

明 細 書

[発明の名称] AIを用いた画像解析による幹細胞の品質管理方法

[技術分野]

[0001]

本発明は、画像解析、特にAIを用いた画像解析による幹細胞の品質管理方法に関する。

[背景技術]

[0002]

再生医療とは、機能不全に陥った臓器を再生させる医療であり、実用化されているものとしては心臓移植、肝臓移植、腎移植、および造血幹細胞移植等がある。

再生医療応用が期待される 3 種の幹細胞としては、受精卵から得られる胚性幹細胞 (ES 細胞)、皮膚繊維芽細胞から山中 4 因子を導入して得られる iPS 細胞、および生体内の組織、臓器に存在する体性幹細胞等があり、現在、これらを用いた創薬への応用、臨床応用が世界中で盛んに研究開発されている。

[0003]

体中のあらゆる組織には幹細胞が存在し、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell:MSC) はそのうちの 1 種である。MSCは、主に骨髄に存在し、骨、軟骨の再生等に関与している。特に近年では、MSCを用いた細胞製品が再生医療等製品として承認され、他家由来の細胞を用いて細胞の大量製造を実施し、コストを下げながら大きな市場へと対応できる可能性が広がったことで、再生医療の産業化は急速に加速しつつある。

[0004]

本発明者らは、LNGFR (CD271) 及びThy1 (CD90) の2種の抗体とセルソーターを用いることで、骨髄からヒトMSCを直接分離する技術を開発し、さらに極めて増殖分化能の高い細胞集団である超高純度ヒトMSCを選別及び取得することに成功した。この超高純度ヒトMSCをREC (Rapidly Expanding Cell) と命名した。そして、RECは、通常法で培養したMSCに比べて100倍以上の細胞数を移植しても肺塞栓などの副作用が出ないことも明らかにした (特許文献1～4、非特許文献1)。

[0005]

しかしながら、現状の再生医療では、臨床研究が進む再生医療等製品の1品目の価格は数百～数千万円と推定されており、多くの患者に届けることが困難

であり、医療財政を圧迫するという課題が残されている。

再生医療が高額である最大の原因は、その細胞製造プロセスが非効率的であるためである。現在、再生医療用の細胞は、全て手作りで1品1品製造されており、職人的な熟練者でなければ作れない。特に大きな課題として、細胞の品質管理技術が存在しておらず世界中の先端的な研究施設、病院又は細胞バンクであっても、細胞の品質評価は熟練者の目利きに依存せざるを得ない。

[0006]

他方、本発明者らは、ヒトの細胞治療に用いる多種多様な細胞において、画像処理技術と AI（人工知能）や機械学習を融合した技術（細胞形態情報解析）によって、非破壊的、リアルタイム、低コスト及び定量的に、培養中の細胞品質を検査及び品質予測を行える技術を開発した（特許文献5～8、非特許文献2）。

[0007]

細胞形態情報解析とは、画像処理技術、データマイニング技術及びAI解析技術を融合し、細胞の生物学的評価結果（品質）の答えを、画像のみから予測することができる技術である。細胞形態情報解析技術を用いると、従来長期間培養後に染色を行うことによってしか得られなかった品質に関する情報が播種後3時間で検出可能となる。

[0008]

しかしながら、上記細胞形態情報解析技術の開発には大量の良質データ（機能性のある幹細胞の画像と品質データ）が必要であるため、通常の市販細胞を使用しても極めて高額であり、従来、10～20細胞のデータを解析するにとどまっていた。また、市販細胞はロット間の品質が安定せず、かつ様々な性質を持った細胞の混合物となっているため、細胞の適格性に課題が残されている。

[先行技術文献]

[特許文献]

[0009]

[特許文献1]特許第6463029号

[特許文献2]特許第6850944号

[特許文献3]特許第6932390号

[特許文献4]W02021/145002号公報

[特許文献5]特開2016-189701号公報

[特許文献6]特開2016-189702号公報

[特許文献7]特開2016-191565号公報

[特許文献8]特許第6721895号

[非特許文献]

[0010]

[非特許文献1]Mabuchi Y et al., “LNGFR+ Thy-1+ Vcam-1hi+ cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells”. Stem Cell Reports 1(2): 152-165, 2013

[非特許文献2]NEDO2018年度～2019年度成果報告書

次世代人工知能・ロボット中核技術開発／次世代人工知能技術分野／AIによる高純度間葉系幹細胞の品質検査高度化の調査研究

[発明の概要]

[発明が解決しようとする課題]

[0011]

上記事情から、細胞形態情報解析技術に適する細胞の開発が求められていた。

[課題を解決するための手段]

[0012]

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、RECが細胞形態情報解析技術に有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[0013]

[1]

LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけられた高速増殖性間葉系幹細胞集団を含む、被検細胞の品質評価又は判定のための標準品。

[2]

細胞集団の特徴が、以下の(a)～(d)のいずれかの情報から選ばれるものである、[1]に記載の標準品。

(a) 細胞集団内の個々の細胞における細胞の大きさ、伸展度、輪郭の複雑性、模様及び輝度、並びにこれらの画像情報からなる群から選ばれる少なくとも1つの細胞情報

(b) 前記(a)の細胞情報を、細胞集団内の複数の細胞にわたり積算して統計処理された情報

(c) 前記(b)の情報を複数の細胞集団に対して取得した組み合わせ情報

(d) 経時的に取得された前記(a)～(c)の情報

[3]

統計処理された情報が、平均値、標準偏差、分布形状からなる群から選ばれる少なくとも1つである[2]に記載の標準品。

[4]

品質が、細胞増殖率、細胞回収数、未分化度、分化度、産生因子の量、細胞のヘテロ性からなる群から選ばれる少なくとも1つである[1]に記載の標準品。

[5]

被検細胞が、幹細胞である[1]に記載の標準品。

[6]

被検幹細胞が、被検間葉系幹細胞である[5]に記載の標準品。

[7]

被検幹細胞集団の品質評価のための情報提供方法であって、以下の工程：

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ(参照画像情報)を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報(参照パラメータ情報)を取得する工程、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ(被検画像情報)を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報(被検パラメータ情報)を取得する工程、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する工程、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を被検幹細胞集団の品質評価のためにユーザに提供する工程

を含む、前記方法。

[8]

被検幹細胞集団の品質評価方法であって、以下の工程：

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ(参照画像情報)を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報(参照パラメータ情報)を取得する工程、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ(被検画像情報)を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報(被検パラメータ情報)を取得する工程、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する工程、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を指標として、被検幹細胞

の品質を評価する工程

を含む、前記方法。

[9]

被検幹細胞集団の品質評価のための情報提供システムであって、以下の手段
:

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ(参照画像情報)を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報(参照パラメータ情報)を取得する手段、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ(被検画像情報)を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報(被検パラメータ情報)を取得する手段、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する手段、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を被検幹細胞集団の品質評価のためにユーザに提供する手段

を含む、前記システム。

[1 0]

被検幹細胞集団の品質評価システムであって、以下の手段:

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ(参照画像情報)を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報(参照パラメータ情報)を取得する手段、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ(被検画像情報)を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報(被検パラメータ情報)を取得する手段、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する手段、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を指標として、被検幹細胞の品質を評価する手段

を含む、前記システム。

[1 1]

細胞集団の特徴が、以下の(a)～(d)のいずれかの情報から選ばれるものである、[9]又は[1 0]に記載のシステム。

(a) 細胞集団内の個々の細胞における細胞の大きさ、伸展度、輪郭の複雑性、模様及び輝度、並びにこれらの画像情報からなる群から選ばれる少なくとも1つの細胞情報

(b) 前記(a)の細胞情報を、細胞集団内の複数の細胞にわたり積算して統計処理された情報

(c) 前記(b)の情報を複数の細胞集団に対して取得した組み合わせ情報

(d) 経時的に取得された前記(a)～(c)の情報

[12]

統計処理された情報が、平均値、標準偏差、分布形状からなる群から選ばれる少なくとも1つである[11]に記載のシステム。

[13]

品質が、細胞増殖率、細胞回収数、未分化度、分化度、産生因子の量、細胞のヘテロ性からなる群から選ばれる少なくとも1つである[9]又は[10]に記載のシステム。

[14]

被検幹細胞が、被検間葉系幹細胞である[9]又は[10]に記載のシステム。

[15]

被検幹細胞集団の品質評価のための情報提供プログラムであって、コンピュータを、以下の手段：

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ（参照画像情報）を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報（参照パラメータ情報）を取得する手段、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ（被検画像情報）を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報（被検パラメータ情報）を取得する手段、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する手段、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を被検幹細胞集団の品質評価のためにユーザに提供する手段

として機能させるための、前記プログラム。

[16]

被検幹細胞集団の品質評価プログラムであって、コンピュータを、以下の手段：

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271)及びThy-1

(CD90のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ(参照画像情報)を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報(参照パラメータ情報)を取得する手段、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ(被検画像情報)を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報(被検パラメータ情報)を取得する手段、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する手段、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を指標として、被検幹細胞の品質を評価する手段

として機能させるための、前記プログラム。

[17]

細胞集団の特徴が、以下の(a)～(d)のいずれかの情報から選ばれるものである、[15]又は[16]に記載のプログラム。

(a) 細胞集団内の個々の細胞における細胞の大きさ、伸展度、輪郭の複雑性、模様及び輝度、並びにこれらの画像情報からなる群から選ばれる少なくとも1つの細胞情報

(b) 前記(a)の細胞情報を、細胞集団内の複数の細胞にわたり積算して統計処理された情報

(c) 前記(b)の情報を複数の細胞集団に対して取得した組み合わせ情報

(d) 経時的に取得された前記(a)～(c)の情報

[18]

統計処理された情報が、平均値、標準偏差、分布形状からなる群から選ばれる少なくとも1つである[17]に記載のプログラム。

[19]

品質が、細胞増殖率、細胞回収数、未分化度、分化度、産生因子の量、細胞のヘテロ性からなる群から選ばれる少なくとも1つである[15]又は[16]に記載のプログラム。

[20]

被検幹細胞が、被検間葉系幹細胞である[15]又は[16]に記載のプログラム。

[21]

[15]又は[16]に記載のプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体。

[22]

高速増殖性間葉系幹細胞の画像処理方法であって、以下の工程：

(a) [1]に記載の標準品の画像データを取得する工程、並びに

(b) 前記取得された画像データのノイズを除去し、及び／又は前記画像データを正規化する工程

を含む、前記画像処理方法。

[23]

[22]に記載の方法で処理された画像データを、コンピュータの機械学習用に提供する方法。

[24]

[22]に記載の方法で処理された画像データと、被検細胞の画像データとを照合して、当該被検細胞の品質を予測する方法。

[発明の効果]

[0014]

本発明により、高速増殖性間葉系幹細胞集団を含む、被検細胞の品質評価又は判定のための標準品が提供される。本発明の標準品により、幹細胞を細胞医薬として製造する際の品質管理の効率化と低コスト化を達成し、幹細胞医薬製造コストを実現することが可能となった。

[図面の簡単な説明]

[0015]

[図1]能力の高い細胞バンクを選択するための形態学的プロファイルを用いた連続継代能予測の概念図。標的RECを、クローン選択工程(P1およびP2)を介してMSCから選別した。P3において細胞を凍結保存して、さらなる実験のための初期継代細胞の調製用に一次細胞バンクを形成した。連続継代試験を、P3から継代限界まで試験した。実用的な細胞に基づく治療製品製造のためには、このような連続継代の間に候補細胞バンクが形成される。しかしながら、例えば、細胞が予期せぬ増殖停止を示し、その結果、細胞バンクの確立が失敗するというリスクがある。それだけでなく、増殖能がさらに低下するものの、より高い活性のより高い能力を有するバンク細胞を得るリスクがより低い候補細胞バンク、すなわちより質の高い候補細胞バンクの形成が期待される。このような連続継代能は、P2の細胞画像における形態学的プロファイルから予測された。形態学的プロファイルは、時間経過×12個の形態学的記述子×細胞集団情報(平均値およびSD)から構成される。

[図2]15クローンのRECのプロファイルを示す図。aは、RECの連続継代試験の結果である。bは、RECの代表的な形態である。cは、RECの成長プロファイルを示す。dは、増殖率と連続継代限界数との相関。R²は決定係数を示す。

[図3]aは、15クローンのRECと従来処理のバルクMSC(cMSC、9ロット)とのサ

イズ分布比較およびその経時変化、並びに15のRECの形態学的特徴付けを示す図。接着細胞および伸長中の細胞のみを計数した。破線の縦線は、平均細胞サイズを表す。bは、RECおよびバルクMSCの代表的な経時的画像を示す。黄色と青色の矢印は、それぞれ増殖細胞と直近の増殖細胞を表している。cは、15クローン間のサイズ分布と時間経過の変化を示す。dは、「面積のSD」と継代数の相関であり、 R^2 は、決定係数である。(e)および(f)は、24個の形態学的記述子によってプロファイリングされた15個のRECのPCAプロットを示す。(e)はクローンカラーラベル(e)を含むPCAプロットであり、(f)は連続継代能ヒートマップによって着色されたPCAプロットである。

[図4]データ利用効果と連続継代予測モデルの性能の網羅的評価を示す図。aは、LAS S0によるデータ利用効果の評価を示す図。行値は使用されるFOV数を表し、列値は、学習データに使用される時間窓のサイズを表す。ヒートマップはRMSEを示す。 $RMSE < 1.0$ は、良好な性能のモデルと考えられる。bは、連続継代予測モデルのパフォーマンスを視覚化するための散布図であり、各ドットが1つのクローンを表す。cは、構築されたモデルの2つのペア間のモデル構造の比較であり、6、6~30、6~60、および6~90時間の時間窓を選択した。ヒートマップは、モデル内のすべての選択された形態学的記述子上のすべての重み間の相関係数を示す。相関係数は使用される記述子の組み合わせが類似している場合に高くなる。dは、RFによるデータ利用効果の評価行は使用されるFOV数を示し、列はトレーニングデータに使用される時間窓サイズを表す。ヒートマップはRMSEを示す。 $RMSE < 1.0$ は、良好な性能のモデルと見なされる。

[図5]ブートストラップのFOV選択(50反復)によって含まれるデータ変動に対する連続継代予測モデルのロバスト性およびそのデータ利用効果の評価を示す。

[図6]本発明のシステムのブロック図である。

[図7]本発明のシステムの動作を示すフローチャートである。

[図8]幹細胞の画像データから抽出される情報を示す図である。赤色がRECクローンMSCであり、情報が均質で整っていることが示される。横軸は数値化した指標。図中の山の形は数千個の細胞集団のヒストグラムである。

[図9]幹細胞の画像データから抽出される情報を示す図である。RECの画像データから抽出される情報は、複数の指標で見ても整っていることが示される。青色のドットはバルクMSCであり、種々の場所に散在するのに対し、赤色のドットはRECクローンを表し、ドット全体できれいな楕円形を描いている。

[図10]幹細胞の画像データから抽出される情報を示す図である。左パネルはRECクローン、右パネルはバルク(市販品MSC)の幹細胞集団を表す。縦軸は時間を表す。RECクローンは、分布が1つのまま時間が変化する。バルクは、

培養初期は山が2つ観察され、それが融合又は混合した状態で時間が経過する。つまり細胞の情報が錯綜している。

[図 1 1] フローサイトメーターによる細胞選別結果を示す図。フローサイトメーターによる選別過程により、集団がクローンになることで、種々のクローンが得られる。このことは、REC以外で廃棄対象となっていたクローンも、機械学習のために、ある特徴を有する細胞として活用できる可能性があることを示す。

[図 1 2] 各MSCの増殖速度（上パネル）、脂肪分化度（中パネル）及び骨分化度（下パネル）を示す図。

[図 1 3] 各MSCの脂肪分化予測モデルを示す図。RECクローンデータでは精度が高く、バルクでは精度が低い。

[図 1 4] クローンモデルでバルクデータを予測した結果を示す図。

[図 1 5] 細胞形態情報の統合を示す図。

[図 1 6] 細胞形態情報の統合を示す図。

[図 1 7] 細胞集団の形態学的プロファイルを示す図である。

[図 1 8] バルクMSCの増殖プロファイルを示す図である。

[発明を実施するための形態]

[0016]

1. 概要

本発明は、高速増殖性間葉系幹細胞（REC）集団を含む、被検細胞の品質評価又は判定のための標準品に関する。

本発明においては、RECの各クローンの細胞画像情報解析を実施し、実際の培養データと照合した結果を踏まえて、REC各クローンのデータを用いた学習モデルを構築し、品質評価システムを完成した。

[0017]

細胞画像情報解析に使用したクローンは100クローン以上であり、商品化レベルのクローン、逸脱が確認されたクローン、ドナーロットの異なるクローン、培養環境を変化させたクローンなどが挙げられる。また、詳細培養プロセスデータについても画像データと共にメタデータとしてこれを整理し、データベース化した。さらに、各クローンについて骨分化、脂肪分化能、および各増殖能についての実験結果を DB に加えた。

[0018]

さらに本発明の一態様では、AIを活用しつつ、従来の機械学習モデルとしての線形回帰モデルに加え、非線形回帰モデル（3 種類）を選定し、そのソースコードの開発と、環境設定を行った。また本発明においては、RECクローンの

データを用いた学習モデルの検証を行い、RECのデータを参照し比較することにより、他の間葉系幹細胞の品質評価法を確立した。例えば、最短で 2 日間の増殖培養中のデータから RECの5日後の細胞回収率が高精度に予測できることや、増殖培養中の画像から1か月後の分化能の逸脱を予測できることがわかった。さらに、REC細胞で網羅的に検証した品質DBを用いて、他社MSCの不均質性をRECデータから定量的に評価し、他社MSCの品質予測までをほぼ同一の性能で予測できることが明らかとなった。

[0019]

2. 被検細胞の品質評価又は判定のための標準品

本発明において使用される標準品は、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけられた高速増殖性間葉系幹細胞集団である。

LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーが陽性又は陰性を示す高速増殖性間葉系幹細胞は、例えばW02009/31678号に記載の方法に従うことができる。

[0020]

その方法の概要は以下の通りである。

まず、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団から、CD271及びCD90のうち少なくとも一方が陽性 (CD271+/CD90+) の細胞分画を選別することにより、間葉系幹細胞を高度に濃縮する。なお、ヒト間葉系幹細胞が含まれる細胞集団に血球系細胞が含まれる場合は、非血球系の細胞を選別するために、CD45及びCD235aが共陰性 (CD45-CD235a-) の細胞を選別する工程を加えてもよい。

[0021]

間葉系幹細胞が含まれる細胞集団は、フローサイトメトリーやアフィニティー・クロマトグラフィーによって調製することができる。この細胞集団を得るための材料は特に限定されないが、例えば、骨髓や末梢血 (G-CSF投与後の末梢血を含む) 等が挙げられる。なお、骨髓は、脊椎、胸骨、腸骨等の骨髓を用いればよい。細胞調製の際、材料が間葉系幹細胞を巻き込んだ細胞塊になっている場合には、必要により、材料に対してピペッティング等による物理的处理や、トリプシン、コラゲナーゼ等による酵素処理を行うことができる。また、材料に赤血球が混入している場合には、予め赤血球を溶血しておくことが好ましい。

[0022]

上記の通り調製された細胞集団を用い、CD271+/CD90+細胞を選別する。CD271+/CD90+細胞を選別する方法としては、例えば、抗体を用いる方法が挙げられる。抗体は、CD271+/CD90+細胞を選別することが可能な、抗CD271抗体及び抗C

D90抗体である。選別にフローサイトメトリーを用いる場合には、FITC、PE、APC等の異なる蛍光色素で標識された抗CD271抗体と抗CD90抗体を、適宜組み合わせることで、生細胞を短時間で選別することが可能になる。また、フローサイトメトリー以外にも、磁気ビーズを用いる方法やアフィニティー・クロマトグラフィーを用いる方法によって、CD271+/CD90+細胞を選別することが可能である。

[0023]

次に、選別したLNGFR及びThy1共陽性細胞を単一細胞（クローン）培養し、増殖が速いロットを選択することで、増殖能・分化能・遊走能にすぐれた高純度ヒト間葉系幹細胞（REC: Rapidly Expanding Clone）を得る。

ヒト骨髄又は脂肪・胎盤絨毛膜から単核細胞を調製し、骨髄単核細胞を抗LNGFR抗体及び抗Thy1抗体で染色する。次に、フローサイトメトリー（セルソーター）を用い、LNGFR陽性及び/又はThy1陽性細胞を96穴培養プレートにクローンソートする。すなわち、1ウェルに細胞1個ずつ播種する。単一細胞培養2週間後に培養プレートを顕微鏡下で撮影し、コンフルエント又はセミコンフルエントになったウェルを選別し、当該ウェルに含まれる細胞をRECとする。

[0024]

ここで、「増殖が速い」、「高速増殖性」とは、96穴培養プレートの1ウェルに細胞1個ずつ播種して培養したときに、培養開始2週間後又はそれ以前に培養プレートがコンフルエント又はセミコンフルエントになる程度の増殖速度（倍加時間（ダブリングタイム）が 26 ± 1 時間）を有することを意味する。

コンフルエントとは、培養容器表面（培養面）の90%以上を培養細胞が覆っている状態である。また、セミコンフルエントとは、培養容器表面（培養面）の70~90%を培養細胞が覆っている状態である。使用する培養器具のサイズ及び種類は、細胞の増殖速度に応じ適宜変更可能である。遅れて増殖している細胞（Moderately/Slowly Expanding Cells）、すなわち単一細胞培養2週間になってもセミコンフルエント又はコンフルエントにならなかった細胞は破棄する。RECとして選別した各ウェルから回収したRECを各ウェル毎に培養フラスコに移入し、さらにコンフルエントになるまで培養する（拡大培養）。その後、拡大培養した細胞を別々に回収する。1ウェル由来のRECを1ロット（後述の実施例における1クローン）とし、これを後述の選別に使用する。

[0025]

本発明の細胞は、1ウェルに細胞1個ずつ播種するクローンソートにより得られたものであるから、増殖した細胞同士の遺伝形質はすべて同じである。従って、本発明においては細胞集団全体を「クローン」と言うことも、細胞集団を構成する個々の細胞を「クローン」と言うこともある。

[0026]

なお、本発明において、選別および品質評価に使用するためのRECは、RECマーカー（抗Ror2）により予め評価しておくこともできる。例えば、前記拡大培養後、全ロットから付着増殖した細胞を回収し、各ロットの一部（ $1\sim 3\times 10^3$ 個程度）の細胞をとりわけて、抗Ror2に対するモノクローナル抗体で単一染色を行う。抗Ror2に対するモノクローナル抗体で単一染色を行う手法は公知である（WO2016/17795）。要約すると、RECマーカーを用いたフローサイトメトリー解析により、回収細胞におけるRECマーカー陽性細胞の比率を求める。比率は、定量的PCRを用いてRor2のmRNA発現を定量してもよいし、顕微鏡により同比率をマニュアルにより求めてもよい。上記陽性比率が一定値（例えば65%）以上のロット（細胞集団）を合格とする。

[0027]

2. 細胞集団の特徴

本発明において、被検細胞の品質を評価又は判定するための標準品として使用される細胞集団の特徴は以下の（a）～（d）のいずれかの情報から得ることができる。被検細胞は特に限定されるものではないが、間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES 細胞）、iPS 細胞などが好ましい。

（a）細胞集団内の個々の細胞における細胞の大きさ、伸展度、輪郭の複雑性、模様及び輝度、並びにこれらの画像情報からなる群から選ばれる少なくとも1つの細胞情報

[0028]

細胞の大きさ、伸展度、及び輪郭の複雑性の情報は、例えば、面積、細胞径、幅、長さ、外周、弧長、及びこれらの組み合わせ、並びに細胞の画像に占めるこれらの割合（例えばピクセル数など）を指標として測定あるいは算出することにより取得できる。

模様及び輝度は、例えば、画像において特定の色相を示すピクセルの数などを指標とすることにより取得できる。

[0029]

（b）前記（a）の細胞情報を、細胞集団内の複数の細胞にわたり積算して統計処理された情報

前記（a）の細胞情報は、細胞集団内の複数の細胞にわたり積算して統計処理する。

統計処理の方法は特に限定されるものではない。

統計処理された情報は、例えば平均値、標準偏差、分布形状などが挙げられる。

[0030]

(c) 前記 (b) の情報を複数の細胞集団に対して取得した組み合わせ情報
前記 (b) の情報は、複数の細胞集団に対して取得し、組み合わせることができる。

[0031]

(d) 経時的に取得された前記 (a) ~ (c) の情報
「経時的に」とは、高速増殖性間葉系幹細胞集団を作製した後の任意の時点を開始時として所定の時間経過後に、又は連続的にという意味である。例えば1時間後、2時間後、3時間後、5時間後、10時間後等の情報である。

[0032]

本発明において、被検細胞を評価又は判定の指標となる品質は、細胞増殖率、細胞回収数、未分化度、分化度、産生因子の量、細胞のヘテロ性であるが、これらに限定されるものではない。

[0033]

細胞増殖率とは、被検細胞又はその子孫を培養した際の細胞増殖の勢いを意味し、例えば、細胞の増殖速度、細胞増殖が停止するまでの継代回数、および1つの細胞から細胞増殖によって得られる細胞数の総和などを指標として評価又は判定することができる。細胞増殖率とこれら指標とは正の相関にある。増殖率が高い、すなわちこれら指標が大きい場合は、品質が高い（増殖能が高い）と評価又は判定することができる。

細胞回収数とは、被検細胞又はその子孫を一定期間の培養した結果、得られる生細胞の数を意味し、増殖能が高い品質が重要な場合、細胞回収数が多い細胞は「目的の品質を満たす細胞」と評価又は判定することができる。

[0034]

未分化度とは、幹細胞が機能的に分化していく過程における被検細胞の分化段階の未熟さ、又は被検細胞から分化可能な細胞種の多様さを意味し、大量の幹細胞を未分化の状態で調整・ストックすることが重要な場合、未分化度が高い細胞は「目的の品質を満たす細胞」と評価又は判定することができる。

分化度とは、被検細胞が目的とする種の細胞、組織又は臓器へ正常に分化する度合い又はその速さを意味し、幹細胞を目的の状態まで分化させることが重要な場合、分化度が高い細胞は「目的の品質を満たす細胞」と評価又は判定することができる。

[0035]

産生因子の量とは、被検細胞から産生される特定のサイトカインの量（濃度など）又はその種類の数を意味し、産生因子の量によって、目的とする機能（例えば、増殖能及び遊走能など）を被検細胞が有しているかどうか、又はその程度、並びに被検細胞の老化の程度を評価又は判定することができる。例えば

、被検細胞から産生される細胞増殖因子の量が多い場合は増殖能が高く、遊走促進因子の量が多い場合には遊走能が高いといえ、いずれの場合も目的の細胞品質に対する合致度を評価又は判定に利用することができる。

[0036]

細胞のヘテロ性とは、被検細胞の表現型（細胞の形態的特徴や遊走能や応答性などの反応を含めた細胞状態）が均質でないことを意味し、目的の品質に合致する細胞集団を純度高く製造することができない可能性（製造に失敗するリスク）を示している。このため、ヘテロ性が低いことは、目的の品質を有する細胞の製造に向けて工程制御パラメータを制御できていることを示し、ヘテロ性が高いことはこれらの培養制御が充分に行えていないリスクを示しており、ヘテロ性が十分に低い場合には、細胞製造能力が高い（工程制御が充分に行えている）または細胞製造成功率が高い（培養リスクが低く、経済性や効率が高い製造となっている）状態を評価又は判定することができる。

[0037]

3. 情報提供方法、品質評価方法、並びにこれらの方法に使用するシステム及びプログラム

（1）情報提供方法及び品質評価方法

本発明は、被検幹細胞集団の品質評価のための情報提供方法、及び被検幹細胞集団の品質評価方法を提供し、本発明の細胞標準品が用いられる。

[0038]

本発明の情報提供方法は、以下の工程を含む。

（a）高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR（CD271）及びThy-1（CD90）のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ（参照画像情報）を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報（参照パラメータ情報）を取得する工程、

（b）ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ（被検画像情報）を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報（被検パラメータ情報）を取得する工程、

（c）前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する工程、並びに

（d）前記比較により得られた全部又は一部の情報を被検幹細胞集団の品質評価のためにユーザに提供する工程。

[0039]

また本発明は、被検細胞の品質評価方法を提供し、（d）前記工程（c）の比較により得られた全部又は一部の情報を指標として、被検幹細胞の品質を評

価する工程を含む。

これらの方法には、前記（a）～（d）の工程を実現するための手段を含むシステム及びプログラムを使用することができる。本発明のシステムは以下の通りである。

[0040]

（2）情報処理装置、プログラム

本発明の一実施形態に係る、品質評価のための情報処理装置、及びプログラムについて、図面を用いて説明する。

図6は、本実施形態に係る情報処理装置10を含む被検幹細胞集団品質評価システム1の概略構成図である。なお、以下では、被検細胞を取り扱う機関及び幹細胞情報の入手を希望する機関（検査会社、病院、大学等）又は個人を「ユーザ」として説明する。

[0041]

情報処理装置10は、CPU、ROM、RAM、及び入出力インターフェースなどを備えたサーバー型コンピュータである。情報処理装置10は、インターネット又はLANなどのネットワーク20を介して、ユーザ機器30_{a1}、30_{a2}、・・・30_{an}（総称して「ユーザ機器30」とする。）と通信可能に接続されている。なおユーザ機器30は、単数であっても複数であってもよい。

[0042]

情報処理装置10は、細胞標準品である高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR（CD271）及びThy-1（CD90）のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ（参照画像情報）を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報（参照パラメータ情報）を取得する。

次に、情報処理装置10は、被検細胞を扱うユーザ（「対象ユーザ」という。）の幹細胞情報（画像情報を含む）の項目を、データベースに記憶されたREC標準品の幹細胞情報の各項目と照合し、その比較結果に基づきパラメータ情報を算出及び取得する。

そして、情報処理装置10は、算出されたパラメータ情報を比較し、対象ユーザの被検幹細胞集団の品質を評価及び判定する。そして、情報処理装置10は、ユーザの幹細胞情報や評価及び判定結果を、ユーザ機器30に送信する。

[0043]

ユーザ機器30は、情報の入力手段や表示手段などを備えたコンピュータ、又はスマートフォン若しくはタブレットなどの機器であり、ネットワーク20を介して情報処理装置10と通信可能に接続される。ユーザ機器30は、ブラ

ウザ又はアプリケーションなどを通じて、情報処理装置 10 から受信した各種情報をディスプレイ上に表示したり、情報処理装置 10 に送る情報を入力するためのインターフェースを提供する。

[0044]

情報処理装置 10 は、ROM に記憶された又は RAM に置かれたプログラムと CPU とが協働するなどして実現される機能部として、情報取得部 101、幹細胞情報抽出部 102、評価基準値設定部 103、比較部 104、画像情報計算部 105、及び判定部 106 を含む。また、情報処理装置 10 は、ROM (又は RAM) に設けられた記憶部 110 を備え、記憶部 110 は、幹細胞情報データベース (DB) 111、パラメータ情報データベース (DB) 112、及び評価基準データベース (DB) 113 を含む。

[0045]

情報取得部 101 は、ネットワーク 20 を介してユーザ機器 30 から幹細胞の画像情報などの各種情報を取得し、記憶部 110 に記憶させる。ユーザ機器 30 から受信する情報には、ユーザが取得した幹細胞の情報、及びユーザ識別情報 (ユーザの氏名又は名称、被検幹細胞の情報 (入手元、被検幹細胞の提供者情報)、又はユーザに設定された ID 等) などが含まれる。

[0046]

情報取得部 101 は、ユーザの被検幹細胞データを受信すると、ユーザ識別情報と関連付けて幹細胞情報 DB 111 に記憶させる。幹細胞情報 DB 111 には、このようにして複数のユーザから集められた幹細胞データが記憶されている。情報取得部 101 は、ユーザの幹細胞情報を受信すると、当該幹細胞情報から被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報を取得し、パラメータ情報 DB 112 に記憶させる。評価基準 DB 113 には、比較部 104 により特徴を抽出する統計解析処理により得られた情報が記憶されている。当該情報は、統計解析処理の対象となったユーザ母標本を識別する情報と関連付けて記憶されている。

[0047]

統計処理された情報は、平均値、標準偏差、分布形状のいずれか、又はこれらの組み合わせの情報を含む。これらの情報の詳細は、前記した通りである。

[0048]

図 7 は、本実施形態に係る情報処理装置 10 による処理フローチャートである。

まず、情報処理装置 10 の情報取得部 101 は、ユーザからの基本情報及び細胞画像などの被検幹細胞情報の入力进行要求してこれらの情報を取得し (S1)、幹細胞情報 DB 111 に記憶させる (S2)。

幹細胞情報抽出部102は、幹細胞情報DB111に記憶された情報から、品質に関する指標となる情報、例えば細胞増殖率、細胞回収数、未分化度、産生因子の両、細胞のヘテロ性からなる群から選ばれる少なくとも1つの指標を抽出し、パラメータ情報DB112に記憶する(S3)。また、評価基準値設定部103は、パラメータ情報DB112に記憶された情報から、各品質評価項目における判定基準値を設定し、評価基準DB113に記憶させる。

[0049]

比較部104は、幹細胞情報DB111及びパラメータ情報DB112から、標準品の幹細胞集団情報(参照パラメータ情報)と、ユーザの幹細胞情報(被検パラメータ情報)を抽出し、参照パラメータ情報と、被検パラメータ情報との間で幹細胞情報を比較照合する(S4)。

[0050]

画像情報計算部105は、参照パラメータ情報と被検パラメータ情報との比較結果から、被検幹細胞の品質評価の数値等を計算し、品質評価及び判定のための情報を取得し(S5)、判定部106は、対象ユーザにおける被検幹細胞の品質を判定する。情報処理装置10は、判定基準評価基準DBに記憶されたデータを参照して、その基準値を境界として細胞の品質が良いか悪いかを判定したり、評価の点数を表示する。表示結果は、表示部(図示せず)により、ユーザ機器に表示される。

[0051]

本発明のプログラムは、コンピュータ読み取り可能な記録媒体又はコンピュータに接続しうる記憶手段に保存することができる。本発明のプログラムを含むコンピュータ用記録媒体又は記憶手段も本発明に含まれる。記録媒体又は記憶手段としては、磁氣的媒体(フレキシブルディスク、ハードディスクなど)、光学的媒体(CD、DVDなど)、磁気光学的媒体、フラッシュメモリーなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0052]

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

[実施例1]

[0053]

間葉系幹細胞(MSC)は、細胞治療への応用のために最も広く研究されている幹細胞である[1-3]。MSC[4-7]には様々な細胞型が存在することが知られているが、これは従来のMSC製造が細胞懸濁液の混合物から接着細胞画分を単に分取するからである[8、9]。LNGFR(CD271)およびTHY-1(CD90)共陽性細胞(LT細

胞)は骨髄中の特異的亜集団MSCの中にあり、それらは、MSCに基づく細胞治療を進歩に役立つ他に類のない特徴を示し、(1)高い増殖能、(2)多様な分化能(脂肪分化、骨分化、および軟骨分化)、(3)老化マーカーSA- β -galの低い発現、および(4)均一で小型のため、マウスモデルにおける静脈内投与後に肺毛細血管に捕捉されることを回避できる [10]。

[0054]

比較的急速に増殖するクローンが、単一細胞分取されたLT細胞において観察され、「高速増殖性クローン(REC)」と名付けられた。RECの増殖能力は、より少ない不均一性を有する細胞バンクの確立に大いに役立つので、RECは現在、低ホスファターゼ症および脊柱管狭窄症を対象に治験中である [11]。

[0055]

MSCは、臨床応用のための多くの研究に使用されているので[3、12、13、14]、MSCに基づく細胞医薬品の進歩への期待は高まっている。したがって、現在、MSCの製造を支援することができる技術の開発が強く求められている[15、16]。RECの特徴は、現在のMSC製造プロセスにおける2つの主要な重大なリスクを低減しており、効率的で頑健な細胞製造プロセスの構築可能性を高めていることから、大いに利益を得ることができる。

[0056]

(1)ドナー間の品質のばらつきを制御することの困難性
MSCはドナー間で大きなばらつきがあり [17, 18, 19]、頑健な製造工程を開発する前に、ドナー細胞のばらつきを十分に調べることは事実上不可能である [20–22]。したがって、様々な未知のドナー細胞を取り扱うことは、MSC製造においてかなりリスクの高い作業であり、予期しない解決困難なエラーの主な原因となる。

[0057]

同種他家細胞バンクの確立は出発細胞の品質を制御するための実用的なアプローチであり、これは、効率的なMSC製造を可能にする。RECは、同種他家細胞バンクを確立するプロセスに大いに有益であり得る。RECは細胞分取によって大量生産することができるため、理想的な細胞バンクが得られるまで大規模なドナー選択を行う困難と比較すると、RECを選択することは、より実行可能かつ効率的である。さらに、RECの増殖能は初期の培養期間においてバンク化された細胞を維持しながら、細胞バンクを確立する成功率を大幅に向上させる。したがって、RECを出発細胞とする製造は、より実現可能なプロセス開発および安定した品質管理を可能にする。

[0058]

(2)細胞増殖培養中の品質低下

MSCは数回の継代後に増殖能を失い、さらに、他の重要な品質特性も拡大培養中に低下する[23-31]。しかしながら、一定の細胞数を達成することは、MSCに基づく治療製品の製造における必須の品質要件である。治療の観点からは、MSCに基づく治療の一般的なプロトコールは有効性を確実にするために、1回の治療当たり10億個を超える細胞を必要とする[32]。製造の観点からは、ほとんどの品質試験は侵襲性であり、細胞は試験ごとに消費されるため、最終製品を多数の品質基準で余すところなく検査するためには、最終的な細胞バンクの細胞は大きな細胞数に達しなければならない[33]。

[0059]

しかしながら、そのような細胞製造プロセスは、品質劣化の可能性が否定できないため、成功の保証のない試みである。実際、細胞バンクの確立の失敗は、全ての作業の後に「事実」としてしか見出すことができず、そのような失敗を事前に回避することは困難である。この文脈において、10回を超える連続継代を可能にするRECの高く持続性のある増殖能は細胞バンク確立不全のリスクを大幅に最小化し、初期継代で豊富な数のストックを確立するための最大限の培養効率を実現することができる。

[0060]

RECには、低リスクで効率的な製造が可能という利点があるものの、REC用の細胞バンクの確立にはジレンマがある。RECは少量の細胞ソースからでも細胞選別によって効果的に製造できる。したがって、出発クローンのバリエーションは同種他家細胞バンクよりも大きくなり得る。しかしながら、最終的な細胞バンクの段階まで多くのRECを拡大培養することはコストがかかり、さらに、確立された細胞バンクを保証するための最終的な品質試験には、さらなるコストおよび労力がかかる可能性がある。

[0061]

RECの出発クローンのばらつきは細胞バンクの確立中に「より良いREC」を選択できるという期待をもたらすが、そのような期待は、コストと労力が必要なセルバンク確立数を増加させる。実際には、RECは、96ウェルプレート中の単一クローンからのそれらの初期の増殖速度を指標にLT細胞からスクリーニングされ、全ての候補が、複数の「候補細胞バンク」を形成するためにさらに拡大培養され、より高い品質を有する「より良いREC細胞バンク」が選択される。

[0062]

RECではより良い品質の製品(=より低いリスクおよびより高い能力を有する最終製品)のための欲張りな選択が可能であるが、それは全プロセスのコストを上昇させ得る。したがって、そのような候補RECをできるだけ早く決定して、過剰な作業を最小限に抑えることが必要である。しかしながら、従来の細胞

評価法を用いて、細胞バンク確立における初期段階の細胞、特に単一クローン由来のRECを検査することは、それらのほとんどが侵襲性であり、貴重な細胞源を浪費するため、極めて困難である。

[0063]

本研究では、細胞数が極めて限られている細胞バンク確立の初期段階で「より良いREC」を選択するための形態に基づく非侵襲的な能力予測法を開発した。MSCの質の低下に関する形態に基づく早期予測に基づく著者らの以前の知見に基づいて[34-37]、著者らはより良いRECセルバンクを形成するより良いRECの選択を強化するために、その早期の形態学的情報のみを用いて「さらなる連続継代能」を予測することを試みた(図1)。

[0064]

さらに、このような能力予測は、細胞バンクを処理するための重要なジレンマでもある「バンクサイズ」と「バンク細胞の能力」のバランスをとる細胞バンク確立プロセスを助けることができると予想される。細胞バンクが大幅に拡大される場合には製造効率を高めることができるが、これはバンク細胞の増殖能を失うリスクを増加させる。したがって、将来の連続継代能が事前に予測できるならば、高い能力を有する最大サイズの細胞バンクを達成するための低リスクなタイミングを設定、可能になると仮定した。

[0065]

予測モデルを開発するための訓練データについて、本発明者らは骨髄から15クローンのRECを確立し、継代限界までの連続継代数(「連続継代能」として定義される)を実験的に確認した。本実施例では、継代1期(P1)の段階の形態学的記述子を用いて、このような能力を定量的に予測するための機械学習モデルの開発を試みた。予測モデルの開発中に、高性能予測モデルを頑健に得るために、データ利用効果の詳細な解析を行った。このように、本発明者らのデータは、予測モデルを実用的な方法で実現するために必要な最も有効な時間経過データ使用と最小画像数を示した。本発明者らの、細胞形態に基づくRECの将来的な能力予測の概念は、MSC製造における、画像に基づくデータ駆動型細胞バンクの構築プロセスが、効率および頑健性の両方を達成することができる可能性を示す。

[0066]

材料と方法

<細胞と培養>

RECを得るために、Ficoll(GE Healthcare, Chicago, USA)を用いた密度勾配遠心分離を用いて、健常ドナーから採取した骨髄穿刺液(AllCells, Alameda, USA)から骨髄単核細胞を調製した。骨髄単核細胞を、抗ヒトウサギ抗CD90 IgG

(BD Biosciences, Cat#559,869, Franklin Lakes, USA)および抗ヒトマウス抗CD271 IgG(Thermo Fisher)で37°Cで1時間染色した。

[0067]

セルソーター(JSAN, BayBioscience, Kobe, Japan)を用いて、CD90およびCD271共陽性細胞について単一細胞選別を行った。LT細胞を96ウェルプレート(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)中で単一クローン(継代数=P0)としてさらに培養し、20%ウシ胎児血清[FBS](Cytiva HyClone, Marlborough, USA)、20ng/ml塩基性線維芽細胞増殖因子[bFGF](KAKEN PHARMACEUTICAL, Tokyo, Japan)、0.01 M 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸[HEPES](Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)、および1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan)を含有する維持培地(低グルコースダルベッコ改変イーグル培地[DMEM](Wako, Osaka)を用いて、2週間後にクローンを96ウェルプレート中でサブコンフルエントにし、回収し、6ウェルプレート(Thermo Fisher Scientific)の単一ウェル中で継代培養(継代数=P1)、画像取得のために設定した。

[0068]

さらなる形態学的解析のための画像取得は、この段階で行われた。次いで、6ウェルプレート(Thermo Fisher Scientific)中で細胞がサブコンフルエントに達した時点で細胞を回収し、T75フラスコ(Thermo Fisher Scientific)中で継代培養した(継代数:P2)。37°Cで3~5分間インキュベートした後、TrypLE Select(Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞を回収した。

[0069]

サブコンフルエントに達したT75フラスコ中のP2細胞を、CP-1(KYOKUTO PHARMACEUTICAL, Tokyo, Japan)および25%ヒト血清アルブミン(CSL Behring, Tokyo, Japan)を用いて 1.0×10^6 細胞/mlで凍結保存し、「一次細胞バンク(P3)」と命名した。連続継代試験用の細胞を保存するため、一次細胞バンクでは、複数の効力についてのインビトロおよびインビボ試験は除外した。

[0070]

形態を比較するために、Lonza Japan, Ltd.(東京、日本)から購入した従来処理のバルクMSC(BMC: Lot 0,000,394,413、0,000,411,107、0,000,413,042、0,000,422,610、0,000,423,370、0,000,429,365、0,000,446,319、0,000,451,491、0,000,458,207)を、BulletKit(Lonza Japan, Ltd.)を添加したMSCGM(Lonza Japan, Ltd.)中でP3に培養した。培養液はすべて37°C、CO₂5%に維持し、3日間に1回交換した。

[0071]

<連続継代能試験>

一次細胞バンク (P3) バイアルを解凍し、 2.0×10^5 細胞/ディッシュで100mmディッシュ (サーモフィッシャーサイエンティフィック) に播種し、P3データと命名した。TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific) を用いて100mmディッシュから細胞を回収し、細胞がサブコンフルエントに達した時点で、同じ播種密度で新しい100mmディッシュへ継代培養した。この継代培養プロセスを、細胞増殖が停止するまで繰り返した。継代回数を数え、最終継代回数を、「連続継代能」として定義した「連続継代限界数」と規定した (図1)。各継代において、回収した全細胞数をCellometer Auto T4 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA) を用いて計数し、その結果を回収した細胞の総数として記録した。

[0072]

<画像取得及び処理>

6ウェルプレート (サーモフィッシャーサイエンティフィック) において、P1 RECについて6時間毎に、自動画像取得装置バイオステーションCT (ニコンコーポレーション、日本国) を用いて、 $\times 4$ 倍率 (64タイリング/ウェル、 16 mm^2 、1000ピクセル/画像をカバー) で位相差顕微鏡画像を取得した。各クローンロットを1ウェルで画像化した。この段階では細胞数は極めて限られていた。

[0073]

バルクMSCについては、MSCを6ウェルプレート (Corning Incorporated, NY, USA) に2000細胞/ cm^2 で播種した ($n = 1$ ロット当たり3ウェル)。タイムポイントは、時点1 (播種後6時間) ~ 20 (播種後 120時間) として指定した。時点15は、一部のロットがサブコンフルエント状態以上に達したことで画像中の個々の細胞を正確に認識することが困難になったため、形態および増殖率の測定の最終時点として選択された。

[0074]

生画像を処理して、細胞集団の形態学的プロファイルのサマリを得るために、個々の細胞形態を測定した (64枚の画像でカバーされる、1ウェルあたり最小300個の細胞から最大10万個までの細胞を回収した)。Pythonバージョン3.7.3、パッケージNumPyバージョン1.20.0 およびOpenCVバージョン4.4.0 を使用して、オリジナルコードで画像処理を実行した。1) 背景調整、2) 質感の向上テクスチャ強調、3) 二値化、4) 小物さなオブジェクトの除去、5) 侵食、6) 小さなオブジェクト物の除去、7) フィルホール、8) 枠接触物フレームタッチオブジェクトの除去 (図17) の8つのプロセスで設計した。画像処理後、12個の基本形態学的記述子 (表1) を、それぞれの画像中の細胞部位ごとに測定した。

[0075]

[表1]

Supplementary Table 1. Basic morphological parameters measured per single cells.

Number	Parameter type	Name	
1	Shape descriptors	Area	Total pixels in the recognized cell region.
2		Compactness	$(\text{Perimeter})^2 / \text{Area}$
3		Inner radius	Radius of inscribed circle from the centroid of cell area.
4		Length width ratio	Length/Width
5		Perimeter	The arc length of recognized cell region.
6		Shape factor	$4\pi(\text{Area})/(\text{Perimeter})^2$
7	Texture descriptors	Correlation	Gray-Level Co-occurrence Matrix (GLCM) of cell region. GLCM = M Correlation $= \sum_{i,j} \frac{(i - \mu_x)(j - \mu_y)M_{ij}}{\sigma_x \sigma_y}$ $\mu_x = \sum_{i,j} jM_{ij}$ $\mu_y = \sum_{i,j} iM_{ij}$
8		Energy	Gray-Level Co-occurrence Matrix (GLCM) of cell region. GLCM = M Energy = $\sum_{i,j} M_{ij}^2$
9		Entropy	Gray-Level Co-occurrence Matrix (GLCM) of cell region. GLCM = M Entropy $= - \sum_{i,j} M_{ij} \log M_{ij}$
10		Inertia	Gray-Level Co-occurrence Matrix (GLCM) of cell region. GLCM = M Inertia = $\sum_{i,j} (i - j)^2 M_{ij}$
11		Homogony	Gray-Level Co-occurrence Matrix (GLCM) of cell region. GLCM = M Homogony $= \sum_{i,j} \frac{M_{ij}}{1 + i - j }$
12		Intensity SD	Standard deviation of intensities of pixels in cell region.

[0076]

細胞集団のサマリは、全ての単一細胞ベースの形態学的記述子データを用いて「平均」および「標準偏差(SD)」を計算することによって記載された。このサマリは、64枚の画像によってカバーされた単一のウェルからのほぼ $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ の細胞を表した。

[0077]

本発明者らは時間経過(6~90時間)を通してこの形態学的記述子のサマリを蓄積し、それらを試料の「形態学的プロファイル」と指定した。各条件(=1ウェル)についての完全な形態学的プロファイルは、360個のパラメータ(=12の記述子 $\times$ (平均およびSD) $\times$ 15の時点)を含んでいた。すべてのデータ処理は、Rバージョン4.0.2を用いて行った。

[0078]

<形態学的プロファイルの可視化>

各時点の単一細胞データを用いてガウスクーネル密度推定を行い、単一形態学的記述子を用いて細胞集団を可視化した。Rのカーネル関数を用いて分布を推定した。分布推定のために、生データをlog10で変換し、「面積」を記述した。面積>200ピクセルを超える単一細胞の測定データを収集し、RECと従来処理のバルクMSCとの間の詳細な「面積」の議論を可能にした。

[0079]

200画素より小さい物体の多くは、増殖中の「丸い細胞」中に見出され、したがって、大きくなる細胞の特徴がそのようなデータにおいて減少するので、サイズの違いを議論することは困難であると考えられた。すべてのロットの形態学的プロファイルを、主成分分析(PCA)を用いて分析し、複数の記述子を用いてクローンの相対的類似性を可視化した。

[0080]

クローンの形態学的プロファイルを比較するPCAにおいて、クローン標識(15色)および連続継代限界数(7レベルのグラデーション:7~13)でドットを着色した。異なるFOV数の使用を含む、同じ時間窓サイズを有する全てのデータは統合され、全データダイバーシティをカバーするための全主成分を設定するために使用され、データ利用効果を視覚化し、それらの時間窓およびFOV数を変更した。

[0081]

次に、異なるFOV数を用いたデータを、固定PCA軸に個別にプロットした。データ利用効果の比較PCAでは、1つのプロットが「1つのクローン」を示す。各データサイズ(異なる時間窓サイズとFOV数の組み合わせを変化させた)による全単一細胞測定データをブートストラップ(重複を許容した50回の反復)によ

て再サンプリングすることで、異なるデータ使用の説明力を可視化し、それぞれの再サンプリングされたデータからそれらの新しい平均値とSDを再取得した。PCAおよびそのような再サンプリングされたデータを用いて、1クローンあたり合計50のプロットをプロットした。スチューデントのt検定を用いて、形態学的記述子と形態学的記述子の集団分布との間の差異を検定した。すべてのデータ処理は、R(バージョン4.0.2)を用いて行った。

[0082]

<連続継代能力予測モデルの構築>

時間経過形態学的プロファイルを説明パラメータとして使用し、実験的に決定された連続継代限界数を機械学習用データセットの目的パラメータとして使用した。2つのタイプの機械学習モデル、すなわち線形回帰モデルのラッソ回帰(LASSO)および非線形機械学習モデルのランダムフォレスト(RF)を検証した。LASSOでは、平均減少ジニ指数を用いてパラメータ選択を行った。モデル性能は、1つ抜き交差検証(leave-one-out cross-validation)によって検証し、二乗平均平方根誤差(RMSE)によって比較した。

[0083]

時間窓の長さ(6~90時間の範囲)およびFOV数(1~64の範囲)の2つのパラメータの網羅的な組合せによって、形態学的情報におけるデータ使用効果を検証した。時間窓の長さを変化させるために、各時点(6時間)における最後の時点(90時間)から窓を合計6~90時間短縮した。したがって、総形態学的記述子の最大値は360個のパラメータからなり、最小値は24個のパラメータからなる。64枚の画像からの画像を無作為に選択して、FOV数を変化させた。64枚の画像からのFOVを50回繰り返し再サンプリングするブートストラップを導入し、データセットサイズを15から750サンプルまで増加させ、選択したデータサイズ条件(6時間、6~30時間、6~60時間 対 FOV15、40、および60)に対するデータ変動効果を評価した。すべてのデータ処理および機械学習は、Rバージョン4.0.2を用いて行った。

[0084]

結果

<学習データ用RECの取得および特徴付け>

初期の細胞形態から「連続継代能」を予測するための機械学習モデルを開発するために、単一ドナー由来の骨髄単核細胞(BMMCs)から15個のクローンのRECを得る作業を開始した(図1のスキーム)。15個のクローンを同じドナーサンプルから取得し、RECの基本的条件に従って選別した。

(1)細胞選別時にLNGFRおよびTHY-1共陽性であること、および(2)96ウェルプレートへの単一クローンソート後、2週間以内にサブコンフルエントに達する(P0

段階)。

[0085]

次いで、6ウェルプレート、続いてT-75フラスコ中で増殖させたクローンを、初期継代細胞を保存するためのバンクである一時細胞バンク(P3)として凍結保存した。

「より良いREC」をさらに選択するために、P2における候補クローンの連続継代能を評価した。何回か繰り返し継代できる細胞性能は、さらなる利用のために「より良い品質の細胞バンク」を選択する上での理想的な基準と考えることができる。連続継代能試験の結果、RECは高い増殖能を保持していることが示され、平均9.8回の連続継代を記録した(図2a)。このような性能は、従来の方法を用いて処理された市販のMSCの性能と比較して高いと考えることができる。

[0086]

次に、クローンの形態学的特徴を評価した(図2b)。6ウェルプレートのP1段階(極めて初期段階)では、形態がそれらの評価のための細胞の重要なシグネチャを含む。しかしながら、マニュアル的な形態学的観察(定量化なし)では、REC間の差異の識別は困難である。

[0087]

P1段階のRECの増殖プロファイルを経時的画像を用いて解析した(図2c)。15個のクローンのうち、12個は4倍を超える増殖率を示した。この増殖率は、本発明者らの研究において、従来处理された複数のバルクMSCの増殖率よりも有意に高かった(図18)。連続継代能が最も低いクローン(クローン13)は低い増殖率を示し、連続継代能が最も高いクローン(クローン4)は、高い増殖率を示した。しかし、「増殖率」と「継代限界数」との決定係数は低かった($R^2 = 0.09$)(図2d)。したがって、このデータは、P1段階での増殖率測定では将来の連続継代能を予測することができないことを示す。

[0088]

<RECの形態学的特徴>

本発明者らは、既知の解析手法[33-36]に従い、画像に基づく形態学的解析によりREC(P1時点)の定量的な特徴づけを試みた。従来处理のバルクMSC(cMSC、9ロット)と比較して、RECはより均一であり、接着後もより小さいままであった(図3a、b)。RECおよびcMSCのいずれも、接着のごく初期段階(6時間、T検定 $p < 0.22$)では、同じような大きさの細胞集団(面積中央値 $= 358 \mu\text{m}^2$ 、それぞれ $335 \mu\text{m}$)から出発した。RECの大きさの中央値は小さいままであった($363 \mu\text{m}^2$)が、バルクcMSCは、培養から30時間後にはサイズが拡大した(面積中央値 $= 473 \mu\text{m}^2$ 、T検定 $p < 0.000001$)。さらに、この一連の経時的画像では、RECにおいて、増殖

する細胞がより多く（位相差顕微鏡下で白色かつ円形に見える）観察された（図3b）。

[0 0 8 9]

P1におけるRECの集団変化を可視化したことにより、連続継代能の低下したクローンの接着細胞集団は、細胞面積が広いままになることがわかった（図3c）。このように、高性能な細胞は均一な細胞サイズの集団を形成するが、このようなサイズデータ解析は示唆的であり、「面積のSD」と「継代限界数」との間の決定係数は低かった（図3d）。単一の形態記述子による解析は、定量的予測には十分に効率的ではなかった。

[0 0 9 0]

基本記述子（表1）[33-36]から得た24個の記述子で記述した複数の形態学的情報を用いてクローンをプロファイリングした。RECの形態学的類似性を主成分分析（PCA）を用いて可視化した（図3 eはクローン番号で、図3fはそれぞれのクローンの連続継代能を示す）。

[0 0 9 1]

これらの結果は、類似した形態学的プロファイルを有するクローンの特定のクラスターが存在し、これらが低連続継代能クローンと高連続継代能クローンとをわずかに分けることを示す。実際には連続継代能が低いクローンはPC2軸の低い位置に集まり、連続継代能が高いクローンはPC2軸の高い位置およびPC1軸の中央に集まる。PCAマップの各軸、とりわけ最も説明的なPC2軸に寄与する記述子は以下のように解釈することができる（表2）。

[表2]

Supplementary Table 2. Morphological descriptors highly contributing to PCA.			
PC1		PC2	
Parameters	Factor loadings	Parameters	Factor loadings
84h_mean_energy	0.08	24h_mean_length_width_ratio	0.11
78h_mean_energy	0.08	30h_mean_length_width_ratio	0.10
72h_mean_energy	0.08	18h_mean_perimeter	-0.10
54h_mean_length	-0.08	12h_mean_length	-0.10
60h_mean_perimeter	-0.08	18h_sd_width	-0.10
78h_mean_intensity_sd	-0.08	24h_sd_perimeter	-0.10
60h_mean_length	-0.08	24h_sd_length	-0.10
54h_mean_area	-0.08	18h_sd_compactness	-0.11
72h_mean_intensity_sd	-0.08	18h_mean_length	-0.11
54h_mean_perimeter	-0.08	24h_mean_length	-0.11

[0092]

24～30時間の増殖中に細胞がより均一で紡錘形を呈する場合、クローンはより高い連続継代能（長期の連続継代が可能）を有するが、細胞の形態学的な均一性が乱れると連続継代能は低下する。そのような教師なしモデル解析は複数の記述子の組み合わせが、性能を形態学的に特徴付けるためのより良い説明を提供することを示唆する。

[0093]

＜連続継代能を予測するための形態ベースの機械学習＞

次に、形態学的情報のみに基づいてRECの「連続継代能」を定量的に予測できるように、形態学的情報を用いた機械学習モデルの構築を検討した(図1)。形態学的プロファイル(24記述子×15時点)を用いて、連続継代限界数を予測した。この予測モデルの構築の下で、形態学的情報が予測モデルの開発に効果的に寄与する部分またはその程度を理解することを試みた。

[0094]

そこで、時間窓効果と視野(FOV)数効果の2つのパラメータを変化させて、形態学的データの利用効果を検証した。これらのパラメータを検討した理由は、著者らが過去に行った形態学的記述子からMSCの増殖率および骨分化速度を予測しようとする研究において、これらを詳細に検討することで画像データ収集の手間を効果的に削減できることを見出した[33-36]ためである。時間窓を短縮し、FOV数を最小化することは、画像データ取得のための時間および労力を節約するだけでなく、予測を効率化することもできる。

[0095]

ラッソ回帰(LASSO)によって「時間窓効果」と「FOV数効果」の両方を十分に検討した結果、PI細胞における形態学的情報を用いても、いくつかのパラメータの組合せで高性能な予測モデルが得られることを見出した(図4aに緑色ヒートマップとして示す $RMSE < 1.0$)。このデータは、時間窓とFOV数を減らしても予測性能を維持できることを示唆する。さらに、「FOV数」の効果は「時間窓」の効果よりも重要であると推論された。なぜなら、15個を超えるFOVを収集する場合、時間窓は、性能を低下させることなく短縮可能であるためである。

[0096]

散布図をプロットして、それぞれのクローンについての連続継代能の予測モデルの性能をさらに理解した(図4b)。これらのデータは発明者らの予測モデルが「連続継代限界数の定量値」を予測することを明確に示している(図4a、b)。様々なサイズの学習データを用いて多くの高性能予測モデルが開発されている。しかし、LASSOは各データセットに対して最適な記述子の組合せを生成するアルゴリズムであるため、すべてのモデル構造は共通の構造を欠くことによ

ってランダムに異なっており、全く異なるモデル構造を有する類似の性能モデルが生成され得る疑いがある。

[0097]

モデル構造がデータの各条件において異なる場合、そのようなモデリング結果はロバストではなく、したがって実用的ではない。そこで、すべてのモデル構造の相関を比較した(図4c)ところ、性能が高いモデル同士は同様のモデル構造をロバストに共有していることが確認された。この結果は、形態学的記述子の組合せと連続継代能との間の関係が、形態学的記述子の特定の普遍的な組合せによってモデル化できることを示唆した。

[0098]

「Correlation_SD(18h)」、「Correlation_SD(6h)」、および「Energy_SD(18h)」といった、異なったモデル間で共有される、高度に寄与する記述子同士の比較は、連続継代能が高いクローンの予測に正に寄与した。また、「Correlation_mean(6h)」、「Length_SD(18h)」、および「Compactness_SD(18h)」は、連続継代能の低いクローンの予測に負に寄与した(表3)。

[表 3]

Supplementary Table 3 Morphological descriptors used in LASSO models.

Model using 15FOVs_6-18h			Model using 40FOVs_6-18h			Model using 60FOVs_6-18h			Model using 60FOVs_6-90h		
Parameter	Coefficient		Parameter	Coefficient		Parameter	Coefficient		Parameter	Coefficient	
18h_mean_perimeter	1.781		18h_mean_energy	1.191		18h_mean_area	0.753		36h_mean_intensity_total	0.226	
6h_mean_area	1.391		18h_mean_intensity_sd	0.865		6h_sd_correlation*	0.582		18h_sd_correlation	0.075	
18h_mean_intensity_sd	1.104		18h_sd_perimeter	0.845		18h_sd_energy**	0.569		6h_sd_correlation*	0.069	
18h_mean_energy	1.092		18h_mean_area	0.668		18h_mean_energy	0.436		12h_sd_correlation	0.057	
6h_mean_length	0.904		6h_sd_correlation*	0.629		18h_sd_width	0.391		36h_mean_width	0.046	
6h_sd_correlation*	0.662		6h_mean_area	0.447		18h_mean_intensity_sd	0.345		48h_mean_intensity_total	0.041	
18h_sd_perimeter	0.587		18h_sd_energy**	0.384		12h_mean_area	0.261		24h_mean_width	0.040	
6h_mean_width	0.537		6h_sd_energy	0.325		6h_mean_area	0.156		18h_sd_energy**	0.039	
18h_mean_area	0.522		12h_mean_width	0.319		6h_mean_compactness	0.136		30h_mean_width	0.036	
6h_sd_intensity_total	0.485		12h_sd_perimeter	0.295		6h_mean_length	0.127		78h_sd_intensity_mean	0.028	
12h_mean_length_width_ratio	-0.539		18h_mean_homogeneity	-0.437		18h_mean_homogeneity	-0.220		6h_mean_correlation**	-0.083	
6h_mean_energy	-0.565		6h_mean_perimeter	-0.448		6h_sd_perimeter	-0.231		54h_sd_length_width_ratio	-0.097	
18h_mean_compactness*	-0.642		6h_mean_correlation**	-0.479		18h_mean_intensity_total	-0.269		42h_mean_length_width_ratio	-0.109	
18h_sd_length	-0.673		6h_mean_length_width_ratio	-0.493		12h_mean_correlation	-0.287		90h_mean_area	-0.110	
12h_mean_homogeneity	-0.683		18h_sd_intensity_sd	-0.498		6h_mean_length_width_ratio	-0.412		18h_sd_length*	-0.112	
12h_mean_perimeter	-0.784		12h_mean_perimeter	-0.519		12h_sd_length	-0.431		48h_mean_length_width_ratio	-0.132	
18h_mean_length_width_ratio	-0.865		12h_mean_length_width_ratio	-0.577		6h_mean_correlation**	-0.484		18h_sd_compactness*	-0.242	
6h_mean_perimeter	-1.135		18h_sd_compactness*	-0.688		18h_mean_length_width_ratio	-0.511		24h_sd_compactness	-0.265	
6h_mean_intensity_total	-1.594		18h_mean_length_width_ratio	-0.825		18h_sd_compactness*	-0.614		60h_mean_length_width_ratio	-0.276	
18h_mean_length*	-1.757		18h_sd_length*	-0.917		18h_sd_length*	-0.701		24h_sd_length	-0.440	

*Blue Commonly used effective descriptor shared in models using small to large data-size

**Red Commonly used effective descriptor shared in models using larger data-size

[0099]

「相関」および「エネルギー」は両方ともテクスチャ記述子であり、したがって、位相差顕微鏡下での強度プロファイルを変化させるので、それらには一般に細胞の三次元パターンと複雑さが反映される。実際には、細胞分裂中に細胞が三次元的な真円度を変化させるときに、強度プロファイルが劇的に変化する。したがって、「テクスチャのSD」の増加は、増殖している細胞集団がより多く存在することを示す。したがって、「テクスチャの平均」がより大きな影響力をもつ場合、細胞集団はテクスチャにおいてより均一になり、これは、テクスチャを変化させるような細胞事象の数が減少することを意味する。

[0100]

長さおよびコンパクトさは形状に関連する記述子であり、したがって、それらは一般に、伸長および膨張などの2次元的な反応を反映する。このような形状が変化するもののテクスチャ変化をほとんど伴わない場合は、細胞活性が増殖よりも伸長のために多く使用されていることを示す。したがって、このようなモデルの構造に由来する情報は、獲得した連続継代予測モデルが将来の細胞の性能の早期検出に有用であるだけでなく、記述的に記録可能な形態学的法則の定量的な抽出にも有用であることと示唆される。したがって、形態学的プロファイルのこのような記述的な理解は、感覚によって形態学的変化を把握する古い習慣からの脱却に役立つ。

[0101]

非線形機械学習モデルRFを用いて同じ条件行列を検証したところ、このモデルはどのデータ利用条件においても、LASSOよりも優れた性能を示さなかった(図4d)。これらのデータは、連続継代能と形態学的情報とが線形関係にあることを反映している。

[0102]

本発明者らは2つのパラメータの組合せ(時間窓とFOV数)を検証したが、その一方で、モデル学習は他の分野の機械学習アプリケーションと比較して、サイズが比較的小さい生サンプルデータに基づいているため、最終的にはLASSOモデルの予測性能をより詳細に確認することを試みた。

[0103]

予測モデルがデータのばらつきによる影響に対してどの程度頑健に耐えられるかを評価するために、画像由来の形態学的プロファイルのばらつきを増加させるためのブートストラップを導入した。50個のブートストラップを導入し、1サンプルあたり64枚のタイリング画像から様々なFOVの組合せを収集することにより、予測モデルの性能を検証した(図5)。

[0104]

この結果は、ブートストラップによって引き起こされたこのような画像サンプリングのバイアスが、いくつかの予測モデルにおける性能の低下を引き起こしたことを示している。しかしながら、高性能モデル(RMSE <1.0)を達成するための「時間窓効果」と「FOV数効果」の範囲は、図4のa~cと比較してよりロバストなモデルによって狭められたものの、最も早い予測ではFOV数40で6~30時間、最小労力の予測ではFOV数15で6~90時間と、予測精度を維持したまま(RMSE <1.0)データ収集の規模を最小化することができた。

[0105]

PCAにおけるこのようなブートストラップの効果を評価したとき、FOV数は形態学的プロファイルのロバスト性を明らかに改善させた。より長い時間窓による形態学的プロファイルの蓄積は、クローンの差異の識別力を改善した。このようなデータサイズ効果調査は、細胞バンクの構築における画像ベースの品質チェックを導入する、より効果的なプロセスの設計に寄与する。

[0106]

考察

RECはヒトBMMCから選択されたクローン性MSCであり、これは、従来处理によるMSCの優れた品質を保持するだけでなく、治療製品のための実用的な細胞製造プロセスに有利な特徴も有する。特に、RECの高い増殖能は、細胞治療製品のための効率的な製造プロセスを開発する上で大きな利点となる。そこで、本研究では、RECの性能をセルバンク構築の初期段階から評価できるように、初期の形態学的情報のみから連続継代性能を予測する可能性と、その最も実用的な構築方法を検討した。

[0107]

いずれのタイプの細胞培養においても、長い間未解決の問題は、拡大培養において「クライオストックを作製する最良のタイミング」を決定することである。ほとんどの正常細胞はインビトロで培養すると増殖能を失うので[38、39]、クライオストックを作りながら、どの継代数で終わるかに賭けるしかない。製造用セルバンクを構築する上ではこのような賭けの要因は重大なリスクになる。成功率の低い拡大培養で細胞が期待通りに増殖しない場合は多額の費用が発生し、細胞の凍結保存が早すぎる場合にはそのストックは生産効率を得られない。

[0108]

現実的には、実際のセルバンク構築におけるボトルネックは貴重なドナーを募集する努力であり、候補細胞バンクの欲張りな選択を行う努力ではない。しかし、RECでは、候補細胞バンクを「マスターセルバンク」として完成させるための、より厳密かつ選択的なプロセスが期待されており、我々の研究は細胞

バンク構築のプロセスを強化し最適化するための「インプロセス解析ツール」として、形態学的非侵襲的解析を使用するという新しい概念を提示している。この概念は、「細胞の収量」と「バンク化細胞の性能維持」とを両立させ、将来の連続継代能を予測することによって、最良のクライオストック作製時期を設定するのに役立つ。このようなアプローチは、データレスロジックを使用して継代数を制限する、現在の細胞バンクの設計概念を捨てることに役立つ。

[0109]

本発明者らはRECの「連続継代能」を予測するための方法を検討したが、cMSCにおける連続継代能についてはいくらかの議論を必要とし得る。人工多能性幹細胞(iPSC)について、iPSCにおける制御不可能な増殖能は治療において悪影響を及ぼす(例えば、奇形腫形成のリスク)ことが理解される[40、41]。しかしながら、MSCでは、増殖能が有限であることが知られているものの、それらの連続継代能がいくつかの局面で考慮される。

[0110]

この研究の「候補細胞バンク」がさらなるワーキングセルバンクの作製のためのマスターセルバンクとして作製される場合、その連続継代能は、プロセス全体に有益であろう。しかし、移植のための最終的な細胞バンクとして作製される場合には、連続継代能の効果を注意深く検証するべきである。最終製品の有効性を高める場合にはメリットであり得るが、それが有効性に悪影響を及ぼす場合にはそれはリスクである。

[0111]

いずれにせよ、このような将来の性能予測をプロセスの最も初期段階から行うことで、最終的な細胞バンクの品質を最適化するのに役立つ。なぜならこの予測は、無益なREC候補に対する過剰な連続的評価によってのみ評価することができするためである。RECは現在、臨床試験への道を歩んでいるので、我々の次の課題はそのような性能予測の有効性を検証し、製品製造を効率的に進めることである。

[0112]

最後に、RECの形態に基づく将来の性能予測は、この開発されたモデルが他のMSC細胞バンクの確立の研究に適用できるかどうかの議論の引き金となる。本発明者らの画像に基づく詳細な形態学的測定は、RECの主要な集団がバルクMSCと比較して、ほぼ2倍小さい細胞から構成されることを示した。このような大きなサイズの差は、形態学的記述子の組み合わせである予測モデル構造をRECに適合させる。なぜなら、本発明者らは、形態学的プロファイルにおいて細胞集団分布を反映するために「平均およびSD」を使用したからである。

[実施例 2]

[0113]

実施例 2 では、細胞集団全体の集団分布の比較を行った。

結果を図 8 ～ 16 に示す。

[0114]

図 8 は細胞集団全体の集団分布の比較を行った結果を示す。クローンMSC (LNGFR (CD271) 及びThy-1 (CD90) のうち少なくとも 1 つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけられた高速増殖性間葉系幹細胞) と、バルクMSC (これらのマーカーでの特徴付けを行っていない間葉系幹細胞) の培養を行い、培養容器から得られた位相差顕微鏡画像の画像処理を行うことで、視野中の数千細胞分の集団分布を記述した。6つの図は6種類の細胞形態特徴量を示し、その1次元の特徴量で集団分布を示した結果、クローンMSCとバルクMSCとの集団分布はどの形態的特徴量でも大きく異なっていた。図 3 とは画質、比較している時系列の時間および画像処理方法が異なり、より安定した細胞画像データから計測した。

[0115]

図 9 は、細胞集団全体の集団分布の比較を行った結果を示す。

クローンMSC (LNGFR (CD271) 及びThy-1 (CD90) のうち少なくとも 1 つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけられた高速増殖性間葉系幹細胞) と、バルクMSC (これらのマーカーでの特徴付けを行っていない間葉系幹細胞) の培養 (3ロットずつ) を行い、培養容器から得られた位相差顕微鏡画像の画像処理を行うことで、視野中の数万細胞分の集団分布を、単一指標ではなく、2指標の組合せ散布図として記述した。図 9 は、ロットごとの差 (行の違い)、時系列データでの差 (列の違い) を示す。2次元 (2つの指標) の組合せで見ることによって、クローンMSCとバルクMSCを比較したとき、バルクMSCは複数の亜集団 (複数の分布) が存在することが確認できる。図 3 とは画質、比較している時系列の時間および画像処理方法が異なり、より安定した細胞画像データから計測した。

[0116]

図 10 は、細胞集団全体の集団分布の比較を行った結果を示す。クローンMSC (LNGFR (CD271) 及びThy-1 (CD90) のうち少なくとも 1 つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけられた高速増殖性間葉系幹細胞) と、バルクMSC (これらのマーカーでの特徴付けを行っていない間葉系幹細胞) の培養を行い、培養容器から得られた位相差顕微鏡画像の画像処理を行うことで、視野中の数万細胞分の集団分布の経時的変化を示した。横軸は細胞の大きさを示しており、時系列で比べたときに、左 (クローンMSC) と右 (バルクMSC) とには、分

布の多方向性の違いや、それが現れる時間帯が異なることがわかる。y 軸は時系列の変化（6時間間隔）。クローンMSC＝RECは、分布が1つのまま時間が変化する（上に行くほど培養後期）が、バルクMSC＝市販MSCは、最初コブが2個あり、それが融合したような、混じって広がったような変化を経過を示した。つまり「細胞集団が複雑で複数の亜集団を含む」ことがわかる。

[0117]

図11は、各MSCの増殖速度、脂肪分化度、骨分化度の評価を行った結果である。

クローンMSC（LNGFR（CD271）及びThy-1（CD90）のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけられた高速増殖性間葉系幹細胞）91ロットと、バルクMSC（これらのマーカーでの特徴付けを行っていない間葉系幹細胞）21ロットの培養を行い、(i)培養7日間での増殖速度、(ii)2週間後の脂肪分化度、(iii)2週間後の骨分化度の評価を行った。増殖速度は経時的な画像の画像処理による細胞数の計測から求めた。脂肪分化については、分化誘導培地での2週間培養後、Oil Red O染色を行い分化能評価スコアを画像の赤色染色領域の総和として算出した。骨分化については、分化誘導培地での2週間の分化培養後、Alizarin Red S染色を行い、画像の赤色染色領域の総和として算出した。その後、全サンプルの結果を集計し、(i)、(ii)、(iii)の度合いでの昇順に整理した結果を表示した。結果、強い選抜をかけないクローンMSCでは多様な品質（増殖、分化能）を示すデータが大量に取得できるが、バルクMSCを購入していろいろなバリエーションを揃えようとしても、その網羅性が非常に低い（青い棒グラフが取り得る品質の値が偏っている）ことがわかる。

[0118]

図12は、図11のデータの増殖率の昇順のまま、脂肪分化度、骨分化度の品質スコアを棒グラフとして表示したものである。図12からは、増殖率が高いから分化度が高い、増殖度が低いから分化度が低い、という単純な相関や、増殖率の高さが骨や脂肪のどちらかの分化度に強い影響を与えるような単純なデータ相関性がないことがわかる。即ち、大量の細胞品質を準備するには様々なクローンを集積することが有効で、増殖の速いクローンだけを集めればいろいろな品質をカバーできることではないことがわかる。また、一般的には細胞は購入してみないとその品質（(i)(ii)(iii)）はわからないため、事前のデータだけでデータバリエーションを揃えることも不可能であることもわかる。このためデータバリエーションを得るためにクローンMSCが有効であることがわかる。さらに、クローンMSCはバルクMSCよりも遥かに広いバリエーションの品質をカバーできていることもわかる。特に増殖能は、バルクMSCが獲得できる品質を遥かに超えた品質も得ることができている。

[0119]

図13は、各MSCの増殖率を経時的な画像解析から計測した結果を示す。クローンMSC (LNGFR (CD271) 及びThy-1 (CD90) のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけられた高速増殖性間葉系幹細胞) 20ロットと、バルクMSC (これらのマーカーでの特徴付けを行っていない間葉系幹細胞) 20ロットの培養を行い、その増殖率 (1日目～5日目) の増殖率を経時的な画像解析から計測した (散布図の横軸になる実測値)。その後、各細胞ロットを1サンプルとして、各サンプルの細胞形態情報 (360 parameters (= 数千細胞分の12形態指標の集団統計値 (mean and SD=2種類) × 15 経時分 (=90時間分)) を説明変数、その増殖率を目的変数としたデータセットを用いて機械学習モデルを構築し、5日後の増殖率を予測した。図13から、クローンMSCを用いて行った増殖率予測モデルの機械学習モデルの方が誤差 (RMSE値) が小さいことがわかり、クローンMSCデータを用いた機械学習モデル構築効率の有効性が示された。

[0120]

図14は、各MSCの増殖率を経時的な画像解析から計測した結果を示す。クローンMSC (LNGFR (CD271) 及びThy-1 (CD90) のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけられた高速増殖性間葉系幹細胞) 75サンプルと、バルクMSC (これらのマーカーでの特徴付けを行っていない間葉系幹細胞) 18ロットの培養を行い、その増殖率 (1日目～5日目) の増殖率を経時的な画像解析から計測した (散布図の横軸になる実測値)。その後、クローンMSCだけのデータを用い、各サンプルの細胞形態情報 (360 parameters (= 数千細胞分の12形態指標の集団統計値 (mean and SD=2種類) × 15 経時分 (=90時間分)) を説明変数、その増殖率を目的変数としたデータセットを用いて機械学習モデルを構築し、5日後の増殖率を予測できるモデルとした (散布図中のグレーの点)。その後、バルクMSCから得られる360指標の説明変数を入力値として、クローンMSCで構築した増殖率予測モデルに興じた結果 (散布図中の黒い点)、全く学習に用いられず、クローンMSCでもない、バルクMSCサンプルの増殖率が、形態情報のみから高精度に予測できることがわかった。

[0121]

図15は、各MSCの増殖率を経時的な画像解析から計測した結果である。クローンMSC (LNGFR (CD271) 及びThy-1 (CD90) のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけられた高速増殖性間葉系幹細胞) の培養 (各実験では別々のロットを培養し、合計で75培養ロットとした) を行い、その増殖率 (1日目～5日目) の増殖率を経時的な画像解析から計測した (散布図の横軸になる実測値)。各ロット (実験日の違い) ごとに、機械学習モデル

(説明変数：形態情報 (360 parameters (= 数千細胞分の12形態指標の集団統計値 (mean and SD=2種類) × 15 経時分 (=90時間分))、目的変数：増殖率) を構築したところ、実験日毎には低い予測誤差 (RMSE値) が得られることがわかった (上段)。しかし、全データを単純に混合し、全75培養ロットでの増殖予測モデルを構築したところ、予測誤差は大きく劣化した。これは、各画像データが全く同じ自動培養観察装置で撮影したものであっても、実験日ごとにデータバイアスを含み、単純に統合したデータで作った機械学習モデルの性能が低いことを示す。

[0122]

図16は、データの統合結果を示す。図15のデータ統合において、各データにおいてデータキュレーション・ノイズカット・データ正規化を組み合わせた前処理を行った結果、このような前データ処理を行う場合 (左図) に比べて、機械学習モデルの予測誤差 (RMSE値) が低く安定することがわかった (右図)。これは、各画像データが全く同じ自動培養観察装置で撮影したものであっても、実験日ごとにデータバイアスを含み、単純に統合したデータで作った機械学習モデルの性能が低いことを示す。

[0123]

参考文献

1. Marofi F, Vahedi G, Biglari A, Esmaeilzadeh A, Athari SS. Mesenchymal stromal/stem cells: a new era in the cell-based targeted gene therapy of cancer. *Front Immunol*. 2017;8:1770. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01770>.
2. Sherman LS, Shaker M, Mariotti V, Rameshwar P. Mesenchymal stromal/stem cells in drug therapy: new perspective. *Cytotherapy*. 2017;19(1):19-27. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.09.007>.
3. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant*. 2016;25(5):829-48. <https://doi.org/10.3727/096368915X689622>.
4. Wakao S, Kitada M, Kuroda Y, Shigemoto T, Matsuse D, Akashi H, Tanimura Y, Tsuchiyama K, Kikuchi T, Goda M, Nakahata T, Fujiyoshi Y, Deza M. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(24):9875-80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108240108>.

- 1073/ pnas. 11008 16108.
5. Vogel W, Grunebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Buhning HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica*. 2003;88(2):126-33.
 6. Trivanovic D, Jaukovic A, Popovic B, Krstic J, Mojsilovic S, Okic-Djordjevic I, Kukolj T, Obradovic H, Santibanez JF, Bugarski D. Mesenchymal stem cells of different origin: comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. *Life Sci*. 2015;141:61-73. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.09.019>.
 7. Sacchetti B, Funari A, Remoli C, et al. No identical "mesenchymal stem cells" at different times and sites: human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. *Stem Cell Reports*. 2016;6(6):897-913. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.011>.
 8. Bakopoulou A, Apatzidou D, Aggelidou E, Gousopoulou E, Leyhausen G, Volk J, Kritis A, Koidis P, Geurtsen W. Isolation and prolonged expansion of oral mesenchymal stem cells under clinical-grade, GMP-compliant conditions differentially affects "stemness" properties. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):247. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0705-0>.
 9. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(7):3213-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3213>.
 10. Mabuchi Y, Morikawa S, Harada S, Niibe K, Suzuki S, Renault-Mihara F, Houlihan DD, Akazawa C, Okano H, Matsuzaki Y. LNGFR+THY-1+VCAM-1hi+ cells reveal functionally distinct subpopulations in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports*. 2013;1(2):152-65. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.06.001>.
 11. Ukeba D, Yamada K, Tsujimoto T, Ura K, Nonoyama T, Iwasaki N, Sudo H. Bone marrow aspirate concentrate combined with in situ forming bioresorbable gel enhances intervertebral disc regeneration in rabbits. *J Bone Joint Surg*. 2021;103(8): e31. <https://doi.org/10.2106/JBJS.20.00606>.

12. De Bari C, Roelofs AJ. Stem cell-based therapeutic strategies for cartilage defects and osteoarthritis. *Curr Opin Pharmacol*. 2018;40:74-80. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.03.009>.
13. Kabat M, Bobkov I, Kumar S, Grumet M. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004-2018: is efficacy optimal in a narrow dose range? *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(1):17-27. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0202>.
14. Viswanathan S, Keating A, Deans R, Hematti P, Prockop D, Stroncek DF, Stacey G, Weiss DJ, Mason C, Rao MS. Soliciting strategies for developing cell-based reference materials to advance mesenchymal stromal cell research and clinical translation. *Stem Cells and Development*. 2014;23(11):1157-67. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0591>.
15. Dwarshuis NJ, Parratt K, Santiago-Miranda A, Roy K. Cells as advanced therapeutics: state-of-the-art, challenges, and opportunities in large scale biomanufacturing of high-quality cells for adoptive immunotherapies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;114:222-39. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.06.005>.
16. Jossen V, van den Bos C, Eibl R, Eibl D. Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102:3981-94. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8912-x>.
17. Lo Surdo J, Bauer SR. Quantitative approaches to detect donor and passage differences in adipogenic potential and clonogenicity in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering - Part C: Methods*. 2012;18(11):877-89. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0736>.
18. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, Idris SB. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):168. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>.
19. Fennema EM, Renard AJS, Leusink A, Van Blitterswijk CA, De Boer J. The effect of bone marrow aspiration strategy on the yield and quality of human mesenchymal stem cells. *Acta Orthop*. 2009;80(5):618-21. <https://doi.org/10.3109/17453670903278241>.

20. Collart-Dutilleul P-Y, Chaubron F, De Vos J, Cuisinier FJ. Allogenic banking of dental pulp stem cells for innovative therapeutics. *World Journal of Stem Cells*. 2015;7(7):1010-21. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i7.1010>.
21. Nievaleve S. Concise review: umbilical cord derived mesenchymal stem cell bank. *Progress in Stem Cell*. 2017;4:3-4. <https://doi.org/10.15419/psc.v4i3-4.397>.
22. Alzahrani FA, Saadeldin IM, Ahmad A, Kumar D, Azhar EI, Siddiqui A J, Kurdi B, Sajini A, Alrefaei AF, Jahan S. The potential use of mesenchymal stem cells and their derived exosomes as immunomodulatory agents for COVID-19 patients. *Stem Cells International*. 2020;2020:8835986. <https://doi.org/10.1155/2020/8835986>.
23. Rombouts WJC, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*. 2003;17(1):160-70. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402763>.
24. Dhanasekaran M, Indumathi S, Poojitha R, Kanmani A, Rajkumar JS, Sudarsanam D. Plasticity and banking potential of cultured adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Banking*. 2013;14(2):303-15. <https://doi.org/10.1007/s10561-012-9311-7>.
25. Dave C, McRae A, Doxtator E, Mei SHJ, Sullivan K, Wolfe D, Champagne J, McIntyre L. Comparison of freshly cultured versus freshly thawed (cryopreserved) mesenchymal stem cells in preclinical in vivo models of inflammation: a protocol for a preclinical systematic review and meta-analysis. *Syst Rev*. 2020;9(1):188. <https://doi.org/10.1186/s13643-020-01437-z>.
26. Hladik D, Hofig I, Oestreicher U, Beckers J, Matjanovski M, Bao X, Scherthan H, Atkinson MJ, Rosemann M. Long-term culture of mesenchymal stem cells impairs ATM-dependent recognition of DNA breaks and increases genetic instability. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):218. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1334-6>.
27. Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):218. <https://doi.org/10.3390/ijms140917986>.

28. Yang YHK, Ogando CR, Wang See C, Chang TY, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):131. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0876-3>.
29. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE.* 2008;3(5): e2213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002213>.
30. Turinetti V, Vitale E, Giachino C. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1164. <https://doi.org/10.3390/ijms17071164>.
31. Binato R, de Souza FT, Lazzarotto-Silva C, Du Rocher B, Mencalha A, Pizzatti L, Bouzas LF, Abdelhay E. Stability of human mesenchymal stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy. *Cell Prolif.* 2013;46(1):10-22. <https://doi.org/10.1111/cpr.12002>.
32. Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell.* 2018;22(6):824-33. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.004>.
33. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(12):2173-85. <https://doi.org/10.1002/scrm.17-0129>.
34. Imai Y, Yoshida K, Matsumoto M, Okada M, Kanie K, Shimizu K, Honda H, Kato R. In-process evaluation of culture errors using morphology-based image analysis. *Regenerative Therapy.* 2018;9(9):15-23. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2018.06.001>.
35. Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE.* 2013;8(2): e55082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055082>.
36. Sasaki H, Takeuchi I, Okada M, Sawada R, Kanie K, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Label-free morphology-based prediction of multiple differentiation potentials of human mesenchymal stem cells for early evaluation of intact cells. *PLoS ONE.* 2014;9(4): e93952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093952>.

- 1371/ journal. pone. 00939 52.
37. Takemoto Y, Imai Y, Kanie K, Kato R. Predicting quality decay in continuously passaged mesenchymal stem cells by detecting morphological anomalies. *J Biosci Bioeng.* 2020;131(2):198-206. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.09.022>.
38. Sawada R, Ito T, Tsuchiya T. Changes in expression of genes related to cell proliferation in human mesenchymal stem cells during in vitro culture in comparison with cancer cells. *J Artif Organs.* 2006;9(3):179-84. <https://doi.org/10.1007/s10047-006-0338-z>.
39. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.* 2000;113(7):1161-6. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.7.1161>.
40. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007;448(7151):313-7. <https://doi.org/10.1038/nature05934>.
41. Gutierrez-Aranda I, Ramos-Mejia V, Bueno C, Munoz-Lopez M, Real PJ, Macia A, Sanchez L, Liger G, Garcia-Perez JL, Menendez P. Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells.* 2010;28(9):1568-70. <https://doi.org/10.1002/stem.471>.

請 求 の 範 囲

1. LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけられた高速増殖性間葉系幹細胞集団を含む、被検細胞の品質評価又は判定のための標準品。
2. 細胞集団の特徴が、以下の(a)～(d)のいずれかの情報から選ばれるものである、請求項1に記載の標準品。
 - (a) 細胞集団内の個々の細胞における細胞の大きさ、伸展度、輪郭の複雑性、模様及び輝度、並びにこれらの画像情報からなる群から選ばれる少なくとも1つの細胞情報
 - (b) 前記(a)の細胞情報を、細胞集団内の複数の細胞にわたり積算して統計処理された情報
 - (c) 前記(b)の情報を複数の細胞集団に対して取得した組み合わせ情報
 - (d) 経時的に取得された前記(a)～(c)の情報
3. 統計処理された情報が、平均値、標準偏差、分布形状からなる群から選ばれる少なくとも1つである請求項2に記載の標準品。
4. 品質が、細胞増殖率、細胞回収数、未分化度、分化度、産生因子の量、細胞のヘテロ性からなる群から選ばれる少なくとも1つである請求項1に記載の標準品。
5. 被検細胞が、幹細胞である請求項1に記載の標準品。
6. 被検幹細胞が、被検間葉系幹細胞である請求項5に記載の標準品。
7. 被検幹細胞集団の品質評価のための情報提供方法であって、以下の工程：
 - (a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ（参照画像情報）を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報（参照パラメータ情報）を取得する工程、
 - (b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ（被検画像情報）を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報（被検パラメータ情報）を取得する工程、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する工程、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を被検幹細胞集団の品質評価のためにユーザに提供する工程

を含む、前記方法。

8. 被検幹細胞集団の品質評価方法であって、以下の工程：

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ(参照画像情報)を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報(参照パラメータ情報)を取得する工程、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ(被検画像情報)を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報(被検パラメータ情報)を取得する工程、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する工程、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を指標として、被検幹細胞の品質を評価する工程

を含む、前記方法。

9. 被検幹細胞集団の品質評価のための情報提供システムであって、以下の手段：

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271)及びThy-1 (CD90)のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ(参照画像情報)を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報(参照パラメータ情報)を取得する手段、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ(被検画像情報)を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報(被検パラメータ情報)を取得する手段、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する手段、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を被検幹細胞集団の品質評価のためにユーザに提供する手段

を含む、前記システム。

10. 被検幹細胞集団の品質評価システムであって、以下の手段：

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271) 及びThy-1 (CD90のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ (参照画像情報) を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報 (参照パラメータ情報) を取得する手段、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ (被検画像情報) を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報 (被検パラメータ情報) を取得する手段、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する手段、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を指標として、被検幹細胞の品質を評価する手段

を含む、前記システム。

11. 細胞集団の特徴が、以下の (a) ～ (d) のいずれかの情報から選ばれるものである、請求項9又は10に記載のシステム。

(a) 細胞集団内の個々の細胞における細胞の大きさ、伸展度、輪郭の複雑性、模様及び輝度、並びにこれらの画像情報からなる群から選ばれる少なくとも1つの細胞情報

(b) 前記 (a) の細胞情報を、細胞集団内の複数の細胞にわたり積算して統計処理された情報

(c) 前記 (b) の情報を複数の細胞集団に対して取得した組み合わせ情報

(d) 経時的に取得された前記 (a) ～ (c) の情報

12. 統計処理された情報が、平均値、標準偏差、分布形状からなる群から選ばれる少なくとも1つである請求項11に記載のシステム。

13. 品質が、細胞増殖率、細胞回収数、未分化度、分化度、産生因子の量、細胞のヘテロ性からなる群から選ばれる少なくとも1つである請求項9又は10に記載のシステム。

14. 被検幹細胞が、被検間葉系幹細胞である請求項9又は10に記載のシステム。

15. 被検幹細胞集団の品質評価のための情報提供プログラムであって、コンピュータを、以下の手段：

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271) 及びThy-1 (CD90) のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ (参照画像情報) を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報 (参照パラメータ情報) を取得する手段、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ (被検画像情報) を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報 (被検パラメータ情報) を取得する手段、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する手段、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を被検幹細胞集団の品質評価のためにユーザに提供する手段

として機能させるための、前記プログラム。

16. 被検幹細胞集団の品質評価プログラムであって、コンピュータを、以下の手段：

(a) 高速増殖性間葉系幹細胞集団の個々の細胞を、LNGFR (CD271) 及びThy-1 (CD90) のうち少なくとも1つのマーカーの陽性又は陰性を指標として特徴づけるとともに、前記個々の細胞の画像データ (参照画像情報) を取得し、又は当該参照画像情報から前記細胞集団の特徴のパラメータ情報 (参照パラメータ情報) を取得する手段、

(b) ユーザから提供された被検幹細胞集団の個々の細胞の画像データ (被検画像情報) を取得し、又は当該被検画像情報から前記被検幹細胞集団の特徴のパラメータ情報 (被検パラメータ情報) を取得する手段、

(c) 前記被検画像情報又は被検パラメータ情報を前記参照画像情報又は参照パラメータ情報と比較する手段、並びに

(d) 前記比較により得られた全部又は一部の情報を指標として、被検幹細胞の品質を評価する手段

として機能させるための、前記プログラム。

17. 細胞集団の特徴が、以下の (a) ～ (d) のいずれかの情報から選ばれるものである、請求項15又は16に記載のプログラム。

(a) 細胞集団内の個々の細胞における細胞の大きさ、伸展度、輪郭の複雑性、模様及び輝度、並びにこれらの画像情報からなる群から選ばれる少なくとも

1つの細胞情報

(b) 前記(a)の細胞情報を、細胞集団内の複数の細胞にわたり積算して統計処理された情報

(c) 前記(b)の情報を複数の細胞集団に対して取得した組み合わせ情報

(d) 経時的に取得された前記(a)～(c)の情報

18. 統計処理された情報が、平均値、標準偏差、分布形状からなる群から選ばれる少なくとも1つである請求項17に記載のプログラム。

19. 品質が、細胞増殖率、細胞回収数、未分化度、分化度、産生因子の量、細胞のヘテロ性からなる群から選ばれる少なくとも1つである請求項15又は16に記載のプログラム。

20. 被検幹細胞が、被検間葉系幹細胞である請求項15又は16に記載のプログラム。

21. 請求項15又は16に記載のプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体。

22. 高速増殖性間葉系幹細胞の画像処理方法であって、以下の工程：

(a) 請求項1に記載の標準品の画像データを取得する工程、並びに

(b) 前記取得された画像データのノイズを除去し、及び／又は前記画像データを正規化する工程を含む、前記画像処理方法。

23. 請求項22に記載の方法で処理された画像データを、コンピュータの機械学習用に提供する方法。

24. 請求項22に記載の方法で処理された画像データと、被検細胞の画像データとを照合して、当該被検細胞の品質を予測する方法。