

# Cell3iMager duosを用いたiPS細胞由来神経細胞の明視野解析

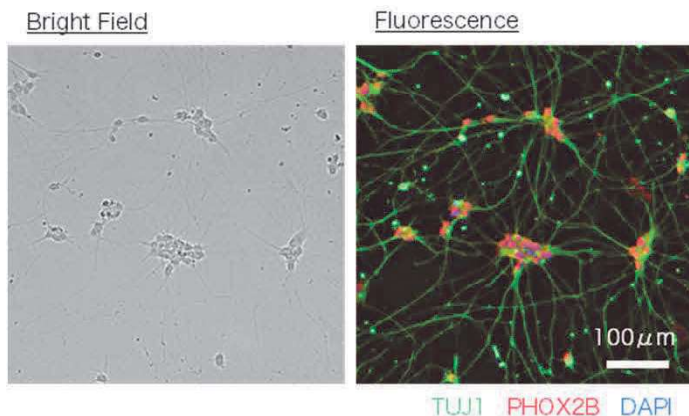
## はじめに

ヒトiPS細胞由来の神経細胞は、新規治療法の開発や医薬品候補物質の探索など幅広く使用されています。神経細胞の観察では、一般的に各種蛍光マーカーやレポーター遺伝子（GFPなど）が用いられています。一方、細胞培養過程のモニタリングや薬剤の長期暴露評価では、非侵襲およびラベルフリーな観察や解析手法も求められています。

そこで、ヒトiPS細胞から交感神経細胞へ誘導し、撮像と解析を検討しました。（[図1](#)）撮像と解析には、Cell3iMager duosとDeep Learningプラグインを使用し、取得した神経細胞の明視野画像について定量解析を行いました。

Deep Learningによる解析では、ロバスト性の高い細胞抽出・定量化が可能となります。従来の画像解析では解析が困難であった複雑な培養条件にも対応することができます。この機能を用いて、神経細胞の細胞体、神経突起、死細胞をそれぞれ学習させ、評価を行いました。

本稿では、神経細胞の増殖性モニタリング評価および薬剤添加試験の検討結果についてご紹介します。



**図1**：iPS細胞由来交感神経の明視野画像と蛍光画像  
本実験では主に明視野画像（左）を対象として、細胞体、神経突起、死細胞の解析を行いました。

## Materials&Methods

### 使用製品

- ・ Cell3iMager duos/duos2
- ・ Deep Learningプラグイン

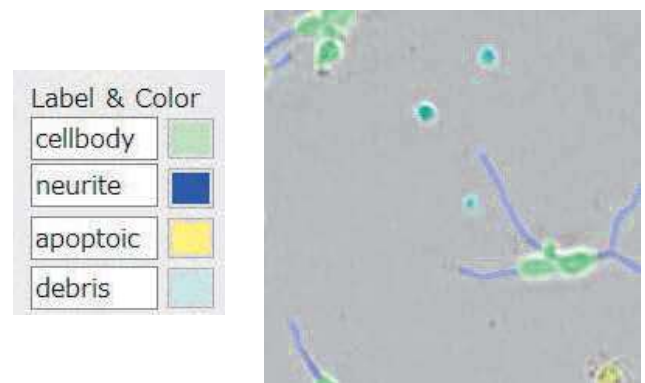
### サンプルおよび試薬

ヒトiPS細胞（201B7株）、Anti-Fas抗体（医学微生物学研究所）、Etoposide（富士フィルム和光純薬）、Staurosporine（富士フィルム和光純薬）

### 方法

ヒトiPS細胞からニューロスフェアを介して交感神経へと誘導する方法が報告されており、その方法に準じて分化誘導を行いました[1]。なお、SUMILON 96ウェルプレート（住友ベークライト）上に細胞を播種して観察を行いました。

Cell3iMager duosによる撮像では、高倍率モード（対物レンズ10倍）を使用しました。XY方向の範囲はウェル全体、Z方向の範囲は30μm（10μmピッチ、4レイヤー）で撮像し、1枚のフォーカス合成画像を取得しました。



**図2**：Deep Learningプラグインのラベル画像  
細胞体、神経突起、死細胞をそれぞれラベルしました。ラベル済み画像を教師データとしました。

Deep Learningプラグインを用いて、取得した画像をそれぞれラベル（Cell body、Neurite、Apoptotic cells、Debris）し、教師データとしました。（図2）Deep Learningの学習は、表1に示す条件で行い、神経突起の抽出精度を向上させるため、Neuriteの重みづけを変更しました。

学習結果をCell3iMager duosの解析ソフトウェアにインポートして、細胞の抽出および解析を行いました。

表1：本実験におけるDeep Learning学習条件

Number of teaching data	Total Calculation time	Labels (Weight for each label)
40 images	5.5 hours	Cell body (4) Neurite (8) Apoptotic cells (4) Debris (4)

## 結果

### Deep Learningと従来画像解析手法との比較

神経細胞の明視野解析について、Deep Learningが有効か検証を行いました。同一の神経細胞の画像に対して、当社既存ソフトウェア（従来の画像解析手法）とDeep Learningによる細胞抽出の違いを比較しました。（図3）

ウェル中央では、どちらの画像解析手法を用いても、細胞体、神経突起をそれぞれ抽出することが可能でした。しかし、ウェル縁のように照明が暗くなってしまう箇所においては、従来の画像解析手法では細胞体を抽出できず、また神経突起についても断片的にしか抽出できないことが分かりました。一方、Deep Learningを用いた場合、ウェルの縁であっても細胞体と神経突起を抽出することが可能でした。

このことから、Deep Learningプラグインを使用することによって、細胞体および神経突起をウェル全体で評価できることが分かりました。

### 神経細胞の増殖モニタリング

次に、ヒトiPS細胞由来交感神経の増殖性の定量化を試みました。分化誘導開始から18日以降のニューロスフェアを解離させ、平底の96ウェルプレートへ25,000 cells/well、合計48ウェルに再播種しました。播種した日をDay0として、Day1からDay7まで経時的に撮像を行いました。

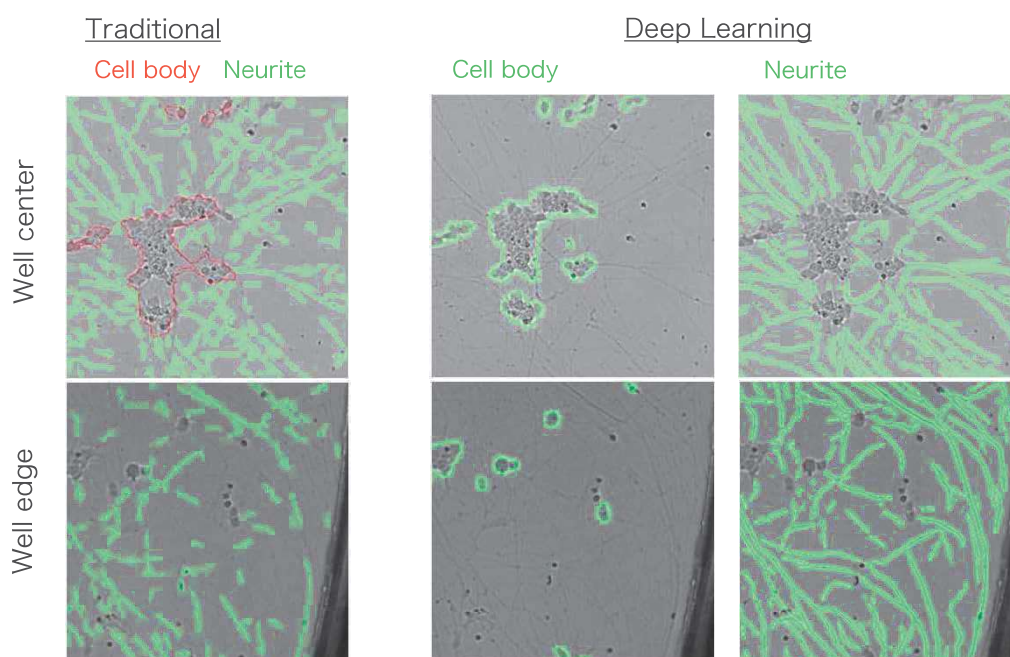


図3：従来の画像解析手法とDeep Learningによる細胞抽出結果の比較

（左列）従来の画像解析手法による細胞抽出結果、（中、右列）Deep Learningによる細胞抽出結果

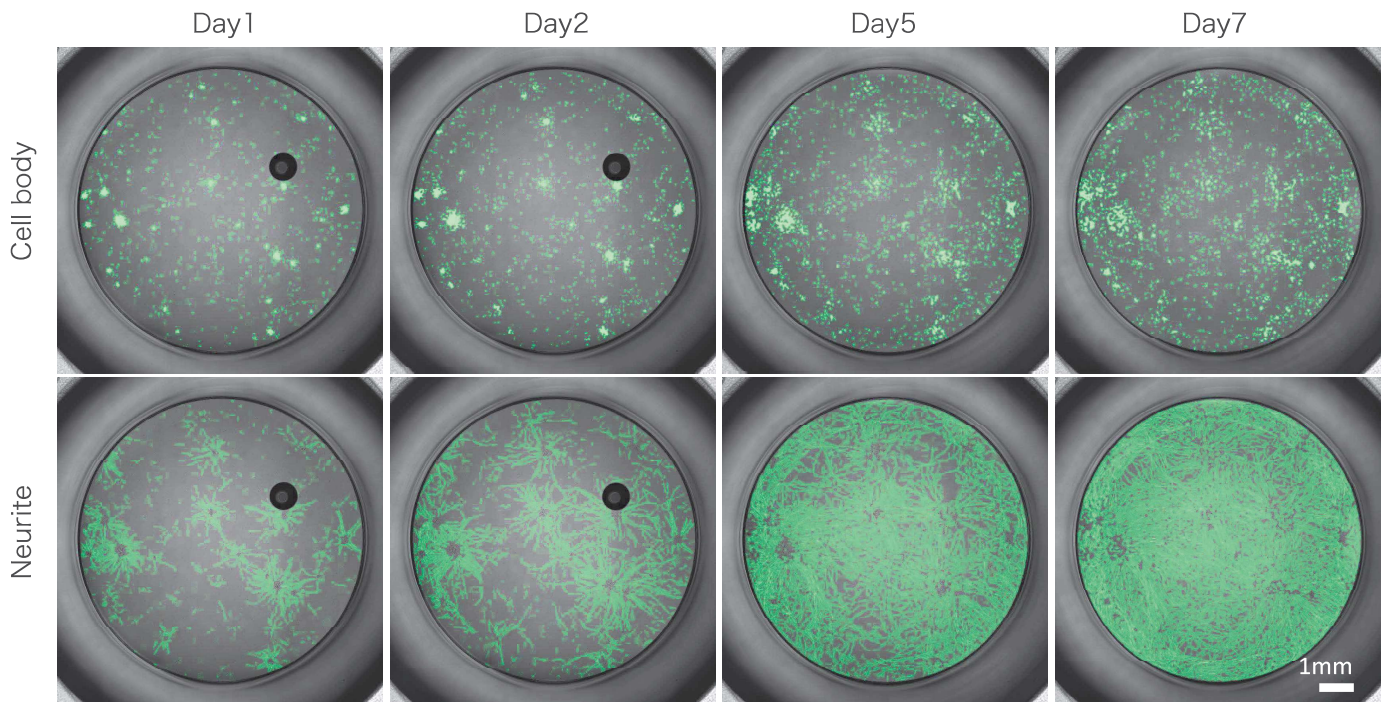


図4：細胞体および神経突起の抽出領域の経時変化

(上) 細胞体の抽出領域の経時変化、(下) 神経突起の抽出領域の経時変化

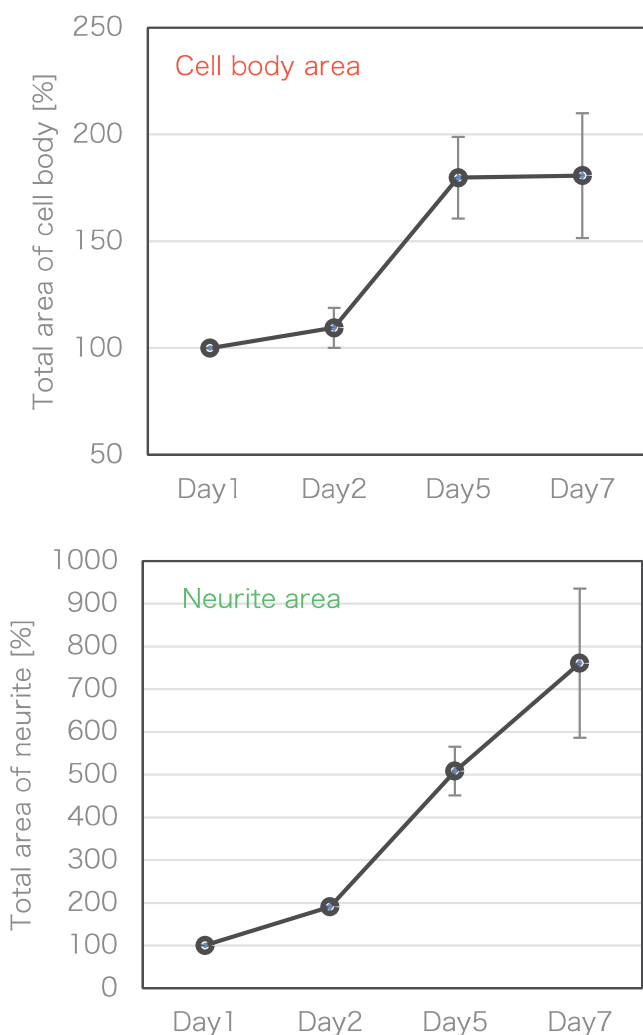


図5：細胞体および神経突起面積の推移

細胞体（上）と神経突起（下）の抽出した領域の経時変化を、Day1を基準として変化率を求めました。

Day1からDay7まで細胞の形態や細胞密度が変化していくため、Deep Learningの学習では各日の撮像画像から教師データを選出しました。撮像した画像から、細胞体と神経突起をそれぞれ抽出しました。（図4）

細胞体、神経突起ともに経時的に面積が増加している様子が確認されました。また、Cell3iMager duosの解析結果出力機能からデータを出力し、各ウェルの細胞体と神経突起の面積推移を定量化、グラフ化しました。（図5）細胞体はDay5からDay7で面積が変化しておらず、その様子は細胞の抽出結果からも判断できました。一方、神経突起についてはDay7まで面積が増加している様子が確認されました。

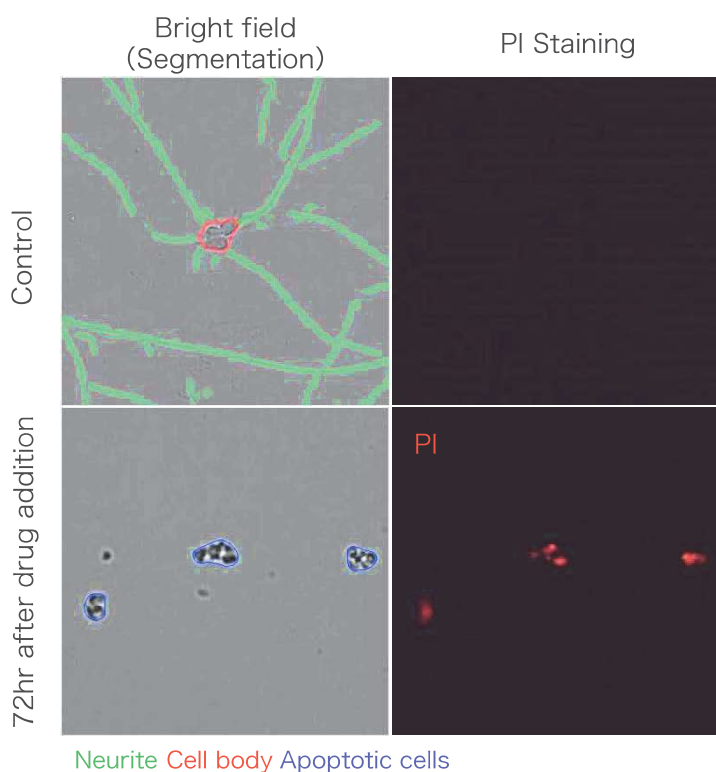
明視野画像とDeep Learningプラグインを使用することによって、細胞体と神経突起を経時的に定量化することができました。

## 薬剤添加試験

次に、ヒトiPS細胞由来神経細胞に、Anti-Fas抗体、Etoposide、Staurosporineを添加し、形態的な変化を解析できるか検討しました。

細胞を96ウェルプレートに5,000 cells/wellで播種して、翌日に薬剤を添加しました。薬剤を添加したタイミングを0時間とし、72時間まで撮像を行いました。

まず、Deep Learningプラグインにより細胞の抽出で生細胞（細胞体、神経突起）と死細胞（アポトーシスが誘導された細胞体）を区別して抽出できるかを検討しました。Etoposide 250 $\mu$ M添加後にウェル内の細胞ではアポトーシスの形態を示しており、その形態をDeep Learningで学習させました。なお、教師データの作成はPIの染色画像を参考に行いました。（細胞によっては染色画像が不要な場合もあります）

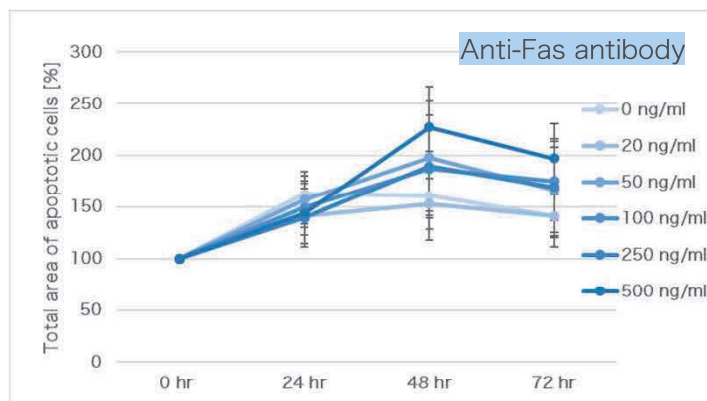


**図6**：Deep Learningによる抽出結果とPI染色の比較  
薬剤添加有無による細胞抽出を比較しました。ここで示す薬剤はEtoposide 250 $\mu$ Mです。（下）生細胞と死細胞を別々に抽出しました。（左）同じ撮像箇所をPIで染色し、死細胞を検出しました。（右）

Deep Learningにより細胞の抽出を行い、PI染色の結果と比較しました。（図6）Etoposideを添加していない場合、細胞体、神経突起をそれぞれ抽出し、またPIでも染色されないことが分かりました。一方、Etoposideを添加した場合、細胞の多くは死細胞として抽出され、これらの細胞はPIでも染色されていることが分かりました。

次に、薬剤の種類および濃度を変更して、それぞれの水準で死細胞の割合がどのように変化するかを調べました。同様にウェルプレートに細胞を播種して、翌日に薬剤を添加し、24時間ごとに撮像を行いました。薬剤添加時の死細胞の面積を100%として、その変化率を経時的に評価しました。

Anti-Fas抗体を使用した場合、死細胞の割合が増加していますが、これは薬剤を添加しない水準でも同様の傾向が確認されました。（図7）このことから、Anti-Fas抗体はヒトiPS細胞由来交感神経に対して、ほとんどアポトーシスを誘導しないと判断できます。また、Etoposideを添加した場合、Anti-Fas抗体よりも死細胞の割合が多く経時的に死細胞が増加していく様子が確認されました。（図8）同様に、Staurosporine添加によりアポトーシスの誘導が確認されました。Etoposideが緩やかに作用していたのに対して、Staurosporineは添加後24時間で死細胞の割合が急激に増加していました。（図9）



**図7**：Anti-Fas抗体添加後の死細胞の割合変化

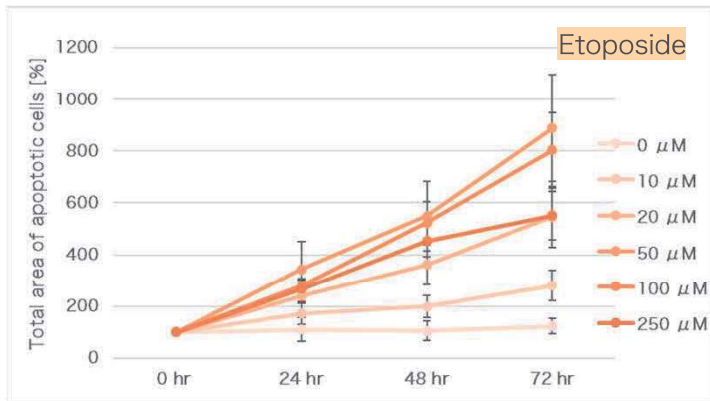


図8：Etoposide添加後の死細胞の割合変化

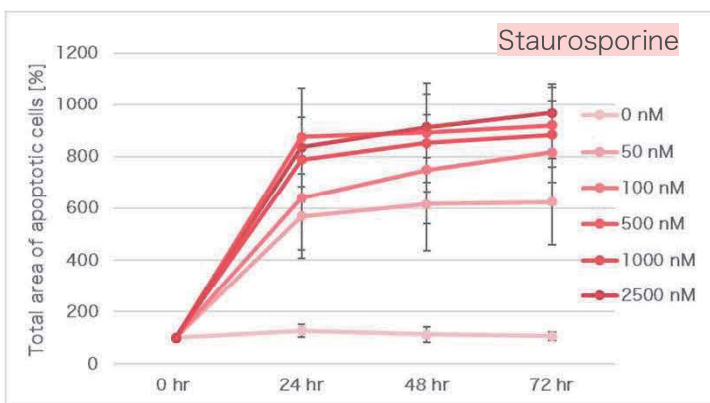


図9：Staurosporine添加後の死細胞の割合変化

## まとめ

本実験により、Cell3iMager duosおよびDeep Learningを用いてヒトiPS細胞由来交感神経細胞の明視野解析ができることを確認しました。従来の画像処理方法に比べてロバスト性が高く、明るさの違いがあったり、デブリの存在下でも、細胞を正確に抽出することが可能です。

また、アポトーシスが誘導された細胞も抽出することが可能なため、培養を続けながら生細胞と死細胞を定量的に評価することが可能となります。このことから、細胞の増殖性や品質の評価をラベルフリーで行うことが可能であり、例えば、神経細胞への長期的な薬剤暴露試験などに応用できる可能性があります。

また、Deep Learningによる明視野解析を用いることによって、神経細胞だけでなく、各種細胞の品質評価や創薬研究に応用できる可能性があります。

## 参考文献

1. Kirino, K. et al. (2018) "Efficient derivation of sympathetic neurons from human pluripotent stem cells with a defined condition," *Scientific Reports*. 8:12865. DOI:10.1038/s41598-018-31256-1

## 株式会社 SCREENホールディングス

京都(本社) / 〒602-8585 京都市上京区堀川通寺之内上る四丁目天神北町1番地の1

### ライフサイエンス事業室

京都(洛西) / 〒612-8486 京都市伏見区羽東帥古川町322  
Tel:075-931-7824 Fax:075-931-7826

東京 / 〒135-0044 東京都江東区越中島一丁目2-21 ヤマタネビル7階  
Tel:03-4334-7977 Fax:03-4334-7978

お問い合わせ先 screen\_lifescience@emis.screen.co.jp

(Web) <https://www.screen-cell3imager.jp/>

