



Title	Concentration and Brightness Imaging for Fluorescent Molecules in Cells: Statistical Image Analysis by Empirical Bayes Method [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	福島, 綾介
Citation	北海道大学. 博士(生命科学) 甲第14607号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/82758
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Ryosuke_Fukushima_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏名 福島 綾介

学位論文題名

Concentration and Brightness Imaging for Fluorescent Molecules in Cells:
Statistical Image Analysis by Empirical Bayes Method
(細胞内蛍光分子の濃度と輝度分布定量: 経験ベイズ法による統計的画像解析)

【背景と目的】生細胞蛍光イメージングは標的分子を蛍光標識することで、生細胞内における標的分子の局在と分布を画像化でき、細胞内の動的な変化を観測できる利点がある。しかし、蛍光イメージングから蛍光分子の濃度を定量することは困難である。これは蛍光強度が濃度のみならず、励起光強度やレンズなどの光学素子、光検出器の感度に依存するからである。そのため、蛍光強度は測定機器依存的であり定量性に対しては様々な注意が必要である。一方、分子の濃度は細胞内の化学反応の進行と密接に関連し、解離定数の推定から分子の反応機構や機能制御の変化を読み解ける。本研究では、蛍光イメージングによって得られた画像群に対する統計解析から濃度を定量する手法の開発を行う。

【研究内容】本研究では、蛍光画像群に対する統計モデルの定式化と開発手法の実証を行った。本開発手法で解析対象とする蛍光画像群は共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡を用いて適切な条件下で経時測定されるとし、統計的な解析により2つのパラメータを画像中の全てのピクセルで決定する。これらのパラメータは Particle Number と Particle Brightness である。Particle Number は蛍光分子の粒子数を意味しており、共焦点領域の体積で割り付けることで濃度の定量値となる。Particle Brightness は蛍光分子一粒子当たりの蛍光強度を意味しており、蛍光分子のオリゴマー形成状態の推定に活用できる。Particle Number と Particle Brightness を決定できる従来法として Number and Brightness (N&B) 解析が知られているが、実用上多くの問題がある。この解決のため N&B 解析におけるパラメータ推定の統計学的問題点の解明とその問題の改善方法について研究を行った。

【第一章: 序論】研究背景と従来法である N&B 解析について詳細に述べる。N&B 解析は濃度の推定を可能にするだけでなく、Particle Brightness 比の計算によって標的分子のオリゴマー形成状態を推定することも可能である。次に解析方法に関して、従来法で仮定される統計モデルと推定方法を記述する。光子検出の確率分布が Neyman Type A 分布に従うと仮定したときに、モーメント法 (Method of Moments; MoM) に基づいて得られる推定関数を導出する。次に、統計モデルで仮定した条件を満たすために必要な蛍光画像の取得条件とパラメータ推定に影響を及ぼす外的要因に関して述べる。

【第二章: デットタイムによる推定バイアスの低減法】デットタイムとは光検出器の特性であり、蛍光検出において、ある光子検出後に、一過的に光子が検出できなくなる時間のことである。このデットタイムは検出される光子の損失を引き起こし、従来法によるパラメータ推定にバイアスを生じる。この章では、従来法と同様に MoM に基づきながらもデットタイムによる推定バイアスの低減が可能な Two Detector-N&B (TD-N&B) について記述する。TD-N&B は1色の蛍光を2つの光検出器により同時測定し、2つの蛍光信号の共分散を推定することで実現できる。デットタイムの発生は検出器ごとに独立であり、共分散は相関のない変数の影響を受けないため、デットタイムの影響を軽減できる。緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein; EGFP) の溶液を用いた実験によって、その効果を実証した。

【第三章：光子検出の確率分布と最尤推定】この章では従来よりも発展的な統計モデルとパラメーター推定に最尤 (Maximum Likelihood; ML) 推定を採用した ML-N&B について記述する。初めにデットタイムの影響を考慮した光子検出の統計モデルを導く。前述の TD-N&B ではデットタイムの影響を低減できるが、この統計モデルにより、デットタイムの影響を完全に排除できる。最尤推定とは観測した光子検出データと統計モデルにより定義される尤度関数を最大化するようにパラメーターを決定する方法である。従来法の MoM では、まれに推定値が負の値となるが、最尤推定で負の値は発生しない。また、従来法では2次のモーメントまでしか推定に利用しないが、最尤推定では高次のモーメントも活用されるため、推定精度の向上が見込める。

【第四章：経験ベイズ法と事後最大確率推定】パラメーター推定に経験ベイズ法 (Empirical Bayes Method; EB) と事後最大確率 (Maximum a Posteriori; MAP) 推定を採用した EB-MAP-N&B について記述する。前述の ML-N&B ではまれに Particle Number と Particle Brightness の推定値はそれぞれ無限大と0になってしまう。これはパラメーターに相応しい数値を1つに決定できない場合に生じ、画像の時系列情報がパラメーター推定のためには不足していることが示唆される。この問題の解決のため、経験ベイズ法を用いて画像の空間情報を活用する手法の開発を行った。本手法の統計モデルでは、隣り合うピクセル同士のパラメーターは似通った値になると仮定した。この仮定は本研究の実験条件において妥当である。なぜならば、蛍光イメージングでは蛍光の回折限界に由来する画像のボケがあることと、蛍光測定時には隣り合うピクセルで共焦点領域の重なりがあるためである。本手法では、あるピクセルにおけるパラメーター推定で、その周辺ピクセルの情報から、どの程度似通った値を取りやすいか予測を行い、中央ピクセルの推定に活用した。この予測を記述するハイパーパラメーターの決定には経験ベイズ法による周辺尤度の最大化を用いた。

【第五章：MoM、ML、EB-MAPの比較】この章では第二章、第三章、第四章で記述した異なる推定法の比較を行った。数値シミュレーションと実際にEGFP溶液を用いた実験、HeLa細胞にタンデム結合型EGFPを発現させた実験を行い、推定の正確度と精度にどの程度の差が生じるか評価した。Particle Numberの推定結果から、MoMは外れ値が多く発生し、推定精度は最も低かった。一方で、EB-MAPは外れ値が発生せず、MoMと比較して10倍程度の推定精度であった。Particle Brightnessの推定結果から、MoMは推定が最も正確であるが、推定精度は最も低かった。一方でEB-MAPは推定精度が最も良いが、推定が正確ではなく過大評価する推定バイアスが明らかになった。しかし、この推定バイアスはParticle Brightness比の計算において簡便に補正可能であり、補正後は推定値に顕著な差はみられなかった。これらの結果より、EB-MAPはParticle NumberとParticle Brightness比の推定において従来法より優れていることが明らかになった。

【第六章：結論と将来展望】本研究により、経験ベイズ法と最大事後確率推定を組み合わせたEB-MAP-N&Bを開発した。この手法は蛍光顕微鏡を用いて画像の取得を行う幅広い研究分野に適用可能であり、細胞内における蛍光分子の濃度とオリゴマー形成状態を高精度に推定可能である。本手法は空間分布を画像として可視化できるため、細胞内で不均一な分布や凝集状態を示す場合にも適用可能である。特に、細胞内シグナル伝達における多量体形成や様々な病態に関連するタンパク質凝集形成において、分子の反応機構や機能制御の理解に貢献できる。さらに、蛍光信号の時系列に対する統計解析によって濃度の推定を行う研究分野において、本研究は初めて蛍光画像の空間分布情報をベイズ推定により活用した。本研究で示した統計モデルの改善により精度改善が期待できるだけでなく、研究分野として更なる発展も期待できる。