

主論文の要約

論文題目： iPS 細胞製造における画像評価を用いた品質安定化の研究

氏名： 吉田 啓

2006 年に山中伸弥らによって報告されヒト人工多能性幹細胞(induced Pluripotent Stem Cells: iPS 細胞)は、自身と同じ性質を持つ細胞を複製する能力(自己複製能)、また様々な細胞へと分化する能力(多分化能)を有していることから、疾患のメカニズム解明や創薬スクリーニング、細胞治療への応用など様々な利用が期待されている。近年では、難治性・希少性疾患に対して iPS 細胞の臨床応用も進められており、今後ライフサイエンス研究における重要な細胞製品になることが期待される。

iPS 細胞を創薬研究・医療の現場へと幅広く応用するために、多能性状態を保持した細胞を大量に培養・調整する技術開発が強く必要とされている。大量培養時に発生する多能性状態を逸脱してしまった細胞(逸脱 iSP 細胞)は、その後の分化誘導効率の低下や、臨床の現場では細胞のがん化のリスクにつながる可能性があり、品質を担保したい幹細胞製品において重大な逸脱となりえる。

しかしながら、iPS 細胞は品質を保持したままで大量に培養するのが非常に難しいデリケートな細胞であることが知られている。近年では、様々な培養方法の研究や培養プロトコルの改良が進んでいるが、長期的な培養プロセスや培養手技がもたらす影響が製品品質を変動させていることが懸念される。また、製品の製造工程には細胞自身のバラツキや不安定性による品質変動の未だに原因不明のバラツキをもたらす要因がいくつか存在しており、細胞品質に与える影響力の大きさは明確に整理されていない。このため、iPS 細胞の幅広い実用化に向けて、大量生産を視野に入れた工業的な品質管理のためには、細胞状態を日々の把握し、モニタリング評価するための技術の開発が必要である。

現在、培養中の iPS 細胞の品質評価は、培養者による顕微鏡観察に基づく経験的判断による判断が最も主流かつ有効な方法である。平面培養された iPS 細胞は、通常コロニーを形成して増殖するが、各コロニーにおける輪郭の乱れやコロニー内部の細胞の肥大化、分均質な模様などの形態の異常が、多能性マーカーの低下や分化マーカーの増大、または核型異常などの生物学的情報と相関することは経験的に知られている。このような方法は非破壊的に評価を行える一方で、手動での評価には限界があり、同時にその形態の定量的・数量的な規定がないため細胞製品などの品質を安定的に評価するには不向きであるという欠点があった。

本論文では、画像解析の技術を用いて位相差画像から得られる iPS コロニーの形態情報を用いて、iPS 細胞製造における細胞製品の品質安定化を目指した。本研究では、画像評価を用いる上で、細胞製造の現場において生じる具体的な課題を設定し、それに対する解決策を提示してい

くことで、品質安定化の手法として工学的技術の開発を行った。

本論文は、細胞製造における現状の課題と画像評価を用いる利点をまとめた（第一章）、iPS 細胞培養プロセス評価のためのコロニートラッキング解析（第 2 章）、iPS 細胞形態情報を用いた品質評価法の改良（第 3 章）、逸脱 iPS 細胞クローンの生物学的プロファイリング（第 4 章）、細胞製造における画像評価の今後の展望と解決課題（第 5 章）の計 5 章に渡って構成されている。以下に各章の詳細について述べる。

第 1 章では、iPS 細胞の可能性、細胞製造における品質管理の重要性、画像を用いた細胞品質評価技術の概要と製造プロセス評価への応用についてまとめた。

第 2 章では、iPS 細胞培養プロセス評価のための時系列の画像情報の有効性の検証を行った。本検証では、画像上の iPS コロニー一つ一つの時間経過の動向を追うことが可能なコロニートラッキング解析を用いて、コロニー集団の増殖の変化を可視化した。本評価を用いることで、今回は細胞品質に対する変動因子の 1 つである培養手技によるシェアストレスの影響について評価を行った。また、トラッキング解析によって得られた時系列の形態情報を用いて、情報処理技術と組み合わせることで最終日のマーカー発現量を予測するために最も有効な情報量の検証を行った。

第 3 章では、画像評価の適用範囲を拡張するために、近年急速に開発が進みつつあるゼノフリーな培養方法を使用して、画像評価の汎用性の検証を行った。本検証では、コロニー形態データのばらつきや、低頻度で生じる逸脱 iPS 細胞のような得られるデータの量に差がある場合に、いかにして品質予測を行うか評価法の開発を行った。本検証により、データの量や特性に合わせた品質評価技術の重要性を提唱する。

第 4 章では、細胞製造における iPS 細胞の品質を理解するために、実際に培養中に生じる逸脱について生物学的な観点から検証を行った。本検証では、多能性を示す細胞表面糖鎖の発現量が著しく低下している細胞を逸脱 iPS 細胞として、クローニングを行い、幹細胞マーカー発現、三胚葉分化能、網羅的遺伝子発現の確認を行うことで生物学的なプロファイルの確認を行った。また、画像情報を用いて逸脱 iPS 細胞を判定することが可能であるか確認するために、機械学習を用いて予測モデルを構築し、精度を算出した。加えて、予測結果を解釈することで、逸脱 iPS 細胞の判定に重要な形態パラメータを特定した。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章までを通じて得られた結果を踏まえて、細胞製造における画像評価の課題を明確にすると同時に、今後の展望についてまとめた。

培養中から得られる画像情報は、細胞そのものを非破壊的に評価するまでのツールとしてだけでなく、製造プロセスのモニタリングとしても魅力的な技術といえる。近年の画像解析や人工知能などの技術は、製造プロセスの安定化・効率化を促進する品質管理技術の一つとして大きな可能性を秘めている。

本研究では、位相差画像を用いた評価を基盤技術として、iPS 細胞製造における細胞品質の定義から、品質安定化のために有効な時系列情報の決定や新規の評価技術の開発に成功した。また、実際に培養で生じうる逸脱 iPS 細胞の生物学的品質を検証することで、細胞品質そのものの理解を深めることに加え、逸脱状態とそれに関連するコロニー形態情報との結び付けに成功した。本論文を通じて得られた知見をもとに、細胞製造における細胞品質安定化のための工学的な技術開発が進み、iPS 細胞を利用した研究・医療の産業化の一助になることを期待する。