

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651229

研究課題名(和文)4Dイメージングによる生体環境の動的解析

研究課題名(英文)Dynamic analysis for living cell environment by 4D imaging

研究代表者

松田 秀雄(MATSUDA, Hideo)

大阪大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：50183950

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)：生きた状態での生体組織の内部での細胞遊走の経時的な動態を観察することで細胞周囲の環境を解析する方法論の開発を目的として、細胞移動の数値モデルに基づいて大域データ対応付けを行うことで多数の細胞の挙動を追跡する手法と、ランダムフォレストを半教師あり学習に応用することで個々の細胞の状態を判別する手法を開発した。それらの手法を実際の細胞画像に適用することで、従来の画像解析手法よりも高い精度を達成できることを示した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop a methodology for analyzing environments of cells in living tissues by observing the time-lapse migration dynamics of the cells. For this purpose, two novel methods were developed: a method for tracking a large number of cell migrations by global data association based on a mathematical model on cell movement, and a method for identifying cell states by applying random forests to a semi-supervised classification. By using these methods to cell images, the methods demonstrated better prediction performance compared with widely-used image analysis programs.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：細胞画像解析 細胞追跡 画像処理 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 生きた状態での生体組織の内部(以下、生体環境と呼ぶ)では、細胞や生体分子の動きが常に行われている。従来の組織・形態学上の「静的」な解析では、生命現象の「スナップショット」を見るのみで、その動く実像を捉えることはできなかった。近年、3次元の空間情報に加え、時間軸を持った情報を可視化する4Dイメージング技術が開発され、生物の生きた状態のまま、外部から組織や細胞などの形態や構造と、その動きを低侵襲で観察することが可能となった。

(2) 硬い石灰質に囲まれた骨組織の内部は、従来、生きたままでの観察が極めて困難であると考えられていたが、本研究の連携研究者である石井らは、マウス頭頂骨を4Dイメージング技術の一つである2光子励起により観察することで、生きた骨髄内を外部から非侵襲的に高解像度で観察できる実験系を確立した。さらに、この実験系を用いて破骨細胞の元になる前駆細胞が、血中と骨表面の間を移動する様子をリアルタイムで可視化することに成功した。本研究では、生体環境内に存在する細胞を4Dイメージングにより観察し、細胞の動きを通じて、生体環境を解明する手がかりを得ることを目指した。

2. 研究の目的

(1) 骨髄機能の生理・病理には、未だ不明な点が数多く残されている。骨髄周辺では、血液系や免疫系の前駆細胞が、ケモカインなどの誘導物質により制御されて然るべき位置に移動した後、成熟細胞に分化することでその機能を果たしている。しかし、生体環境内は非常に多数の分子が入り組んだ状態であり、各場所での誘導物質の濃度変化を直接的に計測することは困難である。そこで、本研究は、誘導物質の濃度勾配を検出して移動する破骨前駆細胞を取り上げ、骨の再構築(リモデリング)についての知見を得ることを目的とした。この目的を達成するために、次の(2)、(3)の副目標を設定した。

(2) 4Dイメージングから破骨前駆細胞の動きをトラッキングして詳細に計測することで、誘導物質の濃度勾配に対する細胞遊走の動的(経時的)かつ定量的な数理モデルを構築する。

(3) (2)で構築した数理モデルと、実際に生体組織中に存在する多数の細胞の動きを計測した結果を詳細に比較・照合することで、細胞の状態を判別する手法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 時間フレームでの経時観測蛍光画像中で画像処理により細胞の領域を検出することで、4Dイメージングデータからの細胞のトラッキングを行った。3次元画像が時間フレ

ームごとに取られる4Dイメージングデータからの経時観測画像から、セグメンテーションにより細胞領域を検出する手法をいくつか考案し、それぞれのセグメンテーション結果をもとに細胞のトラッキングによる動きの検出を行った。

(2) 細胞の経時的な動きをとらえるための数理モデルの構築を行った。具体的には、細胞の状態に応じて蛍光の変わる多色蛍光マーカーを利用して、細胞周期の可視化を行ったイメージングデータから細胞核の自動検出と追跡を、混合正規分布モデルを基にして、EMアルゴリズムでブートストラップサンプリングとハンガリー法による最適割り当てを行う新たな手法を開発した。

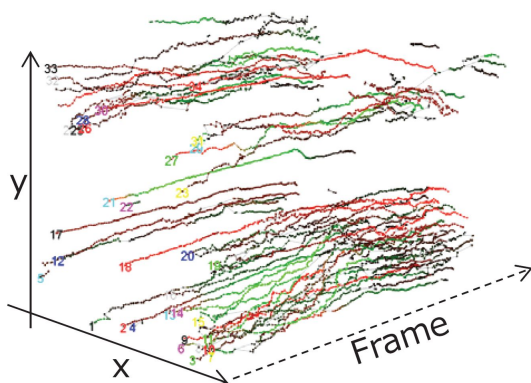
(3) 細胞遊走の数理モデルの詳細化を行った。具体的には、大域データ対応付けに基づいて細胞のトラッキングを行う新たな手法を開発した。従来の大域データ対応付けでは、フレーム単位の対応付けにより短い細胞移動の軌跡であるトラックレットを生成し、細胞移動の仮説の尤度に基づきトラックレットの対応付けを行うことで、全体の軌跡を最適化していた。しかし、細胞移動の仮説の適切な尤度計算は難しく、トラックレットの対応付けに誤りが生じる問題があった。本研究では、大域データ対応付けを一定フレーム領域でスライドしながら反復実行することにより細胞追跡精度を改善する手法を開発した。

(4) 顕微鏡によって得られた観察データを用いて外観から細胞の状態を判別する手法を開発した。従来は、動画データからの細胞の状態判別には、あらかじめ正解の状態がわかっている画像を訓練データとして用いる教師あり学習の手法が広く用いられていたが、訓練データを十分な数だけ作成するのは非常に困難であった。そこで、本研究では教師あり学習の一つであるランダムフォレストを、訓練データとして正解が既知のデータと正解が未知のデータの両方を使う半教師あり学習に応用し、分類器の判別結果の確信の度合いが高いデータを訓練データに追加する共訓練に基づく手法を開発した。

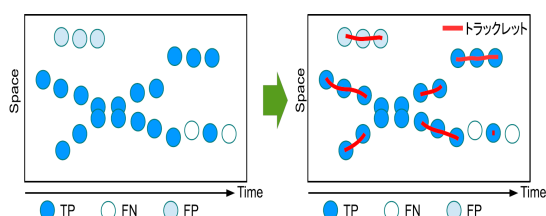
4. 研究成果

(1) 細胞のトラッキングによる動きの検出については、当初想定していたよりも、細胞の形状や動きの変化が多様かつ複雑で、単純にトラッキングをしても、周囲の細胞と重なるなどして動きを誤って検出するケースがあった。そこで、画像のセグメンテーションによる細胞領域の検出を精度よく行う手法について検討し、その結果をもとにトラッキングを行うことで、検出の誤りを削減できることを確認した。

(2)細胞周期の可視化を行ったイメージングデータからの細胞核の自動検出と追跡を、混合正規分布モデルに基づいて新たに開発した手法により行った。追跡結果を次の図に示す。EM アルゴリズムによる最適割当てを行うことで、ノイズの影響を低減でき、細胞核が大きく移動したときや、細胞が密集した状況下でも、細胞の動きに追従して高い精度でトラッキングできることが示された。

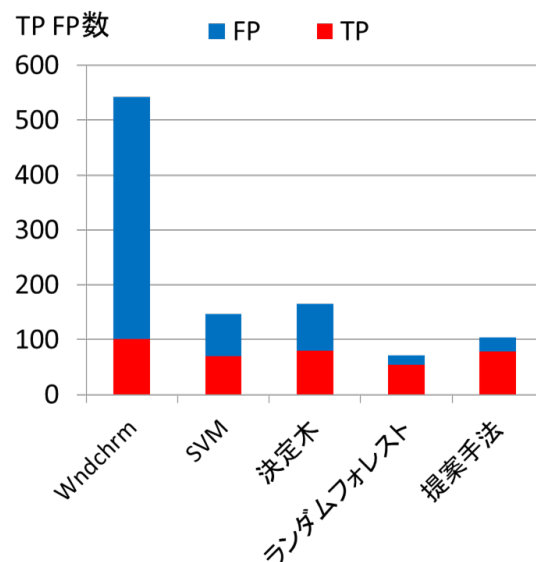


(3)大域データ対応付けに基づいて新たに開発した細胞追跡手法により、実際に、濃度勾配に従い遊走する破骨細胞の観察画像に対して実験を行った。その結果、細胞移動の軌跡であるトラックレット(次の図を参照)の対応付けの精度が従来の追跡手法よりも改善されていることが確認できた。これにより、低コントラスト、不定形、隣接・結合が存在するなど自動追跡が困難であった細胞の動きを高精度で追跡できることが示された。



(4) 本研究で開発した、細胞の外観から細胞の状態を半教師あり学習により判別する手法を使って、実際の細胞画像で細胞状態の判別を行った。その判別結果を、正解との一致数(TP)および偽陽性の数(FP)を基にして、画像分類ソフトウェアである Wndchrm および、従来の機械学習法である SVM (サポートベクターマシン)、決定木、ランダムフォレストによる判別結果と比較した(次の図を参照)。その結果、TP を従来の手法と同程度もしくはより多くの値に維持しながら、FP を減少できることが示された。また、本手法によって訓練データの追加を繰り返し行うことで偽陰性の値が減少する傾向が確認された。このことより、途中の判別過程で確度の高いデータを新たな訓練データに加えて判別を繰り返す

す半教師あり学習の効果が得られていることが確認できた。



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2件)

宇佐見 潤, 繁田 浩功, 間下 以大, 黒田 嘉宏, 菊田 順一, 瀬尾 茂人, 石井 優, 松田 秀雄, 竹村 治雄, グラフカットを用いた骨髓腔画像の領域分割, 情報処理学会論文誌 数理モデル化と応用, 査読有, Vol.8, No.1, 2015, pp.18-27

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009886640>

瀬尾 茂人, 間下 以大, 前田 栄, 竹中 要一, 石井 優, 松田 秀雄, 混合正規分布モデルを用いた経時観測蛍光画像からの細胞核の検出と追跡手法, 情報処理学会論文誌 数理モデル化と応用, 査読有, Vol.6, No.3, 2013, pp.140-150
<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009656653>

[学会発表](計16件)

H. Shigeta, A bone marrow recognition method for bone tissue images using wavelet transform, 2nd Conference on Medical and Biological Imaging, 2015年3月14日, 大阪大学銀杏会館(大阪・吹田)

R. Taguchi, A rendering method based on local maximum intensity projection for in vivo cellular imaging, 2nd Conference on Medical and Biological Imaging, 2015年3月14日, 大阪大学銀杏会館(大阪・吹田)

K. Fukuda, An automatic event

detection method using semi-supervised learning for time-lapse imaging data, Bioimage Informatics Conference 2014, 2014年10月8-10日, Leuven (Belgium)

K. Kurashige, Improvement approach of cell tracking accuracy by using inter-frame information, Bioimage Informatics Conference 2014, 2014年10月8-10日, Leuven (Belgium)

藏重 昂平, 大域データ対応付けの回復実行による細胞追跡精度の改善手法, 情報処理学会 第39回バイオ情報学研究会, 2014年9月19日, 大阪大学情報科学研究科棟(大阪・吹田)

H. Shigeta, A graph cuts image segmentation method for quantifying barrier permeation in bone tissue, 1st Workshop on Pattern Recognition Techniques for Indirect Immunofluorescence Images (I3A), 2014年8月24日, Stockholm (Sweden)

T. Mashita, A segmentation method for bone marrow cavity image using graph-cuts, 1st Workshop on Pattern Recognition Techniques for Indirect Immunofluorescence Images (I3A), 2014年8月24日, Stockholm (Sweden)

福田 浩二郎, タイムラプスイメージングによる細胞周期観測画像の時空間解析, バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ 2014, 2014年6月9日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知・岡崎)

福田 浩二郎, 経時観測蛍光画像からのモーションヒストリーイメージを用いた細胞分裂の検出方法, 第16回画像の認識・理解シンポジウム, 2013年8月1日, 国立情報学研究所(東京・東京)

尾野 貴広, Global Data Associationによる経時観察画像における破骨前駆細胞の自動追跡手法, 第16回画像の認識・理解シンポジウム, 2013年7月31日, 国立情報学研究所(東京・東京)

瀬尾 茂人, 混合正規分布モデルを用いた経時観測蛍光画像からの細胞核の検出と追跡手法, 情報処理学会 第92回数理モデル化と問題解決研究会, 2013年2月27日, 武雄市文化会館(佐賀・武雄)

情報処理学会山下記念研究賞受賞

瀬尾 茂人, 多色蛍光イメージングによる経時観測データのための細胞追跡手法, ビジョン技術の実利用ワークショップ, 2012年12月6日, パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

瀬尾 茂人, 多色蛍光タイムラプスイメージングによる細胞周期観測データのための細胞自動追跡手法, バイオイメージ・インフォマティクス ワークショップ 2012, 2012年11月1-2日, 理化学

研究所 発生・再生科学総合研究センター(兵庫・神戸)

S. Seno, An automatic cell-tracking method and spatiotemporal analysis for time-lapse multicolor fluorescent images of cell cycle, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月12日, 福岡国際会議場(福岡・福岡)

S. Seno, Automatic cell tracking for time-lapse fluorescent images of cell cycle, International Symposium Towards Comprehensive Understanding of Immune Dynamism (TCUID 2012), 2012年10月29日, 大阪大学谷口記念講堂(大阪・吹田)

S. Seno, A cell-tracking method for time-lapse multicolor fluorescent images, Bioimage Informatics Conference 2012, 2012年9月16-19日, Dresden (Germany)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 秀雄(MATSUDA, Hideo)
大阪大学・大学院情報科学研究科・教授
研究者番号: 50183950

(2) 研究分担者

瀬尾 茂人(SENO, Shigeto)
大阪大学・大学院情報科学研究科・助教
研究者番号: 30432462

(3) 連携研究者

石井 優(ISHII, Masaru)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10324758