

- (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset. **Open J Blood Dis.** 2:1-10, 2012
15. Kawamata T, Tojo A. Helicobacter pylori-induced thrombocytosis clinically indistinguishable from essential thrombocythemia. *Leuk. Lymphoma.* 53: 1423-4, 2012
16. Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. **Leuk Res.** 6:128-31, 2012
2. 学会発表
(国内)
第74回血液学会学術集会
2012/10/19 (金) 小林誠一郎、東條有伸、他. 口演 「CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells」
2012/10/19 (金) 塚田端夫、東條有伸、他. ポスター 「リウマチ性多発筋肉痛症を合併したt(1;7)を伴う骨髄異形成症候群の一例」
2012/10/19 (金) 何 海萍、東條有伸、他. ポスター 「Characterization of stem cell in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells」
2012/10/20 (土) Chanda Bidisha、東條有伸、他. 「Impairment of T cell development in chronic myeloid leukemia, partial explanation by in vitro model」
2012/10/20 (土) 大野伸広、東條有伸、他. 「CD3とCD7の展開によるATL細胞の同定：急性型ATLの治療反応性とTCRレパトア解析」
(海外)
第54回米国血液学会学術集会
2012/12/08 (土) 臼杵憲祐、東條有伸、他. 「Sustained molecular response with maintenance dose of interferon alfa after imatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia」
2012/12/10 (日) 幸谷 愛、東條有伸、他. 「Mir-126 and Mir-195-mediated control of B cell fate in leukemic and normal cells as a potential alternative for transcriptional factor」
2012/12/10 (日) 湯地晃一郎、東條有伸、他. 「Possible association between acute myelogenous leukemia and thrombopoietin receptor agonist in immune thrombocytopenia patients: a preliminary signal report」
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

課題名: 「自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生医療の臨床研究」**分担研究報告書**

分担課題名: 「骨髄間質細胞のセルプロセッシング体制の整備と品質管理、自己血清の調製」

分担研究者: 長村(井上) 登紀子 (東京大学 医科学研究所 附属病院・講師)

研究要旨:

本事業は、自己骨髄間質細胞を用いた新たな歯槽骨再生治療法の安全性と有効性のエビデンス創出するための第 I 相/第 II a 相臨床研究を実施するものである。分担研究として、骨髄間質細胞のセルプロセッシング体制の整備と品質管理、自己血清の調製を行った。本年度は臨床研究に先立ち、セルプロセッシングのために新たに雇用された 2 名に対して、細胞調製施設 (臨床細胞工学室) の使用に関する教育訓練を実施した。本臨床研究のために細胞調製施設へ設置された遠心機や冷蔵庫設置などの工事が施行されており、環境モニタリングを行って清浄度の確認を行った。その後は東大医科研細胞リソースセンターの安全衛生管理基準書に基づいて、浮遊菌、表面付着微生物、パーティクルカウンターによる清浄度試験を施行し、これまで問題は認めていない。本臨床研究に使用する機器について、平成 24 年度中に必要とされるバリデーションを施行した。平成 23 年 6 月より被験者のリクルートが開始されており、これまでエントリーが承認された 8 例中 7 例に対して末梢血の採血と自己血清の調製を行った。自己血清の調製に関して、今年度新規に導入した血清分離用バッグセット (セルエイド) は、閉鎖系かつ効率的な自己血清分離ができて有用であった。なお、ヒト幹細胞を用いた臨床研究では、細胞や検体の長期保管が義務付けられている。平成 23 年度に細胞リソースセンター内にこれら検体保管のための部門を設置したが、学内外の臨床研究に対応可能な体制を構築するために、検体の輸送および保管に関する検討を行った。

A. 研究目的

本研究では、自己骨髄間質細胞を用いた新たな歯槽骨再生治療法の安全性と有効性のエビデンス創出し、薬事法下での実用化を目指した第 I 相/第 II a 相臨床研究を実施する。特に先行する臨床研究によって得られた課題について検討し、実用化に向けて改良された細胞調製法による歯槽骨再生の効果を、先行する臨床試験の結果と比較する。本臨床研究では治療用の骨髄間質細胞の培養を行うため、細胞培養施設 (セルプロセッシングルーム、CPC) の整備、およびその運用管理を行うことが重要である。分担研究者として、セルプロセッシングを安全に行うために CPC の整備と運用を担当する。また、細胞培養に必要な自己血清の調製を行う。東大医科研細胞リソースセンターとして、本事業による細胞プロセッシングが安全に運営されるよう支援することを目的とする。

B. 研究方法

1. 教育訓練

セルプロセッシングのため 2 名に対して、細胞調製施設 (臨床細胞工学室) の使用に関する教育訓練を実施した。

教育訓練は、臨床細胞工学室、教育訓練実施基準書 (RCCT-GP02) に従って行われた。

2. CPC の管理運営

平成 24 年度には遠心機、冷凍冷蔵庫、インキュベーター、モニタリング機器が更新または新たに導入されており、設置後のバリデーションとして環境モニタリングを施行した。

CPC の管理のために、東大医科研細胞リソースセンターの安全衛生管理基準書 RCCT-GP01 に基づいて、1 週毎に浮遊菌、表面付着微生物、パーティクルカウンターによる清浄度試験を施行した。

同様に CPC 内で使用する機器については、定期的な保守管理が義務付けられている。本臨床研究に使用する機器について、平成 24 年度中に必要とされる定期保守点検および校正を施行した。手順は SOP-D01 から SOP-D21 に従った。

3. 自己血清の調製

平成 23 年 6 月より被験者のリクルートが開始されており、これまでエントリーが承認された 8 例中 7 例に対して、末梢血の採血と自己血清の調製を行った。

今年度、患者からの採血時のリキャップ防止のため、単回使用透析用針 JMS AV フェイスチュラを導入して採血した。また血清分離の際に、血餅が分離バッグのチューブ部に詰まることが多かったことから、今年度より血液成分分離バッグ（セルエイド）を導入した。セルエイドは自己血清採取用に独自に開発されたバッグでバッグ内に 3 個のビーズが核となり、血液凝固を促進させる。表 1 に従来法との比較を示した。

表 1 自己血清調製手順の相違概略

	従来分離バッグ法	セルエイド
形状	(NIPRO 89-111 瀉血バッグ) 単一バッグ	セルエイド 血清凍結バッグまで閉鎖系で連結している。
穿刺針	採血針はバッグに付属	採血針(AV フェイスチュラは別に接続)
容量	400ml まで	200ml まで。追加の場合はフェイスチュラ部分で再接続
凝固促進方法	採取後約 1 時間 4℃で静置	室温で 30 分以上振盪
遠心	3000rpm, 10 分間, 4℃	3,000g, 22℃, 10min, ACE9, DEC8
血清移動	別の分離バッグを穿刺連結し、分離スタンドを用いて上清を移行。RBC やフィブリン等の混入が多い場合は移行後さらに 1 回遠心。	既に連結されたバッグに分離スタンドを用いて上清を移行。
血清の分注	分離バッグ BB-TQ008J を穿刺接続して分注 (50mlx4 バッグ)	既に連結された凍結用分離バッグ(50ml x3 バッグ)に分注

血清分離後；

- ①調製した血清は、-20℃以下で保管した。
- ②培養中血清の不足が予想される場合には追加採血を行う。なお採血量および期間はセルプロセッシング・輸血マニュアル SOPA17 自己血採取実施手順に準じ、必要な場合には鉄剤経口投与を適宜行う。

4. 東大医科研細胞リソースセンター 細胞保管部門

「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」では、細胞や検体の 10 年間の保管が義務付けられている。しかしながら、それぞれのプロジェクト担当者が責任を持って長期間の試料保管を行うことは困難な場合も想定される。今後のヒト幹細胞を用いた臨床研究の支援体制の整備として、平成 23 年度に細胞リソースセンター内にこれら検体保管のための「細胞保管部門」を設置している。引き続き臨床研究に用いられる細胞および培地の一部の長期保管を担当する。

(倫理面への配慮)

本臨床研究は、臨床研究に関する倫理指針、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針を遵守し、被験者の尊厳と人権を尊重し、被験者の不利益が利益を越えることがないように十分に配慮して実施する。特に、被験者に危険が及ぶことのないよう、被験者骨髄細胞の採取、骨髄間質細胞を高品質に維持するように努め、骨髄間質細胞の移植には細心の注意を払う。

また、被験者には、事前に、TR コーディネーターの同席のもとで、研究責任者又は研究分担者から、本研究の意義、目的、方法、予期される危険、いつでも同意を撤回できること等を平易な用語で説明し、自由意志に基づいて被験者となることを、文書により同意を受ける。被験者の個人情報、個人情報管理者を置き、鍵のかかるロッカー等で厳重に保管される。

本研究はヘルシンキ宣言を遵守し、ボランティアからはインフォームドコンセントを取得した後に組織の採取を行う。

C. 結果

1. 教育訓練

本臨床研究を開始するにあたり、平成24年度に本事業によって新たに雇用された2名に対し、細胞培養手技、品質管理方法、そして細胞調製施設への入室、使用方法に関する教育を行った。現在も引き続き細胞調製、品質管理業務に従事している。(平成23年度は5名に教育訓練を実施済み)

2. CPCの管理運営

(後室設置工事後のバリデーション)

工事後の環境モニタリングの結果、CPC(臨床細胞工学室)において清浄度が確認された。結果の一部を(添付資料1、添付資料2)に示す。

(CPC管理)

(機器のメンテナンス)

本臨床研究にかかわる機器として、以下の機器の使用時点検、定期保守点検、および校正を行った。

- ・CO₂ インキュベーター
週1回の保守点検、年1回の定期点検。
- ・遠心機
年1回定期保守点検。
- ・パーティクルカウンター
年1回校正
- ・エアサンプラー
年1回校正
- ・電子天秤
年1回校正
- ・クリーンベンチ
年一回の定期点検

3. 自己血清の調製

これまで細胞培養が行われた7例について自己血清の分離を行っており、全例で必要とされる血清量が確保された。

また、従来の分離バッグとセルエイドの比較では、表2に示す通り、採血量に対する回収率および200ml採取換算にて分離回収した血清量は分離バッグの方がやや良好であった。従来の分離バッグ法による血清の回収率はMedian 54.9%(range 52.9~64.1%), 200ml採血から109.85ml (range105.8~128.2ml)であり、セルエ

イドでは各々50.0%(range 49.1~52.7%), 99.8ml(98.15~105.3ml)であった(P=0.02)。

一方、従来の分離バッグでは全例2回以上の遠心を必要としたのに対して、セルエイドでは1回の遠心にて分離でき、プロセス時間の大幅な短縮につながった。

4. 東大医科研細胞リソースセンター細胞保管部門

「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に基づく細胞、試料の保管体制については(添付資料3)を参照。平成24年度には、新たに培養、移植が行われた6例の血清および細胞の一部を同部門にて保管した。

D. 考察

細胞調製に関する人材教育は本臨床研究の遂行のためであるが、将来の骨再生医療の普及には、細胞培養に関する知識と経験を持った人材育成が必要である。本臨床研究を通じた教育により、今後これらの研究員が技術指導などの役割を担う人材となることが期待される。現在、細胞を調製する人材の資格については、日本輸血・細胞治療学会や再生医療学会でも議論されているところであるが、こうした人材はほぼ全例有期雇用であり、長期的な安定した雇用と技術を認める制度が今後の課題である。

CPCの管理については東大医科研細胞リソースセンターの手順書に従って実施されている。当院CPCは、国内初に設立(1997年)されたものであり、パイプやパネルの劣化等の老朽化の問題はあるが、これまでのところ細胞培養の環境については施設の基準内で推移しており、安全に細胞を培養できる環境が維持されているものと考えられる。これまで使用している機器に関する故障等に対しても適切に対応できている。

血清分離については、個体差はあるものの従来の分離バッグ法と比較して、セルエイドによる分離では、血清量の増加にはつながらなかったが、予定した十分量の血清は確保できた。また、セルエイドではバッグが予め全て閉鎖系で連結

してあるため、煩雑な分離バッグの接続が不要であり、5例全例1回の遠心により血清分離が可能であり、プロセスの時間短縮につながった。なお、これまでのところ血清分離バッグ変更による細胞の増殖への明らかな影響は認めていない。

臨床研究に用いられた細胞や試料の保管体制については、今回の臨床研究をきっかけとして設置されたものではあるが、広く他施設における臨床研究にも将来的には対応することを検討している。ヒト幹細胞を用いた臨床研究には、施設や機器の維持、管理、細胞や試料の保管など、高額な施設や多くの労力が必要となる。本研究所における施設を整備することで、今後の新たな臨床研究の開始にあたっても有効利用されることが期待される。

E. 結論

歯槽骨再生の臨床研究を支援するために、CPCの運営、維持、管理に関する検討を行い、これまでのところ細胞培養を安全に行うことのできる環境を提供することができた。また、新規血清分離用バッグセットであるセルエイドは、閉鎖系かつ効率的な自己血清分離において有用であった。今後も必要に応じて機器の更新やSOPの整備を行い、さらに安定した細胞調製の環境整備と手順の効率化を図りたい。

F. 研究発表:

論文発表:

1. 論文発表:

1. Nakasone H, Kanda J, Yano S, Atsuta Y, Ago H, Fukuda T, Kakihana K, Adachi T, Yujiri T, Taniguchi S, Taguchi J, Morishima Y, **Nagamura T**, Sakamaki H, Mori T, Murata M. A case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.; GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Transpl Int*. 2013 in press

2. Nakasone H, Kurosawa S, Yakushijin K, Taniguchi S, Murata M, Ikegame K, Kobayashi T, Eto T, Miyamura K, Sakamaki H, Morishima Y, **Nagamura T**, Suzuki R, Fukuda T. Impact of hepatitis C virus infection on clinical outcome in recipients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol*. 2013 in press
3. Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, Nakao S, Hidaka M, Maeda T, Naoe T, Taniguchi S, Kawa K, **Nagamura T**, Tabuchi K, Atsuta Y, Sakamaki H. Prognostic factors for acute myeloid leukemia patients with t(6;9)(p23;q34) who underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Leukemia* (26):1416-9, 2013
4. Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, Nakao S, Hidaka M, Maeda T, Naoe T, Taniguchi S, Kawa K, **Nagamura T**, Atsuta Y, Sakamaki H. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia with t(6;9)(p23;q34) dramatically improves the patient prognosis: a matched-pair analysis. *Leukemia* (26):461-4, 2012
5. Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, **Nagamura-Inoue T**, Kato K, Kanda Y. Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. *Haematologica*. 2013 Jan 24. [Epub ahead of print]

6. Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, **Nagamura-Inoue T**, Wakitani S, Tojo A, Tsuji K. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of haemophilic arthropathy. *Haemophilia*. 2013 Mar;19(2):e87-9. doi: 10.1111/hae.12056. Epub 2012 Dec 4.
7. Sakabe S, Takano R, **Nagamura-Inoue T**, Yamashita N, Nidom CA, Quynh Le MT, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. Differences in Cytokine Production in Human Macrophages and in Virulence in Mice Are Attributable to the Acidic Polymerase Protein of Highly Pathogenic Influenza A Virus Subtype H5N1. *J Infect Dis*. 207, 262-71, 2013
8. Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Aotsuka N, Onishi Y, Kato K, **Nagamura-Inoue T**, Kanda Y. Impact of the direction of HLA mismatch on transplant outcome in single unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.*, 19(2):247-54, 2012.
9. Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, **Nagamura-Inoue T**, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H, Fukuda T. Changes in incidence and causes of non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute leukemia/myelodysplastic syndrome: an analysis of the Japan Transplant Outcome Registry. *Bone Marrow Transplant*. In press, 2012
10. Kanda J, Ichinohe T, Kato S, Uchida N, Terakura S, Fukuda T, Hidaka M, Ueda Y, Kondo T, Taniguchi S, Takahashi S, **Nagamura-Inoue T**, Tanaka J, Atsuta Y, Miyamura K, Kanda Y. Unrelated cord blood transplantation vs related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction. *Leukemia*.27,286-94, 2012
11. Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, **Nagamura-Inoue T**, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood*.119, 2141-8. 2012

2.学会発表

1. 長村登紀子 テクニカルセミナー 細胞処理の基本的操作と検査 第60回日本輸血・細胞治療学会総会 2012/5/25
2. 何 海萍, 長村登紀子, 東條有伸ら. Characterization of primitive markers in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells 臍帯由来間葉系幹細胞における未熟細胞マーカーの解析 第74回日本血液学会学術集会総会 2012/10/19
3. 山本由紀, 長村登紀子, 東條有伸ら. mTOR inhibitor の制御性T細胞の誘導増幅に及ぼす影響 The influence of mTOR inhibitor on inducible regulatory T cells 第74回日本血液学会学術集会総会 2012/10/20
4. 幸道秀樹, 高橋敦子, 長村登紀子, 菅有紗, 笠根萌美, 星野茂角, 松本太郎, 麦島秀雄, 勝村秀樹 初回移植における生着率 The rate of engraftment in the first cord blood transplantation is higher than those in later. 第74回日本血液学会学術集会総会 2012/10/21
5. 湯沢 美紀, 尾上和夫, 山本 由紀, 東條 有伸, 長村(井上) 登紀子ら. 東大医科研における臍帯血移植時の解凍検査について 第134回日本輸血・細胞治療学会関東甲信越支部例会 2012/9/29
6. Makoto Murata, T. Nagamura-Inoue, and Ritsuro Suzuki. Clinical Factors Predicting the Response of Acute Graft-Versus-Host Disease to Corticosteroid Therapy 第54回米国血液学会 2012/12/9
7. Kazunari Aoki, Ken Ishiyama, Tokiko Nagamura, et al. Unfavorable Outcome of

Single-Unit Umbilical Cord Blood Transplantation for Elderly Patients with Myelodysplastic Syndromes 第54回米国血液学会 2012/12/9

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

表 2. 従来分離バッグ法とセルエイドによる血清分離結果の比較

	従来分離バッグ法 (n=6)	セルエイド(n=5)	
	Median(range)	Median(range)	
回収率	54.9% (range 52.9~64.1%)	50.0% (range 49.1~52.7%)	<i>P=0.02</i>
分離後血清量	109.85ml (range 105.8~128.2ml)	99.8ml (98.15~105.3ml)	<i>P=0.02</i>
遠心回数	2回	1回	<i>P<0.05</i>

(添付資料1)

9. 環境モニタリング結果表

9-1 表面付着菌測定結果(サニテーション作業後測定)

表面付着菌測定結果表

表-1

室	採取場所	No.	生菌数 [CFU/25cm ²]		合計値 [CFU/25cm ²]	場所別平均値 [CFU/25cm ²]	基準値 [CFU/25cm ²]	判定
			一般細菌	真菌				
クリーンルーム	床面	1	0	0	0	0.00	5	合格
	床面	2	0	0	0			
	床面	3	0	0	0			
	床面	4	0	0	0			
	床面	5	0	0	0			
	床面	6	0	0	0			
	床面	7	0	0	0			
	床面	8	0	0	0			
	壁面	9	0	0	0	0.00	5	合格
	壁面	10	0	0	0			
	壁面	11	0	0	0			
	壁面	12	0	0	0			
	壁面	13	0	0	0			
	壁面	14	0	0	0			
	壁面	15	0	0	0			
クリーンベンチ	作業台	16	0	0	0	0.00	<1	合格
	壁面	17	0	0	0	0.00		
	天板	18	0	0	0	0.00		
クリーンベンチ	作業台	19	0	0	0	0.00	<1	合格
	壁面	20	0	0	0	0.00		
	天板	21	0	0	0	0.00		
クリーンベンチ	作業台	22	1	0	1	1.00	<1	合格
	壁面	23	1	0	1	1.00		
	天板	24	0	0	0	0.00		
前室1	床面	25	3	0	3	1.50	-	-
エアシャワー	床面	26	0	0	0	0.00	-	-

(添付資料 2)

9-2 空中浮遊菌測定結果(サニテーション作業後測定)

空中浮遊菌測定結果表

表-2

室	採取量 [L]	No.	生菌数 [CFU]		合計値 [CFU]	室別平均値 [CFU]	換算値 [CFU/m ³]	基準値 [CFU/m ³]	判定
			一般細菌	真菌					
クリーンルーム	500	1	0	0	0	0.0	0.0	10	合格
		2	0	0	0				
		3	0	0	0				
		4	0	0	0				
		5	0	0	0				
クリーンベンチ	1000	6	0	0	0	0.0	0.0	<1	合格
		7	0	0	0				
クリーンベンチ	1000	8	0	0	0	0.0	0.0	<1	合格
		9	0	0	0				
クリーンベンチ	1000	10	0	0	0	0.0	0.0	<1	合格
		11	0	0	0				

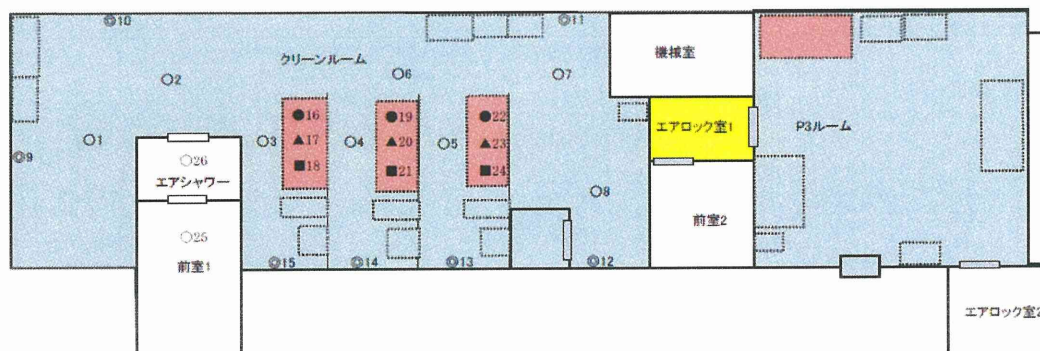
※クリーンベンチはグレードAの管理ではないが、クラス100なので1000 級引とする。

東京大学 医科学研究所 臨床研究A棟 4階 臨床細胞工学室

- :グレードC
- :グレードB
- :グレードA

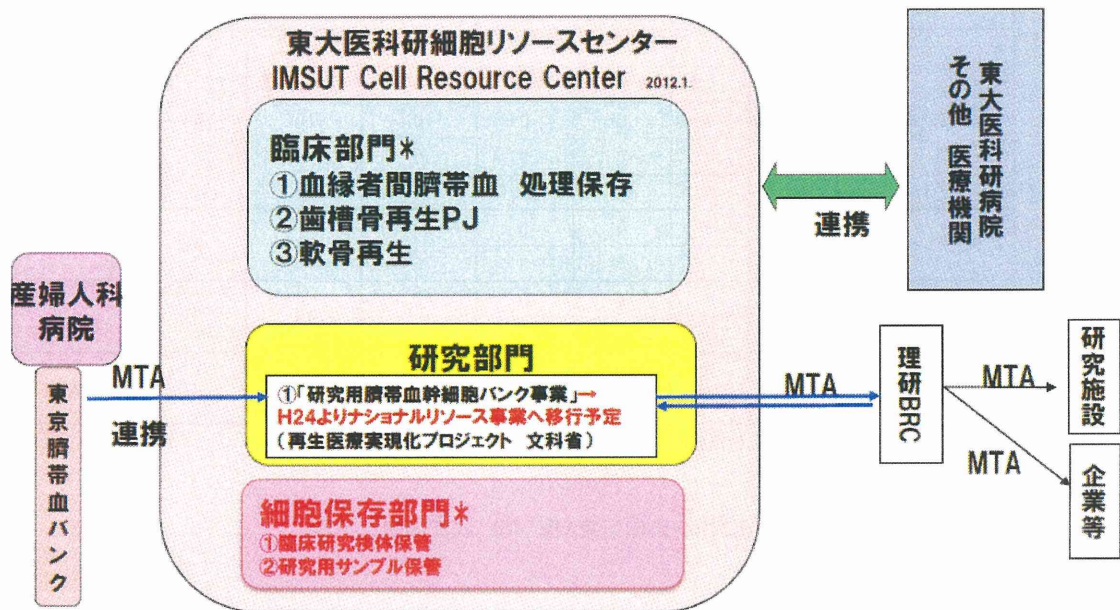
付着菌(一般細菌・真菌)測定図 [計26点]

- 床面...○
- 壁面...◎
- 機器類 作業台...●
- 機器類 壁面又は取手...▲
- 機器類 天板又は天井面...■



(添付資料3)

ヒト幹細胞を用いた臨床研究用細胞保管部門



*臨床用の細胞処理は臨床細胞工学室を使用して分離する。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	In press		2012
Agata H, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, Sumita Y, Tojo A, Kagami H	Characteristic differences among osteogenic cell populations of rat bone marrow stromal cells isolated from untreated, hemolyzed or Ficoll-treated marrow.	Cytotherapy.	14(7)	791-801	2012
Inoue M, Ebisawa K, Itaya T, Sugito T, Yamawaki-Ogata A, Sumita Y, Wadagaki R, Narita Y, Agata H, Kagami H, Ueda M.	Effect of GDF-5 and BMP-2 on the expression of tendon/ligamentogenesis-related markers in human PDL-derived cells.	Oral Dis	18(2)	206-212	2012
Agata H, Sumita Y, Asahina I, Tojo A, Kagami H.	Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery.	Histol Histo pathol	In press		2012
Kobayashi S, Tani K, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru K.	The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-I.	PLoS One.	8(1)	e53728	2013, doi: 10.1371/jour

Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S, <u>Tojo A</u> , Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, Tsuji K.	Quantitative PCR detection of CEP110-FGF R1 fusion gene in a patient with 8p11 syndrome (letter to the editor).	Leuk Lymphoma.			2013 Jan 18. [Epub ahead of print]
Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, <u>Tojo A</u> .	Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations.	Transplant Infectious Disease.			2012 Dec 20. doi: 10.1111/tid.12038. [Epub ahead of print]
Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegae H, <u>Tojo A</u> , Imamura T, Imashukus S; Japan LCH Study Group.	Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special CR regimen formulated by the Japan LCH Study Group.	Int J Hematol.			2012 Dec 16. [Epub ahead of print]
Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Iinoue T, Wakitani S, <u>Tojo A</u> , Tsuji K.	Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy.	Hemophilia			2012 Dec 4. doi: 10.1111/hae.12056. [Epub ahead of print]
Chi HT, Ly BT, Kano Y, <u>Tojo A</u> , Watanabe T, Sato Y.	ETV6-NTRK3 as a therapeutic target of small molecule inhibitor PKC412.	Biochem Biophys Res Commun.			2012 Nov 3. doi:pii: S0006-291X (12)02079-7. 10.1016/j.bbrc.2012.10.087. [Epub ahead of print]

Yamamoto S, Ebihara Y, Mochiduki S, Tsudam M, Yuji K, Uchimarumaru, <u>Tojo A</u> , Tsuji K.	Acute Lymphoblastic Leukemia with t(1;19)(q23;p13)/TCF3·PBX1 Fusion in an Adult Male with Down Syndrome.	Acta Haematol.	128	242-243	2012
Oshima Y, Yuji K, <u>Tojo A</u> .	Eltrombopag in refractory aplastic anemia.	New Engl J Med.	367	1162-1163	2012
Oshima Y, Tsukamoto H, <u>Tojo A</u> .	Association of hepatitis B with antirheumatic drugs: a case-control study.	Mod Rheumatol.			2012 Jul 18. [Epub ahead of print] PMID: 22802011
Hinohara K, Kobayashi S, Kanouchi H, Simizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, <u>Tojo A</u> , Gotoh N.	ErbB/NF- κ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer.	Proc Natl Acad Sci USA.	109	6584-6589	2012
Usuki K, <u>Tojo A</u> , Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A, Naoe T.	Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study.	Int J Hematol.	95	409-419	2012

Kawamata T, Jun L, Sato T, Tanaka M, Nagao H, Agata Y, Toyoshima T, Yokoyama K, Oyaizu N, Nakamura N, Ando K, Tojo A, Kotani A.	Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID.	Blood	119	3123-3127	2012
Dong Y, Kobayashi S, Tian Y, Ozawa M, Hiramoto T, Izawa K, Bai Y, Soda Y, Sasaki E, Itoh T, Maruyama Y, Takahashi S, Uchimaru K, Oyaizu N, Tojo A, Kai C, Tani K.	Leukemogenic fusion gene (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset.	Open J Blood Dis.	2	1-10	2012
Kawamata T, Tojo A.	Helicobacter pylori-induced thrombocytosis clinically indistinguishable from essential thrombocythemia.	Leuk. Lymphoma.			2012 Jan 31. [Epub ahead of print] PMID:22204454
Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K.	Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis.	Leuk Res.	6	128-131	2012
Nakasone H, Kanda J, Yano S, Atsuta Y, Ago H, Fukuda T, Kakihana K, Adachi T, Yujiri T, Taniguchi S, Taniguchi J, Morishima Y, Nagamura T, Sakamaki H, Mori T, Murata M.	A case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.; GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation.	Transpl Int.	In press		2013
Nakasone H, Kurosawa S, Yakushijin K, Taniguchi S, Murata M, Ikegami K, Kobayashi T, Eto T, Miyamura K, Sakamaki H, Morishima Y, Nagamura T, Suzuki R, Fukuda T.	Impact of hepatitis C virus infection on clinical outcome in recipients after allogeneic hematopoietic cell transplantation.	Am J Hematol.	In press		2013

Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, Nakao S, Hidaka M, Maeda T, Naoe T, Taniguchi S, Kawa K, Nagamura T , Tabuchi K, Atsuta Y, Sakamaki H.	Prognostic factors for acute myeloid leukemia patients with t(6;9)(p23;q34) who underwent an allogeneic hematopoietic stem cell transplant.	Leukemia	26	1416-9	2013
Ishiyama K, Takami A, Kanda Y, Nakao S, Hidaka M, Maeda T, Naoe T, Taniguchi S, Kawa K, Nagamura T , Atsuta Y, Sakamaki H.	Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia with t(6;9)(p23;q34) dramatically improves the patient prognosis: a matched-pair analysis.	Leukemia	26	461-4	2012
Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, Nagamura-Inoue T , Kato K, Kanda Y.	Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia.	Haematologica.			2013 Jan 24. [Epub ahead of print]
Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T , Wakitani S, Tojo A, Tsuchi K.	Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of haemophilic arthropathy.	Haemophilia.	19(2)	e87-89	2013 doi: 10.1111/hae.12056. Epub 2012 Dec 4.
Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takanaishi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Aotsuka N, Onishi Y, Kato K, Nagamura-Inoue T , Kanda Y.	Impact of the direction of HLA mismatch on transplant outcome in single unrelated cord blood transplantation.	Biol Blood Marrow Transplant.,	19(2)	247-254	2012

<p>Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, <u>Nagamura-Inoue T</u>, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H, Fukuda T.</p>	<p>Changes in incidence and causes of non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute leukemia/myelodysplastic syndrome: an analysis of the Japan Transplant Outcome Registry.</p>	<p>Bone Marrow Transplantation.</p>	<p>In press</p>		<p>2012</p>
<p>Kanda J, Ichinohe T, Kato S, Uchida N, Terakura S, Fukuda T, Hidaka M, Ueda Y, Kondo T, Taniguchi S, Takahashi S, <u>Nagamura-Inoue T</u>, Tanaka J, Atsuta Y, Miyamura K, Kanda Y.</p>	<p>Unrelated cord blood transplantation vs related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction.</p>	<p>Leukemia</p>	<p>27</p>	<p>286-294</p>	<p>2012</p>
<p>Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Tanakanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, <u>Nagamura-Inoue T</u>, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T.</p>	<p>Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study.</p>	<p>Blood.</p>	<p>119</p>	<p>2141-8</p>	<p>2012</p>

Morphology-Based Prediction of Osteogenic Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells

Fumiko Matsuoka¹, Ichiro Takeuchi², Hideki Agata³, Hideaki Kagami^{3,4}, Hirofumi Shiono⁵, Yasujiro Kiyota⁵, Hiroyuki Honda¹, Ryuji Kato^{1,6*}

1 Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya, Aichi, Japan, **2** Department of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Aichi, Japan, **3** Tissue Engineering Research Group, Division of Molecular Therapy, The Institute of Medical Science The University of Tokyo, Tokyo, Japan, **4** Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Matsumoto Dental University School of Dentistry, Shiojiri, Nagano, Japan, **5** Nikon Corporation, Tokyo, Japan, **6** Department of Basic Medicinal Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Nagoya, Aichi, Japan

Abstract

Human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) are widely used cell source for clinical bone regeneration. Achieving the greatest therapeutic effect is dependent on the osteogenic differentiation potential of the stem cells to be implanted. However, there are still no practical methods to characterize such potential non-invasively or previously. Monitoring cellular morphology is a practical and non-invasive approach for evaluating osteogenic potential. Unfortunately, such image-based approaches had been historically qualitative and requiring experienced interpretation. By combining the non-invasive attributes of microscopy with the latest technology allowing higher throughput and quantitative imaging metrics, we studied the applicability of morphometric features to quantitatively predict cellular osteogenic potential. We applied computational machine learning, combining cell morphology features with their corresponding biochemical osteogenic assay results, to develop prediction model of osteogenic differentiation. Using a dataset of 9,990 images automatically acquired by BioStation CT during osteogenic differentiation culture of hBMSCs, 666 morphometric features were extracted as parameters. Two commonly used osteogenic markers, alkaline phosphatase (ALP) activity and calcium deposition were measured experimentally, and used as the true biological differentiation status to validate the prediction accuracy. Using time-course morphological features throughout differentiation culture, the prediction results highly correlated with the experimentally defined differentiation marker values ($R > 0.89$ for both marker predictions). The clinical applicability of our morphology-based prediction was further examined with two scenarios: one using only historical cell images and the other using both historical images together with the patient's own cell images to predict a new patient's cellular potential. The prediction accuracy was found to be greatly enhanced by incorporation of patients' own cell features in the modeling, indicating the practical strategy for clinical usage. Consequently, our results provide strong evidence for the feasibility of using a quantitative time series of phase-contrast cellular morphology for non-invasive cell quality prediction in regenerative medicine.

Citation: Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, et al. (2013) Morphology-Based Prediction of Osteogenic Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. PLoS ONE 8(2): e55082. doi:10.1371/journal.pone.0055082

Editor: Beatriz Pelacho, Foundation for Applied Medical Research, Spain

Received: October 8, 2012; **Accepted:** December 18, 2012; **Published:** February 21, 2013

Copyright: © 2013 Matsuoka et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: We are grateful to the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) for the Grant for Industrial Technology Research (Financial Support to Young Researchers, 09C46036a) for the support. The research was also supported in part by a grant-in-aid from Nikon Corporation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: We have the following interests. This study was supported in part by a grant-in-aid from Nikon Corporation. Hirofumi Shiono and Yasujiro Kiyota are employed by Nikon Instruments. Ryuji Kato is one of the main investigators of 12 patents (pending) related to basic technologies of "algorithms of cellular image processing. Hirofumi Shiono, is one of the inventors of the hardware we used in our research, "BioStation CT" which is the automatic cell culture system, and a member of this collaborative project with Nagoya Univ. The BioStation CT and relating software are marketed products of Nikon Corporation. Although the system and the software were used in this study, the result of this research does not depend on the system and the software. He is one of the inventors of related 12 patents. Yasujiro Kiyota, is one of the inventors of the hardware we used in our research work. There are no further patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter our adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* E-mail: kato-r@ps.nagoya-u.ac.jp

 These authors contributed equally to this work.

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a useful cell source for tissue engineering and regenerative medicine of various tissues because of their multi-lineage differentiation capacity (e.g., osteogenic, chondrogenic, adipogenic, neurogenic, and myogenic) [1–3]. Although MSCs can be harvested from various tissues,

including adipose tissue and dental pulp, bone marrow derived MSCs (BMSCs) have a well-described *in vivo* bone-forming capacity and are widely used for clinical bone regenerative therapies [4–6]. Several groups, including ours, have been successful in clinical bone tissue engineering using human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) [7–9]. In spite of documented clinical successes of bone regeneration with hBMSCs,

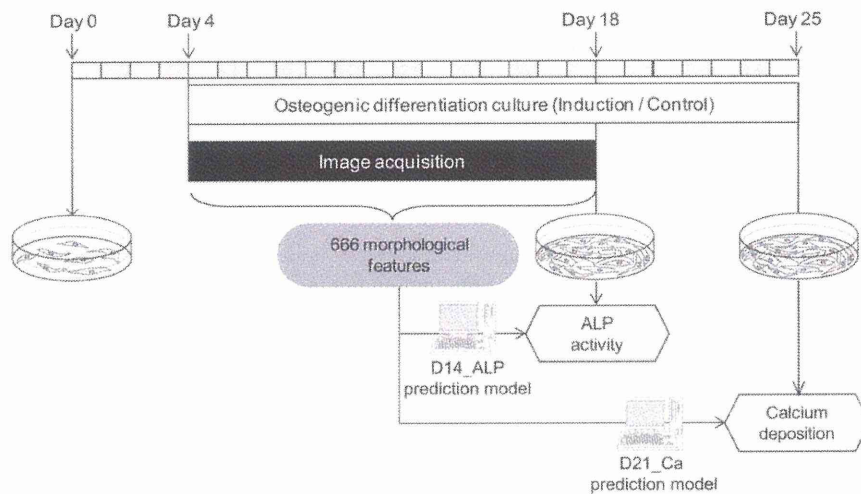


Figure 1. Schematic illustration of the experimental scheme for the prediction of osteogenic differentiation potential using multiple and time-course morphological features. hBMSCs were cultured in non-induction medium in first 4 days, then the medium was replaced with osteogenic induction medium only for the Induction sample. From day 0 to day 14, cell images were automatically acquired by BioStation CT every 8 hours. ALP activity and calcium deposition rates were evaluated on days 14 and 21, respectively. Using multiple morphological features covering 2 weeks culture, two types of hBMSC osteogenic differentiation evaluation results were predicted by individual prediction models. doi:10.1371/journal.pone.0055082.g001

robust therapeutic efficacy able to withstand the large variation among patients remains a challenge. Therefore, practical and effective cell-quality assurance methods are a necessary approach to address the unmet need of minimizing variability in patient outcomes.

Previous works aimed at characterizing BMSC osteogenic potential have mainly focused on methods that damage cells (e.g., staining, gene expression, etc.) [10]. These conventional techniques limit clinical translation in two ways. First, the destructive nature of the measurements consumes cellular material that would otherwise be useful for therapy. Second, the sample measurements are terminal endpoints, in part due to the irreversible damage incurred by the cells from the measurement procedure. As a result, repeated measurement on the same cellular sample is not possible and longitudinal sampling consumes more material.

Currently, the daily monitoring of cellular morphology by microscopy is combined with minimum sampling for biochemical markers to serve as the routine cellular quality assessment during the expansion culture process. Qualitative microscopic examination and the consumptive nature of the biochemical assays impose a limit on the predictive control currently available in clinical practice. A quantitative, non-invasive method for predicting cellular osteogenic potential and quality is needed to better anticipate clinical outcomes.

Cellular morphology has historically been used as an important indicator to characterize present and assess cell quality. Several reports describe correlations between osteogenic differentiation potential and cellular morphology. Kelly *et al.* have reported that cell geometry is highly correlated with differentiation into osteogenic lineages [11]. Takagi *et al.* have also reported that the cell roundness of hBMSCs is highly correlated with the expression of osteogenic differentiation marker genes [12]. In addition to the above examples that match morphology and cell potential, there are increasing numbers of reports describing image-based cell assessment methods. The popularity of fluorescence-labeled imaging methods in high content cellular screening has outpaced methods with non-labeled image-based assessment; however these

approaches retain some technical drawbacks, which do not necessarily improve upon the non-labeled methods [13–16].

In this study, we aimed to demonstrate the efficacy of the non-invasive prediction model, which only uses cellular morphology features to forecast the osteogenic differentiation potential of hBMSCs. Specifically, the outcomes of two biochemical osteogenic markers were quantitatively forecast by two types of prediction models: (1) the alkaline phosphatase (ALP) activity 14 days after differentiation, designated as “D14_ALP model”, and (2) the calcium deposition rate 21 days after differentiation, designated as “D21_Ca model”. ALP activity is a BMSC differentiation marker; however measuring ALP activity alone is not sufficient for predicting *in vivo* bone formation. Compared to ALP, calcium deposition rate is an osteogenic differentiation marker that highly correlates with *in vivo* bone formation. However, since calcium deposition is a late phenotypic marker, which appears beyond the optimal implantation stage, it is not commonly applied as a clinically useful marker. Overall, it is impossible to measure both markers with the same cell sample or quantitatively predict the measurement results using conventional methods.

To advance this field, we aimed to investigate whether a morphology-based prediction model is capable of quantitatively predicting both ALP activity and calcium deposition rate. Further on, to demonstrate the clinical feasibility of our resulting morphology-based prediction models we examined practical considerations for use in the clinic in order to predict osteogenic potential for new patients scheduled for cell therapy. Two simulation scenarios were carefully examined: (Scenario I) Prediction of osteogenic differentiation potential of a new patient’s cells by a model trained with historical patient data; (Scenario II) Prediction of osteogenic differentiation potential of a new patient’s cells by a combination of historical patient data and partial culture imaging data from the early stage expansion of the new patient’s own cells.

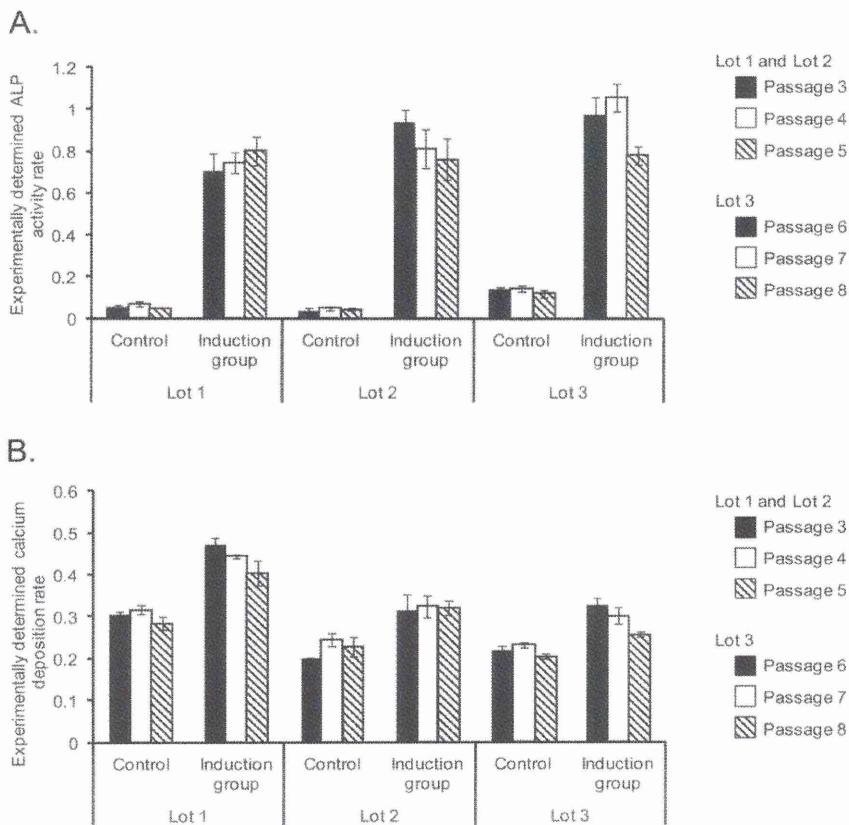


Figure 2. Experimentally determined biological results after the osteogenic differentiation. A: Experimentally determined ALP activity rate on day 14 of differentiation. B: Experimentally determined calcium deposition rate on day 21 of differentiation. doi:10.1371/journal.pone.0055082.g002

Results

Biological/morphological changes during osteogenic differentiation culture

hBMSCs were either cultured in differentiation induction medium or in non-induction medium according to the protocol illustrated in Fig. 1, which was based on the clinical jaw bone therapy protocol used by our group [7]. Three lots of cells, passed three times per lot, were used to assess “patient-derived variance” and “processing-derived variance.” After the image acquisition period during differentiation culture, ALP activity was measured from the same well that the images were acquired. After an additional week of differentiation culture, calcium deposition rate was quantified.

All cell lots at all passages in the induction groups showed a clear increase in ALP activity compared to the control groups (Fig. 2–A). The calcium deposition rate was also significantly higher in the induction group than the control group among all lots and all passages (Fig. 2–B). However, greater variation was observed in the calcium deposition assays compared to the ALP assays. This result reflects the fact that ALP activity measurements add information of osteogenic differentiation, but does not qualify as a marker of further osteogenic maturation potential even in *in vitro*.

In contrast to biochemical measurements, which exhibited a noticeable pattern after several weeks of culture, a signature pattern using morphological measurements was found within 7 days of differentiation culture (Fig. 3). For all cell lots at the

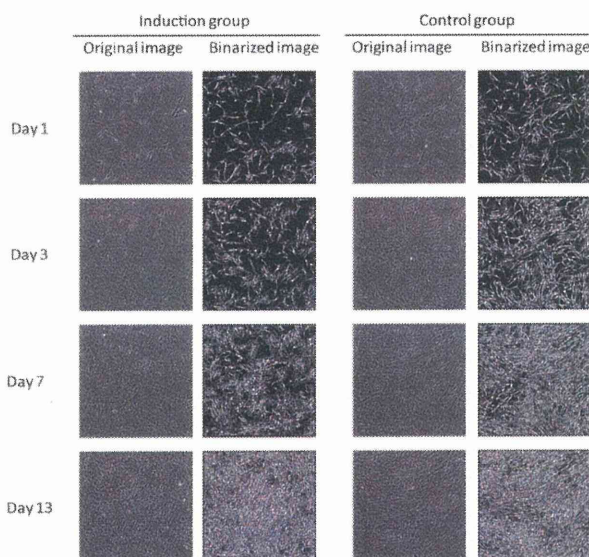


Figure 3. Phase contrast raw image from BioStation CT and its processed image. The images of beginning (day 1), middle (day 3 and 7), and the end (day 13) in the induction period of Lot 1 are indicated as examples. Raw images were binarized with MetaMorph. doi:10.1371/journal.pone.0055082.g003