

令和 2 年 3 月 3 日
愛 媛 大 学

再生医療に使える幹細胞の品質を画像解析で判別する技術を開発 ～コンピュータの目で幹細胞の品質を評価する～

このたび、愛媛大学大学院理工学研究科の木下浩二(きのした こうじ)講師と棟居卓弥さん(当時、大学院生)ならびに東京医科歯科大学難治疾患研究所の難波大輔(なんば だいすけ)准教授らの研究グループは、位相差顕微鏡で撮影した培養状態にあるヒト表皮角化幹細胞の品質を自動評価する画像処理技術を開発しました。

再生医療では、採取・培養した幹細胞の品質が、その後の治療の成否に大きな影響を与えます。難波准教授らによるこれまでの研究で、幹細胞コロニーの動きから幹細胞の品質が評価できることを明らかにしました。しかし、その評価には、培養状態にある幹細胞を専門家が目視で観察する必要がありました。

木下講師らは、難波准教授との共同研究を通して、位相差顕微鏡画像からヒト表皮角化幹細胞コロニー(細胞群)領域を抽出して、その動きを自動計測する画像処理技術を開発しました。今回の研究成果は、再生医療における培養幹細胞の維持・管理のための品質評価法として利用可能であり、産業化が期待できます。

本研究成果は、2019年12月10日(英国時間)にNature Publishing Groupの発行する学術誌「Scientific Reports」にオンライン掲載されました。

つきましては、是非、取材くださいますようお願いいたします。

記

掲載誌: Scientific Reports

DOI: 10.1038/s41598-019-55279-4

題名: Automated collective motion analysis validates human keratinocyte stem cell cultures
(邦題) 自動化された集団運動解析によるヒト角化細胞幹細胞培養の検証方法

著者: Koji Kinoshita, Takuya Munesue, Fujio Toki, Masaharu Isshiki, Shigeki Higashiyama,
Yann Barrandon, Emi K. Nishimura, Yoshio Yanagihara, Daisuke Nanba

責任著: 木下 浩二(愛媛大学), 難波 大輔(東京医科歯科大学)

※送付資料5枚(本紙を含む)

本件に関する問い合わせ先

担当部署: 愛媛大学大学院理工学研究科

担当者名: 講師 木下 浩二

TEL: 089-927-8146

Mail: kinoshita@cs.ehime-u.ac.jp

再生医療に使える幹細胞の質を画像解析で判別する技術を開発

～ コンピュータの目で幹細胞の品質を評価する ～

研究成果のポイント：

画像処理技術を用いて、

1. フィーダー細胞^{*1}とヒト表皮角化幹細胞コロニーを区別する方法
2. ヒト表皮角化幹細胞コロニーの細胞移動速度を算出する方法

を開発しました。これらの方法により、培養系でヒト表皮角化幹細胞の状態を常時モニタリングできる**非侵襲の品質評価法の実現が可能**となります。この技術は、その他の培養幹細胞を用いた再生医療にも応用可能です。

研究の背景：

広範囲な重度熱傷などの治療には自家培養表皮シートの移植が行われます。この場合、患者の正常な皮膚の一部から表皮角化細胞を採取し培養します。この治療の成功は、表皮角化幹細胞をいかに上手く培養できるかにかかっています。そのためには、培養系で角化幹細胞の状態を常にモニタリングできるような、非侵襲の品質評価法の開発が不可欠です。

難波准教授らのグループは、これまでの研究により、高い増殖能力を持つ角化幹細胞コロニーは高い運動活性を持つ細胞によって構成されていることを明らかにしました(図1)。しかしながら、幹細胞の増殖や分化に必要な環境を整えるフィーダー細胞との共培養であり、細胞同士が高密度で接着した表皮角化細胞を自動認識することは難しく、手動によって細胞移動速度を測定していました。ただ、手動測定は時間と労力を必要とし、またヒューマンエラーといった問題を含み、再生医療に応用するには、自動化測定技術の開発が必須です。また、自動化測定が可能になれば、幹細胞をターゲットにした薬剤開発のためのスクリーニング系に応用可能です。

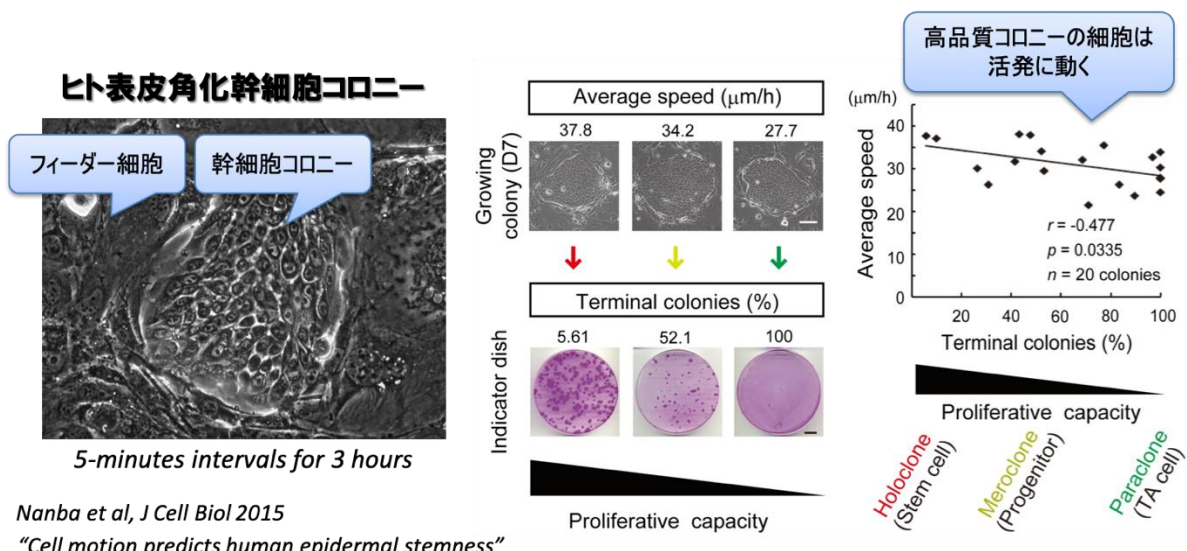


図 1：運動活性と品質との関係

開発した画像処理技術：

はじめに、フィーダー細胞とヒト表皮角化幹細胞コロニーを区別する方法について説明します。

ヒト表皮角化細胞コロニーの位相差顕微鏡画像には二つの特徴があります。一つ目は核小体と細胞質領域が暗い領域として観測され、核小体が細胞質領域に囲まれていること、二つ目は細胞境界が明るい線として観測されることです(図2)。これらの特徴に着目して、二値化処理、ラベリング、細線化処理、交差数の計算といった画像処理技術を用いて、核小体の中心点と細胞境界の分岐点を抽出します。以下、図3に各処理を施した結果を示します。

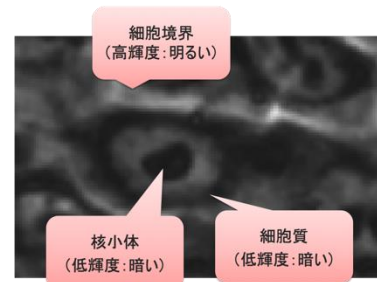


図 2：ヒト表皮角化細胞

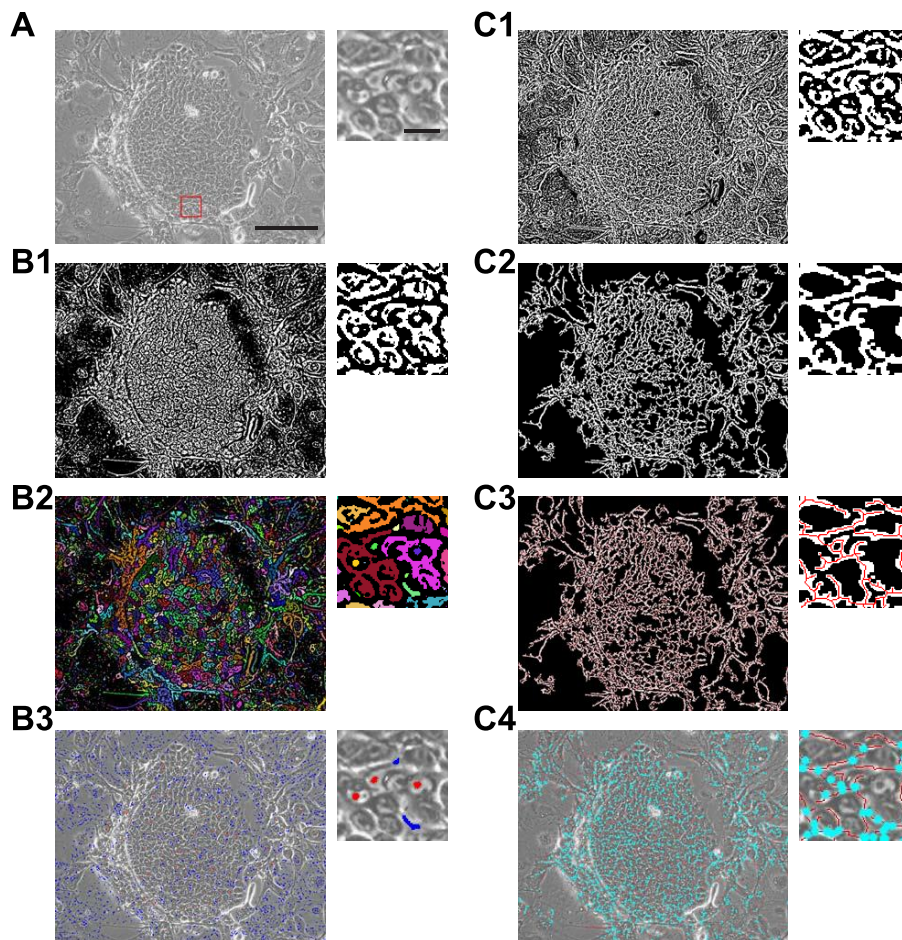
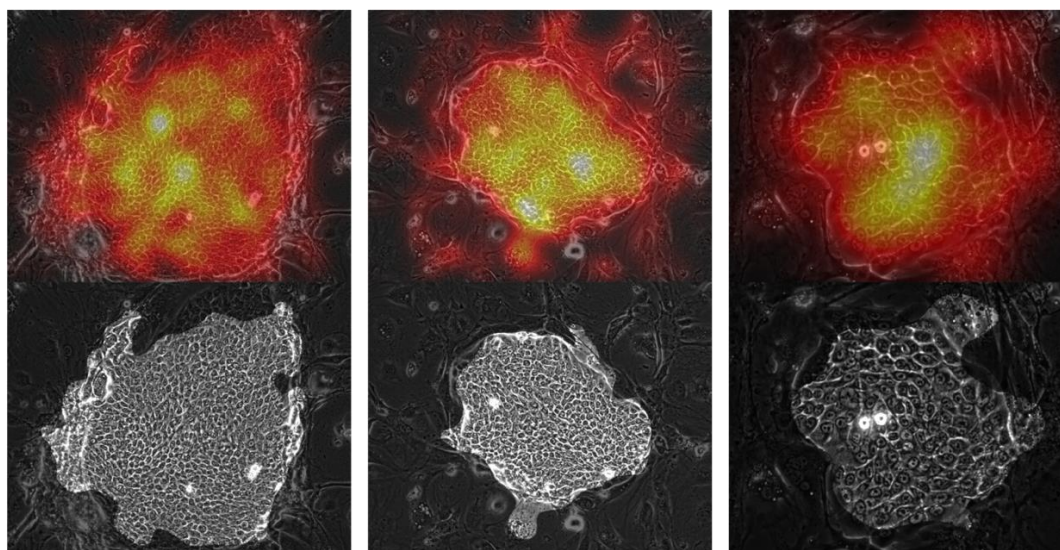


図 3：各種画像処理結果.

A は原画像、B1 は核小体と細胞質の抽出結果、B2 はラベリングによる領域分割の結果、B3 の赤い領域が探索による核小体の抽出結果、C1 は細胞境界の抽出結果、C2 はフィーダー領域の細胞境界の除去結果、C3 の赤い線が細線化結果、C4 の水色の点が分岐点の抽出結果を示します。

コロニー領域には、核小体ならびに、細胞境界の分岐点が多く含まれることに着目して、抽出された核小体の中心点、細胞境界の分岐点をサンプル点と見なしてカーネル密度推定^{*2}を適用することで、画

素のコロニー領域らしさの尺度を数値化しました。その尺度に対するしきい値処理を適用することで、フィーダー細胞の領域とコロニー領域とを弁別します。その結果の一部を図4に示します。



※ 抽出された領域の明るさを 1.5 倍に、それ以外の領域の明るさを 0.5 にして表示

図 4：カーネル密度推定によるコロニー領域の抽出

つぎに、ヒト表皮角化幹細胞コロニーの細胞移動速度を算出する方法について説明します。画像の明るさパターンの各画素における見かけの動き（オプティカルフロー）は、明るさの空間的な違いと時間的な違いから算出することができます。そこで、DeepFlow と呼ばれるオプティカルフローを計算するアルゴリズムを使って、抽出されたコロニー領域の移動速度を算出しました。今回、目視で計測したコロニーの移動速度とオプティカルフローで推定したコロニーの移動速度の比較を図5に示します。グラフ中の数値 ($r=0.93$) は両者の相関係数を表し、非常に高い精度で自動計測できていることを示しています。

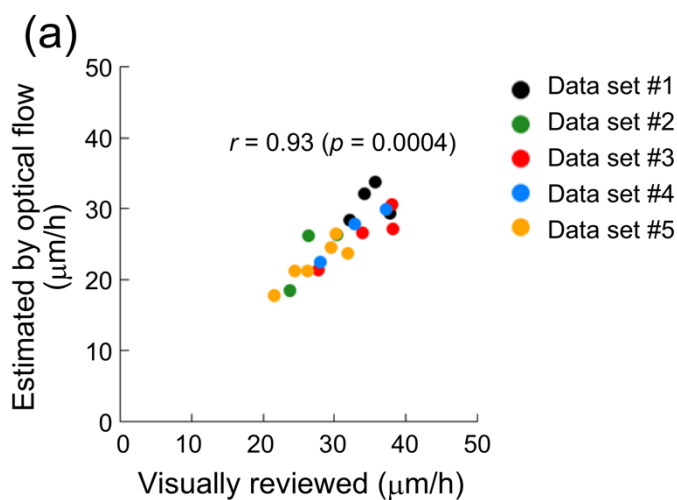


図 5：コロニーの移動速度の推定結果

今後の展望：

適切な培養条件は幹細胞の特性を維持するために不可欠であり、幹細胞培養のための信頼性の高いリアルタイム監視方法の開発は、再生医療にとって非常に重要です。画像処理に基づく幹細胞培養状況のモニタリングは非侵襲的であるために、産業への応用も可能となります。

用語の解説

1. フィーダー細胞：

増殖や分化を起こさせようとする目的の細胞（本研究では、ヒト表皮角化細胞）の培養条件を整えるために用いる、補助役を果たす細胞

2. カーネル密度推定：

有限の標本点から全体の確率密度分布を推定する方法で、本研究では、核小体の中心点、ならびに、細胞境界の分岐点を標本点とみなし、コロニーらしさを表す評価値を推定した

3. DeepFlow：

オプティカルフローを推定するアルゴリズム。明るさの空間差分と時間差分が満たすべき方程式のほかに、深層学習でも使われる畳込み処理とプーリング処理を利用した拘束条件を用いることで、高精度にオプティカルフローを推定できる