

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18578

研究課題名(和文) 4次元変分法による形態形成の動力学的機構を逆探索する技法の開発

研究課題名(英文) Development of a mathematical method for analyzing deformation dynamics of living tissues by 4D variational analysis

研究代表者

齋藤 卓 (Saitou, Takashi)

愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員)

研究者番号：60588705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：実験により得られた情報を最大限に活用する解析方法の発展は重要な課題である。本研究では、蛍光ライブイメージングにより取得した4次元的な計測情報を数理モデルによる数値シミュレーション情報と直接比較できる方法を構築し、細胞状態変化を記述する時系列データに当てはめ、実際にバイオイメージングで得られる細胞追跡が不完全なデータに対して適用することで組織全体の变形動力学を解析する方法について研究開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Development of advanced techniques that fully utilize information from experimental data is a challenging task. In this study, we aimed to advance integration of four dimensional measurement data obtained through fluorescent live imaging analysis and numerical simulation data from mathematical models. Applying the method to the time series data describing cell state changes, deformation dynamics of living tissues were investigated.

研究分野：数理生物学

キーワード：形態形成 シミュレーション バイオイメージング 小型魚類

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の器官・組織形成においては、数多くの細胞が集まり生物の形を作る。この過程の中で細胞は増殖、分化、遊走といった活動を行いながら細胞社会を形成していくことで形態形成が進行する。したがって、形態形成メカニズムを理解するためには、個々の細胞の細胞活動と組織変形動態の相互関係性を明らかにする必要がある。

個体を生きたままの状態でも可視化する方法であるライブイメージングは、この目的のために極めて有効な手段である。近年の蛍光イメージング技術は大きな発展を遂げており、組織・個体における複雑な時空間動態が1細胞レベルで観察できるようになってきている。一方で、数理モデルを用いて形態形成の原理や規則を探索する研究も進んでいる。数理モデルは、現象の記述を単純化することで本質を抜き出すことを可能とし、現象の原理解明のために有効なアプローチとなる。蛍光可視化技術と数理モデルを高度に融合させた定量的な解析は、形態形成原理に迫る上で益々重要な手段となっていくと考えられる。

しかしながら実験により得られた細胞の情報を最大限に利用する解析方法の発展は十分ではない。通常、実験データは統計的に処理され数理モデルのデータと比較される。このような解析方法では、イメージングが持つ時空間的な情報が失われやすい。本来のデータが持つ情報を最大限に生かすために、細胞レベルの情報を実験とシミュレーションで直接対応させ、比較する計算方法の開発が必要であると考へた。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光ライブイメージングにより取得した4次元的な計測情報を数理モデルによる数値シミュレーション情報と直接比較できる方法を構築し、細胞状態変化を記述する時系列データに当てはめ、実際にバイオイメージングで得られる細胞追跡が不完全なデータに対して組織全体の変形動力学を解析する方法を開発・応用する。この目的のために、データ同化手法の1つである4次元変分(アジョイント)法を生物画像データに適用可能なものに拡張し、実験とシミュレーションそれぞれで得られたデータを対応付けし、比較する手法を検討した。

3. 研究の方法

研究開始当初は魚類胚体の形態形成における細胞集団運動に対する解析を予定していたが、この動態は複数の組織の形成が絡む複雑なものであるために、解析が困難であることが予想された。そこで単一の組織の運動からなるより単純な細胞集団運動に研究対象を絞るために、生物モデル系としてメダカ胚で見られる波動性のリズム収縮運動に注目することにした。

メダカ胚における律動性収縮運動は、前中

期囊胚期頃から始まる周期的な収縮運動で、胚の一部分で始まった収縮が波状に表面を胚全体に伝わっていく運動である。この運動は、筋肉運動とは異なるもので、胚の最外細胞層である上皮被覆層の活動によるものであることがわかっている(図1)。これまで平面的な観察によってこの現象の動態についての推察がなされてきたが、詳細な動態はわかっておらず、したがって、メカニズムの解明のためには4次元的な観察や動態の定量的な解析が必要である。本研究では、律動性収縮運動の4次元蛍光ライブイメージング観察と画像解析による定量情報取得、シミュレーションに基づく解析手法を開発・融合することによってダイナミクスを抽出する解析手法の開発を試みた。

細胞情報として、蛍光ライブイメージングで得られた細胞の核の軌跡情報を想定し、この情報から組織全体に働く力を推定する逆問題を扱う。イメージングデータ特有の問題点として、得られた蛍光画像から完全な軌跡情報が得られないことが挙げられる。組織の不透明性、分解能やノイズなどのために高度な画像処理法を用いても完全な細胞トラックデータ取得は現状困難である。これを解決するために画像解析による情報の補間を行うことでシミュレーションデータとの比較が可能な定量情報の取得に対応した。

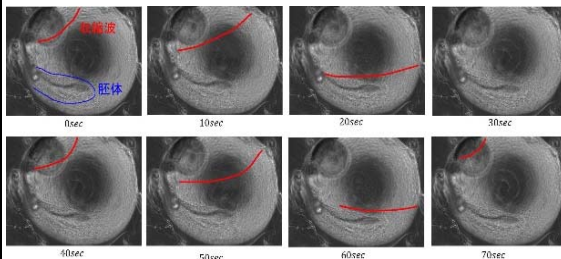


図1. 律動性収縮運動の位相差顕微鏡による観察結果。赤線が収縮運動が起こっている部位を示す。時間とともに収縮運動が波のように胚表面を伝わっていく。胚の一部で始まった波が胚体近くまで伝わり収縮運動が終結する。30秒程度で波が胚全体を一回りし、次の運動が始まる。

4. 研究成果

(1) 蛍光ライブイメージング

メダカ胚における律動性収縮運動の4次元蛍光イメージングによる解析を行う際の問題点はその波面伝播の速度にある。波面伝播の速度は $50 \mu\text{m}/\text{sec}$ 程度、つまり数10秒程度で胚全体を伝わる程度の速さであり、したがって、数秒に一度の間隔で3次元的に胚全体のタイムラプス撮影を行わなければこの現象を捉えることはできない。そこで、高視野・高速3次元撮像が可能な2光子励起デジタル走査型ライトシート蛍光顕微鏡(2-photon digital scanned light-sheet microscopy;

2p-DSLM) を用いて蛍光ライブイメージングによる4次元画像取得解析を行った。細胞層全体の運動を捉えるために、細胞核が緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発現によって光る CMV-H2B-GFP 系統を利用した。この系統と 2p-DSLM によって約 3 秒間隔でのタイムラプス撮像を行うことができ、4 次元的に胚全体にわたって起こる収縮運動の捕捉が可能であることを確認した。

(2) 画像解析

蛍光イメージングにより取得したデータは4次元の細胞核位置情報であるが、組織の不透明性などのために高度な画像処理法を用いても完全な細胞トラックデータ取得は困難であり、不完全なデータとなっている。このデータを補うために輝点検出法と曲面フィッティング法を利用してコンピュータ内で4次元的に胚形状を再構築する画像解析法の開発を行った。まず、輝点検出を行い、各時点でのデータ毎に1細胞位置情報の抽出を行った(図2)。その後、点群データからの滑らかな近似閉曲面の生成を達成するために、輝点情報データから球面調和関数を利用した曲面フィッティングを行うことで胚形状の再構築を行った(図3)。

さらに、球面分割格子による曲面生成点の均一化を行うことによってシミュレーションデータとの4次元時空間的なデータ比較に対

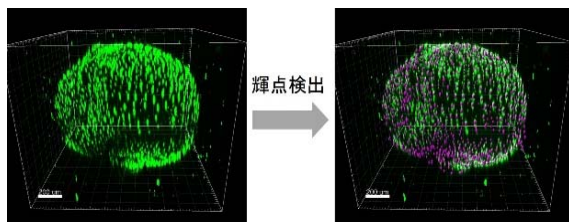


図2. 2光子励起蛍光顕微鏡による全胚蛍光ライブイメージング。最外被覆層の細胞核が緑色蛍光タンパク質によって蛍光を発するメダカ系統を利用。画像解析ソフトウェアを用いて蛍光の輝点検出を実行。

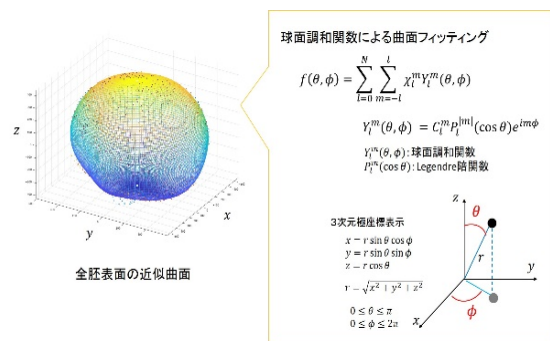


図3. 点群座標データからの近似閉曲面生成。検出した細胞位置情報から球面調和関数を用いて曲面フィッティングを行うことで胚形状の3次元再構築を行った。

応できる定量情報の生成を行った。

(3) シミュレーション解析

胚における波動運動の記述に対応するため波動方程式系を用いて数理モデルを構築した。一方で、トラッキングデータに特化した解析手法としてアジョイント法の開発を進めた。まず、アジョイント法の定式化に必要な評価関数の設定とアジョイント方程式の導出を行った。次に、数理モデルの数値シミュレーションにより生成した人工データを用いて有効性検証試験を行った。アジョイント法で必要となる実験データ値とモデルシミュレーション値をマッチングを行った上での誤差として評価関数を設定した。解析の結果、評価関数の重みづけに推定結果が大きく依存することが判明した。実際のイメージングデータに適応するには、重みづけ、ずれ補正、誤差の見積もりなど微細なパラメータの調整が必要であることが分かった。今後、アルゴリズムの改善を行い、細胞追跡データに応用することで発生期の組織変形動力学の推定を行う。

4-4. 今後の展望

シミュレーションによる解析手法の開発を進め、実際の実験データに適用することで時空間的に動態解析を可能とする計算ツールを構築する。汎用性の高い広範囲のモデル系に応用可能な計算フレームワークの構築と実験による数理モデルの実証を通じて、細胞間相互作用の予測・制御を可能にする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Takeshi Imamura, Takashi Saitou, Ryosuke Kawakami, “In vivo optical imaging of cancer cell function and tumor microenvironment”, *Cancer Science* 109:912-918, 2018, DOI: 10.1111/cas.13544, 査読有
- ② Takashi Saitou, Hiroshi Kiyomatsu, Takeshi Imamura, “Quantitative Morphometry for Osteochondral Tissues Using Second Harmonic Generation Microscopy and Image Texture Information”, *Scientific Reports* 8:2826, 2018, DOI:10.1038/s41598-018-21005-9, 査読有
- ③ Ji-Won Lee, Akiyoshi Hoshino, Kazuki Inoue, Takashi Saitou, Shunsuke Uehara, Yasuhiro Kobayashi, Satoshi Ueha, Kouji Matsushima, Akira Yamaguchi, Yuuki Imai, Tadahiro Iimura, “The HIV co-receptor CCR5 regulates osteoclast function”, *Nature communications* 8:2226, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-02368-5, 査読有
- ④ 今村健志, 審良太郎, 明比麻由, 下山佳織,

古賀繁宏, 渡部祐司, 清松悠, 三浦裕正, 山本晋, 日浅陽一, 齋藤卓, 「医療応用を目指した愛媛大学医学部発の蛍光イメージング技術開発」, 愛媛医学 36(3):123-127, 2017, <https://www.m.ehime-u.ac.jp/emj/backnumber/>, 査読有

- ⑤ Shin Yamamoto, Yusuke Oshima, Takashi Saitou, Takao Watanabe, Teruki Miyake, Osamu Yoshida, Yoshio Tokumoto, Masanori Abe, Bunzo Matsuura, Yoichi Hiasa, Takeshi Imamura, “Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPEM)”, Biochemistry and Biophysics Reports, 8:277-283, 2016, DOI:10.1016/j.bbrep.2016.09.010, 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 齋藤卓, “第2高調波発生イメージングを用いた骨・軟骨組織の計量病理学”, 日本応用数理学会2017年度年会, 武蔵野大学, 2017/9/6-8
- ② Takashi Saitou, “Mathematical inference of spatiotemporal cell cycle patterns in zebrafish body axis development”, The 23rd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Yamanashi, Japan, 2017/8/30-31
- ③ 齋藤卓, “変形性関節症モデルマウスと非線形光イメージングによる関節軟骨変性の定量化法の開発”, 平成28年度 先端モデル動物支援 若手支援技術講習会, 長野県茅野市, 蓼科グランドホテル滝の湯, 2016/9/14-9/17
- ④ 齋藤卓, “細胞周期ライブイメージングとゼブラフィッシュ形態形成の定量解析”, 第68回日本細胞生物学会大会, 京都テルサ, 2016/6/15-17

[図書] (計4件)

- ① 今村健志, 齋藤卓, 川上良介, がん転移学、株式会社日本臨牀, “がんの新しい分子イメージング”, 75 巻増刊号 9, 339-344, 2017
- ② 今村健志, 齋藤卓, 「マウス生体深部蛍光イメージング」, 生体の科学 (増大特集) 細胞多様性解明に資する光技術一見で, 動かす Vol.68 No.5 402-403, 2017
- ③ 齋藤卓, 今村健志, 「魚類個体発生で観察される周期的な細胞周期進行波—イメージングと数理モデルで隠れたパターンを推定する」, 実験医学増刊 Vol.35 No.5, 847-851, 2017
- ④ 今村健志, 齋藤卓, 「生体深部の光学イメ

ージングの新展開」, 実験医学特集 Vol.34 No.14, 2344-2347, 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 卓 (Saitou, Takashi)

愛媛大学・医学部附属病院・助教 (病院教員)

研究者番号: 60588705