

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 27日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2011～2012

課題番号：23659912

研究課題名（和文）細胞形態の画像解析による骨髓間質細胞の新たな品質管理システムの構築

研究課題名（英文）Development of a novel quality assurance system for bone marrow stromal cells using morphology-based prediction.

研究代表者

各務 秀明 (Kagami Hideaki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80242866

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、新たな品質管理システムを開発することである。初めに、最新の細胞画像解析技術を用いて分化誘導中の細胞画像から増殖曲線、細胞面積、外部刺激に対する細胞面積変化、回転運動等の細胞特徴量とその経時的変化を記録した。これらの評価を生化学的、分子生物学的機能的評価の結果と対比させることで、培養細胞の分化度や機能異常を検知する細胞診断の基準を決定し、細胞診断ソフトウェアを開発した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to test the feasibility of morphology-based prediction system of osteogenic differentiation. First, cell morphology was continuously recorded and analyzed with a latest computed system. These data were compared with the results from biochemical assays and potential indices to predict cell differentiation status and functional abnormality were selected. A software was developed using those indices.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・再生歯学

キーワード：移植・再生医療、細胞・組織、トランスレーショナルリサーチ、再生医学、情報工学

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療は基礎研究から実用化を視野に置く段階になっており、細胞を用いた治療に問題が発生した場合には、これまで以上の大きな影響を与えることが懸念されるため、治療用細胞の品質管理は、まさに待つことのできない課題である。中でも目的とする細胞であることの確認やがん化の検出に関する品質管理技術が重要であるが、その基盤となる技術や理論的根拠は確立されていない。これまではサンプリングにより抽出細胞を用いた破壊的検査を行い、遺伝子発現、蛋白発現による品質管理が行われてき

た。さらに厳密な検討のためには移植実験などによる確認が必要であった。しかしながら、これらの検査には時間が必要であり、また検査費用も高額とならざるを得ない。従来熟練した研究者は、細胞の形態や増殖傾向等の挙動から異常を検知していた。細胞の種類による形態的特徴や、分化誘導による形態変化は経験的には知られているものの、客観的評価が可能な数値的目標とはなっていなかった。われわれは、医工連携により開発された最新の画像解析技術を用いて、画像の数値化と多変量解析により細胞増殖能を予測するプログラムの開発を行

ってきた(加藤他、2008)。さらに、予備実験の結果からは、細胞の分化誘導による形態変化は、画像中の細胞特徴量により定量的に評価可能である可能性が示唆されている。これらの経験から、細胞の画像から複数の指標を解析することにより、細胞の種類や分化度など培養細胞の品質管理に必要とされる非侵襲的細胞診断技術の開発が可能と考えた。また、われわれの研究室では骨再生の臨床研究を行っており(H16より)、本研究の成果を活用することが可能である。

## 2. 研究の目的

再生医療の実用化には、治療効果のみでなく目的とする細胞が培養されたかどうか、あるいは治療効果を持つ細胞へと分化させたことの確認など細胞の品質管理が重要となる。しかしながら、品質管理を中心とした実用化支援技術の開発は遅れている。培養細胞の品質管理には、通常サンプリングによる破壊的検査が行われるが、本来は移植される細胞に対する非侵襲的な評価方法の開発が望まれる。これまでの研究から、細胞の形態は種類によって異なり、また分化誘導によって変化することが示唆されている。熟練者は経験的に細胞の形態から状態を判断しているが、明確な数値基準などは示されていない。本研究の目的は、細胞の画像と最新の画像解析技術を応用することにより、細胞の種類や分化度を評価する新たな品質管理システムを開発することである。

## 3. 研究の方法

本申請では、骨再生に用いられる骨髄間質細胞(BMSCs)を対象として、細胞の骨分化の程度や骨再生能を細胞画像から予測する解析するモデルを構築する。はじめにボランティアのBMSCsを画像撮影装置を内蔵した細胞培養装置にて培養し、分化誘導因子を添加した群、および非添加群に分け、それぞれの細胞の連続画像撮影を行った。次に、それぞれの細胞の骨分化の指標としてアルカリフォスファターゼ(ALP)活性とカルシウム沈着量、移植後の骨形成量を解析した。これら従来から用いられてきた骨分化の指標や実際の骨形成の程度と画像解析データとをバイオインフォマティクス的手法を用いて解析し、それぞれの指標を事前に画像データから予測するための統計学的モデルを構築した。さらに、このモデルを実際に骨再生の臨床研究にて用いる細胞へと適応することで、細胞の品質管理システムへの応用の

可能性についても検討した。

(1) BMSCsの分化誘導過程における画像データの取得と骨分化マーカーの解析

ボランティア(3名)より採取した骨髄液を用いて、BMSCsの培養を行った。ヒトBMSCsの画像解析については、既に東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認済みである(21-66-0304)。継代後の細胞を150mlフラスコへ播種し、細胞を培養しながら連続して画像を撮影することのできる装置(BioStation CT,ニコンインスティック)にセットし、連続撮影を行う。

次にそれぞれの細胞について骨分化の指標であるALP活性、カルシウムの沈着量を測定した。

(2) 画像データの解析と統計学的解析  
分化誘導中の画像と骨分化マーカーや移植後の骨形成能との相関を統計学的に解析にした。

具体的な手順は以下の通りである。

① 写真画像の二値化とノイズ除去

② ソフトウエア(Metamorph, Molecular Device)による細胞特徴量の解析

細胞面積、長軸長、短軸長、楕円形度等120項目を解析に用いた。

③ 変動係数による有効変数の絞り込み  
細胞間によるばらつきを考慮して、変動係数が30以下の有効な変数に絞り込んだ。

④ 細胞特徴量を用いた多変量解析

③にて絞り込んだ各項目を経時的に解析し、分化誘導群に特徴的に表れる変化量を選択した。次に、選択された変化量と細胞機能としてのALP活性、カルシウム沈着量、in vivo骨形成量との相関をMultiple Regression Analysis(MRA), Classification and Regression Trees(CART)を用いて解析し、これらの指標の予測に最適なモデルを構築した。

(3) 画像解析情報による新規細胞の機能予測

平成23年度の研究により作成された細胞画像によるBMSCsの分化予測プログラムを用いて、未知の細胞の機能予測が可能かどうかを検証した。具体的にはボランティア(3名)から骨髄穿刺を行い、われわれの開発した培養プロトコル(Agata et al., Tissue Eng. 2010)に従ってBMSCsの培養を行った。1継代の細胞を用いて分化誘導時の画像撮影と解析を行い、ソフトウエア上での予測ALP値、カルシウム沈着量、および移植後のin vivo骨形成能の予測の正確性に

ついて検討を行った。

(4) 細胞の画像解析による BMSCs の品質管理プログラムの作成  
画像解析による細胞の分化予測プログラムは、広くは再生医療に用いる細胞の品質管理プログラムの一部と考えることができる。平成 24 年度には、分化予測プログラムを応用して、細胞の品質管理に必要とされる情報(目的とする細胞が培養されているかどうか—細胞の同一性の検討、細胞の規格化に関する検討—骨形成能を持つ細胞へと分化しているかどうか)が検出可能かどうか検討した。

#### 4. 研究成果

初めに、最新の細胞画像解析技術を用いて分化誘導中の細胞画像から増殖曲線、細胞面積、外部刺激に対する細胞面積変化、回転運動等の細胞特微量とその経時的变化を記録した。これらの評価を生化学的、分子生物学的機能的評価の結果と対比させることで、培養細胞の分化度や機能異常を検知する細胞診断の基準を決定し、細胞診断ソフトウェアを開発した。次に、この非侵襲的細胞診断技術を用いて、実際の臨床研究における品質管理に用いて、その有用性を検証した。骨分化は複雑な現象であり、当初限られたパラメーターのみで正確な予測は困難であった。しかしながら、ridge regression model を用いることにより、未知サンプルの ALP 活性を、画像情報のみから 20%未満の誤差で予測できることが示された。本研究により、実際の臨床においても細胞画像のみから骨分化度を推測することは可能と考えられた。本研究の成果は論文として公表した(文献 1. Matsuoka et al., Pros One in press)。

#### 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 16 件)

- (1) Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. Plos One (査読有) in press doi: 10.1371/journal.pone.0055082..
- (2) Agata H, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, Sumita Y, Tojo A, Kagami H. Characteristic differences among osteogenic cell populations of rat bone

marrow stromal cells isolated from untreated, hemolyzed or Ficoll-treated marrow. Cytotherapy. (査読有) 2012 14(7):791-801. doi: 10.3109/14653249.2012.674639

- (3) Inoue M, Ebisawa K, Itaya T, Sugito T, Yamawaki-Ogata A, Sumita Y, Wadagaki R, Narita Y, Agata H, Kagami H, Ueda M. Effect of GDF-5 and BMP-2 on the expression of tendo/ligamentogenesis-related markers in human PDL-derived cells. Oral Dis (査読有) 2012;18:206-212 doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01871.x.

- (4) Ebisawa K, Kato R, Sugimura T, Latif MA, Hori Y, Narita Y, Ueda M, Honda H, Kagami H. Gingival and dermal fibroblasts: their similarities and differences revealed from gene expression analyses. J Biosci Bioeng (査読有) 111:255-258, 2011 doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.11.014..

- (5) Kato R, Iejima D, Agata H, Asahina I, Okada K, Ueda M, Honda H, Kagami H\*. A compact, automated cell culture system for clinical scale cell expansion from primary tissues. Tissue Eng Part C Methods (査読有) 16:947-956, 2010 doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0305..

- (6) Tonomura A, Mizuno D, Hisada A, Kuno N, Ando Y, Sumita Y, Honda MJ, Satomura K, Sakurai H, Ueda M, Kagami H\*. Differential effect of scaffold shape on dentin regeneration. Annals Biomed Eng (査読有) 38:1664-1671, 2010 doi: 10.1007/s10439-010-9910-z.

- (7) Mizuno H, Kagami H\*, Mase J, Mizuno D, Ueda M. Efficacy of membranous cultured periosteum for the treatment of patients with severe periodontitis: A proof-of-concept study. Nagoya J Med Sci (査読有) 72:59-70, 2010 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20229704>.

- (8) Suzuki S, Narita Y, Yamawaki A, Murase Y, Satake M, Mutsuga M, Okamoto H, Kagami H, Ueda M, Ueda Y. Effects of extracellular matrix on differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage: Utility for cardiovascular tissue engineering. Cells Tissues Organs (査読有) 191:269-280, 2010 doi: 10.1159/000260061..

- (9) Ohara T, Itaya T, Usami K, Ando Y, Sakurai H, Honda MJ, Ueda M, Kagami H\*. Evaluation of scaffold materials for

tooth tissue engineering. J Biomed Mater Res A (査読有) 94:800-805, 2010 doi: 10.1002/jbm.a.32749..

(10) Sumita Y, Honda MJ, Ueda M, Asahina I, Kagami H\*. Differential effects of growth differentiation factor-5 on porcine dental papilla- and follicle-derived cells. Growth Factors (査読有) 28:56-65, 2010 doi: 10.3109/08977190903373380..

(11) Agata H, Asahina I, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H\*. Characteristic change and loss of in vivo osteogenic abilities of human bone marrow stromal cells during passage. Tissue Engineering Part A (査読有) 16:663-673, 2010 doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0500..

(12) Mizuno M, Agata H, Furue H, Kimura A, Narita Y, Watanabe N, Ishii Y, Ueda M, Tojo A, Kagami H\*. Limited but heterogeneous osteogenic response of human bone marrow mesenchymal stem cells to bone morphogenetic protein-2 and serum. Growth Factors (査読有) 28:34-43, 2010 doi: 10.3109/08977190903326362..

(13) Okamoto H, Hata K-I, Kagami H\*, Okada K, Ito Y, Narita Y, Hirata H, Sekiya I, Otsuka T, Ueda M. Recovery process of sciatic nerve defect with novel bioabsorbable collagen tubes packed with collagen filaments in dogs. J Biomed Mater Res A (査読有) 92:859-868, 2010 doi: 10.1002/jbm.a.32421..

(14) Agata A, Sumita Y, Asahina I, Tojo A, Kagami H, Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery. Histol Histopathol (査読有) in press <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23629696>.

(15) Kagami H., Agata H, Tojo A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. Int J. Biochem. Cell Biol. (査読有) 43:286-289, 2011 doi: 10.1016/j.biocel.2010.12.006..

(16) Kagami H\*, Agata H. The potential of somatic stem cells for alveolar bone tissue engineering. Int. J. Oral-Medical Sci. (査読有) 9:1-10, 2010 <https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=delijoms&vo=9&nu=1>.

[学会発表] (計 12 件)

(1) Kagami H. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. Thursday, February 28, 2013 Potential Applications of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, NIDCR, NIH

(2) Kagami H. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. The Second Chinese National Conference on Oral Maxillofacial Development and Regeneration July 28-31, 2011 in Wuyishan city, Fujian Province, China. 1.

(3) 各務秀明、縣秀樹、住田吉慶、朝比奈泉 歯槽骨・唾液腺の再生研究今後の展開 第12回日本再生医療学会総会 シンポジウム5「歯科における再生医療の将来」2013.3.19-21 横浜

(4) 各務秀明 「骨再生医療の現状と展望について」第57回日本口腔外科学会総会・学術大会 シンポジウムI 歯・歯周組織・骨の再生医療 2012.10.19-21 横浜

(5) 各務秀明 「自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞による歯槽骨再生スーパー特区:「医工連携による先進医療機器の実用化プロジェクト」第三回シンポジウム、\*文部科学省橋渡し研究支援推進プログラム:「先端医療の開発支援拠点形成と実践」第五回シンポジウム、2012年2月28日、東京大学医学部附属病院

(6) 各務秀明 「再生医療における品質管理の課題:歯槽骨再生治療について」日本臨床試験研究会第3回学術集会総会 分科会:再生医療 「再生医療と規制」2012年2月24日(金)福岡国際会議場 第1会場 501室

(7) 各務秀明 「骨髄細胞を用いた骨再生とインプラント治療」バイオインテグレーション学会第2回学術大会・総会 東京医科歯科大学 2012.1.29

(8) 各務秀明 「歯からはじまるアンチエイジングインプラントと骨の再生医療」第12回市民公開医療懇談会、2011.7.28、東京大学医科学研究所附属病院

(9) 各務秀明 「実用化を目指した新たな歯槽骨再生臨床研究の開始について」第10回松本ボーンフォーラム、2011年5月28日、松本歯科大学30周年記念棟

(10) 各務秀明:自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞による歯槽骨再生スーパー特区:「医工連携による先進医療機器の実用化プロジェクト」第三回シンポジウム 文部科学省

橋渡し研究支援推進プログラム：「先端医療の開発支援拠点形成と実践」第五回シンポジウム 2011年2月28日，東京大学医学部附属病院

(11) 各務秀明「ヒト幹細胞指針に基づいた臨床研究とネットワーク構築によるトランスレーショナルリサーチの展開」日本再生歯科医学会 シンポジウム 自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生治療：鶴見大会館メインホール 2010.12.11

(12) 加藤竜司 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 2012.6.12

〔図書〕(計3件)

(1) Kagami H, Agata H, Sumita Y, Tojo A. Heterogeneous responses of human bone marrow stromal cells (multipotent mesenchyme stromal cells) to osteogenic induction. Ed. Hayat MA, Stem Cells and Cancer Stem Cells: Therapeutic Applications in Disease and Injury, Volume 2, Springer 2011.

(2) Kagami H, Agata H, Kato R, Matsuoka F, Tojo A. Fundamental technological developments required for increased availability of tissue engineering. Ed. Regenerative Medicine and Tissue Engineering: From Cells to Organs. Intech 2011

(3) Kagami H, Agata H, Satake M, Narita Y. Considerations on designing scaffold for soft and hard tissue engineering. Ed. Gilson Khang. The Handbook of Intelligent Scaffold for Regenerative Medicine Pan Stanford Publishing 2011

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

各務 秀明 (KAGAMI HIDEAKI)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：80242866

### (2)研究分担者

加藤 竜二 (KATO RYUJI)  
名古屋大学・創薬科学研究科・准教授  
研究者番号：50377884

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：