

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26280106

研究課題名(和文) 脂肪細胞の分化転換における遺伝子ネットワークの網羅的解析技術の開発

研究課題名(英文) Development of Systematic Analysis Method of Gene Network for Adipocyte Transdifferentiation

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) 10,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類において、寒冷刺激により脂肪細胞が褐色化し熱産生能を持つことが知られていたが、なぜ一部の脂肪細胞のみ褐色化するかは未解明であった。そこで、寒冷刺激下での脂肪組織について時系列遺伝子発現データを取得し、遺伝子ネットワークの解析を行った結果、ある種の炎症性サイトカインが脂肪細胞の褐色化を抑制していることを見出した。また、脂肪細胞の褐色化に關与する遺伝子の発現を制御する microRNA についてターゲット遺伝子の予測手法を開発した。さらに、脂肪細胞の褐色化での脂肪の分解に伴う細胞の縮小を定量化するため、脂肪組織画像の深層学習による細胞領域の抽出と面積の計測を行う手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：In mammals under cold-exposure stimulation, adipocytes change to be brown and to have thermogenic activity. However, it has not been discovered why only a part of adipocytes obtain the activity. In this study, we measured time-course gene expression of various adipose tissues under the stimulation. As the results of gene network analysis using the expression data, we elucidated that an inflammatory cytokine suppresses the browning of adipocytes. We also developed a method for predicting target genes of microRNAs that regulate the expression of the genes related to the adipocytes browning. In addition, we developed a method for the segmentation of adipocyte areas from the microscopic images of adipose tissues based on deep learning. The method was used for automatic and quantitative calculation of the areas of adipocytes to measure the change of their cell sizes by decomposing fat due to the browning.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：遺伝子ネットワーク 脂肪細胞 ベイジアンネットワーク 遺伝子発現解析

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトを含めた哺乳類の脂肪細胞はその機能と組織学的な特性により、白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞の2種類に大きく分類される。これらは共に間葉系幹細胞からの分化により生じるが、白色脂肪細胞が余剰のエネルギーを中性脂肪として蓄積するのに対して、褐色脂肪細胞はミトコンドリアでの発熱により、一般組織と比べて約100倍の熱産生能を持つことが知られていた。

(2) 寒冷曝露等の刺激により、一部の白色脂肪細胞について分化転換が生じて褐色化し褐色様脂肪細胞に変化することが報告され、ベージュ脂肪細胞と名付けられた。ベージュ脂肪細胞は褐色脂肪細胞と同様に褐色で熱産生能を持つため表現型では区別できず、遺伝子レベルでの解析が中心に行われていた。しかし、従来の研究はそれらの組織で特異的な発現を示すマーカー遺伝子の探索に留まるものが多く、なぜ一部の白色脂肪細胞だけがベージュ脂肪細胞に変化するかは未解明であった。

### 2. 研究の目的

(1) 褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞の持つ高い熱産生能力は、脱共役タンパク質 UCP1 に起因し、その発現誘導は、サイクリックAMPを介したシグナル伝達によることが知られていた。寒冷刺激を受けても褐色化しない白色脂肪細胞があることからUCP1の発現誘導を抑制するパスウェイが存在することが連携研究者により報告されていた(引用文献)。そこで、本研究では、寒冷刺激により褐色化して熱産生を行うベージュ脂肪組織と、褐色化しない白色脂肪組織について、寒冷刺激後の時系列発現データを取得し、それにより遺伝子ネットワークを推定することで、脂肪細胞の熱産生を促進または抑制する新たなパスウェイの探索を目的とした。

(2) 脂肪細胞の熱産生に関連するパスウェイを探索するために、マウス個体に対して寒冷刺激をかけて、遺伝子発現量の変化を計測し、そのデータをもとに時系列データを取り扱える統計的なグラフィカルモデルであるダイナミックベイジアンネットワークモデルを使って、遺伝子ネットワークを推定する手法の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 連携研究者の協力により、マウス個体から取得した10時点(寒冷刺激なしと、刺激後1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 192, 384時間後であり、各時点3回のレプリケート)の常時熱産生を行っている褐色脂肪組織と、寒冷刺激により褐色化し熱産生を行うベージュ脂肪組織、寒冷刺激を加えても褐色化しない白色脂肪組織の3種類についてRNAを抽出し、マイクロアレイで時系列遺伝子発現データを取得

し、ダイナミックベイジアンネットワークモデルにより遺伝子ネットワークを推定した。

(2) (1)の3種類の組織から、さらに、遺伝子をターゲットとして制御するmicroRNAを抽出し、マイクロアレイにより時系列発現データを取得して、ベイジアンネットワークモデルによりmicroRNAと遺伝子の間の制御関係について推定を行った。

(3) 脂肪細胞の褐色化の過程では、脂肪細胞中の脂肪の分解が起こるため、顕微鏡画像で観察される脂肪細胞の面積が小さくなるなどの変化が生じる。これを自動で解析するため、組織切片画像の深層学習に基づく脂肪細胞の領域検出と面積計算のための画像処理手法を開発した。

### 4. 研究成果

(1) 3.(1)で述べたように、寒冷刺激により褐色化するベージュ脂肪組織と、褐色化しない白色脂肪組織について、それぞれ遺伝子ネットワークの解析を行った。両者を比較した結果、図1に示すようにベージュ脂肪組織での遺伝子ネットワークでは、褐色化を引き起こすUCP1の発現を促進する遺伝子群が同時に炎症性サイトカインの一つであるIL-1 $\beta$ の分泌を抑制していることが示唆されたが、白色脂肪組織ではこのような傾向は見られなかった。実際に、連携研究者がマウスにIL-1 $\beta$ を投与したところ、寒冷刺激下で生じるUCP1の発現誘導が抑制されることが確認された(図2)。脂肪組織中ではIL-1 $\beta$ はマクロファージにより分泌されていると見られ、これが脂肪細胞の褐色化を抑制していることが示された。

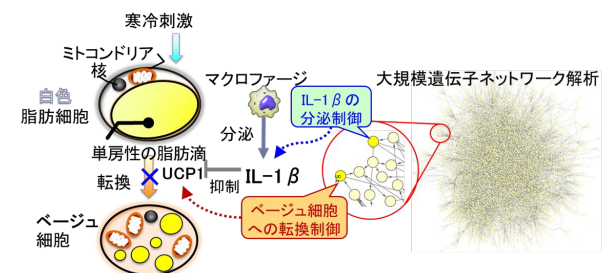


図1 遺伝子ネットワーク解析による脂肪細胞の褐色化抑制の新たな機構の発見

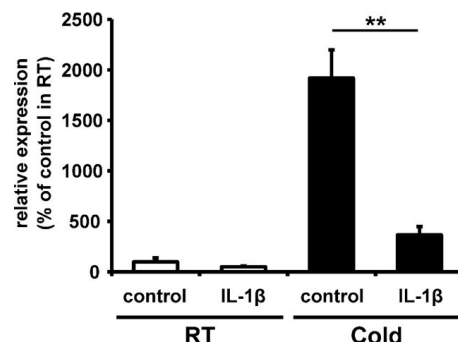


図2 IL-1 $\beta$ の投与によるUCP1発現誘導の抑制(RT室温、Cold寒冷刺激、\*\* $P < 0.01$ )

(2) 遺伝子をターゲットとして制御する因子として microRNA に着目して、microRNA のターゲットとなる遺伝子の予測を試みた。3.(1)で述べた時系列遺伝子発現データに加えて、マウス個体から得られた時点数 6 (各時点で 3 検体) の RNA 検体をもとに、microRNA アレイにより microRNA の時系列発現データを取得した。これをもとに、microRNA のターゲット遺伝子をベイジアンネットワークモデルにより予測した。従来の microRNA のターゲット予測手法は、microRNA が結合するサイトを配列相補性により求めるものが多かったが、配列が短いため偽陽性が多いのが問題となっていた。本研究のように、発現データをもとに予測する手法としては、GenMir++ (引用文献) が知られていたため、既にターゲットが既知の microRNA について、本研究でのベイジアンネットワークモデルによる予測手法と予測結果を比較した (図 3)。興味深いことに、図 3 に示すように GenMir++ は個々の遺伝子に対して、それをターゲットとして制御する microRNA を過度に予測する傾向 (図 3(a)) があり、一方ベイジアンネットワークモデルによる予測では個々の microRNA についてターゲットとする遺伝子を過度に予測する傾向 (図 3(b)) が見受けられた。そこで、両者の予測結果の一致部分を抽出したところ、予測中の正解数は 4 割程度まで減ったものの、偽陽性をその割合以下に抑えることができた (図 3(c))。

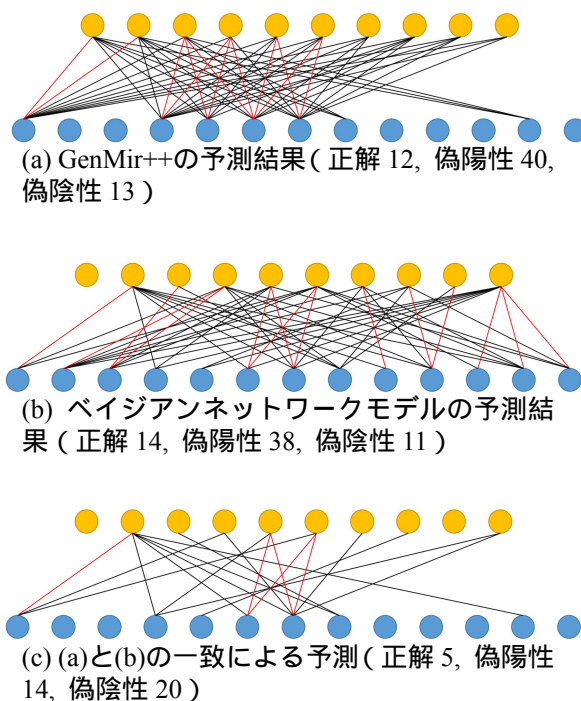


図 3 microRNA のターゲット遺伝子の予測 上段の黄色の丸が microRNA、下段の青色の丸が遺伝子、赤い線が既知のターゲット (正解)、黒い線がそれ以外 (偽陽性)

図 3 は microRNA 数 10, 遺伝子数 13 という小規模なデータでの予測であるが、これを microRNA 数 50, 遺伝子数 50 にまで拡大したところ、正解数、偽陽性数、偽陰性数がそれぞれ、GenMir++ で (18, 524, 7)、ベイジアンネットワークモデルで (10, 532, 15) であったものが、両者の一致を取れば (8, 137, 17) となり、偽陽性数を大幅に減らせることが示された。

(3) 脂肪細胞が褐色化により内部に貯えた脂肪を分解して熱に変換すると、脂肪細胞の面積が縮小することが知られている。そこで、脂肪組織の切片画像から脂肪細胞の領域を抽出し、各細胞の面積を自動計測する手法を、深層学習に基づいて開発した。従来の画像処理ツールとしては、生体画像処理のオープンソースソフトウェア ImageJ 用に提供されている Adipocytes Tools (引用文献) があり、単純セグメンテーション法と分水嶺 (Watershed) セグメンテーション法の 2 種類の手法によりセグメンテーション (領域抽出) が行えるようになっている。両手法は画像に対する平滑化等の前処理が異なるだけで、個々の細胞の領域を抽出するのはどちらの手法でも、画像中の近傍画素の輝度勾配によりセグメンテーションを行う分水嶺法を採用している。分水嶺法は、抽出する細胞の領域が円形や楕円形など境界が明確で規則的な場合には良い結果が得られるが、実際の脂肪細胞では境界が不規則な細胞が多く含まれており、セグメンテーションの精度が低下する原因となっていた。そこで、手作業により脂肪細胞のセグメンテーションを行った結果を教師データとして、畳み込みニューラルネットワークの一つである U-Net により学習させることで、セグメンテーションを行う手法を開発した。セグメンテーションの精度を、各細胞中の画素が正しく細胞領域に分類されていることを示す指標である Adjusted Rand Index で比較した結果を図 4 に示す。

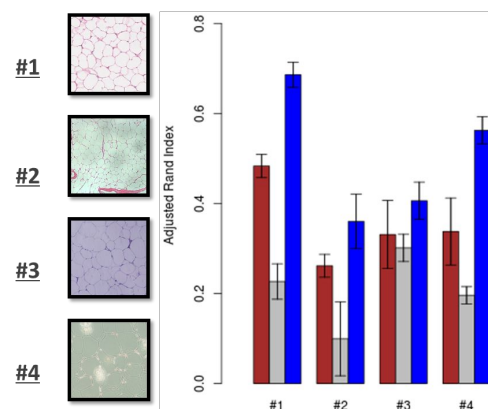


図 4 脂肪細胞のセグメンテーション手法の精度の比較 (#1 ~ #4 はテスト画像を示し、それぞれ標準的な脂肪細胞、細胞が全体に小さい、輝度が全体に低い、一部輝度の高い部分のある画像を示す。グラフは、赤色が従来手法、青色が深層学習の手法を指す)

図4の左の#1~#4はテスト画像を示し、それぞれ標準的な脂肪細胞の画像、脂肪細胞が全体に小さい画像、輝度の低い画像、一部輝度の高い部分のある画像を示す。右側のグラフは、赤色、灰色、青色がそれぞれ、単純セグメンテーション法、分水嶺セグメンテーション法、深層学習による手法の結果を示す。従来のセグメンテーション手法は、標準的な細胞の画像では比較的良好な性能を示すが、標準的でない細胞の画像については分類誤りが見られた。これに対して、本研究の深層学習は、教師データに無い、標準的でない細胞の画像については性能が落ちるものの、従来のセグメンテーション手法と比較すると良好な結果が得られることが示された。

#### <引用文献>

T. Sakamoto, N. Takahashi, Y. Sawaragi, S. Naknukool, R. Yu, T. Goto T. Kawada, Inflammation induced by RAW macrophages suppresses UCP1 mRNA induction via ERK activation in 10T1/2 adipocytes, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Vol.304, pp.C729-C738, 2013, doi: 10.1152/ajpcell.00312.2012  
J. C. Huang, et al., Using expression profiling data to identify human microRNA targets, *Nature Methods*, Vol.4, pp.1045-1049, 2007, doi: 10.1038/NMETH1130  
Adipocytes Tools Wiki, available at: [http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Adipocytes\\_Tool](http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Adipocytes_Tool)

#### 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 6件)

Y. Takenaka, K. Mikami, S. Seno, H. Matsuda, Automated transition analysis of activated gene regulation during diauxic nutrient shift in *Escherichia coli* and adipocyte differentiation in mouse cells, *BMC Bioinformatics*, Vol.19(Suppl.4), pp.49-59, 2018, 査読有, doi: 10.1186/s12859-018-2072-y  
J.-Y. An, H.-F. Jheng, H. Nagai, K. Sanada, H. Takahashi, M. Iwase, N. Watanabe, Y.-I. Kim, A. Teraminami, N. Takahashi, R. Nakata, H. Inoue, S. Seno, H. Matsuda, T. Kawada, T. Goto, A phytol-enriched diet activates PPAR- $\alpha$  in the liver and brown adipose tissue to ameliorate obesity-induced metabolic abnormalities, *Molecular Nutrition & Food Research*, Vol.62, e17000688, 2018, 査読有, doi: 10.1002/mnfr.201700688  
T. Goto, M. Hirata, Y. Aoki, M. Iwase, H. Takahashi, M. Kim, Y. Li, H.-F. Jheng, W.

Nomura, N. Takahashi, C.-S. Kim, R. Yu, S. Seno, H. Matsuda, M. Aizawa-Abe, K. Ebihara, N. Itoh, T. Kawada, The hepatokine FGF21 is crucial for peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  agonist-induced amelioration of metabolic disorders in obese mice, *Journal of Biological Chemistry*, Vol.292, pp.9175-9190, 2017, 査読有, doi: 10.1074/jbc.M116.767590  
T. Goto, S. Naknukool, R. Yoshitake, Y. Hanafusa, S. Tokiwa, Y. Li, T. Sakamoto, T. Nitta, M. Kim, N. Takahashi, R. Yu, H. Daiyasu, S. Seno, H. Matsuda, T. Kawada, Proinflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  suppresses cold-induced thermogenesis in adipocytes, *Cytokine*, Vol.77, pp.107-114, 2016, 査読有, doi: 10.1016/j.cyto.2015.11.001  
Y. Takenaka, S. Seno, H. Matsuda, Detecting the shifts of gene regulatory networks during time-course experiments with a single time point temporal resolution, *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, Vol.13, 1543002, 2015, 査読有, doi: 10.1142/S0219720015430027  
N. Matsushita, S. Seno, Y. Takenaka, H. Matsuda, Metagenome fragment classification based on multiple motif-occurrence profiles, *PeerJ*, Vol.2, e559, 2014, 査読有, doi: 10.7717/peerj.559

#### [学会発表](計 10件)

藪崎隼人, 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, 情報処理学会 第112回数理モデル化と問題解決研究発表会, 2017  
F. Iwasaki, An accurate estimation method for expression profiles of novel transcripts from RNA-Seq data, International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB2016), 2016  
H. Matsuda, A method for reducing false positives of target genes of microRNAs by combining two prediction tools, International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB2016), 2016  
Y. Takenaka, Dynamic analysis of gene regulations using leaving-one-out expression profile, International Conference on Research in Computational Molecular Biology (RECOMB 2016), 2016  
Kazumasa Saito, Bayesian network inference from gene expression profiles with a small number of samples, International Conference on Research in Computational Molecular Biology (RECOMB 2016), 2016  
水野雄太, Deep learningを用いた脂肪組織画像における細胞の認識, 情報処理学

会 第 107 回数理モデル化と問題解決研究会, 2016

Y. Takenaka, Chronological analysis of regulatory strength on gene regulatory networks, 13th European Conference on Computational Biology (ECCB'14), 2014

〔図書〕(計 1 件)

H. Matsuda, Inference of TFRNs (2), pp.97-107, doi: 10.1007/978-1-4939-0805-9\_9, E. Miyamoto-Sato 他編, Transcription Factor Regulatory Networks: Methods and Protocols, Springer-International, 2014, 220

## 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 : 5 0 1 8 3 9 5 0

### (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・准教授  
研究者番号 : 3 0 4 3 2 4 6 2

### (3)連携研究者

河田 照雄 (KAWADA, Teruo)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号 : 1 0 1 7 7 7 0 1