

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12218

研究課題名（和文）生体イメージングと数理を融合した表現型解析に基づく遺伝疾患解明へのアプローチ

研究課題名（英文）Bioimaging and computational approach to elucidate genetic diseases based on phenotypic analysis

研究代表者

齋藤 卓（Saitou, Takashi）

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60588705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、個体全身のイメージングが可能なメダカを用いて系統間の表現型比較解析を可能とする計測・解析技術を構築し、疾患に関わる遺伝背景の解明に向けた研究を目的とした。まず、メダカ稚魚の全身に渡る高解像3次元細胞観察のために、広視野・高分解能2光子励起ライトシート顕微鏡の開発を行った。この顕微鏡を用いて骨異常を有する変異体系統の計測・解析を進め、骨形態を局所特徴量記述子によって定量化する方法を考案し、メダカ変異体系統を個体レベルで比較する方法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝学的な未解決問題をより基礎的な立場から検証するためにモデル生物を利用した計測・解析の方法論の発展は極めて重要である。メダカの利点は近交系の樹立が可能であることで遺伝学研究において脊椎動物としてユニークなモデルとなる。本研究では近年急速に発展している蛍光計測技術および画像解析技術の応用により定量的な個体解析から遺伝学へ結びつける研究を目的とした。今後これまで捉えられなかった表現型の検出から遺伝背景の理解が可能となると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to construct measurement and analysis techniques that enable phenotypic comparative analysis between medaka strains, which can image the whole body of individuals, in order to elucidate the genetic background related to diseases. First, we developed a wide-field, high-resolution two-photon excitation light sheet microscope for observing cells throughout the body of juvenile medaka fish. Using this microscope, we proceeded with the measurement and analysis of mutant strains with bone abnormalities, and devised a method for quantifying bone morphology using a local feature descriptor, and developed a method for comparing medaka mutant strains at the individual level.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：バイオイメージング 蛍光イメージング 光学顕微鏡 画像解析 メダカ 遺伝統計学

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム配列解読技術の発展により多因子遺伝疾患の原因解明に向けたゲノム医学研究が大きく進展しているが、未だ疾患と疾患感受性遺伝子の因果的理解は十分ではない。今後はモデル動物を利用した遺伝的多型と疾患の量的関連性を明らかにする方法論の発展が重要である。メダカは小型の淡水魚で脊椎動物のモデル生物として広く利用されてきた。全ゲノム配列が解読され、メダカとヒトの間でゲノムに多くの共通性があることが明らかになり、遺伝子機能解析の重要なリソースとなっている。また一方で、小型であるために個体全身の蛍光イメージングによる表現型解析に適した生物である。したがって、メダカと先端画像計測・解析技術を駆使することでヒトでは解析することが困難な疾患の原因特定のための方法論の創出が期待される。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究では技術開発として、独自のシングルセル光イメージング装置とメダカ系統間の表現型比較解析が可能な画像情報解析法の構築を行い、疾患に関わる遺伝背景の解明に向けた研究を目的とした。

3. 研究の方法

上記目的のために、本研究では、メダカ個体全身で 3次元高解像度計測が可能なライトシート顕微鏡の開発、顕微鏡の生体応用とメダカ全身での骨組織の 3D 蛍光イメージング、画像解析による骨形態の量的評価法の構築を行った。

4. 研究成果

広視野高分解能 2光子励起ライトシート顕微鏡の開発

ライトシート顕微鏡は照射系と検出系が別れた蛍光顕微鏡システムで、検出対物レンズの焦点面に側面からシート状の蛍光励起光を入射しその光学切片をカメラで撮像することで高速・高解像にイメージング可能な装置である。近赤外光を蛍光励起光源とする 2光子励起現象の利用は、光毒性の低減および生体深部到達性の向上の観点から生体イメージングに有用であり動物の観察に適している。しかしながら、2光子励起のライトシート顕微鏡への応用には励起範囲(ライトシート顕微鏡では“視野範囲”)の狭さが問題となっていた。我々はこの問題を解決するために、レーザー集光範囲を光軸方向に伸長させる(励起範囲を広げる)ベッセルビームを用いて広視野化を実現した顕微鏡システムを構築した(図 1)。ベッセルビームは非回折ビームの一つで、リング形状のビームをレンズに入射することで形成され、中心スポットのビーム形状がニードルのように光学軸方向に伸長する。我々は 2光子励起に必要なエネルギーの損失を大きく抑制したベッセルビーム光学ユニットを開発した。拡大率 10 倍の対物レンズを用いた場合に、軸方向分解能を 2-3 μm に保ったままビーム長 1000 μm を達成し、従来技術(視野範囲 600 μm 、分解能 2 μm)からの改善を果たした (Takanezawa et al, Nat Commun 2021)。

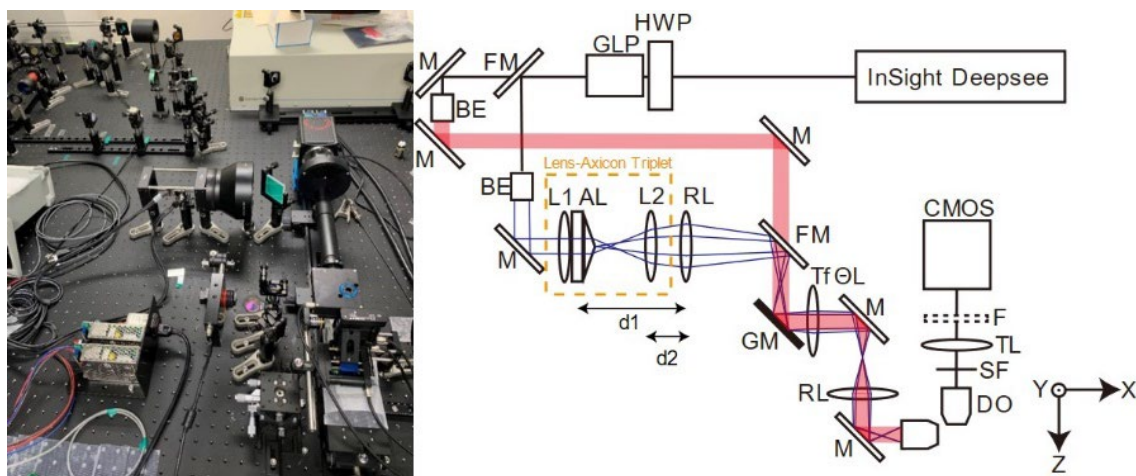


図 1. 近赤外光ベッセルビームを用いた 2光子励起ライトシート顕微鏡。

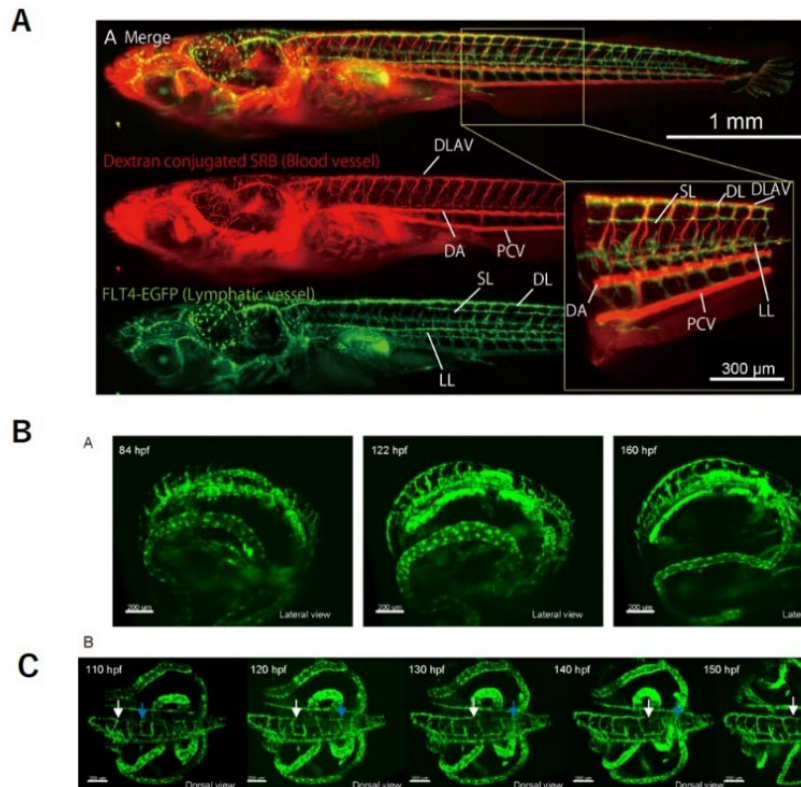


図 2. (A) メダカ稚魚全身の血管・リンパ管 3 次元イメージング. (B,C) リンパ管内皮細胞を緑色蛍光タンパク質で遺伝的に標識したメダカを用いてリンパ管形態形成過程を 3 日間に渡って経時的に観察. 画像は論文 [Takanezawa et al, Nat Commun 2021]より転載.

顕微鏡の生体応用性評価とライブイメージング応用

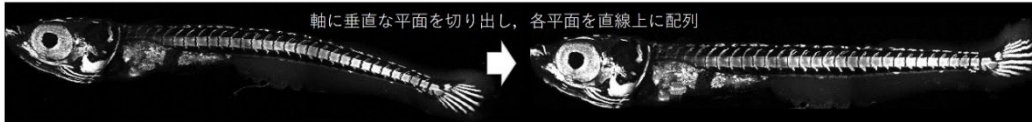
生体応用のために、この顕微鏡の持つ低光毒性能について評価を行った。その結果、今回開発したベッセルビームを用いた顕微鏡はガウシアンビームを用いた従来のライトシート顕微鏡と比べ光毒性が格段に低いことが示され、ライブイメージングに適していることが示唆された。今回開発した光シート顕微鏡をメダカ全身脈管系の観察に応用したところ、広視野と高解像度で生きたメダカの全身を細胞レベルで観察する 3 次元蛍光画像計測に成功した (図 2)。さらに長期間に渡るライブイメージングへの応用として、リンパ管発生過程の観察を行った。リンパ管内皮細胞を緑色蛍光タンパク質で標識したメダカ (FLT4-EGFP 系統) を利用して、z 方向 2 μ m 間隔での 3 次元画像計測 (撮像速度 100ms/slice で、約 700 枚の画像からなる 3 次元像を 2 分程度で撮影) を 5 分間隔で行い、発生を阻害せずに 3 日間 (80 hour post fertilization (hpf) から孵化 160hpf) に渡るタイムラプスイメージングに成功した (図 3B,C)。

メダカ全身骨形態の計測と定量形態解析

メダカの骨特異的な蛍光画像計測のため、カルセインによる標識法について検討し、蛍光試薬溶液の濃度等の最適条件を決定した。メダカの骨異常を有する変異体として脊椎骨の癒合がみられる Fused 系統を導入し、上記の 2 種の蛍光試薬によってその骨異常の解析が全身にわたって生きたまま可能であることを示した。

メダカ系統間の比較を行う画像解析方法として、(A)形態標準形の構築と(B)形態特徴量抽出の 2 つの項目について研究を進めた。(A)においては、メダカの形態特徴を考慮した画像レジストレーション法を構築し、個体間での撮像のばらつきを補正する方法を考案した (図 3)。(B)においては、画像レジストレーションを行った画像に対して特徴量記述子による解析を進めた。特徴量記述子 SURF, KAZE, BRISK 法を用いて骨形態の数値化と判別分析による解析を行ったところ SURF による特徴の記述が優れていることが判明した。画像の局所特徴量記述子を用いて形態ランドマーク点の抽出と骨形態の数値化を行い、特徴量空間における確率場を構築し、最尤推定法による特徴点推定法の検討を行った。野生型、変異体での形態特徴量の分類が十分な精度で可能であることを検証することができた。形態特徴量とゲノム情報の関連解析に関して、複数のメダカ変異体系統群を導入する予定であったがコロナ禍の様々な制限の下、導入がうまく進まなかった。代わりにゲノム編集技術のメダカへの応用を進め、遺伝子ノックアウトのための各種配列の設計とコンストラクト作成を進めた。

◆ 大域的レジストレーション



◆ 特徴量空間の構成と形態定量化

1. マニュアル特徴点抽出
2. 特徴量記述子による特徴量ベクトル (SURF:128次元, BRISK:64次元) の構成
3. 特徴量ベクトルの主成分分析

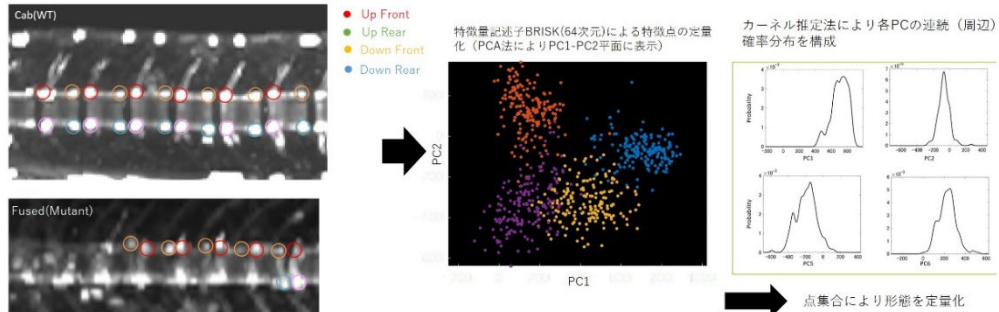


図3. 骨形態の定量解析. (上) 大域的レジストレーション. 頭尾軸に垂直な平面を切り出し、各平面を直線状に配列することでレジストレーションを行う. サンプルングによるぶれを補正し一様な画像解析を行うことができる. (下) 骨形態特徴量の抽出と定量化. 形態ランドマーク点を抽出し、局所特徴量記述子により特徴量空間における確率場を構築し、点群集合により形態の特徴づけを行う方法を構築.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kana Kobayashi-Taguchi, Takashi Saitou, Yoshiaki Kamei, Akari Murakami, Kanako Nishiyama, Reina Aoki, Erina Kusakabe, Haruna Noda, Michiko Yamashita, Riko Kitazawa, Takeshi Imamura, Yasutsugu Takada	4. 巻 27
2. 論文標題 Computer-Aided Detection of Quantitative Signatures for Breast Fibroepithelial Tumors Using Label-Free Multi-Photon Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27103340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takanezawa Sota, Saitou Takashi, Imamura Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Wide field light-sheet microscopy with lens-axicon controlled two-photon Bessel beam illumination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23249-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 今村健志, 川上良介, 齋藤卓	4. 巻 480
2. 論文標題 次世代バイオイメージング実現のための技術開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 OPTRONICS	6. 最初と最後の頁 93-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 齋藤卓, 高根沢聡太, 今村健志	4. 巻 39
2. 論文標題 生きたままの生物を長期間観察できる2光子励起光シート顕微鏡の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3055-3058
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 齋藤卓, 高根沢聡太, 今村健志	4. 巻 59
2. 論文標題 生きたままの生物を長期間観察できる広視野・高分解能2光子励起ライトシート顕微鏡	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 光技術コンタクト	6. 最初と最後の頁 38-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiaki Sugihara, Naoto Inai, Thomas Baumgartner, Ryosuke Kawakami, Takashi Saitou, Takeshi Imamura, Masayasu Taki, Takeshi Yanai, Shigehiro Yamaguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Donor-acceptor-acceptor-type near-infrared fluorophores that contain dithienophosphole oxide and boryl groups: Effect of the boryl group on the nonradiative deca	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1SC00827G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Junichi Kushioka, Takashi Kaito, Rintaro Okada, Hiroyuki Ishiguro, Zeynep Bal, Joe Kodama, Ryota Chijimatsu, Melanie Pye, Masahiro Narimatsu, Jeffrey Wrana, Yasumichi Inoue, Hiroko Ninomiya, Shin Yamamoto, Takashi Saitou, Hideki Yoshikawa, Takeshi Imamura	4. 巻 8
2. 論文標題 A novel regulatory mechanism against BMP/Smad signaling by Smurf2 in bone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Research	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41413-020-00115-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ieda Takeshi, Tazawa Hiroshi, Okabayashi Hiroki, Yano Shuya, Shigeyasu Kunitoshi, Kuroda Shinji, Ohara Toshiaki, Noma Kazuhiro, Kishimoto Hiroyuki, Nishizaki Masahiko, Kagawa Shunsuke, Shirakawa Yasuhiro, Saitou Takashi, Imamura Takeshi, Fujiwara Toshiyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of epithelial-mesenchymal transition in an inflammatory microenvironment? colorectal cancer network	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52816-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Usui Keiko, Kadono Nanako, Furuichi Yuki, Shiraga Keiichiro, Saitou Takashi, Kawasaki Hiroshi, Toyooka Kiminori, Tamura Hiroomi, Kubo Akiharu, Amagai Masayuki, Matsui Takeshi	4. 巻 94
2. 論文標題 3D in vivo imaging of the keratin filament network in the mouse stratum granulosum reveals profilaggrin-dependent regulation of keratin bundling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 346 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2019.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 齋藤卓, 今村健志
2. 発表標題 広視野 2 光子励起ライトシート顕微鏡のライブイメージングへの応用
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第 4 2 回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤卓, 今村健志
2. 発表標題 広視野型 2 光子励起ライトシート顕微鏡の開発
3. 学会等名 第 3 0 回日本バイオイメージング学学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤卓
2. 発表標題 2光子励起ライトシート顕微鏡の開発とin vivo細胞解析
3. 学会等名 第 6 回細胞ダイバース公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Saitou
2. 発表標題 Wide Field Light-Sheet Microscopy with Lens-axicon Controlled Two-photon Bessel Beam Illumination
3. 学会等名 Virtual TGF meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤卓, 今村健志
2. 発表標題 多光子励起自家蛍光スペクトルイメージングと機械学習を利用した肝線維化病態のデジタル診断
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Saitou, Sota Takanezawa, Takeshi Imamura
2. 発表標題 Whole body analysis of Medaka embryos with wide-field 2-photon light-sheet microscopy
3. 学会等名 Resonance Bio International Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Saitou, Takeshi Imamura
2. 発表標題 Wide-field 2-photon light-sheet microscopy and its application to whole body imaging of medaka embryos
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of The Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Saitou, Sota Takanezawa, Takeshi Imamura
2. 発表標題 Wide-field 2-photon light-sheet microscopy and its application to cancer research using Medaka
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Saitou, Sota Takanezawa, Takeshi Imamura
2. 発表標題 Whole body analysis of Medaka embryos using wide-field 2-photon light-sheet microscopy
3. 学会等名 The 25th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤卓, 高根沢聡太, 今村健志
2. 発表標題 広視野 2光子ライトシート顕微鏡の開発とメダカ個体丸ごとイメージング
3. 学会等名 第44回レーザー顕微鏡研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ライトシート顕微鏡用長距離伝搬ビーム形成レンズユニット及び長距離伝搬ビーム形成方法	発明者 齋藤卓, 高根沢聡太, 今村健志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-222518	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今村 健志 (Imamura Takeshi)	愛媛大学・大学院医学系研究科・教授 (16301)	
研究協力者	成瀬 清 (Naruse Kiyoshi)	基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・教授 (63904)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関