

令和元年6月21日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00403

研究課題名（和文）バイオイメージングデータの時空間解析のための情報処理技術の開発

研究課題名（英文）Development of spatio-temporal analysis method for bioimaging data

研究代表者

瀬尾 茂人（Seno, Shigeto）

大阪大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：30432462

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：近年、機器制御の自動化やイメージング技術の発展などの要因により、培養細胞や生体環境のライブイメージングが可能となっている。本研究では、様々な条件下で経時観察されたバイオイメージングデータを入力とし、細胞の自動追跡というニーズが発生した際に、それに潜在的に付随する一連の時空間解析までをフレームワークとして提案することを試みた。このフレームワークは「細胞の位置の追跡と状態推定によるデータの構造化の方法」と「構造化されたデータの時空間解析の方法」からなるもので、細胞動態の時空間的な差異を可視化し、定量的に比較して有意差の検定を行い、また差異の要因を推定するための方法論を提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞の認識・細胞の追跡・細胞のパターンの時空間解析の要素技術を開発し、これらをつなぎ合わせた解析を試みた。特に、ケーススタディとして、細胞周期を可視化した細胞動画の時空間解析や、2種類の細胞が生成する空間的パターンの解析などを行った。これらの方法論は、生命科学への貢献の他、画像取得から解析までを自動化するハイコンテンツスクリーニングなど、医療や創薬への応用も期待できると考える。

研究成果の概要（英文）：In recent years, live imaging of cultured cells and living environments has become possible due to the development of imaging technology. In this study, we attempted to propose a framework for automatic cell tracking, which is potentially accompanied by a series of spatiotemporal analyses, for bioimaging data observed over time under various conditions. The framework consists of a method for tracking the location of cells and estimating their states, and a method for spatiotemporal analysis.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：バイオイメージインフォマティクス

## 1. 研究開始当初の背景

バイオイメージングとは細胞・組織または個体レベルでタンパク質などの分布・局在を捉え、その動態を画像として解析する技術のことであり、高解像度の顕微鏡等の光学技術や蛍光タンパクやゲノム組み換え等の遺伝子工学的技術の進展に伴い、医学・生物学研究を進めるうえで主要な要素技術となりつつある。さらに顕微鏡をコンピュータによって制御し一定時間ごとに撮影することで長時間の変化を観察するタイムラプス撮影は、それを複数の視野で並行して行うことも可能となっている。一方で、ハイスループット化によるデータの量的な増大と取得される情報の質の多様化や複雑化は、人力による定量的な解析を困難にしており、情報処理技術による生物画像の自動処理とデータ解析の方法論の開発が期待されている。

## 2. 研究の目的

生命現象を可視化するバイオイメージングの方法と目的は多種多様で、その後の情報解析も臨機応変に行われるべきである。全ての場合において細胞を追跡する必要があるわけでもない。ただし、経時観察したデータから個々の細胞の自動追跡を行いたいというニーズが多く存在することも事実であり、そしてその場合、追跡結果を元に行われようとするのは、すなわち細胞の状態とその変化の履歴を解析することに他ならない。そこで本研究では、バイオイメージングデータの時空間解析のための基盤となる方法の開発を行う。

本研究で開発するフレームワークは、生命科学への貢献の他、例えば人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いたハイコンテンツスクリーニング (HCS; High Content Screening) への利用など、医療や創薬への応用も期待できる。HCS は、細胞や組織を対象として、外観の変化に加えて遺伝子の発現やタンパク質の局在等を含む大量の情報を、様々な実験条件で高並列かつ長時間の動画として取得する技術である。薬剤に対する応答などをハイスループットかつ定量的・客観的に評価可能とし、さらにゲノム情報などと組み合わせれば、感受性の原因となる SNP を特定するといった利用方法にも発展できると考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、経時観測されたバイオイメージングの動画像を入力とし、細胞の位置の追跡と状態推定、その結果を用いた時空間解析を行う方法を開発した。

### 1. 細胞の認識

様々な解析を行う際に、最も基本的かつ重要な処理は細胞の認識である。本研究では、進展の著しい畳み込みニューラルネットワークを用いた方法を用いて、比較的少数のデータから精度よく学習を行う方法を開発した。

### 2. 細胞の追跡

時空間解析を行う際には細胞の追跡が必要となる。本研究では、細胞領域を検出したのちその移動の軌跡を最適化によって追跡するデータアソシエーション、細胞を明示的に検出するのではなく仮説の総体によって追跡を行う粒子フィルタ、畳み込みニューラルネットワークによって検出と追跡を行う方法を開発した。

### 3. 時空間解析

観察されたバイオイメージングデータに対して、どのような解析を行うのが妥当であるかは、観察対象となる細胞の性質や目的に依存する。本研究では、ケーススタディとして、細胞周期を可視化した細胞動画像の時空間解析や、2種類の細胞が生成する空間的パターンの解析方法などを開発した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞の認識

物体の認識を行うための方法として、畳み込みニューラルネットワーク (Convolutional Neural Network, CNN) が著しい進歩を遂げている。本研究でも CNN を利用して細胞の認識を行う方法を開発した。バイオイメージングの方法と目的は多種多様であるが、特に基礎研究においては、CNN の学習に十分なだけの教師付きデータを用意することが難しい。この問題に対処するため、新しいデータ拡張の方法を提案した。従来のデータ拡張は回転や反転、歪曲などの幾何学的な変換を用いるが、これに加えて画像類推の方法を利用することで、少ないデータからの学習効率を高め、推定精度が向上することを示した。この方法を脂肪細胞画像に対して適用し、細胞の大きさの定量的な評価を行った (論文、学会発表)。

また、上述の通り CNN によって細胞画像処理を行うためには大量のデータが必要であるが、これらは一般に十分なデータ量を確保することが難しい。そこで、乳がんの病理画像を対象としてリンパ節転移の認識を行う国際コンペティション (CAMELYON16) に参加し、様々な知見を得た (論文)。

### (2) 細胞の追跡

細胞の追跡方法については、主に3つの方法を開発した。

まずは、グローバルデータアソシエーションを用いた細胞追跡手法の改良である。この手法

では、検出細胞から信頼性の高い細胞移動の軌跡であるトラックレットを生成し、最適化をすることにより全体の移動軌跡を得る。この方法における細胞間の対応付けの信頼度は、一律に距離が近いほど高くなるよう定められることが多い。しかし、免疫系の細胞など、活発に移動する細胞とそうでない細胞が混在している場合には、細胞の軌跡の取り違えが生じやすくなる。そこで本研究では、細胞の移動傾向を取り入れたトラッキング方法を開発した。これは、従来のグローバルデータアソシエーションに加えて、細胞の移動傾向を推定しながらトラックレットを結合する尤度を修正する機構を実装したものである（学会発表）。

また、粒子フィルタを用いて細胞の追跡と細胞の状態の推定を行う方法を開発した。粒子フィルタによる物体追跡は、多数の仮説によって位置の推定とリサンプリングを繰り返しながら、その総体として物体の追跡を行うものである。本研究では蛍光顕微鏡で撮影された細胞動画像のための粒子フィルタに基づく細胞追跡方法の開発し、特に細胞周期を可視化する FUCCI プロローブを導入した事例への適用を行った。「細胞の位置」と「細胞周期の状態」をそれぞれ状態空間モデルとしてモデル化し、それぞれを相互依存的にパーティクルフィルタで推定することにより追跡精度の向上を実現した。この方法による追跡結果をもとに、さらに薬剤の投与によって癌細胞の細胞周期がどのように変化するかを定量的に評価するため、イベントヒストリ解析を多状態に拡張した方法を利用した（学会発表）。

最後に、CNN を利用した細胞追跡の方法を開発した。細胞動画像の特徴は、対象とする細胞の性質や利用する技術・機器によって異なるため、追跡のためのアルゴリズムや特徴量を個別に設計する必要がある。この問題に対して、追跡対象の物体の特徴を随時学習しながら追跡を行う教師あり学習による手法が提案されており、例えば、畳み込みニューラルネットワークと強化学習を組み合わせて物体追跡を行う方法などが提案されている。本研究では、転移学習によって一般物体追跡で学習したネットワークを蛍光生体イメージングで得られた動画像での細胞追跡に応用し、加えて 3 次元の細胞動画像の深度の情報を疑似的な深度マップとして入力に用いることで、細胞の追跡精度が向上することを示した（学会発表）。

( 3 )

・ Cell Mixture Index ( 論文 、 学会発表 )

従来、共焦点顕微鏡などにより、時間の経過とともに形態が変化していく細胞を観察したり、細胞の形態変化を定量的に観察したりすることが行われてきた。しかしながら、形態変化を観察することはできるものの、2 種類以上の細胞が形成するパターンの変化を定量的に評価することは難しい。本研究では、破骨細胞と骨芽細胞の織り成すパターンを定量的に評価するためのアルゴリズムを開発し、生体内部のライブイメージングによって、2 種類以上の細胞からなる集団を観察した結果に適用することで、細胞集団のパターンの変化から薬効の評価や病態の変化の検出を試みた。本手法は、まず二値化を行って細胞領域を抽出し、その後階層型クラスタリングを行った木構造に対して GINI 係数を利用して細胞の混在度を評価するための尺度を計算するものである。破骨細胞と骨芽細胞はそれぞれ骨を壊す機能と作る機能を持っており、そのバランスが骨代謝の恒常性の維持に重要である。本研究による細胞間のパターンの定量化は、薬剤候補のスクリーニングや病態の詳細な解明に貢献するものと考えられる（論文）。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 16 件 )

主要なもの 5 件

Kenichiro Takeda, Honami Sawazaki, Haruya Takahashi, YuSheng Yeh, HueiFen Jheng, Wataru Nomura, Takeshi Ara, Nobuyuki Takahashi, Shigeto Seno, Naoki Osato, Hideo Matsuda, Teruo Kawada, Tsuyoshi Goto, “ The dipeptidyl peptidase 4 (DPP 4) inhibitor teneligliptin enhances brown adipose tissue function, thereby preventing obesity in mice ”, FEBS openbio, 8(11), 1782-1793, doi: 10.1002/2211-5463.12498 (2018.7). 査読有.

Ji-Yeong An, Huei-Fen Jheng, Hiroyuki Nagai, Kohei Sanada, Haruya Takahashi, Mari Iwase, Natsumi Watanabe, Young-Il Kim, Aki Teraminami, Nobuyuki Takahashi, Rieko Nakata, Hiroyasu Inoue, Shigeto Seno, Hideo Mastuda, Teruo Kawada, Tsuyoshi Goto A Phytol-Enriched Diet Activates PPAR in the Liver and Brown Adipose Tissue to Ameliorate Obesity-Induced Metabolic Abnormalities, Molecular Nutrition & Food Research, 62(6), e1700688, doi: 10.1002/mnfr.201700688 (2018.1). 査読有.

Masayuki Furuya, Junichi Kikuta, Sayumi Fujimori, Shigeto Seno, Hiroki Maeda, Mai Shirazaki, Maki Uenaka, Hiroki Mizuno, Yoriko Iwamoto, Akito Morimoto, Kunihiko Hashimoto, Takeshi Ito, Yukihiro Isogai, Masafumi Kashii, Takashi Kaito, Shinsuke Ohba, Ung-il Chung, Alexander C. Lichtler, Kazuya Kikuchi, Hideo Matsuda, Hideki Yoshikawa, Masaru Ishii, “ Direct cell-cell contact between mature osteoblasts and osteoclasts dynamically controls their functions in vivo ”. Nature Communications, 9(1), 300, doi: 10.1038/s41467-017-02541-w (2018.1). 査読有.

Babak Ehteshami Bejnordi, Mitko Veta, Paul Johannes van Diest, Bram van Ginneken, Nico Karssemeijer, Geert Litjens, Jeroen A. W. M. van der Laak, and the CAMELYON16 Consortium

(Shigeto Seno(49 番目, 総 61)), "Diagnostic Assessment of Deep Learning Algorithms for Detection of Lymph Node Metastases in Women With Breast Cancer". JAMA, 318(22), 2199-2210, doi: 10.1001/jama.2017.14585 (2017.12). 査読有.

Haruya Takahashi, Kohei Sanada, Hiroyuki Nagai, Yongjia Li, Yumeko Aoki, Takeshi Ara, Shigeto Seno, Hideo Matsuda, Rina Yu, Teruo Kawada, Tsuyoshi Goto, "Over-expression of PPAR in obese mice adipose tissue improves insulin sensitivity." Biochemical and Biophysical Research Communications, 493(1), 108-114, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.067 (2017.9). 査読有.

〔学会発表〕(計 32 件)

主要なもの 11 件

嶋田彩人, 瀬尾茂人, 繁田浩功, 間下以大, 内田穰, 石井優, 松田秀雄, 生体蛍光観察動画像の深度を考慮した深層学習による細胞追跡精度の改善, 第 122 回数理解モデル化と問題解決研究発表会 (2019.3).

瀬尾茂人, バイオインフォマティクスと機械学習, 阪大 AI Meet UP (2019.2).

赤沢秀樹, 渡邊誓旅, 繁田浩功, 間下以大, 瀬尾茂人, 松田秀雄, 細胞画像のセグメンテーション精度向上のための画像類推を用いた学習データ拡張, 画像の認識・理解シンポジウム (MIRU2018), PS2-22 (2018.8).

瀬尾茂人, 渡邊誓旅, 後藤剛, 竹中要一, 河田照雄, 松田秀雄, ディープラーニングを用いた脂肪組織画像における細胞の計数, 第 22 回アディポサイエンス・シンポジウム (2017.8)

Shigeto Seno, Masayuki Furuya, Junichi Kikuta, Masaru Ishii, Hideo Matsuda, "A method of bioimage analysis for spatial pattern of cellular interaction and intercalation", The 25th conference on Intelligent Systems for Molecular Biology and the 16th European Conference on Computation Biology (ISMB/ECCB 2017), Session B-385, Prague, Czech Republic (2017.7).

伊藤澄美, 瀬尾茂人, 繁田浩功, 菊田順一, 竹中要一, 石井優, 松田秀雄, 細胞個体の移動傾向の違いを考慮したグローバルデータアソシエーションを用いた細胞追跡手法, 第 112 回数理解モデル化と問題解決研究発表会 (2017.3).

数崎隼人, 瀬尾茂人, 竹中要一, 後藤剛, 河田照雄, 松田秀雄, 畳み込みニューラルネットワークを用いた脂肪細胞セグメンテーションにおける分割精度改善手法の提案, 第 112 回数理解モデル化と問題解決研究発表会 (2017.3).

瀬尾茂人, 間下以大, 繁田浩功, 菊田順一, 竹中要一, 石井優, 松田秀雄, 粒子フィルタを用いた細胞核の追跡, 外観検査アルゴリズムコンテスト 2016, AL06 (2016.12).

瀬尾茂人, バイオサイエンスのための生体医用画像, 生体医用画像研究会第 3 回若手の会 (2016.3).

Masayuki Furuya, Junichi Kikuta, Hiroki Mizuno, Shigeto Seno, Hiroki Maeda, Kazuya Kikuchi, Hideo Matsuda, Hideki Yoshikawa, Masaru Ishii, "Intravital imaging of coupling between osteoblasts and osteoclasts by using multiphoton Microscopy", American Society for Bone and Mineral Research: ASBMR, Seattle, USA, FR0182, (2015.9).

瀬尾茂人, 間下以大, 竹中要一, 石井優, 松田秀雄, "抗がん剤の薬効評価のための経時観察蛍光画像からのデータマイニング", バイオイメージインフォマティクス・ワークショップ 2015 (2015.6).

〔図書〕(計 1 件)

Shigeto Seno, Quantitative Data Analysis for Live Imaging of Bone. Clin Calcium 28 (2), 193-200. (2018.1).

## 6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

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。