

2021年5月18日

新潟大学

細胞を傷つけずに評価する技術を開発

－ 再生医療に用いる細胞の品質管理 －

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体組織再生工学分野の泉健次教授、同大医歯学総合病院歯周病科の干川絵美医員、同大研究推進機構超域学術院の佐藤大祐助教の研究グループは、オプティカルフロー（※1）という画像解析技術を利用することで、再生医療に培養される口腔粘膜上皮細胞（※2）の運動能（平均移動速度）が細胞の増殖能と相関することに加え、口腔粘膜上皮への分化能を予測する指標となることを突き止め、非侵襲的に細胞を評価する技術を開発しました。

本研究成果は、2021年5月17日（英国時間）に国際学術誌「Scientific Reports」に掲載されました。

【本研究成果のポイント】

- 物体の追跡や動きの推定などに汎用されているオプティカルフロー（OF）という画像解析技術を駆使することで、培養されている口の粘膜上皮（歯肉）細胞の運動能（移動速度）が顕微鏡観察下で容易に算出できることがわかりました。
- 移動速度は細胞の増殖能と相関関係にあることや、さらに移動速度は上皮再生能も予測可能であることも解明されたので、OFを用いた解析技術は細胞の優劣（“質”）を非侵襲的に判別するツールとして使えることがわかりました。
- この技術を他の種類の培養細胞にも応用することで、非侵襲的かつ定量的に細胞品質評価を行えるツールとして再生医療の発展に寄与することが期待されます。

1. 研究の背景

再生医療は従来の外科的手法や医薬品では治療が困難な臓器の損傷や疾病などを治療できると考えられ、国民のだれもが享受できる治療手段としてさらなる普及が期待されています。再生医療では細胞を患者に移植し細胞のはたらきを利用して治療を行うため、細胞そのものが薬の役割を果たすので、こうした再生医療等製品には高い品質管理基準が求められます。これまで再生医療用細胞（＝細胞）の製造（＝培養）は手作業によって行われ、顕微鏡を用いた技術者の目利きや経験によって主観的に細胞品質が管理されてきました。しかし、細胞は常に変化し、均質ではありません。従って的確に評価するためには、細胞の生物学的特性を把握し、その特

性と相関した指標を用いて、製造工程中や最終製品の品質を評価することが重要です。かつ、細胞はナマモノですから、製品（＝細胞）の品質管理は、無菌的、リアルタイム、かつ、非侵襲的であることが必須要件になります。

こうした製造工程管理や最終品質評価の目的で、近年盛んに導入されているのが画像解析技術です。例えば、iPS 細胞や間葉系幹細胞などでは顕微鏡の静止画像から得られる細胞塊（コロニー）の形態を指標とし、細胞の質（状態）や分化能を把握できるようになりました。画像解析は非破壊検査なので、検査のために貴重な細胞を廃棄することなく品質評価が可能となり、検査した細胞自体を移植に使うことができます。しかし、これまで多くの臨床実績が報告されている口腔粘膜上皮細胞ではこのようなツールが未開発でした。そこで本研究グループは、画像解析のみから判定可能な細胞品質評価システムの開発を目指してきました。

II. 研究の概要と成果

本研究グループの細胞培養環境下では、口腔粘膜上皮細胞のコロニー形成が緩く、コロニーの境界が不明瞭なため、コロニー形態という静止画像指標ではなく、タイムラプス顕微鏡撮影画像をつなぎあわせた動画で細胞挙動を解析することにしました。画像（動画）内の細胞を認識するために、オプティカルフローというアルゴリズム（※3）を利用しました（図1）。

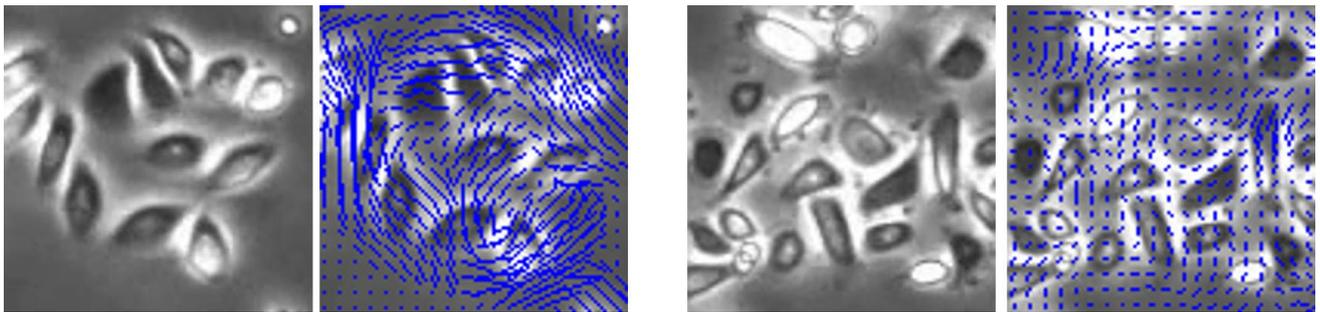


図1 オプティカルフロー解析により、移動速度が速い細胞が撮影されている画像（左）では、遅い細胞の画像（右）より細胞の移動速度を示す矢印が長く示されます

このアルゴリズムを用いることで培養細胞の挙動、すなわち細胞の移動速度（運動能）に関する情報を定量的な数値に置き換えることができます。そして、培養口腔粘膜上皮細胞を再生医療に用いるうえで基本的な特性である細胞増殖能を、運動能という指標を用いて評価したところ、相関関係があることを見出しました（図2）。

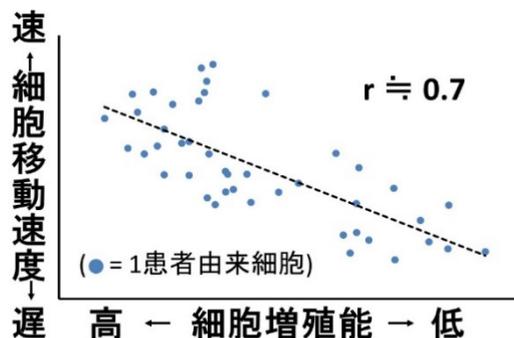


図2 細胞の移動速度（運動能）と細胞増殖能には相関が認められ、移動速度が速い細胞ほど、細胞増殖能が高いことが示されています

つまり、細胞を傷つけることなく、熟練者の主観的目利きに頼らず、細胞の製造工程に関わる細胞増殖能は、運動能を指標とすることで客観的、定量的に評価できることが明らかになりました。さらに、細胞運動能という指標が口腔粘膜上皮の再生能（※4）を予測できる指標にならないかについて検証するため、わざと細胞増殖にとって不利な環境（栄養不足）を作り解析しました。その結果、栄養不足で培養した細胞が再生した上皮は貧弱であったことから、運動能という指標は上皮細胞の再生能も予測可能である指標であることが立証できました(図3)。

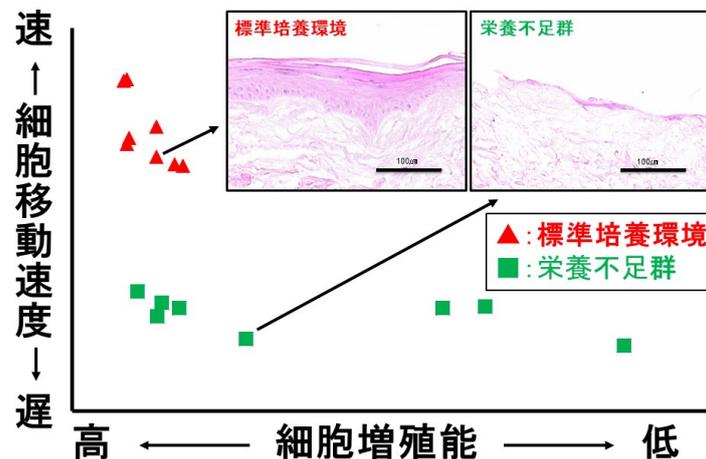


図3 栄養不足群の細胞は標準培養環境の細胞と比較して、移動速度が低下していましたかつ、栄養不足群では標準培養環境と比べ再生した口腔粘膜上皮は貧弱でした

III. 今後の展開

細胞の挙動情報を細胞品質と関係付けて評価する本手法は、リアルタイムでの細胞モニタリングや、容器内の全面検査（評価）も可能にする技術といえます。画像処理機能向上による解析精度の向上を目指しながら、他の種類の細胞への適応拡大や品質管理への展開が可能です。がん細胞に対し、抗がん剤の薬効評価などの研究用途や、新潟大学医歯学総合病院で実施している培養自家骨膜細胞（※5）の骨再生能評価への応用も考えられます。また、細胞評価技術の規格化、標準化を進めることでユーザー同士の融通性も高め、再生医療の実用化に貢献できれば幸いです。

IV. 研究成果の公表

これらの研究成果は、2021年5月17日（英国時間）に国際学術雑誌「Scientific Reports」に掲載されました。

論文タイトル：Cells/colony motion of oral keratinocytes determined by non-invasive and quantitative measurement using optical flow predicts epithelial regenerative capacity.

（オプティカルフローを用いた非侵襲的、定量的解析による口腔粘膜上皮細胞／コロニーの運動能は上皮再生能を予測する）

著者：干川絵美、佐藤大祐、羽賀健太、鈴木絢子、小林亮太、多部田康一、泉健次*

*責任著者

doi:10.1038/s41598-021-89073-y

本研究は日本学術振興会科学研究費基盤研究（B）（17H04398、20H03870）により助成されたものです。

本件に関するお問い合わせ先

新潟大学大学院医歯学総合研究科（歯学系）生体組織再生工学分野
教授 泉 健次（いずみ けんじ）
E-mail : izumik@dent.niigata-u.ac.jp

用語解説

※1 オプティカルフロー

2枚の連続する画像間で、1枚目の画像を構成する多数の（あるいはすべての）点が2枚目の画像においてどこに移動したかを推定する技術です。オプティカルフローは物体の動きを2次元のベクトル場で示し、矢印から移動速度がわかります（矢印の向きが移動の方向、矢印の長さが移動の速さに対応）。コンピュータービジョンでは昔から研究されており、物体追跡や動きの推定など多くの分野で応用されている汎用性の高い方法です。

※2 口腔粘膜上皮細胞（口腔粘膜上皮細胞を用いた再生医療）

口腔粘膜上皮細胞は、細胞シート作成技術を駆使して、眼の角膜疾患による視力回復や食道がん切除後の創傷治療・粘膜組織再建にも利用されています。

※3 アルゴリズム

本研究ではオプティカルフローと画像に写っている細胞のコロニー領域を抽出する画像セグメンテーションを組み合わせた手法を開発し、細胞コロニーの運動能を定量評価しました。

※4 口腔粘膜上皮の再生能

1個の口腔粘膜上皮細胞が、増殖しながら由来した口腔粘膜上皮全体を作り上げる能力。

※5 培養自家骨膜細胞（培養自家骨膜細胞による歯槽骨再生療法）

「新潟大学医歯学総合病院高度医療開発センター先進医療開拓部門」のホームページを参照ください。

<https://remedic.jp/activity/case01.html>

