

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06155

研究課題名(和文) 発生系譜のインフォマティクス技術の構築と、胚の生きの良さの定量化への応用

研究課題名(英文) Development of informatics techniques for analysis developmental lineages

研究代表者

小林 徹也 (Kobayashi, Tetsuya)

東京大学・生産技術研究所・准教授

研究者番号：90513359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳類着床前胚の発生系譜を定量的に解析する手法の構築を目指し、画像解析技術・統計解析技術・シミュレーション技術の構築を行った。画像解析では、胚内の細胞を同定する手法を改良し、最終的にはそこから得られたデータを用いた深層画像解析法の提案を行った。系譜統計解析では、細胞の分裂待ち時間などから細胞の潜在情報を推定する手法を提案した。そして、胚内の細胞における力学的相互作用と発生プロセスの再現を目指し力学モデルの構築を行った。これらを異なる培養条件で得られたマウス着床前胚の解析に応用することで、培養条件依存的な分裂パターンの脱同調や胚全体での構造変化と細胞周期の関係などが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウス着床前胚を対象として、バイオイメージングデータを元に発生系譜を解析する新たな情報技術を構築しました。これらの技術は、胚の発生過程に生じる様々な異常をより定量的にかつ統計的に解析することを可能とします。これらの技術を応用することで発生プロセスの原理を解明することは、胚の発生がどのように決定しているのか、また胚の発生速度の変化や発生の停止に培養状態などはどう影響しているのか、を客観的に評価することを可能とし、胚の健康を改善する培養条件の改良などに応用できると期待されます。

研究成果の概要(英文)：In this work, with the aim at quantitatively analyzing developmental lineages of preimplantation embryos, we developed a collection of techniques for 4D image segmentation and tracking, statistical analysis of cellular lineages, and a mechanical simulation of embryogenesis.

In the image analysis, we improved the method of identifying cells in the embryo and eventually proposed a deep convolutional network for the 3D image segmentation. In the statistical analysis of cellular lineages, we proposed a method to estimate the latent state of cells from the patterns of cell divisions in the lineages.

Lastly, we constructed a mechanical model to reproduce the developmental process of the embryo. By employing these techniques, we have investigated how the culture condition changes the division pattern and synchronization of divisions, how the structural change in a whole embryo is related with the cell cycles of the individual cells.

研究分野：定量生物学

キーワード：着床前胚 4Dイメージング 力学モデル 系譜解析 トラッキング 深層学習

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

1. 研究開始当初の背景

哺乳類着床前胚の発生とは、卵の受精から胎盤着床までの胚発生を指す。家畜の人工交配やヒトの不妊治療などにこの時期の胚が用いられるため、農学・医学の応用分野で特に重要性が高く、発生過程を定量的・統計的に解析することは、我々の発生プロセスの解明、家畜品種交配の成功率向上、不妊治療の改善などにも関わる。しかし胚の解析はこれまで、専門家の目視による観察・比較に大きく依存する客観性・定量性が十分ではなかった。これに対し我々は共同研究者とともに、蛍光タンパク質を用いた胚の 4D イメージング画像データから、胚の内部における細胞の 3 次元配置の変化や、細胞分裂に伴う細胞数の変動を発生系譜として抽出する画像解析システムを構築してきた。このシステムは多数の胚のデータ取得を可能にし、定量的・統計的な視点から胚の発生過程を特徴化・比較する基盤となる。

発生系譜の定量解析とその応用に向けた次の課題は、系譜情報を元に胚ごとの発生様式を特徴化し比較するためのインフォーマティクスやモデリング技術を構築することである。特に哺乳類の発生は線虫などと比較し、胚ごとのばらつきが大きい確率的なものであることが知られており、統計的データ解析の利用が不可欠である。更に、胚内での細胞の動きや分化などの動態を理解するには、数理モデリングも欠かせない。そして副次的ではあるものの、統計的精度の高い解析のためには、発生系譜の作成(画像解析)を効率化してより短時間で多量の発生系譜再構成を行い、十分なサンプル数を確保することも極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究は、基礎生物学のみならず応用でも実用可能な着床前胚の定量解析技術の構築を目指した。発生系譜の統計的解析方法や数理モデルの新たな構築とともに、より簡便かつ効率的な画像からの発生系譜再構成技術の改良を進めた。そしてその応用の一つとして、胚の状態や発生の性質を定量的かつ客観的に特徴化する基準を与えることを試みた。本研究により開発される画像解析やデータ解析・数理モデルなどのインフォーマティクスの技術は、様々なバイオ画像解析や系譜解析に高い波及効果を持つとともに、胚の状態の定量化は、胚培養条件の最適化に貢献すると期待される。

3. 研究の方法

本研究は、(1)画像解析法の改良と系譜データ作成、(2)系譜解析法の構築、(3)手法を応用した胚の発生過程の定量解析、の 3 つの課題で構成した。画像解析の改良には整数計画法に基づく汎用的で高速なトラッキング手法の改良や同定とトラッキングの同時最適化などを計画した。系譜解析法として細胞集団の増殖するという性質を適切に取り扱い情報を縮約する統計的手法の開発を目指した。また仮想的な力学を数理モデルに表現し、細胞間に働く力学構造の推定を行う手法も構築した。そして、着床率や発生進行速度が異なる条件での画像データから発生動態系譜の作成を進め、上記の方法を活用して、胚の発生性質の定量的な差異を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

[(1) 画像解析法の改良と系譜データ作成] 発生系譜を 4D イメージデータから再構築するため、構築済みの画像解析システムを改良して、細胞の核を 3D 蛍光画像から自動同定し、自動同定結果を目視で確認して手動修正をするシステムの効率化を進めた。特にこれまでとは異なる培養条件で計測されたマウス胚イメージデータを扱ったことから、自動同定システム全体を再調整した。また手動修正の GUI の利便性を改良することで、インフォーマティクスに馴染みのない学生などでも修正作業に関われるようになり、このシステムを用いて異なる培養条件の胚について割球の核位置の同定作業をこれまでよりも効率的に進めることが可能になった。

次に同定された核の情報をもとに、細胞の移動と、細胞分裂時の親細胞と娘細胞との対応関係を追跡する整数計画法をベースにしたトラッキングシステムの改良を検討した。これまではずでに同定された割球に対し、その重心間の距離をスコアとして最適化問題を構成して、全体としてのスコアの最小化によってトラッキングを実現していた。これに対して、細胞核の形状の類似性や蛍光強度などの情報を組み込んだスコアを検討した。検討の結果、計測条件や発生の進行度に応じたスコアの調整が必要なことや手動での調整が難しいことがわかり、この部分の自動化の課題が明確となった。

手動での調整の困難が今後予想されたことから、共同研究者らと共に、すでに作成できている核同定の結果を教師データとして、3D イメージからの核同定の精度を深層学習によって高める方向性の探索と検討を進めた。構築したアルゴリズムの評価を行い、既存のシステム以上の精度を学習で実現できることを確認した。特に細胞数が増えた状況での核同定に有効であることがわかった。

[(2) 系譜解析法の構築] 画像から細胞系譜が構築できた後の解析に必要な統計解析法や力学モデリングの検討を進めた。統計解析手法においては、Hormoz や Nozoe ら先行研究の手法をベースにした。Hormoz らの方法は物理学的な手法を背景に娘細胞ペアの相関に着目して細胞状態変化を系譜から推定するものであったが、主に細胞の表現型変化に詳細釣り合いを仮定し、また細胞分裂時の分裂時間の差や確率性などを無視したものだ。この方法を Nozoe らの細

胞の履歴に着目した解析や確率過程における分岐過程の文脈で解釈をし直し、より統計的な手法へと発展させた。具体的には、分岐をする隠れ状態を持つ統計推定問題として再定式化をして、より統計学的に汎用的な視点から解析手法を開発した。特に実際の発生系譜で見られる細胞分裂時間の差などを直接取り扱えるように手法を構成した。そして手法の妥当性をまず長期の細胞系譜が公開されているバクテリアで検証し、その有効性を示した。またその間、Hormozらに日本に招聘して国際WSを開催することで、同氏が開発している手法やその応用についてのより詳細な情報交換を行った。またこれらの手法とより一般的な細胞増殖系モデルの関連との解析も進めた。

細胞系譜解析に胚内での細胞の配置や移動などの情報を組み込むためには、細胞間の力学を表現するモデルが必要になる。発生4Dデータや発生系譜データを元に、その振る舞いを再現する発生力学モデルの構築も合わせて行った。細胞の弾性力などの計測実験を元に、非線形な仮想力を細胞間で仮定し、ノイズを加えたシミュレーションで、まず4Dデータとの定性的な一致性を確認した。その結果、排除体積による反発力、接着にもとづく引力のみならず、細胞分裂時に細胞を引き離す積極的な力の存在が、胚内での大きな細胞の運動の再現に必要なことがわかった。一方で、力学モデルで実際に観測されている細胞の軌道を再現することは極めて難しいことも確認された。

再現が困難である原因の一つとして、細胞間に働く相互作用などの力学的情報を解析者が探索し与える必要があることが挙げられる。この問題を回避するため、細胞集団の運動のデータから細胞間に働く相互作用を推定する統計手法の検討も行った。まずは2次元空間内での細胞運動を対象に、モデル推定により相互作用の種類を辞書の中からモデル選択的に選ぶ方法などを検討した。その結果、データの再現に関しては極めてよい性能が得られるものの、データの予測の精度は十分に上がらなかった。また相対的に予測精度の高いモデルで選ばれている相互作用が必ずしも物理的要請と整合するものではないことが明らかになった。これらの結果から、データのみから胚内の細胞に働く力学的作用を推定するには数理的に大きな進展が不可欠であることが予想された。

[(3)手法を応用した胚の発生過程の定量解析] 発生4D画像からの自動核同定および手動補正のシステムを活用して、異なる培養条件下の胚発生過程での割球の位置を同定したデータの作成を進めた。GUIなどを工夫して、インフォマティクスの知識のない実験系の学生でも修正作業に従事できるようにしたため、当初予定よりも多くの胚について胚内の割球の位置を同定したデータを作成することができた。計測された系譜データに基づき5%、20% O2の結果を比較することで胚の発生速度などが胚のどのような性質に反映されるかを解析した。特に4から8細胞期、そして8から16細胞期の分裂タイミングにおいて顕著な分裂の遅れと分裂タイミングの脱同調が20% O2条件で確認された。またコンパクションやキャピテーションなどの胚全体での構造変化が必ずしもこれら細胞周期の遅れと強く相関していないことも確認された。

[まとめ] 本研究で着床前胚解析に必要な画像解析技術および細胞系譜解析技術に関して大きな進展を得ることができた。また得られたデータやその解析から、発生における分裂タイミングの変化のパターンや、目視において重視される胚全体での構造変化が必ずしも発生系譜上での発生の速さと強く相関していないことなど、いくつかの性質が定量化によって初めて明らかになった。一方で、発生系譜における細胞の移動や分裂などの詳細なパターンを再現するには、物理的な相互作用からデータを再現する手法の必要性が確認された。今後はこれらの技術の開発が、定量データに基づく発生の理解に重要な役割を果たすと予想される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ・ [Tetsuya J. Kobayashi](#), Yuki Sughiyama, Information thermodynamic structure in population dynamics in fluctuating environment, *Physical Review E*, 2017, vol.96, pp.012402
- ・ Yuki Sughiyama, [Tetsuya J. Kobayashi](#), The explicit form of the rate function for semi-Markov processes and its contractions, *Journal of Physics A*, 2018, vol.51(12), 125001
- ・ Yuki Sughiyama, [Tetsuya J. Kobayashi](#), Fitness response relation of a multitype age-structured population dynamics, *Physical Review E*, 2019, vol.99(1), 012413

[学会発表] (計11件)

- ・ Yuki Sughiyama, [Tetsuya J. Kobayashi](#), Steady State Thermodynamics in Population Dynamics, 生物物理学会 第54回年会, つくば国際会議場, 2016/11/25-27
- ・ Yuki Sughiyama, Path-wise analysis for the age-structured population dynamics, LARGE DEVIATION THEORY IN STATISTICAL PHYSICS: RECENT ADVANCES AND FUTURE CHALLENGES, Madhava Lecture Hall, ICTS, Bengaluru, 2017/8/14-10/13
- ・ [Tetsuya J. Kobayashi](#), Yuki Sughiyama, A retrospective approach towards population dynamics under fluctuating environment/A retrospective analysis of the multi-state age-structured population dynamics, Ancestral lines in populations under selection, Frankfurt University - Institute of Mathematics, 2017/11/3-5

- ・ So Nakashima, Yuki Sughiyama, Tetsuya J. Kobayashi, EM based algorithm to infer both phenotypic state and cell division properties from lineage information, EMBL conference Quantitative Principles in Biology, EMBL Heidelberg, Germany, 2017/11/2-4
- ・ So Nakashima, EM based algorithm to infer both phenotypic state and cell division properties from lineage information, Evolution of Diversity, Les Houches Physics School, France, 2018/2/25-3/3
- ・ 小林 徹也, 細胞系譜から隠れた増殖モードを推定する, 第 15 回 生物数学の理論とその応用 -次世代の数理科学への展開-, 京都大学数理解析研究所, 2018/9/10-14
- ・ 錦野 敬三郎, 細胞性粘菌の細胞集団運動のデータ駆動型モデル, 第 15 回 生物数学の理論とその応用 -次世代の数理科学への展開-, 京都大学数理解析研究所, 2018/9/10-14
- ・ 松井 崇晃, 初期胚発生における力学モデルの解析, 第 15 回 生物数学の理論とその応用 -次世代の数理科学への展開- 京都大学数理解析研究所, 2018/9/10-14
- ・ Keizaburo Nishikino, Ryo Yokota, Tetsuya J. Kobayashi, A data-driven model for collective cell motion in Dictyostelium discoideum, 第 56 回日本生物物理学会年会, 岡山大学 津島キャンパス, 2018/9/15-17
- ・ Takaaki Matsui, Tetsuya J. Kobayashi, Analyzing and modeling of early embryo development, 第 56 回日本生物物理学会年会, 岡山大学 津島キャンパス, 2018/9/15-17
- ・ 中島 蒼, 細胞系譜を用いた増殖に関わる隠れ状態の推定(Deciphering Latent Growth-states from Cellular Lineage Trees), 第 9 回定量生物学の会 年会, 大阪大学, 2019/1/13-14

〔図書〕(計 1 件)

- ・ 小林 徹也編, 定量生物学, 化学同人, 2018

〔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

https://research.crmind.net/Project_QEmbryo.html

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山縣一夫

ローマ字氏名：(YAMAGATA, kazuo)

研究協力者氏名：舟橋啓

ローマ字氏名：(FUNAHASHI, aki ra)

研究協力者氏名：横田亮

ローマ字氏名：(YOKOTA, ryo)

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。