

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「計測技術と高度情報処理の融合による
インテリジェント計測・解析手法の開発と応用」
研究課題「高精度時空間計測による多元細胞情報
統合」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者：清末 優子
（関西医科大学／理化学研究所
附属生命医学研究所／生命機能科学研究センター
学長特命教授／客員研究員）

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

生命科学や医学研究において、ライトシート型顕微鏡は、初期胚や脳をはじめとする組織のボリュームイメージングを達成して顕著な貢献を果たしてきた。一方で、大きな検体の観察に最適化してきたライトシート顕微鏡は、細胞レベルのイメージングには最適であるが、細胞内部の微細構造の観察に必要な解像力は十分ではなく、高解像度化が求められていた。そこで、ベッセルビーム技術を応用して生成した 1 ミクロン以下の厚みの超薄ライトシートを用いる格子光シート顕微鏡 (lattice light-sheet microscopy: LLSM) が 2014 年に新たに開発され、超解像 (200 ナノメートル分解能を超える画像化法) に切迫する三次元解像度で細胞内空間の高速ボリュームイメージングを達成した。本研究プロジェクトでは、LLSM の低侵襲性と高い時空間解像力を活かして、画像解析技術、細胞採取技術、1 細胞解析技術、理論／モデル構築やバイオマテリアル開発を組み合わせ、未知な生命原理の解明を進め、様々な新たな生命科学の知見を獲得した。

① 顕微鏡システムの構築と運用

清末 G において、LLSM を開発した Betzig 研究室の設計を踏襲して最も高い分解能を有するモデルを構築し、専用に設計した恒温ブース内に設置して安定稼働させた。計測対象ごとに画像処理結果をフィードバックして撮影条件を最適化することで、チーム内の研究課題に加え、技術の普及のためにチーム外の共同研究にも積極的に活用した。

② 画像・情報解析技術の開発

LLSM 画像データは、安永 G において回転処理やクロッピング、輝度補正、マスキング等の大量前処理を行うプログラムを開発してデータを作成、その後の画像解析に供した。さらに、3D 画像と解析結果を幾何学シンボルで表現し VR で可視化するシステムを開発した。末次 G では、ディープラーニングを用いて顕微鏡画像からタンパク質の局在予測を行う手法を開発した。また清末 G では、撮影された物体の空間統計学的解析手法や、領域内共同研究により機械学習により多次元データから特徴を抽出するツール Machine Learning-Based Visual Extraction of Structural Feature: M-VESt 法を開発し、LLSM 画像に実践した。さらに、モデリングやシミュレーション技術と融合し情報を補完することで分子や細胞動態を予測した。これらにより、画像の前処理から情報抽出にいたる画像解析ツール群を構成した。

③ 1 細胞解析技術の連結

顕微鏡観察と 1 細胞解析を連携させるため、末次 G では活性が異なる細胞を顕微鏡下で分取し、1 細胞トランスクリプトミクスにより活性の違いに関与する新規因子の同定に成功した。オルガノイド等の立体サンプルから目的とする細胞を採取するためには、清末 G と川崎 G において、光刺激により目的細胞をマークできるマウスを作出し、その腸オルガノイドからロボティクス機構を用いてオルガノイドの部分採取、細胞の単離と採取、1 細胞 RNAseq 解析を実行する手法を開発した。

④ 生命科学研究

上記のシステムやツールの生命科学への活用においては、清末 G、末次 G、川崎 G において、各種蛍光標識分子導入細胞、標的遺伝子ノックアウト細胞、レポーターマウス及びオルガノイドを開発し、LLSM イメージングに供した。本研究課題では、単細胞 (酵母) や 1 次元及び 2 次元培養細胞から、立体的なミニ臓器・オルガノイド等を計測し、多角的なバイオ実験や、個体レベルの表現型や病態に関する知見も統合することで生物学的意義を明らかにしつつ、細胞運動や形態形成、分裂、増殖、分化、がん化などの生命現象に関して、新たな生命機構を探索した。川崎 G ではヒトおよびマウス由来オルガノイドを用いて、腸管の細胞分化に関与する転写因子群の同定、新規 TA (transit amplifying) 細胞マーカーの同定、肝臓組織の維持機構を担う新たな機構を発見し、生物学的知見を獲得した。

これらの研究を通じて、特に、細胞のがん化や分化などの細胞の変容、細胞外小胞生成、アクチンや微小管などの細胞骨格制御による細胞運動・形態形成といった生命現象の機構解明において顕著な成果が得られた。また同時に、生命科学研究の発展に資するために LLSM 技術の普及に貢献した。

(2)顕著な成果

＜優れた基礎研究としての成果＞

1. 細胞がん化や分化制御に関わる新規メカニズムの解明

概要：LLSM による細胞分裂画像データの解析手法を開発し、人の目では認知できなかった情報を抽出することで、データドリブンに新たな分子機構を見出した。それらを契機として、がん抑制因子 APC の機能喪失に起因するがんゲノム進化における染色体選択機構や、がん遺伝子による染色体異常制御に関する新たな発見につなげた。また、オルガノイド構成細胞のシングルセル解析により細胞分化を制御する新たな経路を同定した。

2. 細胞外小胞の新奇な産生機序の解明

概要：細胞外小胞は細胞間のリモートコミュニケーションのツールとして近年注目されている物質である。本研究では、細胞運動のために機能していると考えられてきた細胞突起が切断されて小胞となる瞬間を LLSM を用いてとらえ、細胞生物学や生物物理学手法を組み合わせることで、小胞の生成メカニズムや機能を明らかにすることで、がん細胞の運動を促進する作用を有する、新しいクラスの細胞外小胞 (filopodia-derived vesicles: FDVs) の同定に成功した。

3. 細胞動態を制御する新たな機構の解明

概要：LLSM の優れた高速性と三次元解像力によって従来技術では可視化できなかった細胞膜やアクチン繊維などの微細な細胞構造の三次元動態を精密に計測し、さらにシミュレーション技術とも組み合わせることで、生体内運動を模した 1 次元ファイバー上の運動や、細胞突起形成機構、集団運動における細胞間接着制御等における制御機構を新たに見出した。

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. 機械学習による多次元画像データからの特徴抽出手法の開発

概要：LLSM 画像データから特徴抽出することを目的として、機械学習により 2 つのデータセット間の特徴の違いを学習して視覚化するツール、Machine Learning-Based Visual Extraction of Structural Feature: M-VESf 法を開発した。生化学的実験により裏付けを得ることにより、当該技術と LLSM 画像データが人の目では認知が困難である微細な変化を検出できることを実証した。

2. 細胞外小胞の新奇な産生機序の解明

概要：本研究課題において、細胞突起から形成される細胞外小胞の新奇生産経路を見出した。細胞外小胞の元となる構造が特定できたことから、そこに人為的に物質を局在させることで、意図した分子を搭載した小胞を産生させて他の細胞にデリバリーさせるというような用途の可能性がある。例えば細胞外小胞に CRISPR などの遺伝子編集酵素を搭載することで、遺伝子治療などの道を拓く。

3. 細胞分化研究のためのマウス系統及び細胞採取技術の開発

概要：細胞の観察後に目的とする細胞の遺伝子発現を解析するために、光活性型蛍光タンパク質 mEos4 を融合したヒストン H2B ノックインしたマウス系統を樹立し、当該マウスから樹立したオルガノイドから、光照射によりマークした細胞を採取しシングルセル解析を行う手法を開発した。また、幹細胞のイメージング研究のために TA 細胞に特異的なマーカー遺伝子を同定して特許出願し、さらに TA 細胞マーカー遺伝子のレポーターマウスを作製した。

＜代表的な論文＞

1. Nishimura T, et al., Filopodium-derived vesicles produced by MIM enhance the migration of recipient cells. *Dev Cell*. 2021 Mar 22;56(6):842-859.e8.

概要：細胞外小胞は、遠隔の細胞間コミュニケーションツールとして近年注目されている構造体である。細胞突起が切断させることで、がん細胞の運動更新能を持つ新奇的タイプの細胞外小胞 (filopodia-derived vesicles: FDVs) を生成することを見出した。LLSM を用いて切断された

突起と小胞を 3D 追跡することで、小胞の生成過程や場所を特定することに成功した。

2. Mukherjee A, Ron JE, Hu HT, Nishimura T, Hanawa-Suetsugu K, Behkam B, Mimori-Kiyosue Y, Gov NS, Suetsugu S*, Nain AS*, Actin Filaments Couple the Protrusive Tips to the Nucleus through the I-BAR Domain Protein IRSp53 during the Migration of Cells on 1D Fibers. *Adv Sci (Weinh)*. 2023 Mar;10(7):e2207368. (*: corresponding author)

概要：現在のライフ研究においては多くの場合、2次元平面のプレート上に培養した細胞が用いられているが、生体内では細胞は細い細胞外マトリクス繊維の上を移動する。生体内に近い細胞運動を解析するため、LLSM に搭載できるナノファイバーを開発し、ナノファイバーの周囲を3次元的に運動する細胞のアクチン動態を計測した。理論モデルとシミュレーションと合わせ、ナノファイバー上でみられる特徴的な運動様式はアクチン重合が促進されることによって生じることを示した。

3. Yamashita N, Morita M, Yokota H, Mimori-Kiyosue Y., Spatial Statistics of Three-Dimensional Growth Dynamics of Spindle Microtubules, *Methods in Molecular Biology*, accepted.

概要：筆者らが開発した LLSM 画像の空間解析手法を、複数のデータを正規化空間にマージしてサンプル間の定量比較ができる空間統計学手法に改良した。これにより、目視では視認が不可能な分裂期紡錘体内部の高密度な微小管の配置や動態を分析し、分裂期フェーズ移行やがん遺伝子が紡錘体構造に与える影響を解析した。解析に画像自体を用いるのではなく、物体検出とインテリジェント解析を組み合わせる手法を Intelligent Complex Object and Kinetic Analysis (ICOKA)と命名し、計算コストを削減するための手段として提案した。

§2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

① 清末グループ

研究代表者：清末 優子(関西医科大学附属生命医学研究所分子遺伝学部門・学長特命教授)

研究項目：

- ・LLSM の構築と運用、広い領域にまたがる共同研究
- ・LLSM 画像およびデータ解析技術の開発
- ・発生および“がん”をはじめとする疾患にかかわる新奇メカニズムの解明

② 安永グループ

主たる共同研究者：安永卓夫(国立大学法人九州工業大学 大学院情報工学研究院 物理情報工学研究系・教授)

研究項目：

- ・先端画像処理手法を適用した新規の LLSM 鏡画像処理手法の提案と開発
- ・計測された高解像 3D 画像の VR 技術を用いた可視化システムの構築

③ 末次グループ

主たる共同研究者：末次 志郎(国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 先端科学技術研究科・教授)

研究項目：

- ・LLSM による高精度三次元計測を通じた新たな細胞形態制御機構の解明
- ・細胞の形態を決定する細胞膜の裏打ちタンパク質の機能解明
- ・がん細胞の浸潤転移やエンドサイトーシスなどの疾患メカニズムの理解

④ 川崎グループ

主たる共同研究者：川崎 善博(国立大学法人東京大学 定量生命科学研究所・客員准教授)

研究項目：

- ・組織・オルガノイド内における細胞個々の活動情報(3次元形態・表現型・空間的位置情報)とゲノム・遺伝子発現情報を融合した新たな1細胞解析システム(多元1細胞解析法)の開発
- ・多種多様な細胞が組織をつくる仕組みの解明、および“がん”をはじめとする疾患の治療や再生医療の発展につながる新たな知識の獲得

(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

- ・LLSM 技術の普及のためには継続的な利用拡大、および細胞映像の利活用を推進している。
- ・LLSM 計測による発見を契機に見出された腫瘍進展に関する新たな遺伝子連関に関して、オランダを含む国内外のがん研究者との共同研究を進めた。
- ・末次が代表である国際共同研究強化(A)を通じてイスラエルと米国を含むネットワークを強化し、ミュレーションとLLSM 計測を融合した。
- ・細胞外小胞の生成機構に関する研究が進んだことにより、ウィルス学やドラッグデリバリー技術も視野に入れた新領域の立ち上げを目指す体制構築を進めた。