

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「統合1細胞解析のための革新的技術基盤」
研究課題「動く1細胞の「意思」を読み取る *in vivo* 網羅的
動態・発現解析法の開発」

研究終了報告書

研究期間 2015年10月～2021年3月
(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)

石井 優
(大阪大学大学院生命機能研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究計画は、免疫細胞の生体イメージングを基盤とし、細胞動態とその動態を制御する分子基盤を1細胞レベルで解明することを目指した。すなわち、イメージング画像に映し出されている細胞自体の遺伝子発現解析を行う方法論を確立することである。この目的を達成するためには、生体イメージング後に「特徴ある」細胞動態を示す「任意」の細胞集団を「迅速」に回収し、遺伝子発現解析に繋げる技術が必要であると考えた。我々はリアルタイム動態解析とリアルタイム細胞標識・サンプリング技術にその可能性を見出し、本研究計画においてその確立を進めることとした。リアルタイム動態解析法の確立は、数理統計解析を用いて細胞の形や動きの経時変化(細胞動態)を網羅的に解析する理論を構築するところから開始した。細胞動態を数値として表現し分類することにより、観察者の主観をこえた解析が可能になり、真にデータ駆動型の解析が実現し、同じ炎症反応である感染性炎症とアレルギー性炎症の間においても動態の差異を比較し議論することが可能になると考えた。一方、リアルタイム細胞標識・サンプリング技術に関しては、TIVAtag や KikGR の適用を検討した。

リアルタイム動態解析の確立では、石井グループでは皮膚の免疫細胞のイメージング系を構築し、解析理論の確立と検証に必要なイメージングデータ(800シリーズ以上)を山田・三村グループと松田グループと共有し、理論の構築と検証のサポートを行った。画像初期解析法の確立には松田グループを中心に取り組んだ。イメージングデータに対して数理解析処理を適用するためには、画像データから細胞領域を抽出し(セグメンテーション)、継時的変化を対応させる(トラッキング)などの画像の初期解析が必要である。細胞要素のセグメンテーション法、細胞のトラッキング法、どちらの方法においても、顕微鏡画像に対してリアルタイムで適用するためには開発の余地が多く存在し、より精度の高い方法の開発が求められた。セグメンテーション手法としてグラフカット法、トラッキング手法としてGDA法や粒子フィルタ法に着目した。一般的な画像データ(XY情報のみ)と異なり、二光子励起顕微鏡により取得した画像にはXYZの三次元的な情報が含まれることから、これらの手法を三次元処理できるように拡張し、セグメンテーション・トラッキング精度の向上を図った。細胞動態を多数の成分の集合としてとらえる理論の確立・実装には山田・三村グループを中心に取り組んだ。山田・三村グループでは細胞動態を細胞の「動き」と「形」の変化の総和と定義し、数理統計手法を用いた新規手法の理論構築と実装を行った。特に細胞の形の既存計測指標(表面積・体積や突起数など)に落とし込む方法ではなく、球化处理と球面調和関数分解により、形を数学的に過不足なく分解して評価する方法の確立、並びに形を比較するための配置として、重心移動軌跡を基準とした動標構を利用する方法などの検討を行った。解析理論の構築と実装に加え、石井グループと松田グループの共同で解析サーバの設置や解析サーバと顕微鏡システム間での通信・制御システムの開発といった環境整備を行うなど、各グループを有機的に統合しリアルタイム動態解析の実現に向けた取り組みを実施した。

リアルタイム細胞標識・サンプリング技術の確立には石井・奥崎グループを中心に取り組んだ。細胞標識法として、特殊なタグを用いて、光刺激により標的細胞内のmRNAを捕捉・回収するTIVAtag法、色調変化型の蛍光タンパク質を用いて、光刺激により細胞の色を変化させ標的細胞を標識・回収するKikGR法のタイプの異なる2つの方法の確立を目指した。どちらの方法にも長所と短所があり、それぞれの長所と短所を補完する意味で両者の確立を同時に行った。TIVAtag法に関しては生化学的な実験を行い詳細な条件検討を進めたが、実験系としての検証が中心となり、本研究計画実施期間中に我々の研究対象である好中球に適用するまでには至らなかった。しかし、KikGR法に関しては光刺激や細胞回収の条件検討を進め、リアルタイム細胞標識・サンプリング技術として確立することに成功した。*in vitro*の限定された条件ではあるが、この実験系を用いて、動いている・静止している細胞に関してイメージングデータ(細胞動態)と1:1で対応した遺伝子発現情報を1細胞レベルで取得することができた。現在その解析を進めており、今後は*in vivo*においても適用できるよう条件検討を継続するとともに、リアルタイム動態解析法と一体となった運用法の確立を目指していきたいと考えている。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間の延長を行なった。この延長期

間中に解析ソフトウェアの一般公開や細胞動態・遺伝子発現解析の統合解析により同定した候補遺伝子の遺伝子改変マウスの作成などを実施した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 細胞の「形」解析理論の構築

概要:細胞動態の解析は、細胞の重心位置やその移動速度の平均とその変化、または、面積や体積などの単純な幾何学的指標の変化を定量することが一般的である。免疫細胞は生体内を動き回るときにその「形」を大きく変化させるが、この「形」の変化は単純な幾何学指標の定量では表現できず、またこの「形」の変化を定量する方法論は確立されていなかった。そこで我々は曲面の曲率平準化理論を用いて、細胞のような複雑な立体を、生物学的によく出現する形状変化である共形変換により球に変換・射影し、細胞の形を球面上の関数として表すことができるようにしたうえで、各座標における特徴量を球面調和関数で抽出する方法論を確立した。本研究計画で確立した「形」と「変形」と「重心移動」との数学的に安定かつ一意な分解による特徴量解析は、変形する立体の動態解析の標準的手法に発展していくとともに、『形とは何か？形が変わるとはどういう事なのか？』という大きな課題を明らかにすることにもつながると考えている。

2. イメージングデータと対応した遺伝子発現データの回収系の確立

概要:色調変化型蛍光タンパク質:KikGR を用いて、イメージング後に任意の細胞を標識し、FACSにより回収する方法を確立した。この方法を適用することにより、*in vitro*の限定された条件ではあるが、イメージング画像に映し出されている細胞自体の遺伝子発現解析を行うことが可能になった。本研究計画で確立した方法を足がかりに、*in vivo* イメージングにおいても適用していくことで、今後のイメージング研究のスタンダードとなることが期待できる。

3. 病的破骨細胞の同定

概要:関節リウマチなどの関節炎で病的に骨破壊を引き起こす破骨細胞を同定し、この病的破骨細胞は通常の骨代謝を担う破骨細胞とは起源や性質がことなることを明らかにした。病的な破骨細胞の分化に必須となる転写因子 FoxM1 を同定し、FoxM1 を阻害することで病的破骨細胞の形成が抑制され、炎症関節における骨破壊が抑制されることを見出した。今後、このFoxM1 を標的とした創薬により、正常な骨代謝には影響を与えずに関節リウマチ患者の病的な骨破壊のみを抑制する新たな治療薬の開発が期待される。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 顕微鏡-サーバ間の通信・外部制御ソフトウェア

概要:ニコン社の顕微鏡制御・画像取得ソフトウェアであるNIS-Elements から、撮影した画像データを解析サーバにリアルタイムで受け渡すプログラムや解析サーバでの解析結果を反映させて電動ステージなどの顕微鏡の機能の制御を実行するプログラムなど、自動解析・自動サンプル採取に必要な通信・外部制御ソフトウェアを作成した。本ソフトウェアは汎用性を考慮して設計されており画像の撮影・解析・顕微鏡制御に関して様々な使い道が考えられる。NIS-Elements を通してニコン社製顕微鏡システムを外部から操作する手段が皆無である現状を考えると、今回作成した通信・外部制御ソフトウェアは、特にニコン社製顕微鏡の利用者にとって非常に有用であると考えられる。今回作成したソフトウェアはオープンソースソフトウェアとしてGitHubにおいて一般公開した。 今後は、他社の顕微鏡システムでも使用可能な形に汎用化を行う計画としている。

2. 形・動きの統合解析ツール

概要:移動し変形する三次元物体の統合解析ツールの理論構築とその実装をおこなった。このツールを用いると、重心の軌道解析(動きの変化)としては重心の速度とその変化、軌道の

曲率・振率とそれらの変化が、形の変化としては、球面調和関数係数ベクトルと、その進行方向、曲率方向、振れ方向の各成分とその変化として統合的に解析することが可能である。ツールとしては入力形式さえ合えば、細胞でなくても解析することができ、密接細胞集団内移動、血栓、個体発生などの解析に応用できると考えている。下記の代表的な論文4.で示した通り、理論的な背景を論文発表すると共に、プログラムのソースコードを GitHub において一般公開した。

<代表的な論文>

1. Hironori Shigeta, Tomohiro Mashita, Junichi Kikuta, Shigeto Seno, Haruo Takemura, Masaru Ishii, Hideo Matsuda, “Bone marrow cavity segmentation using graph-cuts with wavelet-based texture feature”, J Bioinform Comput Biol. 15(5):1740004 (2017).

概要:二光子励起顕微鏡で撮影された骨髄等の組織境界が複雑な生体画像について、組織の模様に着目して領域分割する画像処理手法を実現した。模様情報はウェーブレット解析により抽出するとともに学習を行い、その結果をグラフカット法のエネルギー関数としてモデリングを行う方法を用いた。これにより、模様による領域認識に加え、境界が曖昧な場合でも、時間的・空間的の連続性を考慮した領域分割に成功した。

2. Tetsuo Hasegawa, Junichi Kikuta, Takao Sudo, Yoshinobu Matsuura, Takahiro Matsui, Szandor Simmons, Kosuke Ebina, Makoto Hirao, Daisuke Okuzaki, Yuichi Yoshida, Atsushi Hirao, Vladimir V Kalinichenko, Kunihiko Yamaoka, Tsutomu Takeuchi, Masaru Ishii. “Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1” Nat Immunol. 20(12):1631-1643. (2019)

概要:関節炎を発症させたマウスの関節組織から細胞を回収・解析する技術を確認し、炎症関節組織において病的な骨破壊を惹起する破骨細胞へ分化するマクロファージ(病的破骨前駆細胞)が存在することを明らかにした。このマクロファージを “arthritis-associated osteoclastogenic macrophage: AtoM(アトム)” と命名し、1細胞遺伝子発現解析技術を駆使し、炎症関節組織中のマクロファージの約 10%が病的な破骨細胞に分化していることを突き止めた。

3. Daigo Okada and Ryo Yamada, “Decomposition of a set of distributions in extended exponential family form for distinguishing multiple oligo-dimensional marker expression profiles of single-cell populations and visualizing their dynamics.” PLoS One 15(4):e0231250. (2020)

概要:細胞集団は1細胞解析を行っても最後は集団として解析する必要がある。したがって、多変量に関する多細胞の分布を統合して解析する手法が必要であると考えた。その目的を実現するために多数の分布をデータ駆動的に解析する手法:DEEF (Decomposition into Extended Exponential Family) を開発し発表した。細胞動態の情報や遺伝子発現情報は分布として落とし込むことが可能であることから細胞動態と遺伝子発現の統合解析に有用なツールとなると期待している。

4. Yusri Dwi Heryanto, Chin-Yi Cheng, Yutaka Uchida, Kazushi Mimura, Masaru Ishii, Ryo Yamada. “Integrated analysis of cell shape and movement in moving frame.” Biol Open 10(3):bio058512 (2021)

概要:細胞の *in vivo* 3D 時系列測定データに対し、細胞トラッキング・細胞像セグメンテーションを施したのち、細胞の重心軌跡の平滑化推定と、その軌跡上にとった直交基底 (Moving Frame) 配置に基づく形の特徴量抽出を曲率フロー理論と球面調和関数分解によって行う方法論を開発し実装した。軌道と軌道上座標系基準の形特徴量との組み合わせをすることにより、運動と形・変形を統合して細胞を亜分類する性能が向上することを示した。同解析ツール

のソースコードは公開を行った。(※コロナ延長時の成果)

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 石井・奥崎グループ

研究代表者: 石井 優 (大阪大学・大学院生命機能研究科・教授)

主たる共同研究者: 奥崎 大介 (大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授)

研究項目

- ・生組織における細胞集団のバイアスフリー動態解析法の開発
- ・*in vivo* トランスクリプトーム解析法の開発

② 山田・三村グループ

主たる共同研究者: 山田 亮 (京都大学・大学院医学研究科・教授)

三村 和史 (広島市立大学・大学院情報科学研究科・教授)

研究項目

- ・数理データ解析
- ・情報圧縮

③ 松田グループ

主たる共同研究者: 松田 秀雄 (大阪大学・大学院情報科学研究科・教授)

研究項目

- ・イメージング画像初期解析
- ・1細胞からの微量 RNA のトランスクリプトーム解析法の確立
- ・1細胞遺伝子発現と細胞動態の関連解析インフォマティクスの確立

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

以下の共同研究や連携を通じて国内外の研究者や産業界等とのネットワーク形成を行った。

- ・本1細胞領域 CREST の九州大学生体防御医学研究所・馬場健史教授とは領域内コラボレーションを実施している。本研究計画で回収した細胞を馬場グループが本1細胞領域 CREST で確立したメタボロミクス・プロテオミクス系に適用するなどの共同研究を実施している。
- ・本1細胞領域 CREST の理化学研究所生命機能科学研究センター・二階堂愛チームリーダーとは、本研究計画の主たる共同研究者の松田が、1細胞 RNA-seq のデータ解析技術の開発、特に複数の一細胞 RNA-seq データ間の比較解析方法に関してディスカッションを行うなどの連携を実施している。
- ・本1細胞領域のさきがけ研究者である金沢大学ナノ生命研究所・奥田覚准教授とは本研究計画の主たる共同研究者の山田・三村が、本研究計画で確立した形・動きの統合解析ツールを奥田覚准教授の細胞の移動・変形シミュレーションデータに適用し評価を行うなどの共同研究を実施している。
- ・本1細胞領域のさきがけ研究者であった理化学研究所・城口克之チームリーダーとは顕微鏡ステージトップの細胞回収装置の開発に関して意見交換を行っており、今後本格的なコラボレーションを実施する予定である。
- ・CREST 領域間連携によるネットワーク形成を目的として、オプトバイオ領域の名古屋大学大学院医学系研究科・和氣弘明教授、情報計測領域の理化学研究所生命機能研究セン

- ター・清末優子チームリーダーと共同で領域横断シンポジウムを企画・実施した。
- さきがけ「統計的有意性を担保する超高速パターン発見技術の創出」の国立情報学研究所・杉山磨人准教授、CREST「離散構造統計学の創出と癌科学への展開」の東京大学理学系研究科・津田宏治教授とは本研究計画の主たる共同研究者の山田・三村が「離散構造統計学の創出と癌科学への展開」の主たる共同研究者であることなどもあり、デジタル画像情報・そのグラフオブジェクト化・密度分布解析にあたり、機械学習等の利活用に関してディスカッションを継続している。
 - 情報計測領域 CREST の理化学研究所生命機能研究センター・清末優子チームリーダーと本研究計画の主たる共同研究者の山田・三村が共同研究を実施し、本研究計画で確立した細胞の形解析プログラムを清末チームの所有する超高解像度細胞画像データに適用するなどの共同研究を通じて連携を行った。
 - 文科省科学技術試験研究委託事業（ポスト「京」重点課題）「個別化・予防医療を支援する統合計算生命科学」において、テーマ名「データ同化生体シミュレーションによる個別化医療支援」の業務主任者である大阪大学基礎工学研究科・和田成生教授とは、本研究計画の主たる共同研究者の松田が当該テーマの実施担当の一人であることから脳循環系シミュレーションでのデータ同化に必要な循環系での細胞遊走の動態パラメータ取得のためのイメージング解析技術の開発について連携を行った。
 - カリフォルニア大学サンディエゴ校のBafna 教授と本研究計画の主たる共同研究者の松田が、深層学習に基づく細胞のトラッキング法の共同研究を行っている。画像認識の研究分野で物体追跡に使われている手法を、顕微鏡画像中での細胞のトラッキングに応用するなどの共同研究を実施している。
 - TIVAtagの開発者である米国ペンシルバニア大学のDmochowski 博士とはTIVAtag に関しての連携を緊密に行なっており、新しいバージョンの TIVAtag に関する情報等を常に共有している。また、つくばオリゴサービス株式会社の協力により TIVAtag を日本国内で合成する体制を整えた。
 - ニコンインステック・バイオサイエンス営業本部 AE 部ゼネラルマネージャー・鶴旨篤司氏と株式会社コンピュータマインド・開発本部東京ソリューション Gr. 第1 Sc. 課長代理・新倉和暢氏にはニコン社製二光子励起顕微鏡システムの制御ソフトウェア NIS-Elements から画像データを動態解析ソフトウェアに受け渡す通信・外部制御ソフトウェアの開発に関して連携を行なっている。また、ニコンインステック・バイオサイエンス営業本部西日本営業部ゼネラルマネージャー補佐・島津滋広氏とは組織採取装置を顕微鏡に組み込む際の装置の仕様に関しての連携や、顕微鏡システムの構築一般に関して連携・協働を行なっている。
 - 本1細胞領域のアドバイザーでもある、株式会社日立製作所・名誉フェロー/フロンティアバイオシステムズ株式会社・代表取締役社長・神原秀記博士と打ち抜き法による組織回収装置の作製とニコン社製二光子励起顕微鏡システムへの組み込みに関して連携・協働を行っている。