

学位研究紹介

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—

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

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野
千川 絵美

Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Science
Emi Hoshikawa

【背景および目的】

近年の再生医療において疾患または損傷によって生じた組織欠損は、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分子生物学的分析が用いられているが、その方法は侵襲的である。また、経時的に解析できないため、ある特定の時点での細胞特性を評価しているにすぎず、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。

口腔ケラチノサイトに対し、細胞/コロニーの動きを非侵襲的、かつ定量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。細胞品質管理ツールとして適用するために、両アルゴリズムから独自の細胞運動能を示すパラメータとして平均運動速度(Mean Motion Speed, MMS)と平均活動度(Mean Dynamic Index, MDI)を算出し、細胞増殖能と関連する指標であることを示せば、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。そ

こで本研究では、MMSおよびMDIと口腔ケラチノサイトの細胞増殖能と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品質管理ツールとして使用可能か検証した。

【材料および方法】

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 $3.0-4.0 \times 10^5$ を 35mm Dish に播種し、4日間培養後15分間隔で24時間タイムラプス撮影を行った。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/コロニーの運動能の指標としてMMSとMDIを算出した(図1)。細胞増殖能はPopulation doublings(PD)を指標とし、対象のコロニーのタイムラプス撮影開始時の細胞数とタイムラプス終了から24時間後の細胞数から算出した(図2)。その後、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/コロニーの運動能はOFとNCCのアルゴリズムで的確に定量化され、それらのパラメータである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、2つの細胞運動能と細胞増殖の指標との間に、正の相関関係を示した(図3)。

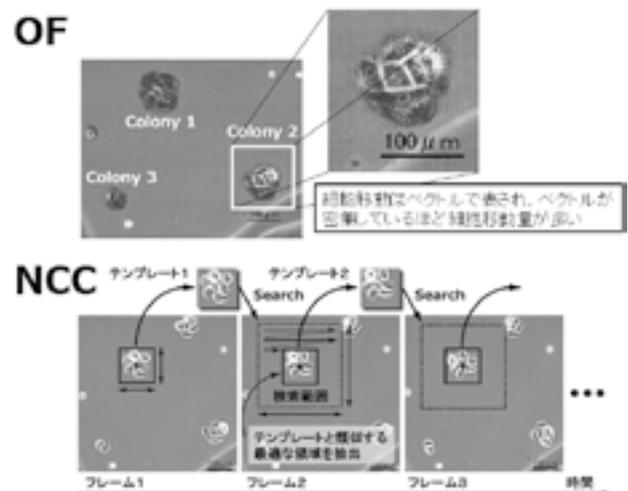


図1 口腔ケラチノサイトの運動能解析に用いたアルゴリズム
OFは2つの連続する画像間の動きを追跡できる画像処理アルゴリズムであり、NCCは2つの画像間の類似度を測定するアルゴリズムである。

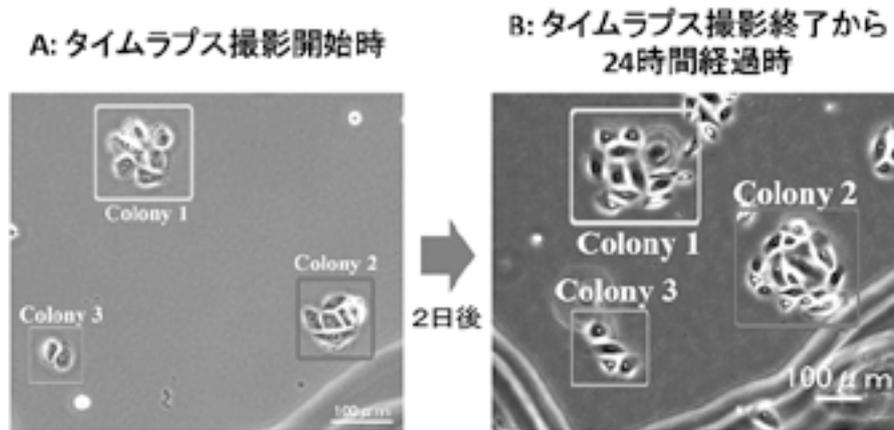


図2 口腔ケラチノサイトの細胞増殖能の算出
以下の計算式を用いてPDを算出した。
 $PD = [\log (B/A)] [\log 2]^{-1}$

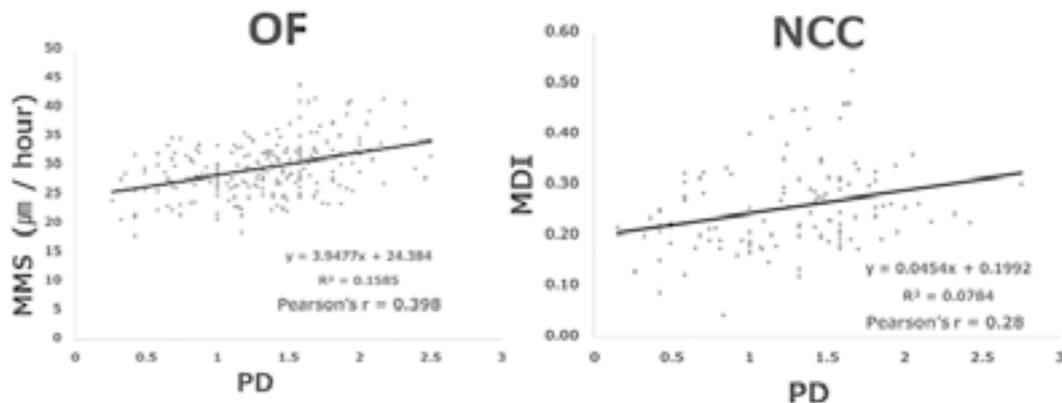


図3 口腔ケラチノサイトの細胞運動能と細胞増殖能との相関
OFは中程度の正の相関性、NCCは弱い正の相関性を示した。

【考察および結論】

口腔ケラチノサイトの細胞/コロニーの細胞運動能の解析にOFとNCCアルゴリズムを適用したところ、MMSとMDI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、MMSとMDI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。

【参考文献】

Hoshikawa E, Sato T, Kimori Y, Suzuki A, Haga K, Kato H, Tabeta K, Nanba D, Izumi K: 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. *J Tissue Eng.* 10: 1-12, 2019.
(図はすべて参考文献より改変して引用)