

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20113007

研究課題名（和文） 細胞内物流システム解明のためのイメージデータを基としたデジタル解析システムの開発

研究課題名（英文） Digital Image Analysis for Intracellular Logistics

研究代表者

牧野内 昭武 (MAKINOCHI AKITAKE)

独立行政法人理化学研究所・研究顧問

研究者番号：80087460

研究成果の概要（和文）：

細胞内の多様な輸送経路の統括的理解を目的に様々なイメージング技術の開発がなされ、撮影した画像情報からの定量解析技術の確立が求められている。本研究では、個人の判断基準によらない解析手法の開発を目的として、細胞内物流システム解析に特化した画像処理アルゴリズムの研究と細胞内物流システムの長時間観察システムの開発を実施した。これらの新規手法を元に、細胞生物学者に優しい画像処理計算ソフトウェアを開発し無償公開を実施した。

研究成果の概要（英文）：

Recent advances in image acquisition technology on intracellular logistics demand new computational methods for quantitative analysis of intracellular images. In this research, we have proposed several new image processing algorithms and a long time-lapse imaging system in order to meet the demand. We have also developed a biologist-friendly software based on the proposed algorithms and made it available on the WWW without compensation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	37,800,000	11,340,000	49,140,000
2009年度	22,800,000	6,840,000	29,640,000
2010年度	22,800,000	6,840,000	29,640,000
2011年度	23,200,000	6,960,000	30,160,000
2012年度	20,500,000	6,150,000	26,650,000
総計	127,100,000	38,130,000	165,230,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・知覚情報処理・知能ロボティクス・生体生命情報学

キーワード：

細胞内画像処理、画像処理統合プラットフォーム、エキスパートシステム、領域抽出、輸送担体追跡、細胞観察システム、近赤外光、アップコンバージョン粒子

1. 研究開始当初の背景

細胞内の各物質輸送経路の統括的解明は、病態の理解に向けて非常に重要であるが、現状の細胞生物学は特定のオルガネラや個々の輸送経路に関しての詳細な研究が主である。また、観察された個々の輸送画像データに対しての解析・解釈は、研究者個人の主観

によるところが大きい。それ故、細胞全域での複合的輸送機構（細胞内物流システム）に対して、個人の判断基準によらない定量的解析手法の研究・開発が急務であり、細胞内の様々な輸送経路の統一的な定量解析による統括的理解こそが、病態の理解を進めるための最重要課題であった。

研究代表者らは、平成11年度より力学・

生体構造の融合の先駆けである生体力学シミュレーション研究及び、平成 13 年度より VCAD システム研究の生物・医療分野への応用を理研にて進めてきた。特に平成 18~19 年度において、コンピュータ内に生きた細胞を再現するライブセルモデリングを理研内競争的資金に基づいて実施し、複数オルガネラの動態を時間毎の立体情報として解析する事に成功した。また、平成 19 年度から本課題採択まで、細胞内のデジタル解析システムの基礎的な計算法の検討・プロトタイプ作成を実施しており本研究に着手する準備を整えていた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内物流システム解明のための観察画像を基とした新しいデジタル解析システムの研究・開発を目的とし、細胞内輸送観察システム構築、細胞内物流システム画像処理計算法とそのソフトウェアの研究・開発を実施した。

3. 研究の方法

本研究では、上記研究目的達成のために下記 3 つの研究項目を主に実施した。

1. 細胞内物流システム解析に特化した画像処理アルゴリズムの研究・開発。
2. 1 を基にした、細胞生物学者に優しい画像処理計算ソフトウェアの研究・開発。
3. 細胞内物流システムの長時間観察システムの開発・運用。

各計画研究が研究対象とするものは、それぞれ全く異なる輸送経路であることから、全対象を網羅的に解析可能であるアルゴリズムの開発は困難である。そこでまずは「輸送」に関連する共通情報の抽象化を実施した。これは、輸送速度や幾何情報、位置の相関など、画像データから数値化できる要素を抽出するアルゴリズムを開発するためである。本研究ではこれらに必要なツールとして、パターン解析・追跡と注目領域の自動抽出アルゴリズムの研究を実施した。工学・情報学分野におけるこれらの関連既存研究と、細胞生物学での関連既存研究は大きく特徴が異なることから、平成 20 年度にはまず後者の関連研究の調査・検討を行なった。また、上記 3 の顕微鏡システムの開発では、基幹部の組み立て及び長時間観察のテスト撮影を実施した。

平成 21 年度は細胞内の小胞やオルガネラの自動抽出システムの開発を引き続き行うと共に、小胞移動を追跡するための画像内の「顕著」部位の認識アルゴリズムを 3 次元空間に拡張を実施した。さらに、開発アルゴリズムや理論公募班による画像解析アルゴ

リズムを取り纏め、生物系研究者が活用できるソフトウェアとするための基盤システムの設計を行った。また、アップコンバージョン共焦点観察システムで可視光レーザーを用いて、細胞内部の 4 次元情報を収集した。

平成 22 年度は自動抽出システムの高度化・検証及び幾何特徴を融合した顕著部位の認識アルゴリズム開発を引き続き実施し、平成 21 年度に設計した基盤プラットフォームの実装・開発を進めた。また、開発したシステム・アルゴリズムの要素技術を順次、基盤プラットフォームへ組み込める仕組みを設計した。また、平成 21 年度までに開発したシングルピンホール型共焦点アップコンバージョン粒子観察システムを用いて、粒子系 100nm 以下の粒子の観察を行うと共に、細胞内への粒子の導入を図った。

平成 23 年度は、Linux Cluster 上で動作する領域抽出システムの開発及び、Saliency と SIFT 特徴を山尾根特徴と融合した新しい画像特徴を開発した。また、輸送担体追跡アルゴリズムの開発を実施した。開発アルゴリズムの一部は、画像処理統合プラットフォームにプラグイン化した。このプラットフォームは、本研究や公募研究による画像解析アルゴリズムを取り纏め、生物系研究者が活用できるソフトウェアとして開発を進めた。

平成 24 年度は、画像処理統合プラットフォームの研究開発を実施した。これまでの研究により研究開発した新しいアルゴリズムを生物学研究者が利用できる事を目的にシステムの開発を行った。主に、3 次元以上の情報をユーザーが容易に操作できるためのユーザーインターフェースの作成や、各種データフォーマットへの対応を実施した。開発システムを使用者や使用環境によらず、より使いやすく、かつ堅牢なソフトウェアとするため、一部コーディングは外注することによりシステムの品質を確保した。具体的には、画像処理統合プラットフォームである VCAT5 の改変と共に、定型作業を繰り返し行う事を目的にマクロ機能の開発を実施した。マクロ機能として、VCAT5 で操作した手順を記録すること、記録した手順をファイルとして出力すること、手順を編集すること、編集した手順を実効制御することの機能を開発した。開発したシステムは、VCAT5 のプラグインとして実装することにより、インターフェースの統一を図った。

4. 研究成果

上記方法に記した三つの課題に対して、本研究を実施したことによる、特筆すべき独創的な成果をそれぞれ下記に示す。

1：細胞内物流システムの解析に特化した画像処理アルゴリズムとして、特にノイズ除去、領域抽出と特徴抽出に関して下記の成果を得た。

観察対象の特徴を保存するノイズ除去法 [b4, c1, b12] の高速計算法を新たに考案し、精度保証付きで、既存方法より非常に高速な計算結果得た [a9, b6]、図 1 参照。

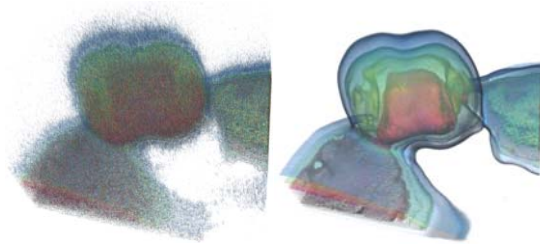


図 1：HeLa 細胞 3 次元画像のノイズ除去。

山尾根谷特徴の幾何学・計算法、両方に対して新しい理論的結果を得た [a1, a19, b5]、さらに、高次元画像に適應する事に成功し [a10, a14]、オートファゴソムの時空間幾何特徴計算を提案した [a12, b10, b17] (図 2)。

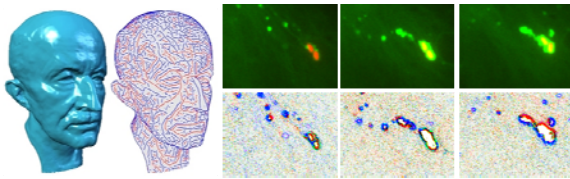


図 2：オートファゴソムの時空間山尾根谷特徴。

幾何学的領域分割を利用して新しい輸送担体追跡アルゴリズムを提案した [b15] (図 3)。

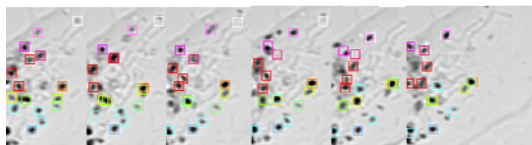
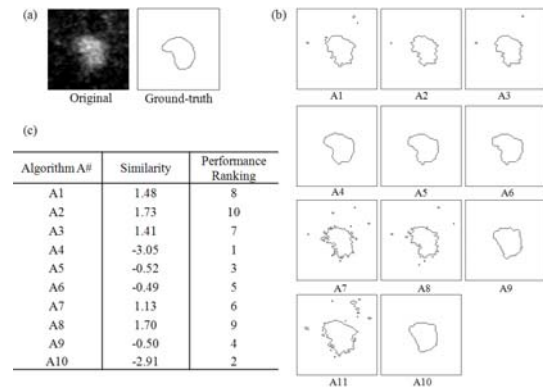


図 3：メラノソームの自動追跡。

また、観察対象によって領域抽出アルゴリズムを自動選択するシステムを開発した。アルゴリズムの選択は、観察者が提示する正解領域と、コンピュータによる自動抽出領域との画像特徴の類似度に基づいて、各アルゴリズムの性能を評価することで実施する。類似度算出には、関連研究の算出式と新たに提案した式を用いて、細胞内観察画像に対する領域抽出アルゴリズム選択の有効性を示した [a4, b13, b14,] (図 4)。システムは複数のアルゴリズムの性能比較を行うことから、計算コストが高くなるが、超並列 PC クラスタ上での動作を可能とすることで計算コストの

問題を解決した [b3]。

図 4：領域抽出アルゴリズムの性能評価



2：細胞生物学者に優しい画像処理計算ソフトウェアとして、画像処理統合プラットフォームの開発に成功した(図 5)。特に、画像処理手順の再現と編集が可能なマクロ機能の統合に加え、生物学者など情報学のアルゴリズムを知らなくても簡単に注目領域の編集・抽出が出来る新しいインターフェースを提案した [a8, a20]。さらに上記 1 で示した画像処理アルゴリズムをプラグインとしてプラットフォームへ統合する事に成功した。画像処理により抽出した細胞内の特定領域に対し、その 3 次元形状の曲率、主方向、体積、表面積、重心位置などの数値情報を算出してデータベースに蓄積するシステムである。これにより、細胞内小器官や輸送担体の位置などの統計情報を容易に導出することが可能となり、開発したアルゴリズムと合わせて、当該新学術領域内外で情報学と生物学の融合研究成果 [a7, a12, a15, a16, a17, a18, b10, b15, b17] を達成した。

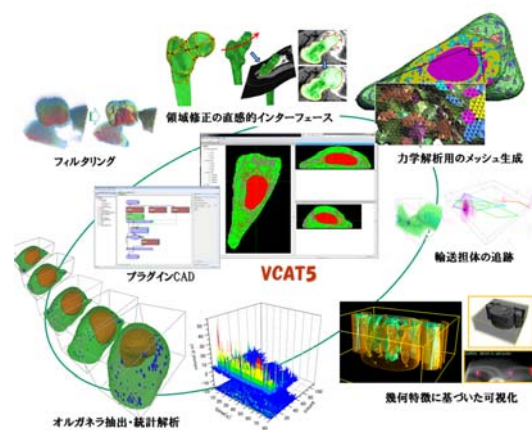


図 5：画像処理プラットフォーム：VCAT5。

3：細胞内物流システムの長時間観察システムを開発し、運用を実施した。希土類含有セラミックスは、近赤外光励起による可視光発光が可能なアップコンバージョン蛍光体

である。この蛍光体を、生細胞内の3次元(空間)および4次元(空間+時間)情報の取得(ライブセルイメージング)に応用することにより、紫外または短波長可視光の励起でなければ得られなかった蛍光を近赤外光の励起で実現することから、細胞への材料ならびに光毒性の低減と深部の高輝度観察が原理的に可能となる。そこで、細胞内の小胞輸送の長時間観察や時空間の高分解能観察が可能となると考え、粒子と観察システムの開発を実施した。希土類含有セラミックスは、細胞内小胞に取り込まれることを目的として粒子径100nmと小径化すると共にPEG修飾し、リポフェクションにて細胞に導入する手法を開発した[b8, c3]。観察システムとして、2光子共焦点レーザー顕微鏡に980nmの近赤外レーザー光を組み込み、粒子により励起される可視光を取得する装置を構築した。

開発したシステムを用いて、細胞内の希土類粒子の4次元動態を48時間に渡る長い時間観察する事に成功し、細胞内の粒子の動態を可視化、解析する事に成功した(図6)。

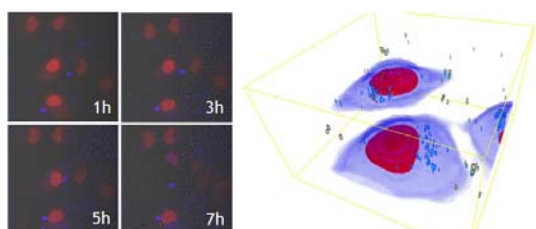


図6：希土類粒子の4次元観察

以上の取り組みにより、本研究において当初設定していた技術的要件を開発する事が出来た。開発したシステムを利用した輸送担体の解析は、本学術領域内の生物研究者と現在も共同研究を進めており、今後の成果が期待できる。

また、本研究は上記に挙げた学術的・技術的成果以外にも、新学術研究領域の確立に向けて様々な活動を実施し、一定の成果を挙げている。特に、「細胞内画像処理」というまったく新しい分野を切り開くべく、国内外での啓蒙活動・研究発表[b1, b2, b7, b13, b14, b16, c2]や研究会・シンポジウムの開催、学会と共催でのアルゴリズムコンテスト実施などである。これにより将来、本研究が細胞内物流システム解析研究の礎になる事が予測される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計108件)

内査読付き論文 71件:

[a1]: Ijiri T, **Yoshizawa S**, Sato Y, Ito M and **Yokota H**. Bilateral Hermite Radial Basis

Functions for Contour-based Volume Segmentation. Computer Graphics Forum, 32(2): 123-132. (2013)

[a2]: **Yoshizawa S**, Belyaev A, and **Yokota H**. Shape and Image Interrogation with Curvature Extremalities. Journal for Geometry and Graphics. 16(1), 81-95. (2012)

[a3]: Hihara S, Pack C.-G, Kaizu K, Tani T, Hanafusa T, Nozaki T, **Takemoto S**, Yoshimi T, **Yokota H**, Imamoto N, Sako Y, Kinjo M, Takahashi K, Nagai T and Maeshima K. Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells. Cell Reports, 2(6), 1645-1656. (2012)

[a4]: Ijiri T, Ashihara T, Umetani N, Igarashi T, Haraguchi R and **Yokota H**. A Kinematic Approach for Efficient and Robust Simulation of the Cardiac Beating Motion. PLoS One. 7(5).(2012)

[a5]: Kominami K, Nagai T, Sawasaki T, Tsujimura Y, Yashima K, Sunaga Y, Tsuchimochi M, Nishimura J, Chiba K, Nakabayashi J, Koyamada K, Endo Y, **Yokota H**, Miyawaki A, Manabe N, and Sakamaki K. In Vivo Imaging of Hierarchical Spatiotemporal Activation of Caspase-8 during Apoptosis. PLoS One. 7(11), e50218:1-18. (2012)

[a6]: Kominami K, Nakabayashi J, Nagai T, Tsujimura Y, Chiba K, Kimura H, Miyawaki A, Sawasaki T, **Yokota H**, Manabe N and Sakamaki K. The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: quantitative experimental validation of a mathematical model. Biochim. Biophys. Acta. 1823(10), 1825-1840. (2012)

[a7]: **Yoshizawa S** and Belyaev A. Conformally Invariant Energies and Minimum Variation Surfaces. Proc. of Geometric Computing and CAD Workshop, Asian Conference on Design and Digital Engineering. 20:1-20:9. (2012)

[a8]: **Takemoto S** and **Yokota H**. Algorithm Selection Based on a Region Similarity Metric for Intracellular Image Segmentation, Image segmentation, Intech. 419-434. (2011)

[a9]: **Yoshizawa S**, **Takemoto S**, Takahashi M, Muroi M, Kazami S, Miyoshi H and **Yokota H**. Interactive Registration of Intracellular Volumes with Radial Basis Functions. International Journal of Computational Intelligence and Applications. 9(3), 207-224. (2010)

[a10]: Maeshima K, Iino H, Hihara S, Funakoshi T, Watanabe A, **Nishimura M**, Nakatomi R, Yahata

K, Imamoto F, Hashikawa T, **Yokota H** and Imamoto N. Nuclear pore formation but not nuclear growth is governed by cyclin-dependent kinases (Cdks) during interphase. Nature

Structural & Molecular Biology. 17, 1065–1071. (2010)

[a11]: Ijiri T and **Yokota H.** Contour-based Interface for Refining Volume Segmentation. Computer Graphics Forum, 29(7), 2153-2160. (2010)

[a12]: **Yoshizawa S,** Belyaev A and **Yokota H.** Fast Gauss Bilateral Filtering. Computer Graphics Forum, 29(1), 60-74. (2010)

[a13]: **Yoshizawa S,** Belyaev A and **Yokota H.** Curvature Extremalities for Intelligent Shape and Image Interrogation. Proc. of International Conference on Geometry and Graphics. 242:1-242:10. (2010)

[a14]: **竹本 智子, 横田 秀夫, 吉森 保, 牧野内 昭武.** Predicting Segmentation Quality for Intracellular Images. ViEW ビジョン技術の実利用ワークショップ, 講演論文集. 336-340. (2010)

[a15]: **吉澤 信, 横田 秀夫, 吉森 保, 牧野内 昭武.** Curvature-based Creases of Spatio-Temporal Intracellular Volumes. ViEW ビジョン技術の実利用ワークショップ講演論文集. 252-256. (2010)

[a16]: **Takemoto S, Yokota H,** Mishima T and Himeno R, Segmentation of Anatomical Structure by Using a Local Classifier Derived from Neighborhood Information. Advances in Soft Computing: Human-Computer Systems Interaction. 60, 171-180. (2009)

[a17]: **Takemoto S** and **Yokota H.** Algorithm Selection for Intracellular Image Segmentation based on Region Similarity. Proc. of International Conference on Intelligent Systems Design and Applications. 1413-1418. (2009)

[a18]: **Yoshizawa S, Takemoto S,** Takahashi M, Muroi M, Kazami S, Miyoshi M and **Yokota H,** Intracellular Volume Registration. Proc. of International Conference on Intelligent Systems Design and Applications. 1407-1412. (2009)

[a19]: **Yoshizawa S,** Belyaev A, **Yokota H,** and Seidel H.-P. Fast, Robust, and Faithful Methods for Detecting Crest Lines on Meshes. Computer Aided Geometric Design. 25(8), 545-560. (2008)

[a20]: **Takemoto S, Yokota H,** Mishima T and Himeno R. Segmentation of Anatomical Structure by Using a Local Classifier Derived from Neighborhood Information. Proc. of IEEE International Conference on Human System Interaction. No. 004472. (2008)

〔学会発表〕(計 171 件)
内招待講演 43 件

[b1]: **H. Yokota.** Towards Advanced Quantitative Biology using Image Processing

Techniques. RIKEN-Taiwan National Science Council Workshop on Biomedical Imaging and Image Processing, 神戸. (2011.11.18)

[b2]: **吉澤 信, 横田 秀夫, 吉森 保, 牧野内 昭武.** 細胞内観察画像の時空間幾何特徴抽出-オートファゴソーム動態の自動定量解析へ向けて-. 第 84 回日本生化学大会, シンポジウム, 京都. (2011.9.21-24)

[b3]: **S. Yoshizawa,** T. Fujiwara, M. Fukuda, and **H. Yokota.** Tracking Melanosomes via Particle Filter with Lloyd Partitioning. International Conference on Systems Biology, poster, Mannheim, Germany. (2011.8.28-9.1)

[b4]: **横田 秀夫, 吉澤 信, 竹本 智子, 西村 将臣, 牧野内 昭武.** 細胞内画像処理のすすめ. ViEW ビジョン技術の実利用ワークショップ. 横浜. (2010.12.9-10)

[b5]: **竹本 智子.** 細胞観察画像の定量解析のための注目点検出アルゴリズムの性能評価. 定量生物学の会第 3 回年会. 東京 (2010.11.26-28)

[b6]: **S. Takemoto, S. Yoshizawa** and **H. Yokota.** A Performance Prediction System for Automatic Intracellular Image Quantization. International Conference on Systems Biology, poster, Edinburgh, UK. (2010.10.10-15)

[b7]: **S. Yoshizawa,** A. Belyaev and **H. Yokota.** Feature-Preserving Filters for Biomedical Image Denoising and Clustering. International Conference on Systems Biology, poster, Edinburgh, UK. (2010.10.10-15)

[b8]: **S. Takemoto** and **H. Yokota.** A Supervised Evaluation System of Intracellular Image Segmentation. Institute of Perception, Action and Behaviour Seminar. Edinburgh University, Edinburgh, UK. (2010.10.13)

[b9]: **S. Yoshizawa,** A. Belyaev and **H. Yokota.** Curvature-based Multidimensional Image Creases. Institute of Perception, Action and Behaviour Seminar. Edinburgh University, Edinburgh, UK. (2010.10.13)

[b10]: **Kohei SOGA.** Application of ceramic phosphors for bio- and medical imaging technologies. SPIE Photonics West 2010. San Francisco, California, USA. (2010.1.23-28)

[b11]: **S. Takemoto** and **H. Yokota.** Parallelized Performance Evaluation of Image Segmentation Algorithm by using the Linux Cluster on RICC. Supercomputing. poster, Oregon, USA, (2009.11.14-20)

[b12]: **S. Yoshizawa,** A. Belyaev and **H. Yokota.** A Novel Approach for Fast and Accurate Bilateral Filtering. CG Lunch Talk. Max-Planck-Institut fuer Informatik, Saarbruecken, Germany. (2009.10.29)

[b13]: **S. Yoshizawa,** A. Belyaev, **H. Yokota** and H.-P. Seidel. On surface ridges and their use for

shape analysis. Institute of Perception, Action and Behaviour Seminar. Edinburgh University, Edinburgh, UK. (2009.10.22)

[b14]: S. Yoshizawa, A. Belyaev and H. Yokota. Fast Bilateral Image and Volume Processing. ERPem: Signal and Image Processing Joint Seminar. Heriot-Watt University, Edinburgh, UK. (2009.10.21)

[b15]: 横田 秀夫, 吉澤 信, 竹本 智子, 西村 将臣, 牧野内 昭武. 生物の定量解析、数値シミュレーションに向けたデジタル解析システムの開発. 日本分子生物学会. 横浜. (2009.12.10-12)

[b16]: S. Yoshizawa and H. Yokota. Volume Processing for Cell Biology. Interactive Media Technology Group Seminar, Durham University, Durham, UK. (2008.10.30)

[b17]: S. Yoshizawa and H. Yokota. Image & Geometry Processing for Cell Biology. ERPem: Signal and Image Processing Joint Seminar, Heriot-Watt University, Edinburgh, UK. (2008.10.29)

[図書] (計6件)

[c1]: 吉澤 信. 高速エッジ保存平滑化フィルタ. Computer Graphics Gems JP 2012 - コンピュータグラフィックス技術の最前線 - ボーンデジタル. Chapter 5, 89-120. (2012)

[c2]: 横田 秀夫. 細胞内画像処理. 実践 医用画像解析ハンドブック, オーム社, 第5章, 483-489. (2012)

[c3]: Soga K. Nanostructured Materials for Biomedical Applications. Transworld Research Network, 223-241. (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計8件)

名称: 画像処理装置、画像処理方法およびプログラム

発明者: 竹本 智子、横田 秀夫

権利者: 独立行政法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 特開 2010-262350

出願年月日: 平成 22 年 11 月 18 日

国内外の別: 国内

名称: 微粒子分散溶液の製造方法、及び L n O X - L n X 3

複合体粒子の製造方法

発明者: 曾我 公平, 小西 智也

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特開 2013-056826

出願年月日: 平成 24 年 10 月 29 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

細胞内ロジスティクスのデジタル解析

<http://www.riken.jp/briect/Logistics/logistics.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野内 昭武 (MAKINOUCHI AKITAKE)

独立行政法人理化学研究所・先端技術基盤部門・部門長

研究者番号: 80087460

(2) 研究分担者

竹本 智子 (TAKEMOTO SATOKO)

独立行政法人理化学研究所・生物情報基盤構築チーム・特別研究員

研究者番号: 00450403

吉澤 信 (YOSHIZAWA SHIN)

独立行政法人理化学研究所・生物情報基盤構築チーム・副チームヘッド

研究者番号: 10455371

西村 将臣 (NISHIMURA MASAOMI)

独立行政法人理化学研究所・生物基盤構築チーム・リサーチアソシエイト

研究者番号: 50392064

横田 秀夫 (YOKOTA HIDEO)

独立行政法人理化学研究所・生物情報基盤構築チーム・チームヘッド

研究者番号: 00261206

曾我 公平 (SOGA KOHEI)

東京理科大学・基礎工学部・教授

研究者番号: 50272399

(3) 連携研究者

なし

以上