APPLICATION NOTE

顕微鏡用AIモジュール *NIS.ai*

NIS.aiを用いた、Fucciデジタルステイン画像の生成と細胞周期解析への応用

生サンプルを染色し顕微鏡観察に供するやり方は一般的ではあるが、染色による影響は避けられない。近年はさまざまな研究分野において機械学習が活躍している。蛍光イメージング分野でも機械学習を用い、非染色の生サンプルにおいて特徴や構造体を検出する手法が検討されている（参考文献1）。細胞周期情報は、細胞の増殖・分化バランスを評価する指標として広く用いられる（参考文献2, 3）が、たとえば再生医療分野においても、ヒトiPS細胞由来幹細胞移植治療などを目指して、染色せずに培養生細胞の増殖・分化状態を評価することが求められている。しかしながら、非染色で細胞周期を検出する技術はいまだ確立されていない。

本アプリケーションノートは、国立研究開発法人理化学研究所 脳神経科学研究センター 細胞機能探索技術研究チームの宮脇敦史先生、阪上-沢野朝子先生にご協力いただき、NIS.aiモジュールを用いて非染色培養細胞の顕微鏡画像から細胞周期情報を予測し、さらにG1, G1/S, late S, G2, M期の5フェーズに分類した事例を紹介する。

実験の概要

細胞周期を可視化するツールとしてFucci（Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator）が知られている（参考文献４）。Fucciには、センサー部分と蛍光タンパク質の種類によりいくつかのバリエーションがある(参考文献５)。その内、Fucci(CA)5とFucci(SA)5は、いずれも緑色蛍光タンパク質（h2-3）と赤色蛍光タンパク質（AzaleaB5）を融合した2種類のコンストラクトにより構成され、細胞周期の異なるフェーズをハイライトする性能を持っている（参考文献６）。

本実験では、Fucciと顕微鏡用AIモジュール「NIS.ai」を組み合わせて、非染色の培養生細胞の顕微鏡画像から細胞周期を予測するAIモデルを構築した。NIS.aiは、ニューラルネットワークをベースとしたディープラーニング技術である（図1）。その機能の一つであるConvert.aiを使うと、位相差など一般的な透過明視野画像から蛍光画像のパターンを予測し、デジタルステイン画像を生成することができる。

学習

Fucci(CA)5とFucci(SA)5をそれぞれ安定発現するHeLa細胞を用いてFucciの蛍光画像を取得し、これを教師画像として使用してConvert.aiにFucciの蛍光パターンを学習させた。学習済みのConvert.aiを使うと、位相差画像を入力するだけで、HeLa細胞のFucciデジタルステイン画像を得ることができる。Fucci(CA)5とFucci(SA)5を用いて作成した学習済みモデルは、それぞれConvert.ai(CA)、Convert.ai(SA)と呼ぶ。

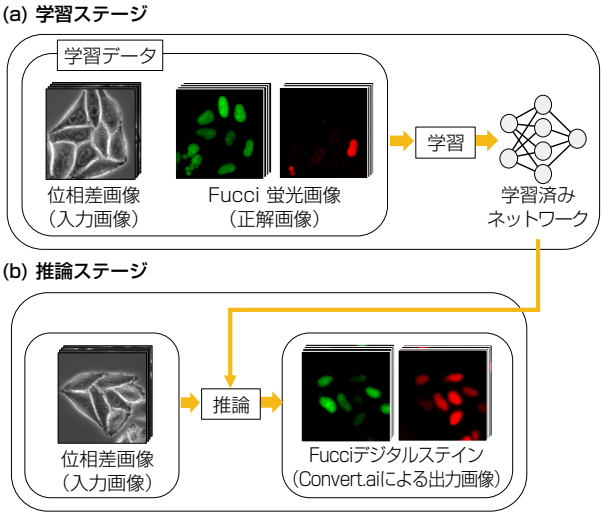

図1. デジタルステインAIモデルの概要

本モデルのベースとなる「Convert.ai」は、(a) 学習ステージと(b) 推論ステージから構成される。学習データの準備として、HeLa/Fucci細胞をマルチポイントで、長時間タイムラプス撮影した。

(a) 学習ステージでは、位相差画像とFucci蛍光画像（緑:h2-3と赤:AzaleaB5）のセットからなる学習データを1,000セット準備し、位相差画像を入力、Fucci蛍光画像を推論結果の正解としてConvert.aiの学習を行った。

(b) 推論ステージでは、学習済みConvert.aiに新たな位相差画像を入力し、Fucciのデジタルステイン画像を出力させた。学習済みConvert.aiは、一度作成すれば、その後も繰り返し新しいデータセットに適用できる。

細胞：
- HeLa/Fucci(CA)5:RCB4919, RIKEN BioResource Research Center
- HeLa/Fucci(SA)5:RCB4917, RIKEN BioResource Research Center

顕微鏡：Eclipse Ti2-E
対物レンズ：CFI S Plan Fluor ELWD ADM 20XC
CMOSカメラ：ORCA-Flash4.0 V3 (Hamamatsu Photonics)
画像取得：30分間隔で40時間のタイムラプス撮影を、60カ所で実施
AI学習条件：画像枚数1,000セット, 学習時間は3,000回

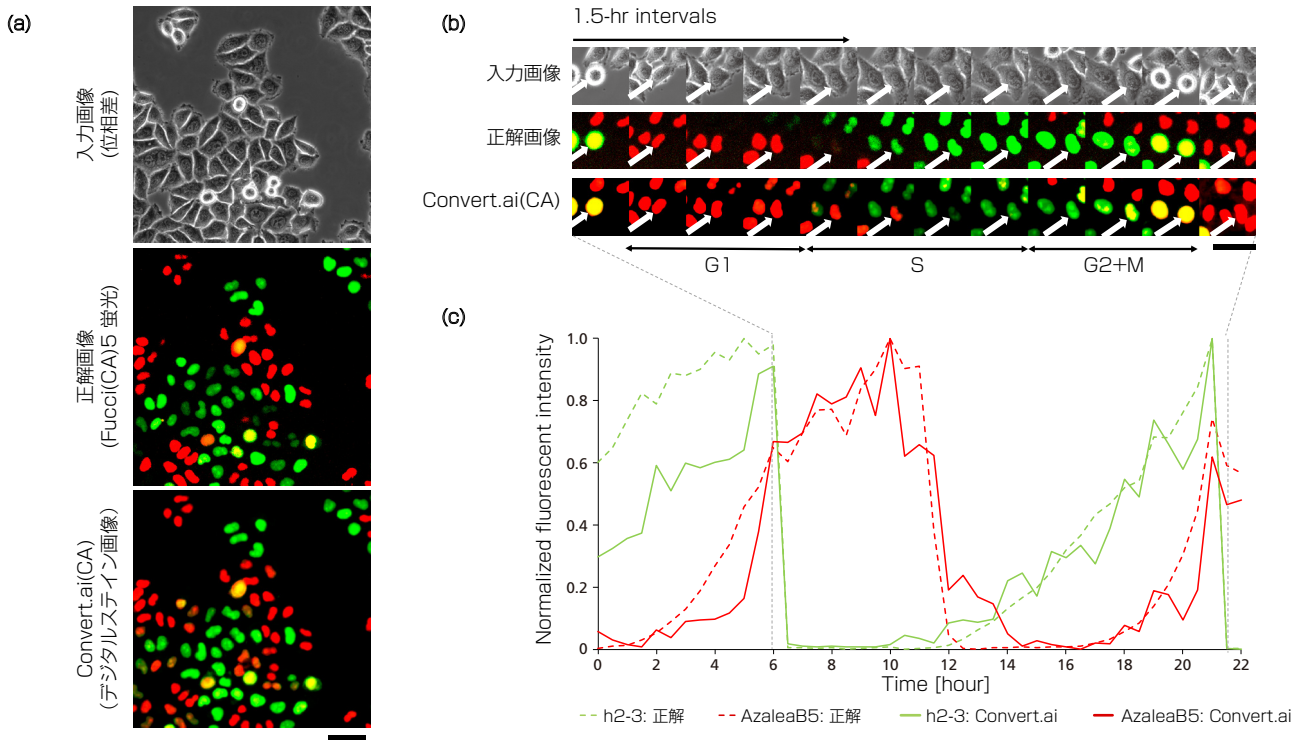

図2. Convert.ai(CA)による、Fucci(CA)5のデジタルステイン画像の生成

(a) Convert.ai(CA)が出力したデジタルステイン画像と、正解画像の比較。入力画像: 学習済みConvert.ai(CA)に入力した位相差画像、正解画像: Fucci(CA)5蛍光画像、Convert.ai(CA): 入力画像から推論・出力されたFucci(CA)5のデジタルステイン画像。Scale bar: 50 µm.

(b) タイムラプス位相差画像からConvert.ai(CA)が出力したデジタルステイン画像を、正解画像と比較。ここでは、40時間のタイムラプス画像の一部を、横方向に時間軸で並べたものを示す。入力画像: 学習済みConvert.ai(CA)に入力した位相差画像、正解画像: Fucci(CA)5蛍光画像、Convert.ai(CA): 入力画像から推論・出力されたFucci(CA)5のデジタルステイン画像。Scale bar: 50 µm.

(c) (b)の画像で、矢印で示す細胞核内の輝度を経時的に計測。グラフは、緑:h2-3、赤:AzaleaB5の輝度を、正解画像(破線)とデジタルステイン画像(実線)で示す。細胞の追跡にはNIS-Elementsのトラッキング機能および、細胞核検出用のデジタルステインモデルを使用した。細胞核用デジタルステインモデルについては、APPLICATION NOTE「機械学習を利用した高精度かつ非侵襲な細胞計測」を参照。

Convert.aiは位相差画像入力から推論し、Fucci デジタルステイン画像を作成

学習済みConvert.ai(CA)に、学習に用いていない新たな位相差画像を与え、Fucci(CA)5のデジタルステイン画像を出力させたところ、正解画像であるFucci(CA)5の蛍光画像とほぼ一致する再現性を示した(図2a)。さらに、タイムラプスのデジタルステイン画像から個々の細胞の輝度推移を定量化した結果、Fucci(CA)5の蛍光輝度の推移を再現することを確認した(図2b, 2c)。

Fucciデジタルステイン画像を用いて細胞周期の定量解析が可能

Fucci(CA)5の蛍光輝度推移がデジタルステイン画像で再現されたことから、輝度情報を基にした細胞周期の分類解析を実施した(図3)。まず、デジタルステイン画像を用いて、個々の細胞の輝度を測定し散布図を作成した。次に、正解画像であるFucci蛍光画像を用いて、一部の細胞に対してG1, S, G2+M期のラベル付けを行い、ペアのデジタルステイン画像で同一細胞にラベル付けした。ラベル付けした細胞の分布を、散布図上にプロットし、細胞周期ごとの細胞数を定量化した(図3a)。各周期に分類された細胞の割合を、正解画像とデジタルステイン画像間で比較した結果、両者で類似した結果が得られた(図3b)。以上から、統計的に、Convert.aiを用いることで非染色の画像から個々の細胞の細胞周期フェーズを同定できることが明らかとなった。

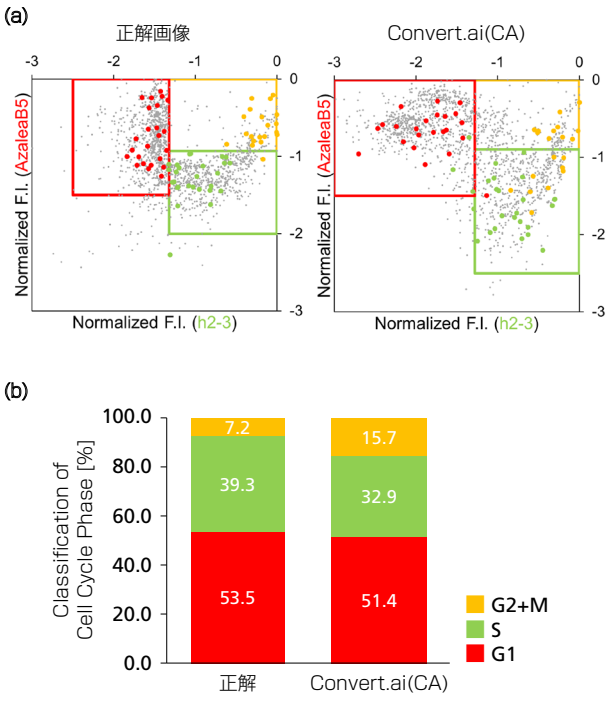

図3. Fucci(CA)5 のデジタルステイン画像を用いた細胞周期の分類解析

(a) 個々の細胞における、緑:h2-3と赤:AzaleaB5の輝度値の散布図(Fluorescent Intensity: F.I.)。軸は対数表示。左は正解画像、右はConvert.ai(CA)が出力したデジタルステイン画像のデータで、G1期を赤、S期を緑、G2+M期を橙の枠で示す。正解画像とデジタルステイン画像はペアとなっており、正解画像をもとに各周期の代表的な細胞を選出し、散布図上にラベルしている。

(b) (a)で定義分類した細胞群について、細胞周期ごとの割合を示す。

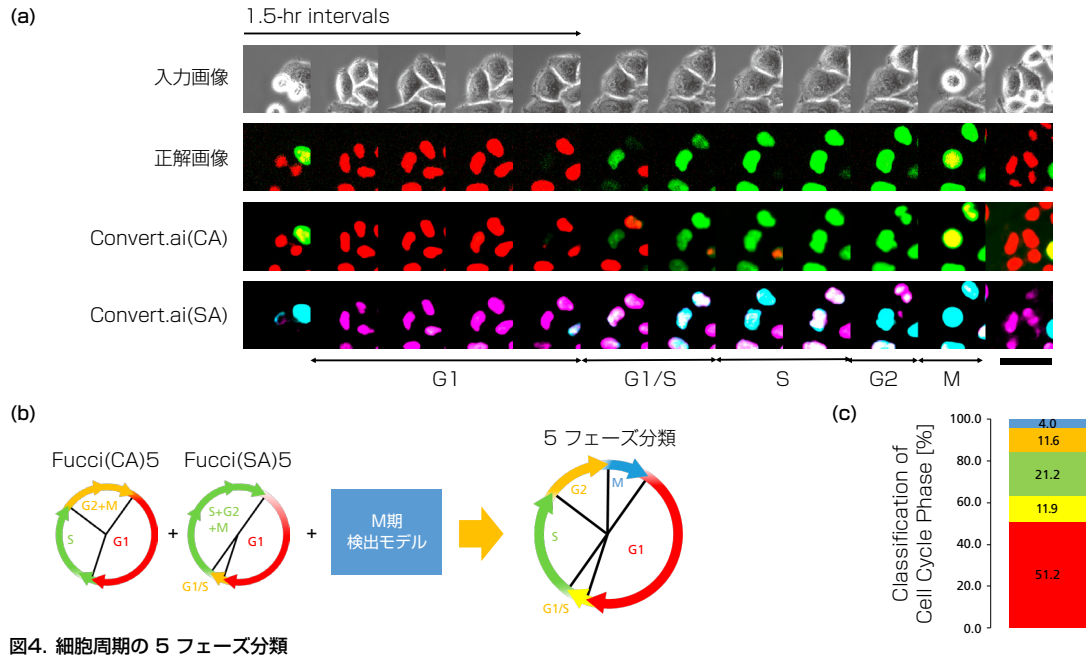

図4. 細胞周期の 5 フェーズ分類

(a) Fucci(CA)5の蛍光パターンを学習したConvert.ai(CA)およびFucci(SA)5の蛍光パターンを学習したConvert.ai(SA)に、タイムラプス位相差画像を入力し、出力されたデジタルステイン画像を正解画像と比較。ここでは40時間のタイムラプス画像の一部を横方向に時間軸で並べたものを示す。入力画像: 位相差画像。正解画像: Fucci(CA)5の蛍光画像。Convert.ai(CA): Fucci(CA)5のデジタルステイン画像。Convert.ai(SA): Fucci(SA)5のデジタルステイン画像。Scale bar: 50 µm.

(b) 細胞周期の5フェーズ分類解析のイメージ図。同一の位相差画像に、Fucci(CA)5デジタルステインモデルとFucci(SA)5デジタルステインモデル、M期検出モデルを適用することにより、個々の細胞の細胞周期を５つのフェーズに分類する。

(c) (b) の方法で分類した細胞の、細胞周期ごとの割合。

Fucciデジタルステイン画像を用いて、細胞周期の詳細分類が可能

Fucci(CA)5はG1, S, G2+M期を、一方Fucci(SA)5はG1, G1/S, late S+G2+M期を識別する。また当然のことではあるが、位相差画像からは、細胞の輪郭形状に基づき、M期にある細胞を容易に検出することができる。本実験では、Convert.ai(CA)とConvert.ai(SA)のモデルを併用し、さらにM期の細胞のみを検出するモデル(Segment.aiを使用)を重ねて、同一の位相差画像に適用することにより、細胞周期をG1, G1/S, late S, G2, M期の5フェーズに分類することに成功した (図4)。このように、NIS.aiモデルは従来のFucciの特性を発展させ、さらに詳細な細胞周期フェーズの同定と解析を可能にすることを示した。

まとめ

NIS.aiとFucci技術の組み合わせにより、位相差画像を入力するだけで、細胞周期の各フェーズを推論・分類することができる。これは、非染色サンプルの評価が求められる再生医療分野において殊に、有用なツールになることが期待できる。

本実験は、国立研究開発法人理化学研究所と株式会社ニコンのシステム開発部が共同で進めました。

参考文献

1. E. M. Christiansen et al., “In Silico Labeling: Predicting Fluorescent Labels in Unlabeled Images”. Cell. 19;173(3). 792-803 (2018).
2. N. Zielke and B. A. Edgar, “FUCCI sensors: powerful new tools for analysis of cell proliferation”. Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol. 4(5). 469-487 (2015).
3. A. Kalbasi and A. Ribas, “Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade”. Nat. Rev .Immunol. 20(1). 25-39 (2019).
4. A. Sakaue-Sawano et al., “Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression”. Cell. 132, 487–498 (2008).
5. A. Sakaue-Sawano et al., “Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle”. Mol. Cell. 68, 626-640 (2017).
6. R. Ando et al., “Two new coral fluorescent proteins of distinct colors for sharp visualization of cell-cycle progression”. BioRxiv. Available at https://doi.org/10.1101/2020.03.30.015156. Deposited 31 March 2020.

製品情報

顕微鏡用AIモジュール *NIS.ai*

画像統合ソフトウェア「NIS-Elements」を拡張する画像処理・解析モジュールで、Enhance.aiとConvert.ai、Segment.aiの3種類のAIモジュールが含まれます。

本アプリケーションノートで使用したConvert.aiは、位相差や微分干渉などの非染色の細胞画像から、蛍光画像に近似したデジタルステイン画像を生成するよう学習することが可能です。蛍光染色を行うことなく長時間タイムラプスが行えるため、励起光によるダメージが少ない低侵襲な解析を実現します。

Segment.aiは、目的とするオブジェクトのみをセグメンテーションするよう学習できます。従来の二値化ではターゲット抽出が困難だったケースや、手作業による分類が必要だったケースに、新たなソリューションを提供します。