

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 産業応用に向けた多能性幹細胞培養工程における
画像情報解析を用いた品質評価技術の開発

氏名 長坂 理紗子

論文内容の要旨

多能性幹細胞(Pluripotent Stem Cell: PS 細胞)は、様々な細胞へと分化する能力と無限増殖能による大量生産の可能性から、発生過程を含めた疾患機構の解明や創薬スクリーニングのための細胞源対象として実用化への期待が大きい。PS 細胞としては、1998 年に樹立された胚性幹細胞「ES (Embryonic Stem) 細胞」や、2006 年に報告された人工多能性幹 (induced Pluripotent Stem: iPS) 細胞が知られる。特にヒト iPS 細胞はヒト ES 細胞様の多能性を有しながら、ES 細胞における倫理的障壁や樹立プロトコルの難易度を解決できる可能性が高いと期待されている。また、近年では巧妙なリプログラミングによって多能性を獲得させる技術も多数報告されつつあり、PS 細胞はライフサイエンス研究における重要な細胞製品となることが期待されている。

創薬および製薬研究において PS 細胞が広く産業応用されるためには、PS 細胞を大量に培養・調整する技術開発が強く望まれる。PS 細胞の活用としては、無限増殖能を有する未分化 PS 細胞の状態で大規模増幅を行う「未分化培養」と、製造した PS 細胞から様々な目的の細胞へと大量に分化誘導を行う「分化培養」の両方の製造工程を制御する技術が必要となる。現在、創薬および臨床のどちらの応用においても PS 細胞は 1 つの製造単位として $10^5 \sim 10^{10}$ 細胞もの規模の細胞製造が必要であると考えられている。しかし PS 細胞は、未分化維持および分化培養が非常に難しい細胞でもある。様々な培養方法が研究されているが、その培養プロトコルの多く複雑かつ長期間であり、経験的な判断と手技に大きく製品品質を左右することが知られる。また、培養過程での様々なストレスが PS 細胞に大きな影響を及ぼすことが知られつつあるが、その原因や現象はいまだ未解明であることが多く、品質管理のための絶対的マーカーや評価技術もまだ発展の途上にある。

現在、培養中の PS 細胞の品質評価やメンテナンスは、世界中の研究施設においても顕微鏡によるコロニーの形態観察が唯一の方法となっている。歴史的にも ES 細胞～iPS 細胞の樹立、維持培養、分化培養の全てにおいて、細胞の形態の「目利き」が極めて重要な評価項目であること実証されており、多くの教科書や培養手技書において形態観察の重要性が明記されている。このような目視による判断は、非破壊的に細胞を評価できる一方で、定量的でないために記録性がなく、生産技術としても非効率的であることが、現在 PS 細胞培養を産業化する際に最大の問題となっている。今後 PS 細胞は研究用細胞としてだけでなく、臨床治療用細胞としても活用が期待されており、安全性および有効性の担保の観点からも PS 細胞の品質を安定化させる製造技術への期待は大きく、現在では産官学の共同プロジェクトなどで PS 細胞の製造調製技術として培養機械化・自動化が急速に進みつつある。

本論文では PS 細胞の産業応用に向けた大量製造調製の実現を目指し、従来経験的・感覚的であった細胞の形態観察を、画像解析技術とバイオインフォマティクス解析技術との融合（画像情報解析）によって定量化・効率化し、細胞評価における新しい品質評価技術の一つとして開発することを目指した。本研究では、PS 細胞の培養工程として「未分化維持培養工程」および「分化培養工程」の両方を視野に入れ、培養中の細胞の状態を非破壊的にリアルタイムで定量評価・予測する解析手法およびアルゴリズムの開発を行った。また、画像情報解析技術による品質評価の妥当性を示すため、PS 細胞の形態変化と生物学的現象の相関性についても検証した。

本論文は 5 章で構成され、PS 細胞とその産業応用に向けた技術課題についてまとめた序章（第 1 章）、PS 細胞の未分化維持培養における画像情報解析を用いた品質評価（第 2 章）、未分化維持細胞における細胞形態と生物学的現象の相関性検証（第 3 章）、PS 細胞の分化培養における画像情報解析を用いた品質評価（第 4 章）、PS 細胞製造調製技術開発と画像情報解析の可能性と課題（第 5 章）である。

以下に各章の具体的な内容を述べる。

第 1 章では、PS 細胞の発展と可能性、PS 細胞の産業応用に向けた製造技術とその課題、および、細胞画像情報解析の概要と可能性について序章としてまとめた。

第 2 章では、細胞の善し悪しの評価が複雑かつ感覚的である未分化維持培養において、PS 細胞コロニーの形態を客観的・簡便・迅速に評価する画像情報解析アルゴリズムの開発についてまとめた。本検証では、様々な未分化維持培養環境における PS 細胞コロニーについて大量の画像と品質関連情報のデータベースを構築し、培養過程で出現する細胞形態の変化を自動的にモニタリングするための可視化プログラムを基礎理論から構築した。結果、従来感覚的であった培養中の PS 細胞について、全貌かつ網羅的な評価を定量的に行うことができるモニタリングソフトウェアの開発に成功し

た。同時に、これまで定量的に比較検証されたことが無かった培養の熟練者・非熟練者のスキルを定量的に分析することで、PS 細胞培養の標準化および自動化の可能性を検証した。

第 3 章では、細胞画像情報解析の有効性および妥当性についてより深く検証するため、細胞形態と PS 細胞の品質バイオロジーとの相関性について、オミクス解析手法を導入することで検証した結果についてまとめた。本検証では、未分化の逸脱状態を画像的に定量化しながら濃縮する実験系を構築し、未分化逸脱という品質劣化の現象に関わる画像から得られる PS コロニー形態情報、破壊試験から得られる遺伝子発現情報、非破壊試験として近年注目される代謝解析情報について、品質評価法としての有効性・精度・感度について比較した。

第 4 章では、PS 細胞の分化培養工程のモデルとして肝分化における細胞状態の画像情報解析による定量化および品質予測についてまとめた。PS 細胞などを用いた分化培養では、分化誘導効率の割合によって他の系譜の細胞が混在した細胞が製造される可能性がある。このような分化細胞における不均質性は、細胞製品として品質保証が難しいことや、薬剤応答などの研究結果のばらつきの原因となってしまう可能性がある。本研究では、PS 細胞の未分化培養工程の評価とは全く異なる画像情報解析手法として、画像中の細胞のテクスチャ情報を解析対象として、特徴的な系譜の細胞集団を非破壊・非染色状態で検出・定量化する解析技術の開発に成功した。

第 5 章では、本論文を通じて構築された PS 細胞品質評価のための画像情報解析の有効性と課題について考察し、今後の PS 細胞の産業応用に向けた画像品質評価の可能性について総括した。

本研究では、PS 細胞の未分化培養および分化培養の両方の工程における画像情報解析を用いた品質評価法の有効性について情報解析的理論構築および実証検証を行い、PS 細胞の安全かつ効率的な品質評価のための革新的基盤技術の確立に成功したと言える。また、これまで感覚的な実証および検証しか行われてこなかった「目利き」の有効性や欠点、さらにはバイオロジーとの連動性について解析することで、品質評価のための画像情報解析の妥当性を確認することができたと考えている。本論文が、今後さらに需要が期待される PS 細胞とその産業応用の成功に向けた有用なテクノロジーとして先導となることを期待している。