

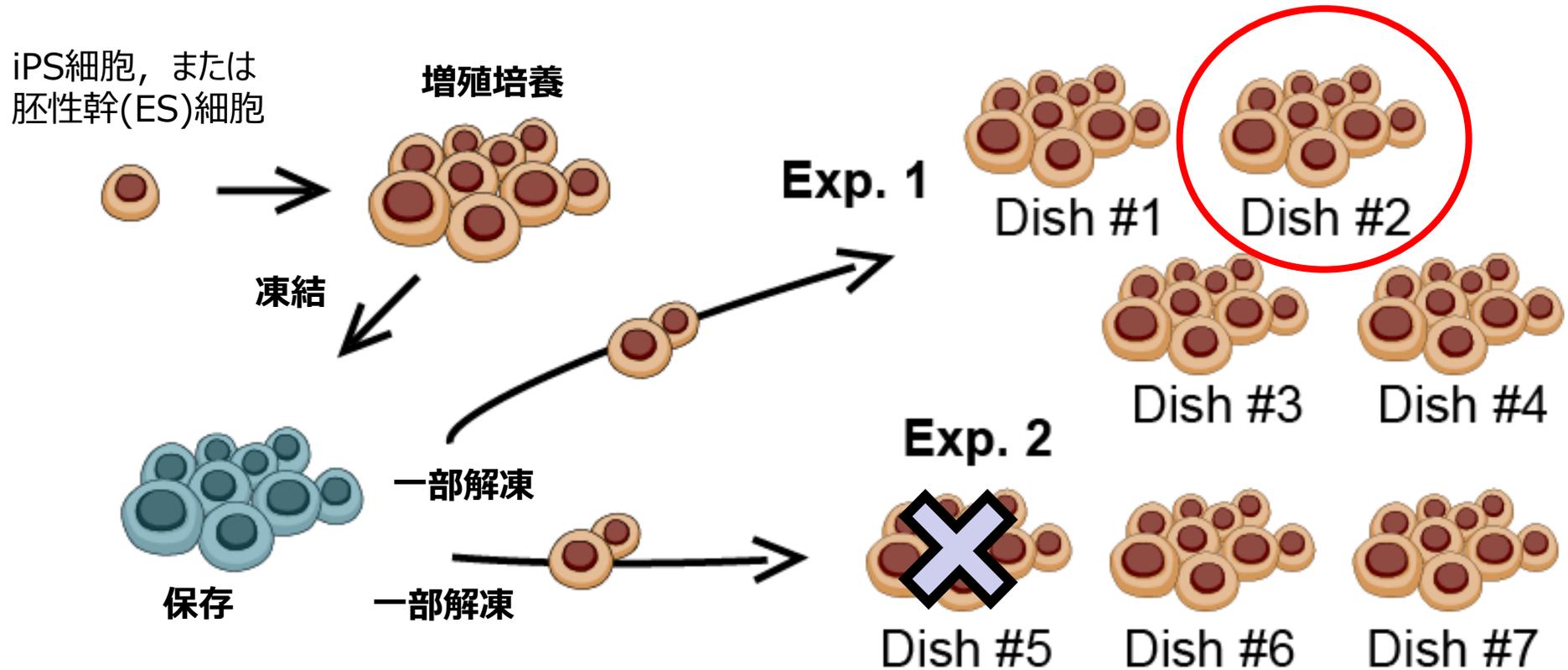
i P S 細胞の初期分化を 従来法より早期に評価する技術

所属 理化学研究所
生命機能科学研究センター
先端バイオイメージング研究チーム
氏名 渡邊 朋信

背景

- 我が国では、世界に先駆けて人工多能性幹細胞(iPS細胞)の発明が成され、様々な細胞や組織が、人工的に作られるようになってきている。
- iPS細胞の品質評価・管理について、規格や基準の標準化に関する議論が積極的に進められている。
- その主題は主に、iPS細胞の①樹立・作製、②管理・評価、③培養・保存である。
- 本発明は、②管理・評価に係る。

開発のモチベーション



従来技術①

iPS細胞には、ゲノムの違いや培養条件などの**内外の要因**によって**大きなばらつきが生じる**。この問題を解決するために、

ゲノム解析

エピゲノム解析

核型解析

試験管内分化誘導など、

iPS細胞の状態を評価するための標準的な基準を複数同時に適用することが提案されている。

従来技術①の問題点

- これら全ての手法により品質の不均一性を調べ上げることは、**費用的にも時間的にも多大なコストになる。**

⇒ 事前に簡素・低コスト・高スループットの細胞評価技術が必要

(たとえば)特開2020-72734(P2020-72734A)

初期化処理した細胞の亜硫酸水素塩処理後のDNAをPCRで増幅して、イオン交換クロマトグラフィーにより解析する方法。

- これらの方法は、侵襲的に細胞内液を抽出する。
- そのため、調べたiPS細胞と実際に用いるiPS細胞が異なるため、**異なる培養皿上にある細胞は、異なる性質を示すリスクが残る。**

従来技術②

問題を解決するために、**非侵襲的に取得できる顕微鏡画像によって計算される特徴点を用いてiPS細胞の品質を評価する技術が開発されている。**

増殖の特徴（コロニー被覆率、コロニー平均面積、コロニー面積のバラつき、コロニー平均長径の特徴量のうちひとつまたは複数）

微分干渉顕微鏡 + 深層学習(AI) など

従来技術②の問題点

- 「人の目」を機械に代替した技術であり、「**良質のiPS細胞**」と「**それ以外**」に分類するに留まる。
⇒ ラマン散乱スペクトルなど網羅的情報を用いた評価法が確立しつつある。
- 機械学習を用いるため、事前の学習データが必要となる。特に、深層学習では大量の学習データが必要となる。
- ヒトiPS細胞の（表現型の）個人差の有無については明らかにされておらず、**ある細胞で得られた学習データが他の細胞で適用できる確証は得られていない。**

解決すべき根底の課題

iPS細胞の品質評価の観点から鑑みると、

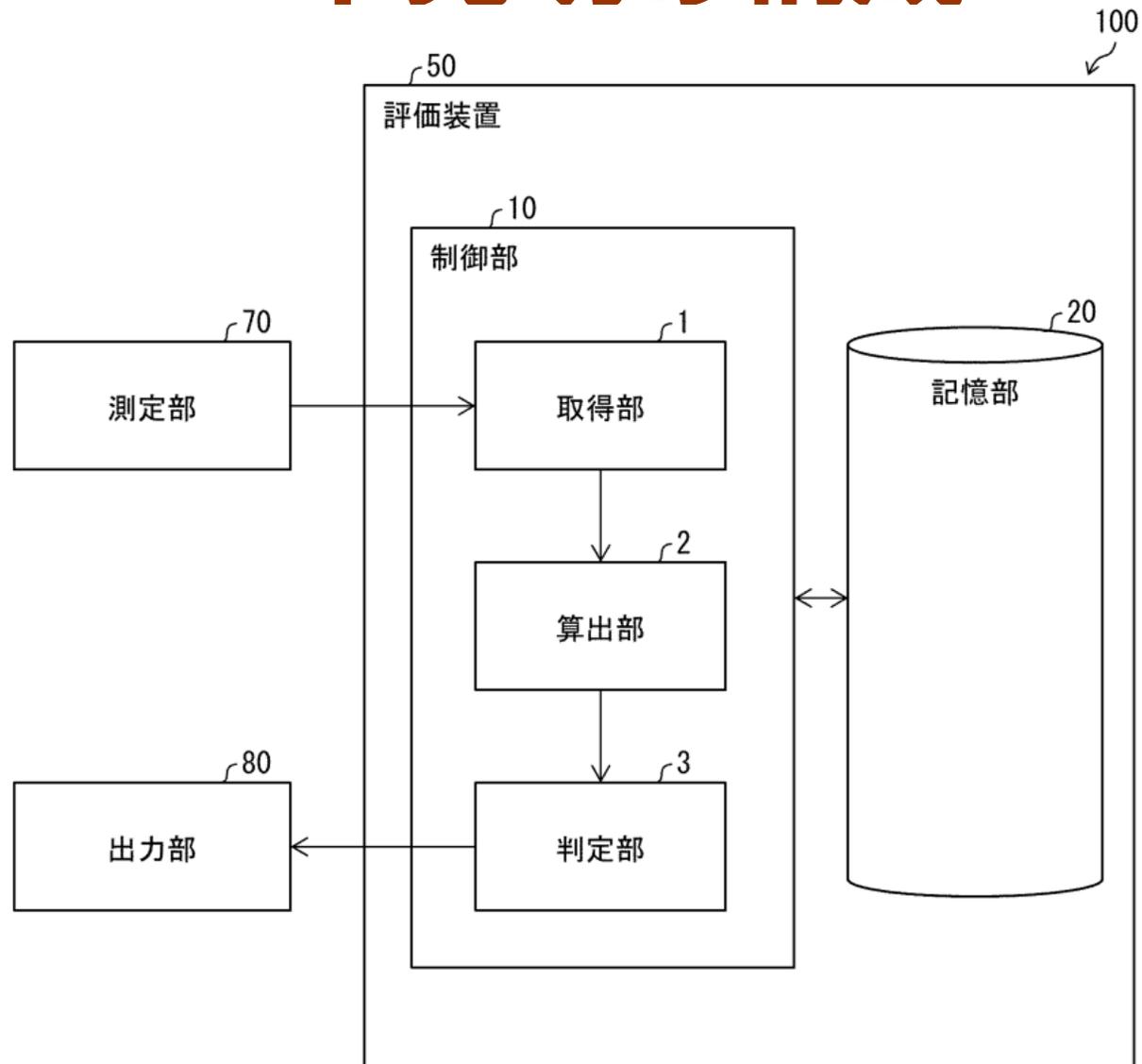
- (1) iPS細胞の分化直後（多能性を喪失するより前）に
- (2) 生きた状態で

iPS細胞の状態の相違を検出する必要がある。

新技術の特徴・従来技術との比較

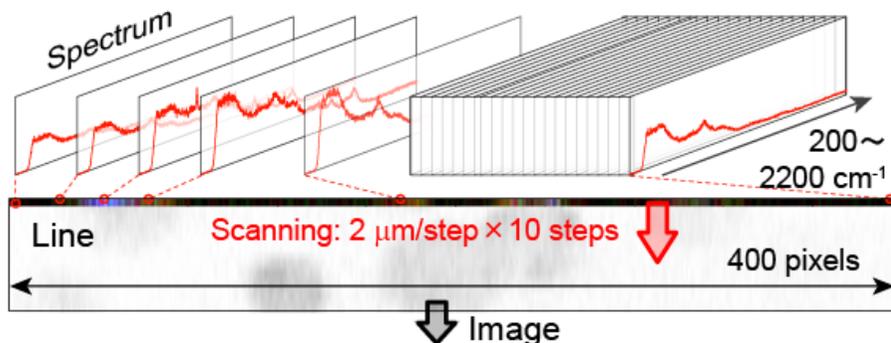
- 本技術は、非染色・低侵襲計測が可能なラマンスペクトル計測に基づく。
- 多くの従来技術とは異なり、細胞を生かしたまま、iPS細胞を評価できる。
- 従来法で認識される「分化開始」よりも前にiPS細胞の状態変化を検出することに成功した。
- 本技術は、別途、再現性の高いラマン散乱スペクトル計測（特願2022-082496）との併用が有効である。

本発明の構成



ラマンスペクトルの収集

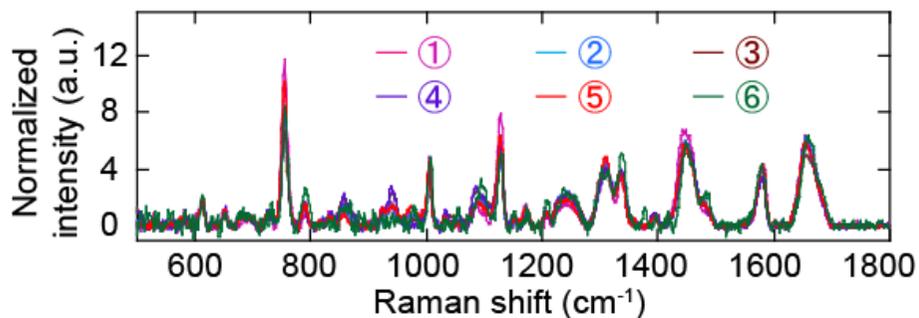
ハイパースペクトル
イメージング



ラベリング



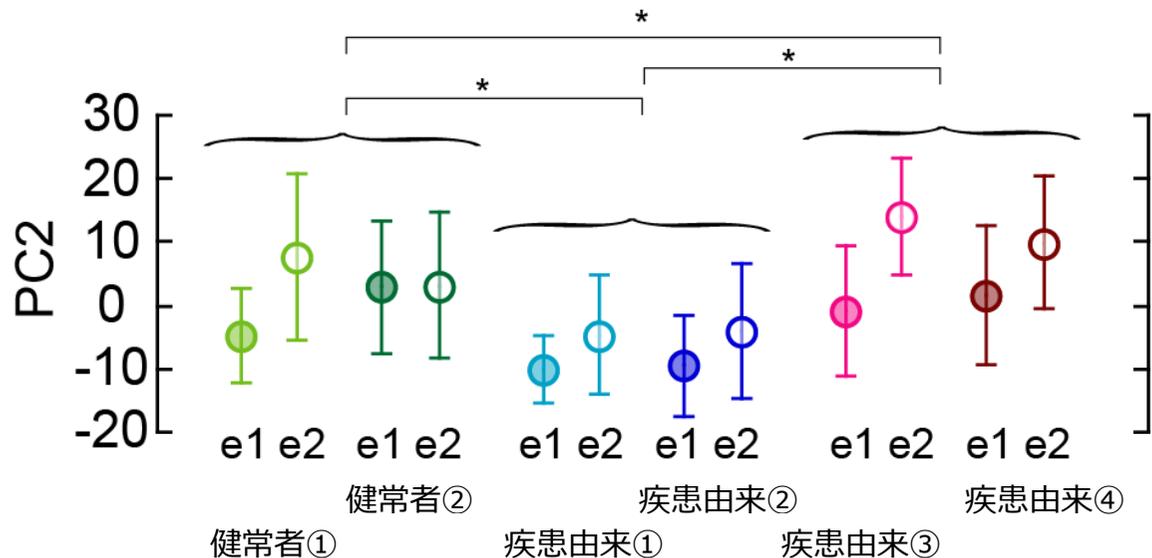
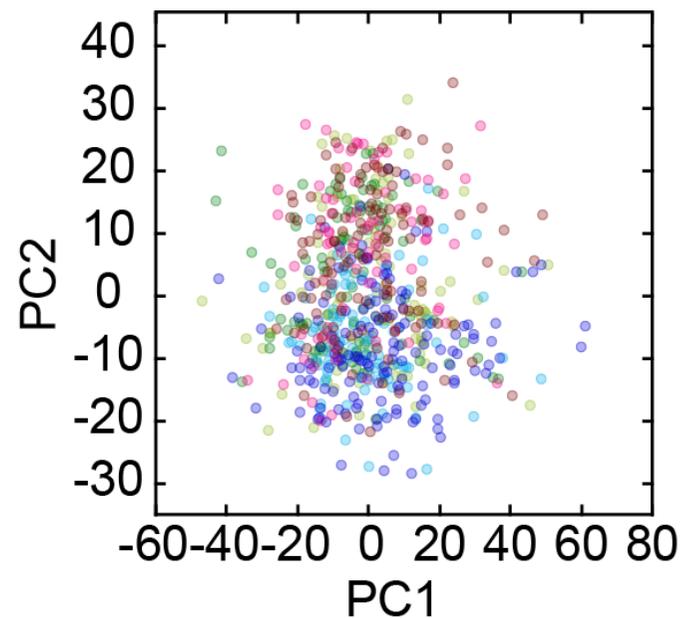
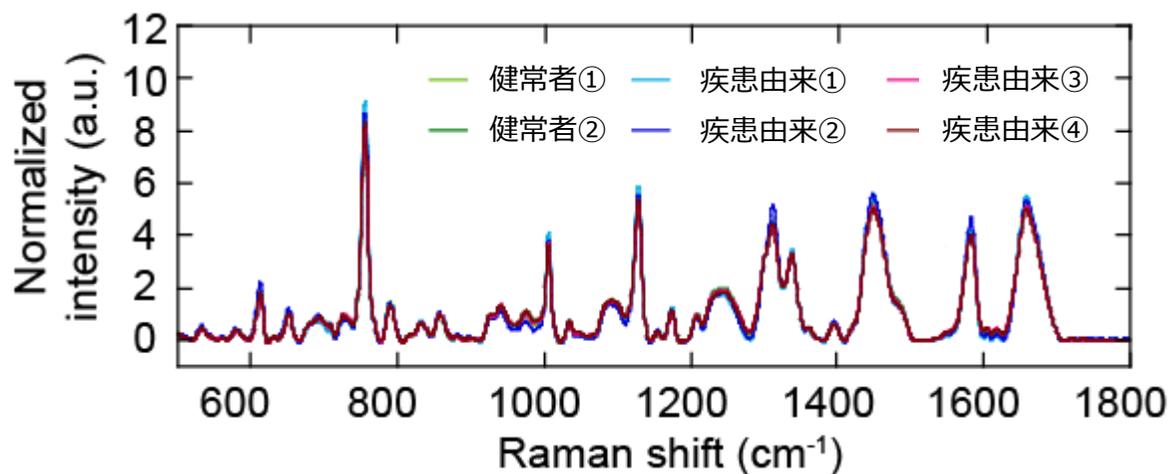
平均スペクトル



- ✓ 実験再現性が悪い
- ✓ 実用化に向けた壁
- ✓ 特願2022-082496
で解決

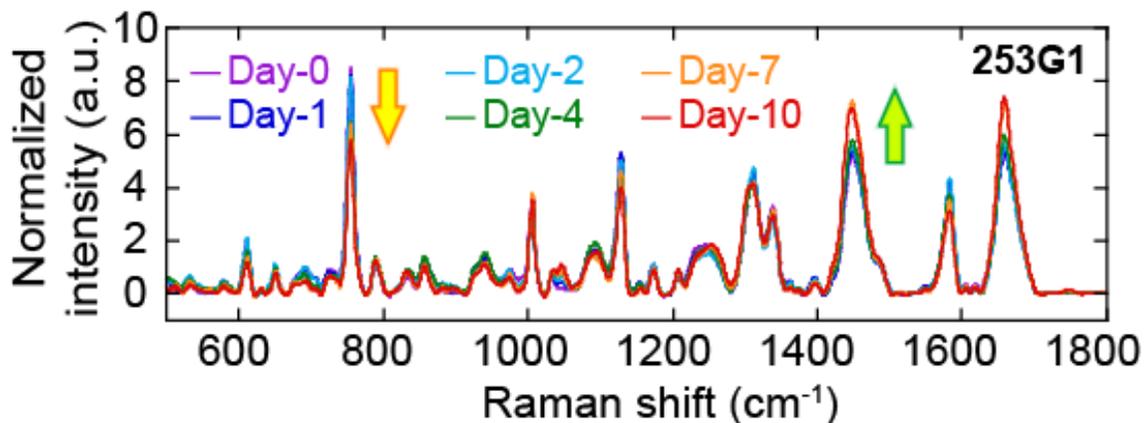
ラマンスペクトル適用の利点

細胞株間で差が無い（個人差間で差が無い）

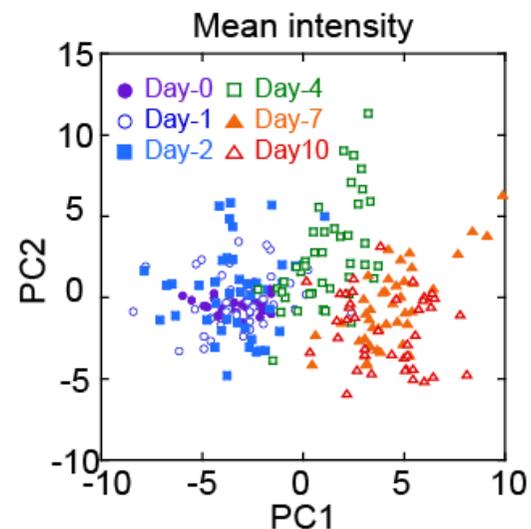


従来の方法(強度を指標)

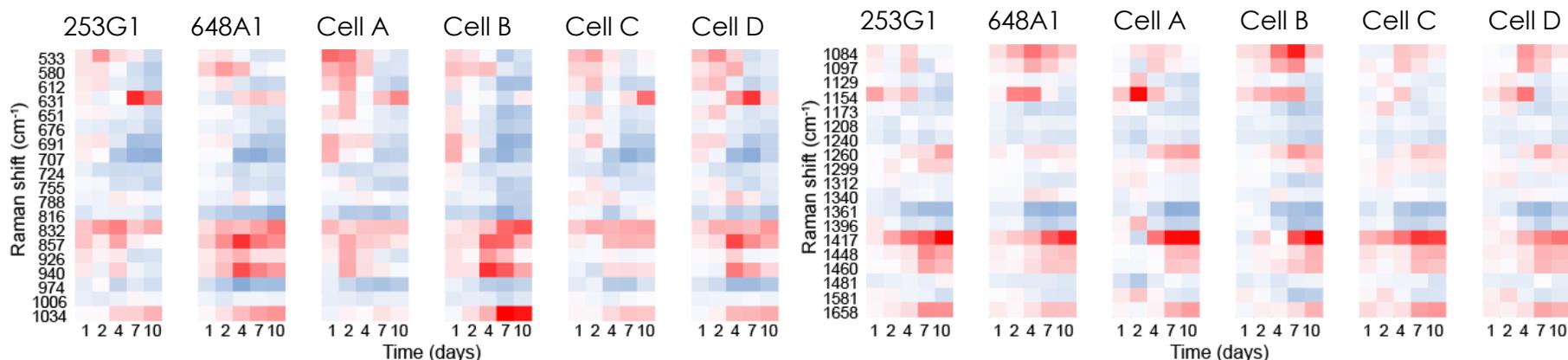
平均のラマン散乱スペクトル



主成分解析



ヒートマップ

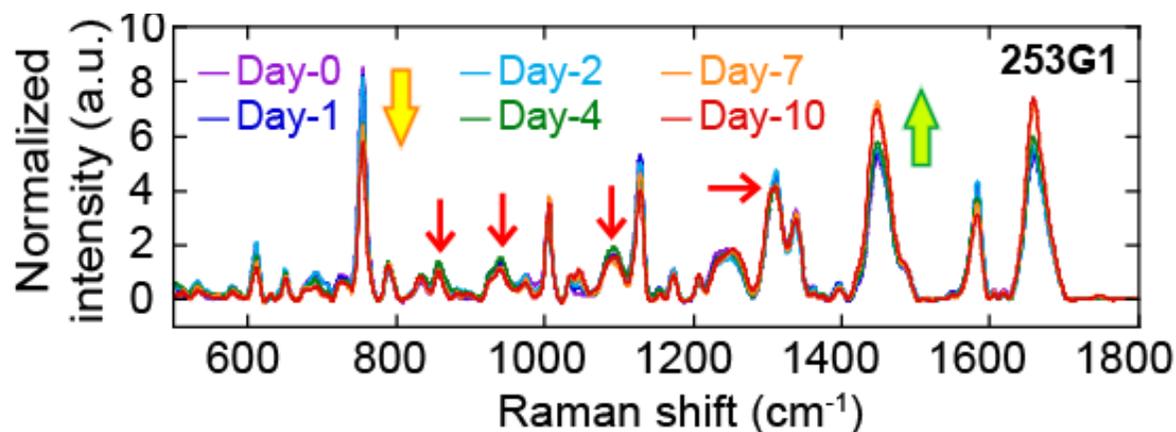


有意な変化は、分化誘導4日目に認識される

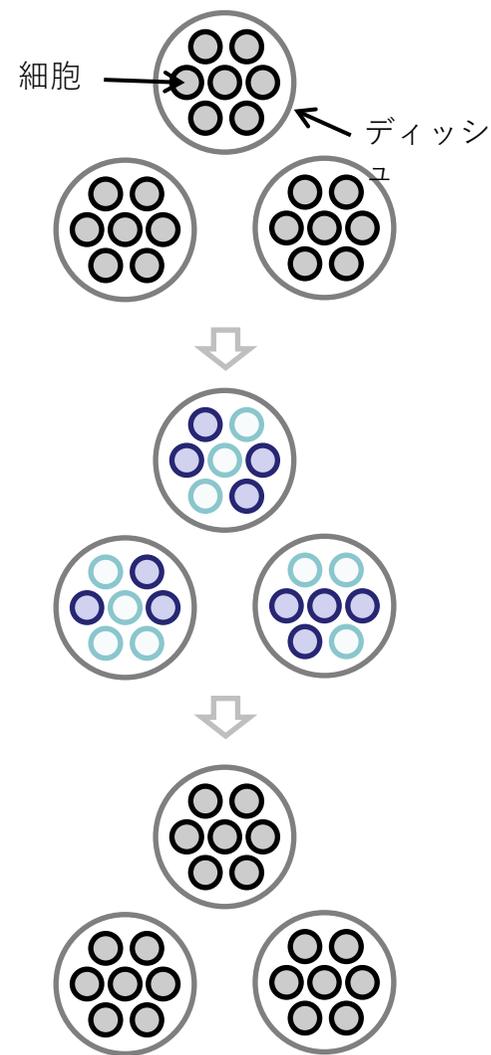
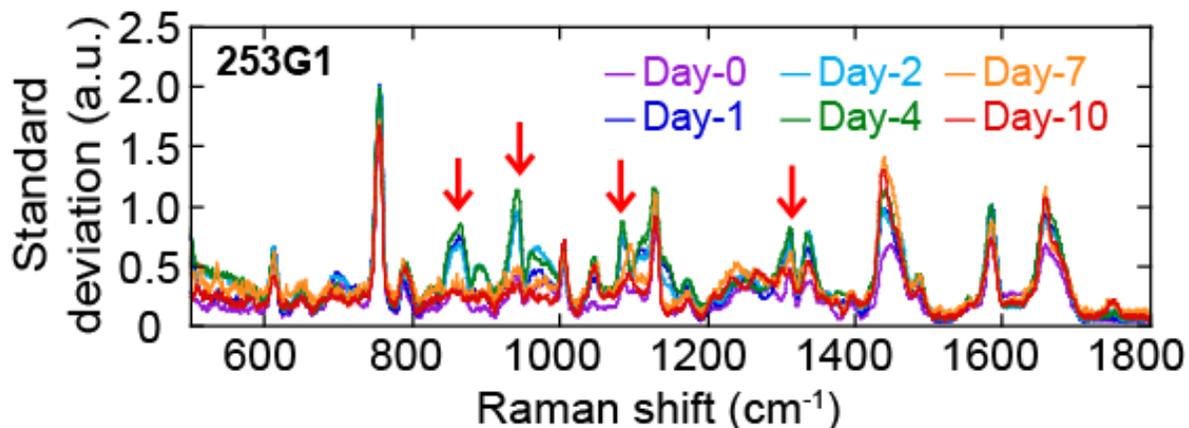
本発明（変動係数を指標）

強度は変化しないが、標準偏差が変化するピーク群が存在

平均ラマン散乱スペクトル



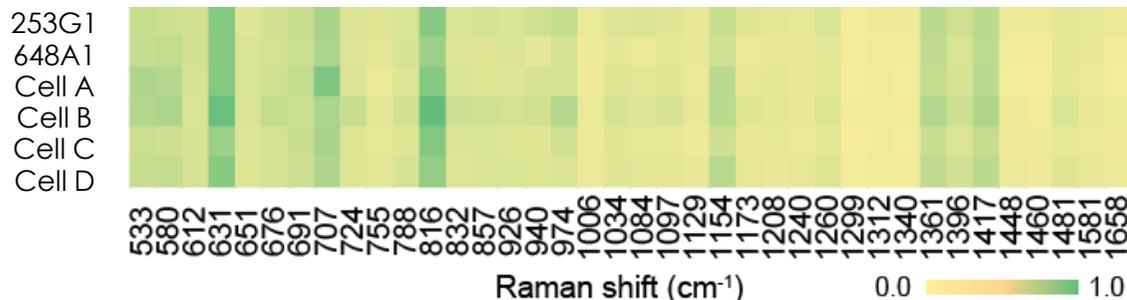
標準偏差スペクトル



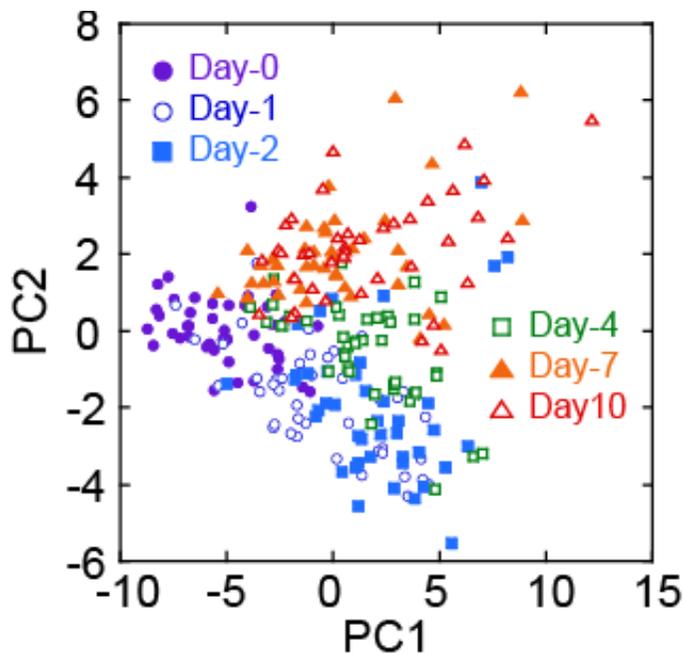
本発明 (変動係数を指標)

変動係数 $C_v = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{\bar{x}}$ 標準偏差 / 平均強度

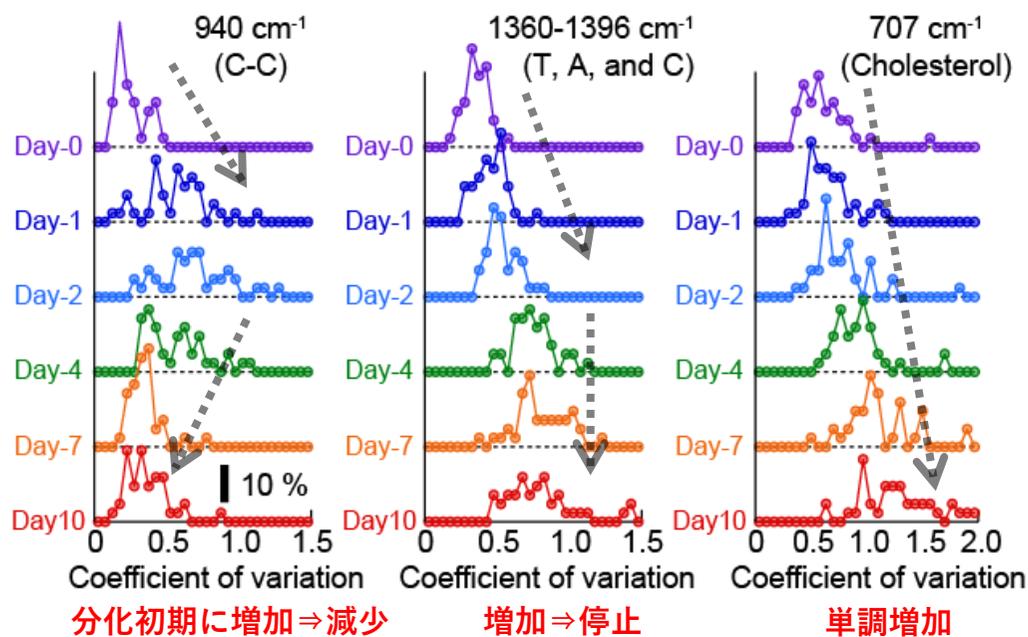
分化前の変動係数



主成分解析



時間変化



有意な変化を分化誘導1日目で認識可能

まとめ

- 変動係数(細胞のバラつき)を指標とすることにより、幹細胞の分化開始を従来法(強度情報)より早く検出できる。
- 実施例としてラマンスペクトルを用いているが、他のオミックスデータであっても適用可能。
- ただし、実験そのものにバラつきがあった場合には適用できない。

手技によるバラつきや計測誤差

- 低実験再現性の計測方法、たとえばラマンスペクトル計測であるなら、別技術（特願2022-082496）との併用など、必要である。

想定される用途

- iPS細胞のクリティカルチェック前のトリアージに有効。
- iPS細胞の維持培養時における細胞品質チェックに利用できる。
- 使用に不足する細胞を迅速に検出できるため、無駄なコストを軽減できる。
- 維持培養の最適化スクリーニングなどに有効。
- iPS細胞由来の体細胞の移植前チェックに利用可。
- 高再現のラマンスペクトル解析法(特願2022-082496)は、細胞のラマンスペクトル計測に広く流用できる。

実用化に向けた課題

- 現在、6種類のヒトiPS細胞、および、マウスES細胞についてのみ、コンセプトが適用できることを確認しているが、その他については未完である。
- 培養皿(ディッシュ)に接着する細胞でなくても適用できると思われるが、その確認はされていない。
- 実用化としては、iPS細胞の大量培養や移植前の品質評価が近く見えるが、それぞれに向けた周辺技術の開発や最適化などが必要である。
- 高再現のラマンスペクトル解析法(特願2022-082496)は、ソフトウェア技術なので、実用化に向けた課題は特にない。

企業への期待

- 未解決の「本コンセプトの汎用性の確認」については、現在、他の細胞株での確認や他オミックスへの展開を行っており、研究開発を持続していれば必然的に克服できると考えている。
- iPS細胞大量培養の技術を持つ、企業との**共同研究**を希望。
- また、iPS細胞由来体細胞製品（細胞シートなど）を開発中の企業、ラマン散乱計測のバイオ分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：ES細胞またはiPS細胞の評価装置および評価方法
- 出願番号：特願2022-054425
- 出願人：広島大学、理化学研究所
- 発明者：藤田英明、渡邊朋信

お問い合わせ先



株式会社理研鼎業 (りけんていぎょう)

新技術説明会事務局

E-mail: senryaku@innovation-riken.jp