

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18453

研究課題名（和文）培養滑膜幹細胞の画像解析および形態から得られる情報と生物学的情報の統合解析

研究課題名（英文）Integrated analysis for information derived from morphology and biological information of cultured synovial stem cells

研究代表者

水野 満（Mizuno, Mitsuru）

東京医科歯科大学・統合研究機構・プロジェクト助教

研究者番号：00733908

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：我々がヒト臨床試験で投与している滑膜幹細胞は、軟骨分化能が高く、膝関節の他の組織と発生学的に類似していることから、優れた臨床細胞ソースである。本研究の目的は、滑膜幹細胞の培養位相差画像における細胞形態情報と、増殖・分化能や遺伝子発現プロファイルなどの細胞生物学的解析を統合したデータベースを構築し、再生医療技術の実用化における製造安定性の向上を図ることである。

解析用の細胞画像は、様々な条件下で連続的に取得した。さらに、新規開発した撮像機を用いて深層学習による細胞画像の認識を行い、チャンバー法による細胞カウントや細胞の蛍光染色による細胞数計測といった従来の方法と同等の細胞認識精度を実現しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、代表者が実施している臨床用滑膜幹細胞の製造工程管理の簡便化を目指し、細胞の増殖性、特性を予測可能な画像解析技術を開発することを目的とし、細胞画像を用いた統合解析を行った。これまでに本研究課題を通して申請者が開発してきた画像解析技術（特開2021-193880、特開2022-173309）、本研究課題で取得する細胞形態に関するデータ、特性などの細胞生物学的な解析結果を統合し解析することで、主要因子を探索した。本研究は形態と機能を統合した科学的に根拠のある画像解析技術を開発し、再生医療の臨床現場で妥当性を検証することで実用性を高めることが可能であるなど、極めて学術的意義の高い研究である。

研究成果の概要（英文）：Synovial stem cells, which we have administered in human clinical studies, are an excellent clinical cell source because they have high chondrogenic differentiation potential, are embryologically similar to other tissues in the knee joint. The purpose of this study is to construct a database integrating cell morphology information in culture phase contrast images of synovial stem cells and cell biology analyses such as proliferative and differentiation potential and gene expression profiles, and to attempt to improve manufacturing stability in the practical application of regenerative medicine technology. Cell images were continuously acquired and analyzed under various conditions. Moreover, we conducted deep learning to recognize cell images using a newly developed alternative to the phase contrast microscope, and achieved cell recognition accuracy equivalent to that of conventional methods such as cell counting by the chamber method and cell counting by fluorescent staining of cells.

研究分野：再生医療実用化

キーワード：再生医療実用化 画像解析

1. 研究開始当初の背景

培養経験の豊富な研究者は、細胞の形態情報から状態の良し悪しを見極めることができると言われている。実際、継代数が進むことで生じる細胞老化を形態情報から推測することも可能になっている。さらに、近年、これらの考えを裏付けるように細胞形態の主要因子である Actin が、分化性と関連することが多く報告されている (Ikeda et al., *Nature Communications*, 9:1387, 2018., Nobusue et al., *Nature Communications*, 5:3368, 2014)。しかし、間葉系幹細胞での形態情報と機能解析に関する報告は、脂肪分化能や骨分化能との関連解析にとどまり (Sen et al., *Stem Cells*, 2017)、滑膜幹細胞を用いた軟骨分化能への影響に関する報告は皆無であった。そこで本研究では、滑膜幹細胞の形態と特性 (増殖能・分化能) の関連性を明らかにするため、滑膜幹細胞の細胞形態情報を取得した細胞で、その細胞生物学的な解析を詳細に行うことを研究開始当初の背景としていた。

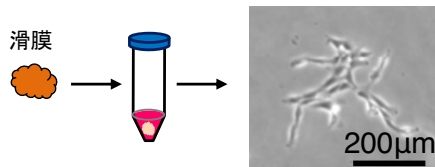
2. 研究の目的

我々が使用している滑膜幹細胞は高い軟骨分化能を有し、臨床的に優れた細胞ソースである (Sekiya et al., *Clin Orthop Relat Res.* 473(7), 2015)。本研究の目的は、申請者が実施している臨床研究用滑膜幹細胞の製造工程管理を簡便にするために、細胞の増殖性、特性を予測可能な画像解析技術を開発することである。本研究では、申請者が独自に開発した画像解析技術や、新たに本研究課題で取得する細胞形態に関するデータ、特性などの細胞生物学的な解析結果を統合し解析することで、主要な因子を探索する。さらに、進行中の臨床研究での治療成果が取得でき、*in vitro* データとの補完が可能である。以上より、本研究は形態と機能を統合した科学的に根拠のある画像解析技術を開発し、再生医療の臨床現場で妥当性を検証することで実用性を高めることが可能であるなど、極めて独自性が高い研究である。

3. 研究の方法

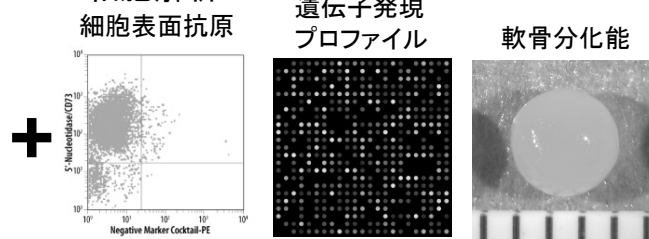
画像解析システムの信頼性は教師ありデータの質に依存することから、良質な統合データベースを構築する。画像データとして、臨床検体滑膜から細胞を分離し、タイムラプス顕微鏡で画像を取得した。また、細胞解析データとして、細胞表面抗原、遺伝子発現プロファイル、軟骨分化能等のデータを取得した。

細胞形態画像の取得



滑膜から細胞を分離し、タイムラプス顕微鏡で画像を取得

細胞解析



培養した滑膜の機能を解析

・画像データ取得

本研究は、倫理委員会により承認され、すべての被験者が書面によるインフォームドコンセントを得た検体を使用している。ヒト滑膜からの細胞分離は、人工膝関節全置換術を受けた変形性関節症のドナー膝から採取された。滑膜組織は、3mg/mL のコラゲナーゼの溶液中に 37°C で消化した。3 時間後、消化した細胞を 70 µm のセルストレーナーでろ過し、1% の抗生物質-抗真菌剤および 10% の牛胎児血清を添加した α -Minimal Essential Medium で培養し、37°C、5% の CO₂ インキュベータにおいて培養を行った。自動セルカウンターを用いて細胞をカウントし、有核細胞数を求めて播種した。画像データの取得は、有核滑膜細胞を 6 ウェルプレートに 20 細胞/cm² で播種し、14 日間培養することで撮影を行った。コンピュータによるマルチエリアタイムラプスイメージングシステム (IX83ZDC ; オリンパス) を用いて、ウェル全体をタイムラプス顕微鏡でスキャンした。画像は 6 時間ごとに 14 日間取得し、画像解析ソフトウェアを用いてタイムラプスムービーとして再構成された。位相差画像からの細胞認識は、複数の画像処理により実施した。細胞の縁にハレーションがあり、中心が周囲の背景より暗い画像を画像解析用に最適化し、背景の明るさの階調を調整した。次に、位相差画像から画像フィルターを用いて細胞の形状を復元し、復元した形状を二値化して細胞の形状を特定した。複数のフレームで同じ位置にある物体を生きた細胞と定義し、デブリのように急激に動く物体は画像ノイズと定義した。

細胞の質を評価するために、細胞コロニーを解析することとした。コロニーの定義として、本解析では直径 $320\mu\text{m}$ (80 ピクセル) 内に最低 4 個の細胞を含む細胞集団として定義した。その後、同定されたコロニーは、“merged” または “non-merged” のいずれかとして特徴づけられた。コロニー間の最も近い細胞間隔が $100\mu\text{m}$ 未満である場合、両方のコロニーはマージされたコロニーとみなされ、分析から除外された。逆に、合併していないコロニーを非合併コロニーと定義した。これら細胞の認識に誤りがないかを評価するため、位相差細胞像と蛍光細胞像の等価性評価を実施した。培養初期、後期の滑膜幹細胞を、リン酸緩衝生理食塩水で $1:5000$ に希釈した DAPI により核染色した。その後、複数ドナーに由来する複数ウェルから位相差画像と核染色画像を取得し、画像解析ソフトで 145 のコロニーについてコロニーあたりの細胞数をカウントした。培養初期と後期の位相差画像の細胞数と核染色画像の細胞数との決定係数 (R^2) を回帰分析により算出した後、対数変換した。

各コロニーの質が細胞の質と関連すると仮定し、各コロニーにおける成長曲線を分類することとした。 140 のコロニーについて、培養初期から後期まで、コロニーあたりの細胞数の連続した成長測定値を解析した。差が大きかったため、コロニーあたりの細胞数を平方根値に変換し、差を小さくした。クラスター解析は、R ソフトウェアと最遠点近傍法を使用して行った。コロニーの形態的特性を明確にするために、コロニーを構成する細胞の長軸および細胞間の距離を定義した。長軸は、関心領域と同じ正規化第二中心モーメントを持つ楕円の長軸の長さを用いて算出した。コロニーを形成するすべての細胞の長軸の平均をコロニーのデータとして定義した。細胞間の距離は、まず、認識された各細胞領域における個々の画素座標の X 値および Y 値を平均することによって重心を決定することによって確立した。次に、すべての点を結ぶ三角形が最小の角度を最大にするように作成するドロネー三角測量法を用いて、細胞の重心を接続した。そして、コロニー内の細胞間の全距離の平均を算出した。

また、画像から得られるデータをより拡充するために細胞の機能解析として、細胞の凍結耐性に関する解析および、臨床用の細胞の安全性に関する解析を実施した。

4. 研究成果

我々は、滑膜幹細胞の培養タイムラプス画像を用いて、個々のコロニーを区別し、コロニーあたりの細胞数を自動的にカウントすることができるソフトウェアを開発した。本研究では、本ソフトウェアの有用性を検討し、培養した滑膜幹細胞のコロニー形成の解析を行った。

14 日間培養したヒト滑膜 MSC について、タイムラプス画像データを取得した(図 1)。コロニーあたりの細胞数 (145 コロニー分) は、位相差および核染色画像から自動的にカウントされた。

ついで、位相差画像を白黒画像に変換し(図 2A)、その後、コロニーあたりの細胞数をカウントした。この方法の正確さは、培養初期、後期に DAPI で染色した滑膜幹細胞を用いて得られた細胞数との比較によって検証された。この 2 つのカウントは高い相関性を示した(図 2B)。

コロニーあたりの細胞数の成長曲線とその分類を解析し、成長曲線を作成した(図 3)。クラスター解析の結果、成長曲線は大 1 群、大 2 群、中 1~中 4 群、小群に分類された(図 3A)。 14 日目のコロニーあたりの細胞数は、大-1 グループが最も多く、小グループが最も少なかった(図 3B)。培地グループにおいて、 14 日目のコロニーあたりの細胞数の順位は、培地-1 > 培地-2 ≒ 培地-3 > 培地-4 であった。中 2 群と中 3 群は、対数増殖期が中 3 群より中 2 群の方が早いことで区別された。

図 1 : タイムラプス画像データ

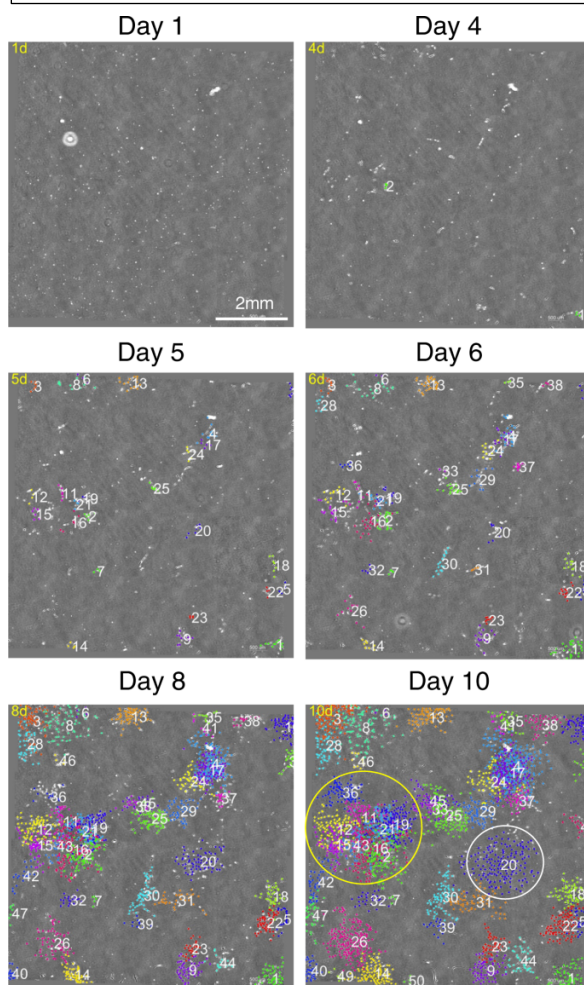


図2：位相差像の細胞認識精度

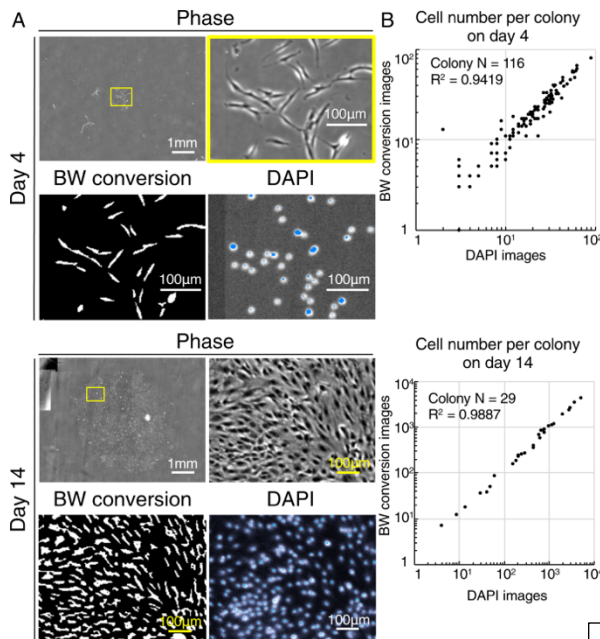
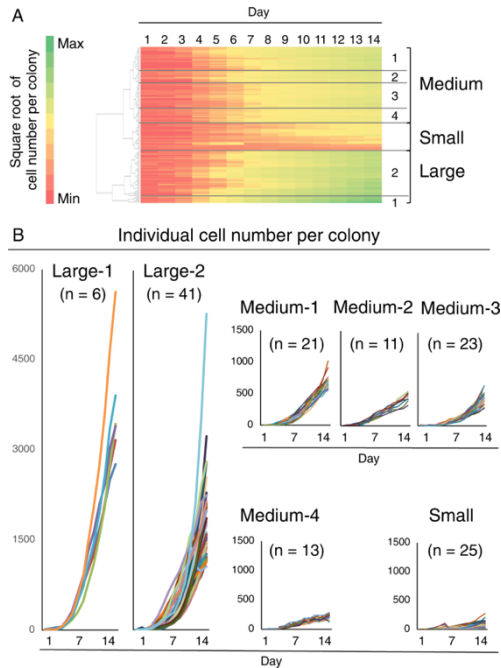


図3：コロニーあたりの成長曲線



14日目のコロニーは、大1群が最も大きく、小1群は最も小さかった（図4A）。白黒変換した画像では、細胞コロニーの形態的な違いが明確になった（図4B）。細胞の長軸は各コロニー群で違いは見られなかったが、細胞間の距離は小コロニー群で他の群に比べ有意に広がった（図4C、D）。

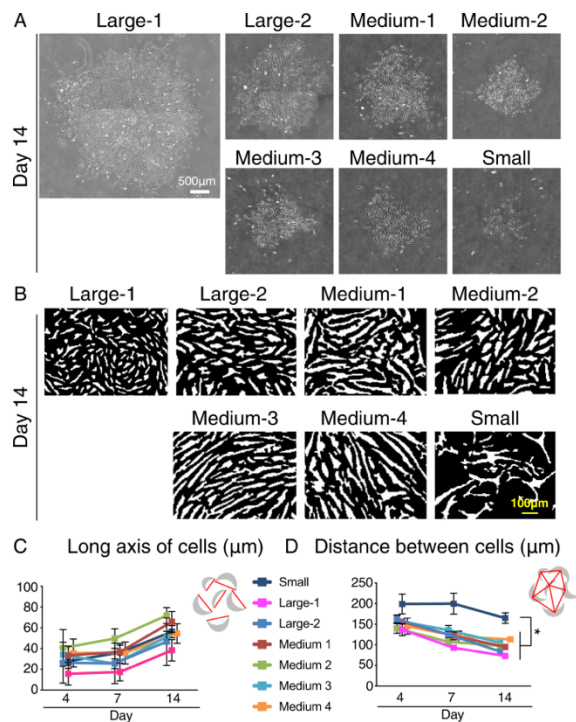
本研究の成果は、細胞の形態データから増殖の評価をすることが期待でき、滑膜幹細胞を用いた臨床応用を成功させる可能性を有している。

また、細胞の機能をより詳細に解析するために実施した細胞の凍結耐性および安全性に関する解析については、それぞれ成果を英文雑誌に報告した。

凍結耐性の解析では、高い凍結耐性を有する滑膜幹細胞の生物学的・物理的要因を明らかにし、本研究課題の推進に資することを目的として実施した。滑膜幹細胞では、凍結保護剤であるDMSOへの反応が乏しかったが、凍結耐性の弱い細胞では、生細胞率が低下し、細胞外小胞に関連する遺伝子発現が大きく変動した。また、流動性測定により、滑膜幹細胞では、流動性が低く、凍結保護剤に対する反応性が乏しいことがわかった。また、滑膜幹細胞は抗酸化機能も高かった。これらの基礎データを画像データと統合解析を実施している。

また、細胞の安全性解析では、変形性膝関節症由来患者の滑膜組織で認められる核型異常を有する細胞の評価を実施した。これら解析では、クローン解析、軟寒天コロニー形成試験、造腫瘍性などの機能解析を実施した。その結果、核型異常を有する細胞に機能異常を認めなかった。これらの基礎データについても、画像データとの統合解析を予定している。

図4：コロニーのサブグループの相互解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kohno Yuji, Mizuno Mitsuru, Endo Kentaro, Ozeki Nobutake, Katano Hisako, Matsumoto Mikio, Kaneko Haruka, Takazawa Yuji, Koga Hideyuki, Sekiya Ichiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Yields of mesenchymal stromal cells from synovial fluid reflect those from synovium in patients with rheumatoid arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 101727 ~ 101727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2021.101727	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 -

1. 著者名 Mizuno Mitsuru, Endo Kentaro, Katano Hisako, Tsuji Ayako, Kojima Naomi, Watanabe Ken, Shimizu Norio, Morio Tomohiro, Sekiya Ichiro	4. 巻 15
2. 論文標題 The environmental risk assessment of cell-processing facilities for cell therapy in a Japanese academic institution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0236600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0236600	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 -

1. 著者名 Mizuno Mitsuru, Katano Hisako, Shimozaki Yuri, Sanami Sho, Ozeki Nobutake, Koga Hideyuki, Sekiya Ichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Time-lapse image analysis for whole colony growth curves and daily distribution of the cell number per colony during the expansion of mesenchymal stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53383-z	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 -

1. 著者名 Mizuno Mitsuru, Matsuzaki Takahisa, Ozeki Nobutake, Katano Hisako, Koga Hideyuki, Takebe Takanori, Yoshikawa Hiroshi Y., Sekiya Ichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Cell membrane fluidity and ROS resistance define DMSO tolerance of cryopreserved synovial MSCs and HUVECs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-022-02850-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Mitsuru, Endo Kentaro, Katano Hisako, Amano Naoki, Nomura Masaki, Hasegawa Yoshinori, Ozeki Nobutake, Koga Hideyuki, Takasu Naoko, Ohara Osamu, Morio Tomohiro, Sekiya Ichiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Transplantation of Human Autologous Synovial Mesenchymal Stem Cells with Trisomy 7 into the Knee Joint and 5?Years of Follow-up	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 1530 ~ 1543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.20-0491	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Mitsuru, Yori Kouichirou, Takeuchi Toshikazu, Yamaguchi Tetsuya, Watanabe Ken, Tomaru Yasuhiro, Shimizu Norio, Sekiya Ichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Cross-contamination risk and decontamination during changeover after cell-product processing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 30 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.12.003	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno Mitsuru, Matsuda Junpei, Watanabe Ken, Shimizu Norio, Sekiya Ichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of disinfectants and manual wiping for processing the cell product changeover in a biosafety cabinet	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 169 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2023.01.009	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水野 満、前田 賀隆、佐波 晶、関矢 一郎
2. 発表標題 模様シートを介在させた家庭用スキャナーによる培養細胞の非侵襲的全数測定
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 細胞観察画像撮影装置、および細胞観察画像取得方法	発明者 前田 賀隆、佐波 晶、水野 満、関矢 一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2021-193880	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 増殖予測方法、増殖予測装置およびプログラム	発明者 下崎 ゆり、佐波 晶、水野 満、関矢 一郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特開2022-173309	出願年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------