



Morphology-based non-invasive quantitative prediction of the differentiation status of neural stem cells

細胞形態情報解析を用いた神経分化状態のリアルタイム定量予測法の開発

(JBB, Vol. 124, No. 3, 351–358, 2017)

藤谷 将也¹・Noor Safika Huddin²・河合 駿¹・蟹江 慧¹
清田泰次郎³・清水 一憲²・本多 裕之²・加藤 竜司^{1*}

近年、筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病などの神経変性疾患に対する治療として幹細胞の利用が注目されている。特に、神経幹細胞 (neural stem cell; NSC) は種々の神経系細胞 (ニューロン, アストロサイト, オリゴデンドロサイトなど) への多分化能を有する幹細胞であり、臨床応用に向けた培養法や品質評価法が開発されている¹⁾。

NSCの品質評価、特に分化能に対する評価ではbeta III tubulin (ニューロン分化) やGFAP (アストロサイト分化) といった神経分化マーカーの染色評価や遺伝子発現評価が一般的に行われている²⁾。しかしこうした評価手法は、実際に評価するまでに長期間の分化培養が必要であり、手間やコストが非常にかかる作業となっている。加えて、細胞破壊的な評価であるために、分化培養過程の経時的な追跡が困難であることや、評価するタイミングも評価者の判断に委ねられるといった課題もある。

そこで筆者らは、分化培養中のNSCの品質を、細胞画像解析を用いて非侵襲的に評価する手法の開発を目的とした。筆者らはこれまでに、培養中に経時的に取得した位相差画像から個々の細胞の形を数値化し、インフォマティクス的手法で解析することで、細胞の分化ポテンシャルを細胞非破壊的かつ定量的に評価できる画像解析手法を開発してきた^{3,4)}。本研究では、この手法をNSCに応用し、(I) 神経分化培養中の細胞応答をリアルタイムに定量化、(II) NSCの分化ポテンシャルを早期に予測することを目指した。

市販の神経分化培地4種を用いてヒトNSCを分化培養し、培養中の位相差画像約1000枚を連続的に取得した。その後、培養8日目にbeta III tubulinとGFAPの免疫染

色にて各神経系細胞への分化度を評価するデータを得た。免疫染色の結果、培地ごとにニューロン分化度とアストロサイト分化度に差が生じていた。分化培養中の細胞形態を画像処理により数値化した結果、8日後のニューロン分化度が高い培養条件では4日目辺りから細胞が細長く変化していく様子が確認された。また、アストロサイト分化度が高い培養条件では分化培養1日目の時点で細胞が大きくなる変化が見られた。こうした経時的な形態情報を用いてクラスター解析を行った結果、実際の分化度と細胞形態変化に対応があることが確認され、分化培養中の細胞応答をリアルタイムに細胞形態情報のみからプロファイリングできる可能性が示唆された。

さらに、評価期間の短縮を目的として、分化培養初期の形態情報のみから最終日の分化度を予測可能か検証した。形態変化と分化データの関係性を、回帰分析 (Lasso回帰) を用いて予測モデルとして構築した。結果、最短で分化培養後1日分の細胞画像から8日後の分化度を定量的に早期予測できることが明らかとなった。

本論文では、分化培養中の非染色細胞画像のみから、神経分化度を細胞非破壊的かつ定量的に早期評価できる手法を開発した。今後、細胞治療用NSCの品質評価の他、神経分化プロトコルの最適化評価や薬剤スクリーニングへの応用が期待される。

- 1) Lindvall, O. *et al.*: *Nature*, **441**, 1094 (2006).
- 2) Rhim, J. *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 16237 (2015).
- 3) Sasaki, H. *et al.*: *PLoS One*, **9**, e93952 (2013).
- 4) Kawai, S. *et al.*: *J. Biomol. Screen.*, **21**, 795 (2016).

*著者紹介 名古屋大学大学院創薬科学研究科基盤創薬学専攻 (准教授) E-mail: kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

¹名古屋大学大学院創薬科学研究科基盤創薬学専攻, ²名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻, ³株式会社ニコン 生物工学 第97巻 第2号 (2019)