上、細胞自身の形態変化を表現することは適切ではないため、細胞遊走を連続的な挙動ではなく、着目する細胞と隣接した格子への離散的な位置変化で表現することとした (図 2.2 (d)). また、遊走方向や遊走速度の大きさが位置変化の前後において、着目する細胞と隣接している他の細胞や基質との結合エネルギーによって決定されるルールを構築した. 本研究では、先行研究 (Nguyen et al., 2021) で構築された細胞遊走モデルを 3 次元に拡張するとともに、密着結合に関するモデルを反映した.

細胞が細胞遊走のために使用可能なエネルギーの最大値 ($E_{\max}$) は、入力パラメータである自由遊走速度 ($V_{m,free}$) を用いて式 (10) で与えられる.

$$E_{\max} = \frac{1}{2} m_c \cdot V_{m,free}^2 \quad (10)$$

ここで m_c は細胞の質量であり、本研究では $m_c = 1.0 \text{ ng}$ と仮定した.

細胞は遊走する際、周囲の細胞や基質との間に形成されている結合を切断するために $E_{\max}$ の一部を使用し、残ったエネルギーは細胞自身の移動に使用される. ある細胞 c がある方向 (dir) に隣接する格子へと遊走する場合、細胞遊走速度 $V_{m,c}$ は式 (11) で与えられる.

$$V_{m,c} = V_{m,\text{free}} \sqrt{1 - \frac{E_{B,dir}}{E_{\text{max}}}} \quad (11)$$

ここで，遊走方向 (dir) は離散的であり，整数変数 ($dir = 0, 1, \dots, N_{\text{nn}} - 1$) で表される (図 2.3). また， N_{nn} は着目する単位六角柱と隣接する単位六角柱の数であり，本モデルでは $N_{\text{nn}} = 20$ である．細胞 c の次の細胞遊走までの待機時間 $t_{m,c}$ は，遊走前後の細胞中心間の幾何学的距離 l_m を用いて $t_{m,c} = l_m / V_{m,c}$ へと更新される． $t_{m,c}$ は計算時間の経過とともに減少し， $t_{m,c} \leq 0$ となったときに遊走する． $t_{m,c} > 0$ の場合，細胞 c が能動的に遊走することはないが，周囲の細胞の遊走によって受動的に遊走する可能性がある (詳細は後述の式 (20) に記載).

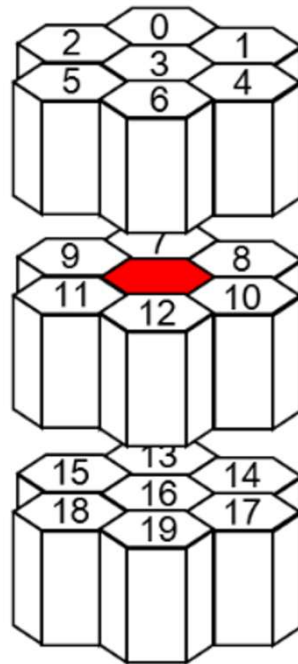


図 2.3 モデルにおける隣接単位六角柱と方向の定義．隣接単位六角柱は，対象の細胞に直接接するすべての単位六角柱が占める領域として定義される．赤色の単位六角柱の隣接単位六角柱は白色の単位六角柱で示されており，細胞遊走方向 (dir) は $dir = 0 - 19$ で示されている．細胞遊走前の着目する細胞から見た方向 (d) も同様に $d = 0 - 19$ で示される．

$E_{B,dir}$ は細胞がある方向 (dir) に隣接する格子へと遊走することによる、細胞遊走前の着目する細胞から見た方向 d に隣接する細胞または基質との結合エネルギー ($\Delta E(d;dir)$) の減少量の和であり、式 (12) で与えられる。

$$E_{B,dir} = \sum_{\substack{d=0 \\ \Delta E(d;dir)}}^{N_{nn}-1} \Delta E(d;dir) \quad (12)$$

$\Delta E(d;dir)$ は、遊走前の細胞 c から見て方向 d に隣接する細胞または基質との中心座標間の距離 ($\lambda_{c,d,before}$) と、その細胞または基質との遊走後の距離 ($\lambda_{c,d,after}$) から式 (13) で与えられる。 $E_{CS,c,d}$ は遊走前の細胞 c から見て方向 d に隣接する基質との結合エネルギーである。 $E_{AJ,c,d}$ と $E_{TJ,c,d}$ はそれぞれ AJ と TJ による遊走前の細胞 c から見て方向 d に隣接する細胞との結合エネルギーである。また、遊走前の細胞 c から見て方向 d の単位格子が空の場合、 $\Delta E(d;dir) = 0$ となる。

$$\Delta E(d;dir) = \begin{cases} E_{CS,c,d}, & (W(\lambda_{c,d,before}) - W(\lambda_{c,d,after}) = 1 \text{ and } T_d = \text{substrate}) \\ E_{AJ,c,d} + E_{TJ,c,d}, & (W(\lambda_{c,d,before}) - W(\lambda_{c,d,after}) = 1 \text{ and } T_d = \text{cell}) \\ E_{TJ,c,d}, & (W(\lambda_{c,d,before}) - W(\lambda_{c,d,after}) = 0 \text{ and } T_d = \text{cell}) \\ 0, & (\text{otherwise}) \end{cases} \quad (13)$$

ここで、 T_d は遊走前の細胞 c から見て方向 d に隣接するエージェントの種類である。また、式 (14) に示す $W(\lambda_{c,d})$ は、引数である細胞 c の遊走前に方向 d に隣接している細胞または基質との中心座標間の距離 ($\lambda_{c,d}$) が、結合を形成可能な範囲 (A) 内であることを判断し、0 または 1 の値をとる関数である。本研究では、隣接する単位格子に存在する細胞または基質とのみ結合を形成可能な値である、 $A = l_c\sqrt{2}$ とした。

$$W(\lambda_{c,d}) = \begin{cases} 1, & (\lambda_{c,d} \leq A) \\ 0, & (\lambda_{c,d} > A) \end{cases} \quad (14)$$

本モデルにおける細胞は, 20 方向に存在する隣接する単位格子に遊走する可能性があり, その遊走方向は隣接するエージェントが存在しない場合の遊走方向選択確率 ($p_{m,dir}$) を用いて確率的に決定される. $p_{m,dir}$ は, 細胞が方向 dir に遊走する場合の, 遊走先の足場の有無 ($H_{m,dir}$), 方向 dir の空間の幾何学的重み (Ω_{dir}), 方向 dir への細胞遊走によって減少する結合エネルギーによる重み ($R_{m,dir}$) に比例する, $d=20$ 方向それぞれにおける遊走方向の重み ($R_{m,d} \cdot \Omega_d \cdot H_{m,d}$) の総和で正規化された量であり, 式 (15) で与えられる.

$$p_{m,dir} = \frac{R_{m,dir} \cdot \Omega_{dir} \cdot H_{m,dir}}{\sum_{d=0}^{N_{nn}-1} (R_{m,d} \cdot \Omega_d \cdot H_{m,d})} \quad (15)$$

$H_{m,dir}$ は細胞が dir 方向へと遊走した場合の足場の有無を判断する関数であり, dir 方向へと遊走する場合に, 足場となる隣接した細胞または基質が存在する場合は $H_{m,dir}=1$ となり, 存在しない場合には $H_{m,dir}=0$ となる. このため, 遊走後に足場となる細胞や基質と結合不可能な方向への遊走は実現しない.

Ω_{dir} は, 面で接する単位六角柱の中心座標間の距離が l_c である単位六角柱の配列の中で, ある単位六角柱の格子の中心座標を中心とする半径 l_c の球の, 隣接する各単位六角柱に含まれる表面積から計算される. シミュレーションには式 (16) に示す, 計算された値の最も単純な整数比を用いた.

$$\Omega_{dir} = \begin{cases} 3, & dir = 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16 \\ 1, & dir = 0, 1, 2, 4, 5, 6, 13, 14, 15, 17, 18, 19 \end{cases} \quad (16)$$

$R_{m,dir}$ は, 細胞遊走によって減少する, 隣接する細胞や基質との結合エネルギーから計算される. 細胞は E_{max} の一部を細胞 - 細胞間や細胞 - 基質間の結合を切断するために使用し, 残りのエネルギーは遊走のために使われる. そのため, $E_{B,dir}$ は最大移動エネルギー E_{max} を超えてはならず, この条件を満たさない遊走は実現されない.

$$R_{m,dir} = 0, \quad \text{when } E_{max} \leq E_{B,dir} \quad (17)$$

また, $H_{m,dir} = 1$ かつ $E_{B,dir} \leq E_{\max}$ の場合, $R_{m,dir}$ は式 (18) で与えられる.

$$R_{m,dir} = \begin{cases} \frac{E_A - E_{B,dir}}{E_A}, & \text{when } E_A > 0 \\ 0, & \text{when } E_A = 0 \end{cases} \quad (18)$$

ここで, E_A は細胞 c が遊走前に方向 d に存在する周囲の細胞や基質との間に形成している結合エネルギー ($E_{i,c,d}; i = \text{AJ, TJ}$ または CS) の総和であり, 式 (19) で与えられる. 方向 d に細胞や基質が存在しない場合には, $E_{i,c,d} = 0$ である.

$$E_A = \sum_{d=0}^{N_{nn}-1} E_{i,c,d} \quad (19)$$

また, 選択された方向 dir に他の細胞が存在する場合, 細胞同士の位置交換により細胞遊走が表現される. この時, いずれの細胞も位置交換による遊走先に遊走可能な状態である必要がある. 最終的に, 細胞同士の位置交換を考慮した遊走方向選択確率 ($Pr_{m,dir}$) は, 式 (20) で与えられる.

$$Pr_{m,dir} = \frac{(p_{m,dir})_T (p_{m,\widetilde{dir}})_D}{\sum_{d=0}^{N_{nn}-1} (p_{m,d})_T (p_{m,\widetilde{d}})_D} \quad (20)$$

ここで, $(p_{m,dir})_T$ は細胞同士の位置交換を考慮しない場合に, 着目する細胞が方向 dir に遊走する確率である. $(p_{m,\widetilde{dir}})_D$ は着目する細胞の方向 dir に存在するエージェントが, 位置交換のために方向 dir と反対方向 $\widetilde{dir}$ に遊走する確率であり, 可能な場合は 1, 不可能な場合は 0 となる. また, 着目する細胞の遊走方向 dir が基質である場合には $(p_{m,\widetilde{dir}})_D = 0$, 空である場合には, $(p_{m,\widetilde{dir}})_D = 1$ となる. 添え字の T は着目する細胞, D は遊走先のエージェントをそれぞれ意味する.

2.3.1.5 細胞分裂モデル

上皮系組織の基底層に存在する増殖性細胞の細胞分裂には、基底層に増殖性細胞を生む水平分裂と、基底上層に非増殖性細胞を生む垂直分裂の二種類が存在する．垂直分裂の中でも、基底層に存在する細胞の幹細胞性を保ちつつ基底上層に非増殖性細胞を生む非対称分裂は上皮系の細胞組織の極性を持った構造の形成に寄与するとされており、角膜上皮細胞においても報告されている (Gómez-Flores et al., 2011; Lechler & Fuchs, 2005). また、p63 の発現が非対称分裂に必須であるという報告もある (Koster et al., 2004). さらに、細胞分裂による細胞の押し出しが、角膜上皮の恒常性維持に重要であることが示唆されている (Strinkovsky et al., 2021). これらの報告をもとに、本研究では角膜上皮細胞シート形成培養において基底層に存在する p63 陽性細胞を増殖性細胞とし、先行研究 (Nguyen et al., 2021) で構築された iPS 細胞の水平分裂を表現するモデルに、垂直分裂に関するルールを追加することで、角膜上皮細胞の細胞分裂を表現した (図 2.2 (e)).

各増殖細胞は、細胞周期ごとに $0.9 \bar{t}_g$ から $1.1 \bar{t}_g$ までランダムに与えられた確率変数である世代時間 t_g を持つ．入力パラメータ $\bar{t}_g$ は平均世代時間である．各細胞は次の分裂までの待ち時間 $t_{d,c}$ を持ち、これは細胞分裂時には t_g に等しく、タイムステップごとに t_{step} 減少する．また細胞が遊走不可能な場合には、静止状態となり細胞周期は進行しない．そして、 $t_{d,c} \leq 0$ となった際に細胞分裂が起こる．娘細胞は母細胞に隣接する単位格子に配置される．配置される方向は離散的な整数変数 ($d=0, 1, \dots, N_{mm}-1$) で表され、本モデルでは $N_{mm}=20$ である (図 2.3). 分裂する細胞 (母細胞) から水平距離 N_v 以内に娘細胞を配置可能な場所がある場合、水平分裂が起こる．それ以外の場合には、垂直分裂が起こる．水平分裂では、母細胞の水平方向 ($d=7-12$) に娘細胞を配置可能な場所が存在しない場合、最も近くに空いている単位格子の一つを選択し、その単位格子に隣接する細胞の一つを移動させる．この手順を、母細胞に隣接する単位格子に空きができるまで繰り返す．最後に、この空いた隣接単位格子に娘細胞を配置する．一方、母細胞から水平距離 N_v 以内に娘細胞を配置可能な場所が存在しない場合、垂直分裂が起こる．垂直分裂の場合、娘細胞は母細胞の上方向 ($d=0-6$) に配置される．母細胞に隣接するすべての単位格子に細胞が配置された後、水平分裂と同様に上方向への細胞の押し出しが発生する．また、この時基底層側

に存在する母細胞は垂直分裂の際に p_{dif} の確率で非増殖性細胞となる。

2.3.1.6 上皮細胞分化モデル

培養角膜上皮細胞シートでは、p63 陽性細胞は基底層に局在し、その密度は培養時間とともに減少することが報告されている (Baba et al., 2020). 角膜上皮組織では、辺縁幹細胞が一過性増幅 (TA) 細胞を生成し、TA 細胞は増殖能を持たない終末分化 (TD) 細胞を生成する。さらに、TA 細胞が増殖能力を失うと、2つの TD 細胞に分裂するとされている (Moraki et al., 2019). また、基底上層に非増殖性細胞が生じる原因として、基底層に存在する増殖性細胞の非対称分裂と基底層から離れることによる、基質との接着の喪失が考えられる (Gómez-Flores et al., 2011; Koster et al., 2004; Lechler & Fuchs, 2005). これらの報告より、増殖性細胞から非増殖性細胞への分化のルールを構築した (図 2.2 (f)). 細胞が基質との結合を失った場合に細胞は分化する。分化した細胞は密着結合を形成する能力を獲得し、同時に細胞 - 細胞間結合形成に使用可能なエネルギー量が基質との結合を形成していない時間に比例して減少する。

2.3.2 モデルパラメータ値推定方法

シミュレーションに使用されるモデルパラメータ値は、着目する現象を正確に解釈するために可能な限り精度高く推定する必要がある。ここではパラメータ値の推定の定義として、同時に複数のパラメータを推定すること、または別に決められたパラメータ群を用いパラメータを推定することも含むものとする。モデルパラメータ値推定の流れと本研究で使用するモデルパラメータの分類を図 2.4 に示した。はじめに、独立した実験データから個別のパラメータ値を推定可能な場合について、パラメータ値を推定する。その後、独立した実験データから個別のパラメータ値を推定不可能な場合について、計算に必要なモジュールを用いたシミュレーション値の実験データへの fitting によりパラメータ値を推定する。この時、使用するモジュールで未設定のパラメータについては計算上寄与しないようにパラメータ値を設定するものとする。推定するパラメータが含まれる個別のモジュールを用いた計算で推定可能なパラメータ値について、実験データへの fitting により推定する。ここで、単一培養フェーズは主たる細胞挙動が定常状態である培養フェーズ（例：対数増殖期）とする。また、細胞挙動の定常状態とは、主たる細胞挙動以外の細胞挙動の影響が無視できる、つまりモデル上では他のモジュールの寄与が無視できる状態である。さらに、複数モジュールを用いた単一培養フェーズの計算で推定可能なパラメータ値について、実験データへの fitting により推定する。この時、推定するパラメータを含まないモジュールを用いる場合も含まれるものとする。最後に、複数の培養フェーズをまたぐ計算で推定可能なパラメータ値について、必要なモジュールを使用した複数の培養フェーズをまたぐ実験データへの fitting により推定する。ここまでで推定不可能なパラメータが存在する場合、実験データの追加取得や構築したモデルの見直しを行う必要がある。また、図 2.4 のフローチャートでは左側に行くにしたがってパラメータ値推定における仮定が少なくなるため、推定されたパラメータ値の信頼性は高くなる。

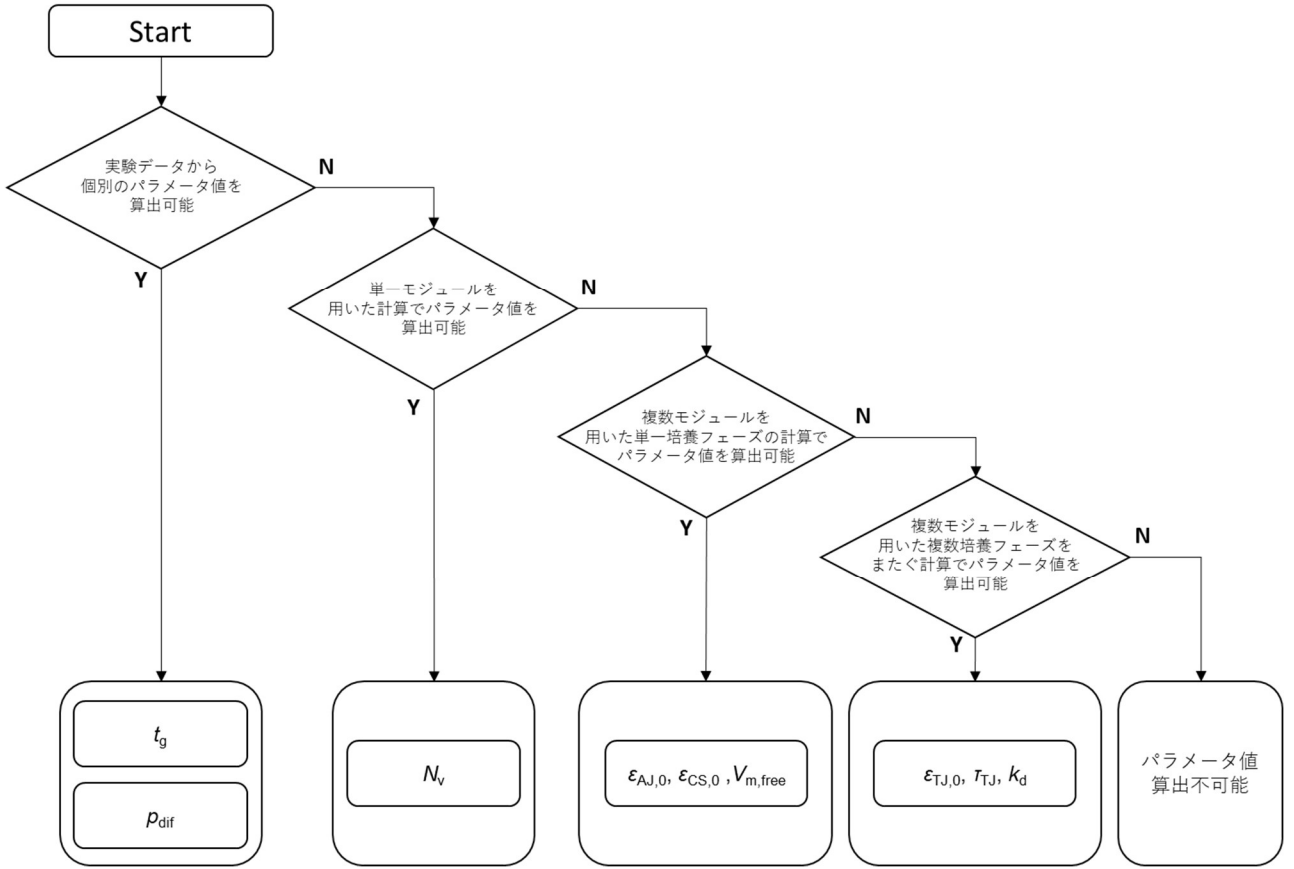


図 2.4 細胞挙動に関するモデルパラメータ値推定の流れと本研究で使用するモデルパラメータの分類

実験データへの fitting により n_p 個のパラメータ値を推定する流れを図 2.5 に示す. 推定する各パラメータについて, 探索範囲の最大値 $R_{\max,0}$, 探索範囲の最小値 $R_{\min,0}$, 探索範囲の分割数 n_d を設定する. ここで, 最終的な有効桁数を D_f , m_r は探索範囲の縮小倍率であるとする. 各パラメータ $n_d + 1$ 通りの組み合わせ $(n_d + 1)^{n_p}$ 通りの条件全てについて計算を行う. この時, 探索の繰り返し回数 n_r の初期値を 0 とする. 各条件の計算結果について, fitting に使用する *in vitro* 実験データに対する残差平方和を算出し, 最も残差平方和が小さいパラメータ値の組み合わせ $(V_{\text{tent},1}, \dots, V_{\text{tent},n_p})$ を決定する. その後, 各パラメータについて探索範囲 R と interval I を更新する. 以下, 式 (21, 22) に n 番目のパラメータの探索範囲 R と interval I を示した.

$$R_n = V_{\text{tent},n} \pm \frac{1}{2} \left(\frac{R_{\max,n} - R_{\min,n}}{m_{r,n}} \right) \quad (21)$$

$$I_n = \frac{1}{n_{d,n}} \left(\frac{R_{\max,n} - R_{\min,n}}{m_{r,n}} \right) \quad (22)$$

上記の探索範囲 R と interval I の更新と各パラメータ $n_d + 1$ 通りの組み合わせ $(n_d + 1)^{n_p}$ 通りの条件全ての計算を行い, fitting に使用する *in vitro* 実験データに対する残差平方和が最も小さいパラメータ値の組み合わせ $(V_{\text{tent},1}, \dots, V_{\text{tent},n_p})$ を決定することを $I \leq 10^{-D_f}$ となるまで繰り返す. 上記プロセスで決定された *in vitro* 実験データに対する残差平方和が最も小さいパラメータ値の組み合わせ $(V_{\text{tent},1}, \dots, V_{\text{tent},n_p})$ の各パラメータについて精度 10^{-D_f} となるように四捨五入し, 推定値とする.

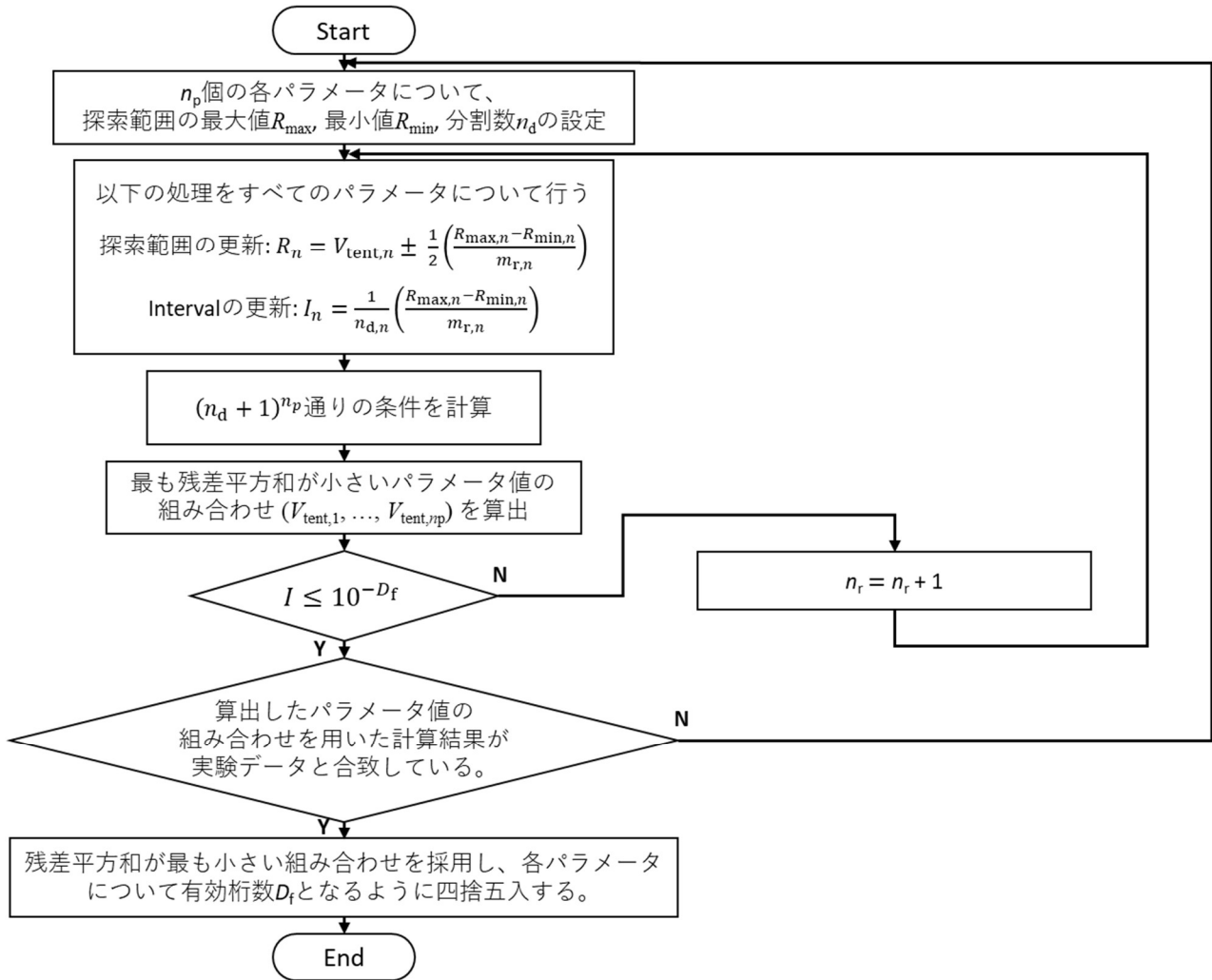


図 2.5 実験データへの fitting によるパラメータ値推定の流れ

2.4 結果

2.4.1 モデルパラメータ値の推定

2.4.1.1 独立した実験データからの個別パラメータ値推定

平均世代時間 $\bar{t}_g$ と非増殖性細胞に転換される確率 p_{dif} についてそれぞれ独立した実験データから推定した。平均世代時間 $\bar{t}_g$ について、対数増殖期である培養時間 $t_1 - t_2$ h におけるコンフルエンス (C_i) の変化から、式 (23, 24) を用いて推定した。ここで μ は比増殖速度 (h^{-1}) であり、 $t_1 = 72$ h, $t_2 = 84$ h とすることで、15.8 h と推定された。

$$\mu = \frac{\ln(C_{t_2}/C_{t_1})}{t_2 - t_1} \quad (23)$$

$$\bar{t}_g = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (24)$$

非増殖性細胞に転換される確率 p_{dif} は、重層時における増殖性細胞密度 X_{aP} の見かけの変化速度 k_q (式 (25)) を用いて式 (26) で示す関係から、式 (27) で推定した。

$$\frac{dX_{\text{aP}}}{dt} = k_q X_{\text{aP}} \quad (25)$$

$$\int_{X_{\text{aP},0}}^{X_{\text{aP},0}(1-p_{\text{dif}})} \frac{1}{X_{\text{aP}}} dX_{\text{aP}} = \int_0^{\bar{t}_g} k_q dt \quad (26)$$

$$p_{\text{dif}} = 1 - e^{\bar{t}_g k_q} \quad (27)$$

本研究では、増殖性細胞密度の見かけの変化速度 k_q は培養時間 144, 216, 288, 360 h の増殖性細胞密度 X_{aP} から $k_q = 3.00 \times 10^{-3}$ と推定され、また式 (23, 24) を用いて推定された平均世代時間の値 $\bar{t}_g = 15.8$ h を用いて $p_{\text{dif}} = 4.6 \times 10^{-2}$ と推定された。

2.4.1.2 個別のモジュールを用いた計算によるパラメータ値推定

角膜上皮細胞の培養を表現するために、すべてのモデルパラメータ値を推定した。同一平面上における細胞単位六角柱の中心間距離 l_c は実験で得られた基底層の細胞密度から、 $l_c = 22.7 \mu\text{m}$ とした。計算は x, y 平面について周期境界条件が適用された $[X, Y, Z] = [221, 256, 32]$ の単位正六角柱の 3 次元配列で構成される計算空間 (培養面積 0.252 cm^2) で行われた。図 2.4 の順番に従い、推定するパラメータが含まれる個別のモジュールを用いた単一培養フェーズの計算で推定可能なパラメータ値である、垂直方向への細胞分裂が起こるために細胞で占められる必要のある水平方向の領域の半径 N_v を推定した。細胞挙動モジュールは計算に必要な細胞分裂モジュールのみを使用し、 $N_v = 1 - 30$ の 30 条件で培養時間 $t = 72 - 120 \text{ h}$ の計算を行った。シミュレーションには表 2.1, 2.2 に示したモデルパラメータ値を使用した。

表 2.1 N_v の推定に使用したモデルパラメータ値

モデルパラメータ	記号	単位	値
平均世代時間	$\bar{t}_g$	h	15.8
非増殖性細胞に転換される確率	p_{dif}	-	4.6×10^{-2}

表 2.2 N_v の探索範囲と精度

モデルパラメータ	記号	単位	精度 (10^{-D_f})	探索範囲 [$R_{\text{min}} - R_{\text{max}}$]
垂直方向への細胞分裂が起こるために細胞で 占められる必要のある水平方向の領域の半径	N_v	layer	1	[1 - 30]

計算の結果, *in vitro* における培養時間 $t = 72 - 120$ h のコンフルエンスの経時変化を最もよく表現することから, $N_v = 8$ とした (図 2.6).

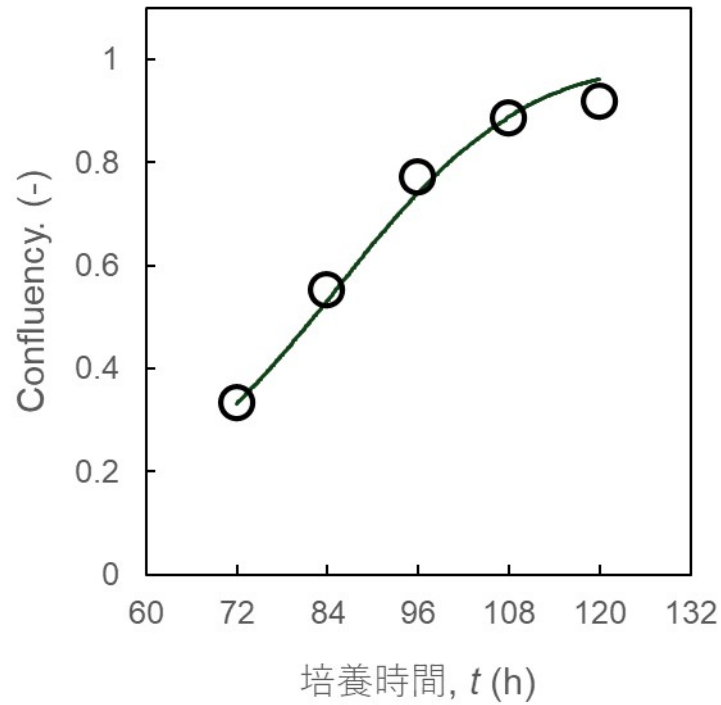


図 2.6 コンフルエンスの経時変化の *in vitro* 実測値と, 実測値を最もよく表現したモデルパラメータ値の条件 ($N_v = 8$) における計算結果. ○ : *in vitro* 実測値, 実線 : *in silico* 計算値.

2.4.1.3 複数モジュールを使用した単一培養フェーズの計算によるパラメータ値推定

複数の培養フェーズをまたぐ計算で推定可能なパラメータ値である $\varepsilon_{AJ,0}$, $\varepsilon_{CS,0}$, $V_{m,free}$ について、位相差画像のトラッキングにより推定された培養時間 $t = 72 - 78$ h における細胞遊走速度の平均値に最小二乗法を用いてフィッティングすることで推定された．細胞挙動モジュールは計算に必要な細胞 - 細胞間結合・細胞 - 基質間結合・細胞遊走・細胞分裂モジュールを使用し， $\varepsilon_{AJ,0}$, $\varepsilon_{CS,0}$, $V_{m,free}$ を変化させた組み合わせの各条件で培養時間 $t = 72 - 78$ h の計算を行った．計算は x, y 平面について周期境界条件が適用された $[X, Y, Z] = [221, 256, 32]$ の単位正六角柱の 3 次元配列で構成される計算空間（培養面積 0.252 cm^2 ）で行われた．シミュレーションには表 2.3, 2.4 に示したモデルパラメータ値を使用した．細胞遊走・細胞 - 細胞間結合・細胞 - 基質間結合は相互に影響しており，個別に値を推定することが難しいため，本研究では同時に 3 つのパラメータ値を推定する．また，増殖性・非増殖性細胞ともに $\varepsilon_{AJ,0}$, $\varepsilon_{CS,0}$, $V_{m,free}$ の値は一定であると仮定し，シミュレーションを行った．ここでは，推定するすべてのモデルパラメータ値について探索範囲の分割数 $n_d = 10$ ，探索範囲の縮小倍率 $m_r = 2$ とし，図 2.5 に従ってモデルパラメータ値の推定を行った．

表 2.3 $\varepsilon_{AJ,0}$, $\varepsilon_{CS,0}$, $V_{m,free}$ の推定に使用したモデルパラメータ値

モデルパラメータ	記号	単位	値または探索範囲
平均世代時間	$\bar{t}_g$	h	15.8
非増殖性細胞に転換される確率	p_{dif}	-	4.6×10^{-2}
垂直方向への細胞分裂が起こるために細胞で 占められる必要のある水平方向の領域の半径	N_v	layer	8

表 2.4 $\varepsilon_{AJ,0}$, $\varepsilon_{CS,0}$, $V_{m,free}$ の探索範囲と精度

モデルパラメータ	記号	単位	精度 (10^{-D_f})	探索範囲 [$R_{min} - R_{max}$]
最大遊走エネルギーに対する 接着結合エネルギーの比率	$\varepsilon_{AJ,0}$	-	0.01	[0.00-1.00]
最大遊走エネルギーに対する 細胞 - 基質間結合エネルギーの比率	$\varepsilon_{CS,0}$	-	0.01	[0.00-1.00]
自由遊走速度	$V_{m,free}$	$\mu\text{m h}^{-1}$	1	[0-100]

計算の結果, *in vitro* における培養時間 $t = 72 - 78$ h の細胞遊走速度を最もよく表現するモデルパラメータ値の有効桁数を調整し, $\varepsilon_{AJ,0} = 0.09$, $\varepsilon_{CS,0} = 0.21$, $V_{m,free} = 90$ とした (図 2.7).

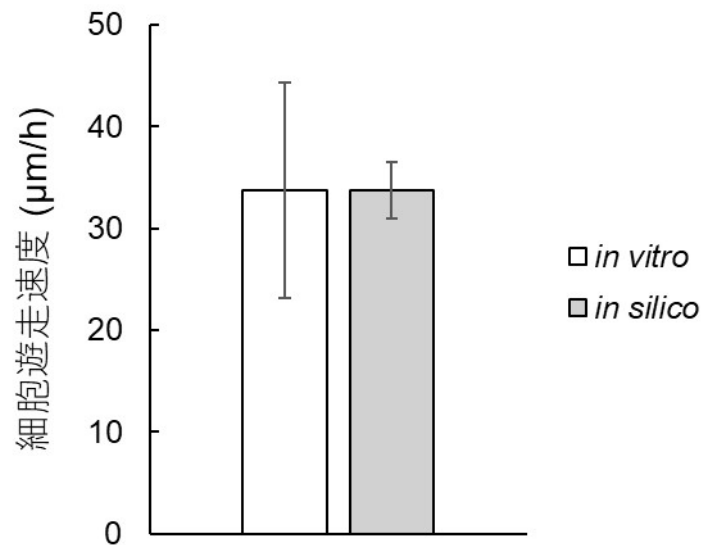


図 2.7 培養時間 $t = 72 - 78$ h の細胞遊走速度の *in vitro* 実測値と, 実測値を最もよく表現したモデルパラメータ値の組み合わせ ($V_{m,free} = 90.000$, $\varepsilon_{AJ} = 0.08750$, $\varepsilon_{CS} = 0.21250$) における計算結果. 白色: *in vitro* 実測値 ($n = 100$), 灰色: *in silico* 計算値 ($n = 15821$).

2.4.1.4 複数培養フェーズの計算によるパラメータ値推定

$\varepsilon_{\text{TJ},0}$, τ_{TJ} , $k_{\text{d,cc}}$ の値を推定した. シミュレーションには表 2.3 に示したモデルパラメータ値を使用した. 計算は x, y 平面について周期境界条件が適用された $[X, Y, Z] = [89, 102, 30]$ の単位正六角柱の 3 次元配列で構成される計算空間 (培養面積 0.041 cm^2) で行われた. ここで用いる $\bar{V}_{\text{mov, in vitro}}$ は各細胞の移動速度を間接的に測定したものであるため, $\bar{V}_{\text{mov, in silico}}$ と経時変化の傾向を比較するために, それぞれの基準時間 $t_{\text{ref}} = 120 \text{ h}$ における速度により正規化された相対速度 ($R_{\text{m, in vitro}}$, $R_{\text{m, in silico}}$) を算出した (式中の i は in vitro または in silico). その後, $R_{\text{m, in vitro}}$ の経時変化と最も近い $R_{\text{m, in silico}}$ の経時変化を示すパラメータの組み合わせを最小二乗法で評価することで求めた.

$$R_{\text{m},i} = \frac{\bar{V}_{\text{mov},i}(t)}{\bar{V}_{\text{mov},i}(t_{\text{ref}})} \quad (28)$$

ここでは, 推定するすべてのモデルパラメータ値について探索範囲の分割数 $n_d = 10$, 探索範囲の縮小倍率 $m_r = 2$ とし, 図 2.5 に従ってモデルパラメータ値の推定を行った.

表 2.5 $\varepsilon_{\text{TJ},0}$, τ_{TJ} , $k_{\text{d,cc}}$ の推定に使用したモデルパラメータ値

モデルパラメータ	記号	単位	値または探索範囲
平均世代時間	$\bar{t}_{\text{g}}$	h	15.8
非増殖性細胞に転換される確率	p_{dif}	-	4.6×10^{-2}
垂直方向への細胞分裂が起こるために細胞で 占められる必要のある水平方向の領域の半径	N_{v}	layer	8
最大遊走エネルギーに対する 接着結合エネルギーの比率	$\varepsilon_{\text{AJ},0}$	-	0.09
最大遊走エネルギーに対する 細胞 - 基質間結合エネルギーの比率	$\varepsilon_{\text{cs},0}$	-	0.21
自由遊走速度	$V_{\text{m,free}}$	$\mu\text{m h}^{-1}$	90

表 2.6 $\varepsilon_{AJ,0}$, $\varepsilon_{CS,0}$, $V_{m,free}$ の探索範囲と精度

モデルパラメータ	記号	単位	精度 (10^{-D_f})	探索範囲 [$R_{min} - R_{max}$]
最大遊走エネルギーに対する 密着結合エネルギーの比率	$\varepsilon_{TJ,0}$	-	0.01	[0.00-0.50]
密着結合形成の時定数	τ_{TJ}	h	0.1	[0.0-5.0]
細胞-細胞間結合エネルギーの劣化速度定数	$k_{d,cc}$	h^{-1}	0.0001	[0.0000-0.0500]

計算の結果, *in vitro* における培養時間 $t = 72 - 360$ h における細胞流動性の継時変化を最もよく表現するモデルパラメータ値の有効桁数を調整し, $\varepsilon_{TJ,0} = 0.21$, $\tau_{TJ} = 1.8$, $k_{d,cc} = 0.0050$ とした (図 2.8).

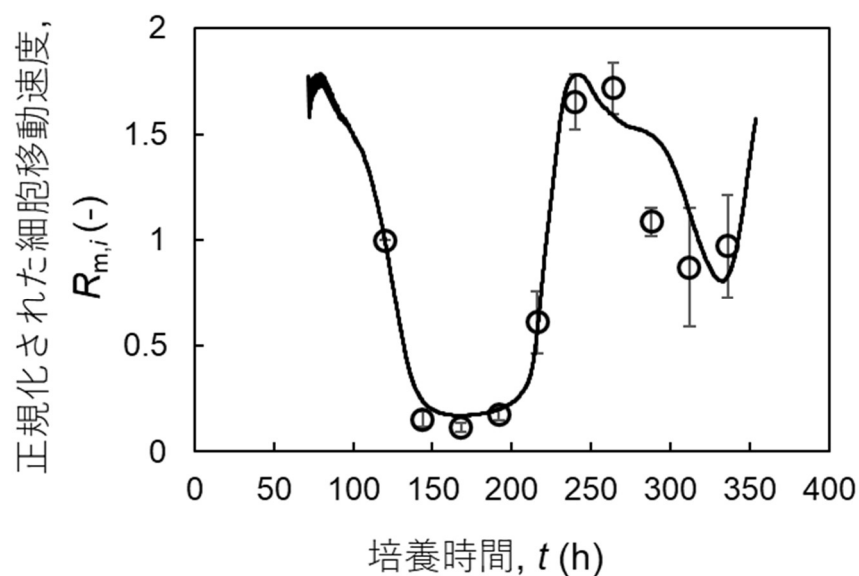


図 2.8 細胞移動速度の *in vitro* 実測値と, 実測値を最もよく表現したモデルパラメータ値の条件 ($\tau_{TJ} = 1.8750$, $\varepsilon_{TJ} = 0.21250$, $k_{d,cc} = 0.005000$) における計算結果, ○: 細胞シート内の領域移動速度の実測値 $R_{m,in vitro}$, 実線: 平均細胞移動速度の計算値 $R_{m,in silico}$.

また, 基底層 p63 陽性細胞密度は培養時間 $t = 123.3$ h で最大値をとったのちに減少しており, 計算値と実測値は概ね一致していた. 総細胞密度は $t = 140$ h 付近から増加速度が低下したのちに, $t = 200$ h 付近から再び細胞密度の増加が見られ, $t = 289.4$ h に極大値をとったのちに減少し, $t = 339.0$ h に極小値をとり, 再び増加する傾向が見られた. 総細胞密度は培養期間を通して, 計算値が実測値よりも大きい傾向がみられた (図 2.9).

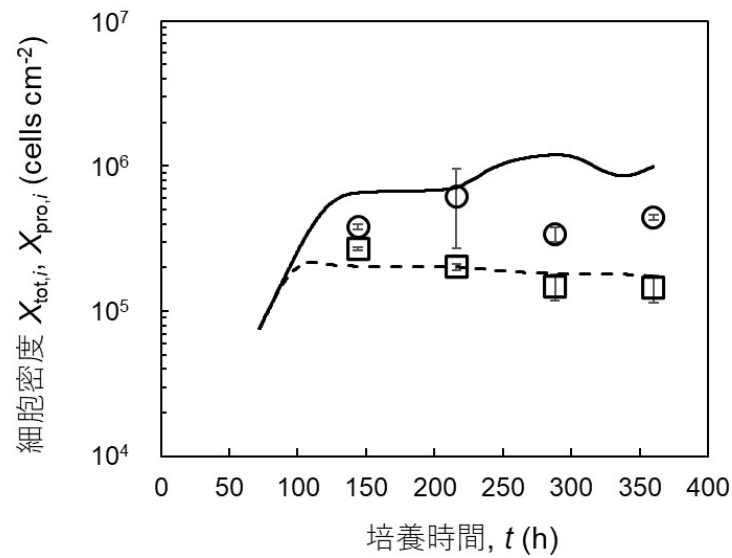


図 2.9 モデルパラメータの推定値を用いた角膜上皮細胞シート形成培養における細胞密度のシミュレーション結果, ○: 全細胞密度の実測値, $X_{tot, in vitro}$, □: 基底層 p63 陽性細胞密度の実測値, $X_{pro, in vitro}$, 実線: 全細胞密度の計算値, $X_{tot, in silico}$, 破線: 増殖性細胞密度の計算値, $X_{pro, in silico}$.

2.5 考察

2.5.1 モデルの選択と実装

細胞挙動を表現するモデルは、これまで数個の細胞からなる詳細なモデルから単純化された細胞からなる三次元組織レベルのモデルまで様々なモデルが開発されてきた (Metzcar et al., 2019). モデルの表現力と計算量はトレードオフの関係にあり、着目する現象を表現する目的に応じてモデルを選択する必要がある. 本研究で用いたセルラーオートマトンモデルの長所として、実測が難しいモデルパラメータの数を減らすことが可能な点と計算速度の速さが挙げられる. 一方で細胞形態が固定されてしまうことで、細胞組織における細胞密度の変化や細胞の集団遊走などの表現に制限が生じる. また、本研究ではモデルの実装にユーザーインターフェースの作成とモジュール化した細胞挙動の実装が容易な C#を使用した. 一方で将来的にさらなる大規模な並列計算による計算速度の向上を目指す際には計算のアルゴリズムの最適化が必要となる.

2.5.2 パラメータ値推定方法

シミュレーション研究において、モデルパラメータ値を実測する以外に他の文献から実測値を引用する、または特定の値を推定せずにパラメータ依存性を見ることが多い. 本研究では、モデルパラメータ値の推定方法の中でも、実験データから直接推定することが難しいモデルパラメータ値の推定方法を提案した. **Fitting** により同時に複数のモデルパラメータ値を推定する際、パラメータ数の増加にともない推定に要する計算時間は指数関数的に増加し、用いる仮定が多くなることから推定されるパラメータ値の精度が低くなる. これらの点から本研究では培養フェーズを分割し、必要最低限のモジュールを使用した計算によりパラメータ値を推定した. 今後は測定系の技術の進歩により実験データから直接推定することが可能なパラメータを増やすとともに、**fitting** により推定する場合には必要最低限のモジュールを使用し、培養フェーズを限定して計算を行うことで計算量を抑え、可能な限り確度の高く着目する現象を表現することが可能となると考えられる.

2.5.3 本研究で構築したエージェントベースモデルによる現象の表現

本章では、先行研究 (Nguyen et al., 2021) で構築された iPS 細胞のコロニー内の細胞挙動を表現するルール (細胞遊走・細胞 - 細胞間結合) を 3 次元に拡張し、さらに細胞分裂・細胞分化・細胞死・細胞 - 細胞間結合 (密着結合) を表現するルールを新たに追加することで、角膜上皮細胞シートにおける細胞挙動が表現された。本モデルで考慮した 6 種類の細胞挙動 (細胞 - 基質間結合・細胞 - 細胞間結合・細胞遊走・細胞分化・細胞分裂・細胞死) によって、角膜上皮細胞の培養において細胞播種から細胞シート構造が形成される過程を以下に示した(図 2.10)。シミュレーション開始時 ($t=72\text{ h}$) では、すべての細胞は基質面上に配置されており、隣接する細胞及び基質との間に細胞 - 細胞間、細胞 - 基質間結合をそれぞれ形成する。そして基質面上に存在する増殖性細胞が水平分裂することでコロニーが形成され、さらにコロニー外側への細胞の押し出しを伴う水平分裂によるコロニーの拡大が起こり、シート構造が形成される。その後、増殖性細胞が上 7 方向のいずれかに非増殖性細胞を配置する垂直分裂により細胞シート構造の積層化が進む。そして垂直分裂の際に母細胞が確率で非増殖性細胞へと分化する。またこの時、増殖性細胞は隣接するすべての細胞との間に接着結合を形成する。一方で、非増殖性細胞の場合は、隣接する細胞が増殖性細胞の場合には接着結合のみを形成し、非増殖性細胞の場合では接着結合に加えて密着結合を形成する。細胞シートが積層化した後、基底層の増殖性細胞の中で、隣接する細胞との細胞 - 細胞間結合により遊走不可能な細胞は休止状態となる。また基底上層に存在する非増殖性細胞は、細胞 - 細胞間結合を失うことで死細胞となり計算空間から取り除かれる。

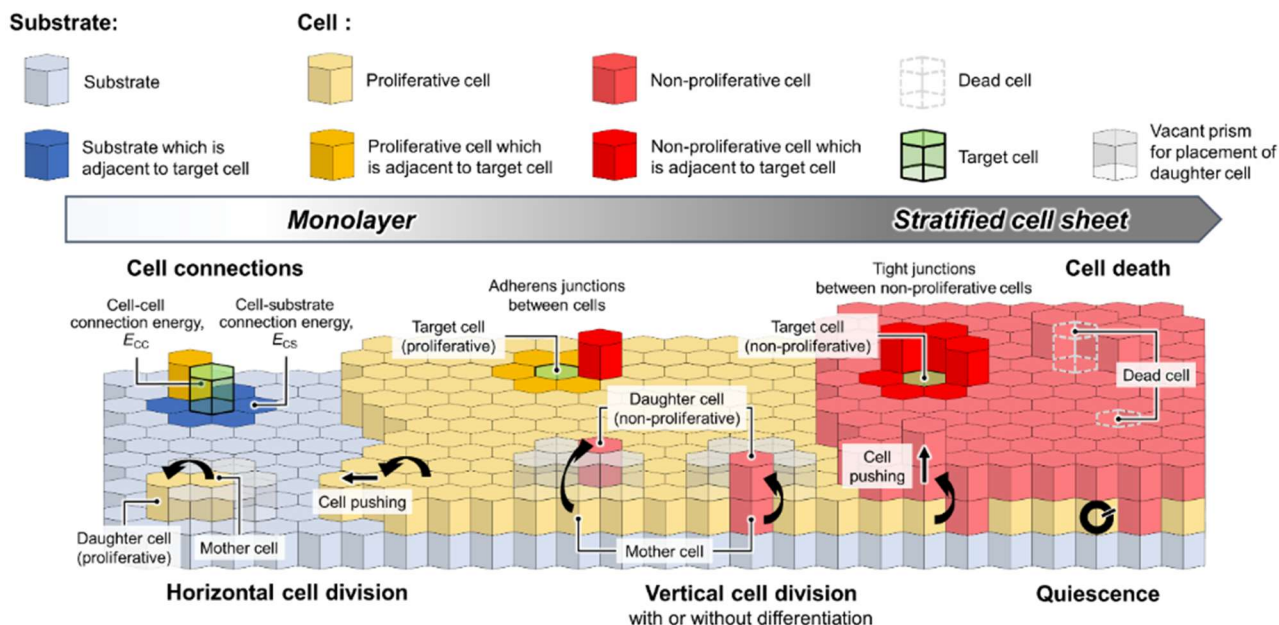


図 2.10 角膜上皮細胞の培養シミュレーションにおける細胞シート積層化の過程とその中の各細胞挙動の概念図

角膜上皮細胞の分化は、角膜上皮が持つ極性構造の恒常性に関与している (Yoon, 2014). さらに、これまでの研究において様々な研究者によって作成された角膜上皮細胞シートの構造は、培養条件によって角膜上皮の構造と異なっている (Ban, Cooper, et al., 2003b; González-Andrades et al., 2009). 一方で、角膜上皮細胞シートにおける角膜上皮細胞の分化過程を理解するためにはさらなる研究が必要である. 本研究では、増殖細胞と非増殖細胞が直ちに AJ を形成できること、増殖細胞から分化した非増殖細胞のみが AJ の維持時間に従って形成される TJ を形成できること、非増殖細胞が基質との結合を失ってから徐々に AJ や TJ の形成能力を失い、この能力がゼロになると細胞死が起こることを仮定して、細胞 - 細胞間の結合と細胞死のモデルを構築した. これらの仮定をすべて考慮したモデルは、角膜上皮細胞シートの培養における細胞流動性の経時変化を表現していた. これらの結果は、上皮層での一連の細胞分化の過程が、角膜上皮細胞シートの細胞流動性の経時変化のパターンをもたらすことを示唆している. さらにこの結果は、先行研究 (Miyashita et al., 2013) で示唆された、角膜上皮細胞シートの培養中においてもターンオーバーが起きているという仮説を支持するものである.

また本シミュレーションにおいて、基底層 p63 陽性細胞密度の計算値と実測値は概ね一致していた。一方で、総細胞密度は培養期間を通して、計算値が実測値よりも大きい傾向がみられた (図 2.9)。要因の 1 つとして、セルラーオートマトンモデルの特性からくる細胞形態の表現の制限が挙げられる。実際の培養では培養期間の後半 (day 9 以降) において基底層では細胞サイズの増加に伴う基底層細胞密度の減少が起きており、また基底上層に存在する分化細胞のサイズは、基底層に存在する幹細胞よりも大きい (Baba et al., 2020)。今回使用したモデルは格子モデルで細胞を 1 つの単位六角柱として表すため、細胞の大きさや形態の継時的変化を表現することが出来ない。そのため、今回の計算において格子 (1 細胞) のサイズ l_c を培養時間 day 6 - 15 における基底層の細胞密度の平均値から推定した値にしており、その値は計算期間を通して変化していない。これにより、基底上層の各層が細胞で占められるまでの時間が実際の培養と比較して遅くなったことで、総細胞密度について実測値よりも計算値が大きい傾向となったことが考えられる。またその他の要因として、総細胞密度の *in vitro* データの取得方法も考えられる。*In vitro* の総細胞密度の推定は Hoechst 染色により染色された細胞核をカウントすることで行ったが、染色操作中の表層の細胞の剥離や、細胞核をカウントする際に脱核した細胞が認識されていない可能性も考えられる。本研究の細胞死のモデルでは周囲との細胞-細胞間結合を失った細胞を計算空間から消すことで細胞死を表現しているが、細胞死に至るまでの脱核のプロセスは考慮していない。上記の要素が、総細胞密度について実測値よりも計算値が大きい傾向となった要因として考えられる。

2.6 小括

本章では，角膜上皮細胞の細胞挙動を表現するために，先行研究で構築されたモデルに加えて TJ の形成と細胞間結合の劣化，幹細胞の非対称分裂や増殖能の喪失を考慮した細胞挙動モデルを構築した．さらにモデルパラメータ値推定方法を構築し，角膜上皮細胞の挙動を表現するために必要なパラメータ値を推定した．その結果として，角膜上皮細胞の培養における細胞流動性の経時変化が 6 種類の細胞挙動（細胞 - 基質間結合・細胞 - 細胞間結合・細胞遊走・細胞分化・細胞分裂・細胞死）を考慮することで表現された．本章で提案したモデルパラメータ値推定方法の考え方は，実際の実験で求めることが技術的に難しいモデルパラメータ値を確度高く求めることに寄与すると考えられる．

第3章 角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性の経時変化の機構解明

3.1 緒言

細胞組織における細胞流動性の経時変化は、胚発生・創傷治癒・癌の転移などの生命現象に深く関わっている (Lenne & Trivedi, 2022; Park et al., 2016). 細胞流動性の高い相 (unjamming phase) から細胞流動性の低い相 (jamming phase) への転移は、jamming 転移あるいは unjamming-jamming 転移 (UJT) と呼ばれている (La Porta & Zapperi, 2020). これまでの研究から、UJT には細胞密度・細胞遊走性・細胞 - 細胞間接着の強さ、細胞膜に働く張力や細胞形態など様々な因子が関与していることが示唆されている (Bi et al., 2015, 2016; La Porta & Zapperi, 2020; Park et al., 2015). 一方で、jamming phase から unjamming phase へと転移し、細胞の流動性が高まる現象は jamming-unjamming 転移 (JUT) と呼ばれ、上皮間葉転換、細胞膜に働く張力やエンドサイトーシスとの関わりが示唆されている (La Porta & Zapperi, 2020; Malinverno et al., 2017; Oswald et al., 2017). 先行研究では、角膜上皮細胞から細胞シートを形成する培養において、細胞シート構造の形成に伴う UJT の後に JUT が観察された (Baba et al., 2020). またこの培養において、UJT は細胞の密度や真円度と関連していたことが示唆されている. 一方で JUT に関しては、*in vitro* の単層上皮細胞シートや *in vivo* の癌細胞組織で報告されている (Malinverno et al., 2017; Oswald et al., 2017). しかし、JUT の機構の理解のためにはさらなる研究が必要である.

本章では、エージェントベースモデルを用いて、角膜上皮細胞培養で観察される細胞流動性の経時変化の機構を明らかにすることを目的とした. エージェントベースモデルは、個々のエージェントの行動と複数のエージェント間の相互作用に基づく複雑な現象の機構を捉え、分析することが可能である. また、連続体モデルでは不可能である細胞組織の空間的不均質性を表現し、時空間的な解析を行うことが可能である. これらの特性を活かし、細胞状態の空間的マッピングやその中での着目する細胞のトラッキング、速度論的解析といった 1 細胞レベルの時空間的な解析を行った. 解析によって角膜上皮細胞シートの細胞流動性の経時変化の機構を可視化することで仮説を提案した. 最後に、生命現象の機構の可視化において重要となるエージェントベースモデルによるアプローチの手法やその意義について議論した.

3.2 実験方法

3.2.1 角膜上皮細胞の培養シミュレーション

角膜上皮細胞の培養時間 $t = 72 - 360$ h のシミュレーションは、第 2 章において Visual Studio 環境で C#言語により実装されたプログラムを用いて行われた。培養時間 $t = 72$ h において撮影された位相差画像を用い、計算を開始する時間 $t_{\text{start}} = 72$ h に増殖性細胞を基質面上に配置した。細胞の初期配置後、計算を終了する時間 $t_{\text{end}} = 360$ h までタイムステップ $t_{\text{step}} = 0.1$ h ごとに細胞挙動と重力沈降の計算を行った。計算は x, y 平面について周期境界条件が適用された $[X, Y, Z] = [221, 256, 32]$ の単位正六角柱の 3 次元配列で構成される計算空間 (培養面積 0.252 cm^2) で行われた。また、細胞特性に関するパラメータ値は第 2 章で推定されたものを使用した (表 3.1)。

表 3.1 モデルパラメータ値

モデルパラメータ	記号	単位	値
同一平面上における細胞単位六角柱の中心間距離	l_c	μm	22.7
平均世代時間	$\bar{t}_g$	h	15.8
非増殖性細胞に転換される確率	p_{dif}	-	4.6×10^{-2}
垂直方向への細胞分裂が起こるために細胞で占められる必要のある水平方向の領域の半径	N_v	layer	8
最大遊走エネルギーに対する 接着結合エネルギーの比率	$\varepsilon_{\text{AJ},0}$	-	0.09
最大遊走エネルギーに対する 細胞 - 基質間結合エネルギーの比率	$\varepsilon_{\text{cs},0}$	-	0.21
自由遊走速度	$V_{\text{m,free}}$	$\mu\text{m h}^{-1}$	90
最大遊走エネルギーに対する 密着結合エネルギーの比率	$\varepsilon_{\text{TJ},0}$	-	0.21
密着結合形成の時定数	τ_{TJ}	h	1.8
細胞-細胞間結合エネルギーの劣化速度定数	$k_{\text{d,cc}}$	h^{-1}	5.0×10^{-3}

3.2.2 モデル出力の解析

推定されたモデルパラメータ値を用いたシミュレーションによるモデル出力を用いて、遊走可能、非遊走可能状態間の細胞状態遷移、細胞状態遷移速度、細胞 - 細胞間結合エネルギーについて解析を行った。モデル出力の解析と可視化は、Visual Studio 環境で C# 言語で実装されたプログラムを使って行われた。

3.2.2.1 遊走可能、非遊走可能状態間の細胞状態遷移の解析

遊走可能、非遊走可能状態間の細胞状態遷移について解析を行うために、シミュレーションにおける細胞状態遷移を定義するルール (図 3.1) と、解析のためのアルゴリズムを構築した (図 3.2)。計算時間 t において、増殖細胞の細胞分裂によって計算空間内に生成された細胞は、すべて分類 $C(t)=1$ (遊走可能状態) に分類される。各タイムステップにおいて、細胞遊走に必要なエネルギーの最小値 ($E_{B,min}$) の細胞遊走に使用可能なエネルギーの最大値 (E_{max}) に対する比率 ($\varepsilon_{B,min} = E_{B,min}/E_{max}$) が細胞ごとに計算される。ある細胞が $\varepsilon_{B,min} \geq 1.00$ となった場合、その細胞の分類は $C(t)=0$ (非遊走可能状態) となる。一方で、 $C(t)=1$ の細胞は $\varepsilon_{B,min} \geq 1.00$ となる前に遊走すると、その細胞の分類は $C(t)=2$ (遊走可能状態) となる。ここで $E_{B,min}$ は、細胞がある遊走方向 (dir) に遊走する際に、結合を切断するために必要なエネルギーである $E_{B,dir}$ を、遊走する可能性のあるすべての方向についてそれぞれ計算された値の最小値である ($E_{B,dir}$ 算出方法の詳細は細胞遊走に関するルール (2.3.1.5) に記載)。 $C(t)=0$ (非遊走可能状態) の細胞が遊走可能状態となるパターンは、細胞 - 細胞間結合の劣化によるものと着目する細胞の周囲の細胞の細胞遊走によるもの (chain migration) の 2 種類存在する。 $C(t)=0$ の細胞の $\varepsilon_{B,min}$ が細胞 - 細胞間結合の劣化によって $\varepsilon_{B,min} < 1.00$ となった場合、その細胞の分類は $C(t)=3$ (非遊走可能状態) となり、その後遊走することで $C(t)=4$ (遊走可能状態) となる。細胞 - 細胞間結合の劣化によって $\varepsilon_{B,min} < 1.00$ となったタイムステップ内で細胞が遊走した場合、細胞の分類は $C(t)=0$ (非遊走可能状態) から $C(t)=4$ (遊走可能状態) に変化する。一方で、chain migration によって $\varepsilon_{B,min} < 1.00$ となった場合、その細胞の分類は $C(t)=5$ (非遊走可能状態) となり、その後遊走することで $C(t)=6$ (遊走可能状態) となる。chain migration によって $\varepsilon_{B,min} < 1.00$ となっ

たタイムステップ内で細胞が遊走した場合，細胞の分類は $C(t) = 0$ (非遊走可能状態) から $C(t) = 6$ (遊走可能状態) に変化する．細胞は $\varepsilon_{B,\min} \geq 1.00$ となった場合，その前のタイムステップにおける分類にかかわらず，細胞分類が $C(t) = 0$ (非遊走可能状態) に変化する．

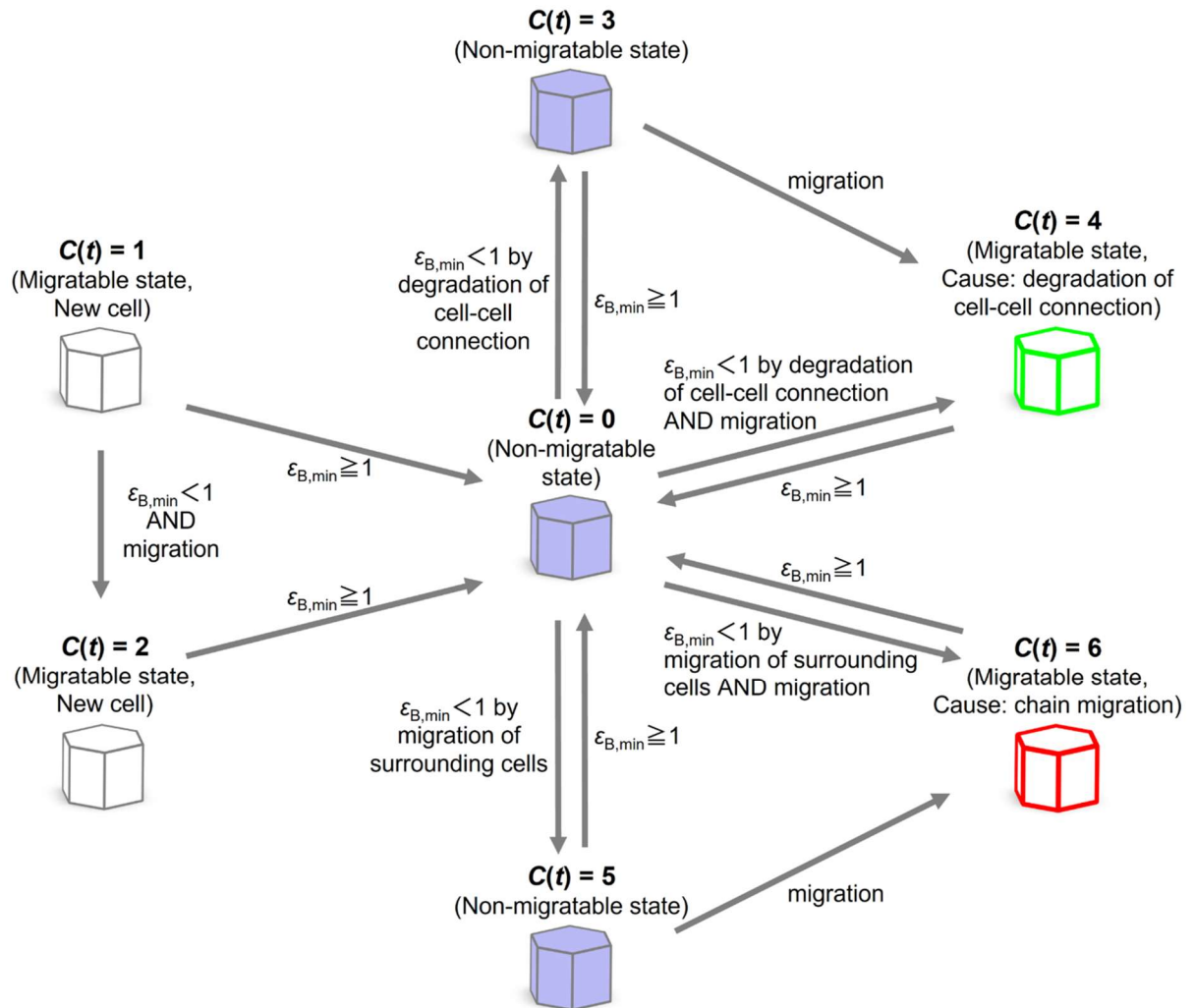


図 3.1 細胞状態遷移図.

3.2.2.2 細胞状態遷移速度の解析

角膜上皮細胞シートにおける遊走可能, 非遊走可能状態間の細胞状態遷移について考察するために, 1 細胞レベルの細胞状態遷移の解析から細胞状態遷移速度を算出した. 細胞状態遷移速度はタイムステップ毎に計算された. 遊走可能状態から非遊走可能状態への細胞状態遷移の見かけの速度 ($k_{n,app}$) は着目する領域における, 総細胞数 (n_c) と非遊走可能状態の細胞数 ($n_{n,state}$) を用いて下式より算出された.

$$k_{n,app} = \frac{1}{n_c} \cdot \frac{dn_{n,state}}{dt} \quad (29)$$

さらに, 遊走可能状態から非遊走可能状態への細胞状態遷移速度 (k_n) に加えて, 非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移速度 (k_m) については, 細胞 - 細胞間結合の劣化による非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移速度 ($k_{m,deg}$) と, chain migration による非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移速度 ($k_{m,chain}$) が式 (30 - 32) によってそれぞれ算出された.

$$k_n = \frac{n_n}{t_{step} \cdot n_c} \quad (30)$$

$$k_{m,deg} = \frac{n_{m,deg}}{t_{step} \cdot n_c} \quad (31)$$

$$k_{m,chain} = \frac{n_{m,chain}}{t_{step} \cdot n_c} \quad (32)$$

ここで用いられた, 遊走可能状態から非遊走可能状態への細胞状態遷移を起こした細胞数 (n_n), 細胞 - 細胞間結合の劣化によって非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移を起こした細胞数 ($n_{m,deg}$), chain migration によって非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移を起こした細胞数 ($n_{m,chain}$) はそれぞれ, 遊走可能, 非遊走可能状態間の細胞状態遷移の解析 (図 3.2) においてカウントされた.

3.2.2.3 細胞 - 細胞間結合エネルギーの解析

各細胞の最大遊走エネルギーに対する細胞 - 細胞間結合のエネルギーの和の割合 ($\varepsilon_{cc,total}$) は, すべての隣接する単位格子 (方向数: N_{nn}) について, ある方向 (d) に存在する細胞との間に形成している細胞 - 細胞間結合のエネルギー ($E_{cc,d}$) を計算した値を用いて算出された.

$$\varepsilon_{cc,total} = \sum_{d=0}^{N_{nn}-1} \frac{E_{cc,d}}{E_{max}} \quad (33)$$

3.3 結果

3.3.1 角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性の変化

推定されたパラメータ値を用いたシミュレーション結果について、着目する領域における非遊走可能状態の細胞率 R_n を算出した。各 (x, y) および (y, z) 座標における R_n をヒートマップに示した (図 3.3A)。コンフルエントに達する前 ($t = 100.0$ h) では、すべての (y, z) 座標で R_n が低く、コロニーの中心部で非遊走可能状態の細胞が存在した (図 3.3A (a, a1))。 $t = 150.0$ h では、 R_n は大部分の (x, y) 座標で増加していたが、 $t = 100$ h でコロニーが存在しなかった領域では比較的低かった (図 3.3A (b))。一方で yz 平面では、 R_n は基底層から第 4 層まで増加したが、表層では低いままであった (図 3.3A (b1))。 $t = 200.0$ h では、 R_n は (x, y) 座標の大部分と (y, z) 座標の基底層から第 3 層まで高い状態であったが、表層では低かった (図 3.3A (c, c1))。その後、 R_n は $t = 250.0$ h に高い R_n を持つ細胞からなる島状の構造を残して xy 平面全体で減少した (図 3.3A (d))。 R_n が低い細胞の領域は表層から基底上層で拡大し、 R_n は表層に向かって低くなる傾向があった (図 3.3A (d1))。その後、 R_n は大部分の (x, y) 座標で再び増加した (図 3.3A (e))。また yz 平面では、 $t = 300.0$ h における第 2 層と第 3 層の R_n は $t = 250.0$ h よりも高かった (図 3.3A (e1))。 $t = 350.0$ h では、 xy 平面で $t = 250.0$ h で見られた高い R_n を持つ細胞からなる島状の構造が再び見られた。また yz 平面における R_n の分布は $t = 3000.0$ h と比較して、第 2-3 層で低くなっていた (図 3.3A (f, f1))。さらに各層の R_n の経時変化の解析を行った (図 3.3B)。基底層の R_n は $t = 78.4$ h の 0.00 から $t = 191.6$ h の 0.995 まで増加し、その後 0.9-1 の間で振動していた。第 2 層と第 3 層は同様の傾向を示し、それぞれ $t = 185.8$ h と $t = 186.7$ h にそれぞれ 0.978 と 0.961 の最大値に達した後、減少していた。その後、 R_n は振動し、第 2 層と第 3 層ではそれぞれ 0.60 付近に収束する傾向がみられた。第 4 層では、 R_n は $t = 175.7$ h で 0.505 の最大値に達した後、 $t = 241.9$ h で 0.028 まで減少し、0 に振動しながら収束する傾向があった。第 5 層以上では、 R_n は計算中 0.02 未満であった。

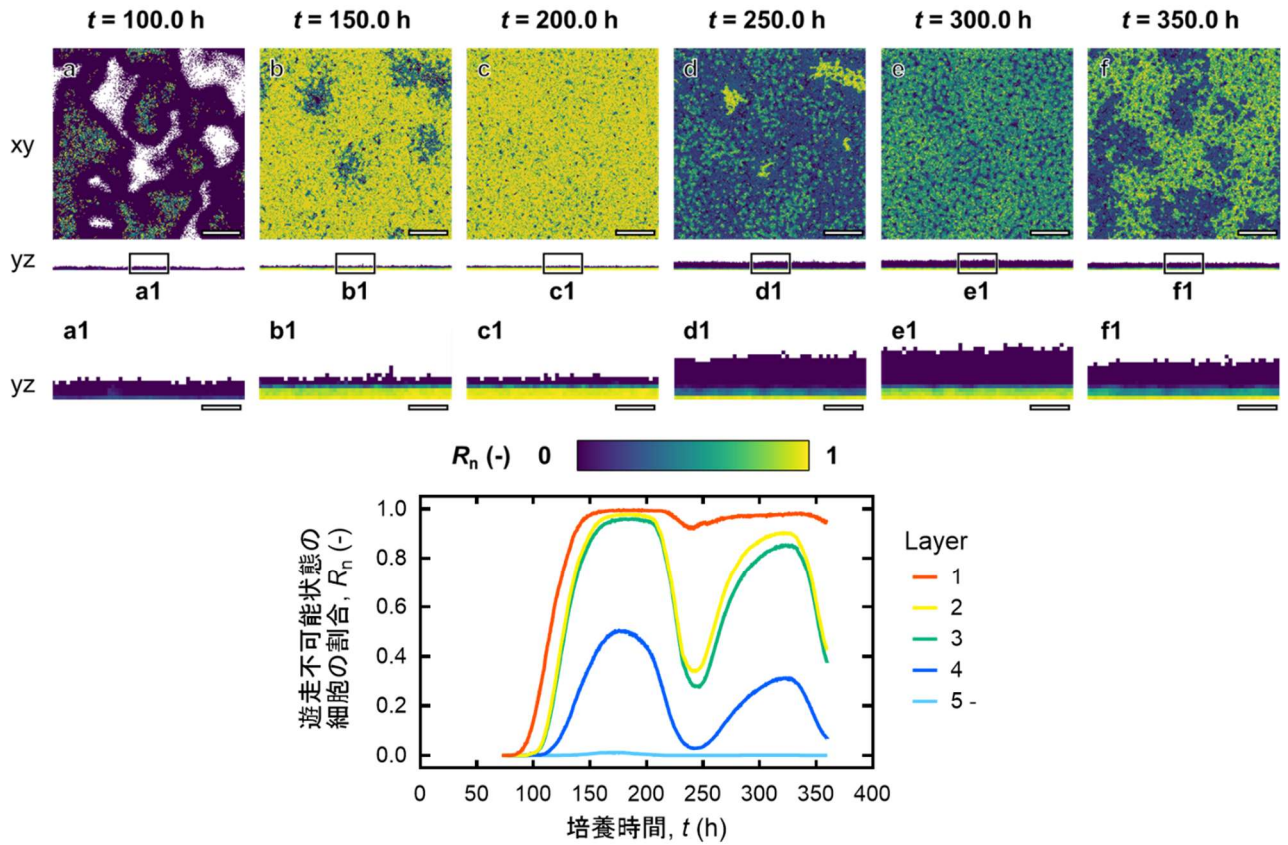


図 3.3 細胞シート内の着目する領域における非遊走可能状態の細胞率 (R_n) の経時変化.
 (A) 各 (x, y) および (y, z) 座標における R_n のヒートマップ. $a1-f1$ は $a-f$ に示す yz 平面内の黒四角で囲われた領域の拡大図である. $a-f$ のスケールバー: 2 mm, $a1-f1$ のスケールバー: 200 μm . (B) 各層における R_n の経時変化.

3.3.2 細胞状態遷移の速度論的解析

細胞シート内の細胞流動性の変化時における機構を明らかにするために、遊走可能、非遊走可能状態間の遷移について 1 細胞レベルの解析を行い、状態遷移速度の 1 時間の単純移動平均を図 3.4 に示した。基底層における遊走可能状態から非遊走可能状態への見かけの細胞状態遷移速度 $k_{n,app}$ は、 $t = 110.4 \text{ h}$ に $0.42 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ の最大値に達した後減少し、0 付近で振動していた。一方で基底層上層では、 $k_{n,app}$ は $t = 127.2 \text{ h}$ に $0.35 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ の最大値に達した後、 $t = 225.8 \text{ h}$ に最小値 $-0.28 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ に減少し、その後振動して 0 に収束していく傾向がみられた (図 3.4A)。さらに角膜上皮細胞シートにおける遊走可能、非遊走可能状態間の細胞状態遷移を理解するために、遊走可能状態から非遊走可能状態への細胞状態遷移速度に加えて、非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移速度について細胞 - 細胞間結合の劣化によるものおよび chain migration によるもの (それぞれ k_n , $k_{m,deg}$, $k_{m,chain}$; 図 3.4B) をそれぞれ算出した。いずれの状態遷移速度も基底層より基底上層で低く、また異なる経時変化を示していた。基底層上層について詳細に解析すると、 k_n は $t = 127.2 \text{ h}$ に $0.39 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ に達した後に $t = 254.3 \text{ h}$ に $0.11 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ に達し、振動しながら減衰していく傾向が見られた。また、 $k_{m,chain}$ には 3 つのピークが観察されることが示された。最初のピークは $t = 123.1 \text{ h}$ の $0.05 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ で、 k_n の最初のピークとほぼ同時刻であった。その後、 k_n よりも早く値が増加し、 k_n の極大値よりも大きな値 ($t = 225.5, t = 349.0 \text{ h}$ でそれぞれ $0.31 \times 10^{-2}, 0.20 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$) で極大値となった。 $k_{m,deg}$ は $t = 115.1 \text{ h}$ 以降に出現し、 $t = 215.3 \text{ h}$ で $0.003 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ の最大値に達した後減少し、0 付近で振動していた (図 3.4B(a))。基底層では、 k_n は $t = 117.6, 240.7 \text{ h}$ にそれぞれ $2.42 \times 10^{-2}, 2.66 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ の 2 つのピークが見られ、 k_n はピークの間に $0.10 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ 未満まで低下していた。 $k_{m,chain}$ のピークも k_n のピークとほぼ同じ時刻 $t = 119.2, 240.7 \text{ h}$ にみられ、それぞれ $1.75 \times 10^{-2}, 2.27 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ と k_n のピークと比較して小さい値であった。また、 $k_{m,deg}$ についてもほぼ同じ時刻 $t = 120.2, 242.8 \text{ h}$ にそれぞれ $0.37 \times 10^{-2}, 0.40 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ の 2 つのピークが見られた (図 3.4B(b))。

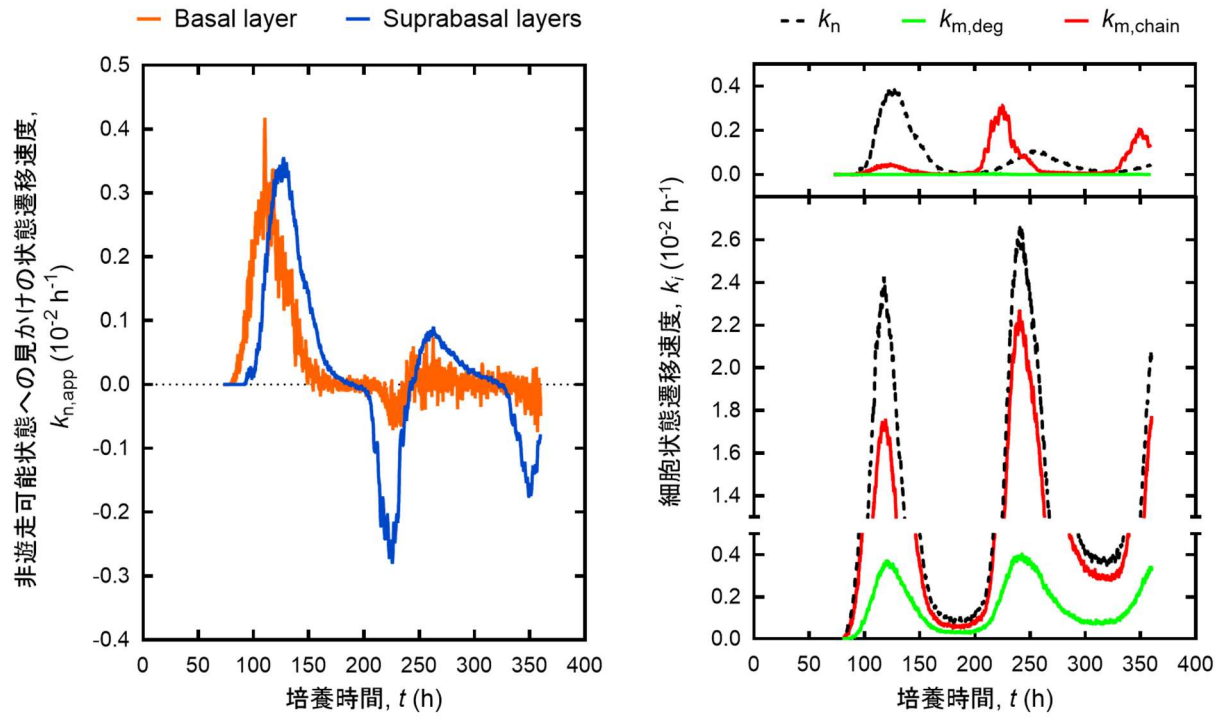


図 3.4 細胞シートにおける細胞状態遷移速度の 1 時間の単純移動平均. (A) 細胞シートの基底層と基底上層における遊走可能状態から非遊走可能状態への見かけの細胞状態遷移速度 ($k_{n,app}$) の経時変化. (B) 細胞シートの基底層 (a) と基底上層 (b) における状態遷移速度 k_i ($i = n; m,deg; m,chain$) の経時変化.

3.3.3 細胞流動性変化における chain migration と細胞シート構造の変化

非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移を単一細胞レベルで解析した結果、細胞の遊走後にその周囲の細胞が連鎖的に遊走する chain migration が、細胞流動性が低い状態から高い状態の変化時に起きていることが明らかになった。細胞シート内の細胞の状態、最大遊走エネルギーに対する細胞 - 細胞間結合のエネルギーの和の割合 $\varepsilon_{CC, total}$ 、および積層数の時間変化を図 3.5 に示した。着目した領域において、chain migration による非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移を起こした細胞の領域拡大は、複数カ所で発生した chain migration から起きていた。 $t = 205.0$ h では、非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移を起こした細胞はまばらに分布しており、遊走可能状態の細胞の領域で $\varepsilon_{CC, total}$ が低かった (図 3.5B (a1, b1))。また積層数を見ると、第 3 層までほぼ細胞で占められており、第 4 層以上の細胞は島状の構造を形成、またはまばらに分布していた (図 3.5B (c1))。その後、 $t = 210.0$ h 以降において $\varepsilon_{CC, total}$ が比較的低かった領域で非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移が起きた細胞の拡大領域が経時的に観察されたが、一方で $\varepsilon_{CC, total}$ が高かった細胞の領域では非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移が起きた細胞の領域は拡大しなかった (図 3.5B (a2-a4, b2-b4))。非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移が起きた細胞の領域では、細胞状態遷移よりも遅れて細胞シートの不均一な積層化が観察された (図 3.5B (c2-c4))。

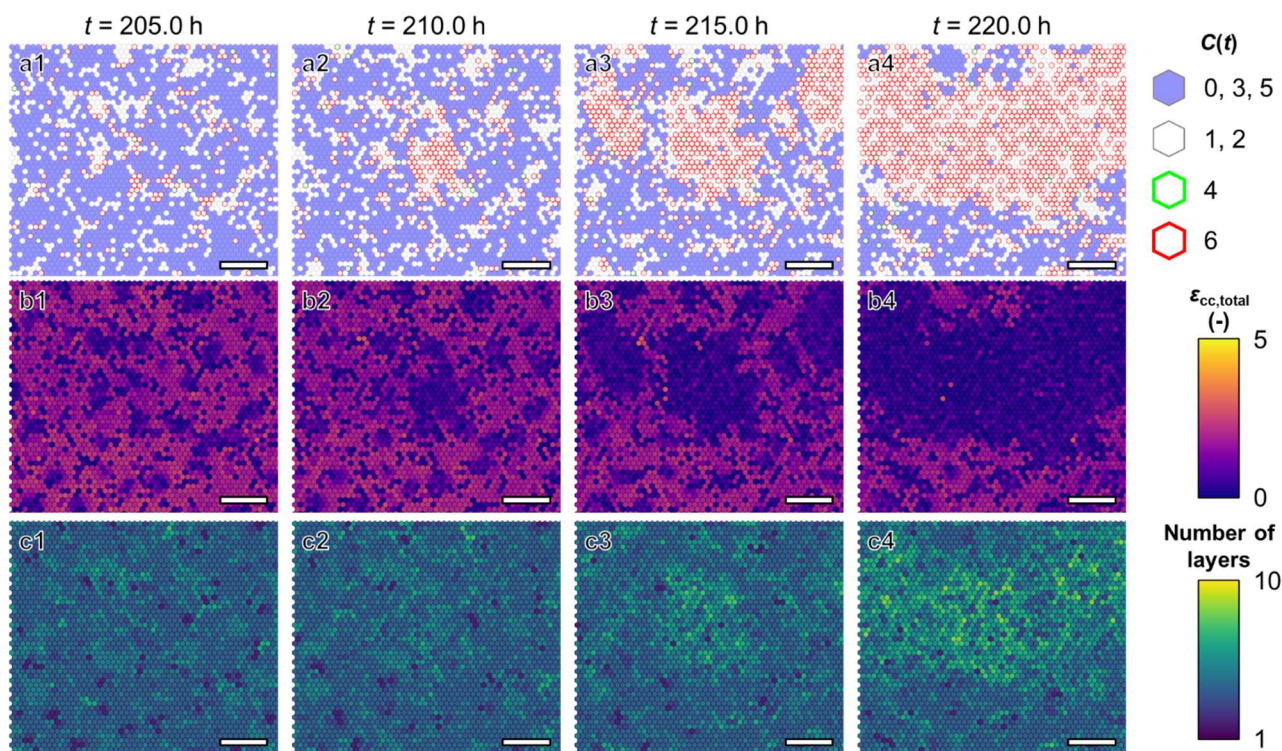


図 3.5 細胞流動性変化における細胞シート内の細胞状態, $\varepsilon_{CC,total}$, 積層数の時空間解析. 細胞流動性が低い状態から高い状態の変化時における細胞シート内の細胞状態 (a1-a4), $\varepsilon_{CC,total}$ (b1-b4), 積層数 (c1-c4) の時間依存的変化の上面図. スケールバー : 200 μm .

3.4 考察

3.4.1 角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性変化の機構

本研究では、周囲の細胞との細胞 - 細胞間結合によって遊走可能状態・非遊走可能状態を区別し、角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性変化の可視化を行った。その後、単一細胞レベルでの時空間解析を行うことで、角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性変化の各細胞の挙動を明らかにした。結果として、遊走可能状態から非遊走可能状態への細胞状態の遷移は基底層から表層へと細胞シート構造の積層化と細胞 - 細胞間結合の形成を伴いながら進行することが示唆された。また、非遊走可能状態から遊走可能状態への遷移は基底上層の細胞が細胞間結合を形成する能力が低下することによって引き起こされ、周囲の細胞の連鎖的な細胞遊走 (**chain migration**) を誘発することが示唆された。これらの結果より、細胞シート内に形成されている細胞 - 細胞間結合の強さは細胞シートにおける細胞流動性の変化を支配する因子であることが示唆された。一方で、本研究で使用したモデルの特性として、細胞遊走が連続的な挙動ではなくイベントの頻度で表されることが挙げられる。そのため、協調的な集団遊走において 1 細胞の遊走が周囲の細胞の遊走に与える力学的な影響は表現されず、細胞シート全体の流動性は細胞シート内の細胞遊走速度の平均値で表されている。また、角膜上皮細胞の実際の培養では、細胞は周囲から伝わる力と周囲の細胞との間に形成されている細胞-細胞間結合により、細胞集団の協調的な遊走がみられる (Baba et al., 2020)。これらのことから、細胞-細胞間結合の強さは細胞流動性を支配する因子の 1 つであり、その他因子と協調的に作用していると考えられる。

また、非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移が起きた後には、平均移動速度の計算値が振動していることが観察された。この間細胞シート内では、それぞれ細胞 - 細胞間結合の形成による遊走可能状態から非遊走可能状態への遷移と **chain migration** による非遊走可能状態から遊走可能状態への遷移が繰り返し発生していた。この現象は、非遊走可能状態から遊走可能状態への遷移に伴う基底層での細胞分裂の増加と細胞シートの積層化、遊走可能状態から非遊走可能状態への遷移に伴う基底層での細胞分裂の減少と基底層上層での細胞死の増加の繰り返しに関連していると考えられる。

3.4.2 角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性変化を支配する因子

細胞-細胞間結合と細胞密度の変化によって細胞流動性が制御されることが、*in vitro* と *in vivo* の実験から示唆されている (Ilina et al., 2020). また先行研究から、角膜上皮細胞シートにおける UJT において、その他の細胞種での報告と同様に、細胞密度や細胞の真円度が関係していると考えている (Baba et al., 2020). 加えて本研究の結果から、角膜上皮細胞シートの積層化に伴う、基底上層に存在する密着結合を形成する能力を持つ細胞同士の強い細胞-細胞間結合の形成が UJT に寄与していることが示唆された. これまで、複数の JUT に関する *in silico* 研究が行われており、細胞張力と細胞間接着が細胞形状を決定する vertex model を用いた計算により、JUT は強い細胞間相互作用によって引き起こされることが示唆されている (Bi et al., 2015; Malinverno et al., 2017). 本研究では、基底層上部における chain migration が細胞間の結合を切断することによって JUT を促進することが示唆された. 本研究で得られた仮説は、細胞密度と細胞 - 細胞間結合の変化により細胞集団の流動性が変化するという、先行研究 (Ilina et al., 2020; Mitchel et al., 2020) で主張されている仮説と矛盾しないものであるといえる. すなわち、細胞間結合は周囲の細胞からの力を効率よく伝えることで細胞集団の流動性の向上に寄与しているが、強すぎる場合には細胞遊走に必要な細胞間結合の再形成ができなくなり、jamming phase への移行につながることを示唆された.

3.4.3 角膜上皮細胞シートの細胞流動性変化における chain migration

本研究で角膜上皮細胞シートの JUT への寄与が示唆された chain migration は、神経堤細胞、筋芽細胞、がん細胞からなる系で報告されており、特に胚発生期の神経堤細胞で多くの報告がなされている (Friedl & Wolf, 2003; Theveneau & Mayor, 2012). この挙動は、細胞から分泌される化学物質の濃度勾配と contact inhibition of locomotion (CIL : 接触による移動阻害) に基づいているとされている. これらのメカニズムはいずれも移動する細胞に共通しており、胚発生におけるパターンの形成や癌の浸潤など、多くの細胞組織の形態形成過程に関与していると考えられている (Szabó & Mayor, 2015). また CIL の元来の定義は、細胞同士の接触が細胞移動の停止や方向転換をもたらすというものであるが、細胞集団における細胞移動についても重要な役割を担っている (Mayor & Carmona-Fontaine, 2010). 本研究

の結果は、細胞シート基底上層における連続的な細胞分化過程に伴う、細胞 - 細胞間結合の劣化により CIL を失った細胞がリーダー細胞となって遊走し、その後周囲の細胞で CIL の喪失と遊走が連鎖的に起きていく **chain migration** のメカニズムが角膜上皮細胞シートの JUT に関与していることを示唆した。

3.4.4 エージェントベースモデルの特性を活かした現象の可視化

エージェントベースモデルを用いたアプローチは、**chain migration** を含む細胞の集団遊走のメカニズムを理解するために使用されている (Schumacher et al., 2016). これまで、神経堤細胞の **chain migration** の機構について、セルラーオートマトンモデルを用いた 2 次元シミュレーションを用いて、リーダー細胞がフォロワー細胞との細胞間結合を維持しながら遊走することが、細胞集団の協調的な遊走につながることを示唆された (Wynn et al., 2012). 我々のモデルも含め、セルラーオートマトンモデルは、その離散的な特徴から細胞の状態や行動の変化の始まりを捉えることができる。一方でこのモデルでは、時間依存的な細胞形態の変化や、遊走する細胞が周囲に及ぼす力 (集団遊走につながる力) を表現することに限界が存在する。そのため、力学的特性や細胞から分泌される化学物質の濃度勾配の集団移動への寄与を考慮するための新たなアプローチも必要である。近年、細胞を細胞の形態変化を表現可能な **off-lattice** モデルを用いたエージェントベースで表現し、空間における化学物質の濃度勾配を偏微分方程式で表現するハイブリッド計算モデルが、細胞集団の移動方向制御に対する CIL と細胞から分泌される化学物質の濃度勾配の影響を明らかにするために実施された (McLennan et al., 2015). したがって、これらの知見や本アプローチを用いた我々の研究は、エージェントベースアプローチを用いたさらなる研究により、細胞の分化・形態・サイズなどの細胞の状態の時間依存的変化が細胞集団の挙動に及ぼす影響を調べることで、細胞集団の挙動を制御するメカニズムを明らかにすることができることを示している。また、細胞組織の空間的不均一性を考慮したアプローチや単一細胞レベルでの解析により、細胞の挙動変化の発現を捉え、その創発現象を誘発する要因を明らかにできると考えられる。

3.5 小括

本章ではエージェントベースモデルを使用し，角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性の経時変化のトリガーとなった細胞の状態，挙動と周囲の細胞の状態，挙動に与えた影響について，1細胞レベルの時空間的解析を行った．結果として，JUTは細胞シートの基底上層における細胞 - 細胞間結合の劣化により始まり，周囲の細胞遊走が連鎖的に誘発される現象である **chain migration** によって促進されているという仮説が示唆された．エージェントベースモデルの特性の1つである1細胞レベルの経時的な解析は，単細胞レベルの細胞挙動や周辺の細胞との細胞間相互作用が複雑にかかわりあう中で創発してくる生命現象の始まりをとらえて理解するのに大きな力を発揮すると考えられる．

第4章 総括と今後の展望

4.1 本研究の総括

本研究では、エージェントベースモデルのモデルパラメータ値の推定方法を構築したうえで角膜上皮細胞シートが培養を通して形成される過程において生じる現象を表現することで、培養プロセスにおける細胞集団の挙動の理解に寄与することを目的とした。

第2章では、角膜上皮細胞の挙動をモデル化する上で、細胞 - 基質間結合、細胞 - 細胞間結合、細胞遊走、細胞分裂、上皮細胞分化、細胞死の6つの細胞挙動を考慮した。細胞 - 基質間結合、細胞 - 細胞間結合、細胞遊走、細胞分裂については先行研究では考慮されていなかった要素 (密着結合の形成、細胞 - 細胞間結合の劣化、非対称分裂) を考慮したモデルを追加した。また、上皮細胞分化、細胞死に関しては新たに数理モデルを構築した。また、複数の細胞挙動の表現に必要なモデルパラメータ値の推定方法の考え方を提案した。実際に推定したモデルパラメータ値を使用して構築したモデルに従う自律的な細胞挙動をシミュレーションすることにより、角膜上皮細胞の培養における細胞流動性変化が表現されることを示した。

第3章では、角膜上皮細胞シートの培養における細胞流動性の経時変化の機構を解釈するために、培養において細胞流動性の変化が見られた検体に着目し、1細胞レベルの細胞状態変化について速度論的解析や時空間的な解析を行った。結果として、流動停止状態からの流動の再開が基底上層における細胞 - 細胞間結合の劣化によって始まり、さらに周囲の細胞の遊走 (chain migration) が誘発されることで細胞挙動の変化が伝播していることが示唆された。

本研究で示した複雑な現象を表現するために必要な多数のモデルパラメータ値推定方法の考え方と、エージェントベースモデルを用いた1細胞レベルの時空間的解析のアプローチは、着目する生命現象を構成する細胞の自律的な挙動や、周囲の細胞・環境との相互作用を明らかにすることで、複雑な生命現象の機構解明に今後資するものであると考えられる。

第一章：エージェントベースモデルを用いた細胞集団の挙動を理解するためのアプローチ

“Wet” experiments

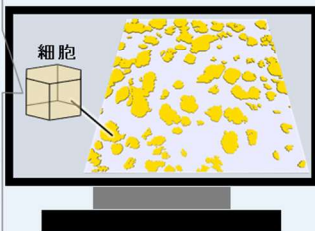
- 生物学的知見の獲得：角膜上皮細胞の積層化の過程で細胞流動性の変化が起こる。
- Research questionの抽出：角膜上皮細胞の流動性の変化と形成される細胞シートの質との関係



“Dry” experiments

第二章：角膜上皮細胞の細胞挙動モデルとパラメータ値算出方法の構築

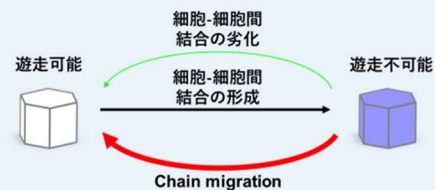
細胞挙動モデルとモデルパラメータ値算出方法の構築
「角膜上皮細胞の挙動を表現」



第三章：角膜上皮細胞シートにおける細胞流動性の経時変化の機構説明

1細胞レベルの細胞挙動の時空間的解析による仮説の生成
「Chain migrationの伝播による流動性増加に伴い細胞-細胞間結合が劣化する」

細胞流動性増加における細胞状態遷移



細胞集団の挙動の理解

図 4.1 エージェントベースモデルを用いた角膜上皮細胞シートにおける細胞集団の挙動を理解するためのアプローチの概念図

4.2 今後の展望：細胞製造プロセスに対するシステムバイオテクノロジー的アプローチ

4.2.1 細胞挙動シミュレータによる細胞培養プロセスの理解

近年の再生医療技術の発展に伴い、治療に使用可能な安定した品質の細胞や組織の供給が求められている。1つのアプローチとして、数理モデルによる生物学的現象の理解を通じた再生医療製品の製造工程や治療の最適化による研究速度の加速が期待されている (Waters et al., 2021)。再生医療製品の製造工程は、生きた細胞 (組織) が最終製品となることから、微生物を用いた抗生物質や核酸などの生産や、動物細胞を用いた抗体などの生産と比較して多くの要素の変動を考慮する必要がある (Kino-oka et al., 2019)。細胞培養による細胞数の増幅をはじめとする再生医療製品の製造における上流工程を対象とした先行研究では、常微分方程式で細胞増殖や培地中の代謝物濃度の変化を表現したモデルを用いて、重要工程パラメータの変動が重要品質特性に与える影響を評価する手法を提案し、間葉系幹細胞の培養に適用した例が報告されている (Hirono et al., 2022)。このような常微分方程式を用いて現象を記述したモデルでは、培養中の細胞挙動による揺らぎを確率変数として与えることで出力の変動を表現することが可能である。一方で、細胞挙動による揺らぎを表現する確率変数の値をどのように変化させうるかを理解することは難しい。エージェントベースモデルを用いた1細胞レベルの細胞挙動シミュレーションにより、細胞培養プロセスにおいて空間的・質的不均一な細胞組織や細胞集団が生じる過程を捉え、それらの生物学的機構の理解を通じてプロセスの改善に貢献していくことが可能であると考えられる。

4.2.2 培養操作を考慮したモジュール群の実装による細胞製造プロセス全体の表現

本研究では、培養容器内の細胞群の挙動を表現するために必要な細胞挙動モジュール群と環境モジュール群を実装したシミュレーションが、細胞培養プロセスの理解に貢献可能であることを示した。また細胞製造プロセスの全体を表現するためには、系への入力として細胞特性や原材料特性を表現可能な細胞挙動モジュール群と環境モジュール群に加えて作業特性を表現可能な培養操作モジュール群を実装する必要がある。播種・継代・培地交換・試薬添加等の培養操作モジュール群の実装により、各培養操作のパラメータが細胞製造プロセスの出力に与える影響を理解することが可能となると考えられる。さらに、自家細胞移植では原材料となる細胞の質が患者あるいはドナーの状態により異なり、さらに細胞数の増幅や分化を目的とした培養工程中にさらに細胞集団の不均一性が変化する(Kino-oka et al., 2019)。細胞製造プロセスで最終的に作製される製品の品質にばらつきが生じてしまうという課題が存在する。そのため、原料として採取された細胞の質のばらつきが、培養プロセスにおいてどのように製品である細胞（組織）の質のばらつきを生じさせているのかを理解することは、細胞製造プロセスの改善に重要であると考えられる。

4.2.3 シミュレーションデータの解析による細胞製造プロセス最適化

細胞製造プロセスにおける細胞・細胞組織状態の経時変化を理解することで、既存の培養操作の変更や試薬の添加といった新たなプロセスパラメータの追加による最適化に貢献することが可能となると考えられる。また、既存のプロセスパラメータの最適化に関しては、感度解析を用いて細胞製造プロセスの出力である製品のプロファイルに影響を与えるプロセスパラメータ (Critical Process Parameter: CPP) を特定し、そのパラメータを変化させたシミュレーションを通して最適化を行うことが可能となると考えられる。

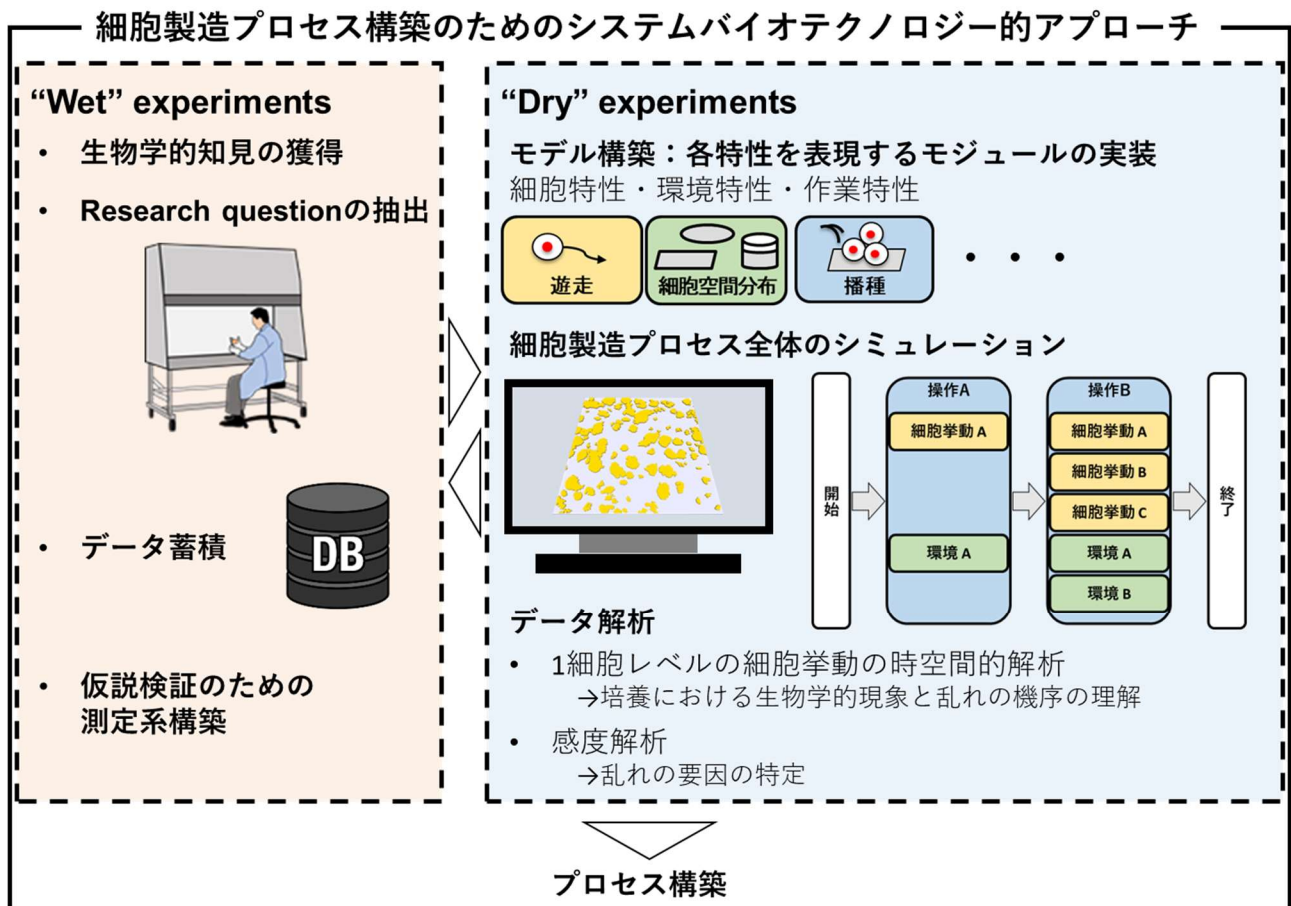


図 4.2 細胞製造プロセス構築のためのシステムバイオテクノロジー的アプローチの概念図

略語リスト

AJ	adherence junction
CIL	contact inhibition of locomotion
JUT	jamming-unjamming transition
PIV	particle image velocimetry
TJ	tight junction
UJT	unjamming-jamming transition

記号表 (Nomenclature)

入力パラメータ (Parameters)

記号	定義	単位
$k_{d,cc}$	細胞-細胞間結合エネルギーの劣化速度定数	h^{-1}
l_c	同一平面上における細胞単位六角柱の中心間距離	μm
m_c	細胞の質量	ng
N_v	垂直方向への細胞分裂が起こるために細胞で占められる必要のある 水平方向の領域の半径	layer
p_{dif}	非増殖性細胞に転換される確率	-
t_{end}	計算を終了する時間	h
$\bar{t}_g$	平均世代時間	h
t_{ref}	細胞の移動速度を正規化するための基準時間	h
t_{start}	計算を開始する時間	h
t_{step}	シミュレーションのタイムステップ	h
$V_{m,free}$	自由遊走速度	$\mu m h^{-1}$
X	X 軸方向の計算空間を構成する配列の大きさ	prism
Y	Y 軸方向の計算空間を構成する配列の大きさ	prism
Z	Z 軸方向の計算空間を構成する配列の大きさ	prism
Δt	細胞の移動速度を解析する時間	h
$\varepsilon_{AJ,0}$	最大遊走エネルギーに対する接着結合エネルギーの比率	-
$\varepsilon_{CS,0}$	最大遊走エネルギーに対する細胞-基質間結合エネルギーの比率	-
$\varepsilon_{TJ,0}$	最大遊走エネルギーに対する密着結合エネルギーの比率	-
τ_{TJ}	密着結合形成の時定数	h

変数 (Variables)

記号	定義	単位
c	cell index	-
$C(t)$	計算時間 t における細胞の状態の分類	-
d	細胞から見た方向 ($d = 0 - 19$) を指定する整数値	-
$\tilde{d}$	d と反対方向を指定する整数値	-
D_f	最終的な有効桁数	-
dir	遊走方向を指定する整数値 ($dir = 0 - 19$)	-
$\tilde{dir}$	dir と反対方向を指定する整数値	-
E_A	細胞 c が遊走前に形成している結合エネルギーの総和	-
E_{AJ}	接着結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{AJ,0}$	細胞の年齢が 0 h の時の接着結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{AJ,c}$	細胞 c の接着結合のために使用可能なエネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{AJ,c,d}$	遊走前の細胞 c から見て方向 d に隣接する細胞との接着結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{B,dir}$	dir 方向に遊走するために減少する結合エネルギーの総和	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{B,min}$	細胞遊走に必要なエネルギーの最小値	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
E_{CC}	細胞 - 細胞間結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{CC,d}$	方向 d に隣接する細胞との間の細胞 - 細胞間結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
E_{CS}	細胞 - 基質間結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{CS,c}$	細胞 c の細胞 - 基質間結合のために使用可能なエネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{CS,c,d}$	遊走前の細胞 c から見て方向 d に隣接する基質との結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
E_{max}	細胞遊走に使用可能なエネルギーの最大値	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
E_{TJ}	密着結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{TJ,0}$	細胞の年齢が 0 h の時の密着結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$

変数 (Variables)

記号	定義	単位
$E_{TJ,c}$	細胞 c の密着結合のために使用可能なエネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{TJ,c,d}$	遊走前の細胞 c から見て方向 d に隣接する細胞との密着結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$E_{TJ,\max}$	2 つの細胞 i, j 間の密着結合による最大結合エネルギー	$\text{ng } \mu\text{m}^2 \text{ h}^{-2}$
$H_{m,d}$	細胞が方向 d に遊走する場合の、遊走先の足場の有無	-
$H_{m,dir}$	細胞が方向 dir に遊走する場合の、遊走先の足場の有無	-
k_m	非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移速度	h^{-1}
$k_{m,\text{chain}}$	chain migration による非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移速度	h^{-1}
$k_{m,\text{deg}}$	細胞 - 細胞間結合の劣化による非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移速度	h^{-1}
k_n	遊走可能状態から非遊走可能状態への細胞状態遷移速度	h^{-1}
$k_{n,\text{app}}$	見かけの遊走可能状態から非遊走可能状態への状態遷移速度	h^{-1}
M	細胞集団の移動速度を解析するタイムステップ数	step
m_r	探索範囲の縮小倍率	-
N	計算時間 t に計算空間に存在する細胞数	cells
n_c	着目する領域における総細胞数	cells
n_d	パラメータ値探索範囲の分割数	-
$n_{m,\text{chain}}$	chain migration によって非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移を起こした細胞数	cells
$n_{m,\text{deg}}$	細胞 - 細胞間結合の劣化によって非遊走可能状態から遊走可能状態への細胞状態遷移を起こした細胞数	cells
n_n	遊走可能状態から非遊走可能状態への細胞状態遷移を起こした細胞数	cells

変数 (Variables)

記号	定義	単位
$n_{n,state}$	非遊走可能状態の細胞数	cells
N_{nn}	細胞と隣接する単位 prism の数	prisms
n_p	モデルパラメータ数	-
n_r	探索の繰り返し回数	-
$p_{m,dir}$	隣接するエージェントが存在しない場合の遊走方向選択確率	-
$Pr_{m,dir}$	遊走方向選択確率	-
$R_{m,d}$	方向 d への細胞遊走で減少する結合エネルギーによる重み	-
$R_{m,dir}$	方向 dir への細胞遊走で減少する結合エネルギーによる重み	-
$R_{m,in\ silico}$	正規化された平均細胞移動速度 (<i>in silico</i>)	-
$R_{m,in\ vitro}$	正規化された細胞集団の平均移動速度 (<i>in vitro</i>)	-
$R_{max,n}$	n 番目のパラメータのパラメータ値探索範囲の最大値	-
$R_{min,n}$	n 番目のパラメータのパラメータ値探索範囲の最小値	-
R_n	着目する領域における非遊走可能状態の細胞の割合	-
t	時間	h
T_d	遊走前の細胞 c から見て方向 d に隣接するエージェントの種類	-
$t_{d,c}$	細胞 c の次の細胞分裂までの待ち時間	h
$t_{g,c}$	細胞 c の細胞周期の長さ	h
$t_{m,c}$	細胞 c の次の細胞遊走までの待ち時間	h
$\bar{V}_{mig,in\ vitro}$	トラッキングによって得た細胞の平均遊走速度 (<i>in vitro</i>)	$\mu\text{m h}^{-1}$
$\bar{V}_{mov,in\ silico}$	平均細胞移動速度の計算値 (<i>in silico</i>)	$\mu\text{m h}^{-1}$
$\bar{V}_{mov,in\ vitro}$	PIV 解析によって得た細胞シート内の細胞集団の平均移動速度 (<i>in vitro</i>)	$\mu\text{m h}^{-1}$
$V_{m,c}$	細胞 c の遊走速度の大きさ	$\mu\text{m h}^{-1}$
$V_{tent,n}$	n 番目のパラメータの暫定のパラメータ推定値	-

変数 (Variables)

記号	定義	単位
$W(\lambda_{c,d})$	注目している細胞からの距離 $\lambda_{c,d}$ が A の範囲内か判断する関数	-
x	計算空間の x 座標	-
$X_{\text{pro,in silico}}$	基底層 p63 陽性細胞密度 (<i>in silico</i>)	cells cm ⁻²
$X_{\text{pro,in vitro}}$	基底層 p63 陽性細胞密度 (<i>in vitro</i>)	cells cm ⁻²
x_t	計算時間 t における細胞中心の x 座標	-
$X_{\text{tot,in silico}}$	全細胞密度 (<i>in silico</i>)	cells cm ⁻²
$X_{\text{tot,in vitro}}$	全細胞密度 (<i>in vitro</i>)	cells cm ⁻²
y	計算空間の y 座標	-
y_t	計算時間 t における細胞中心の y 座標	-
z	計算空間の z 座標	-
$\Delta E(d;dir)$	細胞が dir 方向へ遊走した結果、移動前の細胞の d 方向に位置していた他細胞または基質との間の結合エネルギーの減少分	ng μm^2 h ⁻²
$\varepsilon_{B,\text{min}}$	細胞遊走に必要なエネルギーの最小値の細胞遊走に使用可能なエネルギーの最大値に対する比率	-
$\varepsilon_{CC,\text{total}}$	最大遊走エネルギーに対する細胞-細胞間結合エネルギーの和の割合	-
$\theta(i,j)$	細胞 i,j 間の接着結合の持続時間	h
A	細胞と他の細胞や基質が結合可能な最大の中心間距離	μm
$\lambda_{c,d}$	細胞 c から見て方向 d に隣接する細胞または基質との中心座標間の距離	μm
$\lambda_{c,d,\text{after}}$	遊走前の細胞 c から見て方向 d に隣接していた細胞または基質との遊走後の中心座標間の距離	μm
$\lambda_{c,d,\text{before}}$	遊走前の細胞 c から見て方向 d に隣接する細胞または基質との中心座標間の距離	μm

変数 (Variables)

記号	定義	単位
Ω_d	方向 d の空間の幾何学的重み	-
Ω_{dir}	方向 dir の空間の幾何学的重み	-
$(p_{m,\tilde{dir}})_D$	着目する細胞の方向 dir に存在するエージェントが、位置交換のために方向 dir と反対方向 $\tilde{dir}$ に遊走する確率	-
$(p_{m,dir})_T$	細胞同士の位置交換を考慮しない場合に、着目する細胞が方向 dir に遊走する確率	-
$(p_{m,\tilde{d}})_D$	着目する細胞の方向 d に存在するエージェントが、位置交換のために方向 d と反対方向の $\tilde{d}$ に遊走する確率	-
$(p_{m,d})_T$	細胞同士の位置交換を考慮しない場合に、着目する細胞が方向 d に遊走する確率	-

参考文献

- Angelini, T. E., Hannezo, E., Treppe, X., Marquez, M., Fredberg, J. J., & Weitz, D. A. (2011). Glass-like dynamics of collective cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 4714–4719. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010059108>
- Baba, K., Sasaki, K., Morita, M., Tanaka, T., Teranishi, Y., Ogasawara, T., Oie, Y., Kusumi, I., Inoue, M., Hata, K., Quantock, A. J., Kino-oka, M., & Nishida, K. (2020). Cell jamming, stratification and p63 expression in cultivated human corneal epithelial cell sheets. *Scientific Reports*, 10(1), 9282. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64394-6>
- Ban, Y., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Nakamura, T., Tsuzuki, M., Koizumi, N., Dota, A., Mochida, C., & Kinoshita, S. (2003a). Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Experimental Eye Research*, 76(6), 735–743. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00033-2)
- Ban, Y., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Nakamura, T., Tsuzuki, M., Koizumi, N., Dota, A., Mochida, C., & Kinoshita, S. (2003b). Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Experimental Eye Research*, 76(6), 735–743. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00033-2)
- Ban, Y., Dota, A., Cooper, L. J., Fullwood, N. J., Nakamura, T., Tsuzuki, M., Mochida, C., & Kinoshita, S. (2003). Tight junction-related protein expression and distribution in human corneal epithelium. *Experimental Eye Research*, 76(6), 663–669. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00054-X)
- Berdahl, A. M., Kao, A. B., Flack, A., Westley, P. A. H., Codling, E. A., Couzin, I. D., Dell, A. I., & Biro, D. (2018). Collective animal navigation and migratory culture: from theoretical models to empirical evidence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1746), 20170009. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0009>
- Bernabeu, M. O., Köry, J., Grogan, J. A., Markelc, B., Beardo, A., D’Avezac, M., Enjalbert, R.,

- Kaeppler, J., Daly, N., Hetherington, J., Krüger, T., Maini, P. K., Pitt-Francis, J. M., Muschel, R. J., Alarcón, T., & Byrne, H. M. (2020). Abnormal morphology biases hematocrit distribution in tumor vasculature and contributes to heterogeneity in tissue oxygenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(45), 27811–27819.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2007770117>
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167–223. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00007-8)
- Bettinger, J. S., & Eastman, T. E. (2017). Foundations of anticipatory logic in biology and physics. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 131, 108–120.
<https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.09.009>
- Bi, D., Lopez, J. H., Schwarz, J. M., & Manning, M. L. (2015). A density-independent rigidity transition in biological tissues. *Nature Physics*, 11(12), 1074–1079.
<https://doi.org/10.1038/nphys3471>
- Bi, D., Yang, X., Marchetti, M. C., & Manning, M. L. (2016). Motility-Driven Glass and Jamming Transitions in Biological Tissues. *Physical Review X*, 6(2), 021011.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevX.6.021011>
- Bonabeau, E. (2002). Agent-based modeling: Methods and techniques for simulating human systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(SUPPL. 3), 7280–7287. <https://doi.org/10.1073/pnas.082080899>
- Brauer, F. (2017). Mathematical epidemiology: Past, present, and future. *Infectious Disease Modelling*, 2(2), 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.idm.2017.02.001>
- Burillon, C., Huot, L., Justin, V., Nataf, S., Chapuis, F., Decullier, E., & Damour, O. (2012). Cultured autologous oral mucosal epithelial cell sheet (CAOMECS) transplantation for the treatment of corneal limbal epithelial stem cell deficiency. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(3), 1325–1331. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7744>
- Byrne, H., & Drasdo, D. (2009). Individual-based and continuum models of growing cell populations: a comparison. *Journal of Mathematical Biology*, 58(4–5), 657–687.

<https://doi.org/10.1007/s00285-008-0212-0>

- Bzdok, D., Altman, N., & Krzywinski, M. (2018). Statistics versus machine learning. *Nature Methods*, 15(4), 233–234. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4642>
- Chiang, M., & Marenduzzo, D. (2016). Glass transitions in the cellular Potts model. *EPL (Europhysics Letters)*, 116(2), 28009. <https://doi.org/10.1209/0295-5075/116/28009>
- Cordes, H., Thiel, C., Aschmann, H. E., Baier, V., Blank, L. M., & Kuepfer, L. (2016). A Physiologically Based Pharmacokinetic Model of Isoniazid and Its Application in Individualizing Tuberculosis Chemotherapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 6134–6145. <https://doi.org/10.1128/AAC.00508-16>
- Cosgrove, J., Butler, J., Alden, K., Read, M., Kumar, V., Cucurull-Sanchez, L., Timmis, J., & Coles, M. (2015). Agent-based modeling in systems pharmacology. *CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology*, 4(11), 615–629. <https://doi.org/10.1002/psp4.12018>
- Cotsarelis, G., Cheng, S. Z., Dong, G., Sun, T. T., & Lavker, R. M. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell*, 57(2), 201–209. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90958-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90958-6)
- De Vladar, H. P., & Barton, N. H. (2011). The contribution of statistical physics to evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 26(8), 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.04.002>
- DeGracia, D. J., Tri Anggraini, F., Taha, D. T. M., & Huang, Z.-F. (2014). Inductive and Deductive Approaches to Acute Cell Injury. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/859341>
- Deisboeck, T. S., Wang, Z., Macklin, P., & Cristini, V. (2011). Multiscale Cancer Modeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 13(1), 127–155. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124729>
- Delile, J., Herrmann, M., Peyri  ras, N., & Doursat, R. (2017). A cell-based computational model of early embryogenesis coupling mechanical behaviour and gene regulation. *Nature*

Communications, 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms13929>

Deutsch, A., & Dormann, S. (2017). *Cellular Automaton Modeling of Biological Pattern Formation*. Birkhäuser Boston. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7980-3>

Douven, Igor. (Summer 2021 Edition), "Abduction", *The Stanford Encyclopedia of Philosophy*, Edward N. Zalta (ed.), URL = <https://plato.stanford.edu/archives/sum2021/entries/abduction/>.

Eissing, T. (2011). A Computational Systems Biology Software Platform for Multiscale Modeling and Simulation: Integrating Whole-Body Physiology, Disease Biology, and Molecular Reaction Networks. *Frontiers in Physiology*, 2(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00004>

Epstein, J. M. (1999). Agent-based computational models and generative social science. *Complexity*, 4(5), 41–60. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0526\(199905/06\)4:5<41::AID-CPLX9>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0526(199905/06)4:5<41::AID-CPLX9>3.0.CO;2-F)

Epstein, J. M. (2006). Chapter 34 Remarks on the Foundations of Agent-Based Generative Social Science. *Handbook of Computational Economics*, 2(05), 1585–1604. [https://doi.org/10.1016/S1574-0021\(05\)02034-4](https://doi.org/10.1016/S1574-0021(05)02034-4)

Farooqui, R., & Fenteany, G. (2005). Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *Journal of Cell Science*, 118(1), 51–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.01577>

Ferber, J., & Weiss, G. (1999). *Multi-agent systems: an introduction to distributed artificial intelligence* (Vol. 1). Reading: Addison-Wesley.

Fisher, J., & Henzinger, T. A. (2007). Executable cell biology. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1239–1249. <https://doi.org/10.1038/nbt1356>

Flach, P. A., & Kakas, A. C. (2000). *Abduction and Induction* (P. A. Flach & A. C. Kakas, Eds.; 20th ed., Vol. 18). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-0606-3>

Fordyce, A. P., & Rawlings, J. B. (1996). Segregated Fermentation Model for Growth and Differentiation of *Bacillus licheniformis*. *AIChE Journal*, 42(11), 3241–3252.

<https://doi.org/10.1002/aic.690421125>

- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 362–374. <https://doi.org/10.1038/nrc1075>
- Gabbay, D. M., & Woods, J. (2014). *Handbook of the History of Logic* (Jörg H. Siekmann, Ed.; 2014th ed.).
- Gerstner, W., Sprekeler, H., & Deco, G. (2012). Theory and Simulation in Neuroscience. *Science*, 338(6103), 60–65. <https://doi.org/10.1126/science.1227356>
- Ghaffarizadeh, A., Heiland, R., Friedman, S. H., Mumenthaler, S. M., & Macklin, P. (2018). PhysiCell: An open source physics-based cell simulator for 3-D multicellular systems. *PLOS Computational Biology*, 14(2), e1005991. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005991>
- Glen, C. M., Kemp, M. L., & Voit, E. O. (2019). Agent-based modeling of morphogenetic systems: Advantages and challenges. *PLOS Computational Biology*, 15(3), e1006577. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006577>
- Gómez-Flores, E., Sánchez-Guzmán, E., & Castro-Muñozledo, F. (2011). Asymmetrical cell division and differentiation are not dependent upon stratification in a corneal epithelial cell line. *Journal of Cellular Physiology*, 226(3), 700–709. <https://doi.org/10.1002/jcp.22380>
- González-Andrades, M., Garzón, I., Gascón, M. I., Muñoz-Ávila, J. I., Sánchez-Quevedo, M. C., Campos, A., & Alaminos, M. (2009). Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 3(6), 442–449. <https://doi.org/10.1002/term.178>
- Hammerstein, P., & Selten, R. (1994). Chapter 28 Game theory and evolutionary biology. In *Handbook of Game Theory with Economic Applications* (Vol. 2, pp. 929–993). [https://doi.org/10.1016/S1574-0005\(05\)80060-8](https://doi.org/10.1016/S1574-0005(05)80060-8)
- Harel, D. (1987). Statecharts: a visual formalism for complex systems. *Science of Computer Programming*, 8(3), 231–274. [https://doi.org/10.1016/0167-6423\(87\)90035-9](https://doi.org/10.1016/0167-6423(87)90035-9)
- Hayashi, R., Ishikawa, Y., Katori, R., Sasamoto, Y., Taniwaki, Y., Takayanagi, H., Tsujikawa, M., Sekiguchi, K., Quantock, A. J., & Nishida, K. (2017). Coordinated generation of multiple

- ocular-like cell lineages and fabrication of functional corneal epithelial cell sheets from human iPS cells. *Nature Protocols*, 12(4), 683–696. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.007>
- Hayashi, R., Ishikawa, Y., Sasamoto, Y., Katori, R., Nomura, N., Ichikawa, T., Araki, S., Soma, T., Kawasaki, S., Sekiguchi, K., Quantock, A. J., Tsujikawa, M., & Nishida, K. (2016). Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature*, 531(7594), 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature17000>
- Hirono, K., A. Udugama, I., Hayashi, Y., Kino-oka, M., & Sugiyama, H. (2022). A Dynamic and Probabilistic Design Space Determination Method for Mesenchymal Stem Cell Cultivation Processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 61(20), 7009–7019. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c00374>
- Ilina, O., Gritsenko, P. G., Syga, S., Lippoldt, J., La Porta, C. A. M., Chepizhko, O., Grosser, S., Vullings, M., Bakker, G.-J., Starruß, J., Bult, P., Zapperi, S., Käs, J. A., Deutsch, A., & Friedl, P. (2020). Cell–cell adhesion and 3D matrix confinement determine jamming transitions in breast cancer invasion. *Nature Cell Biology*, 22(9), 1103–1115. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0552-6>
- Jaeger, J. (2009). Modelling the Drosophila embryo. *Molecular BioSystems*, 5(12), 1549–1568. <https://doi.org/10.1039/b904722k>
- Kell, D. B., & Oliver, S. G. (2004). Here is the evidence, now what is the hypothesis? The complementary roles of inductive and hypothesis-driven science in the post-genomic era. *BioEssays*, 26(1), 99–105. <https://doi.org/10.1002/bies.10385>
- Kim, M. H., & Kino-oka, M. (2018). Bioprocessing Strategies for Pluripotent Stem Cells Based on Waddington’s Epigenetic Landscape. *Trends in Biotechnology*, 36(1), 89–104. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.006>
- Kim, M.-H., Tsubakino, N., Kagita, S., Taya, M., & Kino-oka, M. (2011). Characterization of spatial cell distribution in multilayer sheet of human keratinocytes through a stereoscopic cell imaging system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(3), 289–291. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.05.015>

- Kimura, K., Teranishi, S., & Nishida, T. (2009). Interleukin-1 β –Induced Disruption of Barrier Function in Cultured Human Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(2), 597. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2606>
- Kino-oka, M., Mizutani, M., & Medcalf, N. (2019). Cell manufacturability. *Cell and Gene Therapy Insights*, 5(10), 1347–1359. <https://doi.org/10.18609/cgti.2019.140>
- Kitano, H. (2002a). Computational systems biology. *Nature*, 420(6912), 206–210. <https://doi.org/10.1038/nature01254>
- Kitano, H. (2002b). Systems Biology: A Brief Overview. *Science*, 295(5560), 1662–1664. <https://doi.org/10.1126/science.1069492>
- Koster, M. I., Kim, S., Mills, A. A., DeMayo, F. J., & Roop, D. R. (2004). p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes & Development*, 18(2), 126–131. <https://doi.org/10.1101/gad.1165104>
- Kurosaka, S., & Kashina, A. (2008). Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 84(2), 102–122. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20125>
- La Porta, C. A. M., & Zapperi, S. (2020). Phase transitions in cell migration. *Nature Reviews Physics*, 2(10), 516–517. <https://doi.org/10.1038/s42254-020-0213-5>
- Lechler, T., & Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*, 437(7056), 275–280. <https://doi.org/10.1038/nature03922>
- Lee, S. Y., Lee, D.-Y., Kim, Y., Kim, H., & Lee, S. J. (2006). 7 *Systems Biotechnology: Combined in Silico and Omics Analyses for the Improvement of Microorganisms for Industrial Applications*.
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2982>
- Lenne, P.-F., & Trivedi, V. (2022). Sculpting tissues by phase transitions. *Nature Communications*, 13(1), 664. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28151-9>
- Lindenmayer, A. (1968). Mathematical models for cellular interactions in development I. Filaments with one-sided inputs. *Journal of Theoretical Biology*, 18(3), 280–299. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(68\)90079-9](https://doi.org/10.1016/0022-5193(68)90079-9)

- Macal, C. M., & North, M. J. (2005). Tutorial on agent-based modeling and simulation. *Proceedings - Winter Simulation Conference, 2005*, 2–15.
<https://doi.org/10.1109/WSC.2005.1574234>
- Macal, C. M., & North, M. J. (2010). Tutorial on agent-based modelling and simulation. *Journal of Simulation*, 4(3), 151–162. <https://doi.org/10.1057/jos.2010.3>
- Malinverno, C., Corallino, S., Giavazzi, F., Bergert, M., Li, Q., Leoni, M., Disanza, A., Frittoli, E., Oldani, A., Martini, E., Lendenmann, T., Deflorian, G., Beznoussenko, G. V., Poulidakos, D., Ong, K. H., Uroz, M., Trepas, X., Parazzoli, D., Maiuri, P., ... Scita, G. (2017). Endocytic reawakening of motility in jammed epithelia. *Nature Materials*, 16(5), 587–596.
<https://doi.org/10.1038/nmat4848>
- Matsuda, N., Shimizu, T., Yamato, M., & Okano, T. (2007). Tissue engineering based on cell sheet technology. *Advanced Materials*, 19(20), 3089–3099. <https://doi.org/10.1002/adma.200701978>
- Mayor, R., & Carmona-Fontaine, C. (2010). Keeping in touch with contact inhibition of locomotion. *Trends in Cell Biology*, 20(6), 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.03.005>
- McLennan, R., Schumacher, L. J., Morrison, J. A., Teddy, J. M., Ridenour, D. A., Box, A. C., Semerad, C. L., Li, H., McDowell, W., Kay, D., Maini, P. K., Baker, R. E., & Kulesa, P. M. (2015). Neural crest migration is driven by a few trailblazer cells with a unique molecular signature narrowly confined to the invasive front. *Development*, 142(11), 2014–2025.
<https://doi.org/10.1242/dev.117507>
- Menzies, T. (1996). Applications of abduction: knowledge-level modelling. *International Journal of Human-Computer Studies*, 45(3), 305–335. <https://doi.org/10.1006/ijhc.1996.0054>
- Metzcar, J., Wang, Y., Heiland, R., & Macklin, P. (2019). A Review of Cell-Based Computational Modeling in Cancer Biology. *JCO Clinical Cancer Informatics*, 3, 1–13.
<https://doi.org/10.1200/cci.18.00069>
- Miroshnikova, Y. A., Le, H. Q., Schneider, D., Thalheim, T., Rübsam, M., Bremicker, N., Polleux, J., Kamprad, N., Tarantola, M., Wang, I., Balland, M., Niessen, C. M., Galle, J., & Wickström, S. A. (2018). Adhesion forces and cortical tension couple cell proliferation and differentiation

to drive epidermal stratification. *Nature Cell Biology*, 20(1), 69–80.

<https://doi.org/10.1038/s41556-017-0005-z>

Mitchel, J. A., Das, A., O’Sullivan, M. J., Stancil, I. T., DeCamp, S. J., Koehler, S., Ocaña, O. H., Butler, J. P., Fredberg, J. J., Nieto, M. A., Bi, D., & Park, J.-A. (2020). In primary airway epithelial cells, the unjamming transition is distinct from the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature Communications*, 11(1), 5053. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18841-7>

Mitchell-Olds, T., & Shaw, R. G. (1987). REGRESSION ANALYSIS OF NATURAL SELECTION: STATISTICAL INFERENCE AND BIOLOGICAL INTERPRETATION. *Evolution*, 41(6), 1149–1161. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1987.tb02457.x>

Miyashita, H., Yokoo, S., Yoshida, S., Kawakita, T., Yamagami, S., Tsubota, K., & Shimmura, S. (2013). Long-Term Maintenance of Limbal Epithelial Progenitor Cells Using Rho Kinase Inhibitor and Keratinocyte Growth Factor. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(10), 758–765. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0156>

Moraki, E., Grima, R., & Painter, K. J. (2019). A stochastic model of corneal epithelium maintenance and recovery following perturbation. *Journal of Mathematical Biology*, 78(5), 1245–1276. <https://doi.org/10.1007/s00285-018-1308-9>

Nguyen, T. N. T., Sasaki, K., & Kino-oka, M. (2019). Elucidation of human induced pluripotent stem cell behaviors in colonies based on a kinetic model. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(5), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.10.016>

Nguyen, T. N. T., Sasaki, K., & Kino-oka, M. (2021). Development of a kinetic model expressing anomalous phenomena in human induced pluripotent stem cell culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 131(3), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.10.013>

Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Maeda, N., Watanabe, H., Yamamoto, K., Nagai, S., Kikuchi, A., Tano, Y., & Okano, T. (2004). Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*, 77(3), 379–385. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000110320.45678.30>

- Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Nagai, S., Kikuchi, A., Maeda, N., Watanabe, H., Okano, T., & Tano, Y. (2004). Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium. *New England Journal of Medicine*, 351(12), 1187–1196. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040455>
- Oie, Y., & Nishida, K. (2013). Regenerative Medicine for the Cornea. *BioMed Research International*, 2013(8), 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/428247>
- Oswald, L., Grosser, S., Smith, D. M., & Käs, J. A. (2017). Jamming transitions in cancer. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 50(48), 483001. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa8e83>
- Park, J.-A., Atia, L., Mitchel, J. A., Fredberg, J. J., & Butler, J. P. (2016). Collective migration and cell jamming in asthma, cancer and development. *Journal of Cell Science*, 129(18), 3375–3383. <https://doi.org/10.1242/jcs.187922>
- Park, J.-A., Kim, J. H., Bi, D., Mitchel, J. A., Qazvini, N. T., Tantisira, K., Park, C. Y., McGill, M., Kim, S.-H., Gweon, B., Notbohm, J., Steward Jr, R., Burger, S., Randell, S. H., Kho, A. T., Tambe, D. T., Hardin, C., Shore, S. A., Israel, E., ... Fredberg, J. J. (2015). Unjamming and cell shape in the asthmatic airway epithelium. *Nature Materials*, 14(10), 1040–1048. <https://doi.org/10.1038/nmat4357>
- Pellegrini, G., Rama, P., Mavilio, F., & De Luca, M. (2009). Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy. *The Journal of Pathology*, 217(2), 217–228. <https://doi.org/10.1002/path.2441>
- Pellegrini, G., Traverso, C. E., Franzini, A. T., Zingirian, M., Cancedda, R., & De Luca, M. (1997). Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *The Lancet*, 349(9057), 990–993. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)11188-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)11188-0)
- Popel, A. S. (1989). Theory of oxygen transport to tissue. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 17(3), 257–321.
- Quek, L.-E., Dietmair, S., Krömer, J. O., & Nielsen, L. K. (2010). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metabolic Engineering*, 12(2), 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.09.002>

- Rama, P., Bonini, S., Lambiase, A., Golisano, O., Paterna, P., De Luca, M., & Pellegrini, G. (2001). Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation*, 72(9), 1478–1485. <https://doi.org/10.1097/00007890-200111150-00002>
- Rama, P., Matuska, S., Paganoni, G., Spinelli, A., De Luca, M., & Pellegrini, G. (2010). Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration. *New England Journal of Medicine*, 363(2), 147–155. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0905955>
- Ray, O. (2005). Hybrid Abductive Inductive Learning. http://www.cs.bris.ac.uk/Publications/pub_master.jsp?id=2000718
- Rice, G., & Rompolas, P. (2020). Advances in resolving the heterogeneity and dynamics of keratinocyte differentiation. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 67, pp. 92–98). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.09.004>
- Rocha, H. L., Godet, I., Kurtoglu, F., Metzcar, J., Konstantinopoulos, K., Bhoyar, S., Gilkes, D. M., & Macklin, P. (2021). A persistent invasive phenotype in post-hypoxic tumor cells is revealed by fate mapping and computational modeling. *IScience*, 24(9), 102935. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102935>
- Salvador-Carulla, L., Fernandez, A., Madden, R., Lukersmith, S., Colagiuri, R., Torkfar, G., & Sturmberg, J. (2014). Framing of scientific knowledge as a new category of health care research. *Journal of Evaluation in Clinical Practice*, 20(6), 1045–1055. <https://doi.org/10.1111/jep.12286>
- Schermer, A., Galvin, S., & Sun, T. T. (1986). Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *Journal of Cell Biology*, 103(1), 49–62. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.1.49>
- Schumacher, L. J., Kulesa, P. M., McLennan, R., Baker, R. E., & Maini, P. K. (2016). Multidisciplinary approaches to understanding collective cell migration in developmental biology. *Open Biology*, 6(6), 160056. <https://doi.org/10.1098/rsob.160056>
- Sharpe, J. (2017). Computer modeling in developmental biology: growing today, essential

tomorrow. *Development*, 144(23), 4214–4225. <https://doi.org/10.1242/dev.151274>

Simpson, C. L., Patel, D. M., & Green, K. J. (2011). Deconstructing the skin: Cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(9), 565–580. <https://doi.org/10.1038/nrm3175>

Smith, W. L., Dewitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). CYCLOOXYGENASES : Structural , Cellular , and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 145–182.

Soheilypour, M., & Mofrad, M. R. K. (2018). Agent-Based Modeling in Molecular Systems Biology. *BioEssays*, 40(7), 1–8. <https://doi.org/10.1002/bies.201800020>

Stéphanou, A., Fanchon, E., Innominato, P. F., & Ballesta, A. (2018). Systems biology, systems medicine, systems pharmacology: The what and the why. *Acta Biotheoretica*, 66(4), 345–365. <https://doi.org/10.1007/s10441-018-9330-2>

Strinkovsky, L., Havkin, E., Shalom-Feuerstein, R., & Savir, Y. (2021). Spatial correlations constrain cellular lifespan and pattern formation in corneal epithelium homeostasis. *ELife*, 10, 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.56404>

Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywachak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Systems*, 9(2), 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>

Szabó, A., & Mayor, R. (2015). Cell traction in collective cell migration and morphogenesis: The chase and run mechanism. *Cell Adhesion & Migration*, 9(5), 380–383. <https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1019997>

Thessen, A. E. (2016). Adoption of machine learning techniques in ecology and earth science. *One Ecosystem*, 1, 1–38. <https://doi.org/10.3897/oneeco.1.e8621>

Theveneau, E., & Mayor, R. (2012). Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology*, 366(1), 34–54. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.041>

Thoft, R., Friend, J., Jm, E., E, A., F, F., E, G., H, H., & G, V. (1983). The X , Y , Z Hypothesis of Corneal Epithelial Maintenance To the Editor : For the past few years , studies of corneal

epithelial of corneal epithelial disease . Department of Ophthalmology. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 24(October), 1442–1443.

- Thorne, B. C., Bailey, A. M., & Peirce, S. M. (2007). Combining experiments with multi-cell agent-based modeling to study biological tissue patterning. *Briefings in Bioinformatics*, 8(4), 245–257. <https://doi.org/10.1093/bib/bbm024>
- Tsai, R. J.-F., Li, L.-M., & Chen, J.-K. (2000). Reconstruction of Damaged Corneas by Transplantation of Autologous Limbal Epithelial Cells. *New England Journal of Medicine*, 343(2), 86–93. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007133430202>
- Wang, Z., Butner, J. D., Cristini, V., & Deisboeck, T. S. (2015). Integrated PK-PD and agent-based modeling in oncology. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 42(2), 179–189. <https://doi.org/10.1007/s10928-015-9403-7>
- Wang, Z., Butner, J. D., Kerketta, R., Cristini, V., & Deisboeck, T. S. (2015). Simulating cancer growth with multiscale agent-based modeling. *Seminars in Cancer Biology*, 30, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.001>
- Wangersky, P. J. (1978). LOTKA-VOLTERRA POPULATION MODELS. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 9(1), 189–218.
- Waters, S. L., Schumacher, L. J., & El Haj, A. J. (2021). Regenerative medicine meets mathematical modelling: developing symbiotic relationships. *Npj Regenerative Medicine*, 6(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s41536-021-00134-2>
- Watt, K. E. F. (1962). Use of Mathematics in Population Ecology. *Annual Review of Entomology*, 7(1), 243–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.07.010162.001331>
- Wolfram, S. (2002). *A new kind of science* (Vol. 5). Champaign: Wolfram media.
- Wynn, M. L., Kulesa, P. M., & Schnell, S. (2012). Computational modelling of cell chain migration reveals mechanisms that sustain follow-the-leader behaviour. *Journal of The Royal Society Interface*, 9(72), 1576–1588. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0726>
- Yamato, M., Akiyama, Y., Kobayashi, J., Yang, J., Kikuchi, A., & Okano, T. (2007). Temperature-responsive cell culture surfaces for regenerative medicine with cell sheet engineering. *Progress*

in Polymer Science (Oxford), 32(8–9), 1123–1133.

<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.06.002>

Yin, H., Hu, M., & Li, D. (2023). Regulation of epidermal stratification and development by basal keratinocytes. In *Journal of Cellular Physiology*. John Wiley and Sons Inc.

<https://doi.org/10.1002/jcp.30978>

Yoon, J. J. (2014). Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis. *World Journal of Stem Cells*, 6(4), 391. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i4.391>

Yu, J. S., & Bagheri, N. (2020). Agent-Based Models Predict Emergent Behavior of Heterogeneous Cell Populations in Dynamic Microenvironments. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(June), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00249>

本報に関する論文

Junya Kamioka, Kei Sasaki, Koichi Baba, Tomoyo Tanaka, Yosuke Teranishi, Takahiro

Ogasawara, Masukazu Inoie, Ken-ichiro Hata, Kohji Nishida, and Masahiro Kino-oka:

Agent-based approach for elucidating the release from collective arrest of cell motion in corneal epithelial cell sheet, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 136(6), 477–486.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2023.10.003>

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始的確なご指導とご鞭撻を賜りました、大阪大学大学院工学研究科 紀ノ岡正博 教授に深甚の謝意を表します。また、日頃から議論とご指導を賜りました佐々木啓 特任助教に心から感謝申し上げます。さらに、論文審査にあたり丁寧なご指導およびご校閲を賜りました、大阪大学大学院工学研究科 内山進 教授、並びに大阪大学情報科学研究科 清水浩 教授に厚く感謝申し上げます。そして、日頃から研究活動に関するご指導、ご助言のみならず、研究室生活全般にてお世話になりました大阪大学大学院工学研究科 金美海 准教授、山本陸 助教、秋田大学大学院理工学研究科 堀口一樹 准教授に心から感謝申し上げます。

大阪大学大学院医学研究科の西田幸二 教授、馬場耕一 特任教授、株式会社ジャパン・ディスプレイ・エンジニアリング株式会社の畠賢一郎 様をはじめ、井家益和 様、田中朋代 様、小笠原隆広 様、寺西陽友 様には研究に使用する実験データを提供していただきました。深く感謝申し上げます。

そして研究室生活を共にし、支えてくださった大阪大学大学院工学研究科 生物プロセスシステム工学領域（紀ノ岡研究室）の皆様および共同研究講座の先生方に心より御礼申し上げます。

最後に、これまで学ぶ機会を与え、様々な困難な状況においても支え続けてくださった両親に心から感謝の意を表して謝辞と致します。