

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630427

研究課題名(和文) 万能細胞培養技術標準化のための培養経過全貌のFingerprint評価法

研究課題名(英文) Total culture fingerprint evaluation method for standardization of multi-potent stem cell culture

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞などの多能性幹細胞は、高度な培養技術を必要としており、現状は熟練者の培養スキルに依存している。今後このような幹細胞を広く活用するには「最適な培養法の標準化」が必須であり、そのためには細胞培養工程全体の数値化法の開発が急務である。本研究では、iPS細胞をモデル細胞として、未分化能との関連が深いことが知られるiPSコロニー形について、全コロニー・全履歴の形態情報の変化を数値化・可視化する手法「Total Culture Fingerprint法」を開発した。これによって培養工程の各種ストレスと、これに関わる幹細胞の品質低下とコロニー形態の変化について定量的なモデル化が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Pluripotent stem cells, such as iPS cells, require highly trained culture skills, therefore the present cell culture production process greatly rely on experts' skills and experiences. To widely distribute the stem cell technology, the quantitative understanding and standardization is essential. In this study, we have developed an image-based profiling method, "Total culture fingerprint", to record and monitor the quality changes during their culture. By our method, we have found that the stress levels and effects on disturbance of iPS cellular quality can be monitored and modeled by real-time analysis of their colony morphologies, which are known to be an indicator of their quality change.

研究分野：医療支援工学

キーワード：再生医療 標準化 幹細胞 細胞培養工程 画像処理 数値化 iPS細胞 細胞品質

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS 細胞など万能細胞の応用は、創薬薬剤評価や革新的臨床治療など実用的応用が急速に進んでいる。しかしながら、多くの万能性細胞は、通常のがん細胞や正常細胞に比べて、培養が極端に難しく、どこの施設でも研究できる対象では無い。この原因は、万能細胞の日々の品質を見極める「コロニー状態の目利き技術」があまりにも職人的で、数値的に標準化できていなかったことに一因がある。

しかし現存する細胞評価手法の多くは破壊的であるため、培養方法は「結果論の評価 (= エンドポイント評価)」でしか評価されて来なかった。培養経過が「評価できないブラックボックス」であることは、「培養の上手・下手を生む原因」が未だに特定できていない原因の一つであり、標準化の大きな課題である。この解決のため、世界では再生医療研究ハブ期間 (英、Peter Andrews) Stem Cell Initiative (Fiona Watt)、Ontario Stem Cell Consortium (Peter Zandsra)、NIH などが技術標準化を進めている。しかし、やはり侵襲的な評価の「途中過程を連続評価できない」という欠点は致命的で、最終結果を左右する「途中のミス」「現状を回復する上手いスキル」の原因究明ができないということから細胞培養工程や手技は科学的に証明・理論化されてきておらず、定量的な理論は極めて少ない。

本研究は、長年の細胞培養工程管理の考え方を改革し、容器内の全細胞の全培養履歴を評価できる「Total Culture Fingerprint 法」を開発するものである。これは、申請者・加藤の iPS コロニーの画像解析技術を応用した「容器内全ての万能細胞コロニー生育履歴の指紋化法」の提案であり、培養経過を最初から最後まで数値化することで、培養標準化と培養法選択や教育指導を支援するものである。

申請者・加藤は、2012~2013 NEDO 「ヒト幹細胞産業応用促進基盤技術開発」において、iPS 細胞の培養中において「未分化 iPS コロニーを見分ける画像診断技術」を開発してきた (特許出願中 2013、論文投稿中)。この研究の中で、加藤は「人間の目利き」という感覚的作業を「定量的システム」にしてきた (右上図)。また、既存の画像解析やトラッキング技術に「コロニー形態のバイオインフォマティクス解析」を導入し、容器内の全 iPS コロニーをトラッキング評価できることを確認している (右下図・例示)。

本研究ではこの先行技術を発展させ、これまで数量的記述・評価が不可能だった iPS 細胞培養工程の全貌を指紋化する技術と、その有効性の実証研究を行う。

基盤となる画像解析技術 (1) iPS コロニー認識画像処理法、(2) iPS 細胞の形態情報プロファイリング技術は先行研究で確立済のため、本研究は 経時的に積み上げた

iPS 細胞の「全コロニー全経時のデータ」をいかに情報処理するか、上記情報解析の結果で、細胞培養結果は従来法よりどこまで緻密に評価できるか、を検証する。

本研究によって開発する画像を用いた Total Culture Fingerprint 法の有用性は (連続性) 常時観察可能なこと、や様々な定期間隔の自動スケジュール実行が可能なること、(記録性) 全コロニーの形情報 = 12~25 指標の形態カルテ増殖情報 = トラッキング結果がコンピュータにデータベースとして記録が可能、(網羅性) 容器内の約 90% (メナスカス領域以外) のコロニーを全て評価可能、に加えて (培養経過の定量比較能) 指紋的プロファイルが生成される、ことであろう。

2. 研究の目的

iPS 細胞をはじめとした万能性細胞の多くは、高度な培養技術を要する。このため、これらを医療・産業で広く・安定して利用するには、「最適な培養法の標準化」が必須である。

しかし細胞評価手法の多くは破壊的であるため、培養方法は「結果論の評価 (= エンドポイント評価)」でしか評価されて来なかった。培養経過が「評価できないブラックボックス」であることは、「培養の上手・下手を生む原因」が未だに特定できていない原因の一つであり、標準化の大きな課題である。

本研究は、長年の細胞培養工程管理の考え方を改革し、容器内の全細胞の全培養履歴を評価できる「Total Culture Fingerprint 法」を開発するものである。これは、申請者・加藤の iPS コロニーの画像解析技術を応用した「容器内全ての万能細胞コロニー生育履歴の指紋化法」の提案であり、培養経過を最初から最後まで数値化することで、培養標準化と培養法選択や教育指導を支援するものである。

3. 研究の方法

本研究は、万能細胞培養過程を丸ごと画像的細胞変化から可視化する技術「Total Culture Fingerprint 法」を開発することで、低コストかつ迅速でありながら緻密に細胞培養を標準化可能な革新的融合技術として世界に提案するものである。

この研究は「インフォマティクスの開発」と「実験的開発」の融合研究であるため、

・項目 1 (可視化技術開発): Total Culture Fingerprint 法の開発

・項目 2 (実験的実証) : Total Culture Fingerprint 法の有効性検証

を並行して進める。

本研究では、万能細胞として京大 iPS 株である 201B7 を研究対象として、下記 3 つの培養条件を検証し、本技術が万能細胞培養の標準化に利用できる可能性を示す。

・条件 I: 培養手技の差 (細胞塊形成能、

異常コロニー除去能、酵素処理時間)
・条件 II: プロトコルの差 (培地交換頻度、播種後静置時間、播種密度)
・条件 III: 基礎細胞環境の差 (Feeder 細胞の差、On Feeder/Non-Feeder の差、培地の差)

4. 研究成果

H26 年度は、万能細胞培養過程を丸ごと画像的細胞変化から可視化する TotalCultureFingerprint 法を開発するために、iPS 細胞株 201B7 株を用い、特に (条件 I: 培養手技の差) について複数の条件を検証した。具体的にはこれまで経験的には重要だとされながらも一度も定量評価されたことがなかった「ピペティングによる物理的ストレスの差」「培地交換頻度と量の差」「コロニークリーニングの有無の差」「Rock 阻害剤の添加の有無」に関して、約 2 万枚の位相差顕微鏡画像 (約 96 経時ポイント) の撮影と画像処理、そして、ここから得られるコロニー形態情報とその変化のプロファイルを取得した。さらに、このような僅かな手技やスキルの差で生まれる品質変化を、4 種類の未分化・分化マーカーで最終的には免疫染色し、これを定量評価した結果を蓄積した。解析の結果、わずかな手技の差 (3 条件ともに) は、コロニーの形態変化 (特にテクスチャ情報の変化) とその増殖率の変化として現れることがわかったため、これを同時に表現できる新規可視化法として、描画のための各種条件の最適化後、TotalCultureFingerprint 法アルゴリズムとして完成させることに成功した。この図示法は、細胞の形、増殖率を全て同じ図の中に変化量として表現することができ、大量のコロニーの形状評価として様々な条件の比較が定量的に行える技術となった。この技術によって、これまでは別々な情報かつ「バルク = ヘテロ性のわからないひとまとめの情報」であった iPS コロニーの培養中の変化を、両方合わせながら評価可能かつ、集団の中に現れるヘテロ性の評価が可能となった。また、本解析を通じて iPS 細胞株の品質評価において増殖率という観点が重要かつ有効であることが示された。培養容器中の全コロニーの全履歴をプロファイリングすることによって、我々は培養中に生じる大小のコロニーサイズ、培養中のコロニー形成時期など、様々なファクターが異なるコロニーのほとんどにおいて、増殖率 (倍加率) というパラメータは極めて安定している確率が高いことを発見した。培養途中に形成されるコロニーと培養初期に形成されるコロニーは、その後のパラクリンやオートクリンの効果から、培養状態や生育は異なっているのではないかと長らく考えられてきていたが、我々のデータはそれを観察と定量化によって科学的に検証できたと言える。また、言い換えれば、これだけ安定している増殖率というパ

ラメータにおいて、それが変異するコロニーの多くは統計的に希少であるため、品質として逸脱している確率は高く、履歴を全て解析することによってそのようなパラメータの変化が形態 (コロニー形状) とも強く相関していることが示された。即ち形態パラメータと増殖パラメータは共に影響しあっているパラメータでもあるため、本開発方である TotalCultureFingerprint 法を用いてこそ、細胞集団の中の品質変化をデリケートに表現・評価できる可能性が高いことが示唆されたと言える。

H27 年度 (最終年度) では、昨年度に確率した TotalCultureFingerprint 法を用い、いくつかの条件を絞り込む必要があったが、培養技術の最適化に必要な実験項目や、可視化技術の科学的意味の解明について検証を行った。具体的には、条件 I (培養手技の差) として細胞塊の砕き方と異常コロニー除去能について、条件 II (プロトコルの差) として播種密度の差について、条件 III (基礎培養環境の差) として On Feeder/Non-Feeder の差、および、コーティング剤 (ビトロネクチン・iMatrix) の影響について、201B7 株における応答性およびリアルタイムの培養プロファイルの差を定量的に比較し、Fingerprint 法の汎用的な有効性について確認すると共に、研究ゴールでもあった指紋化の有効性について、生物学的な情報との相関性を検証した。結果として、各種生成コロニーの収量を比較した結果、iPS 細胞コロニーの収率は「初期接着数」を左右する条件 (砕き過ぎ、播種密度、コーティング剤の違い) が最も大きく収率に影響すること、培養 5~7 日目後の収量の増減が播種後 1 日目で既に決定していることを明かした。また、各コロニーの OCT3/4 の陽性率を数値化し、各種培養条件を定量的に比較した結果、抗酸化ストレスが活性化するようなストレス (物理ストレスや培地への乳酸の蓄積) が培養プロファイルを大きく乱すことがわかった。また、条件 I については異常コロニーの除去を意図的に減らした条件と増やした条件を、遺伝子発現および代謝産物の変化から比較したところ、形態の異常なコロニーの増加は、コロニーの遺伝子発現パターンと大きく連動しており、コロニーのエネルギー生産がミトコンドリア非依存的なものに変化することと相関していることが明かとなり、構築した可視化方法の感度および細胞品質との連動性を確認することができた。我々の解析は、通常の iPS や ES 細胞の研究で評価されているような「分化前・分化後」というような明らかに異なる生体条件を比較するのではなく、「分化前を維持している 1 つの条件であるはずの状態」の中において、自然発生的に生じる生体の揺らぎ・バラツキの現象である。このバラツキの現象を引き起こす主たる原因の解明にはまだ至っていないが、我々の開発した TotalCultureFingerprint 法は、コロニー形態情

報の定量的なデータと、遺伝子発現データおよび代謝プロファイリングデータとを連動させることで、この「わずかな状態のほころび」という品質変化のメカニズムとして、ストレスというトリガーが細胞の応答性の方向性をわずかに変化させ、それがドミノ的に積み重なって脱未分化が誘導され、それがECM 贅成やストレス対応の遺伝子発現の恒常状態を乱すことによって形態が変化している結果である可能性を初めてポイントアウトすることができたと言える。このような評価方法は、今回のように生物現象との密接な相関解析によって現象の解明を行うためのツールや測定機器として機能するだけでなく、今後は細胞培養そのものをバリデーションするようなツールとして利用が広がることが期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 20 件)

- 1) 長坂 理紗子, 岡田 光加, 松本 恵, 佐々木 寛人, 蟹江 慧, 清田 泰次郎, 古江美保, 加藤 竜司, 画像解析を用いたiPS細胞のリアルタイム品質モニタリング技術, 第21回 HAB 研究機構学術年会, 昭和大学上條講堂(東京), 2014年05月
- 2) 加藤竜司, 細胞画像情報解析を用いた再生医療における品質管理の可能性, 再生医療イノベーションフォーラム(FIRM)・特別講演会, JBA(東京), 2014年05月
- 3) 城戸 理紗子, 松本 恵, 佐々木 寛人, 蟹江 慧, 本多 裕之, 清田 泰次郎, 古江美保, 加藤 竜司, 画像情報解析を用いたiPS細胞培養の非侵襲モニタリング, 日本組織培養学会 第87回大会, 星陵会館(東京), 2014年05月
- 4) 長坂理紗子, 岡田光加, 佐々木寛人, 蟹江慧, 菅三佳, 柳原佳奈, 福田隆之, 清田泰次郎, 古江-美保, 加藤竜司, 細胞画像解析によるiPS細胞リアルタイム品質評価法の開発, 第66回 日本生物工学会大会, 札幌コンベンションセンター(北海道), 2014年09月
- 5) 吉田啓, 長坂理紗子, 岡田光加, 佐々木寛人, 清田泰次郎, 本多裕之, 古江美保, 蟹江 慧, 加藤竜司, コロニートラッキングを応用したiPS品質状態のモニタリング, 細胞アッセイ研究会(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), 2015年01月
- 6) 加藤 竜司, 再生医療向け培養細胞の画像を用いた品質管理技術と培養技術標準化への可能性, “未来へのバイオ技術”勉強会, 鉄鋼会館(東京), 2015年03月
- 7) 加藤 竜司, 吉田啓, 岡田光加, 長坂理紗子, 佐々木寛人, 蟹江慧, 菅三佳, 柳原佳奈, 福田隆之, 清田泰次郎, 古江美保, 細胞形態情報を用いたiPS細胞培養手技の定量化, 第14回 日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜(神奈川), 2015年03月
- 8) 加藤 竜司, 岡田光加, 長坂理紗子, 佐々木寛人, 蟹江慧, 菅三佳, 柳原佳奈, 福田隆之, 清田泰次郎, 古江美保, コロニー形態情報を用いたiPS細胞株の特性解析, 第14回 日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜(神奈川), 2015年03月
- 9) 長坂理紗子, 松本恵, 佐々木寛人, 蟹江慧, 清田泰次郎, 本多裕之, 古江-楠田美保, 加藤 竜司, iPS細胞培養手技標準化のための形態評価モデル, 第61回薬学会東海支部大会, 名古屋市立大学, 2015.07
- 10) 吉田啓, 長坂理紗子, 岡田光加, 松本恵, 佐々木寛人, 清田泰次郎, 本多裕之, 古江-楠田美保, 蟹江慧, 加藤 竜司, 細胞画像情報解析を用いたiPSコロニーのリアルタイム評価, 第61回薬学会東海支部大会, 名古屋市立大学, 2015.07
- 11) 長坂 理紗子, iPS細胞の創薬応用に向けた画像評価法, 第7回 若手研究シンポジウム, 名古屋大学, 2015.07.10,
- 12) 加藤 竜司, 画像情報処理技術を用いた再生医療における細胞品質管理, 日本生物工学会中部支部主催 第4回 CHUBU懇話会, アステラスファーマテック, 2015.08
- 13) 長坂理紗子, 松本恵, 蟹江慧, 清田泰次郎, 本多裕之, 古江-楠田美保, 加藤竜司, iPS細胞培養における培地上清とコロニー形態変化の関係性, がん代謝研究会, 石川県立音楽堂(交流ホール), 2015.07
- 14) 加藤 竜司, 細胞品質管理のための細胞画像情報処理技術, 第33回ヒト細胞学会, ホテルスカイタワー(宮崎), 2015.08
- 15) 吉田啓, 長坂理紗子, 岡田光加, 松本恵, 佐々木寛人, 蟹江慧, 清田泰次郎, 本多裕之, 古江-楠田美保, 加藤 竜司, 画像情報解析を用いたiPS細胞コロニーのリアルタイム評価法の開発, 第67回日本生物工学会大会, 鹿児島県城山観光ホテル, 2015.10
- 16) 長坂理紗子, 岡田光加, 松本恵, 佐々木寛人, 蟹江慧, 清田泰次郎, 古江-楠田美保, 清水一憲, 本多裕之, 加藤 竜司, コロニー形態情報解析を用いたiPS細胞株の特性解析, 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, 2016.01

- 17) 吉田啓, 長坂理沙子, 岡田光加, 松本恵, 佐々木寛人, 蟹江慧, 清田泰次郎, 本多裕之, 古江-楠田美保, 加藤竜司, 細胞画像情報解析を用いた iPS コロニーの培養手技定量化法の開発, 化学工学会第 81 年会, 関西大学, 2016.03
- 18) 長坂理紗子, 岡田光加, 松本恵, 佐々木寛人, 蟹江慧, 清田泰次郎, 古江-楠田美保, 清水一憲, 本多裕之, 加藤 竜司, iPS コロニー形態情報解析を用いた培養環境がもたらす形態ヘテロ性の定量解析, 再生医療学会, 大阪国際会議場, 2016.03
- 19) 吉田啓, 長坂理沙子, 蟹江慧, 清田泰次郎, 古江-楠田美保, 清水一憲, 本多裕之, 加藤竜司, iPS 細胞培養システムのためのコロニー画像情報を用いた培養手技の定量評価, 第 15 回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場, 2016.03
- 20) Risako Jouto, Megumi Matsumoto, Hiroto Sasaki, Kei Kanie, Yasujiro Kiyota, Hiroyuki Honda, Miho Kusuda-Furue, Ryuji Kato, Image-based iPS colony morphology analysis for culture protocol evaluation, International Society for Stem Cell Research, Sweden, 2015.06

なし

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 加藤竜司, 清田泰次郎, 備瀬竜馬, 再生医療実現に向けた幹細胞培養工学の最前線, 社団法人 日本生物工学会, 92(9), 495-499, 2014 年 9 月 29 日
- 2) 加藤竜司, 清田泰次郎, 備瀬竜馬, 細胞画像情報処理解析を用いた培養細胞の品質評価 (3 次元ティッシュエンジニアリング~細胞の培養・操作・組織化から品質管理, 脱細胞化まで~ 第 5 節), 出版社 NTS, 2015 年 2 月 1 日

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者