



Title	バイオイメーシングデータを用いた細胞動態解析のための細胞追跡に関する研究
Author(s)	藤本, 健二
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/92000
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (藤本 健二)

論文題名

バイオイメージングデータを用いた細胞動態解析のための細胞追跡に関する研究

論文内容の要旨

細胞の移動（遊走）、状態の遷移、増殖、分化といった動態（動的な変化）は多種多様な生命現象や疾患に関与することが知られている。細胞動態の解明には様々な細胞や組織を可視化するバイオイメージング技術が重要な役割を果たしており、特に生きた細胞を観察する蛍光イメージングは、細胞の動態を動画像として記録することを可能にする。イメージングで得られた動画像を用いた細胞動態解析では、個々の細胞の移動軌跡を細胞追跡で抽出し、目的に応じた時系列解析手法を適用するというアプローチが基本となる。しかしながら蛍光イメージングデータには、追跡対象の細胞の見失いや取違えといった追跡誤りを発生させ得る種々の要因が存在し、長期的な動態の解析において重要となる個々の細胞を長く継続して追跡することは困難な課題となっていた。

本論文は全 4 章で構成される。第 1 章では研究の背景や位置付けと目的について述べる。

第 2 章では、細胞が DNA 複製を経て分裂に至る一連の過程である細胞周期の解析のための、蛍光プローブ Fucci を導入した細胞の追跡に焦点を当てる。生体内における細胞の増殖は細胞周期の進行と停止を通じて制御されているが、遺伝子に異常を来した癌細胞は細胞周期の制御機構を無視し、際限なく分裂・増殖する。一方、ある種の抗癌剤は細胞周期への作用（DNA 複製の阻害等）によって癌細胞の増殖を抑制する。このような抗癌剤の薬効や作用機序の解明には、細胞周期の時系列解析が有用と期待される。Fucci は細胞周期の時系列解析を可能にし得る蛍光プローブであり、細胞核の蛍光色を赤、黄、緑の順に変化させることで細胞ごとの細胞周期の状態（進行度合い）を可視化する。本研究では、動画像からの Fucci 導入細胞の追跡を通じて細胞周期の時系列を抽出し、解析につなげることを目指した。Fucci の蛍光は細胞ごと・フレームごとに強度が大きく変動し、また細胞周期進行によって急速に色が変わる。このような外観変化を伴う細胞を継続的に追跡するため、一時的な追跡対象の隠れに頑強なパーティクルフィルタ法に、細胞の状態変化の予測する仕組みを導入した方法を提案した。実際のイメージングデータを用いて提案手法の性能を示すと同時に、細胞周期解析への応用可能性を示すため、追跡結果に多状態イベントヒストリ解析を適用することで、抗癌剤の投与条件による癌細胞の細胞周期進行の差異を明らかにした。

第 3 章では、細胞遊走の移動軌跡を解析するための、3D イメージングデータにおける細胞追跡に焦点を当てる。遊走は何らかの刺激を受けた細胞が移動する現象であり、生物の発生段階における諸器官の形成から免疫応答に至るまで様々なプロセスに関与する。2 光子励起顕微鏡を用いた生体内イメージングは生体内内部における細胞遊走を 3D 動画像として可視化できるため、遊走を理解するための主要なアプローチのひとつとなっている。本研究では生体内イメージングデータ（3D 動画像）における細胞追跡を通じて、遊走細胞の移動軌跡の解析を可能にすることを旨とした。生体内イメージングでは個々の細胞が同じ蛍光色で可視化され、それぞれを外観で識別することが容易でない場合が多い。このような追跡対象には高い特徴抽出能力を有する深層学習の有効性が期待されるが、深層学習モデルの訓練（最適化）に追跡の「正解」（教師データ）が必要であり、3D 動画像をそのまま扱う場合には「正解」の作成（アノテーション）に膨大なコストがかかる。そのため従来はいったん 2D 動画像に変換してから訓練・追跡が行われていた。しかしながら異なる深度に分布する細胞が 1 枚の 2D 画像上に投影されるため、密集・重畳する細胞が画像内で分離されず、それぞれの取違えや見失いの原因となっていた。これに対し、本研究では深層学習に基づく 2D 動画像用の物体追跡手法を 3D 動画像用に拡張した方法を提案した。提案手法は 2D のデータのみで訓練されたモデルを 3D 動画像内の細胞追跡に用いるため、アノテーションコストは 2D の追跡の場合と同様である。また個々の細胞の深度を位置と同時に推定することで、密集・重畳した細胞の継続的な追跡を可能とする。実際のデータを用いて提案手法の性能を示すと同時に、遊走軌跡解析への応用可能性を示すため、刺激の違いによって移動速度の経時変化に生じる差異を明らかにした。

第 4 章では結論を述べる。本研究では、蛍光イメージングデータに遍在する「追跡対象の外観変化」および「外観の類似した追跡対象の密集・重畳」という細胞の継続的な追跡を困難にする要因に、細胞の状態や深度といった動態情報を活用して対処した。今後、異種の状態空間への拡張や 2D 画像から深度を推定する手法との統合により、幅広いイメージングデータへの適用が期待される。また、細胞動態解析のための細胞追跡は、従来は主に手作業または半自動で行われていた。これに対し計算機による高精度な細胞追跡手法を提案し、細胞動態解析への応用可能性を示した本研究の成果は、細胞動態研究の効率化と客観性・再現性の確保に資すると期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (藤 本 健 二)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	松田 秀雄
	副 査	教 授	松田 史生
	副 査	准教授	小蔵 正輝
	副 査	准教授	瀬尾 茂人

論文審査の結果の要旨

細胞の移動（遊走）、状態の遷移、増殖、分化といった動態（動的な変化）は多種多様な生命現象や疾患に関与することが知られている。細胞動態の解明には様々な細胞や組織を可視化するバイオイメージング技術が重要な役割を果たしており、特に生きた細胞を観察する蛍光イメージングは、細胞の動態を動画像として記録することを可能にする。イメージングで得られた動画像を用いた細胞動態解析では、個々の細胞の移動軌跡を細胞追跡で抽出し、目的に応じた時系列解析手法を適用するというアプローチが基本となる。しかしながら蛍光イメージングデータには、追跡対象の細胞の見失いや取違えといった追跡誤りを発生させ得る種々の要因が存在し、長期的な動態の解析において重要となる個々の細胞を長く継続して追跡することは困難な課題となっていた。

本論文は全4章で構成される。第1章では研究の背景や位置付けと目的について述べた。

第2章では、細胞がDNA複製を経て分裂に至る一連の過程である細胞周期の解析のための、蛍光プローブFucciを導入した細胞の追跡に焦点を当てる。Fucciは細胞周期の時系列解析を可能にし得る蛍光プローブであり、細胞核の蛍光色を赤、黄、緑の順に変化させることで細胞ごとの細胞周期の状態（進行度合い）を可視化する。Fucciの蛍光は細胞ごと・フレームごとに強度が大きく変動し、また細胞周期進行によって急速に色が変化する。このような外観変化を伴う細胞を継続的に追跡するため、一時的な追跡対象の隠れに頑強なパーティクルフィルタ法に、細胞の状態変化を予測する仕組みを導入した方法を提案した。実際のイメージングデータを用いて提案手法の性能を示すとともに、細胞周期解析への応用可能性を示すため、追跡結果に多状態イベントヒストリ解析を適用することで、抗癌剤の投与条件による癌細胞の細胞周期進行の差異を明らかにした。

第3章では、細胞遊走の移動軌跡を解析するための、3Dイメージングデータにおける細胞追跡に焦点を当てた。細胞追跡では、高い特徴抽出能力を有する深層学習の有効性が期待されるが、深層学習モデルの訓練（最適化）に追跡の「正解」（教師データ）が必要であり、3D動画をそのまま扱う場合には「正解」の作成に膨大なコストがかかる。そのため従来はいったん2D動画像に変換してから訓練・追跡が行われていた。しかしながら異なる深度に分布する細胞が1枚の2D画像上に投影されるため、密集・重畳する細胞が画像内で分離されず、それぞれの取違えや見失いの原因となっていた。これに対し、本研究では深層学習に基づく2D動画像用の物体追跡手法を3D動画像用に拡張した方法を提案した。実際のデータを用いて提案手法の性能を示すとともに、遊走軌跡解析への応用可能性を示すため、刺激の違いによって移動速度の経時変化に生じる差異を明らかにした。

第4章では結論を述べた。本研究では、蛍光イメージングデータに遍在する「追跡対象の外観変化」および「外観の類似した追跡対象の密集・重畳」という細胞の継続的な追跡を困難にする要因に、細胞の状態や深度といった動態情報を活用して対処した。今後、異種の状態空間への拡張や2D画像から深度を推定する手法との統合により、幅広いイメージングデータへの適用が期待される。また、細胞動態解析のための細胞追跡は、従来は主に手作業または半自動で行われていた。これに対し計算機による高精度な細胞追跡手法を提案し、細胞動態解析への応用可能性を示した本研究の成果は、細胞動態研究の効率化と客観性・再現性の確保に資すると期待される。

よって、博士（情報科学）の学位論文として価値のあるものと認める。