

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21116006

研究課題名(和文) 初期胚細胞動態のインシリコ再構成技術と数理モデルの構築

研究課題名(英文) Informatics and mathematics for In silico reconstruction of mammalian early embryogenesis

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) 50,500,000円、(間接経費) 15,150,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳類着床前胚の4Dイメージデータを対象として、細胞核の位置を99%の精度で自動同定する画像解析アルゴリズムと1%のエラーを補正するGUIを開発した。これらを用いて得られるエラーフリーの細胞位置情報をもとに、細胞移動と細胞分裂に関わる最適化問題を解くことによって細胞集団のトラッキングを実装し、複数の胚でその発生動態をin silicoで再構成した。再構成した細胞系譜に様々な発生の情報をマップすることにより、発生を定量的かつ詳細に解析することが可能となった。また初期胚以外にも活用できる様々なバイオイメージ解析技術、データ解析技術、そして発生にかかわる個別現象の数理モデル構築を行った。

研究成果の概要(英文)：In this work, we developed semi-automatic image analysis system for 4D bio-imaging data of mammalian preimplantation embryos. With this system, we can automatically detect the positions of nuclei with 99% accuracy and manually correct the rest of only 1% error. The detected nuclei are subsequently tracked over time by solving an optimization problem for the association of dividing and moving nuclei. The system enables us to track each mouse embryo from one cell up to 16- to 32-cell stage, and successfully reconstructed developmental dynamics of several embryos. By mapping various properties of embryogenesis onto the lineage of a reconstructed embryo, we can analyze the developmental process quantitatively and dynamically.

We also developed bio-image analysis algorithms, data processing methods, and mathematical models that can be used for a variety of developmental phenomena.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：発生・分化 数理工学 細胞・組織 生体生命情報学 シミュレーション工学

1. 研究開始当初の背景

発生は多細胞の複雑な構造体が3次元空間内に構築される、きわめて複雑な時空間現象である。特にマウスの初期発生過程は大きなゆらぎを内在し決定的には進行しない。そのため、実験・測定技術と理論・情報技術を融合させた包括的なアプローチが現象の解明に不可欠である。開始当時、大腸菌や酵母、培養細胞などの単細胞生物を対象に、バイオイメージングによる細胞動態の実験計測データと画像解析・データ解析・理論モデルを融合した研究が多数報告され、大きな注目を集めていた。我々も培養細胞の概日リズムを対象にリズムの環境応答性とその特異性という問題を解決し、分野融合型生命科学研究の先鞭的研究を複数進めていた。しかし、多細胞の発生過程においてバイオイメージデータの動的情報を定量的に活用した研究は先例がほとんどなく、単細胞での成功を多細胞・高等生物の複雑な現象へと拡張することが大きな課題となっていた。

当時、計画班の藤森グループが世界に先駆けてマウス着床前胚の4D長期イメージングとその解析を実現させており、このデータを中心的な対象として、多細胞発生過程の動態解析を進めることが課題となっていた。また、発生を対象としたバイオイメージデータの定量解析についても先例が少なく、発生に頻出する問題を扱っている画像解析・データ解析・数理モデルの基礎技術や領域を構築することが急務となっていた。

2. 研究の目的

本研究は、様々なバイオ画像解析の技術、細胞の動態のデータ解析技術、個別生命現象の数理モデルの知見を応用し、初期発生現象の理解に不可欠な3つの情報・理論的技術(4D画像解析・動態のデータ解析・数理モデル)を新たに開発することを目的とする。開発した技術を、初期発生の実験データなどに対して適用することによって、発生を構成する基本過程を支配する法則を調べる。さらに数理モデルを組み合わせ、多細胞の確率的動態の原理を探索する。本計画により、哺乳類初期胚にとどまらず、バイオ画像・データに関する技術の統合と新たなバイオイメージングインフォマティクス分野の創成、発生過程をとらえる新しい理論生物学的研究の発展なども期待される。

3. 研究の方法

研究は、画像解析、データ解析、数理モデルの3つの技術の開発を平行して行う。画像解析では、マウスの初期胚データを主な対象として、発生過程動態を再構築する画像解析法を構築する。形状認識、リネージュ追跡などの方法を3Dや4Dに拡張し、様々な条件でのデータにハイスループットに処理できる技術を目指す。また解析結果を目視で補正するためのGUIプログラムも作成する。

データ解析では、多細胞発生動態を特徴化する解析法を、時系列解析や統計解析の技術などを応用して構築する。細胞の空間構造の特徴化、発生過程における細胞状態・位置の定量化などを行う。さらにタンパク立体構造解析技術を応用した解析方法の開発も行う。数理モデルの構築では細胞極性形成、接触による発生動態制御など、発生の基本過程を解析するための数理モデル構築を進める。

4. 研究成果

(1) イメージデータから細胞核の位置を自動同定する画像解析手法の構築。哺乳類着床前胚のデータを中心に、細胞核を蛍光タンパク質でラベル化したデータに関して、核の位置や形状を自動同定する手法を複数開発した。細胞の核を蛍光データから認識する場合の問題として、シグナル強度が核ごとに異なる、解像度が不足している場合や複数の細胞が隣接する場合にその分離が困難になる、などの問題が生じる。前者に対して、異なるシグナル強度で閾値を連続的にとったバイナリデータを用いたグラフ構造を持つオブジェクトと捉え、探索的に核ごとの最適な閾値を決定する手法を考案した。チック初期胚における細胞遊走の2Dデータをプロトタイプデータとして、その有効性を検証した(図1)。

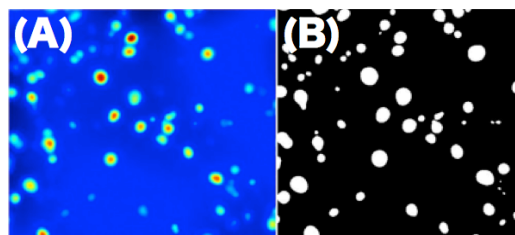


図1: (A) オリジナルの蛍光データ。(B) 本手法による segmentation の例。細かい細胞などが精度よく分離されている。

同じ手法を3Dのマウスデータにも拡張し、比較的良い精度で核を同定できることも明らかにした(図2, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Societyにて報告)。

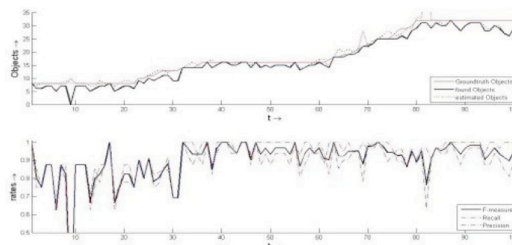


図2: グラフに基づく segmentation をマウスの初期胚データに適用した結果。上段は異なる時間展での正解の核個数との同定された核個数の比較。下段は同定エラーの定量化。

一方、解像度が不足している場合や複数の細胞が隣接する場合にその分離が困難にな

る問題は 2D での核認識でも生じるが、特に 3D の場合、計測系の特性から z 方向の解像度が不十分であることが多く、核認識の最も大きな障害となっている。この問題は哺乳類初期発生データのデータにおいても研究当初から問題となり、集中的な開発を行った。まず、隣接する物体の輪郭認識 (segmentation) よりも、物体の中心の認識 (centroid extraction) の方が隣接物体の同定に関しては高い精度が期待できることから centroid extraction の開発を行った。Centroid の候補となる位置を、イメージデータから推定するため、マルチスケールでのフィルター結果を統合し、異なるサイズの核からのシグナルを最大限エンハンスする方法を開発した。この手法をマウス初期胚のデータに適用することにより、約 90% の精度で核位置が同定できることを示した (図 3, Bashar, *et al.* Plos One 2012)。

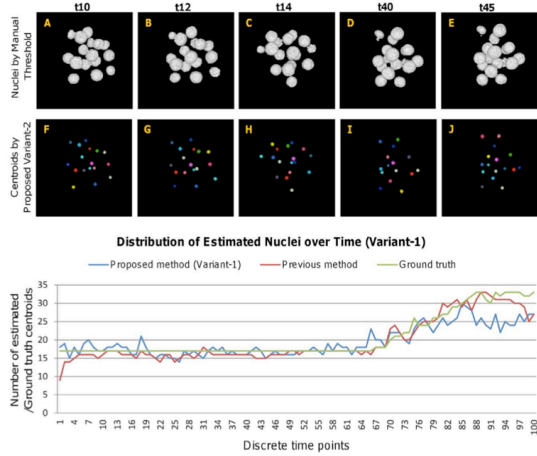


図 3: マルチスケールフィルタリングを用いた哺乳類初期発生の自動核同定の結果。上段が閾値処理をした蛍光輝度データと同定された核重心の比較。下段が各時間点において、同定された核数と正解の核数の間の比較。

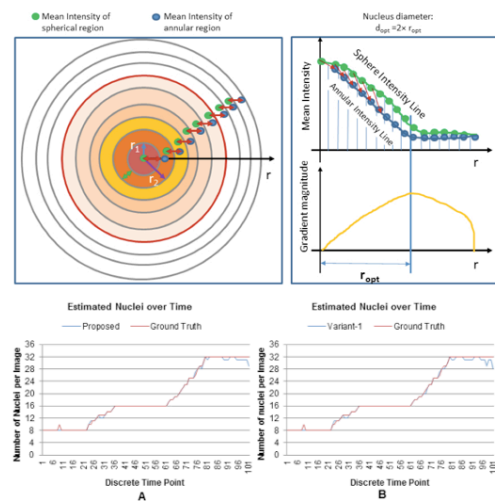


図 4: 上段は蛍光輝度の放射状勾配変化を用いて細胞核の大きさを見積もるアルゴリズム。下段はこの手法を適用した場合の細胞核の自動同定数と正解データとの比較。しかしながら 90% の精度は、初期胚の時間発

展動態を追跡するためには十分でない。そこで、同定された核の重心の候補に対して放射上に蛍光強度の勾配変化を探索して、マルチスケールフィルターで利用される核サイズを見積もり、その情報をフィードバックし、パラメータを最適化する手法を考案した。この改良したアルゴリズムを z 方向の解像度を改良した初期胚の計測データに適用することにより約 99% の核同定の精度を得ることに成功した (図 4, Bashar, *et al.* 2014 投稿中)。

(2) 自動同定された哺乳類着床前胚の細胞核の位置を確認し、改変を加える GUI システムの構築。イメージデータからの核などのオブジェクトの自動認識において、その結果および精度を評価するための GUI システムは不可欠である。マウス初期胚の 4D データを対象に、オリジナルイメージのボリュームレンダリングデータと自動核同定アルゴリズムの結果を対比し、かつその時間発展を追跡できる GUI を汎用データ解析プラットフォームの機能を活用して独自に作成した (図 5)。また、自動同定した結果に存在する誤りを修正するため、3D 内でのオブジェクトを直接、マウス操作で選択・削除・融合・コピー・移動をすることのできる GUI も作成した。これらの GUI を 99% の同定精度を実現したアルゴリズムと併用することにより、ほぼエラーフリーの核位置のデータを 1~32 細胞期にわたって作成することに成功した。この他にも、2D 空間内で運動をする粒子を手動でトラッキングする GUI や分裂する細胞を手動でトラッキングする GUI など作成している。

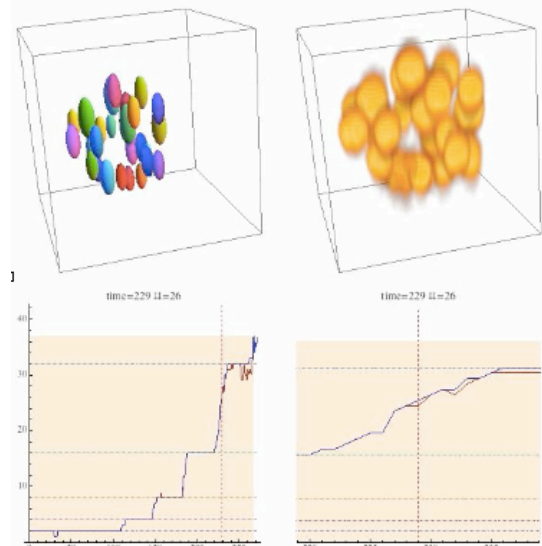


図 5: GUI の表示例。上段左は自動同定のデータ。上段右がオリジナルデータのボリュームレンダリング。下段左は同定された核の個数の時間変化と上段で表示されているデータの時間点を表示。下段右は左の拡大図。

(3) 3D 再構成法や最適化法を用いた細胞増殖過程の追跡技術の開発。移動する細胞の追跡は発生の動態を定量化する上で不可欠の技

術である。この問題に対し、チック初期胚における細胞遊走のデータをプロトタイプとして用いて、2Dにおける細胞追跡のアルゴリズムの開発を行った。アクティブに遊走する細胞は細胞自体が大きく変形し、その結果蛍光で標識される核なども変形する。同定された核の重心間を接続する手法よりも、この変形を考慮した追跡が精度向上にも関連する。そこで、2D空間内で遊走する細胞のタイムラプスデータ(2D+1D)を3D空間内のオブジェクトとみなし、3D空間でのオブジェクト認識としてトラッキングを実装した。ノイズ除去などの適切な前処理の後、本手法で追跡することにより良好な結果を得た(図6)。また同様の手法を粘菌細胞の化学走性データにも適用し、データに依らず有効に利用できることを確認した。

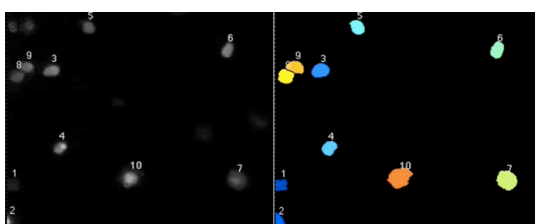


図6: (A)細胞遊走のデータからのトラッキングの例。左がオリジナルデータ。右がトラッキング結果。

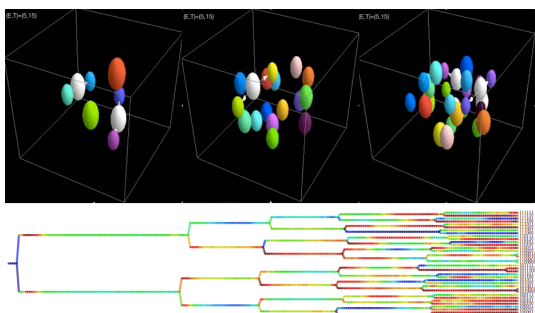


図7: 上段は、最適化による哺乳類初期胚の発生動態のトラッキングの3D表示。下段はトラッキングしたデータを系譜データとして表示した例。

3Dの哺乳類着床前胚の細胞追跡においては、細胞の核の形状は間期にはほぼ球状であり、細胞分裂直前に多少変形し、分裂後、娘細胞の位置が大きく動く。このような場合には、2Dでの手法は十分に機能しない。そこで新たに、時間的に隣り合う3Dデータにおいて、同定された核の重心位置のリストから、細胞の移動距離の和を最小とする最適化問題を解くことによってトラッキングを実現する手法を開発した。この最適化において、分裂細胞の扱いが問題となるが、分裂後、2つの娘細胞はちょうど反対方向に移動する傾向が強いこと、したがって2つの娘細胞の中間位置の近傍に親細胞が存在する、という特性を利用して解決した。最適化問題に娘細胞・親細胞との対応関係を探る問題も組み

込み、距離の最小化と娘細胞・親細胞の対応を同時に解くことによりトラッキングを実現した。マウスの着床前胚のデータに適用することにより1~32細胞期まで高い精度で分裂・発生する細胞を追跡できることを示した(図7)。

(4)上皮細胞の細胞膜の画像解析による同定。細胞核だけではなく細胞の膜をイメージングデータから同定し、細胞の接触関係などを調べることも発生過程の理解には重要である。ハエの羽の上皮細胞を対象に、膜を蛍光タンパク質でラベル化した2Dタイムラプス画像から細胞膜の情報を自動で認識するアルゴリズムの開発を行った。各種空間フィルタリング・モーフォロジー処理などを時間的に個別の画像に適用し、大まかな細胞膜の形状を推定した。タイムラプス画像のS/Nの低さから自動推定された結果は多くのエラーを含む。手動によるエラー訂正を自動の画像解析に組み合わせる方法を開発し、全体として実用に耐える精度を実現した(図8、Harumoto, Kobayashi *et al.* 投稿準備中)。

またこの画像解析手法に関してアルゴリズムにおいて処理に時間がかかるボトルネックの解析を行い、GPUによる並列処理とメモリアクセスの効率化を行うことで既存のアルゴリズムと比較して30倍の高速化も達成した。この方法は哺乳類初期胚における解析の基礎となるものである。

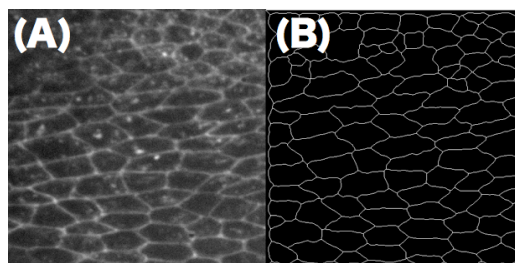


図8: (A)細胞膜を蛍光プローブで計測したオリジナルデータの例。(B)膜の認識アルゴリズムによる処理結果。

(5)ランダムに運動をする細胞や粒子を対象とした統計解析手法の開発。細胞や細胞内分子などを運動は非常に確率的であり、画像から同定し、その運動を追跡した後にその特性を評価するためには統計的な手法が不可欠である。特に細胞運動の方向性のバイアスは、発生における極性形成などに関わるため重要性が高い。ハエの上皮細胞を対象に取得した極性関連タンパク質の小胞運動を対象に、一見ランダムに見える運動に方向性があるかを検定する方法を構築した。小胞の運動はPD軸方向に偏った上で、更にProximal, Distalの中で偏りがあることが分子生物学的な知見から示唆される(Harumoto *et al.*, 2010, *Dev Cell*)。このような多重の偏りをとらえるため von Mises 分布の混合分布を変

分ベイズ法によってフィッティングする手法を活用した。混合分布を利用することによって、混合割合から運動のバイアスを評価することができる。この手法をブートストラップリサンプリング法と組み合わせ、PD 軸の中で小胞の運動に方向の偏りが存在するかどうかを検定する手法を構築した。この手法を変異体などのデータに適用することにより、確かに運動の偏りやその方向が変化することを確認した(図 9, Harumoto, Kobayashi *et al.* 投稿準備中)。この方法は哺乳類初期胚内の細胞遊走などにも活用できると期待される。

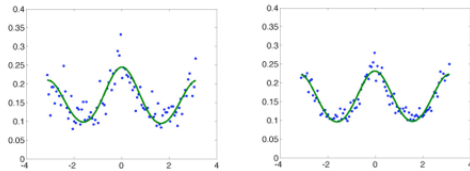


図 9 : 小胞の運動方向のデータに対する混合 von Mises 分布を用いたフィッティングの例。

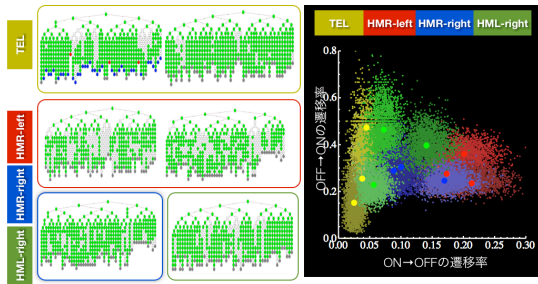


図 10: 左図は解析に用いた細胞分裂の系譜と遺伝子発現の ON/OFF 状態の例。右図は分裂系譜グラフからのリサンプリングにより各種パラメータのばらつきを評価した例。

(6) 増殖する細胞系譜の統計的解析方法。

発生では少数の細胞が分裂を分裂と分化を繰り返し、複雑な形が形成される。しかし分裂と共役した分化のパターンなどはしばしば確率的であることが多く、変異体と野生型を比較して、何らかの差異が生じているのかなどを統計的な観点から定量化する必要がある。そこで酵母のエピジェネティックな遺伝子制御状態を蛍光タンパク質で可視化し、細胞が分裂してゆく過程で制御状態が変化してゆく様を追跡したデータを対象に、発現制御状態の統計的な検定を行う方法を開発した。2つのサンプル間で有意な差が存在するかどうかを、ノンパラメトリックな permutation テストに基づいて検定する方法を構築した。また、実験計測された細胞系譜の部分グラフをランダムにサンプリングしてグラフを再構成し、それを用いてブートストラップ的に検定を行う方法も開発した。この手法を用いて各種変異体間の統計的な差を検出することに成功した。この結果は Plos Biology に掲載された(図 10, Mano, Kobayashi *et al.* Plos Biol, 2013)。また、このような系譜解析の理論基盤として、経路

積分を用いた数理的なアプローチについても検討を行った。この方法は、遺伝子発現と細胞の位置を初期胚内で同時計測したデータ等の解析にも活用できると期待できる。

(7) 細胞の確率的運命決定についての理論構築。発生過程において細胞は確率的に状態を変えつつも、外部からのシグナルと周りの細胞との相互作用を介してその運命を決定してゆく。外部からのシグナルと相互作用依存的に確率的な運命決定が固定してゆくプロセスを理論的に解明するため、複数の運動をする細胞が相互作用を介して運命決定をするモデルを構築・解析した。相互作用を上昇させることによって、集合で運動する細胞群が現れ、相互作用がない場合にも正しく外界からのシグナルを読み取り正確に運動ができることを示した。また、細胞数の増加は必ずしも常に精度を向上するわけではなく、外界からのシグナルのノイズ強度に依存した一定レベルで飽和することも示された(図 11, Kamimura & Kobayashi, 2012, Front. Phys.)。さらにこのような運命決定に関わるゆらぎの大きさとフィードバック機構との関係を解析手法についても検討をしている。

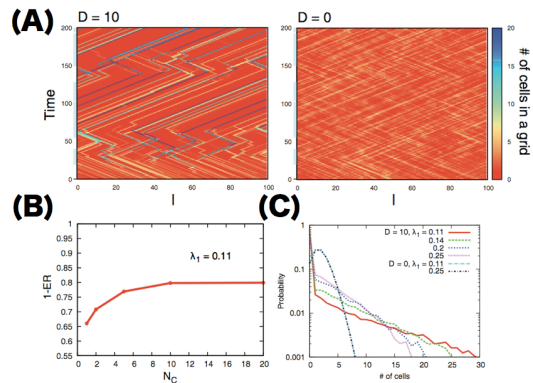


図 11: (A) 相互作用がある場合(左)とない場合(右)についての、場の細胞の密度の時間変化。(B) 細胞数 N_c を変化させた場合の細胞の外場への追従度。(C) 相互作用の強度を変化させた際に遊走細胞が形成するクラスターのサイズ分布。

(8) その他の結果。上記以外にも、3次元空間内で動的に変動する複数の細胞や分子の構造を解析する方法として、KL 距離による確率的ダイナミクスの定量化と PCA を組み合わせた手法の開発も行った(Koyama *et al.* 2011, Phys. Rev. E)。これらの方法は、哺乳類初期胚の細胞配置のデータが十分得られた場合にその構造を評価するために活用できると期待できる。

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 8 件)

① Y. Mano, T. J. Kobayashi, J. Nakayama,

- H. Uchida, M. Oki, "Single Cell Visualization of Yeast Gene Expression Shows Correlation of Epigenetic Switching Between Multiple Heterochromatic Regions Through Multiple Generations", Plos Biology, 査読あり, Vol. 11, 2013, e1001601.
- ② 小林徹也、上村淳, "細胞のふるまいを読み解く時系列に潜む情報量", 実験医学, 査読なし, Vol. 31(8), 2013, 1239-1244.
- ③ 小林徹也, "定量データが切り開く生命科学", 実験医学, 査読なし, Vol. 31(8), 2013, 1202-1208.
- ④ K. Bashar, K. Komatsu, T. Fujimori, T.J. Kobayashi, "Automatic Extraction of Nuclei Centroids of Mouse Embryonic Cells from Fluorescence Microscopy Images", Plos One, 査読あり, Vol. 7(5), 2012, e3550.
- ⑤ A. Kamimura, T. J. Kobayashi, "Information processing and integration with intracellular kinetics near critical point", Frontiers in Physiology, 査読あり, Vol. 3, 2012, 203.
- ⑥ N. Hiroi, T. Okuhara, T. Kubojima, K. Iba, A. Tabira, S. Yamashita, Y. Okada, T.J. Kobayashi, A. Funahashi, "Physiological intracellular crowdedness is defined by perimeter to area ratio of subcellular compartments", Frontiers in Physiology, 査読あり, Vol. 3, 2012, 293.
- ⑦ Y. M. Koyama, T. J. Kobayashi, H. R. Ueda, "Perturbation analyses of intermolecular interactions", Physical Review E, 査読あり, Vol. 84, 2011, 026704.
- ⑧ T. Harumoto, M. Ito, Y. Shimada, T. J. Kobayashi, H. R. Ueda, B. Lu, T. Uemura, "Atypical Cadherins Dachsous and Fat Control Dynamics of Noncentrosomal Microtubules in Planar Cell Polarity", Developmental cell, 査読あり, Vol. 19, 2010, 389-401.

[学会発表] (計 35 件) うち招待講演 20 件

- ① T.J. Kobayashi, "Bayesian Information Processing in Stochastic Biological Systems", International Conference of Noise and Fluctuation 2013, Montpellier, France, 2013.
- ② T.J. Kobayashi, "Information Decoding in Microscopic Biological Processes", 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2013.
- ③ T. J. Kobayashi, "Dynamic Information Processing in Biological Sensing Systems", Nonlinear Theory and Its

Applications 2013, 2013.

- ④ T.J. Kobayashi, "Dynamics of Bayesian Inference and its Application to Cellular Decision-Making", Information, probability and inference in systems biology (IPISB 2013), 2013.
- ⑤ 小林 徹也, "情報ダイナミクスの生命科学", 生命医薬情報学連合大会 - 情報計算化学生物学会, 2012.
- ⑥ 小林 徹也, "定量的な生命科学と情報・数理技術", 第 84 回日本生化学会大会, 2011.
- ⑦ 小林 徹也, "バイオイメージングと画像情報処理の技術: 定量的な解析にむけて", 日本顕微鏡学会第 55 回シンポジウム, 2011.
- ⑧ 小林徹也, "定量的な生命科学とバイオイメージング", 第 19 回 日本バイオイメージング学会学術集会, 2010.
- ⑨ 小林徹也, "細胞機能としての情報処理", 分子生物学会 年会, 2010.

[図書] (計 0 件)

[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

<http://research.crmind.net>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

舟橋 啓 (FUNAHASHI, Akira)
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号: 70324548

(3) 連携研究者

広井 賀子 (HIROI, Noriko)
慶應義塾大学・理工学部・講師
研究者番号: 20548408

(4) 連携研究者

本多 久夫 (HONDA, Hisao)
兵庫大学・健康科学部・教授
研究者番号: 10289118