

論文の内容の要旨

論文題目 Automatic Quantitative Segmentation of Myotubes Reveals Single-cell Dynamics of S6 Kinase Activation
(Myotubeの定量的自動セグメンテーションはS6キナーゼ活性化の1細胞dynamicsを明らかにする)

氏名 井上 晴幾

自動的細胞セグメンテーション法は細胞内シグナル活性のダイナミクスを時空間的に定量する強力な方法である。これまでの細胞セグメンテーション法は、主に丸い形状で単核の細胞に対して開発が行われてきた。しかし、蛍光画像において筋分化 C2C12 細胞（以下、myotube と表記）などの多核で細長い細胞に対するセグメンテーション法は未だ開発されていない。さらに myotube は reserve 細胞と呼ばれる未分化の細胞に囲まれており、背景と細胞の区別とそれに続く定量を難しくしている。そこで本研究では、シグナル分子 S6 kinase (S6K) の活性状態をモニタする fluorescence resonance energy transfer (FRET) バイオセンサーを安定発現した分化誘導 7 日目の C2C12 細胞を用いてライブセル蛍光イメージングを行い、蛍光画像から自動的に myotube のセグメンテーションおよび蛍光輝度を定量する新規画像解析フレームワークを開発した。さらに、開発した画像解析フレームワークを用いて、インスリン刺激時の個別 myotube の S6K 活性時系列を定量した。定量した S6K 活性時系列から特徴量を抽出し、インスリン刺激に対する特徴量の dose response が細胞集団と個別とで異なる性質を持つことを示した。

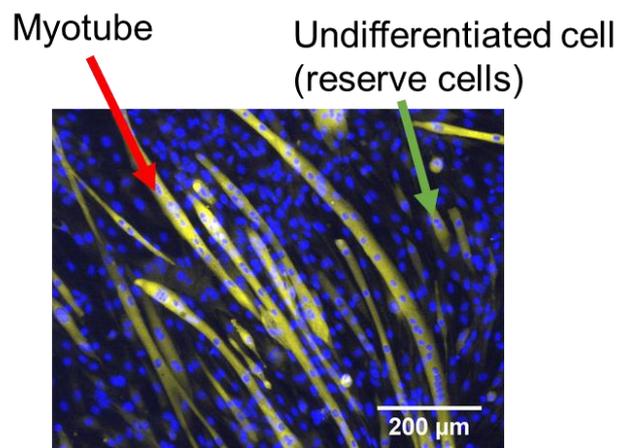


図 1 Eevee-S6K を安定発現した筋分化 C2C12 細胞

Measurements

取得した時系列蛍光画像は 5 分間隔 650 分間（全 131 frames）で、撮影開始後 50 分後時点に刺激を行った。蛍光画像は CFP と FRET-YFP の 2 種類で、これらの比 FRET ratio（FRET-YFP/CFP）を S6K 活性として定量している。

Step I: smoothing of images.

筋分化 C2C12 細胞は多核で細長い形状となる。そのため、取得した蛍光画像の myotube 領域内で蛍光輝度にバラつきが出る。まず初めに median filter で画像中のアウトラリア除去し、white top-hat filter を用いて蛍光輝度の局所的なバラつきを軽減した。これにより、正確な myotube segmentation を行うことができる。

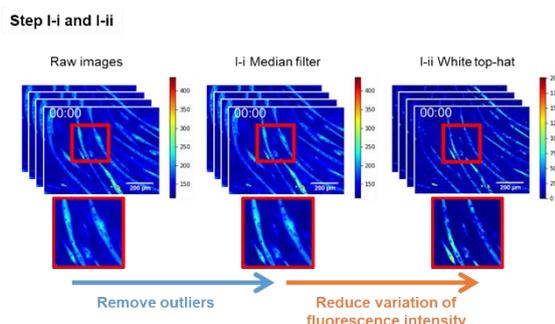


図 2 時系列蛍光画像の前処理

Step II: Segmentation of differentiated C2C12 myotubes.

セグメンテーションステップでは、二値化した時系列蛍光画像を足し合わせることで myotube 領域と reserve 細胞領域間のコントラストを強調し、myotube 領域と myotube の中心領域の同定を可能にした。Myotube の中心領域を核の代わりにマーカーとして用いることで watershed segmentation 法で自動的に個別の myotube 領域の同定を行った。

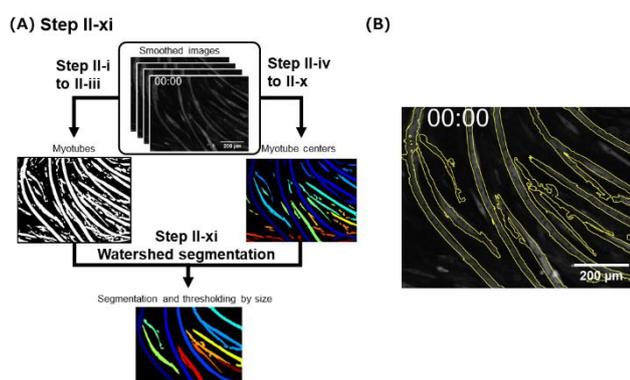


図 3 個別 myotube のセグメンテーション

次に、励起光の露光量と使用画像枚数の変化による myotube 領域同定の性能を、開発手法、大津法、トライアングル法間で比較した。大津法とトライアングル法は蛍光画像における細胞領域の同定で一般的に用いられている方法である。性能比較はマニュアルで領域選択して生成した Ground truth に対する Jaccard index を指標として行った。Jaccard index は[0,1]の値をとり、1に近いほど領域の類似度が高いことを示す。開発手法は励起光の透過率 12%以下で、その他の手法より有意に Jaccard index が高かった。これは、開発手法が従来法より励起光の変化に対して頑健であることを示している。画像枚数の減少に関してはすべての手法間で有意差がなかった。これは、使用画像枚数の減少に対して、開発手法は従来法に匹敵することを示す。さらに、開発手法では myotube 中心領域を同定しているため、watershed segmentation により隣接した myotube 同士を分離できる点がメリットである。

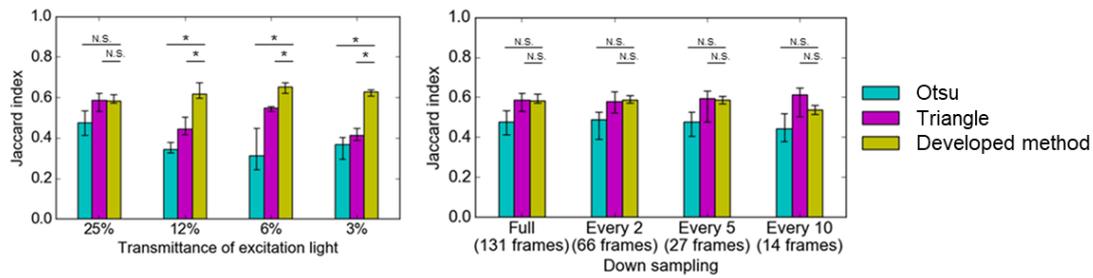


図4 開発手法 (Developed method) と伝統的な手法 (Otsu, Triangle) とのセグメンテーション性能比較。N. S. (Not significant), $p > 0.05$ (Welch's t-test)。 p 値はボンフェロニ法で補正。

Step III: Background correction.

次に、時系列蛍光画像から Maximum intensity projection 画像を生成し、二値化することで myotube が 1 度でも存在した領域を抽出した。抽出した領域と時系列画像の NAND operation により、reserve 細胞と背景からなる myotube 以外の領域を各時点の画像で得た。各画像の蛍光輝度ヒストグラムに対して、two-component Gaussian mixture model (GMM) で背景輝度分布の推定および背景輝度の補正を行った。背景輝度補正を行った後、個別 myotube の蛍光輝度の定量を行った。

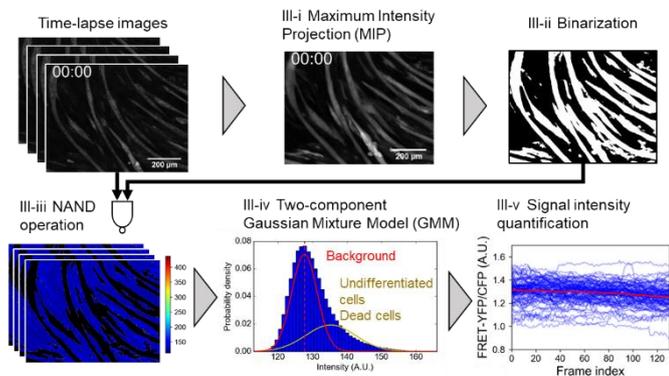


図5 背景輝度補正と FRET ratio の定量

Two-component GMM による背景輝度補正の性能比較を行うため、蛍光輝度分布を推定する方法として two-component GMM と、輝度ヒストグラムを直接用いる方法 (RAW)、カーネル密度推定を用いる方法 (KDE) で、FRET ratio の一階差分系列の絶対値の曲線下面積 (AUC) を計算して有意差検定を行ったところ、two-component GMM が有意に小さかった。同様に、マニュアル定量

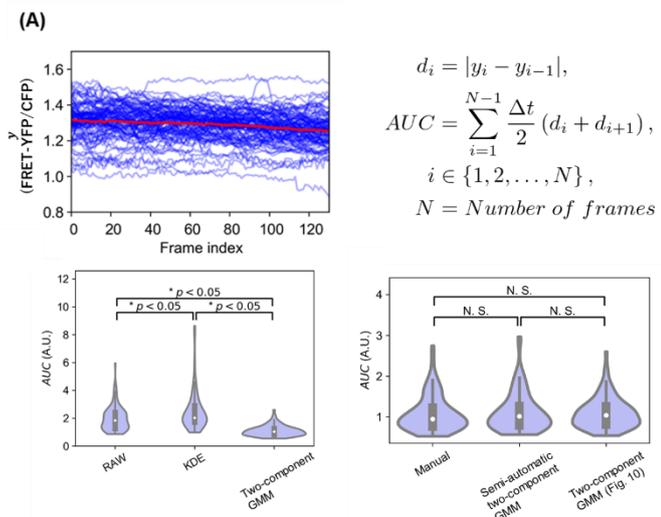


図6 背景補正の性能比較。* $p < 0.05$ (Steel-Dwass test)

を行ったところ、two-component GMM が有意に小さかった。同様に、マニュアル定量

(Manual)、マニュアル選択した領域を使って two-component GMM (Manual + two-component GMM)、two-component GMM 間でも比較を行った。これらに有意差はなかった。以上より、two-component GMM による背景輝度補正は RAW、KDE よりも優れておりマニュアルと同等の精度が出ることが示された。

The different characteristics between cell population and individuals in C2C12 myotubes.

最後に、筋分化 C2C12 を種々インスリン濃度 (0-100 nM) で刺激し、開発した手法で個別 myotube ごとに S6K 活性の定量を行った。定量した S6K 活性時系列から特徴量 (Peak, AUC, Adaptation precision, Half-life of adaptation, Intensity at half-life of adaptation) を抽出した。細胞集団と個別との性質の違いを調べるために、細胞集団としてのブートストラップ集団 (Bootstrap) と個別 myotube としての全データ (All) とで特徴量間の相関解析をそれぞれ行った。Bootstrap と All で相関係数の差の検定をおこなった。Peak time はその他すべての特徴量の組み合わせ

で、相関係数が Bootstrap と All とで有意に異なった。また、Half-life of adaptation もその他すべての特徴量の組み合わせで、相関係数が Bootstrap と All とで有意に異なった。これらの結果は、インスリン刺激に対する S6K 活性化時系列の特性において、個別 myotube には細胞集団では見られない隠れた特性があることを示唆している。

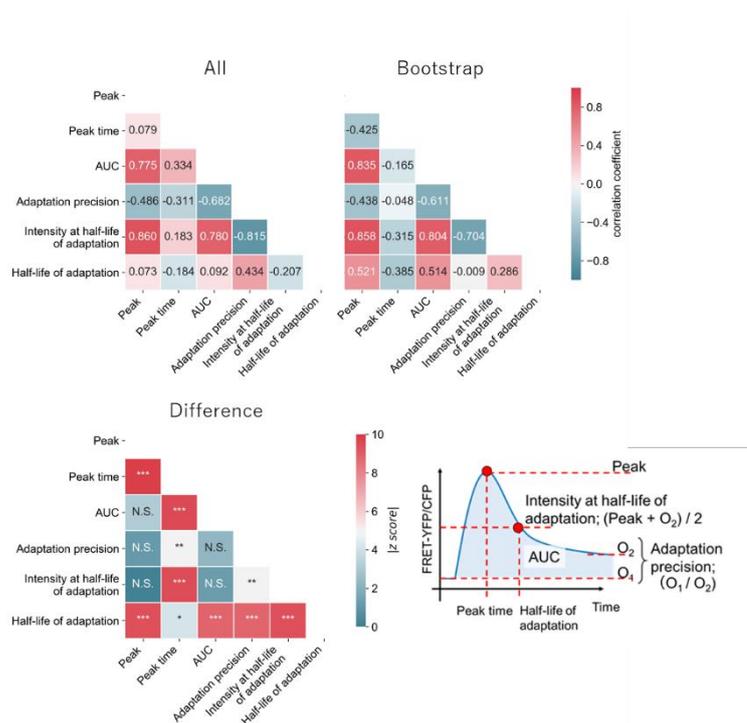


図7 特徴量間の相関解析。N. S. (Not significant)、* $p < 10^{-3}$ 、** $p < 10^{-5}$ 、*** $p < 10^{-7}$ 。