

## 先端計測分析技術・機器開発事業「機器開発プログラム」重点開発領域案

(領域名)

### シグナル伝達の定量化ハイスループットイメージング技術

(概要)

細胞内のリン酸化、たんぱく質などを含む多くの分子の動態を同時に精度よくハイスループットに検出する多色イメージング技術を開発する。リン酸化抗体などによる免疫染色手法などを用いて複数の分子を同時に同一細胞で検出する。イメージング技術のポテンシャルを最大限に引き出すため、イメージング画像から定量性の高い情報を自動的に取得するアルゴリズムとソフト開発も同時に行う。

(期待される効果の例)

1. iPS細胞を含む幹細胞における分化誘導やガン幹細胞の同定
2. 細胞画像処理アルゴリズムおよびソフト開発により定量性の上昇
3. 現在のフローサイトメトリーを完全に凌駕しうる代替技術
4. 創薬ハイコンテントスクリーニング手法を一変
5. 自動化技術も試みる。本手法以外にも広い汎用性を有する技術
6. システム生物学分野などライフサイエンスのイノベーション

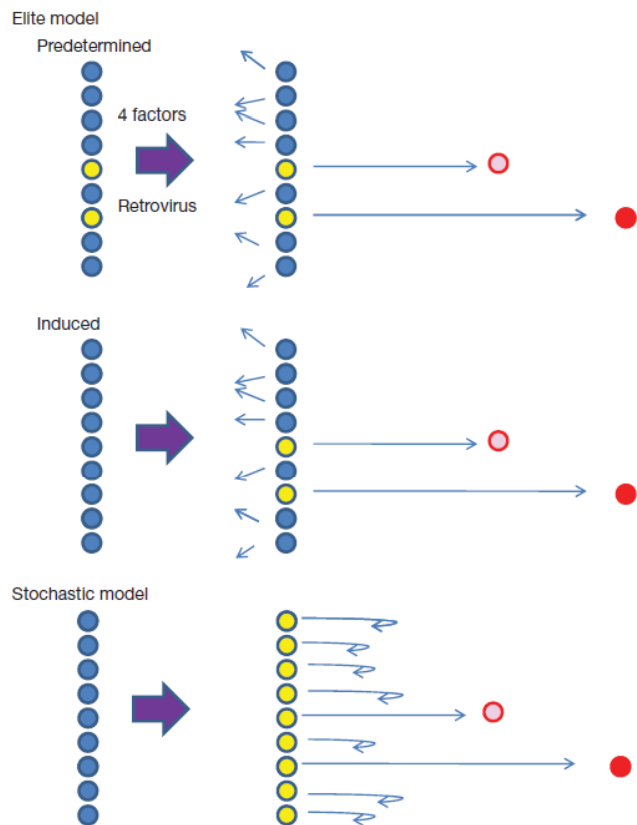
# シグナル伝達の定量化 ハイスループットイメージング技術

1.なぜ必要か？何に使うのか？

「1細胞レベルで複数の分子を同定」

# iPS 細胞と分化

Elite and stochastic models for iPS cells generation



Yamanaka, S. Nature 460, 49-52, 2009

Q1 どの細胞がiPS細胞になるのか？

Q2 Stem細胞からどの細胞へ分化するのか？

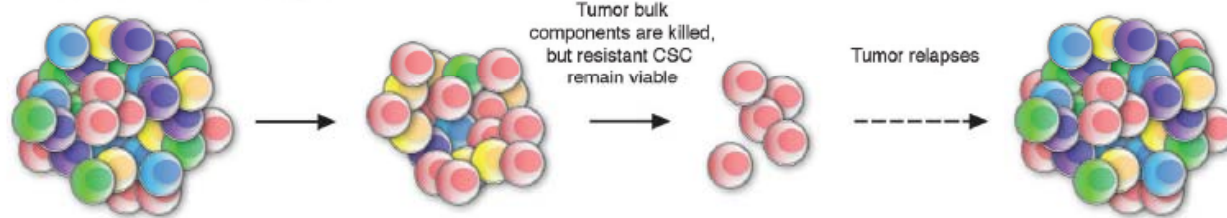
ポイント  
ごく一部の細胞に選択的

解決方法

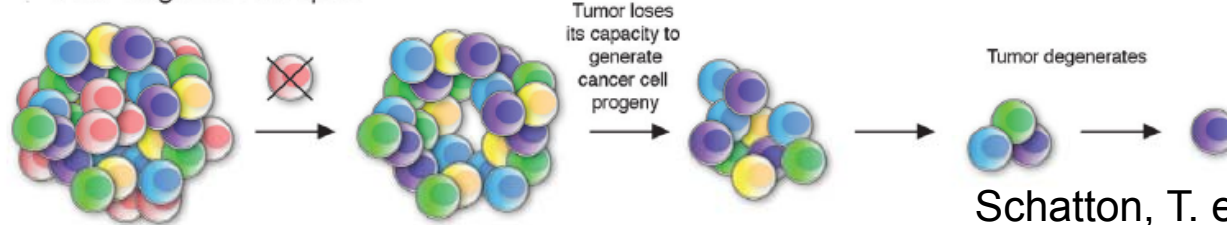
一細胞で同定しないといけない。  
同定には複数の分子を一つの細胞で見る必要がある！

# がん幹細胞(Cancer stem cells)

A Conventional Therapies



B CSC-Targeted Therapies



Schatton, T. et al. BioEssay, 2009

 Cancer Stem Cell (CSC)

 Differentiated Tumor Cells

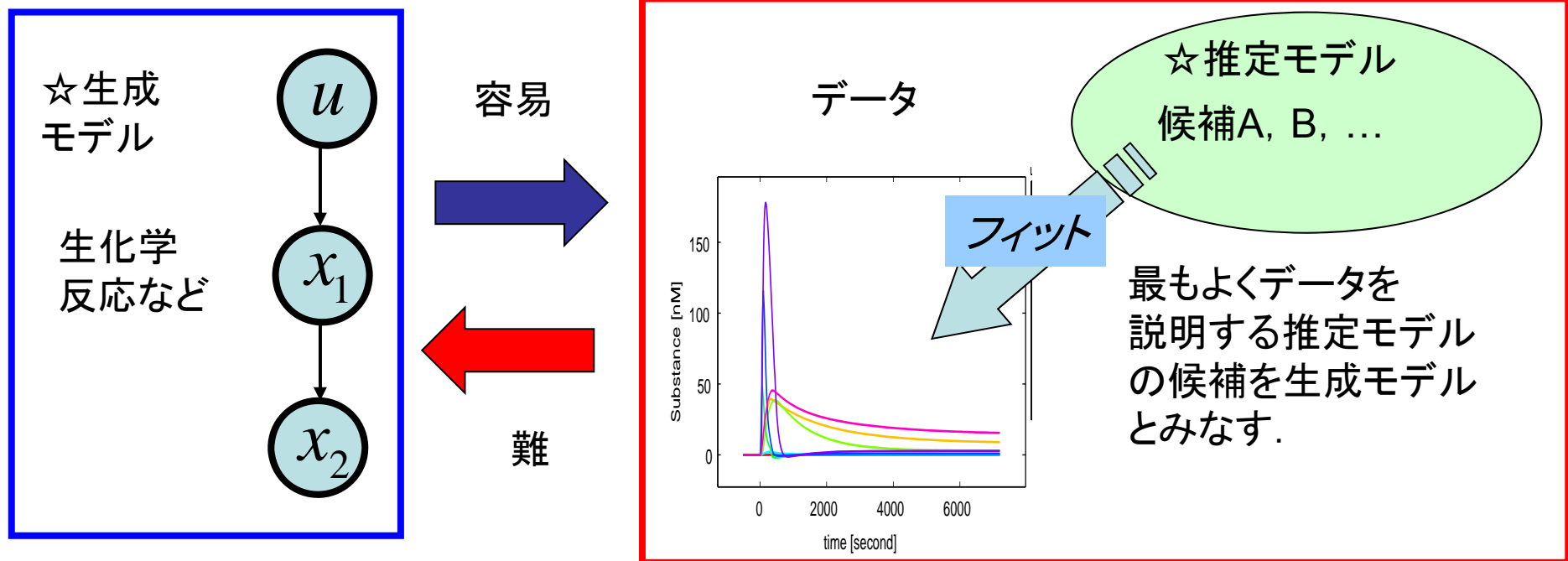
がん幹細胞：がんの源  
これを選択的にたたけ  
ばよい。

解決方法

1細胞レベルで複数の分子を  
同時に同定しないといけない。  
→ 定量化ハイスループットイ  
メージング技術

# システム生物学

## 細胞のモデル化と応答予測



- ・順問題: 以前は, データと知見により人力
- ・逆問題: 定量化ハイスループットイメージング技術によりデータドリブンモデルが可能  
(天気予報などさまざまな分野で用いられている手法)

# シグナル伝達の定量化 ハイスループットイメージング技術

## 2. どのような技術か？

「1細胞レベルの多重染色、画像解析」

# シグナル伝達の定量化

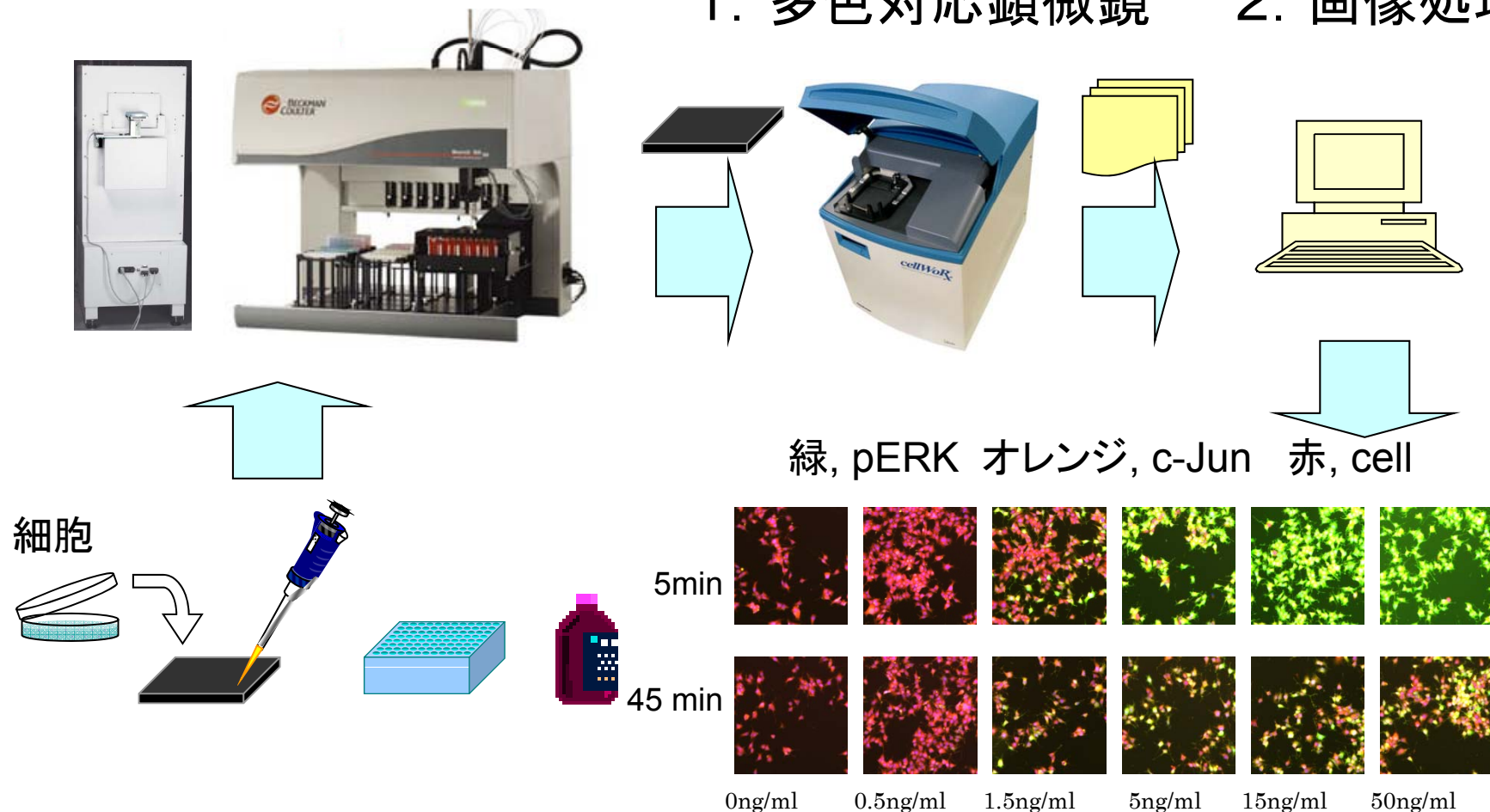
## ハイスループットイメージング技術

細胞の多色染色(リン酸化抗体)

3. 補足: ロボットによる実験の自動化

1. 多色対応顕微鏡

2. 画像処理



# シグナル伝達の定量化

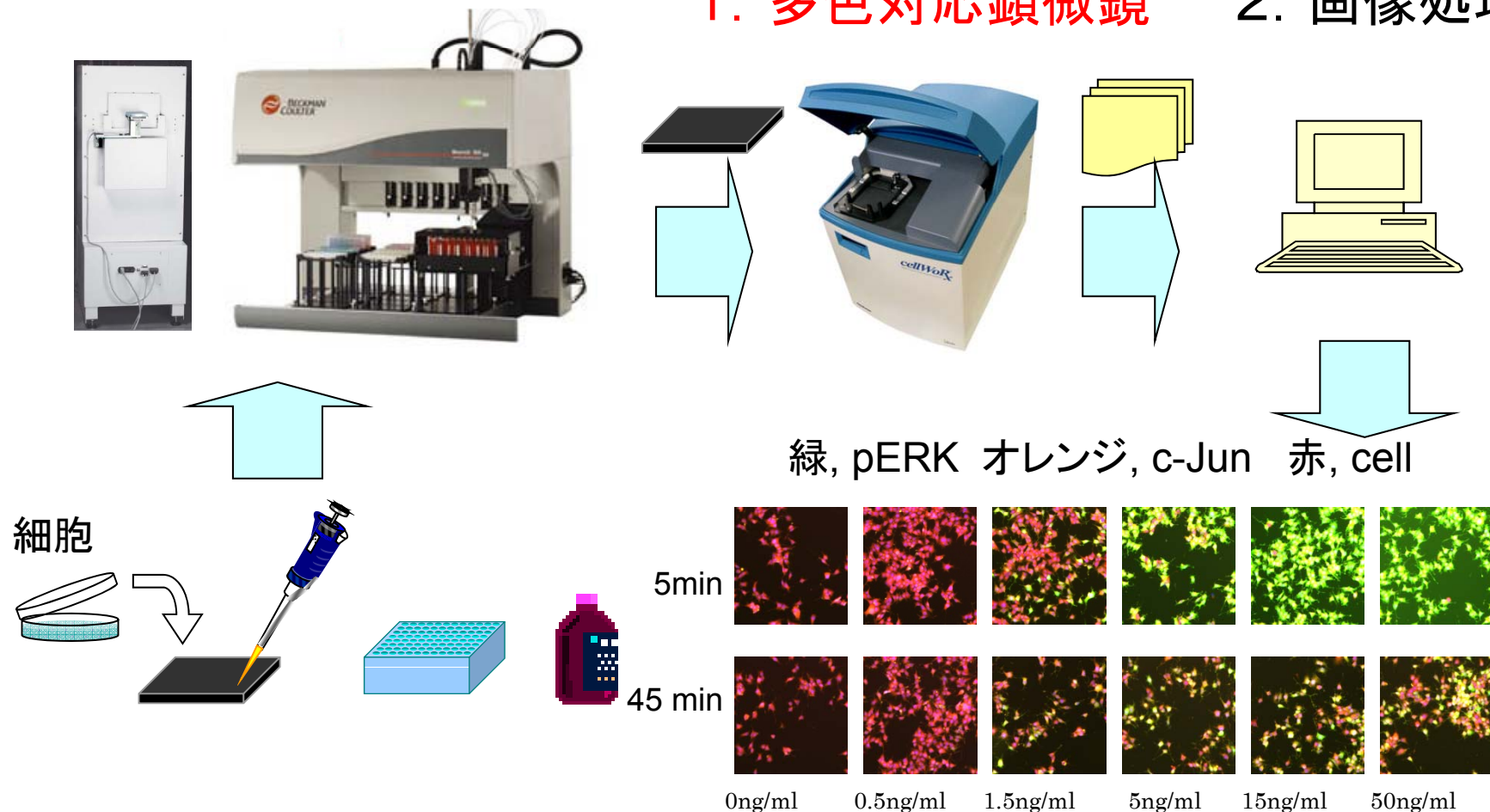
## ハイスループットイメージング技術

細胞の多色染色(リン酸化抗体)

3. 補足: ロボットによる実験の自動化

1. 多色対応顕微鏡

2. 画像処理

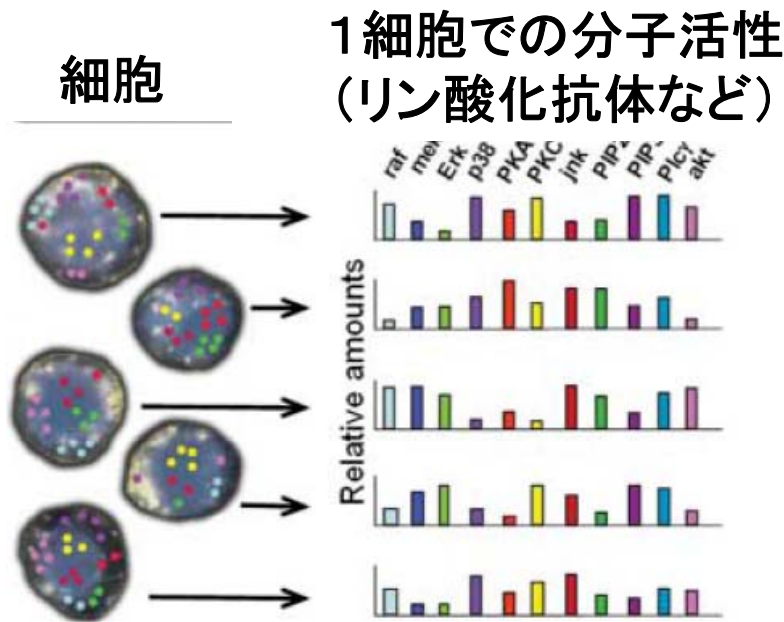




# シグナル伝達の定量化 ハイスループットイメージング技術

## 1. 多色対応顕微鏡

### サンプルの例



#### 目的

1細胞の多色(6種類以上)を検出

#### 方法

1. 分光
2. フィルタ

# シグナル伝達の定量化

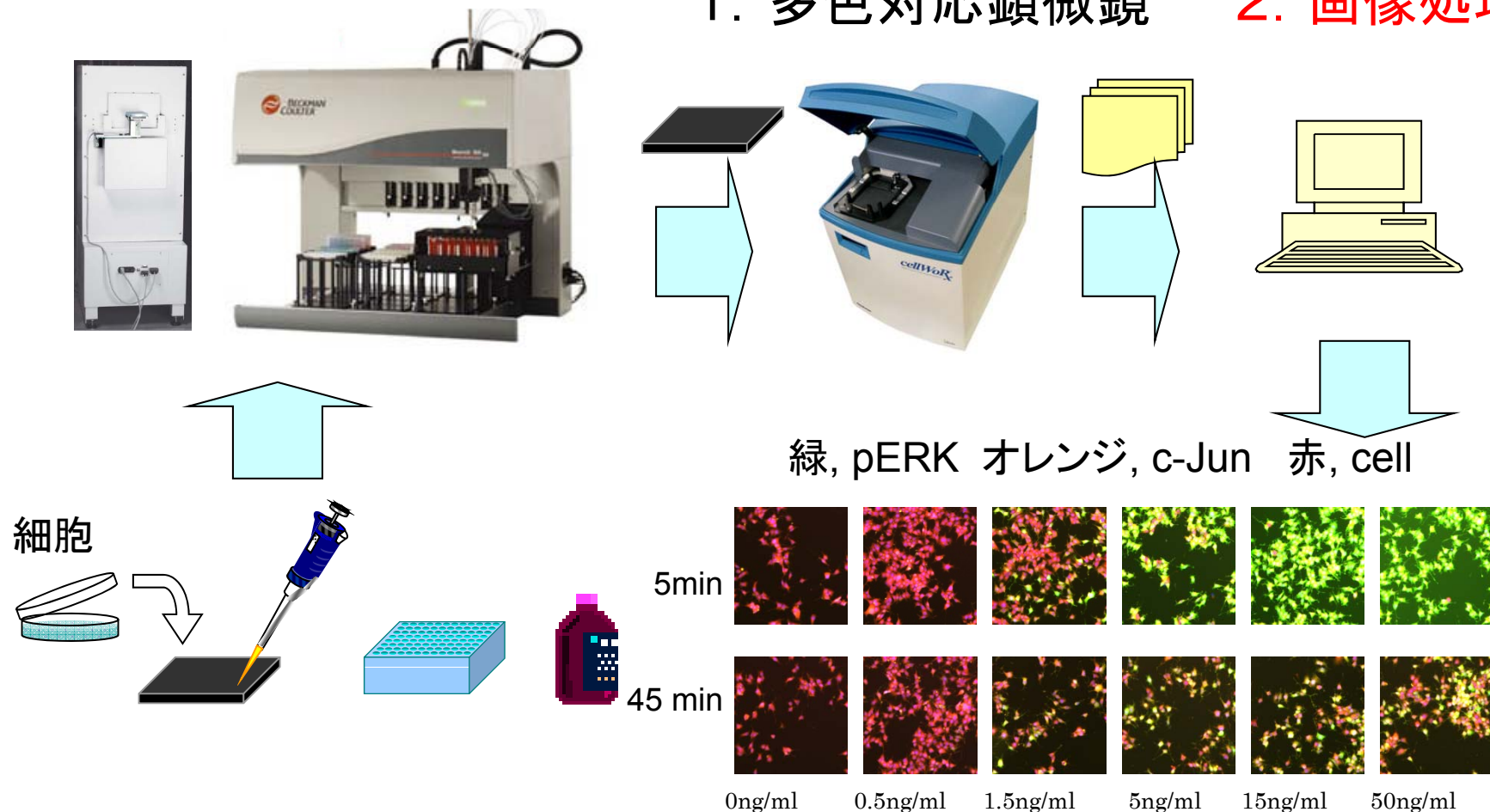
## ハイスループットイメージング技術

細胞の多色染色(リン酸化抗体)

3. 補足: ロボットによる実験の自動化

1. 多色対応顕微鏡

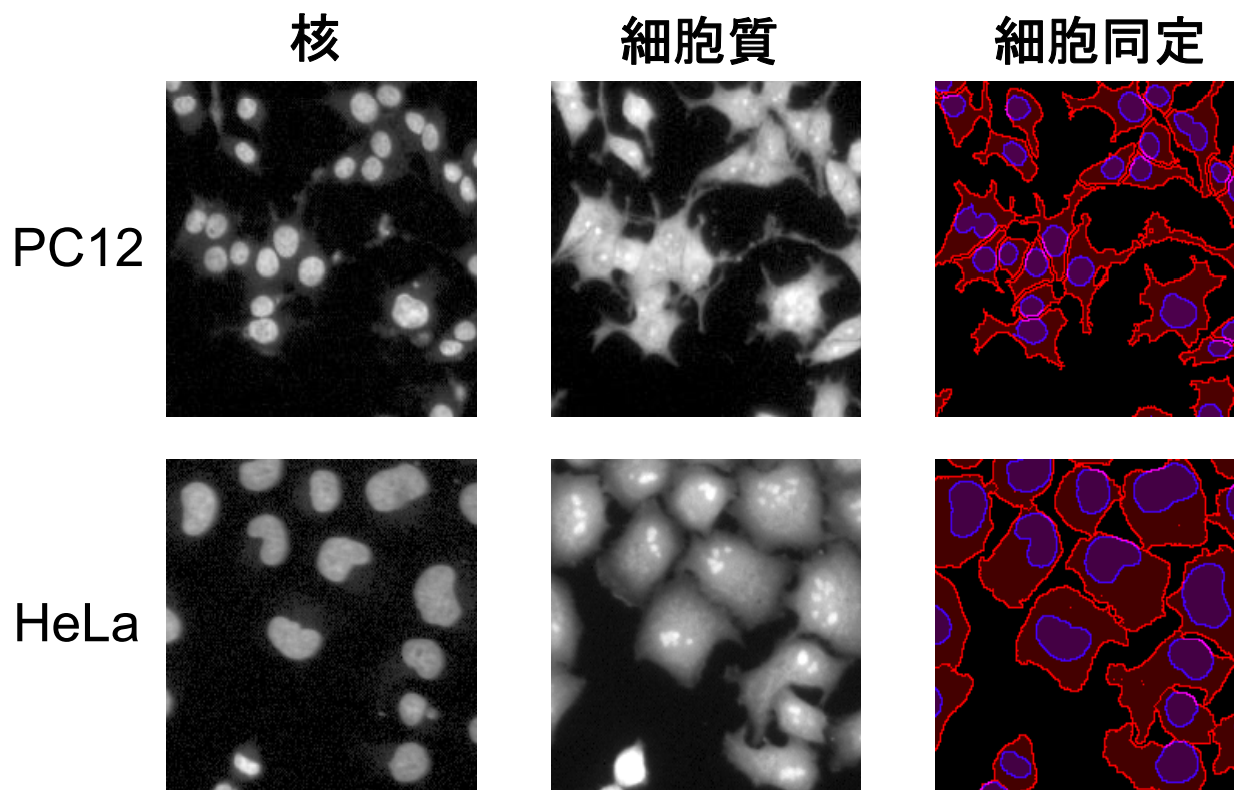
2. 画像処理



# シグナル伝達の定量化

## ハイスループットイメージング技術

### 2. 画像処理 細胞自動同定アルゴリズム(済)とソフト開発



画像の情報を余すところなく取り出す → 定量性の劇的上昇

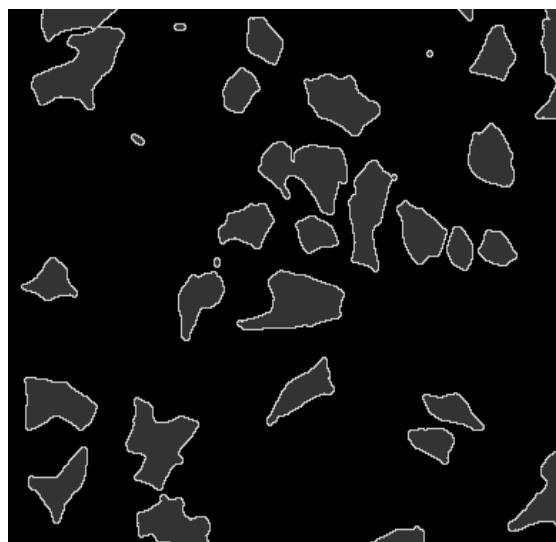
# シグナル伝達の定量化

## ハイスループットイメージング技術

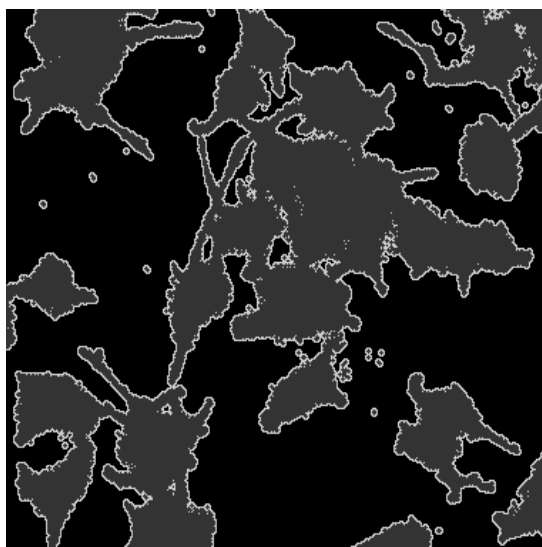
### 2. 画像処理

#### 従来法との比較

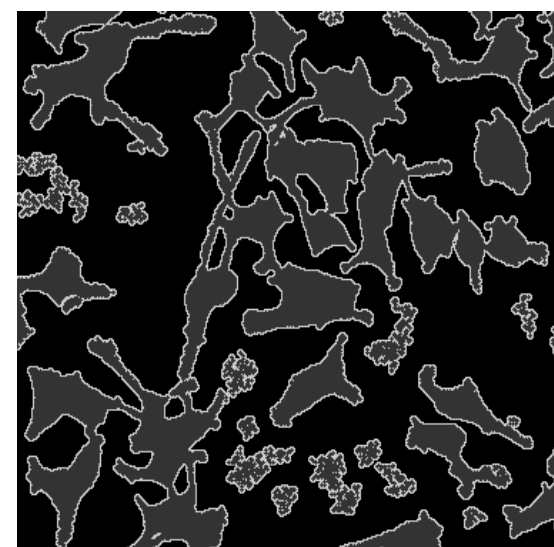
従来法 (1)



従来法 (2)

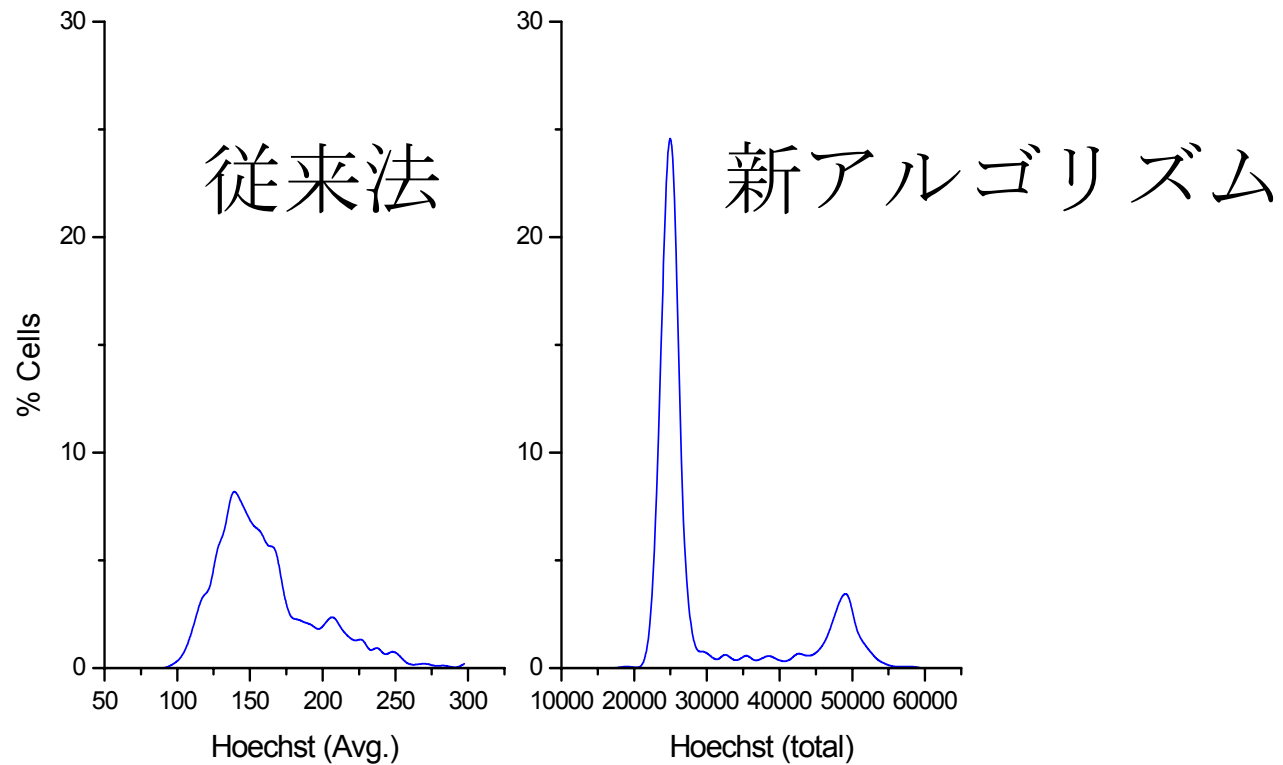


新アルゴリズム



新アルゴリズムだと細胞体も小さな突起もどちらも精度よく認識できる

# DNAヒストグラム

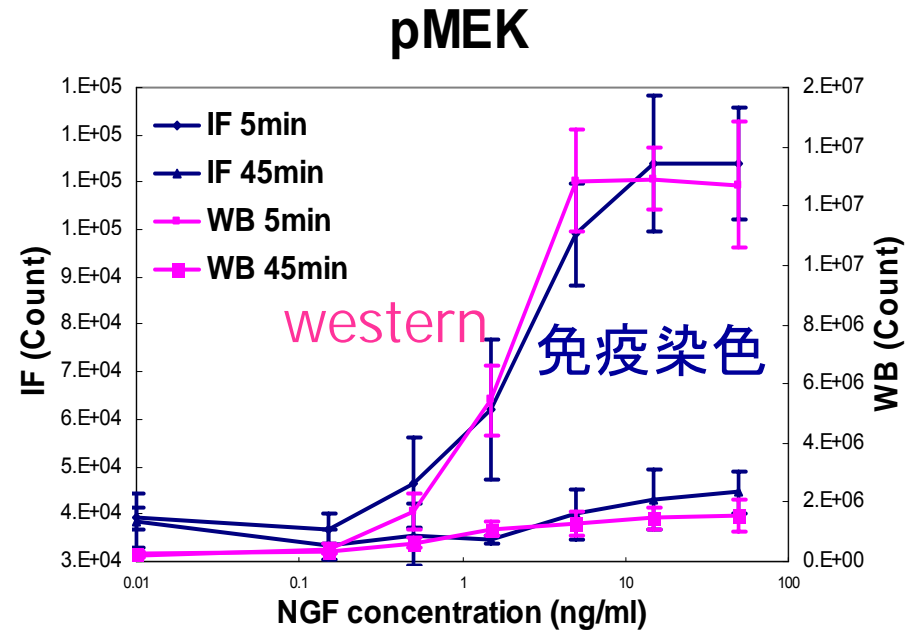
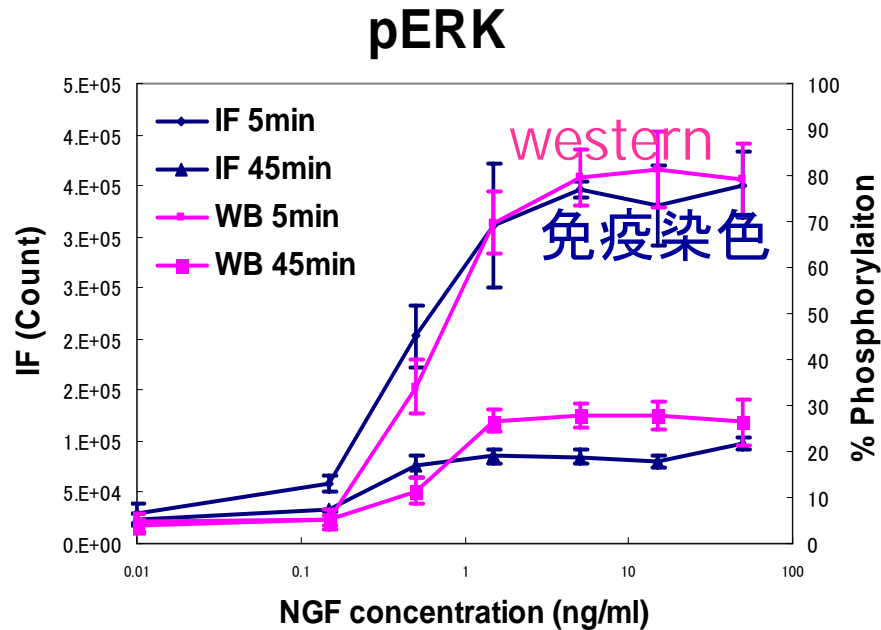


従来法と比較して劇的な解像度の上昇

# シグナル伝達の定量化 ハイスループットイメージング技術

## 2. 画像処理

免疫染色はきちんと画像解析すればwesternと同程度の定量性  
これまでの常識を覆す



c-Fos, c-Jun, pJNK, pp38についても同様の結果が得られている。

画像の情報を余すところなく取り出す → 定量性の劇的上昇

# シグナル伝達の定量化

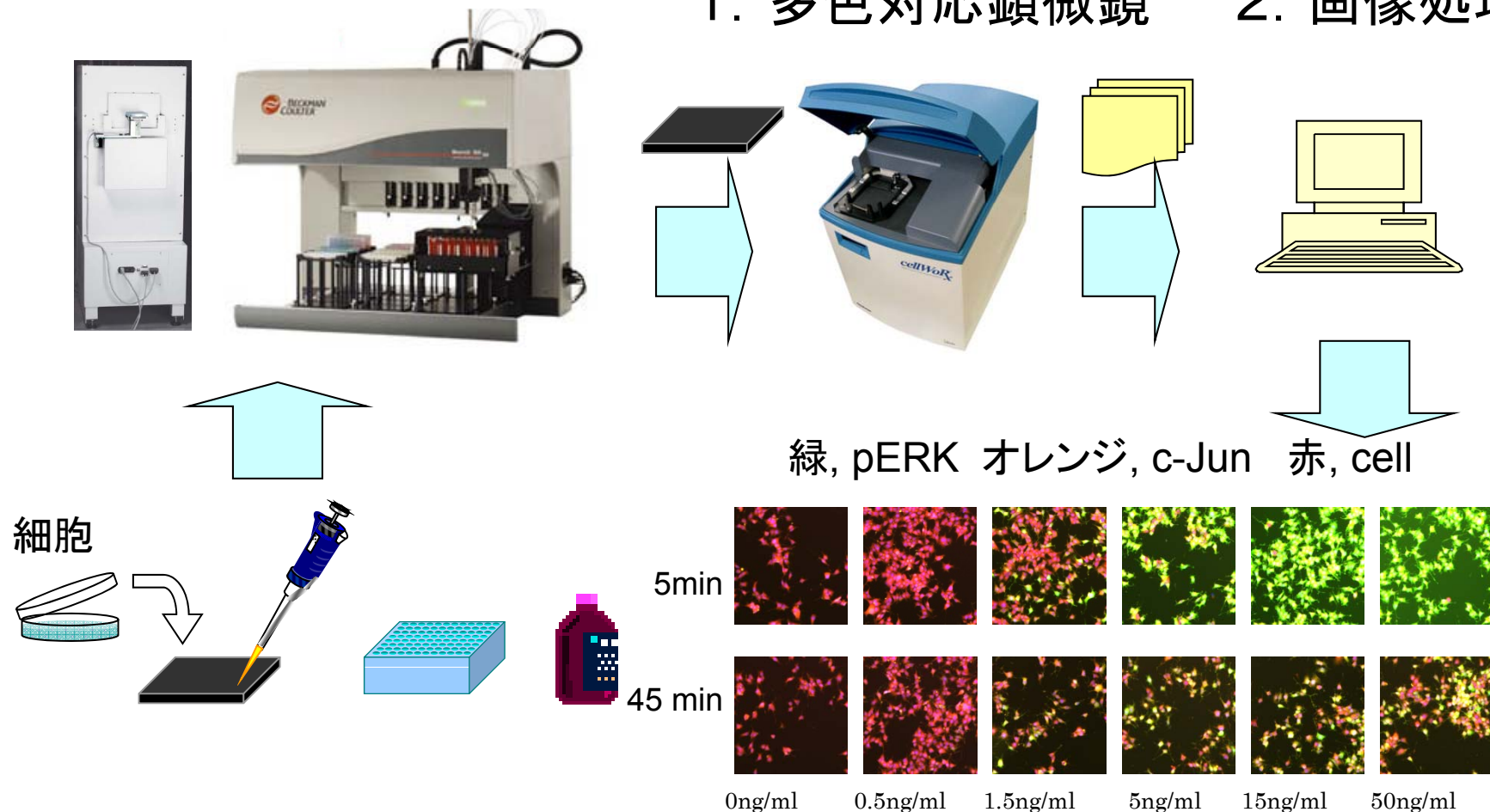
## ハイスループットイメージング技術

細胞の多色染色(リン酸化抗体)

3. 補足: **ロボットによる実験の自動化**

1. 多色対応顕微鏡

2. 画像処理





# シグナル伝達の定量化

## ハイスループットイメージング技術

### 3. 補足: サンプル調整の自動化



#### 目的

再現性よく精度のよいデータを得るためには可能な限りすべてのステップを自動化

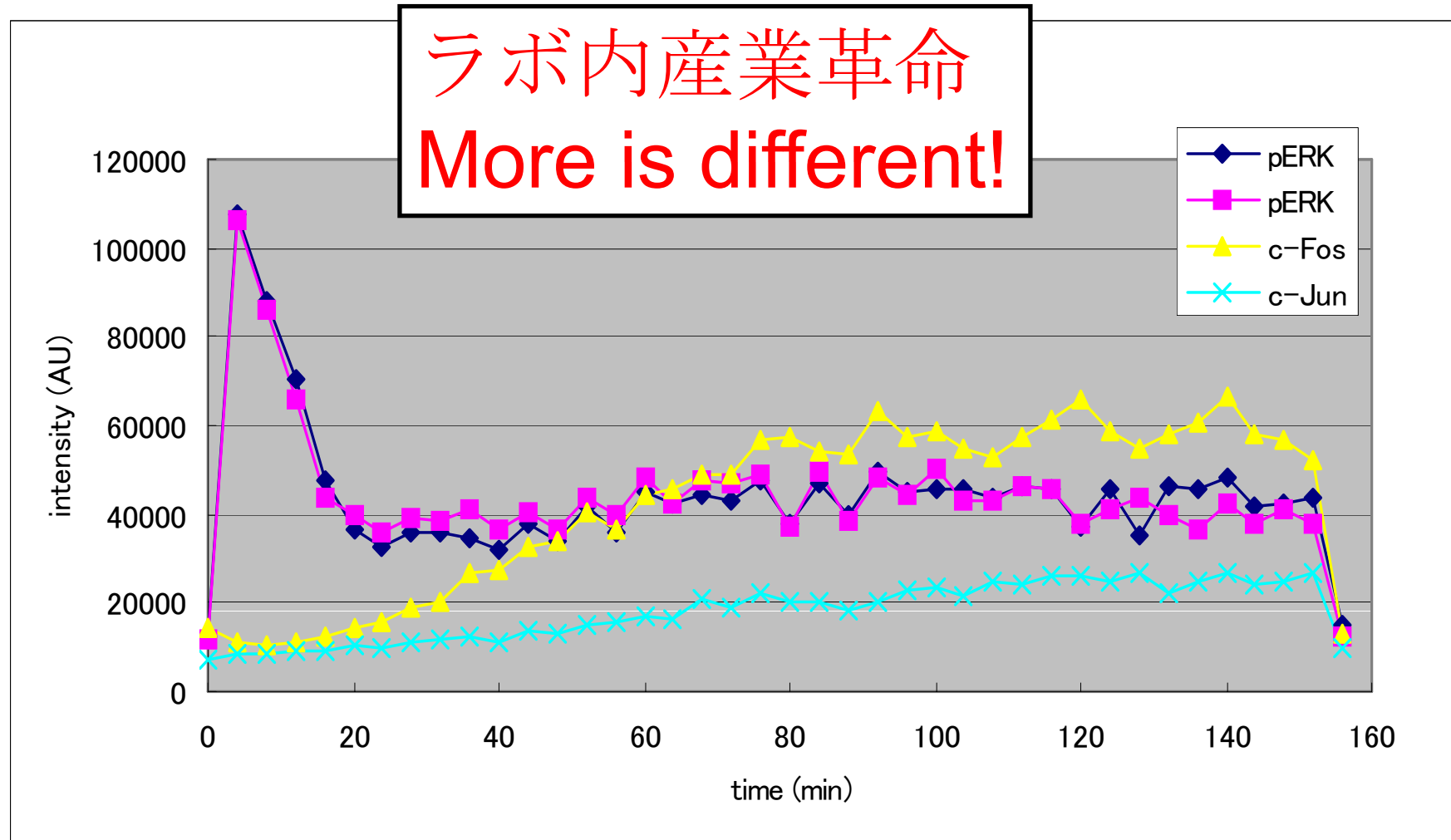
→ 高い汎用性

現在市販の汎用機器には現実的には再現性や精度の問題あり

→ イメージングのポテンシャルを引き出すためにはサンプル調整もカギ



# pERK, c-Fos, c-Junのハイスループット時系列計測 人手ではできないポイント数



# シグナル伝達の定量化 ハイスループットイメージング技術

## 3.なにが優れているのか？

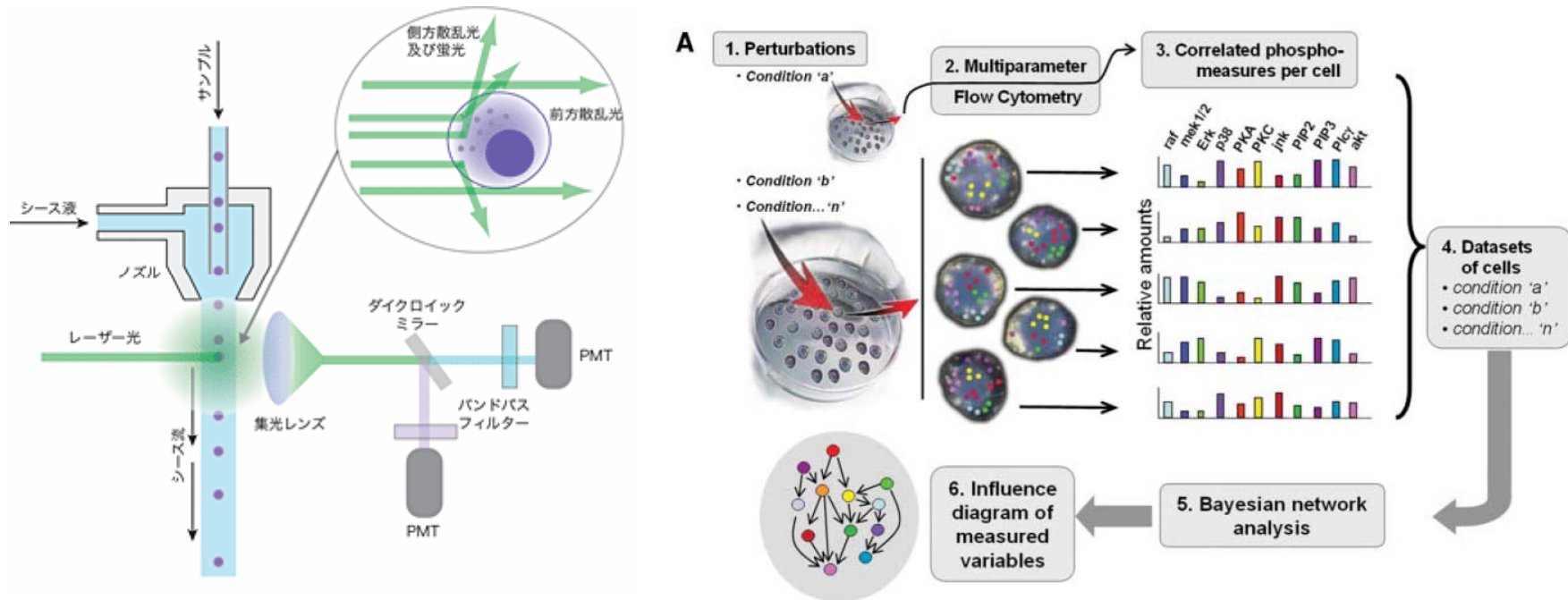
「既存の手法（フローサイトメータなど）との比較」

# 従来法との比較

	定量化ハイスループットイメージング	ウェスタンブロット	フローサイトメータ	ライブイメージング
自動化	○	×	×	×
非侵襲性	○	○	△	×
1細胞	○	×	○	○
局在	◎	△	×	◎
リン酸化シグナル	○	○	○	×
プローブ	抗体	抗体	抗体	蛍光たんぱく質
時系列	スナップショット	スナップショット	スナップショット	ライブ
信号特異性	抗体の特異性と局在	抗体の特異性と分子量	抗体の特異性	蛍光プローブの特異性
多色化	○	△	◎	○

◎:よい、○:可能、△:限定的、×:難しい

# フローサイトメータ



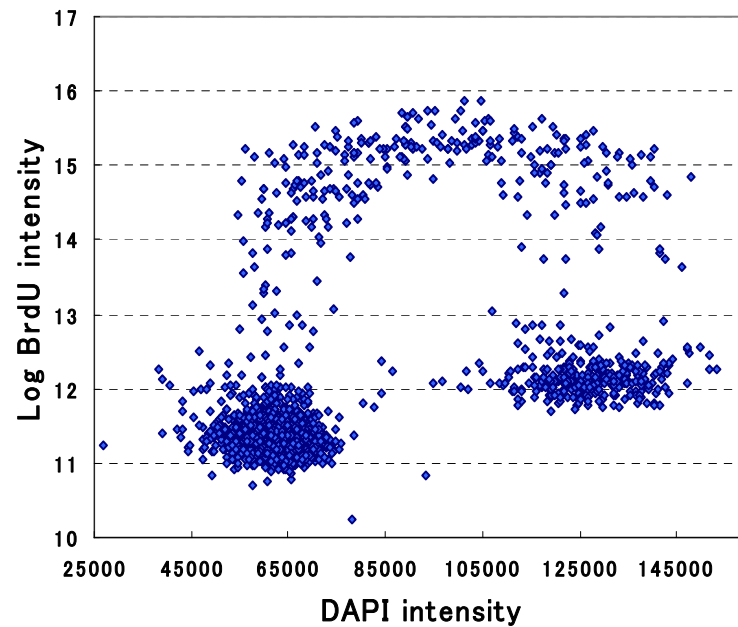
一見するとフローサイトメータでも同じようなことができるように思えるが

1. 細胞をばらばらにする作業が必要(使用できる試料が限的される)
2. 観測時間が短い
3. 局在が観測できない
4. 自動化に向いていない

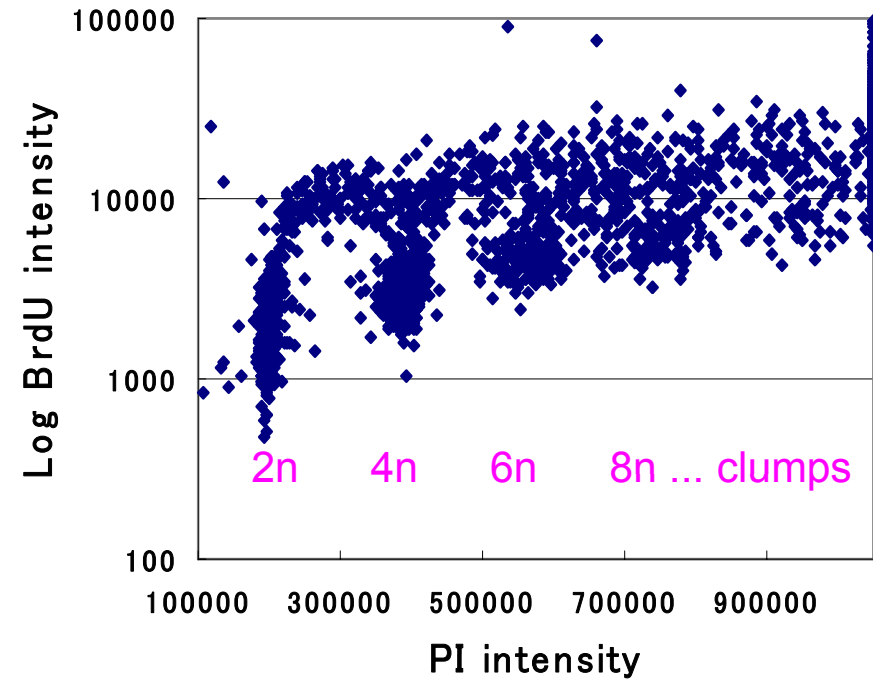
# 細胞周期解析

定量化ハイスループットイメージング

BrdU vs DAPI



フローサイトメトリー



# 定量化ハイスループットイメージングの フローサイトメータに対するアドバンテージ

1. 細胞をはがさなくてよい。接着していてもOK  
(ほとんどすべての細胞に応用できる)
2. 自動化できる。再現性がよい。
3. 短い時間インターバルが大量に取れる。
4. 感度がよい。
5. 局在や形態も解析できる。
6. 外部プローブによる外乱がない。

フローサイトメータにとって代わる技術  
次世代ハイコンテンツスクリーニングの主力機

## 先端計測分析技術・機器開発事業「機器開発プログラム」重点開発領域案

(領域名)

### シグナル伝達の定量化ハイスループットイメージング技術

(概要)

細胞内のリン酸化、たんぱく質などを含む多くの分子の動態を同時に精度よくハイスループットに検出する多色イメージング技術を開発する。リン酸化抗体などによる免疫染色手法などを用いて複数の分子を同時に同一細胞で検出する。イメージング技術のポテンシャルを最大限に引き出すため、イメージング画像から定量性の高い情報を自動的に取得するアルゴリズムとソフト開発も同時に行う。

(期待される効果の例)

- ・1細胞レベルでの生体試料(細胞を含む)のイメージングを従来にはない高精度かつ大量に行う。特に、同一細胞における複数の分子を計測することができるため、iPS細胞を含む幹細胞における分化誘導やガン幹細胞の同定など従来のイメージングでは得られない決定的な情報を得ることができる。
- ・免疫染色画像から、細胞全体や核、細胞内小器官を自動的に認識するアルゴリズムおよびソフト開発を行う。染色技術はこれまでに存在したものの、そこから情報を抽出する手法にかけていた。この開発により免疫染色画像から従来得られたなった精度での情報を抽出でき定量性を劇的に上昇させる。現在のフローサイトメトリーよりいろんな点で優れるため将来的には完全に置き換わる可能性が高い。
- ・高精度でハイスループット化できるため、従来の創薬スクリーニングに用いられてきた定量性に乏しいハイコンテンツスクリーニング手法を一変することが期待される。
- ・細胞のサンプル調整、細胞の免疫染色など自動化を行うため、これまで人手の操作によるノイズを極力抑えることができる。これらの自動化技術は本手法以外にも広い汎用性を有する技術である。
- ・細胞の分化、増殖、代謝などさまざまな現象を制御するシグナル伝達経路などの予測精度の高いモデルに必要な不可欠な情報を提供でき、システム生物学の発展に劇的なイノベーションをもたらす。