

生体イメージングがつなぐ細胞動態と遺伝子ネットワークの解析

松田秀雄^{†1}

概要: 生体イメージング技術の進展により、生体内の細胞や組織を生きた状態で観察することが可能となり、生体内の細胞の動きをリアルタイムで観察可能となっている。一方、次世代シーケンシング技術の急速な発展により、生体組織中の各細胞で働いている数万個におよぶ遺伝子群を網羅的かつ定量的に解析することも可能となっている。これらの技術を融合することで、生きた細胞の動きを調節している遺伝子ネットワークの解析が原理的には可能となったが、実際の情報解析技術はまだ発展途上の段階にある。本稿では、これらの技術についての最近の動向や応用分野について紹介する。

キーワード: 生体イメージング、細胞動態、遺伝子ネットワーク、バイオインフォマティクス

Connecting Cell Dynamics and Gene Network Analyses by Bio-Imaging

HIDEO MATSUDA^{†1}

1. はじめに

顕微鏡で細胞の動きを観察し、その動態を定量的に数理モデルで表現して、その動きをシミュレーションする研究は以前より行われている。細胞の走化性の研究などが、その代表例としてあげられる。さらに、近年の多光子励起顕微鏡を始めとした光学観察技術の大幅な向上により、マウス等の動物の生体内を生きたまま観察し、細胞や分子の「動態」を解析することが可能となってきた。このように生きた環境でのリアルタイムの生体イメージングは *intravital imaging* と呼ばれ、近年注目を集めている[1]。

一方で、細胞の分子的な状態を調べる方法の一つとして細胞内で働いている遺伝子の量(遺伝子発現量と呼ばれる)を計測する方法がある。遺伝子が働くときには、細胞の核内の DNA の塩基配列上の遺伝子領域が RNA に写し取られるから、RNA の量を計測することで遺伝子発現量を求めることが広く行われている。以前から、マイクロアレイまたは Gene チップと呼ばれる、RNA の量を標識した蛍光の強さで表す方法により計測されてきたが、近年は RNA の配列をシーケンサーで読み取ることで、遺伝子発現量を求める RNA-Seq と呼ばれる方法も盛んに利用されている。これらの方法により、一度の計測で数千個から数万個におよぶ数の遺伝子の発現量を一度に求めることができる。生体内の組織・臓器中の細胞で働いている遺伝子の発現量を網羅的に計測することで、ある遺伝子が働くときは高い頻度で特定の別の遺伝子も働いているなどの因果的な事象を探索することができ、ベイジアンネットワーク等の確率モデ

ルを使うことで、遺伝子間の因果関係を表す遺伝子ネットワークを作成することができる[2]。

前述の細胞の動態の多くは、細胞内の遺伝子のネットワークで制御されていると考えられているが、従来は特定の動態を示す細胞のみから選択的に遺伝子発現量を計測するのが困難であったため、細胞動態からそれを制御する遺伝子を求めるのではなく、個別の遺伝子を破壊してそれに対する細胞の動態を観察するアプローチが主流であった。しかし、近年 TIVA (transcriptome in vivo analysis)プローブ[3]という特定の細胞のみを光らせて、そこから1細胞のレベルで RNA を抽出することが可能となった。これにより、特定の動きを示す細胞のみを光らせて、そこから RNA を回収する方法が開発され、両者はつながりつつある。

2. 生体イメージング

図1はマウスの血管内の免疫細胞(白血球の一種)を二光子励起蛍光顕微鏡で観察した画像である。生きたマウスの血管内の細胞の動きを経時的に観察できる。図1では、刺激を与えて炎症を起こさせており、免疫細胞を緑色蛍光で標識している。

生体内を経時的に毎秒30フレームで画像を撮影できるため、一つ前のフレームで輝度が類似した画素を対応付けることで、画像中の免疫細胞の動きを表すオプティカルフローを求めることができる。図1の画像とそれの一つ前の画像の間での細胞の移動速度をオプティカルフローにより計算して重ね合わせたものを図2に示す。OpenCV 3.0中のGunnar Farnebackのアルゴリズムでオプティカルフローを計算しており、格子の上に白で点または線で速度ベクトルを表し、点は速度が0、すなわち時間的に連続する画像間で対応する画素が移動していないことを表し、線はその方向

^{†1} 大阪大学 大学院情報科学研究科
Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University

に線の長さ分の速度で移動していることを表す。図2から細胞の移動速度は均一でなく細胞ごとにばらついているのがわかる。炎症発生時には免疫細胞が血管壁に張り付いて留まるという現象があるとされているが、図2を見ると動かずに留まっている細胞があることがわかる（例えば、丸で囲んだ部分）。

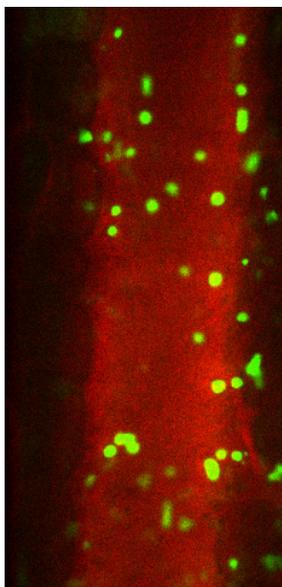


図1 血管中の免疫細胞

Figure 1 Immune Cells in Blood Vessel.

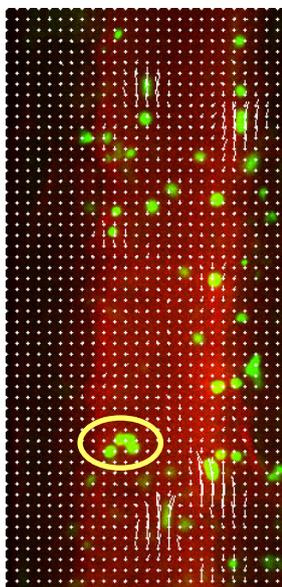


図2 図1の画像のオプティカルフロー

Figure 2 Optical Flows for Image in Fig. 1.

3. 遺伝子ネットワーク

3.1 遺伝子ネットワークの種類と推定法

細胞中の遺伝子は、基本的に単独で働くのではなく、他の遺伝子と協調してネットワークを構成することが知られ

ている。このような遺伝子ネットワークの代表的な例としては、遺伝子制御ネットワーク、タンパク質間相互作用ネットワーク、代謝反応ネットワークなどがある。

遺伝子制御ネットワークは、ある遺伝子の発現量が増加するときに、別の遺伝子の発現量が増加または減少する関係をグラフで表しており、グラフの節点は遺伝子、辺には向きがあり、発現量の増減に応じて、亢進辺と抑制辺の2種類がある。本稿では、遺伝子制御ネットワークについての研究を紹介する。なお、タンパク質間相互作用ネットワークとは、複数のタンパク質どうしが会合してリン酸化などにより情報を伝達するものであり、代謝反応ネットワークとは、酵素（タンパク質）を触媒とする化学反応の連鎖を指す。

遺伝子制御ネットワークは、ネットワークの節点を構成している各遺伝子の発現量をもとに推定することが可能である。ただし、実際の細胞内では、遺伝子制御ネットワークが存在していて、その結果としてネットワーク中の各遺伝子の発現量が決まるので、発現量からネットワークを推定する方法は逆問題であり、一般的に解くのは容易ではない。具体的な方法としては、ブーリアンネットワーク、グラフィカルガウシアンモデリング、ベイジアンネットワーク、微分方程式モデルなどがあげられる。その中でも、ベイジアンネットワークは、ベイズ推定という確率的な推定法に基礎をおいており、推定により得られるネットワークを確率的に解釈できることから、定量性や厳密性に優れた方法といえる[2]。しかし、厳密に解こうとすると候補となるネットワークの数が膨大となることから、遺伝子数が100を超えると最適なネットワークを求めるのは現実的ではなくなる。このため、山登り法などの近似的な探索法が広く用いられている。

3.2 遺伝子発現量と遺伝子制御ネットワークの例

図3に遺伝子発現量の例を示す。これは、これはマウスの骨髄にある間葉系幹細胞と呼ばれる細胞が、脂肪を蓄積する細胞である脂肪細胞に分化（変化）するときに働く遺伝子セットの発現量を図式化したものであり、行が遺伝子、列が時系列を表す。内部の色は発現量の変化を表しており、赤が増加、青が減少を指し、色の濃さが変化の度合いを表す。図3から、分化の前半に濃い赤色を示す（すなわち、強く働く）もの、中間段階で働くもの、後半になって働き出すものと、働く時期が多様であることがわかる。

図4に遺伝子制御ネットワークの例を示す[4]。図3の中の一部の遺伝子を取り出して、相互の制御関係を表したものであり、緑と黄色で表示された節点は、それぞれ分化の前半と後半に働く遺伝子を表している。図4からわかるように、前半で働く遺伝子（緑）から後半で働く遺伝子（黄色）に多数の辺が引かれており、分化の制御の流れを示唆している。

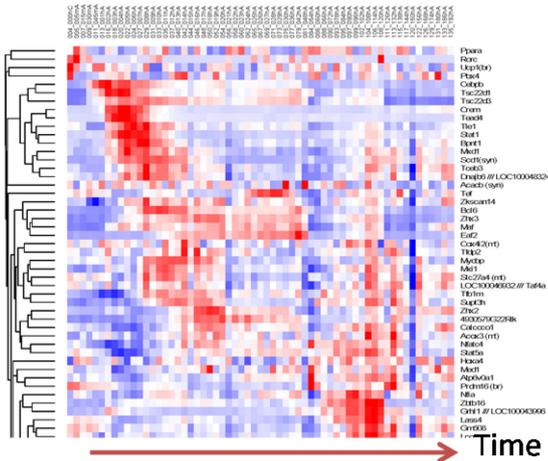


図 3 遺伝子発現量の例
 Figure 3 An Example of Gene Example

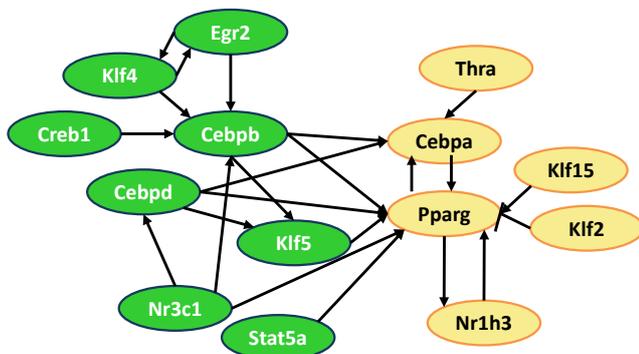


図 4 遺伝子制御ネットワークの例
 Figure 4 An Example of Gene Regulation Network

3.3 細胞動態を制御する遺伝子ネットワークの推定に向けて

例えば、図 1、図 2 で示されるような細胞ごとの動きの違いを制御している遺伝子ネットワークを推定するには、以下の課題があると考えられる。

- (1) 細胞ごとに動きが多様であるため、特徴的な動きを示す細胞のみを抽出し、その細胞について遺伝子発現量を計測する必要がある。
- (2) 遺伝子は細胞内で働く時期が多様であるため、経時的に細胞を追跡して、時期ごとの遺伝子発現量を計測する必要がある。

これらの課題を解決するためには、細胞の動きを生体イメージングにより可視化して、特徴的な動きを示す細胞の同定と追跡を自動的に行い、そこから RNA を抽出して遺伝子発現量を求める必要があると考えられる。

これらを高等動物の生体内で行うには、二光子励起顕微鏡と TIVA プローブ[3]のようなイメージング技術と分子生物学技術の活用に加えて、イメージング画像解析や遺伝子

発現・遺伝子ネットワークの解析など高度な情報科学技術の開発が必要不可欠である。現段階では、まだ達成できていないが、生体イメージングや遺伝子解析技術は急激に進歩しつつあり、最先端の技術を駆使して実現できることを望んでいる。

4. おわりに

本稿では、細胞動態と遺伝子ネットワーク推定の研究の例を示し、両者をつなぐには生体イメージング技術の活用が必要と考えられることを示した。今後は、実現に向けて、実際に対象とする具体例をあげて取り組むことを検討中である。

謝辞 二光子励起顕微鏡による血管内部の細胞動態画像は、大阪大学大学院生命機能研究科の石井優教授からご提供頂きました。ここに感謝いたします。

本研究は、JST CREST 「動く 1 細胞の「意思」を読み取る in vivo 網羅的動態・発現解析法の開発」、およびポスト「京」重点課題(2)「個別化・予防医療を支援する統合計算生命科学」の支援を受けています。

参考文献

- [1] Pittet, M. J. and Weissleder, R., Intravital Imaging. *Cell*, Vol.147, pp.983-991 (2011).
- [2] Friedman, N. et al., Using Bayesian Networks to Analyze Expression Data, *Journal of Computational Biology*, Vol.7, No.3-4, pp.601-620 (2000).
- [3] Lovatt, D. et al., Transcriptome in vivo Analysis (TIVA) of Spatially Defined Single Cells in Live Tissue, *Nature Methods*, Vol.11, No.2, pp.190-196 (2014).
- [4] Nakayama, T., Daiyasu, H., Seno, S., Takenaka, Y. and Matsuda, H., Reconstruction of Dynamic Gene Regulatory Networks for Cell Differentiation by Separation of Time-Course Data, 2013 International Conference on Bioinformatics and Computational Biology (BIOCOMP'13), BIC7296 (2013).