

【助成 40-42】

自動ヒト培養幹細胞動態解析による再生医療支援システムの構築

研究者 鳥取大学医学部 教授 難波 大輔

〔研究の概要〕

本研究は、われわれが開発した自動細胞動態追跡システム DeepACT を培養ヒト表皮幹細胞に応用し、細胞動態データを最終的な医療の成果(移植後の生体組織の状態)と紐付けすることで、移植が成功しやすい培養幹細胞の状態を明確にし、実際の治療に活かす再生医療支援システムを構築することを目的としている。今回、われわれは、まず皮膚再生医療製品である培養表皮シートの作製過程における細胞動態を広範囲に捉えるため、システム開発を行った。さらに、培養表皮シートの品質向上に向けた培養法の改良も行った。両者を統合することで、より優れた再生医療製品が提供できることが期待される。

〔研究経過および成果〕

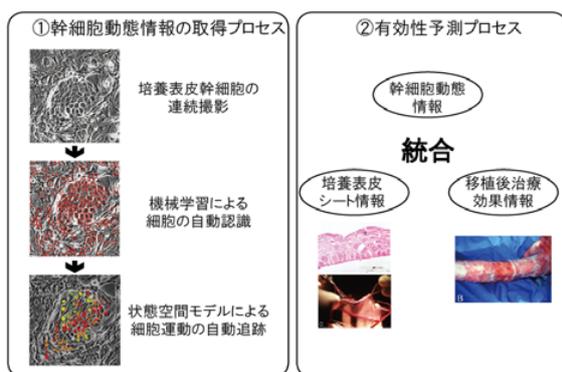
培養幹細胞を用いた再生医療が様々な疾患に対して応用されようとしている。しかしながら、発展途上にある培養幹細胞による治療は、幹細胞移植後の治療成果を予測できるほどの精度にはなく、熟練の細胞培養技術者による直感、いわば暗黙知によって、治療に最適な幹細胞が選別され、その治療が行われているのが現状である。ヒト表皮幹細胞を培養することで得られる培養表皮シートは、すでに臨床応用されており、多くの重度熱傷患者を救ってきた。しかしながら、その治療効果の決定要因である表皮シートの製造過程は細胞培養技術者の熟練度に大きく依存している。このことも要因の一部となって、実際に移植された培養表皮シートが正常に表皮として機能する割合は 100%ではなく、また培養表皮シートの製造プロセスに予測不能な要因が多いため、移植を待つ間に患者が死亡する例も多い。このような現状は、培養中の幹細胞の状態に関する情報と、最終的に形成される培養表皮シートの品質に関する情報、さらに移植後の治療効果に関する情報が全く乖離しており、

再生医療システムの中に組み込まれていないことが原因の一つである。皮膚の再生医療だけでなく、今後の幹細胞を用いた再生医療をさらに前進させるには、これらの情報を統合した治療効果予測技術の開発、及び、そのフィードバックによる治療成績の向上が不可欠である。

われわれは、ヒト表皮幹細胞の品質を培養中に評価する方法を開発するため、研究を行ってきた。そして、実際に培養中の表皮細胞の移動速度とその後の長期的な増殖能力に正の相関性を見出し、培養細胞の時系列位相差顕微鏡画像を解析するだけで、培養ヒト表皮幹細胞の品質を評価することに成功した(Nanba et al, J Cell Biol 2015)。これは培養幹細胞の動態情報から移植に適しているか否かを判断する本研究が目指す再生医療治療効果予測技術の基盤となる成果である。しかし、この方法は実験者の目視による細胞軌跡の解析を基盤としており、再生医療に応用できる精度に達していない。さらに細胞移動速度以外のパラメータも幹細胞の性質に大きく関与していると考えられる。以上のことから、われわれは、非侵

襲イメージングと機械学習による高度画像解析から得られる培養幹細胞の動態解析と、最終的に移植した表皮組織の状態(治療効果)を双方向的に関連させ、再生医療に応用するシステム構築の構想を得た。

以上の構想を実現すべく、われわれは、帝京大学教授である古徳純一博士と共に、深層学習と物体追跡アルゴリズムを組み合わせた自動細胞追跡システム DeepACT を開発し、培養環境と細胞動態の相関、さらに細胞動態のみからヒト表皮幹細胞を同定することに成功した (Hirose et al, Stem Cells 2021)。本研究では、すでに熱傷治療などへの臨床応用が実現しているヒト表皮幹細胞培養による再生医療をモデルとして、非侵襲イメージングと機械学習を用いた高度画像解析技術を組み合わせた DeepACT を用いて、培養幹細胞の状態を示すパラメータを網羅的に抽出することで、細胞培養技術者の暗黙知を数量化し、さらに、その情報と治療成績を結びつけることで、再生医療の有効性を予測するシステムを構築することを目的とした【下図】。



まず、培養表皮シートの作製過程における品質管理法を構築するには、広範囲における画像取得が必須である。われわれは、広範囲の視野を同時に撮影

できる広視野顕微鏡を使用し画像取得を行った。現在、使用できる広視野顕微鏡は、蛍光画像および明視野画像の取得が可能であり、われわれは培養ヒト表皮幹細胞の画像を明視野画像で取得し、DeepACT にて解析を行った。しかしながら、DeepACT は位相差顕微鏡画像を辞書データとして作製していることから、明視野画像を用いた解析では、十分な精度を得ることが出来なかった。現在、明視野画像を辞書データとしたシステムの再構築、また、位相差画像が取得可能な広視野顕微鏡の構築に向けて、検討を行っている。以上のような培養表皮シートの品質管理法を構築する一方で、われわれは、培養表皮シートの品質を向上させる手法の開発にも取り組んできた。そして、スイス連邦工科大学ローザンヌ校とシンガポール皮膚科学研究所と共同で、低温環境による mTORC1 シグナルの抑制が、培養系におけるヒト表皮幹細胞の維持を亢進し、mTORC1 シグナル阻害剤であるラパマイシンを培養系に添加することで、長期培養後も品質の良い培養表皮シートが作製できることを明らかにした【[発表論文1](#)】。今後は品質管理と品質向上の両方の技術を開発し、より優れた皮膚再生医療製品の提供ができるシステムの構築を行う予定である。

[[発表論文](#)]

1. [Nanba D*](#), Sakabe J, Mosig J, Brouard M, Toki F, Shimokawa M, Kamiya M, Braschler T, Azzabi F, Droz-Georget Lathion S, Johnsson K, Roy K, Schmid CD, Bureau JB, Rochat A, Barrandon Y. (2023). Low temperature and mTOR inhibition favor stem cell maintenance in human keratinocyte cultures. EMBO Reports, 24: e55439. (*: corresponding author)