

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-325567
(P2006-325567A)

(43) 公開日 平成18年12月7日(2006.12.7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	2G045
C12M 1/34 (2006.01)	C12M 1/34 B	4B029
G01N 33/48 (2006.01)	G01N 33/48 P	4B063
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 Y	

審査請求 未請求 請求項の数 6 書面 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2005-179833 (P2005-179833)	(71) 出願人	505016388 南 俊基 東京都杉並区桃井3-10-1-108
(22) 出願日	平成17年5月25日 (2005.5.25)	(71) 出願人	503067878 安本 茂 神奈川県横浜市旭区中沢1-1-13
		(72) 発明者	安本 茂 神奈川県横浜市旭区中沢1-1-13
		(72) 発明者	越後谷 朋子 神奈川県横浜市瀬谷区二つ橋60-7
		(72) 発明者	竹内 誠亮 神奈川県横浜市旭区鶴ヶ峰2-47ハイツ ASA103

最終頁に続く

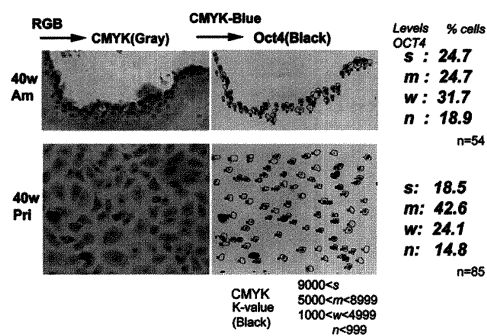
(54) 【発明の名称】 転写因子発現細胞の評価方法及び評価装置

(57) 【要約】

【課題】 D A B免疫染色された細胞群から特定の転写因子O c t 4を発現する転写因子発現細胞の様子を数値評価する方法を提供する。

【解決手段】 D A B免疫染色された細胞群から特定の転写因子を発現する転写因子発現細胞の様子を評価する転写因子発現細胞の評価方法は (a) 前記転写因子発現細胞を含む細胞群からD A B免疫染色した細胞を顕微鏡を介してコンピュータ可読画像データに変換し、 (b) 得られた画像データをソフトウェアによりC M Y Kイメージ変換し、C M Y K変換した画像から青色を減色し、 (c) 全体の画像中から黒要素測定値であるK値の割合を求め、さらに、好ましくは (d) 前記K値を予め定めた複数の黒要素測定値範囲を設定し、各設定した黒要素測定値範囲の割合を求めて、転写因子発現細胞の濃度分布を評価する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

D A B 免疫染色された細胞群から特定の転写因子を発現する転写因子発現細胞の様子を評価する転写因子発現細胞の評価方法であって、

(a) 前記転写因子発現細胞を含む細胞群から D A B 免疫染色した細胞を顕微鏡を介してコンピュータ可読画像データに変換し、

(b) 得られた画像データをソフトウェアにより C M Y K イメージ変換し、C M Y K 変換した画像から青色を減色し、

(c) 全体の画像中から黒要素測定値である K 値の割合を求める

ことを特徴とする転写因子発現細胞の評価方法。

10

【請求項 2】

さらに、

(d) 前記 K 値を予め定めた複数の黒要素測定値範囲を設定し、各設定した黒要素測定値範囲の割合を求めて、転写因子発現細胞の濃度分布を評価する

ことを特徴とする請求項 1 に記載の転写因子発現細胞の評価方法。

【請求項 3】

さらに、

(e) 同一の細胞群に対して 2 又はそれ以上の転写因子を用いて D A B 染色し、前記各転写因子により免疫染色された細胞の K 値又は黒要素測定値範囲の割合、又は両者を比較することを特徴とする請求項 2 に記載の転写因子発現細胞の評価方法。

20

【請求項 4】

前記細胞が、E S 又は E S 様細胞であって、前記転写因子が O c t 4 又は P 7 5 N T R であることを特徴とする請求項 1 から請求項 3 のいずれか 1 項に記載の転写因子発現細胞の評価方法。

【請求項 5】

請求項 1 から請求項 4 のいずれか 1 項に記載の方法を実行するためのプログラムが格納されたコンピュータ可読媒体。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のコンピュータ可読媒体が格納されたコンピュータシステムから構成された転写因子発現細胞の評価装置。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、転写因子発現細胞の評価方法及び評価装置及び転写因子発現細胞の評価プログラムに関する。

【背景技術】

【0002】

D A B 染色は、免疫染色に最も一般的に使用されている免疫染色法であり、転写因子発現細胞は、褐色に染色される。

そのため、D A B 染色された細胞（転写因子発現細胞）から、細胞を定量的に評価・特定することは困難である。

40

【0003】

O c t 4 は、最も一般的な E S 細胞を同定するためのマーカーであるが、これを転写因子として用いて D A B 染色した場合、その染色の度合いを数値で示す指標がなかった。例えば、非特許文献 1 ~ 3 には、マウス初期胚 (B l a s t c y s t) では O c t 4 の発現程度が異なる細胞が存在することが示されており、そこから分離される E S 細胞では O c t 4 の発現程度が異なる細胞は異なった運命、即ち潜在的な多分化能力を保持しながら未分化状態で増殖し続けるか、多様な細胞に分化するかの特性の違いを示す分子生物学的解析結果が記載されている。

【非特許文献 1】 O k a m o t o K , e t a l . , A n o v e l o c t a m e

50

r binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. Cell 60461-472, 1990.

【非特許文献2】 Pesce M et al., Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. Mech. Dev. 71: 89-98, 1998.

【非特許文献3】 Niwa H, Miyazaki J-I, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nature Genetics 24: 372-376, 2000 10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、本発明の課題は、細胞組織の状態を評価するために最も日常的で頻繁に実施されている免疫染色法によるDAB免疫染色された細胞群から特定の転写因子Oct 4を発現する転写因子発現細胞の様子を数値評価する方法を提供することであるが、本発明はOct 4に限定されるものではなくその他の免疫染色や、さらに特定の物質の存在量を画像評価することにまで拡張される。 20

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記課題を解決する本発明は、下記事項に関する。

(1) DAB免疫染色された細胞群から特定の転写因子を発現する転写因子発現細胞の様子を評価する転写因子発現細胞の評価方法であって、

(a) 前記転写因子発現細胞を含む細胞群からDAB免疫染色した細胞を顕微鏡を介してコンピュータ可読画像データに変換し、

(b) 得られた画像データをソフトウェアによりCMYKイメージ変換し、CMYK変換した画像から青色を減色し、

(c) 全体の画像中から黒要素測定値であるK値の割合を求めることを特徴とする転写因子発現細胞の評価方法。 30

(2) さらに、

(d) 前記K値を予め定めた複数の黒要素測定値範囲を設定し、各設定した黒要素測定値範囲の割合を求めて、転写因子発現細胞の濃度分布を評価することを特徴とする(1)に記載の転写因子発現細胞の評価方法。

(3) さらに、

(e) 同一の細胞群に対して2又はそれ以上の転写因子を用いてDAB染色し、前記各転写因子により免疫染色された細胞のK値又は黒要素測定値範囲の割合、又は両者を比較することを特徴とする(2)に記載の転写因子発現細胞の評価方法。

(4) 前記細胞が、ES又はES様細胞であって、前記転写因子がOct 4又はP75 NTRであることを特徴とする(1)から(3)のいずれか1項に記載の転写因子発現細胞の評価方法。 40

(5) (1)か(4)のいずれか1項に記載の方法を実行するためのプログラムが格納されたコンピュータ可読媒体。

(6) (5)に記載のコンピュータ可読媒体が格納されたコンピュータシステムから構成された転写因子発現細胞の評価装置。

【発明の効果】

【0006】

このように構成することによってDAB免疫染色された細胞群から特定の転写因子Oct 4を発現する転写因子発現細胞の様子を数値評価することが可能となる。この評価方法 50

はOct 4に限定されるものではなくその他の免疫染色や、さらに特定の物質の存在量を画像評価することも可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明は、DAB(3,3'-diaminobenzidine)反応によって免疫染色された細胞群から特定の転写因子を発現する転写因子発現細胞の様子を評価する転写因子発現細胞の評価方法に関する。

以下の実施形態においては、転写因子としてOct 4を用いた例を例示して説明するが、本発明は、このような特定の実施形態に限定されるものではなく、幅広く適用されるものである。

【0008】

まず、所定の細胞群のうち、Oct 4発現細胞を含むか否かを、特定するのに当たって、まず当該技術分野に公知の方法により取得した細胞を免疫染色し、染色した細胞を顕微鏡を介してコンピュータ可読画像データ(RGBデータ)に変換する。

得られた画像データ(RGBデータ)をソフトウェア例えばAdobe Photoshop(登録商標名)によりCMYKイメージ変換する。DAB免疫染色法により染色した箇所(本実施形態ではOct 4を免疫染色した箇所、すなわち、Oct 4発現細胞は)、通常褐色で表されているので、この画像から青色を減色すると、画像中Oct 4発現細胞だけが黒色要素(K)を含んでいることとなる。

【0009】

このようにして変換した画像は、免疫染色された箇所が黒色要素(K)として数値評価することが可能となる。例えば、全体の細胞群における免疫染色された箇所が面積比として数値評価可能となる。

【0010】

本発明の好ましい実施形態において、このようにしてK値で示された染色細胞(Oct 4発現細胞)の染色の程度を、K値の分布として示すことが可能となる。図示しないが、K値(すなわち、染色濃度)の濃度分布を分布曲線として示すことも可能であるが、例えばOct 4発現の強度を、K値の所定の区画、無し(n)「1000未満」、弱(m)「1000以上、5000未満」、中(m)「5000以上9000未満」、強(s)「9000以上」の四段階評価で示すことができる。本実施形態におけるK値の所定の区画、無し(n)「1000未満」、弱(m)「1000以上、5000未満」、中(m)「5000以上9000未満」、強(s)「9000以上」はあくまでも恣意的に決定したものであるので任意に変更することも可能であり、また3段階評価、5段階評価等の区画数も任意である。

【0011】

このように構成することによって従来数値評価することが不可能であり、特に発現程度とその分布を調べるのが困難であったOct 4発現細胞を評価することが可能となる。

【0012】

また、本発明の別の実施形態によると、異なる転写因子を用いた同一検体をDAB染色することによって、比較評価を行う。例えば、ES、ES様細胞のマーカ(転写因子)には前記のOct 4以外にもDAB転写因子として種々の転写因子が知られている。

【0013】

そして、これらの転写因子は、細胞の状態により発現の様子が異なることも本発明者等の予備実験にて確認されている。

例えば、皮膚癌について本発明者等が調査した所、Oct 4では異常なし(±)、初期(±)、末期(++)であり、P75NTRでは異常なし(±)、初期(+)、末期(++)と、初期癌段階では異なる挙動を示す。また、食道癌、子宮頸癌も同様な挙動を示す。

したがって、両者を比較することによって皮膚癌・食道癌、子宮頸癌等癌の診断を行うことも可能であると考えられる。さらに、癌幹細胞のスクリーニングを行うことも可能と

10

20

30

40

50

なると考えられる。すなわち、同一の細胞群（癌幹細胞を含む細胞群）を異なるマーカ（転写因子）を用いて免疫染色して、本発明の評価方法により評価することによって、癌幹細胞のスクリーニングを行うことが可能となる。

【0014】

次に、具体的には手順を図1に基づいて説明する。

DAB（3,3'-diaminobenzidine）反応によって得られたOct 4蛋白の褐色の画像ファイルを画像処理ソフト、例えばPhotoshopによって開き、「イメージ」メニューから「モード」の「CMYKカラー」を選択する。CMYKはシアン（C）、マゼンタ（M）、黄色（Y）、黒色（K）の色成分で表現される。

【0015】

次いで、画像処理ソフトのスポイトツールを選択してDAB陽性褐色部分（この場合は細胞核内で機能する遺伝子転写因子Oct 4であるため、褐色の染色を示す細胞核）を選択する。

次に、描画色のパレットをクリックしカラーピッカーのウィンドウを開きCMYKのK値（黒色%値）を確認し、さらにDAB陰性細胞核（細胞質及び細胞膜に存在するDABの非特異的発色含む青色が優勢な部分）を選択しカラーピッカーで同様にK値を測定する。

前者が後者よりK値（%）が十分高い%値であることを確認しカラーピッカーのウィンドウを閉じる。この時の前者と後者のK値（%）が大きい場合は非特異的DAB発色の占める割合が高いと判定されるため、より信頼できるK値を得るためには非特異的染色

10

20

【0016】

例えば本標本のK値は前者が58~60%、後者が22~24%となる。「ウインドウ」メニューから「ブラック」のチャンネルを選択クリックし画面を白黒で表現する。「選択範囲」メニューから画像全てを選択し「編集」から「コピー」機能によってクリップボードにコピーする。

【0017】

「ファイル」メニューから「新規」を選択し、モードをグレースケールとする（図1、図面1「これを図1-1とする」、図1-1の下に挿入、例えば図1-2左上図40w Am-40週羊膜基部羊膜上皮層、同様に左下図40w Pri-培養した40收容幕細胞）。OKをクリックする。「編集」メニューから「ペースト」機能によって新規ファイルにDAB発色の画像を移す。「ウインドウ」メニューから「レイヤー」を表示し、背景レイヤーとペースト画像の二つが確認されたら、プルダウンメニューから「画像の統合」を選択し画像を統合する。

30

【0018】

「ファイル」メニューから保存を選択し、ファイルタイプを、例えばTIFF（拡張子.tif）とし保存する。例えば、画像解析ソフトClontech Image Quant（TM）でのOct 4染色値を測定する場合、「色調補正」から「階調の反転」を選択し白黒画像を反転しておく。本解析で例示されるClontech Image Quant（TM）で与えられた個々の細胞核の黒色濃度の測定値はほぼ300~20000までの

40

【0019】

本発明者等は、さらに、このようにして黒色要素Kの強度により、Oct 4発現細胞として表されたOct 4発現細胞を詳細に調査した所、そのK値により、Oct 4発現細胞の挙動が異なることを見出した。すなわち、本発明においては、黒色要素測定値が、無し（n）「1000未満」、弱（m）「1000以上、5000未満」、中（m）「5000以上9000未満」、強（s）「9000以上」の四段階評価で示した場合、無し（n）又は弱（w）の場合、ES細胞又はES様細胞としての挙動をまったくあるいはほとん

50

ど示さず、逆に強 (s) の場合には上皮表層に分布し羊水中へ脱落する傾向にあり、E S 細胞又はE S 様細胞として、未分化ではなくむしろ分化傾向または終末期であった。これに対して中 (m) の場合には上皮基底層側に位置する傾向にあり長期生存に有利であるE S 細胞又はE S 様細胞として、未分化状態の維持という優れた挙動を保証する。したがって、単にO c t 4 陽性細胞の存在のみならず、O c t 4 の発現程度に幅があるO c t 4 陽性細胞集団がE S 又はE S 様細胞の存在を保証する。

本発明の細胞群には、このようなE S 細胞又はE S 様細胞として優れた挙動を示す中程度の強度を有するO c t 4 発現細胞が有意に含まれることが実験的及び解析的に判った。

【 0 0 2 0 】

このように本発明の評価方法は、取得した画像をコンピュータにより一連の処理を行うことが可能である。

10

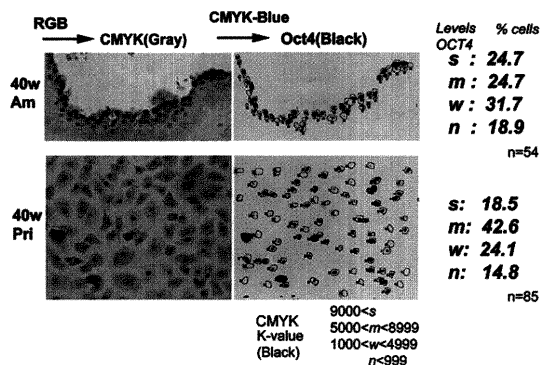
このようにして解析した結果、例えば、前記のO c t 4 発現細胞を含む細胞群の場合には、細胞全体における染色された細胞の割合、無し (n)、弱 (w)、中 (m)、強 (s) の各々の割合をプリントアウトして、サンプリングした細胞群を保存する容器に貼ることによってその細胞の様子を後段の研究、適用に用いることが可能となる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 1 】

【 図 1 】 本発明の評価方法を示す図面である。

【 図 1 】



フロントページの続き

(72)発明者 中村 浩康

神奈川県横浜市神奈川区松見町1 - 3 0 - 4 2

Fターム(参考) 2G045 BB24 CB01 JA01

4B029 AA07 BB01 CC02 CC08 FA01 FA15

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QR90 QS36 QS39 QX01

专利名称(译)	用于评估表达转录因子的细胞的方法和装置		
公开(公告)号	JP2006325567A	公开(公告)日	2006-12-07
申请号	JP2005179833	申请日	2005-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	南 俊基 安本茂		
申请(专利权)人(译)	南 俊基 安本茂		
[标]发明人	安本茂 越後谷 朋子 竹内 誠亮 中村 浩康		
发明人	安本 茂 越後谷 朋子 竹内 誠亮 中村 浩康		
IPC分类号	C12Q1/02 C12M1/34 G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	C12Q1/02 C12M1/34.B G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/JA01 4B029/AA07 4B029/BB01 4B029/CC02 4B029/CC08 4B029/FA01 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QR90 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种数字评估从DAB免疫染色细胞组表达特定转录因子Oct4的表达转录因子的细胞的方法。 解决方案：一种评估表达转录因子的细胞的方法，用于评估表达来自DAB免疫染色细胞组的特定转录因子的转录因子表达的细胞的外观，方法如下：(a)来自包括转录因子表达细胞的细胞组的DAB 通过显微镜将免疫染色的细胞转换为计算机可读图像数据，(b)将所得图像数据通过软件转换为CMYK图像，并从CMYK转换图像中减去蓝色。从以下获得的K值的比率为黑元素测量值，进一步优选地(d)将多个黑元素测量值范围设定为预定的K值，各设定的黑元素测量值范围的比率 然后，评估表达转录因子的细胞的浓度分布。 [选型图]图1

