

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14522

研究課題名(和文)形態形成の全自動数値解析法の開発と神経細胞のキラル構造形成とらせん運動への適用

研究課題名(英文)Development of automated numerical methods for analysis of morphogenesis and their application to chiral structure and motion

研究代表者

玉田 篤史(Tamada, Atsushi)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60270576

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):形態形成機構を研究するには、細胞の形態と運動を正確に定量する手法が必要である。本研究では、細胞の3Dタイムラプスイメージング画像から細胞の立体構造および直線・回転運動を全自動で数値化して定量的に解析する手法の開発を目的とした。その成果として、1)リース変換微分干渉顕微鏡法による3Dライブセルイメージング法、2)構造テンソルを用いた3D形態の自動解析法、3)オプティカルフローを用いた3D形態変化の自動解析法の3つの技術を開発した。これらを神経細胞および細胞性粘菌に適用し、神経成長円錐・神経突起・細胞性粘菌の3Dキラル構造と4Dらせん運動を計測・解析することに成功し、論文に発表した。

研究成果の概要(英文):For investigating the mechanism of morphogenesis, it is necessary to quantitatively analyze the structure and motion of the cells. Here, in this study, we developed automated methods for imaging and analyzing of 3D structure and 4D motion of the cells. We developed three fundamental techniques including 1) Riesz transform-differential interference contrast microscopy for label-free 4D live imaging, 2) automated analysis of 3D cellular structure by the structure tensor and 3) automated analysis of 4D morphological changes by the multi-scale optical flow. By applying these techniques to neurons and cellular slime mold, we demonstrated that neuronal growth cones, growing neurites and migrating cellular slime mold show 3D chiral morphology and 4D spiral motion.

研究分野：神経科学

キーワード：成長円錐 神経突起 キラリティ 左右非対称性 リース変換 微分干渉顕微鏡 構造テンソル オプティカルフロー

1. 研究開始当初の背景

発生過程における形態形成のメカニズムを研究する際には、細胞の形態とその時間的変化を観察・可視化して定量的に解析する作業が必要不可欠である。これまで、定量化と言えば、注目する構造(の変化)を的確に評価できる少数の指標(細胞の重心位置、大きさ、細胞から伸びる突起の長さなど)を予め選び、それらをマニュアル作業で計測する、という手法が一般的であった。近年、様々な画像解析ソフトウェアが開発されたことで、マニュアル作業の一部は自動化されているが、まず画像をセグメンテーションして物体を簡単な指標に変換してそれを解析していくという基本方式に変わりはない。この方法では、見たいところだけを見て他の情報は捨ててしまうので部分的で恣意的な解析になりがちであり、解析したい対象が変わるたびに指標を選びなおす必要があり汎用性を持たせることができない。顕微鏡イメージング技術とコンピューター性能の向上に伴い、構造に関する膨大な画像情報を研究者が容易に入手できるようになったが、画像の定量・解析方法は依然として従来のものであり、大規模データを有効に活用できていないのが現状である。申請者も、神経突起先端にある構造体である成長円錐のフィロポディアが右ねじ回転することで軸索が右旋回することを示す際に、神経突起やフィロポディアを1つ1つ手でトラッキングして回転運動を数値化するという解析手法を用いたが(Tamada et al., J. Cell Biol., 188, 429, 2010, 図1)、この方法では最新機器で得られる膨大な高次元(空間3次元+時間)データに対応できないという問題を抱えていた。そこで、大規模データに対応可能な新たな構造(変化)の解析手法を模索する必要に迫られていた。

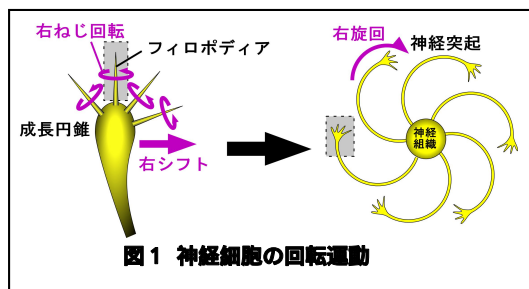


図1 神経細胞の回転運動

2. 研究の目的

以上の背景を基にして、本研究では、細胞の3次元タイムラプスイメージング画像から細胞の立体構造および直線・回転運動を全て漏らさずに全自動で数値化して定量的に解析する方法を開発することを目的とする。また、開発した手法を申請者の研究テーマに適用し、神経突起のキラルな右旋回運動パターンと成長円錐フィロポディアのらせん回転運動を完全に計測・解析することを目的とする。さらに開発した手法と解析プログラム

(MATLAB コード、IMAGEJ のプラグイン等)を一般に公開し、大規模多次元画像データから細胞の立体形態およびその形態変化を解析する方法論を提案し、関連研究分野の発展に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、まず3Dイメージング技術の開発を行った。細胞のライブイメージングには蛍光顕微鏡を使用するのが一般的であるが、この方法で高頻度3D撮影すると、通常生細胞では、励起光に起因する光毒性により構造が簡単に壊れてしまう。一方、古くからよく使われている微分干渉顕微鏡(注3)を使用すれば、無染色・低毒性で高解像度撮影が可能であるが、陰影の付いた画像しか得られず、そのままでは3D可視化・解析に使えない。そこで、リース変換と呼ばれる数学的操作を施すことで、微分干渉像に含まれる陰影付きの位相情報を輝度情報に変換する方法を考案し、「リース変換微分干渉顕微鏡法(RT-DIC)」と名付けた(図2)。本手法を使うことで、蛍光像とほぼ等価な、明るく光る輝度画像を得て、脆弱な細胞をライブで3D可視化することに成功した。

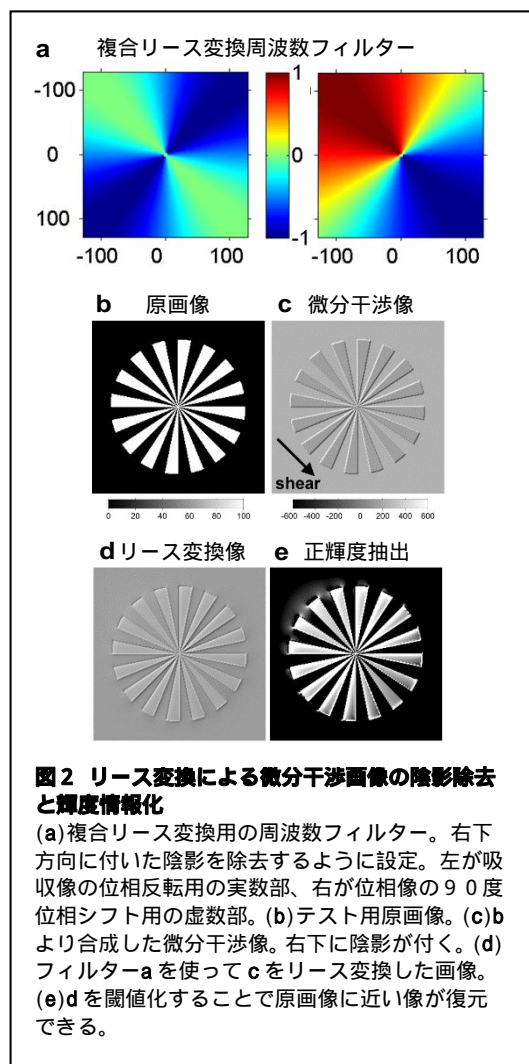
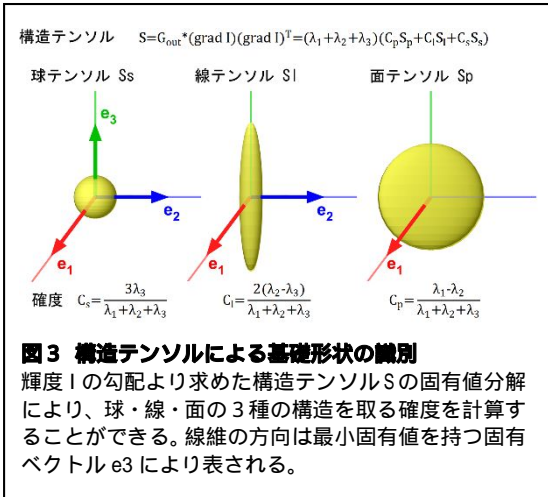


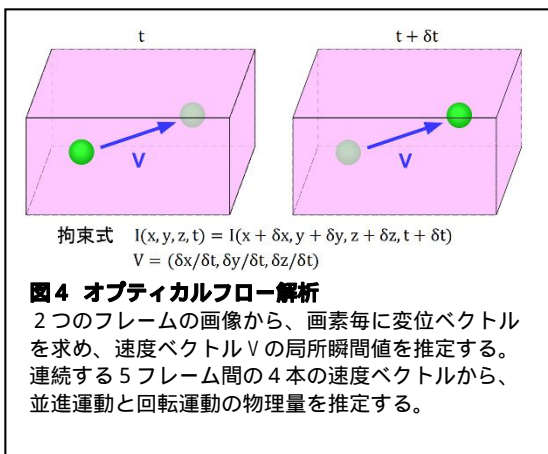
図2 リース変換による微分干渉画像の陰影除去と輝度情報化

(a)複合リース変換用の周波数フィルター。右下方向に付いた陰影を除去するように設定。左が吸収像の位相反転用の実数部、右が位相像の90度位相シフト用の虚数部。(b)テスト用原画像。(c)bより合成した微分干渉像。右下に陰影が付く。(d)フィルターaを使ってcをリース変換した画像。(e)dを閾値化することで原画像に近い像が復元できる。

次に、多次元画像データから細胞の形と動きを自動解析する手法の開発を行った。コンピュータビジョンの技術を取り入れ、画素ごとの形状と運動の物理量を数値的に推定する手法を確立した。形については、輝度勾配の3D空間的広がりを表す構造テンソル(輝度勾配テンソル)を計算し、そこから画素ごとの基礎形状(面・線・球の各構造の確からしさ)と線維の方向を推定した(図3)。



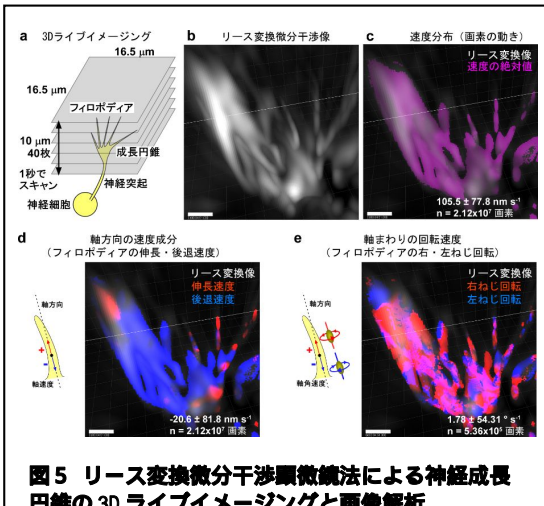
動きに関しては、各画素について、フレーム間の3D変位ベクトルをオプティカルフローとして計算し、速度・加速度・躍度などの並進物理量および角速度・曲率・捻率などの回転物理量を推定することに成功した(図4)。さらに、画素ごとの形状情報と運動情報を時空間的に統合することにより、粒子・細胞・線維の走行経路・運動軌跡を追跡することに成功した。



4. 研究成果

今回開発したイメージング技術と画像解析技術を、伸びていく神経の先端構造で伸びる方向の制御に重要な、神経成長円錐のキラリティ解析に応用した。RT-DICの結果、神経成長円錐の3D形態と動きをとらえることに世界で初めて成功し、そのフィロポディア(糸状仮足:運動性を支配する動的構造)が激しく動きまわる様子を観察できた(図5)。さらに画像解析により、それらの形と動きを

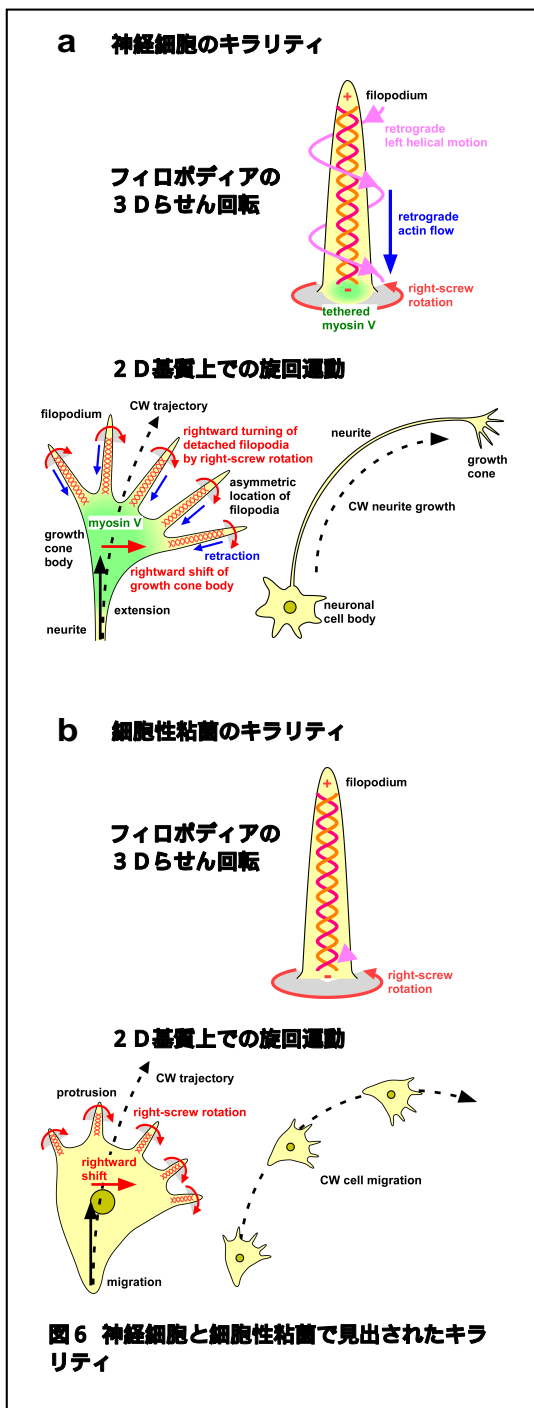
数値化することに成功し、フィロポディアが右ねじ回転と後退運動を伴う左らせん運動をするという、神経成長円錐の運動様式を明らかにすることができた(図5)。以前の研究では、神経突起が2D基質上で右回り(時計回り)に旋回しながら伸びることを手作業のトレースと角度計測による煩雑な解析により定量したが、今回開発した手法により、同一の現象をさらに簡便かつ自動的に定量することができた。



今回の技術を別の細胞にも応用し、細胞の分化、移動、形態形成のモデルとしてよく実験で使われる生物である細胞性粘菌の運動を観察した。単細胞期でアメーバ状の粘菌細胞を解析すると、2D基質上では細胞が右回り(時計回り)に旋回しながら移動、3D環境だとフィロポディア様の突起が右ねじ回転していることがわかった。

本研究により得られた細胞のキラリティに関する成果をまとめると図6のようになる。本研究では、神経成長円錐(哺乳類のマウスの脳で実験)および細胞性粘菌に関して、3D空間での形と動きを詳細に可視化し定量することに世界で初めて成功した。成長円錐については、フィロポディアが右ねじ回転と後退運動の合成により左らせん運動することを発見した。細胞性粘菌では、フィロポディア様の突起構造が成長円錐同様に右ねじ回転することを明らかにした。2D基質上では、神経細胞が右旋回するのは既知の現象であるが、今回新たに、細胞性粘菌も同程度の回転速度で同じく右方向に旋回しながら移動することがわかった。哺乳類(マウス)と細胞性粘菌は系統学的には全く離れていますが、似通ったキラリな運動様式を示すことがわかり、細胞レベルのメカニズムに関して共

通性が示唆される。



また本研究では、バイオイメージングや画像解析分野において高い有用性と汎用性を持つ技術の開発に成功した。特に、本研究のRT-DIC法は低毒性であり、蛍光顕微鏡で扱うことが困難であった、生細胞の3D構造のイメージングを可能にする。本手法については、オープンソースソフトウェアとしてImageJプラグインとMATLABコードを誌上で公開している。RT-DIC法は蛍光顕微鏡の短所をカバーできる新たな手法として幅広く顕微鏡技術と医学生物学研究への利用が期待できる。生命現象で基本的な性質である左右非対称性が生じる原理は、キラリティに基づくと考えられる。本研究成果により、これまで扱

いの難しかったキラリティをシステムティックな手法で定量的に解析することが可能になり、細胞のキラリティ現象を正確に記述し特性を明らかにできるようになった。本研究を含めた国内外の研究から、キラリティ分子であるアクチン細胞骨格とミオシンモーターの相互作用が細胞のキラリティ形成に重要である、との証拠が集まりつつある。近いうちに、本研究の成果を応用して、左右非対称性形成のしくみが解明されるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Asami Kawasaki, Masayasu Okada, Atsushi Tamada, Shujiro Okuda, Motohiro Nozumi, Yasuyuki Ito, Daiki Kobayashi, Tokiwa Yamasaki, Ryo Yokoyama, Takeshi Shibata, Hiroshi Nishina, Yutaka Yoshida, Yukihiro Fujii, Kosei Takeuchi and Michihiro Igarashi (2018)

Growth cone phosphoproteomics reveals that GAP-43 phosphorylated by JNK is a marker of axon growth and regeneration. *iScience* 4, in press. 査読有
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.05.019>

Atsushi Tamada and Michihiro Igarashi (2017)

Revealing chiral cell motility by 3D Riesz transform-differential interference contrast microscopy and computational kinematic analysis. *Nat Commun* 8, 2194. 査読有
<https://www.nature.com/articles/s41467-017-02193-w>

Nozomu Yoshioka, Shinji Miyata, Atsushi Tamada, Yumi Watanabe, Asami Kawasaki, Hiroshi Kitagawa, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Kosei Takeuchi and Michihiro Igarashi (2017)

Abnormalities in perineuronal nets and behavior in mice lacking CSGaINAcT1, a key enzyme in chondroitin sulfate synthesis. *Mol Brain* 10, 47. 査読有
<https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-017-0328-5>

[学会発表](計 7 件)

Atsushi Tamada, Michihiro Igarashi
Automated multidimensional image analysis for structures and functions of the

nervous systems

第 8 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、2018

玉田 篤史、五十嵐 道弘

3次元イメージングと画像解析により明らかになったキラルな細胞運動様式
第 39 回神経組織培養研究会、2017

玉田 篤史、五十嵐 道弘

多次元顕微鏡画像の自動解析により明らかとなった神経細胞のキラル運動特性
第 40 回日本神経科学大会、2017

玉田 篤史、五十嵐 道弘

細胞の 3 次元形態・運動解析技術の開発
第 58 回新潟生化学懇話会、2017

Atsushi Tamada

Imaging and quantitative analysis of chiral cell motility and left-right asymmetry. Symposium: Catching a glimpse of cell chirality: its roles and origin
第 69 回日本細胞生物学会大会、2017

Atsushi Tamada

Formation of left-right brain asymmetry by molecular chirality
Symposium: Discovery of cell chirality, a novel cell polarity, and its functions
第 39 回日本分子生物学会、2016

玉田 篤史

神経成長円錐の 3 次元イメージングとキネマティクス解析
シンポジウム「神経・血管の発生と新生：多角的アプローチで目指す未踏峰」
第 121 回日本解剖学会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 篤史 (TAMADA, Atsushi)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・客員
研究員
研究者番号：60270576

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()