

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	千川 絵美
学位	博士（歯学）
学位記番号	新大院博（歯）第482号
学位授与の日付	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Noninvasive measurement of cell/colony motion using image analysis methods to evaluate the proliferative capacity of oral keratinocytes as a tool for quality control in regenerative medicine (口腔ケラチノサイトの増殖能を評価するための画像解析法を用いた細胞/コロニー運動の非侵襲的測定—再生医療用細胞品質管理ツールとして—)
論文審査委員	主査 教授 多部田 康一 副査 教授 泉 健次 副査 教授 大峽 淳

博士論文の要旨

学位申請者千川 絵美氏より提出のあった主論文（英語）の要旨（和訳）は以下の通りである。

【緒言】近年の再生医療において疾患または損傷によって引き起こされた組織欠損は、自家組織および細胞を用いて修復される。上皮組織の場合、細胞移植後の治療効果は、移植される上皮細胞内の幹細胞の割合に依存すると言われており、培養中に幹細胞集団を維持することは重要である。幹細胞を評価する方法の多くは、免疫組織化学などの分子生物学的分析が用いられており、ある特定の時点での細胞特性を評価しているにすぎない。そうした方法は侵襲的な解析方法ゆえに、時間経過に伴う細胞評価ができず、再生医療の治療に使用する細胞の品質評価には適切ではない。安定して細胞/組織ベースの再生医療製品の提供を行うために、細胞に応じた非侵襲的な品質管理ツールを作成する必要がある。本研究では口腔ケラチノサイトの細胞とコロニーの動きを、定量的かつ非侵襲的に分析するために、医学生物学領域で、細胞挙動と機能の研究にしばしば利用されている Optical Flow (OF) と Normalized Cross Correlation (NCC) という2種類のアルゴリズムの適用を試みた。二つの画像解析アルゴリズムは、再生医療において細胞評価に利用された前例はほとんどないが、細胞品質管理ツールとして適用するために、OF と NCC により算出される平均運動速度 (Mean Motion Speed, MMS) と平均活動度 (Mean Dynamic Index, MDI) が、細胞増殖能と関連する指標であることを示すことで、口腔ケラチノサイトの非侵襲的品質管理に利用できるのではないかと考えた。

本研究の目的は、口腔ケラチノサイトの細胞増殖能を評価するための非侵襲的・定量的ツールとして、タイムラプス撮影による動画に対して OF と NCC のアルゴリズムを適用し、それから算出される運動速度 (Motion Speed, MS) と活動度 (Dynamic Index, DI) の2つの指標が、細胞運動能の指標としての適用性と実現可能性について検討した上で、MMS および MDI と口腔ケラチノサイトの細胞増殖能の相関関係を解析し、MMS と MDI が再生医療や薬理学的スクリーニングにおける細胞の品質管理ツールとして使用可能か検証することである。

【材料と方法】今回使用する OF と NCC は、だれもが利用することのできる画像解析手法である。OF は2つの連続する画像間の動きを追跡できる画像処理アルゴリズムであり、NCC は2つの画像間の類似度を測定するアルゴリズムである。インフォームドコンセントを得た患者歯肉から単離した口腔ケラチノサイト $3.0\text{-}4.0 \times 10^5$ を 35 mm Dish に播種し、EpiLife Defined Growth Supplements を添加した EpiLife® で培養し、4 日目に 15 分間隔で 24 時間タイムラプス撮影 (Keyence BZ-X710, $\times 4$ PlanFluor NA0.13 PhL objective lens) を行った。撮影後に得られた細胞・コロニー画像から動画を作成し、標的とした細胞・コロニー運動能の指標として、MMS と MDI を算出した。細胞増殖能は Population doublings (PD) を指標として用いた。PD の算出は、タイ

タイムラプス撮影開始時の細胞運動能を算出したコロニーを構成する細胞数、および、タイムラプス撮影から24時間後に10%ホルマリンにて固定した後にカウントした細胞数から算出した。そして、MMSおよびMDIとPDの相関関係分析を行った。

【結果】個々の細胞/コロニーの運動挙動はOFとNCCにより正常に定量化され、それらの指標であるMMSとMDIの指標が細胞/コロニー運動の定量的測定に適用可能であることが示された。また、各コロニーのMMSとMDI、およびそれらのPDとの散布図から、二つの細胞運動能と細胞増殖の指標との間に、低から中程度の正の相関関係を示した。

【考察】口腔ケラチノサイトの細胞・コロニーのタイムラプス撮影を行い、OFとNCCアルゴリズムを動画に適用したところ、MSとDIは問題なく算出された。この画像解析データは、手動追跡によるデータとも相同性を示したことから、MSとDIという指標は細胞/コロニーの動きの非侵襲的・定量的分析ツールとして信憑性があることが検証された。また、口腔ケラチノサイトのMMSとMDIはPDとの間にゆるやかな相関関係を認め、細胞増殖能の予測としてOFとNCCは非侵襲的で定量的な細胞評価ツールとして、細胞品質管理用に利用可能であることが示唆された。一方、本研究におけるプロトコールでは、細胞培養初期におけるコロニー単位で測定を行っていたが、細胞増殖に伴いコロニー同士の癒合が生じるため、標的としたコロニーの評価が、時間がたつと不可能になる欠点が想定される。臨床応用するにあたり、コロニーが癒合しない密度で細胞を播種することは難しいことから、コロニー単位ではなく、培養容器全体を評価できるようなプロトコールの改善が必要と思われる。また、高品質で安定した細胞/組織ベースの再生医療製品の提供を行うためには、複数のパラメータでの評価が望ましく、品質管理の精度向上には、新しい分析ツールを開発することも必要である。今後は、MMSおよびMDIを使用して、タイムラプス撮影の期間や撮影範囲、撮影開始のタイミングを検証し、培養容器全体の細胞増殖能力を予測することを目指していくとともに、新たな分析ツールの開発も目指していく。

審査結果の要旨

本研究の研究テーマの妥当性についての試問を行った。

本研究着想の経緯及び先行研究との関連については、以下の通りである。近年、疾患や損傷によって生じた組織欠損は、自己組織および細胞を使用して修復されている。ケラチノサイトでは再生医療製品にケラチノサイト幹細胞を多く保有しているほど良い治療効果が得られるといわれており、治療効果を保証するためにも再生医療製品に用いられる細胞の品質管理は重要である。しかし、再生医療における品質管理は培養細胞の一部を侵襲的・不可逆的な方法で評価しており、実際に評価した細胞を再生医療製品に使用することはできなかった。近年、表皮ケラチノサイトにおいて画像解析によって2細胞コロニーの回転運動を測定し、細胞回転運動が速いコロニーほど幹細胞性が高いという相関性があることが報告され、培養初期段階でリアルタイムかつ非侵襲的に細胞増殖能を評価することが可能であることが明らかになった。口腔ケラチノサイトでは幹細胞マーカーが発見されていないため幹細胞であると断定することは難しいが、表皮ケラチノサイトと同様に高い回転運動能を有するコロニーは高い細胞増殖能＝幹細胞特性を有している可能性が高い。しかし、培養時にfeeder細胞を使用しない口腔ケラチノサイトの培養プロトコールでは、表皮ケラチノサイトのコロニーよりも密集していないため、2細胞コロニーの回転運動の評価が難しいと考えた。そこで細胞回転運動以外で細胞運動を評価するパラメータを開発し、それらのパラメータと細胞増殖能の相関性を評価することを本実験の目的とした。

研究方法と論旨の展開についての試問をおこなった。

OF analysisを用いた理由と検討項目を選定した理由およびその妥当性については以下の通りである。OF analysisはこれまでもコンピュータビジョンでよく研究されてきたアルゴリズムであり、ライフサイエンス分野においては創傷治癒における線維芽細胞の動きや頭蓋領域の発生における脳神経堤細胞の移動を定量的に測定するために用いられてきた。OFアルゴリズムは複雑な形状を持つ物体の動きを追跡することが可能で個々の細胞やコロニーを識別できない場合においても測定することができ、様々な形態を取る細胞やコロニーの運動を定量的に評価に有利なアルゴリズムである。また、OFはオープンソフトとして公開されているため、品質管理ツールとして普及する際に有利であると考えた。OFの中にはLucas-Kanade法とFarneback法があり、こ

の 2 つの方法は動態解析の基本となる画像の特徴点追跡法の中でよく用いられる方法である。Lucas-Kanade 法は矩形の窓領域内の対応点間の輝度の移動量を表すパラメータであり、隣り合う 2 フレーム間での物体の変形がわずかである場合に有利な方法であり、Farneback 法では各画素の輝度値を 2 次の多項式で近似し、その係数をフレーム間で比較することで高精度に移動量を推定する方法である。経時的に形態を変化させる細胞やコロニーの測定において、Lucas-Kanade 法と比較して Farneback 法はより正確な追跡が可能であるため、本実験では Farneback 法を用いて測定を行った。

実際の医療提供における細胞品質評価への応用に際し、ヘテロな播種細胞は集団を評価する問題点について以下の回答を得た。本実験での播種細胞は様々な細胞周期の細胞が存在することから、ヘテロな集団であると言える。細胞運動は細胞分裂期(M 期)になると細胞運動が低下するため、個々の細胞で評価した場合は細胞運動のパラメータの測定に障害が出ると考えられるが、本実験での 2 つのアルゴリズムは細胞/コロニー全体の平均値をパラメータとしているため、細胞周期が異なることによる細胞品質評価の障害にはならないと考える。また、細胞の分化の違いによる不均一性に関しては、対象の細胞/コロニーが幹細胞特性=高い増殖能を有しているかを細胞運動のパラメータによって予測しているため、品質評価には障害はなく、むしろ幹細胞特性を多く持っているコロニーを選定することに貢献できると考える。ただし、iPS 細胞などの場合は未分化状態を逸脱してしまった細胞は製品としての質が低下するため、本実験の細胞/コロニー全体を対象とした場合では正確な評価ができないと考えられる。細胞の状態を把握するうえで、細胞の形は細胞培養の重要なモニタリング項目の一つであるが、これまで細胞形態の評価は熟練者の経験によって実現されており、その判断基準は数値化されていなかったが、近年 iPS 細胞や間葉系幹細胞において形態学的パラメータによって細胞の品質を評価するツールが報告されている。上皮細胞においては未だそれらのツールの適用性の報告がほとんどなく、形態学的パラメータを適用させるためにはコンピュータが細胞の形を認識してその形から細胞の状態を評価する必要があり、そのためには多くのサンプルを用いてコンピュータに学習させる必要がある。今後は細胞運動によるパラメータだけでなく、細胞の形や大きさなどからも細胞の状態を評価する指標を開発し、それらのパラメータを組み合わせることでより信頼度の高い細胞品質評価ツールになると考え、今後の課題であると考えられる。

平均運動速度 (Mean Motion Speed, MMS) と平均活動度 (Mean Dynamic Index, MDI) を細胞増殖能細胞の品質管理ツールとして使用することの十分性と不確実性の考察については以下の通りである。OF によって算出された MMS は複雑な形態の物体の動きにも対応することができ、様々な種類の細胞にも応用可能であると考えられる。本実験では細胞/コロニー全体の測定を行ったが、連続する画像間の輝度差より物体の動きを測定するため、培養プロトコールによってコロニーを形成しない細胞においても、測定範囲を広くして測定することが可能である。しかし、OF は物体の動きが少ないほど精度が高くなるため、撮影時間の間隔が異なると正確に測定できないという欠点がある。また、品質管理ツールとして使用するためにはカットオフ値の設定が必要である。これは細胞の種類によっても異なってくるため、口腔ケラチノサイト以外の細胞においてもさらなる検証を行う必要がある。一方で、NCC を用いて算出された MDI は、連続する画像において矩形領域の類似度から算出されており、OF と異なり口腔ケラチノサイトの動きを速度という指標を使用せずに評価できるツールである。大幅に物体が動いたときに精度が低下する OF に対して、NCC で使用されるテンプレートマッチングは物体の動きの大きさには影響されずに測定することが可能である。しかし、コロニーの回転運動に対しては輪郭の変動が少ない可能性もあるため、類似度をみる NCC では細胞自体は活発に動いていても活動度が低く算出される可能性がある。また、本実験のように細胞/コロニー全体ではなく撮影範囲全体とした場合、NCC のようなテンプレートマッチングは適用が困難である。MMS と MDI はそれぞれ利点欠点が存在するため、今後撮影する細胞や撮影条件などをさらに検証し、これらのソフトウェアを改善する必要がある。

本研究で用いた統計解析方法の選択理由と妥当性について、以下の回答を得た。本研究では 2 つの細胞運動のパラメータと細胞増殖能のパラメータの相関性を調べることを目的とし、細胞運動能と細胞増殖能の 2 つの連続変数間の線形関係を評価するために、Pearson の積率相関係数を

選択した。散布図より 2 つの連続変数には線形関係を示すため、Spearman の順位相関係数ではなく Pearson の積率相関係数を選択したことは妥当だと考えられる。

本実験では口腔ケラチノサイトの p0 細胞の細胞/コロニーに対して検証を行っているが、それ以外の細胞においても OF と NCC のアルゴリズムは適用可能であるかについて、以下の説明を得た。本実験では表皮ケラチノサイトの 2 細胞コロニーの回転運動の評価を参考にした。そこでは、画像解析により角度を測定して回転運動速度を評価していたが、フィーダー細胞を利用した培養系での実験であった。しかし、フィーダー細胞を用いない本実験の培養系では細胞同士の接着がゆるいために、コロニーがばらける傾向にあり、口腔ケラチノサイトでは測定中にコロニー同士が癒合する可能性もあったため、コロニーの構成細胞が少ない p0 細胞を用いて、先行研究とは異なる方法で細胞運動能の検証を行う必要が生じたため、新しいアルゴリズムを適用するに至った。本実験では口腔ケラチノサイトの p1 細胞の他にも、口腔ケラチノサイト以外の口腔線維芽細胞や癌細胞でも測定可能性の検証を行い、OF アルゴリズムに関しては問題なく測定可能であることは検証済みである。これは、OF アルゴリズムが細胞の形態に左右されず、測定点の輝度の変化をベクターに変換して速度を認識するプログラムであることから、影響をうけづらいためと考えられる。一方、NCC アルゴリズムでは連続する画像の類似度よりパラメータを算出しているため、個々の細胞を認識する必要がないことは OF アルゴリズムと同様である、広範囲の類似度を測定するには膨大なデータ量になるため検証に至っていないが、上記理由で理論上は可能と考えている。

OF と NCC の 2 種類のアルゴリズムの違いについては以下の通りである。OF は複雑な形態を有する物体の動きを測定することが可能であり、本実験においては連続する位相差画像から得られた輝度差の移動量を細胞/コロニーの運動速度という指標によって評価している。一方で NCC は物体が 2 つの画像間においてどれくらい一致するかを測定しており、本実験においては連続する画像間における細胞/コロニーの類似度という指標で評価しており、速度を使用せずに口腔ケラチノサイトの動きを評価している。このように細胞の動きを複数のパラメータで評価することによって、より信頼度の高い細胞品質管理ツールとなると考えられる。

NCC(Normalized Cross-Correlation)アルゴリズムの概要と、選択した理由については以下の通りである。NCC はテンプレートマッチングの手法の 1 つであり、テンプレート画像と入力画像間の類似度を評価することができる。本実験では測定する細胞群を 1 枚目のフレームにおいて手動で選択し、それをテンプレート画像として 2 枚目のフレームでテンプレートと最も一致する領域を抽出する。さらに 2 枚目で抽出された領域を次のテンプレートとし、3 枚目においてもテンプレート画像と最も一致する領域を抽出していき、これを繰り返す。それぞれのフレーム間で、テンプレート画像と入力画像間の類似度を算出することで、連続するフレーム間での細胞群の状態の変化を評価することが可能となる。NCC によって算出された数値は、時間の経過と共に変化する細胞群の形状とサイズを反映しており、類似度が低い細胞群は活動度の高い細胞と評価することができる。OF と同様にラベルフリーの状態で評価することが可能であり、本実験の目的に合致していたため NCC を選択した。また、テンプレートマッチングの手法には他にも NCC の改良版である ZNCC(Zero-mean Normalized Cross-Correlation)が存在する。ZNCC は画像全体に存在するノイズやバックグラウンドの影響を受けにくいという利点がある。そのため 2 つの画像間でのバックグラウンドの明暗に大きな差があれば ZNCC の方が有利であるが、本実験ではバックグラウンドの明暗に大きな差がないため、計算コストを抑えることができる NCC を選択した。

細胞運動能と細胞増殖能との低～中程度の相関性を高めるためには何が必要であるかについて、以下の回答を得た。本実験では OF アルゴリズムにおいても NCC アルゴリズムにおいても同様の撮影条件で撮影を行っている。どちらのアルゴリズムにおいても連続する画像間の細胞/コロニーの移動量や形態・サイズの変化を基にパラメータを算出しており、連続する画像間のそれらの変動は撮影のインターバルに大きく左右される。OF アルゴリズムにおいては物体の移動量が大幅になると正確な測定が難しくなるため、撮影のインターバルを短くすることでより精度の高い測定が可能であると考えられる。また、NCC アルゴリズムにおいては撮影のインターバルが短すぎたり長すぎたりするとパラメータの信頼度が低下するため、適切な撮影のインター

バルを模索することによって改善可能であると考えられる。また、今回の算出パラメータは、24時間撮影の平均を測定値としている。24時間撮影中でも、細胞運動速度は刻々と変化しており、15分おきの運動速度の24時間の平均が代表値となるかも今後の検討課題である。方策としては、平均速度ではなく加速度をパラメータ化する方法も考えている。また本実験では、2次元の顕微鏡撮影画像をベースに画像解析している。しかしながら、実際に培養皿上で増殖している細胞は細胞分裂を起こす。細胞分裂時に細胞は停止して、Z軸上に細胞が“運動する”。今回のアルゴリズムは、細胞分裂は“運動停止”として計算されているので、細胞分裂をどのようにとらえていくかも課題である。

実際の臨床現場への応用とそのため検討すべき課題は以下の通りである。本実験で開発したツールは再生医療製品の品質を保証するために、細胞培養段階で細胞の質を評価することを目的としている。それだけではなく培養初期段階において培養細胞の良し悪しを評価し望ましい品質ではないと判断された場合、再度サンプリングを行い基準以下と判断された細胞の培養を中止することができ、コストの削減にも繋がると考える。本実験で画像解析に用いたデータは、15分間隔24時間タイムラプス撮影から得られたものである。実際に臨床応用を考えたときに、1人の患者のタイムラプス撮影に24時間費やした場合、同時に複数人の患者の細胞評価が必要になったときに膨大な時間とタイムラプス撮影が可能な機器を用意するコストがかかると予想される。そのため、タイムラプス撮影の時間をどこまで短縮可能であるかの検討は必要である。また本実験では口腔ケラチノサイトを対象に検証を行ったが、前にも述べたように、本実験で開発したツールは他の細胞種に対しても応用可能であると考えられる。そのためには、それぞれの細胞種において本実験で用いた細胞運動速度パラメータの閾値を検討する必要であると考えられる。さらに本実験では口腔ケラチノサイトの細胞運動が細胞増殖能と相関があることから細胞品質管理のツールとして利用価値があると考えているが、その他の細胞種では細胞運動がどのような生物学的指標と相関があるかを検討する必要もある。

本実験で使用したアルゴリズムの欠点と、それに対して考える対応策については以下の通りである。OFアルゴリズムは複雑な形態の物体に対しても応用可能であるが、連続する画像間での物体の移動量が大きくなるとデータの精度が低下することが欠点として挙げられる。これに対しては、タイムラプス撮影の撮影インターバルを短くすることで大幅な物体の移動を避けることができ、データの精度の低下を防ぐことができると考える。一方で、撮影のインターバル短くした場合、データ量が増え解析にかかるコストの増加が予想される。今後、撮影のインターバルをどれくらい短くすればデータの精度の信頼度を保証できるか検証する必要がある。これは細胞の種類によっても検討する必要があると考える。NCCアルゴリズムでは画像間での類似度を評価しているが、本実験のような経時的に物体の形態が変化するものを対象とした場合、撮影時間による補正はされないため、撮影時間が短くなれば必然的に算出された数値は1に近づき、細胞/細胞群の動きがあまりないということになる。一方で撮影時間をある程度長くすると、細胞増殖の程度に関わらず、類似度が低くなると考えられる。そのため、NCCにおいても撮影のインターバルに対して検討する必要がある。これも細胞の種類に応じて検討する必要があると考えられる。

学術的意義に関する事項についての試問を行った。

新規性・創造性については以下のとおりである。細胞培養中の画像分析は再生医療製品の一貫性を維持するための一助となる可能性を大いに秘めているが、上皮細胞において細胞培養中に画像解析による細胞品質評価を行った報告はほとんどない。本研究では口腔ケラチノサイトにおいてタイムラプス顕微鏡画像に2種類のアルゴリズムを適用することで細胞/コロニーの動きを定量的かつ非侵襲的に分析し、細胞品質の評価を行った。我々の方法は複数のパラメータを用いて細胞を評価しているため、より安定した移植前の細胞の品質管理を確保することにつながると考えられる。

本研究結果の学術的発展性や応用価値については以下の通りである。本実験では口腔ケラチノサイトのp0細胞/コロニーを対象に細胞運動能と細胞増殖能の相関性を検証した。本実験で用いたアルゴリズムは口腔ケラチノサイト以外の細胞に対しても応用可能である。また、培養初期段階において培養細胞の評価をリアルタイムに非侵襲的に行うことが可能であるため、移植細胞の

品質保証だけでなく、条件に満たなかった細胞の培養を中止することでコスト削減することも可能である。撮影時間等の検証を重ねて撮影時間の短縮を図ることで、実際の現場での負担も軽減することができ応用価値は高いと考える。

今後の研究の課題と展開については以下の通りである。本実験では OF アルゴリズムと NCC アルゴリズムを用いた 2 つのパラメータと細胞増殖能との間の相関性については検証することができたが、実際の臨床応用を目標としたときには多くの課題が残っている。本研究では口腔ケラチノサイトの初代培養細胞の細胞/細胞群を対象に検討を行ったが、実際の臨床応用では継代した細胞を用いることが多く、継代細胞でもこれらのアルゴリズムを適用することが可能かどうか検討する必要がある。また最終的な目的は移植前に標準以下の細胞を除外することであり、MMS と MDI の閾値の設定が必要である。そのため、OF アルゴリズムと NCC アルゴリズムによって評価した細胞を用いて 3 次元培養を行ったときの上皮再生能力や長期的な増殖に関して追加で実験を行う必要がある。

論文構成・文法・語法の適切性については適切に執筆されている。

以上