

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02397

研究課題名(和文) FRETマウスを用いた生体イメージング

研究課題名(英文) In vivo imaging with FRET mice

研究代表者

松田 道行 (Matsuda, Michiyuki)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10199812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,700,000円

研究成果の概要(和文)：HE染色は組織学的研究では事実上の標準である。そこで、HE染色用の画像を生きた細胞で取得することを目的とし、蛍光タンパク質に基づくマーカー-NuCyMを作成した。さらにNuCyMを発現するトランスジェニックマウスを確立した。このマウスでは細胞分裂が5世代に亘り確認できた。このマウスをERKのFRETバイオセンサーを発現するマウスと交配し、細胞ごとのERK活性を定量した。さらに効率化のために機械学習を用いた細胞分別法を開発した。これらの成果は、HE染色で得られる形態情報と機能情報結びつけるツールとしてのNuCyMの有用性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物学の研究は、培養皿上のクローン化された細胞から、オルガノイド、さらには生体組織へとその中心を移しつつある。今回開発したNuCyMは蓄積された組織学の叡智を最新の分子プローブへと繋ぐツールである。今後の病態解明あるいは創薬研究に役立つツールとなることが期待される。また、機械学習を用いた細胞分別法はさまざまに開発されつつあるが、機械学習を念頭においた組織染色あるいは細胞染色法が必要であり、本研究はその嚆矢としても重要である。

研究成果の概要(英文)：Hematoxylin and eosin (H&E) staining has been the de-facto standard for histological studies. We have developed a genetically encoded fluorescent marker, NuCyM, which is designed to recapitulate H&E staining patterns in vivo. We generated a transgenic mouse line ubiquitously expressing NuCyM. NuCyM evenly marked the plasma membrane, cytoplasm and nucleus in most tissues. In the NuCyM-expressing cells, cell division of a single cell was clearly observed as five basic phases during M phase by three-dimensional imaging. We next crossed NuCyM mice with transgenic mice expressing an ERK biosensor. Using NuCyM, ERK activity in each cell could be extracted from the FRET images. To further accelerate the image analysis, we employed machine learning-based segmentation methods, and thereby automatically quantitated ERK activity in each cell. In conclusion, NuCyM is a versatile cell morphological marker that enables us to grasp histological information as with H&E staining.

研究分野：細胞生物学

キーワード：蛍光プローブ 組織形態マーカー FRETバイオセンサー 機械学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

形態組織学により与えられる組織や細胞の可視的な特徴は、生体内における生理的な現象を理解するうえで重要である。癌組織では、細胞の大きさや形の乱れ、組織の構造異型がみられることが知られており、これらの形態変化から癌の診断が可能である。また、他の様々な病気の診断や炎症の分類にも組織学的変化の情報は大きく寄与している。このような病理学の研究には、古くからヘマトキシリン・エオジン(HE)染色に基づく細胞形態を指標とした細胞同定が用いられ、これにより現在までに多くの病理形態学の知識が蓄積されてきた。また、形態学と分子生物学の融合により、発生時の形態形成に関わる分子や、病的な形態変化を引き起こす分子などが同定されている。

生体イメージングは生体組織や臓器の内部を生きた状態のまま観察し、細胞や分子の動態を解析する研究手法である。近年、多光子顕微鏡や蛍光タンパク質、蛍光プローブなどの、生きた組織や臓器の観察に有用なツールの開発が進み、生体イメージングによりリアルタイムで空間的な生体内の変化を捉えることが可能となった。なかでも、フェルスター(蛍光)共鳴エネルギー移動[Förster (fluorescence) resonance energy transfer (FRFT)]を利用したバイオセンサー(以下、FRET バイオセンサー)を発現する遺伝子改変動物と多光子顕微鏡の組み合わせは、様々な分子活性変化の観察を可能にした。

これら FRET バイオセンサーを発現する遺伝子改変動物は、全身の組織で発現する CAG プロモーターを用いており、細胞種の同定はできない。また、核あるいは細胞質に局在しているため、バイオセンサーの細胞内分布から得られる形態情報のみから細胞腫を同定する事が困難であった。それゆえ、これまで固形組織中の個々の細胞を用いた網羅的な解析は行われてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では、生体イメージングで FRET バイオセンサーと同時に使用できる細胞形態マーカーを開発することを目指した。FRET バイオセンサーの検出に用いる波長と重ならない長波長の2種類の蛍光タンパク質を用いて核、細胞質、および細胞膜の3つの細胞構造を標識することにより、細胞の種類や形態の情報を分子活性の変化と同時に観察することが期待される。さらに、細胞形態の情報をを用いて組織内の個々の細胞を区分し、それらひとつひとつの分子活性変化を解析することを可能とする。加えて、機械学習を用いることで画像データからの形態情報の検出を自動化し、バイアスのかからないデータ解析と作業効率化を図る。これらの情報は、組織における同一細胞群の不均一性の抽出や、個々の細胞の差異を産む原因、少数の特異的な細胞群(幹細胞など)の同定につながるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 細胞形態マーカー(NuCyM)の構築

蛍光タンパク質は mCherry および iRFP を用いた。iRFP に HIV-1 rev タンパク質である核外移行シグナル(NES)(LQLPPLERLTLD)を、mCherry にヒト由来のヒストンタンパク質である H1 を融合させ、mCherry に KRasCAAX をつけた。これらのタンパク質を self-cleaving 2A ペプチドで連結し、iRFP-NES-P2A-H1-mCherry-P2A-mCherry-KRasCAAX を作製した。このプラスミドから発現する組織形態マーカーを NuCyM と命名した。

(2) 培養細胞のイメージング

NuCyM を MDCK 細胞に安定発現させた。培養細胞のイメージングには倒立型顕微鏡 IX83 (Olympus, 東京, 日本) に以下の装備を施したシステムを用いた: 60 倍対物レンズ(Olympus)、冷却型 CCD カメラ DOC-Cam (Olympus)、照明システム Spectra X Light Engine、IX2-ZDC レーザー型自動焦点合わせシステム(Olympus)、および MD-XY30100T-メタ電動 XY ステージ(SIGMA KOKI, 東京, 日本)。以下のフィルターセットを Semrock (Rochester, NY, USA) より購入し、用いた。GLASS ダイクロイックミラー、mCherry 用 575/25、iRFP 用 632/22 励起用フィルター、蛍光フィルター FF01-624/40-25 (mCherry)、FF01-692/40-25 (iRFP) (Rochester, NY, USA)。

(3) 細胞の三次元培養とタイムラプスイメージング

Cyst の形成は、まず培養皿上の MDCK 細胞をトリプシン処理により遊離させ、MEM に懸濁した。細胞数を計測し、10000 細胞を 500 μ l の三次元培養用 MEM [2% matrigel (BD) を含む MEM、組成は同上、フェノールレッド不含] に懸濁した。24 ウェルプレートに 100% の matrigel を塗り広げ、37 $^{\circ}$ C で 30 分間放置して重合させた。このようにして作成したカルチャープレートの上に細胞懸濁液を加え 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。三次元培養用 MEM は二日ごとに交換した。

(4) トランスジェニックマウスの作製

遺伝子改変マウスのためのプラスミドには CAGGS プロモーターを用いた。またメチル化抑制のために CAGGS プロモーターの上流に D4Z4 insulator を、mRNA の安定性を高めるために NuCyM の配列の下流に WPRE 配列を挿入した。遺伝子改変マウスの作製に際しては、BAC-ROSA26 システムを利用した。上記コンストラクトを BAC-ROSA26 領域へ挿入するため

に、ROSA26 領域と相同な組み換え配列をもつシャトルベクターに組み込んだ。NuCyM を含んだシャトルベクターをエレクトロポレーションにより BAC-ROSA26 を保持する SW102 大腸菌に入れ、組み換えを誘導した。NuCyM を含んだ BAC DNA を精製し、マウス受精卵へのインジェクションを行った。

(5) トランスジェニックマウスの観察

マウスは 1.5% のイソフルラン (Abbot Japan) で吸入麻酔下におき、37 °C で維持された顕微鏡電動ステージ上に固定した。脾臓、肝臓、腎臓のイメージングには正立型二光子顕微鏡を用いた。取得した画像の処理と解析は MetaMorph software (Molecular Devices) を用いた。

(6) 機械学習と細胞毎の分子活性の解析

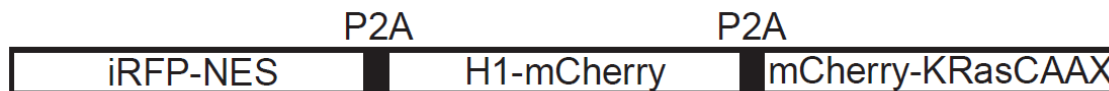
組織内の個々の細胞における分子活性の解析のために機械学習 Deep Convolutional Generative Adversarial Networks (DCGAN) を用いて細胞の自動抽出を行った。DCGAN とは、GAN の発展モデルであり、ほとんど写真と見分けがつかない精度の画像の生成を可能にする。NuCyM 画像の細胞膜のみ、核のみを手動でアノテーションした画像を各 50 枚ずつ異なる画像で作成した。うち 40 枚を教師画像として使用し、正解画像を判断する識別器および画像生成器に入力し、繰り返し学習させることで学習データと見分けがつかない画像生成器を作成した。正解率を検討するために、作製した DCGAN で残り 10 枚の画像を用いてテストを行い、学習データ同様に細胞膜と核を別々に区分した画像を得た。学習させた DCGAN に NuCyM と ROCK の FRET バイオセンサーを共発現するマウスのイメージングにより得た NuCyM 画像を入力し、細胞境界を出力させた。返ってきた細胞膜情報について MetaMorph software (Molecular Devices) を用いて自動で全ての領域を選択することで、画像内の全ての細胞を個々に囲み、これらの領域を CFP および FRET 画像に領域を移した。この全ての領域について CFP と FRET の蛍光強度を求め、ratio (FRET/CFP) 値を求めた。

4. 研究成果

(1) 細胞形態マーカー-NuCyM の作成

生体内において、個々の細胞腫の同定と区分を行うために、マーカー構築を行った。細胞同定は、核・細胞質それぞれにおいて、形状・大きさの情報が必要となる。また、区分のためには細胞膜の位置情報が必要となる。その為、核・細胞質・細胞膜に局在する蛍光蛋白を発現するプラスミドを作製した。核マーカーとして、赤色蛍光蛋白である mCherry に、ヒストン H1 をつけた。細胞質マーカーとして、近赤外蛍光蛋白である iRFP に核外移行シグナル (NES) をつけた。細胞膜マーカーとして、KRasCAAX を融合した mCherry を用いた。さらに、これらを自己切断ペプチド P2A でつないだ。このプラスミドを NuCyM (Nucleus, Cytosol, Membrane) と名付けた。各蛍光蛋白は、FRET バイオセンサーに干渉しない色を選定した。シアン～黄色の蛍光タンパク質を用いた FRET バイオセンサーと併用するため、細胞形態マーカーには mCherry と iRFP 蛍光タンパク質を用いた。より明瞭に細胞構造 (核・細胞質・細胞膜) を区別するには、P2A の高い切断効率が重要となる。

NuCyM が細胞内で機能するか確認するために、HeLa 細胞に発現させて観察した。その結果、mCherry により核と細胞膜が、iRFP により細胞質が標識された画像を得た。mCherry と iRFP の画像を、疑似カラーを用いて重ね合わせると、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で得られるような細胞形態の情報を得た。これらの結果から、作成した NuCyM は細胞形態の識別を可能にすると結論づけた。



細胞形態マーカー NuCyM の構造： iRFP に核外移行シグナル(NES)、mCherry にヒストン H1 の核内移行シグナル、mCherry に細胞膜局在シグナルをそれぞれ不可したものを self-cleavage peptide P2A で繋いだ。

(2) NuCyM による三次元での細胞同定や M 期細胞の同定

次に、三次元培養細胞で NuCyM が利用できるかを検証した。一般的に、培養細胞の形態は透過光で観察可能であるが、三次元イメージングでは透過光による観察は難しい。そこで、NuCyM による細胞形態情報を三次元培養系に応用するため、イヌ腎臓上皮 (MDCK) 細胞の cyst を用いて、二光子顕微鏡による三次元イメージングを行った。その結果、立体構造をもつ cyst の断面で、二次元透過光で得られるような細胞形態情報を含む画像が得られた。さらに、

細胞形態が変化する箇所での分子活性を調べるために、ROCK バイオセンサーと NuCyM を恒常的に共発現する MDCK 細胞で cyst を形成し、同様に三次元イメージングを行った。断面での解析の結果、NuCyM の画像において染色体の凝集と分離、細胞質分裂が確認され、分裂中の細胞であると判断できた。FRET/CFP 比の画像においては、細胞分裂において、中期から、終期において、ROCK 活性の上昇が確認された。このように、NuCyM は三次元においても、形態変化を可視化するツールになると示された。

(3) NuCyM マウスを用いた個々の細胞同定

NuCyM が三次元イメージングで細胞形態情報を提供できることがわかったので、マウス生体内においても細胞同定が可能か検証した。生体組織では数種類の細胞が混在しており、それぞれ異なる働きをもつ。既存の FRET バイオセンサー発現マウスでは細胞種の識別が困難であり、個々の細胞における分子活性変化の観測は難しい。そこで私は NuCyM をユビキタスに発現するマウスの作成を試みた。トランスジェニックマウス作成にあたり、DNA メチル化による外因性蛍光タンパク質の発現不活化を回避するために、メチル化を抑制する D4Z4 insulator 配列、および mRNA の安定性を高める WPRE 配列の挿入を行った。更に、全身性に均一に発現させるため、これらの遺伝子配列を、ROSA26 領域を含むバクテリア人工染色体 (BAC, bacterial artificial chromosome) へ挿入し、トランスジェニックマウスを作成した。NuCyM マウスが生体内で組織の同定を可能にするかを確かめるため、二光子顕微鏡を用いて NuCyM マウスの膵臓のライブイメージングを行った。その結果、膵臓のすべての細胞で核および細胞膜が確認され、一つ一つの細胞が周りの腺房細胞より小さく、核の密度が高いという細胞形態からランゲルハンス島が同定された。続いて、NuCyM マウスから得た情報が、個々の細胞における分子活性の解析を可能にするか検証した。ERK バイオセンサーを発現する Eisuke マウスの交配を行い、NuCyM と共発現するマウスを得た。共発現するマウスを用いて肝臓のイメージングを行った結果、細胞膜の位置情報より個々の肝細胞は区分された。一方、バイオセンサーの YFP 画像では肝細胞を個別に識別することは困難であった。また、NuCyM 画像の細胞膜の領域を ratio 画像に移すことにより、様々な活性をもつ細胞を正確に抽出した。大腿動脈のイメージングでは、最も管腔側にある血管内皮細胞の層が NuCyM の核により識別できるため、その外側に存在する血管平滑筋細胞の層と区分される。以上のことから、NuCyM マウスは細胞形態により生体組織の個々の細胞同定を可能にすることが示された。

(4) 機械学習を用いた四次元での細胞内分子活性と形態変化の網羅的解析

最後に、より多くの細胞を用いて、個々の細胞における分子活性を解析するため、細胞の自動抽出を試みた。生体においては FACS を用いて、個々の血球から情報を得る事が可能であるが、固形組織では未だ報告が無い。そこで本研究では、NuCyM の細胞形態情報を利用して、個々の細胞における分子活性の変化を網羅的に解析する事を試みた。個々の細胞を区分するため、画像処理のみで膜情報の二値化を試みたが不十分であった。これはノイズによる膜情報の不連続性に依存しており、手動で膜情報を補完する必要が考えられた。この問題を自動化するために、NuCyM の核と細胞膜を手動で標識した教師画像を用いて、機械学習を行った。その結果、ほぼ全ての細胞を区分することが可能となり、機械学習の有用性が示された。また、同一組織内の細胞毎の分子活性のばらつきを解析するため、ROCK バイオセンサーと NuCyM を共発現するマウスを用いて ROCK 阻害剤 fasudil 添加前後における生体イメージングを行った。機械学習を用いて個々の細胞を抽出し、分子活性を解析した。fasudil 添加前に比べ、添加後に全体的に FRET ratio が減少したが、添加前と同等の ratio 値を示す細胞が存在することもまた確認された。これらのことは、NuCyM 画像への機械学習の適用により組織内の個々の細胞の活性の特徴を捉えることが可能になったことを示す。

【結語】 本研究にて FRET バイオセンサーと同時に使用可能な、核・細胞質・細胞膜を標識する細胞形態マーカー NuCyM を作製した。また、NuCyM と FRET バイオセンサーを共発現するマウスの生体イメージング画像へ機械学習を適用することで、個々の分子活性情報をもつ細胞の抽出を行い、細胞ごとの分子活性の解析を網羅的に行った。本研究における最も重要な技術的発展は、細胞形態を可視化するマーカーの作製であり、これを用いることで生体イメージングにおいて分子活性とともに細胞形態の可視化が可能になったことである。これにより、(1) 三次元イメージングにおいて細胞内分子活性の変化が起きる箇所でのどのような形態変化のイベントが生じているかを紐付けすることや、(2) 細胞形態から生体組織や細胞種を同定すること、(3) 組織内における細胞毎の分子活性の時空間的変化の解析が可能となった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Sano, T., Kobayashi, T., Ogawa, O. & Matsuda, M. Gliding Basal Cell Migration of the Urothelium during Wound Healing. *Am. J. Pathol.* 188, 2564-2573, (2018). doi:10.1016/j.ajpath.2018.07.010

Imanishi, A., Murata, T., Sato, M., Hotta, K., Imayoshi, I., Matsuda, M. & Terai, K. A novel morphological marker for the analysis of molecular activities at the single-cell level. Cell Struct. Funct. 43, 129-140, (2018). doi:10.1247/csf.18013

Muta, Y., Fujita, Y., Sumiyama, K., Sakurai, A., Taketo, M. M., Chiba, T., Seno, H., Aoki, K., Matsuda, M. & Imajo, M. Composite regulation of ERK activity dynamics underlying tumour-specific traits in the intestine. Nat Commun 9, 2174, (2018). doi:10.1038/s41467-018-04527-8

Maryu, G., Matsuda, M. & Aoki, K. Multiplexed Fluorescence Imaging of ERK and Akt Activities and Cell-cycle Progression. Cell Struct. Funct. 41, 81-92, (2016). doi:10.1247/csf.16007

Hiratsuka, T., Sano, T., Kato, H., Komatsu, N., Imajo, M., Kamioka, Y., Sumiyama, K., Banno, F., Miyata, T. & Matsuda, M. Live imaging of extracellular signal-regulated kinase and protein kinase A activities during thrombus formation in mice expressing biosensors based on Förster resonance energy transfer. J Thromb Haemost 15, 1487-1499, (2017). doi:10.1111/jth.13723

Kawabata, N. & Matsuda, M. Cell density-dependent increase in tyrosine-monophosphorylated ERK2 in MDCK cells expressing active Ras or Raf. PLoS One 11, e0167940, (2016). doi:10.1371/journal.pone.0167940

〔学会発表〕(計 10 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fret.lif.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 上岡裕治

ローマ字氏名： (KAMIOKA, Yuji)

所属研究機関名： 京都大学

部局名： 大学院医学研究科

職名： 助教

研究者番号(8桁)： 50511424

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 平塚 拓也

ローマ字氏名： (HIRATSUKA, Takuya)

研究協力者氏名： 青木 一洋

ローマ字氏名： (AOKI, Kazuhiro)

研究協力者氏名： 今城 正道

ローマ字氏名： (IMAJO, Masamichi)

研究協力者氏名： 小松 直貴

ローマ字氏名： (KOMATSU, Naoki)

研究協力者氏名： 隅山 健太

ローマ字氏名： (SUMIYAMA, Kenta)

研究協力者氏名： 築地 真也

ローマ字氏名： (TSUKIJI, Shinya)

研究協力者氏名： 今吉 格

ローマ字氏名： (IMAYOSHI, Itaru)

研究協力者氏名： 寺井 健太

ローマ字氏名： (TERAI, Kenta)

研究協力者氏名： 堀田 一弘

ローマ字氏名： (HOTTA, Kazuhiro)

研究協力者氏名： 村田 智和

ローマ字氏名： (MURATA, Tomokazu)

研究協力者氏名： 佐藤 雅也

ローマ字氏名： (SATO, Masaya)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。