

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650286

研究課題名(和文)細胞形態変化をインジケータとする超効率的培地評価法の確立と革新的培地開発

研究課題名(英文) Novel super-rapid screening method to customize the cellular medium ingredients based on cell morphology analysis

研究代表者

加藤 竜司 (Kato, Ryuji)

名古屋大学・創薬科学研究科・准教授

研究者番号：50377884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、再生医療や創薬産業で用いられる未分化細胞の多能性維持状態を維持するために最適な培地を。迅速かつ効率的に設計する方法の開発であり、培地中の成分の違いによって現れる細胞の形の変化をインジケータとして用い、「細胞の形を見ただけで培地機能が評価できる」次世代培地機能性スクリーニング法の確立とこれを用いた革新的培地開発である。結果、間葉系幹細胞の培養状態の細胞画像を用いて培養環境をプロファイリングできること、またそれを利用すると分化の誘導・阻害をするような培地添加因子をスクリーニングできることを確認し、細胞の品質を評価しながら最適な培地を選択できるような解析システムを構築するに至った。

研究成果の概要(英文)：This research was conducted to develop effective and rapid screening method for designing novel cell culture medium for regenerative medicine or medical development. Briefly, we applied the cellular morphological bioinformatics analysis method to numerically convert the cellular response to indicate the surrounding effects from medium. As a result, we found that clustering-based morphological analysis can categorize the medium effects, also with the combination with cellular activity, and established a screening strategy to evaluate the medium additives non-invasively and rapidly. We also found several compounds could stably control the stem cell differentiation through our method.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：医用システム

キーワード：培地開発 細胞形態情報解析 形態分類 パターニング クラスタリング 多変量解析 培地最適化 再生医療

1. 研究開始当初の背景

細胞培養は、医薬品・食品・化粧品等の開発や試験、再生医療、抗体医薬生産、など多方面において全世界で日常的に行われている。細胞の中でも、iPS細胞を始めとした万能細胞や幹細胞などの「未分化細胞」は、創薬開発や安全性試験において全ての動物実験に代わる検証細胞として、または細胞医療の可能性を無限に広げる治療用細胞として、大きく注目を集めている。

未分化細胞の培養においては、「細胞が増殖する」だけでなく、「細胞の未分化能が維持される」ことが必須であるが、未だに有効な培地は確立しておらず、各研究者は未だに手探りで1950年代に開発された培地をわずかに改変するにとどまっておき、革新的な培地の創出は行われていない。

細胞培地の開発における最大の問題は、無限に存在する検討変数(無機・有機成分、原料のロット、配合比率等)である。筆者はこれまで、細胞の形態情報をコンピュータ解析することで「品質を評価する技術」(上図参照:名古屋大学・ニコン共同出願10件)を確立している。この技術では、画像中の細胞の変化を、長さや太さというデータの変化として抽出し、まるで指紋のように「品質を比較」できることがわかっている。筆者は、現在ブレイクスルーの少ない細胞培養工学において、このような細胞形態情報解析技術を導入することで、細胞の形から培地成分の有効性をモニタリングしたり、複数種類の培地をパターン分類できるのではないかと発想し、簡便かつ超効率的な培地成分検証法として本研究の開発を立案し、革新的に新しい「未分化能維持培地」の開発を行うものである。

2. 研究の目的

本研究は、再生医療や創薬産業で用いられる未分化細胞の多能性維持状態を維持するために最適な培地を、迅速かつ効率的に設計する方法の開発である。

具体的には、培地中の成分の違いによって現れる細胞の形の変化をインジケータとして用い、「細胞の形を見ただけで培地機能性が評価できる」次世代培地機能性スクリーニング法の確立とこれを用いた革新的培地開発である。

3. 研究の方法

本申請では、下記2つの到達課題を設定し、これらを順次達成することで研究目的を目指す。

到達課題1: 培地成分の影響を、培地中の細胞の画像を用いてパターン分類する技術を構築する。

具体的には、細胞: 間葉系幹細胞(MSC)を各種培地で培養した経時的な位相差画像を取得し、画像中の細胞の形態情報をクラスタリング解析によって分類するアルゴリズムを開発する。同時に、未分化能と相関する「形」を実験により数値化し、「目標とする未分化細胞の形」を既定する。

到達課題2: 既存の培地と比較して、未分化維持能が高い新規培地を設計開発し、有効性を実証する。

具体的には、多数の成分調整培地を準備し、課題1で決定した「目標とする未分化細胞の形」に最も近い細胞の形が生じる成分調整培地をスクリーニングすることで、どんな成分が効果的かを明らかにする。その後、有効な成分だけをさらに振った二次スクリーニングを行い、各細胞の未分化能を免疫染色とRT-PCRで定量することで、その有効性を実証する。

4. 研究成果

H23年度の研究では、次の3項目を達成した。

解析データの準備: 研究目標に対して、ヒトMSC3ロットを10継代培養(約半年間)し、全サンプルを3つの分化傾向へと分化させるという長期的培養実験をミス無くして実施し、これに関して約8000枚の細胞位相差顕微鏡画像を取得し、データベースとした。またさらには培地成分から血清成分を抜いたもの、脂質成分を変化させたものなどのカスタム培地を準備し、これに関しても1ロットではあるがMSCの培養画像を約200枚取得しデータベース化した。細胞パターン分類アルゴリズムの開発: C言語およびR言語を用いて、上記データに関してK-meansクラスタリング、CARTの2種類の分類方法をプログラム化・比較検討し、両方を用いて解析検証できるアルゴリズムプラットフォームを作った。さらには多次元情報解析方法としてのAutoSOME解析法のソースコードを元にこれを改良し、これらの検証が行えるプラットフォームを作った。標準未分化形態ルールの数値化: 結果、上記開発手法の比較検討により、MSCの分化程度の変化は約10個の形態分類模範パターンに整理できることがわかった。さらには、MSCの形の違いを細胞比率でプロット化することによって、低血清状況であっても品質の良いMSC培養が可能になる条件を絞り込むことができた。

H24年度の研究では次の2項目を実施・達成した。ロット数の増加による解析モデルの再現性の確認。平成23年度で確立した解析基礎技術の汎用性・再現性を確認するため、間葉系幹細胞MSCのロット数をさらに増やし12ロットとしてのデータベースの蓄積(約2万枚の画像取得)を実施し、さらに培地成分への反応を数ヶ月の分化培養結果と照らし合わせて教師値データベースとして整備した。さらにこれら12ロットにおいてはこれまで検討していなかった神経系(外胚葉系)への分化も検討し、培地成分への反応が細胞形態をインジケータとして数値化・分類できることを確認した。再現性を高めるための新規アルゴリズムの開発。H23年度で検証したK-meansクラスタリングを上記追加ロット数の画像で検証した結果、アルゴリズムとし

での汎用性に問題が生じてしまうことが判明したため、K-means クラスタリングをさらに改良し、X-means クラスタリングとして新規アルゴリズムを実装し、その機能性解析をやりなおした。

H25 年度の研究では「新規未分化能維持培地の実証」を目標としながら次の2つの項目についての開発を行った。12ロットの間葉系幹細胞に対して、骨、脂肪、神経分化培養を3継代のストレスに分けて行い、約36ロット分の細胞株側の性質を変化させながら、途中の画像データの取得および分化培養傾向の画像での比較を行った。画像情報は約2万枚の位相差顕微鏡画像で取得し、これをH23-24年度で構築してきた新規アルゴリズムを用いて分類を行い、どのような培地と細胞品質の組合せが、どのような細胞形態をもたらすかを検証してきた。3ロットの間葉系幹細胞に対して6種類の脂肪分化途中に対する添加因子の検証とその形態画像的な解析を行った。この結果、いくつかのカスケードの阻害剤において、細胞形態情報からその影響を事前に評価できるばかりか、分化への移行を強く阻害できる因子を特定できることを確認、発見した。当初想定していた単純な制御因子は6種類の中からは見つからなかったが、6種類が制御するカスケードの調節が培地成分として有効であることを発見したため、培地成分探索として評価すべき項目が明確に絞り込まれた。さらに申請時の目標では、分化培養の培地検討は、複数の分化傾向を検証するものであったが H23-24 年度の検証結果よりも、培地条件を振りすぎるとアルゴリズムの精度が担保されないケースがあることが確認されてきたため、細胞株のバリエーションを増やす実験と有効因子探索の検証へと実験を分けて行い、どちらも豊富な画像データと品質バリエーションの組合せが、画像情報で分類・評価できることを実証することができ、本研究の大きな目標であった培地評価開発に開発した手法が有効であること、さらには、いくつかのそのためのカスケードが簡易に絞りこむことができたことから、目標としていた開発を行えたと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. H. Sasaki, I. Takeuchi, M. Okada, R. Sawada, K. Kanie, Y. Kiyota, H. Honda and R. Kato, Label-free morphology-based prediction of multiple differentiation potentials of human mesenchymal stem cells for early evaluation of intact cells, PLoS ONE, 9(4), e93952. doi:10.1371/journal.pone.0093952,

(2014) 査読有

2. F. Matsuoka, I. Takeuchi, H. Agata, H. Kagami, H. Shiono H, Y. Kiyota, H. Honda, R. Kato, Characterization of time-course morphological features for efficient prediction of osteogenic potential in human mesenchymal stem cells., Biotechnol. Bioeng., , doi: 10.1002/bit.25189., (2014) 査読有
3. K.Sasaki, T. Yuasa, H. Sasaki, R.Kato, Orientation based segmentation for phase-contrast microscopic image of confluent cell., Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.?, , 3323.-3326doi: 10.1109/EMBC. (2013) 査読有
4. F. Matsuoka, I. Takeuchi, H. Agata, H. Kagami, H. Shiono H, Y. Kiyota, H. Honda, R. Kato, Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells, PLoS One, 8(2), doi:0.1371/, (2013) 査読有
5. Fumiko Matsuoka, Ichiro Takeuchi, Hideki Agata, Hideaki Kagami, Hirofumi Shiono, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda, Ryuji Kato?, Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells, PLoS One, 8(2), doi:0.1371/journal.pone.0055082, (2013) 査読有

〔学会発表〕(計 36 件)

1. 加藤竜司, 細胞培養画像情報解析を用いた再生医療用細胞の品質管理, 日本医工学治療学会第30回学術大会, ウィンクあいち、名古屋, Symposium
2. 加藤竜司、岡田 法大、佐々木 寛人、蟹江 慧、清田 泰次郎、本多 裕之、細胞形態情報を用いた幹細胞制御因子の新規 Cell-based Assay 法, 第13回日本再生医療学会, 京都国際会議場、京都, Oral
3. 佐々木寛人、竹内一郎、蟹江慧、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司, 間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化の細胞形態と発現プロファイリングとの相関解析, 第13回日本再生医療学会, 京都国際会議場、京都, Oral
4. 佐々木寛人、高橋厚妃、蟹江慧、竹内一郎、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司, 細胞画像情報解析による間葉系幹細胞分化能の品質プロファイリング, 第13回日本再生医療学会, 京都国際会議場、京都, Poster
5. 加藤竜司, 細胞形態画像解析を用いた

- 非侵襲的分子評価, 日本動物実験代替法学会 26 回大会, 京都テルサ、京都, Symposium
6. Hiroto Sasaki, Ichiro Takeuchi, Rumi Sawada, Kei Kanie, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda, Ryuji Kato, Morphology-based and non-invasive quality control method of mesenchymal stem cells, 9th annual World Stem Cell Summit, Manchester Grand Hyatt, San Diego, USA, Poster
 7. Ryuji Kato, Kei Kanie, Hiroyuki Honda, Mee-Hae Kim, Masahiro Kino-oka, Cellular Mobility Mapping for Non-invasive Prediction of Differentiation Quality of Stem Cells, 9th annual World Stem Cell Summit, Manchester Grand Hyatt, San Diego, USA, Poster
 8. 岡田法大、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司, 細胞品質異常を検出しながら行う Cell-based Screening 法, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール、東京, Poster
 9. 高橋厚妃、佐々木寛人、蟹江慧、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司, 間葉系幹細胞における多分化能品質のカタログ化, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール、東京, Poster
 10. 佐々木寛人、蟹江慧、高橋厚妃、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司, 画像プロファイリングによる Cell-based Assay 用細胞の品質カタログ化, シンポジウム: 細胞アッセイ技術の現状と将来, 東京大学生産技術研究所コンベンションホール、東京, Poster
 11. Hiroto Sasaki, Rumi Sawada, Kei Kanie, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda, Ryuji Kato, Cell structural information can be indicators of cellular senescence of human mesenchymal stem cells, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, Nagoya University, Japan, Poster
 12. 高橋厚妃、佐々木寛人、蟹江慧、竹内一郎、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司, 細胞画像情報解析による幹細胞プロファイリングおよび品質判断方法の構築, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島国際会議場、広島, Poster
 13. 佐々木寛人、竹内一郎、蟹江慧、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司, 幹細胞分化予測における細胞形態情報モデリング法の最適化, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島国際会議場、広島, Poster
 14. 佐々木寛人、坪井泰樹、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司, 細胞品質管理のための高次元クラスタリング手法を用いた細胞品質分類法, 化学工学会第 45 回 秋季大会, 岡山大学 津島(東)キャンパス、岡山, Poster
 15. Hiroto Sasaki, Rumi Sawada, Kei Kanie, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda and Ryuji Kato, Cell structural information can be indicators of cellular senescence of human mesenchymal stem cells, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions, 名古屋大学、愛知, Poster
 16. 佐々木寛人、坪井泰樹、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司, セルバンクのための高次元クラスタリング手法を用いた細胞品質分類法, 2012 年度日本生物工学会若手研究者の集い, フェニックスシーアガイアリゾー、宮崎, Poster
 17. Ryuji Kato, Morphology-based Informatics for Non-invasive Evaluation of Cell Quality for the industrialization of Regenerative Medicine, The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'13), Osaka International Convention Center, Osaka, Oral
 18. Kei Sasaki, Tetsuya Yuasa, Hiroto Sasaki, Ryuji Kato, Orientation Based Segmentation for Phase-Contrast Microscopic Image of Confluent Cell, The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'13), Osaka International Convention Center, Osaka, Oral
 19. Hiroto Sasaki, Taiki Tsuboi, Kei Kanie, Asuka Miwa, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda, Ryuji Kato, Non-biased image processing methodology for typing stem cells by their morphologies, International Society of Stem Cell Research (ISSCR) 11th Annual meeting, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, Poster
 20. 加藤竜司、小島健児、蟹江慧、白石卓夫、

- 武澤康範、本多裕之、培養細胞環境評価のためのノンラベル細胞形態解析、日本薬学会第 133 年会、パシフィコ横浜、神奈川、Poster
21. 加藤竜司、梶浦 圭一、蟹江 慧、金 美海、紀ノ岡 正博、本多 裕之、コンフレント細胞分化度評価のための細胞画像情報からの 動的積算マップ法(MapIQ)、第 12 回日本再生医療学会、パシフィコ横浜、神奈川、Oral
 22. 松本恵、佐々木寛人、城戸理紗子、蟹江慧、本多裕之、清田泰次郎、加藤竜司、細胞画像情報の多次元マッピングによる再生医療用細胞品質管理、化学工学会第 78 年会、大阪大学豊中キャンパス、大阪、Oral
 23. 佐々木 寛人、竹内 一郎、澤田 留美、蟹江 慧、清田 泰次郎、本多 裕之、加藤竜司、細胞画像情報解析および遺伝子解析による幹細胞品質管理手法の構築、第 64 回日本生物工学会、国際会議場、神戸、Oral
 24. 佐々木 寛人、細胞画像情報解析による幹細胞品質管理手法の構築、セルプロセッシング計測評価研究部会主催・第 4 回若手研究シンポジウム～細胞の組織化と機能評価技術～、モンタナリゾート岩沼、宮城、Oral
 25. 佐々木寛人、竹内一郎、澤田留美、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司、細胞画像情報解析および遺伝子解析による幹細胞品質管理手法の構築、2012 年度 日本生物工学会若手研究者の集い、モンタナリゾート岩沼、宮城、Poster
 26. Hiroto Sasaki, Fumiko Matsuoka, Ichiro Takeuchi, Rumi Sawada, Hiroyuki Honda, Ryuji Kato, Morphology-based Cell Quality Assessment of Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells, International Society for Stem Cell Research(ISSCR) 10th Annual Meeting, Pacifico Yokohama, Yokohama, Oral
 27. 佐々木寛人、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司、骨髄由来間葉系幹細胞の画像情報解析による劣化度評価、第 11 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜、横浜、Oral
 28. 佐々木寛人、高橋厚妃、坪井泰樹、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司、間葉系幹細胞画像の情報解析による細胞状態分類法の有効性、第 11 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜、横浜、Oral
 29. 加藤竜司、松岡史子、佐々木寛人、縣秀樹、各務秀明、清田泰次郎、本多裕之、骨髄由来間葉系幹細胞の画像情報解析による骨分化度予測、第 11 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜、横浜、Oral
 30. 加藤竜司、坪井泰樹、佐々木寛人、蟹江慧、清田泰次郎、本多裕之、細胞形態の客観的解析のための細胞認識手法、第 11 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜、横浜、Symposium
 31. 佐々木 寛人、加藤竜司、蟹江 慧、名倉良英、塩野 博文、紀伊 宏昭、魚住 孝之、越馬 隆治、清田 泰次郎、富岡 研、本多 裕之、細胞画像解析による継代培養における細胞ダメージ度評価、第 63 回生物工学会大会、東京農工大学、東京、Oral
 32. 加藤竜司、細胞マイクロチップに求められる画像情報インフォーマティクス、第 63 回生物工学会大会、東京農工大学、東京、Symposium
 33. 坪井泰樹、三輪明日香、佐々木寛人、蟹江慧、加藤竜司、越馬隆治、清田泰次郎、本多裕之、細胞画像情報処理自動化のためのノイズ除去アルゴリズム、化学工学会第 43 回秋季大会、名古屋工業大学、名古屋、Poster
 34. 佐々木寛人、加藤竜司、越馬隆治、清田泰次郎、本多裕之、画像情報処理のための周辺工学技術の最適化、化学工学会第 43 回秋季大会、名古屋工業大学、名古屋、Poster
 35. 佐々木 寛人、加藤竜司、名倉 良英、塩野博文、紀伊宏昭、魚住孝之、本多裕之?、細胞画像解析法を用いた間葉系幹細胞の分化能予測モデル構築、生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー 2011、春日井びゅーほてる、山梨、Poster
 36. Fumiko Matsuoka, Ichiro Takeuchi, Hiroto Sasaki, Keiichi Kajiura, Hideaki Agata, Hideaki Kagami, Hiroyuki Honda, Ryuji Kato, Prediction of Osteogenic Differentiation Status of Mesenchymal Stem Cells based on Image Analysis combined with Bioinformatics, European Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU) 2011, Granada, Spain, Oral
- 〔著書〕(計 2 件)
1. Hiroto Sasaki, Fumiko Matsuoka, Wakana Yamamoto, Kenji Kojima, Hiroyuki Honda, Ryuji Kato,

Image-based cell quality assessment:
Modeling of cell morphology and
quality for clinical cell therapy,
Studies in Mechanobiology, Tissue
Engineering and Biomaterials, Chapter
"Computational modeling in tissue
engineering" Epub, 10, 207-226,
(2012)

2. Kagami H, Agata H, Kato R, Matsuoka F,
and Tojo A, Fundamental Technological
Developments Required for Increased
Availability of Tissue Engineering,
Regenerative Medicine and Tissue
Engineering - Cells and Biomaterials
(ISBN: 978-953-307-663-8) Epub InTech
Publisher, (2011)

〔産業財産権〕

出願状況 (国内出願準備中 計 2 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤竜司 (KATO, Ryuji)

研究者番号 : 50377884

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

竹内 一郎 (TAKEUCHI, Ichiro)

名古屋工業大学・工学研究科・准教授

研究者番号 : 40335146

各務 秀明 (KAGAMI, Hideaki)

東京大学医科学研究所・先端医療研究センタ

ー分子療法分野・特任准教授

研究者番号 : 80242866