

論文内容の要旨

論文題目: IMACEL : cell image analysis system revealed stromule frequency at hourly intervals in Arabidopsis stomatal guard cell chloroplasts.

(人工知能を活用した細胞画像解析システムIMACELの開発とストロミュールの形態解析)

氏名 島原 佑基

<序論>

多様な顕微鏡を駆使した生物画像解析分野の発展は著しく、顕微鏡技術の革新およびコンピューターの処理速度向上と併せ、単位時間あたりに撮像される画像のデータ量は膨大なものになっている。多量の実験画像から高速かつ客観的に知見を得るために、画像処理ソフトウェアを用いた定量解析の重要性が高まりつつある。

近年、画像解析技術や人工知能に関するアルゴリズムの発達により画像処理ソフトウェアの高機能化が達成されつつある。一方で、それら高度な技術を活用するためには、環境整備やパラメータチューニングなど、様々な場面において、プログラミング言語を用いた操作が求められるのが現状である。このことは、計算機の開発スキルに乏しい生命科学研究者にとっては、画像処理を施す際の大きな壁となっている。加えて、Photoshopに代表される平易なユーザーインターフェイス (UI) を持つ画像処理ソフトウェアを使用する場合には、生命科学に特化した実装ではないために、研究目的で使用するには不適切な機能が多数実装されており、画像処理手法に対する理解が求められることとなる。今後さらに膨大となり続ける研究用画像に対処するためには、高機能かつ必要十分な画像処理技術のみを平易な UI にて達成する新規画像処理ソフトウェアの開発が求められる。

上記の理由により本研究では、クリックベースの UI を有する新規の細胞画像解析ソフトウェア「IMACEL」の開発を行った。加えて、植物細胞特有のオルガネラである葉緑体に着目し、ストロミュールと呼ばれる管状構造物の出現頻度を、IMACEL に搭載された画像 a

<細胞画像解析システム IMACEL の開発>

IMACEL のシステム開発の概要

細胞内構造の解析にあたり、形態解析と自動分類の機能をもつクラウドベースの細胞画像解析システム IMACEL の開発を行った (図 1)。IMACEL の特色は、目的に合わせた最適なアルゴリズムの組み合わせを対話的かつ半自動的に構築することである。そのためにまず、アップロードされた解析対象画像から複数の特徴量を算出する。その後、解析対象画像の特徴量と類似する

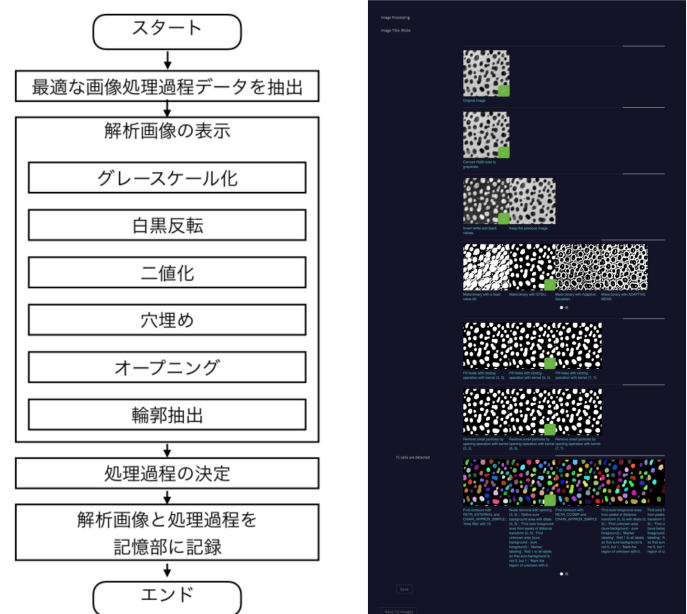


図 1. 細胞画像解析システム IMACEL の概略図

(a) 画像内対象物を高精度に抽出するために必要十分な画像処理手法のみを実装。(b) クリックベースの新

学習済み画像データをシステム内で探索する。その結果に基づき、妥当と思われる画像処理過程を施した解析中間画像群をユーザーに示し、ユーザーの研究目的に適した画像処理過程を選択させる。具体的な画像処理については、グレースケール化、白黒反転、二値化、穴埋め、輪郭抽出等が実装されている。この対話的かつ半自動的な画像処理過程の組合せにより汎用的な細胞画像解析を実現する機構については、新規性が認められ特許を取得済みである。また、パブリッククラウドである Microsoft Azure 上に実装したため、計算機リソースが乏しい研究環境であっても、高速で安全性の高い解析を行うことができる。これにより、研究室および研究者ごとに異なる多様な解析ニーズに対し、それぞれ適切な画像解析法を高速かつ高精度で提供することが可能になった。

IMACEL 形態解析機能の性能評価

IMACEL の精度検証として、本システムによる解析結果と手動解析の結果を比較検討した。解析対象の選定にあたり、まず細胞小器官の形状が単純な楕円形であり、かつ手動解析時にトレースが容易である、免疫標識されたストレス顆粒をターゲットとした。亜ヒ酸ナトリウムの投与により、時間依存的にストレス顆粒が発生することが報告されている COS7 細胞につき、亜ヒ酸ナトリウム投与後 15 分後と 60 分後に、発生したストレス顆粒のサイズと数を解析した。その結果、IMACEL では手動で解析する場合と同等の 2 値画像を作成できた。予想通り、ストレス顆粒の数と大きさは投与後 15 分後と 60 分後とに有意差が認められた (図 2a)。また、IMACEL の解析結果は手動評価の結果と非常に近似していた (図 2b、c)。IMACEL での解析はバッチ処理 (15 分後および 60 分後の試料につき、それぞれ 65 画像) をすることで約 5 分間で完了した。一方、ストレス顆粒のトレースが必要な手動解析では約 16 時間を要した (図 2d)。これらの結果は、IMACEL が細胞内構造の形態を定量的かつ迅速に高い精度で測定できることを示している。

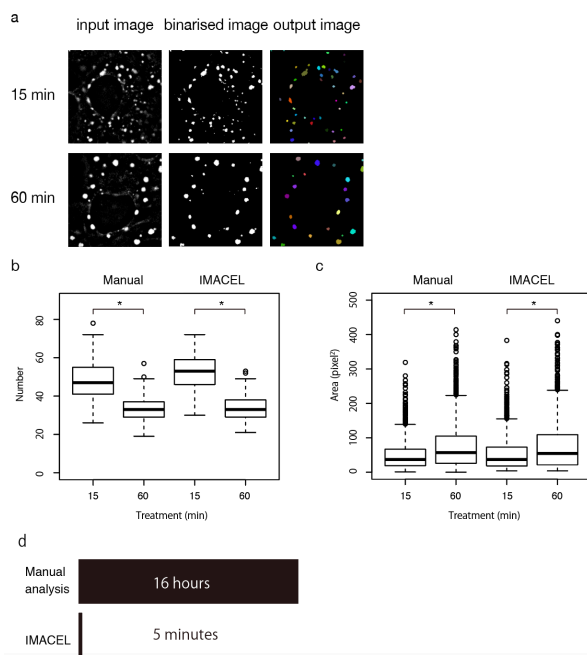


図 2. COS7 細胞中のストレス顆粒に対する手動解析と IMACEL による解析の結果とその比較 (a) 0.5 μ M 亜ヒ酸ナトリウムを 15 分および 60 分処理した際のストレス顆粒画像。(b-c) 手動および IMACEL で計測したストレス顆粒の数 (b) と面積 (c)。(d) 手動および IMACEL それぞれの解析所要時間。

<IMACEL を用いたストロミュール出現頻度の定量評価>

明暗条件におけるストロミュールの出現頻度の解析

ストロミュールは、葉緑体など色素体の表面から突出する動的な管状構造であり、突出方向は細胞骨格およびモータータンパク質、小胞体等によって決定されることが示されている。また、ストロミュール形成は、塩や乾燥によるストレス、スクロースやグルコースやストリゴラクトンの処理、および酸化還元シグナルによ

て誘発されるが、この構造は化学固定に対して脆弱であり、固定を伴う撮像手法では観察されていなかった。近年の蛍光タンパク質を用いたライブイメージングにより構造や生理学的意義に関する研究が少しずつ進められている。ストロミュールは植物免疫に関与することが示唆されているものの、構造や生理学的意義の多くにおいて未解明な点が残されている。加えて、ストロミュール形成は比較的低頻度かつ形態が複雑で多様なため大規模かつ統計的な形態評価はこれまでに存在せず、詳しい生理学的機能や動態についてはよくわかっていない。そこで本研究では、手動により計測と併せ、IMACEL による画像分類機能を活用しシロイヌナズナ孔辺細胞におけるストロミュール出現頻度を定量的に評価した。

シロイヌナズナにおける明暗条件下のストロミュールの出現頻度、および日周周期の影響を調べるために、CaMV35S プロモーターの制御下で AtFtsZ1-1 と YFP の結合タンパク質を安定的に発現する形質転換体を用い、孔辺細胞における葉緑体の形態を観察した (図 3a)。明期の発芽 1 日目の子葉における孔辺細胞のストロミュールの出現頻度を手動にて計測した結果、暗期よりも有意に高かった ($P=0.0242$ 、図 3b)。しかし、発芽 2 日目のものでは明暗の間に有意差は認められず ($P=0.2257$ 、図 3c)、一方で発芽 5 日目では暗期で有意に高値を示した $P=0.001557$ 、図 3d)。これらの結果は、明期と暗期との間のストロミュールの出現頻度の差が、子葉の発育段階に依存して変化することを示唆している。

日周期におけるストロミュール出現頻度の経時評価

ストロミュールの出現頻度が明条件と暗条件の切り替わる時点で大きく変化しているのか否かを評価するために、発芽後 1 日目と 2 日目のシロイヌナズナにつき、1 時間毎にストロミュールの出現頻度を解析した。IMACEL を用いた客観的な画像分類の結果、2~4 時間間隔で局所的なストロミュール出現頻度のピークがみられ、ストロミュールの出現頻度は周期的に増加と減少を示すことが明らかになった。加えて、手動にてストロ

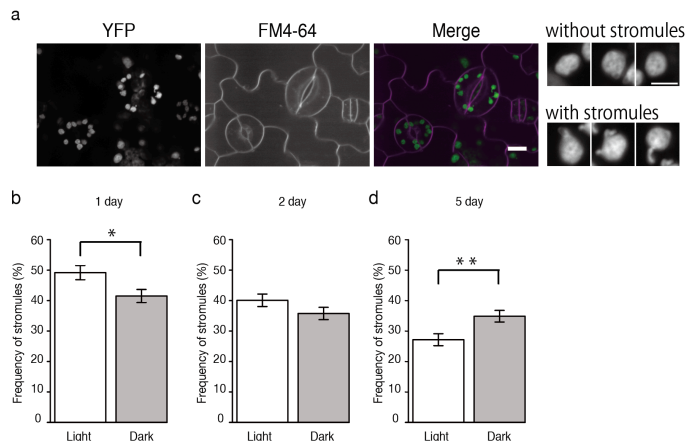


図 3.シロイヌナズナのストロミュールの出現頻度の比較 (a) 色素体および細胞膜を可視化したシロイヌナズナの孔辺細胞。(b-d) 発芽 1 日目 (b)、2 日目 (c)、5 日目 (d) における明暗条件下でのストロミュール出現頻度。Bars: 10 μ m (広域画像)、3 μ m (拡大画像)。

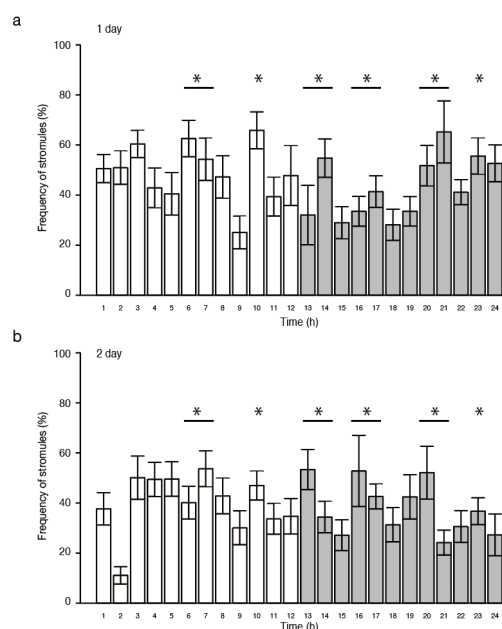


図 4. 1 時間間隔にて計測したストロミュール出現頻度 発芽 1 日目 (a)、2 日目 (b) におけるストロミュール出現頻度。アスタリスクは発芽 1 日目および 2 日目における共通した増減リズムを示す。

ミュール頻度を計測した場合も同様の結果が確認された（図 4）。発芽後 1 日目と 2 日目の子葉における周期的パターンの比較は、ほぼ同時期に大小平均頻度の局所的ピークを示した（図 4a, b）。なおこの同期的かつ周期的パターンは、発芽後 5 日目の子葉でも確認された。この結果から、発育中のシロイヌナズナの子葉孔辺細胞におけるストロミュールの出現頻度は一定ではなく、同期的かつ周期的な出現パターンが存在していることが明らかとなった。現在検討されているストロミュールの生理的意義の一つに、細胞核との接触を介した植物免疫の誘導がある。今後、ストレス処理や、変異体を用いた解析により、ストロミュール出現が周期的である生理的意義を解明できると考えている。

< 結論 >

本研究では、細胞内構造の形態解析に有用な細胞画像解析システム IMACEL を開発し、性能評価を行った。それを用いてシロイヌナズナ子葉の孔辺細胞にみられるストロミュールに関して 2 つの新しい所見を得た。即ち、1) ストロミュールの出現頻度は、明暗条件により変化すること、2) ストロミュールの出現頻度は 2~4 時間の周期的なパターンを示すこと、である。これらの結果は、生理的意義や動態の理解が進んでいないストロミュールにつき、その機能と日周期の関連性を示唆するものである。本研究で開発した IMACEL を用いることによりストロミュール解析における経時的かつ統計的な議論が可能となった。なお IMACEL は他の生物画像にも活用できることを確認しており、今後多様な細胞内構造の研究効率化に貢献できるものと期待される。

< 発表論文 >

1. **Yuki Shimahara, Natsumaro Kustuna, Seiichiro Hasezawa, Kei H. Kojo. *Quantitative evaluation of stomule frequency at hourly intervals in Arabidopsis stomatal guard cell chloroplasts*. Cytologia (in press)**
2. **Daiju Ueda, Akira Yamamoto, Masataka Nishimori, Taro Shimono, Satoshi Doishita, Akitoshi Shimazaki, Yutaka Katayama, Shinya Fukumoto, Choppin Antoine, Yuki Shimahara, Yukio Miki. *Deep Learning for MR Angiography: Automated Detection of Cerebral Aneurysms*. Radiology (in press)**
3. **Yuki Shimahara, Ko Sugawara, Kei H. Kojo, Hiroki Kawai, Yuya Yoshida, Seiichiro Hasezawa, Natsumaro Kutsuna, *IMACEL: A cloud-based bioimage analysis platform for morphological analysis and image classification*. PLOS ONE (under review)**
4. **島原佑基 (2017) 深層学習を活用した脳動脈瘤検知ソフトウェアの開発. 医用画像情報学会雑誌 Vol.34 No.2**
5. **島原佑基, 朽名夏磨 (2017) 人工知能を活用した医療画像診断支援システムの効率的な開発. Rad Fan Vol 15 No.9**
6. **Yuki Shimahara, Natsumaro Kutsuna (2016) *Detection of image manipulation and plagiarism in life science research*. Editorial Office News (The official publication of the International Society of Managing and Technical Editors) 9: 16-19**

< 発明特許 >

画像処理装置及び画像処理方法：特許第 6329651 号（日本）取得済み・PCT 国際出願中

○島原佑基、菅原皓、青池亨、朽名夏磨、上坂高寛