

審査の結果の要旨

氏名 井上 晴幾

生細胞イメージングにおいて、自動セグメンテーションアルゴリズムは、生細胞における細胞内シグナル活性の時系列を定量化するための強力な方法である。自動セグメンテーションアルゴリズムは、これまで主に単核および円形の細胞に対して開発されてきた。しかしながら、分化した C2C12 細胞 (myotube) のような多核で細長い細胞に対するセグメンテーション方法は未だ開発されていない。また、C2C12 細胞は分化誘導により myotube だけでなく未分化細胞も形成するため、背景領域の同定と背景シグナル強度の補正が困難になる。本論文では、インスリンシグナル経路下流のシグナル分子 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 C2C12 細胞に安定発現させ、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。

まず、S6K 活性をモニタする FRET バイオセンサーを安定発現した筋分化 C2C12 細胞の時系列蛍光画像を取得した。取得した時系列蛍光画像は 5 分間隔 650 分間 (全 131 frames) である。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 活性として定量した。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 領域と未分化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。次に、励起光の露光量と使用画像枚数の変化による myotube のセグメンテーション性能を、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。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。

本論文では次に、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** が一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** 演算により、未分化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、2成分混合ガウス分布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。2成分混合ガウス分布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 2成分混合ガウス分布を用いる方法と、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を計算して有意差検定を行ったところ、2成分混合ガウス分布による背景輝度補正は **RAW**、**KDE** よりも優れていることがわかった。同様に、マニュアル定量、マニュアル選択した領域を使って 2成分混合ガウス分布を用いる方法、2成分混合ガウス分布を用いる方法間でも比較を行ったところ、2成分混合ガウス分布を用いる方法はマニュアルと同等の精度が出ることが示された。

本論文では最後に、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** 活性時系列から時系列の特徴量を抽出した。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い、**Bootstrap** と **All** とで有意に異なる特徴量の組み合わせがあることが分かった。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。これは骨格筋における 1細胞解析の重要性を示しており、本論文で開発された方法が骨格筋のシグナル伝達における 1細胞解析への扉を開くと期待される。

なお本論文は、国田勝行氏、松田直樹氏、星野太佑氏、和田卓巳氏、今村博臣氏、野地博行氏、黒田真也氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって研究を立案・実行したもので、論文提出者の寄与が充分であると判断する。したがって、博士 (科学) の学位を授与できると認める。

以上 1993 字