

令和 4 年 10 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04398

研究課題名(和文)細胞運動能を指標とした再生医療向け非侵襲的口腔粘膜上皮細胞評価システムの開発

研究課題名(英文) Development of evaluation system using noninvasive measurement of cell/colony motion of oral keratinocytes for quality control in regenerative medicine

研究代表者

泉 健次 (Izumi, Kenji)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80242436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：患者口腔内に移植して再生医療に用いる初代自家培養口腔粘膜上皮細胞に対して、培養期間初期のコロニーを形成する細胞に着目し、ランダムに選択したコロニーに対して24時間タイムラプス撮影後、細胞の運動能をOptical Flow(OF)とNormalized Cross-Correlation(NCC)という画像解析法(アルゴリズム)を用いて、非侵襲的・定量的に解析した。この解析で得られた細胞運動能と、細胞集団倍加数をパラメータとした細胞増殖能の両者に、正の相関関係があることが明らかにした。臨床応用のためには撮影時間の短縮やプロトコルの簡便化が今後必要であるが、培養細胞の品質評価法の開発につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タイムラプス撮影による顕微鏡画像から、画像解析アルゴリズムを駆使することで、細胞運動能を定量的に評価することを可能にした本課題は、将来的な「再生医療向け非侵襲的口腔粘膜上皮細胞評価システムの開発」につながる。また、培養細胞の非侵襲的かつ客観的な維持・管理が可能となり、口腔粘膜上皮再生医療の質の担保と向上につながる。一方で、細胞運動能は発生や組織/器官の構築といった生理学的現象解析にも重要で、シミュレーションが可能になれば上皮細胞重層化のモデルにつながり、発生学の進展に寄与できる。病理学でも、癌の浸潤や転移は細胞運動能と密接な関わりがあるので、本研究成果は癌研究の発展にも応用できる。

研究成果の概要(英文)：Autologous primary oral keratinocytes have been utilized for intraoral grafting in regenerative medicine. After multiple-cells colonies were formed during an early phase of culture, time-lapse photography was applied to the colonies randomly selected. Then, non-invasive and quantitative measurement of the cell/colony motion was conducted using two specific image analyses (algorithms) of Optical Flow (OF) and Normalized Cross-Correlation (NCC). As a result, we revealed that cell/colony motion calculated by both OF and NCC positively correlates with the proliferative capacity of oral keratinocytes showing populatoin doublings, respectively. Although it is necessary to shorten the operation time of time-lapse photography and simplify the protocol for future clinical use, this image analyses will allow us to develop quality control of cultured cells in regenerative medicine.

研究分野：再生歯学

キーワード：口腔粘膜角化細胞 再生医療 細胞運動能 細胞増殖能 非侵襲的細胞評価 画像処理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

自家口腔粘膜上皮細胞シートは、角膜や食道の再生に適用され、国内外の多くの施設で治療が進んでいる。また、申請者が 2000 年より研究テーマとして構築した基盤技術である、足場材を用いたヒト培養口腔粘膜の口腔内移植でも自家細胞を用いている。自家細胞を利用する再生医療製品は、採取した原料である生細胞が不均質なため、製品(患者)間のロット差が生じやすい。従って製品同等性が担保されず有効性・安全性に関する不安が残る。これを払拭するには、培養工程内検査や出荷前検査としての確かな細胞評価技術が求められるが、精密で多様化した近年の細胞評価技術は、どれも培養終了後に実施され、抽出された培養細胞を高侵襲的に評価した後、廃棄される。現状では、培養が継続でき、患者に移植される細胞そのものに対する非侵襲的でリアルタイムな定量的計測に基づいた細胞品質評価法が実践されている再生医療製品は存在しない。

最近、経時的顕微鏡画像情報による細胞/コロニーの“形”の観察から、不均質な間葉系幹細胞の品質を培養期間中に、大量かつ安定して再生医療製品を製造するプロセスの一環として、定量的かつ非侵襲的に細胞品質を予測する技術が開発され始めてきた。この技術は他家由来細胞を想定し、非侵襲的細胞計測で品質を評価し、細胞増殖率予測、混在異種細胞判別、間葉系幹細胞の骨分化度測定を可能とする。この技術は iPS 細胞への応用も可能とされるが、現状では、幹細胞の品質を規定する基準が乏しく、信頼のおけるマーカーが少ない幹細胞に対する品質管理基準や方法は非常に限られる。また、口腔粘膜上皮細胞特異的な“幹細胞/未分化”マーカーは存在しないので、解析データに対する生物学的基盤の確立が困難で、この技術を口腔粘膜上皮細胞に応用するのは困難である。上皮細胞では、移植細胞集団内に一定割合以上の幹細胞の存在が移植後の治療効果に関係するので、十分な治療効果が担保された上皮再生医療製品を作成するには、培養系における上皮幹細胞維持・品質管理が必須で、自家口腔粘膜上皮細胞に特異的で非侵襲的な定量的計測法の開発と品質管理の規格設定が不可欠である。一方、表皮細胞培養系の連続的顕微鏡画像解析により、非侵襲的に計測可能な回転運動速度や細胞移動量が、表皮幹細胞の指標となり得ることが明らかになった。実際、創傷修復の際に表皮幹細胞は創部に移動しなければならず、自らの運動性を創閉鎖に利用することは理にかなっており、上皮細胞の運動能は上皮組織恒常性維持の基本と推察できる。

以上から、口腔粘膜上皮幹細胞の特性の一つに、高い細胞運動能という可能性が示唆されていることから、細胞運動能という“バイオマーカー”を可視化する手法が求められる。よって、非侵襲的に計測できる細胞運動能を示す指標を検索して使用することで、細胞集団内の幹細胞比率の推測ができ、培養中の上皮幹細胞品質管理システムとして利用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、非侵襲的・定量的に測定した細胞運動能の指標と、細胞増殖能を含めた口腔粘膜上皮細胞の幹細胞特性を明らかにすることで、細胞評価システムの構築を最終目的とするが、まず、運動能測定が再生医療用の細胞品質管理技術として細胞増殖能との相関性を検討した。

3. 研究の方法

本課題では、口腔ケラチノサイトの細胞運動能の非侵襲的・定量的評価法として、

normalized cross correlation; NCC と Optical flow; OF の 2 つの画像解析アルゴリズムがコロニーの運動能の非侵襲的・定量的評価法として実現可能かどうか検討し、それらの指標で測定した運動能と細胞増殖能との相関性について検討した。

本学医歯学総合病院にて、インフォームドコンセントを得た口腔外科外来にて小手術を受ける患者様から頂いた歯肉から、口腔ケラチノサイトを単離して、培養した。培養方法は本学のヒト自家培養口腔粘膜臨床応用プロトコールに準じて行った。培養 4 日目で、形成されたコロニーを 15 分ごと、24 時間でタイムラプス撮影を行った。タイムラプス撮影終了から 24 時間経過したところで、ディッシュ全体をスキャンし、ランダムに抽出したコロニー内のセルカウントを実施した。タイムラプス撮影で得られた画像の画像解析を行うためにビデオファイルに置き換え、ターゲットとしたコロニーにおいて NCC と OF アルゴリズムを用いて定量的測定を試みた。ここまでの流れを下図に示す。

NCC と OF について説明する。

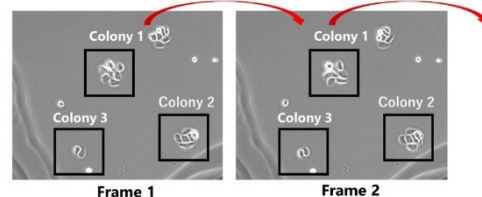
NCC は 2 つの画像の類似度の計算方法の 1 つで、NCC で得られた値は最大値である 1 に近いほど、類似度が高い、つまり 2 枚の画像間で動きがないことを意味することから、NCC を用いてコロニーの運動能の指標として活動度 DI を算定した。DI の算出



方法を下図に示す。例として、3つの細胞コロニーを測定ターゲットとした。Frame1 と Frame2 は隣り同士の画像である。Frame 1 でコロニーを含む矩形領域を設定し、フレーム 2 と比較して類似度 ρ を (ソフトが自動で) 測定し、そこから DI を算定した。すなわち、DI はフレーム間におけるコロニー領域の非類似度を表しており、DI を α とするとこのような式で表せる。コロニーが類似しているほど ρ の値が 1 に近づくので、コロニーが全く動いていない場合 α はゼロになり、反対に活発に動いているコロニーは α が 1 に近づくという原理である。

一方、OF はデジタル画像中の物体の動きをベクトルで表したものであり、各ベクトルが 1 フレーム目から 2 フレーム目への変位ベクトルを表す 2 次元ベクトルで表される。本課題では OF を用いて、コロニーの運動の指標として平均移動速度 MVM を算定した。本研究での OF プログラムでは、各ピクセルにおける移動量をベクトルで表している。下に実際の OF による測定を行うピクセルを付与した画像を示す。算定した各ピクセルの移動量は細胞の移動量と一致し、フレームごとに計測したピクセルの移動量の平均をとって、コロニー全体の運動能の定量的な解析を試みた。

細胞コロニーの運動能の計測方法(1)
細胞コロニーの活動度 (DI) : α の算出



類似度: ρ は相互相関係数の値
活動度 (DI): α は 1 から類似度を減じた以下の定義

$$\alpha = 1 - \rho$$

最後に、抽出したコロニーの増殖能を算出するためにコロニーを構成する細胞数を測定した。タイムラプス撮影の前後で、同じコロニーの細胞数を数えた後、細胞増殖能の指標である Population doublings: PD を算出し、細胞増殖能の指標として用いた。

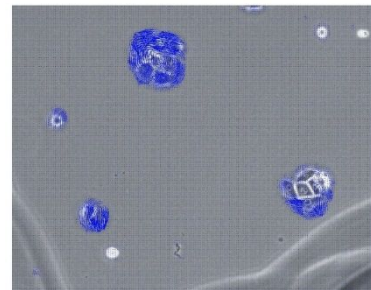
4. 研究成果

下の表は、上で示した例にあげた3つのコロニーの DI と MVM の平均値になります。

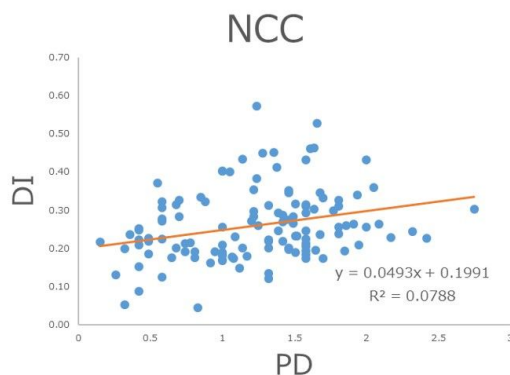
DI と MVM どちらにおいても、コロニー1 は運動が活発であり、コロニー3 は1 に比べて動きが緩慢であることがわかります。DI も MVM も同様の傾向を示し、これら2つの指標はコロニーの運動を非侵襲的・定量的に測定し得ることが示唆された。

最後に、2つの運動能の指標と口腔ケラチノサイトの細胞増殖能との相関を検討した(下図)。

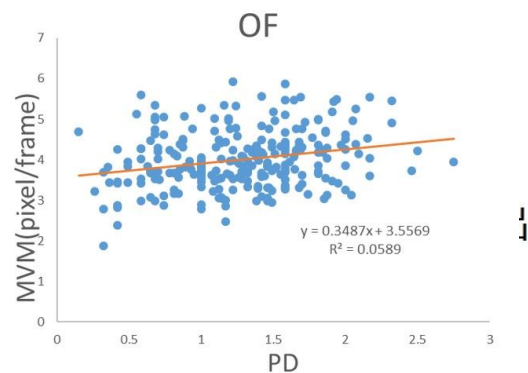
細胞コロニーの運動能の計測方法(2)
平均運動速度:MVMの算出



2つの運動能指標と細胞増殖能との相関



Pearson's $r = 0.28$, $p = 0.0014$
($n = 125$ colonies from 11 individuals)



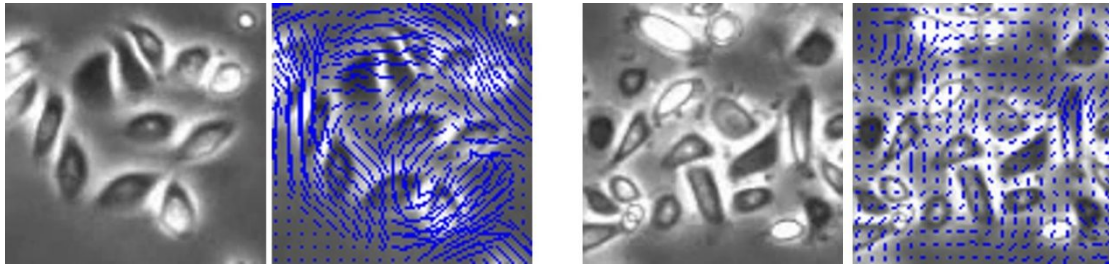
Pearson's $r = 0.24$, $p = 0.000096$
($n = 253$ colonies from 13 individuals)

口腔ケラチノサイトのコロニーの DI と

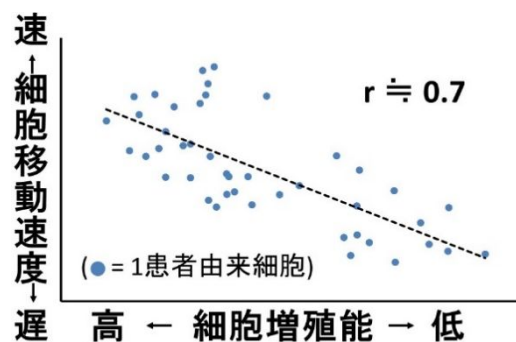
MVM、および PD をプロットし、統計解析を行い、DI・MVM と PD との間に正の相関を認めた。すなわち、細胞増殖能が高い細胞は、DI や MVM も高い値を示すことが示唆された。今回の研究で開発したソフトウェアで DI と MVM は問題なく計算され、NCC と OF は細胞/コロニーの運動能を、非侵襲的かつ定量的に評価・測定できる分析ツールとなり得ることが示唆され、かつ、細胞増殖能は DI や MVM と有意な正の相関を示したことから、口腔ケラチノサイトの品質管理に細胞運動能を用いることができることが示唆されました。

実際の臨床プロトコールに組み込むためには、これらの測定法はさらに改善する必要があることに加え、実際の臨床、すなわち患者移植の用いられる細胞は初代培養細胞を継代した細胞であることがほとんどである。継代を経験した細胞の増殖パターンは、p0 細胞とは大きく異なり、コロニー形成中心から、個々の細胞が基盤に接着後、小さなコロニーを形成してコンフルエントに近づいていくというパターンで増えていくので、p0 細胞で用いた画像解析方法を改変する必要があると考えられた。

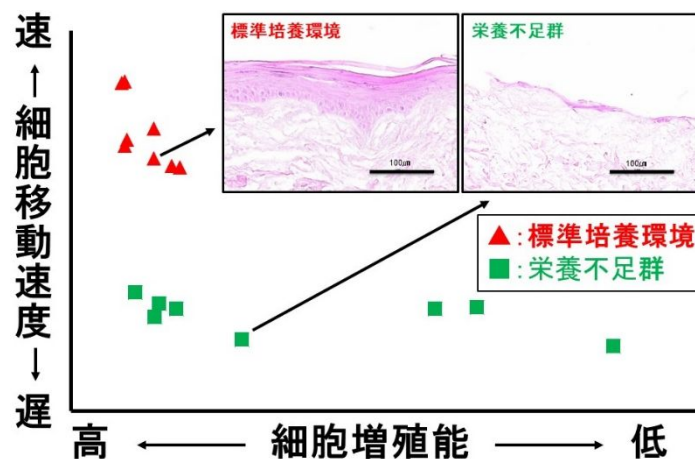
そこで、本研究グループの細胞培養環境下では、口腔粘膜上皮細胞のコロニー形成が緩く、コロニーの境界が不明瞭なため、コロニー形態という静止画像指標ではなく、タイムラプス顕微鏡撮影画像をつなぎあわせた動画で細胞挙動を解析することにし、画像(動画)内の細胞を認識するためにOFのみを利用して解析しました。



OF 単独解析で培養細胞の挙動、すなわち細胞の移動速度(運動能)に関する情報を定量的な数値に変換し、p0細胞と異なるp1細胞以降の増殖能を、細胞移動速度という指標を用いて評価したところ、p0細胞より強い相関関係があることが見出された。



結果、細胞を傷つけることなく、熟練者の主観的目利きに頼らず、細胞の製造工程に関わる細胞増殖能は、運動能を指標とすることで客観的、定量的に評価できることを明らかにすることができた。さらに、細胞運動能という指標が口腔粘膜上皮の再生能を予測できる指標にならないかについて検証するため、わざと細胞増殖にとって不利な環境(栄養不足)を作り解析したところ、栄養不足で培養した細胞が再生した上皮は貧弱であったことから、運動能という指標は上皮細胞の再生能も予測可能である指標であることが立証できた。



細胞の挙動情報を細胞品質と関係付けて評価する本手法は、リアルタイムでの細胞モニタリングや、容器内の全面検査(評価)も可能にする技術といえます。画像処理機能向上による解析精度の向上を目指しながら、他の種類の細胞への適応拡大や品質管理への展開が可能である。がん細胞に対し、抗がん剤の薬効評価などの研究用途や、新潟大学医歯学総合病院で実施している培養自家骨膜細胞の骨再生能評価への応用も考えられ、細胞評価技術の規格化、標準化を進めることでユーザー同士の融通性も高め、再生医療の実用化への貢献が期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hoshikawa Emi, Sato Taisuke, Kimori Yoshitaka, Suzuki Ayako, Haga Kenta, Kato Hiroko, Tabeta Koichi, Nanba Daisuke, Izumi Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Noninvasive measurement of cell/colony motion using image analysis methods to evaluate the proliferative capacity of oral keratinocytes as a tool for quality control in regenerative medicine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 1 - 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/2041731419881528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hoshikawa E, Kimori Y, Sato T, Kato H, Suzuki A, Haga K, Nanba D, Izumi K
2. 発表標題 Quantitative measurement of cell colony mobility using image analysis methods for quality control of oral keratinocytes: A preliminary study
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hoshikawa E, Kimori Y, Sato T, Kato H, Suzuki A, Haga K, Nanba D, Izumi K
2. 発表標題 Quantitative measurement of cell colony mobility using image analysis methods for quality control of oral keratinocytes
3. 学会等名 The International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Izumi K
2. 発表標題 Current and Future Research Topics on Tissue Engineering of Oral Mucosa
3. 学会等名 The International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 干川絵美, 木森義隆, 佐藤大祐, 加藤寛子, 鈴木絢子, 羽賀健太, 難波大輔, 多部田康一, 泉 健次
2. 発表標題 細胞品質管理に向けた画像解析による口腔ケラチノサイトの非侵襲的, 定量的運動能評価の試み
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hoshikawa E, Kimori Y, Sato T, Kato H, Suzuki A, Haga K, Nanba D, Izumi K
2. 発表標題 Quantitative measurement of cell colony mobility using optical flow and normalized cross correlation as a non-invasive tool for quality control of oral keratinocytes.
3. 学会等名 Japan-Singapore International Skin Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hoshikawa E, Sato T, Suzuki A, Haga K, Tabeta K, Nanba D, Izumi K.
2. 発表標題 Noninvasive Cell Motion Monitoring Using Image Analysis Algorithms: A tool For Quality Control To Discriminate Epithelial Regenerative Capacity of Oral Keratinocytes.
3. 学会等名 TERMIS-AM (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞の品質評価方法, 品質評価システム及び品質評価プログラム	発明者 泉 健次, 干川絵美, 佐藤大祐, 木森義隆	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-149488	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	難波 大輔 (Nanba Daisuke) (10380255)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授 (12602)	
研究分担者	木森 義隆 (Kimori Yoshitaka) (10585277)	福井工業大学・環境情報学部・准教授 (33401)	
研究分担者	飛田 成史 (Tobita Seishi) (30164007)	群馬大学・大学院理工学府・教授 (12301)	
研究分担者	佐藤 大祐 (Sato Daisuke) (70778703)	新潟大学・研究推進機構・特任助教 (13101)	
研究分担者	加藤 寛子 (Kato Hiroko) (70749994)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関