

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 細胞培養工程の標準化に向けた  
高次元細胞形態情報解析法の開発

氏名 藤谷 将也

## 論文内容の要旨

近年の細胞科学や遺伝子工学技術の発展により、生きた細胞を原料とする細胞性医薬品が注目されている。細胞性医薬品は損傷した組織の直接的な補完や細胞分泌物による組織再生・免疫抑制といったこれまでにない作用機序を有しており、従来の医薬品では治療が困難であったアンメットメディカルニーズを満たしうる医薬品として非常に期待されている。既に間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)や骨格筋芽細胞を原料とした製品が上市され市場範囲も拡大していることから、細胞性医薬品は医薬品業界において重要な製品となりつつある。

細胞性医薬品は生きた細胞というヘテロ性を持った原料から細胞培養によって製造されるため、製品の有効性や安全性の安定化が産業的課題である。細胞培養の可否は、培養に用いる培地や培養容器、コーティング剤といった複数の培養因子が担っており、製造ラインを構築する上でもその最適化が極めて重要と言える。培養工程の最適化に向けて、これまでに培養時の網羅的遺伝子発現データや代謝データといった大量の細胞データがデータベース化されており、ビッグデータを活用して定量的かつ客観的に培養工程上の課題を解決し最適化するアプローチが推進されている。しかし蓄積されている細胞データの多くは、培養中の任意のタイミングでバルク的に測定したデータがほとんどであり、培養過程の変動を詳細に検出することが困難である。また、得られたデータを最近発展してきた人工知能(Artificial intelligence: AI)で解析しても、その指標の複雑性から解析結果を細胞培養へフィードバックできないことが多々起きている。

顕微鏡による細胞の形態観察は、培養細胞の品質を非破壊的に評価できる評価項目として古くから利用されている。製造工程においても日々のモニタリングに活用されているが、専門家による目視判断であるために定量性や記録性がなく評価技術として非効率なものであった。申請者の所属研究室ではこれまでに、経時的に取得した位相

差顕微鏡画像から得られる高次元細胞形態情報をインフォマティクス的手法で解析することで、定量的かつ細胞非破壊的な細胞品質評価法を開発し、その有効性を示してきた。申請者は様々な培養環境に対する細胞応答評価に向けて本技術を応用することで、細胞形態情報を培養環境の定量パラメータとし、細胞培養工程の新規評価法へ発展できると考えた。

本論文では細胞培養工程評価に向けた高次元細胞形態情報の解析法の確立を目指した。培養中に経時撮影した位相差画像内の細胞をシングルセル単位で計量することで得られる高次元細胞形態情報の取得方法と解析法、可視化手法に至るまでの一連のデータプロセスの構築を行った。本研究では、培地と足場材料(培養容器とコーティング剤)を対象に、培養環境で細胞形態がどう変化するか、実際の細胞品質との関連性をプロファイリングし、培養環境－細胞形態－品質の関係性を統計的にモデリングすることで、細胞形態情報解析の有効性を検証した。また、シグナル分子阻害剤やリコンビナントコーティング剤によって人為的に細胞形態を制御し、その時の細胞品質との関連性を解析することで生物学的な細胞形態と品質の関連性を検証した。

本論文は 6 章で構成され、細胞性医薬品製造における現状と課題をまとめた序章(第 1 章)、細胞形態情報の基礎検討と形態情報解析による神経幹細胞(Neural stem cell: NSC)の神経分化培地評価(第 2 章)、シグナル分子阻害剤による MSC の形態と脂肪分化プロファイリング(第 3 章)、形態情報解析による培養容器評価(第 4 章)、コーティング剤評価と標準形態の有効性検証(第 5 章)、細胞形態情報解析の可能性と今後の課題(第 6 章)である。

以下に各章の具体的な内容を述べる。

第 1 章では細胞性医薬品の現状、細胞培養工程の最適化における課題、細胞形態情報解析の概要と可能性について記述した。

第 2 章では細胞形態情報解析法のデータ取得工程の基礎検討と神経幹細胞の神経分化培地評価についてまとめた。細胞形態情報の有効性を検証するに当たり、第一に安定した細胞形態データ取得のための基礎検討から実施し、細胞形態情報の再現性や画像解析に求められる画質など細胞形態解析の基盤要素を確立した。その後モデルケースとして NSC の神経分化培地評価を行った。分化培地の評価は長期間かかることや評価タイミングが実験者の経験や感覚に委ねられているといった課題がある。細胞画像解析により早期かつリアルタイムに神経分化培地に対する細胞応答を検出するための基礎理論から構築した。結果、従来の 1/2 の期間でリアルタイムに神経分化度を評価できる系を構築し、細胞形態情報による分化培地評価の有効性を示した。

第 3 章では細胞形態情報解析の有効性と妥当性をより深く検証するために、シグナル分子阻害剤を用いて、細胞形態と分化度の生物学的関係性について検証した結果をまとめた。阻害剤に暴露した MSC の細胞形態情報と脂肪分化データを大量に取得しプロファイリングすることで、特定のシグナル分子を起点とした細胞形態と品質の生物学的応答を高精度にモデリングすることに成功した。

第4章では細胞形態情報による足場材料評価として、細胞形態プロファイルに基づく培養容器性能の可視化技術の開発と、オミクスデータとの相関性についてまとめた。現在の培養容器の評価法は乾燥状態での表面物性の評価や、エンドポイントでの増殖や遺伝子発現評価のみであり、実際の培養環境を反映していないことや培養過程のある一面での評価である。本章では、MSCを市販の培養容器24種類で培養し形態情報を抽出することで培養容器性能の可視化する手法をアルゴリズム開発から行った。また、網羅的遺伝子発現プロファイルとの相関性を検証し細胞形態解析アルゴリズムの有効性を示した。

第5章では足場材料として重要な要素であるコーティングマテリアルの評価と、細胞形態と品質の尺度（標準形態）の概念と可能性についてまとめた。様々なコーティング剤が開発されているが、培養容器と同様に評価が難しく、コーティング剤の機能性評価法としての細胞形態情報の有効性を検証した。また、これまで構築した細胞形態情報解析法の実用化に向けて、一般的な分析評価で使われる標準物質のような、品質と細胞形態が定義された「細胞形態の尺度（標準形態）」の必要性とその可能性についてリコンビナントペプチドコーティング剤を例として検証した。

第6章では本論文を通じて開発された高次元細胞形態情報解析法の有効性と課題について考察し、今後の細胞培養工程の最適化に向けた本手法の可能性について総括した。

本研究では、細胞培養工程、特に培地成分と足場材料における高次元細胞形態情報を用いた新規評価法の有効性について、基盤技術となるアルゴリズム開発とその検証を行い、細胞形態情報に基づく効率的な細胞培養工程の評価法の構築に成功した。データ取得工程から基礎的検討を行い、本手法を実用化する上でのデータ規格について議論した。また、各種阻害剤やオミクス解析によって細胞形態とバイオロジーの関係性を解析することで、細胞形態解析の妥当性を確認することができた。本論文により、今後の細胞培養工程の最適化や標準化の先駆け、更には創薬スクリーニングにおけるフェノタイプアッセイにおける革新的な細胞評価法として活用していくことが期待される。