

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12525

研究課題名(和文)リアルタイム生体イメージングによる網羅的な細胞動態の解析

研究課題名(英文)Comprehensive and Systematic Analysis of Cell Migration Dynamics by Real-Time Bioimaging

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：複雑で計測が困難な生体組織内の環境を、遊走細胞を一種のプロープとして導入し、その細胞の動態を顕微鏡で観察することで、細胞を取り巻く生体組織内の環境についての知見を得ることを目的とした。その結果、炎症状態での細胞の動態が炎症の種類(アレルギー性炎症と感染性炎症など)によって大きく異なることを見出した。また、生体組織中で複数の種類からなる細胞集団同士の混雑度を測る指標を考案し、骨組織中の骨芽細胞と破骨細胞の混合度を解析した結果、骨芽細胞と破骨細胞の集団が相互に接触している領域と、そうでない領域をイメージング解析で定量的に判別できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きた動物の体内には、多様な種類の細胞が存在し、互いに相互作用しており、そこに異常が生じると疾患となると考えられている。それらの細胞間相互作用を生体内で直接観察することは困難であるため、本研究では生理活性物質の濃度により遊走が変化する免疫細胞を一種の生体プロープと考え、生体内での免疫細胞の動態を観察することで、生体内の環境状態を間接的に判別することを考えた。その結果、同じような種類の炎症であっても免疫細胞の遊走パターンが全く異なるものがあることを明らかにした。また、異なる種類の細胞どうしの混ざり具合を定量的に表す指標を考案し、細胞間相互作用との関連性を示した。

研究成果の概要(英文)：Intravital imaging by multi-photon excited microscopy has been used for analyzing the migration dynamics of cells in animal bodies. However, it is still difficult to identify the complicated environment surrounding migrating cells. For this reason, we have analyzed the environment by regarding migrating cells as some types of probes to explore the environment surrounding the cells. As a result, we have detected that the cell migration patterns are very different depending on the types of inflammation. Moreover we have designed an indicator to describe the degree of mixture of two cell types. Using the indicator, we have successfully analyzed the cell-cell interactions between bone construction and destruction cells in mouse bone marrow.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：細胞イメージング イメージング解析 セグメンテーション 細胞追跡

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

1. 研究開始当初の背景

- (1) 生体内では多様な細胞集団が種々の生理活性物質を通じて相互作用していると考えられているが、生体内を直接計測するのは困難であるため、その詳細なメカニズムは十分に解明されているとは言い難かった。
- (2) 近年、intravital imaging という新たなイメージング観察技術が開発され、生きたままの体内での細胞を直接観察することが可能となり、細胞を一種のプロブとしてその動態を観測することで、生体内の細胞が置かれている環境を推定することができる可能性がでてきた。

2. 研究の目的

- (1) 生体内を生きたままに観察し、細胞の動態をリアルタイムで解析できる intravital imaging により、血管内の免疫細胞の動態を画像解析することで、免疫細胞と血管内皮細胞との相互作用や炎症の有無とその進行が細胞動態に与える影響を定量的に解析することを目的とした。
- (2) (1)の定量的解析の結果を基にして細胞動態を表現する数理モデルを構築する。その数理モデルを使って、個々の生体環境下での細胞動態からその生体環境での炎症等の進行度を予測する。これにより、従来よくわかっていなかった炎症の発症メカニズムについての知見を得ることを目的とした。

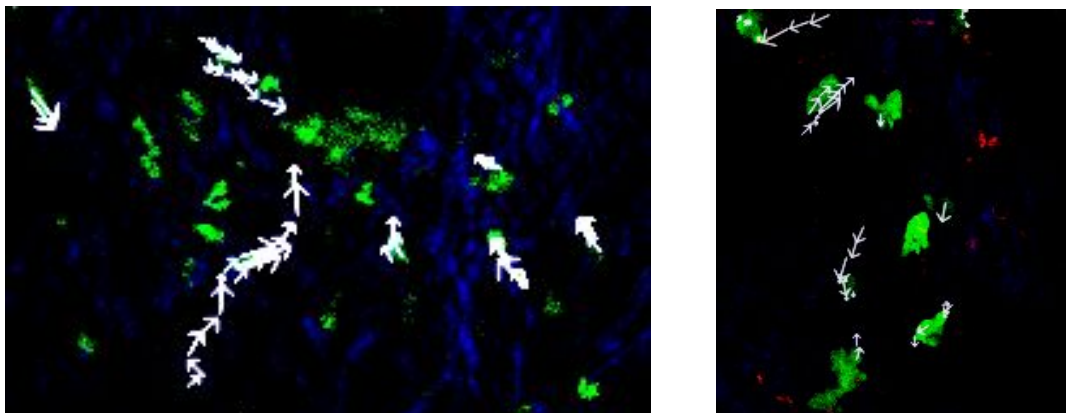
3. 研究の方法

- (1) intravital imaging データから炎症状態での細胞動態の解析を行った。細胞の動きを検出する方法として、オプティカルフローに基づく手法を用いることで、血管中の環境変化に対する免疫細胞の遊走の変化を解析した。
- (2) 免疫細胞の細胞動態の数理モデルを構築した。数理モデルとしては、血流による輸送と血管内皮との接着による相互作用を定量化するため、前述の細胞領域の速度変化に加えて、細胞追跡手法の高精度化を行った。本手法は、細胞の移動をモデル化した大域的な領域対応付けに基づいており、まず信頼度の高い局所的な対応付けであるトラックレットを生成し、それを周囲に拡大して大域的に最適化することで全体の細胞の軌跡を作成した。
- (3) 細胞集団の混合度を表す指標を考案し、細胞間相互作用の予測に応用した。生体組織中で種類の異なる複数の細胞の空間的な配置をもとに、異なる種類の細胞間での相互作用の量を予測した。
- (4) 深層学習により、細胞領域のセグメンテーション精度を向上させた。細胞の動きを検出するには、顕微鏡画像中での細胞領域を検出するセグメンテーションと組み合わせることで、画像のノイズ等による細胞以外の領域の見せかけの移動を誤検出することを抑制することができる。そこで、深層学習により細胞領域を学習させ、細胞領域のセグメンテーションを行う手法を開発した。深層学習により領域認識の精度を向上させるには、できるだけ多くの学習データで学習させることが必要となるため、画像類推を用いた学習データ拡張により、顕微鏡の撮像条件や画像のコントラストの違いを意識した多様な学習データを生成することで学習データを量的だけでなく質的にも増やすことにより、細胞領域のセグメンテーション精度を向上させた。

4. 研究成果

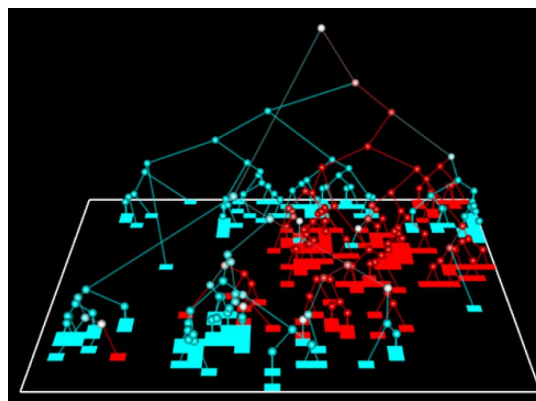
- (1) intravital imaging データから炎症状態での細胞動態を、オプティカルフローに基づく手法を用いることで、血管中の環境変化に対する免疫細胞の遊走の変化を解析した。イメージングのデータとしては、炎症誘導物質であるリボ多糖の投与の有無で分けた2種類のマウスの血管を2光子励起顕微鏡で経時的に観察した動画データを使用した。炎症部位として、免疫細胞と血管内皮との相互作用の領域を求めるのに、単純に速度ベクトルが小さい領域を求めてしまうと、免疫細胞が全くないかごく少数しか存在しなかった領域も含まれてしまう恐れがある。そこで、細胞領域と背景の2状態の隠れマルコフモデルを作成し、画像中の画素ごとの輝度情報の時間的な変化をもとにモデルを最適化することで、各時点でその画素が細胞領域か背景かを判別する手法を開発した。前述のオプティカルフローの速度ベクトルとこの領域判別法とを組み合わせることで、細胞領域でかつ速度ベクトルが小さい領域を炎症部位の候補として検出することができた。
- (2) 細胞の動きを検出するため、オプティカルフローに基づく手法を用いて、異なる刺激を与えたときの免疫細胞の遊走の変化を解析した。イメージングのデータとしては、アレルギー性炎症と感染性炎症の2種類の炎症を誘導する刺激剤を加えたマウスの皮下組織を、2光子励起顕微鏡で経時的に観察した動画データを使用した。細胞の移動度を表す速度ベ

クトルだけでなく、連続的な時間変化における速度ベクトルを連結した細胞移動の軌跡を求めることで、細胞の移動度と移動方向を検出できるようにした。この結果、これら2種類の炎症において免疫細胞の動態が大きく異なるという知見が得られた。下図で、左がアレルギー性炎症、右が感染性炎症での免疫細胞（緑色の領域）の移動軌跡（白い矢印で結んだもの）を指す。アレルギー性炎症では、細胞が特定の場所に向かうような移動軌跡を示した。



- (3) 免疫細胞の遊走追跡のための数理モデルの構築を行った。このモデルは、細胞の移動をモデル化した大域的な領域対応付けに基づいており、まず信頼度の高い局所的な対応付けであるトラックレットを生成し、それを周囲に拡大して大域的に最適化することで全体の細胞の軌跡を作成するが、そのときの細胞間の対応付けの信頼度は距離が近いほど高く定められている。しかし、免疫細胞は短時間で急激に移動する細胞とそうでないものが混在しているため、一律に決定することが難しい。そこで、移動のパターンごとに細胞を分類し、それぞれで信頼度を調整することで、より精度の高い細胞追跡手法を開発した。

- (4) 細胞集団の混合度を表す指標を考案し、骨組織中の破骨細胞と骨芽細胞の混合度を解析した。従来は、生体組織の画像からの細胞の空間配置の解析においては共局在を扱うものが多かった。異なる種類の細胞群の相対的な配置は相互作用の情報を含んでおり、すなわち群間で相互作用する必要がある場合は空間的な分布にも相関がみられると考えられる。このような相互作用の量を詳細に定量化するには、単なる共局在に加えて各細胞群が排他的に形成している集団間での混じり具合を評価する必要がある。そこで本研究では、細胞集団の混じり具合と、排他的な集団形成の度合いを定量化する指標として CMI (cell mixture index) を考案した。実際に CMI を用いて、骨組織中の破骨細胞と骨芽細胞の混合度を解析した結果、骨芽細胞と接触している破骨細胞では、接触していない破骨細胞と比較して、骨を溶かす機能が低いことを示した。



- (5) 深層学習による細胞領域のセグメンテーションを、実際にマウス脂肪組織での脂肪細胞の認識に応用した。脂肪組織での脂肪細胞のセグメンテーションでは、脂肪細胞が持つ画像領域としての特徴が少なく、画像の撮像条件の違いや画像中のノイズの影響を受けやすいため、画像処理による自動認識が困難であった。3.(4)で述べた手法により、撮像条件やノイズを考慮した多様な学習データを生成することができ、これにより、高脂肪食による負荷をかけ、肥満させたマウスにおける脂肪細胞の拡大を画像処理により検出することに成功した。このセグメンテーション手法を使うことで、アドレナリン刺激による脂肪細胞での脂肪の分解とエネルギー消費を DPP-4 (ジベチルペプチダーゼ-4) が阻害していることを見つけて、その影響を定量的に計測することができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

K. Takeda, H. Sawazaki, H. Takahashi, Y.-S. Yeh, H.-F. Jheng, W. Nomura, T. Ara, N. Takahashi, S. Seno, N. Osato, H. Matsuda, T. Kawada, T. Goto, The dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor teneligliptin enhances brown adipose tissue function, thereby preventing obesity in mice, FEBS Open Bio, 査読有, Vol.8, pp.1782-1793, 2018

DOI: 10.1002/2211-5463.12498

M. Furuya, J. Kikuta, S. Fujimori, S. Seno, H. Maeda, M. Shirazaki, M. Uenaka, H. Mizuno, Y. Iwamoto, A. Morimoto, K. Hashimoto, T. Ito, Y. Isogai, M. Kashii, T. Kaito, S. Ohba, U. Chung, A. C. Lichtler, K. Kikuchi, H. Matsuda, H. Yoshikawa, M. Ishii, Direct cell-cell contact between mature osteoblasts and osteoclasts dynamically controls their functions *in vivo*, Nature Communications, 査読有, Vol.9, 2018

DOI: 10.1038/s41467-017-02541-w

H. Shigeta, T. Mashita, J. Kikuta, S. Seno, H. Takemura, M. Ishii, H. Matsuda, Bone marrow cavity segmentation using graph-cuts with wavelet-based texture feature, Journal of Bioinformatics and Computational Biology, 査読有, Vol.15, 2017

DOI: 10.1142/S0219720017400042

〔学会発表〕(計9件)

赤沢秀樹, 渡邊誓旅, 繁田浩功, 間下以大, 瀬尾茂人, 松田秀雄, 細胞画像のセグメンテーション精度向上のための画像類推を用いた学習データ拡張, 第21回画像の認識・理解シンポジウム MIRU2018, 2018

嶋田彩人, 繁田浩功, 瀬尾茂人, 池田わたる, 竹中要一, 松田秀雄, 蛍光顕微鏡画像のためのグラフカットによる毛細血管の抽出手法, 第16回画像の認識・理解シンポジウム MIRU2017, 2017

S. Seno, M. Furuya, J. Kikuta, M. Ishii, H. Matsuda, A method of bioimage analysis for spatial pattern of cellular interaction and intercalation, International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology and European Conference on Computational Biology (ISMB/ECCB 2017), 2017

H. Matsuda, H. Shigeta, S. Seno, J. Kikuta, M. Ishii, Analyzing cell migration dynamics from intravital imaging by deformable image matching, International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology and European Conference on Computational Biology (ISMB/ECCB 2017), 2017

伊藤澄美, 瀬尾茂人, 繁田浩功, 菊田順一, 竹中要一, 石井優, 松田秀雄, 細胞個体の移動傾向の違いを考慮したグローバルデータアソシエーションを用いた細胞追跡手法, 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

繁田浩功, 間下以大, 菊田順一, 瀬尾茂人, 石井優, 松田秀雄, 模様特徴量とグラフカットを利用した生体骨組織の骨髓腔の領域分割, 第5回生命医薬情報学連合大会, 2016

繁田浩功, 間下以大, 菊田順一, 瀬尾茂人, 竹村治雄, 松田秀雄, 石井優, ウェーブレット変換を用いた生体骨組織の骨髓腔の領域分割手法, バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ, 2016

松原周平, 瀬尾茂人, 西澤志乃, 菊田順一, 竹中要一, 石井優, 松田秀雄, オプティカルフローとウェーブレット解析を用いた白血球の動態の解析手法, バイオイメージ・インフォマティクスワークショップ, 2016

H. Shigeta, T. Mashita, J. Kikuta, S. Seno, H. Takemura, H. Matsuda, M. Ishii, A bone marrow cavity segmentation method using wavelet-based texture feature, International Conference on Pattern Recognition (ICPR2016), 2016

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 評価方法、評価装置およびプログラム

発明者: 石井優、菊田順一、松田秀雄、瀬尾茂人

権利者: 石井優、菊田順一、松田秀雄、瀬尾茂人

種類: 特許

番号: 特願 2018-007571

出願年: 2018

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 瀬尾 茂人

ローマ字氏名: (SENO, Shigeto)

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 大学院情報科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30432462

(2)連携研究者

連携研究者氏名：石井 優

ローマ字氏名：(ISHII, Masaru)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院生命機能研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 10324758