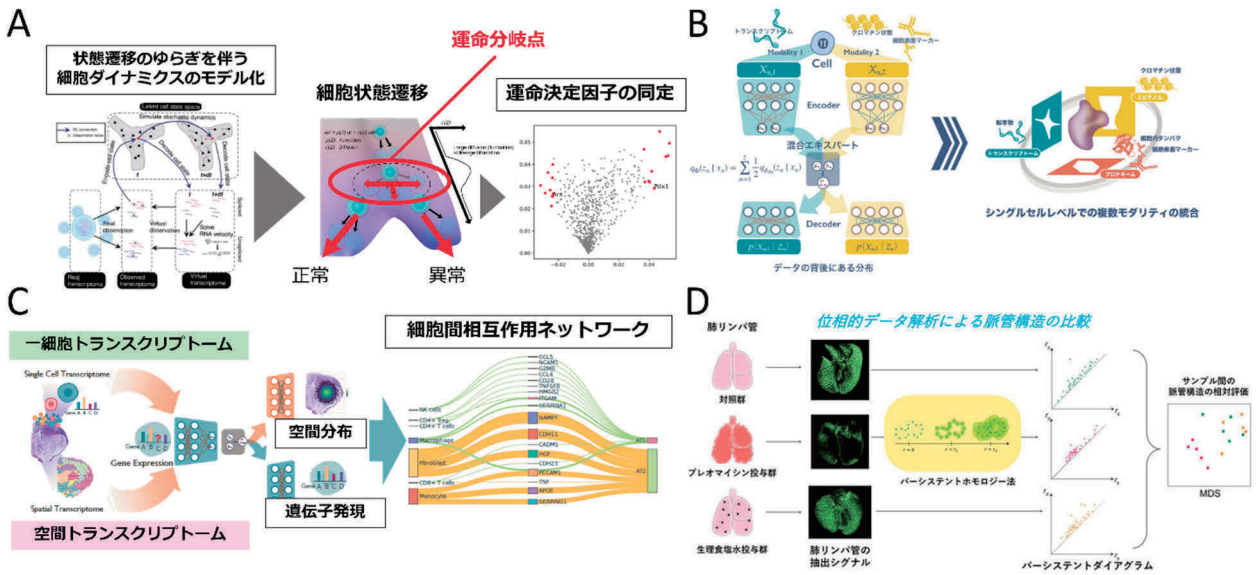
71　多細胞エコシステムの全容解明のためのベイズ深層学習	島村　徹平

【目的】生体内のさまざまな微小環境において、細胞集団は相互作用を介した複雑な生態系（エコシステム）を形成している。近年、一細胞オミクス測定技術の進歩により、エコシステムを形成する細胞レベルでのオミクス情報の取得が可能となり、分子・細胞レベルでの生命システムの理解が期待されている。しかしながら、刻々と移り変わるシステムに対し、そこに内在される基本原理をあぶり出すためには、要素還元論に基づく従前のアプローチには限界がある。本研究では、目に見えない分子・細胞集団の移り変わり（ダイナミクス）を捉え、多細胞が作り出すエコシステムを俯瞰するための、最先端のベイズ推論と深層学習に基づく新たな解析プラットフォームを開発することを目的とする。

【方法】一細胞および空間オミクス計測技術から得られる分子・細胞情報を基に、細胞間相互作用・ダイナミクスを推定するとともに、これらが作り出す多細胞のエコシステムを俯瞰するための解析技術として、1. 細胞動態シミュレーションのための深層生成モデル、2. マルチモーダル細胞情報を統合する深層生成モデル、3. 細胞間相互作用ネットワークを推定する深層生成モデル、4. 多細胞が作り出す組織構造変化を抽出するベイズ機械学習、5. 多分子が作り出すタンパク構造変化を抽出するベイズ機械学習、を開発した。

【結果】解析技術の有効性を示すために、扁平上皮がん微小環境における線維芽細胞とその細胞間コミュニケーションの同定、大腸癌浸潤先進部がん微小環境における SPP1^{+}マクロファージとその細胞間コミュニケーションの同定、肺線維症モデルにおけるリンパ管構造変化、および肺転移モデルにおけるリンパ管構造変化の可視化を行った。本研究の成果により、開発した技術による解析結果の再現性を確認するとともに、開発した技術が腫瘍微小環境に対する新たなターゲット探索や病態モデルにおける構造変化パターン解析の解析基盤として有効であることが示された。

開発した情報解析技術の概念図



71. 多細胞エコシステムの全容解明のためのベイズ深層学習

島村　徹平

名古屋大学 大学院医学系研究科 システム生物学分野

Key words：深層生成モデル，多細胞ダイナミクス，細胞運命決定，細胞間コミュニケーション，腫瘍微小環境

緒　言

生体内のさまざまな微小環境において、細胞集団は相互作用を介した複雑な生態系（エコシステム）を形成している。近年、一細胞オミクス測定技術の進歩により、エコシステムを形成する細胞レベルでのオミクス情報の取得が可能となり、分子・細胞レベルでの生命システムの理解が期待されている。しかしながら、刻々と移り変わるシステムに対し、そこに内在される基本原理をあぶり出すためには、要素還元論に基づく従前のアプローチには限界がある。

本研究では、目に見えない分子・細胞集団の移り変わり（ダイナミクス）を捉え、多細胞が作り出すエコシステムを俯瞰するための、最先端のベイズ推論と深層学習に基づく新たな解析プラットフォームを開発する。本研究で推進する数理科学、医学、分子生物学の異分野から構成されるユニークな融合研究により、がんの診断、治療、治療効果予測などの臨床応用に向けた強力な研究開発基盤が構築されることが期待される。

方　法

本研究課題では、一細胞および空間オミクス計測技術から得られる分子・細胞情報を基に、細胞間相互作用・ダイナミクスを推定するとともに、これらが作り出す多細胞のエコシステムを俯瞰するため、最先端のベイズ推論・深層学習を駆使したデータ解析基盤を開発した。具体的には、下記の解析技術を開発し、これを達成した。これら解析技術の概念図を図１に示す。

1. 細胞動態シミュレーションのための深層生成モデルの開発［1］

深層生成モデルと数理モデルの融合により、シングルセルトランスクリプトームデータから細胞状態遷移のゆらぎをシミュレートし、確率的な遺伝子発現変化や細胞運命分岐点を探索するための人工知能技術 VICDYF（variational inference of cell state dynamics with fluctuation）を開発した（図 1A）。

2. マルチモーダル細胞情報を統合する深層生成モデルの開発［2］

大規模マルチモーダルな細胞情報からデータに内在する細胞の潜在状態を推論するとともに、シングルセルマルチオミクスデータのモダリティ間の関係性を自動で学習し、モダリティをまたいだ情報の変換による欠損モダリティを補完するための人工知能技術 scMM（A mixture-of-experts deep generative model for integrated analysis of single-cell multiomics data）を開発した（図 1B）。

3. 細胞間相互作用ネットワークを推定する深層生成モデルの開発［3］

深層生成モデルをキーテクノロジーとしてシングルセルトランスクリプトームデータと空間トランスクリプトームデータを統合することで、一細胞解像度で細胞間の共局在ネットワークを推定するとともに、共局在関係によって定義される細胞集団の分類、関連するリガンドとレセプター間の分子パスウェイを同定するための人工知能技術 deepCOLOR（deep generative model for single-cell colocalization representation）を開発した（図 1C）。

4. 多細胞が作り出す組織構造変化を抽出するベイズ機械学習の開発［4］

組織透明化手法 CUBIC を用いて、マウスのさまざまな臓器を透明化し、血管・リンパ管を臓器のまま 3 次元かつ高解像度に可視化した画像データから、位相的データ解析や非定常ポアソン過程モデルなどの機械学習技術により、3 次元の脈管構造の『かたち』を総合的に評価するための方法を開発した（図 1D）。

5. 多分子が作り出すタンパク構造変化を抽出するベイズ機械学習の開発［5］

分子動力学シミュレーション、パーシステントホモロジー法、およびベイズ統計モデルを用いて、アミノ酸変異によって引き起こされるタンパク質構造変化の多様性を解析するための方法を開発した。

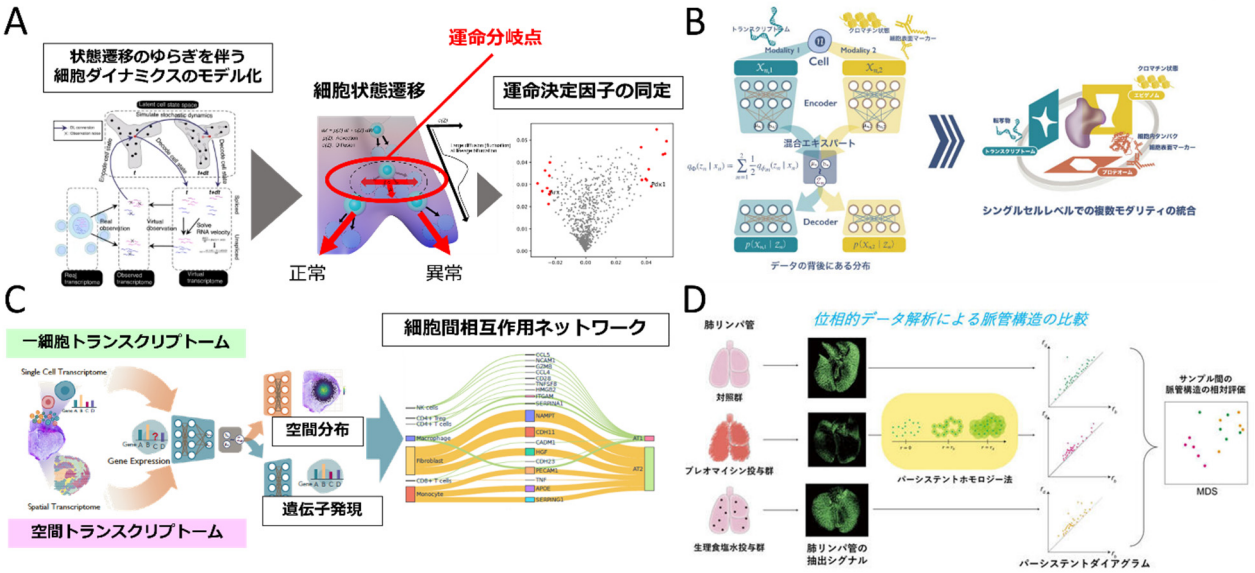


図 1. 開発した情報解析技術の概念図

A) 細胞動態シミュレーションのための深層生成モデル。

B) マルチモーダル細胞情報を統合する深層生成モデル。

C) 細胞間相互作用ネットワークを推定する深層生成モデル。

D) 組織構造変化を抽出するベイズ機械学習。

結果および考察

1. 扁平上皮がん微小環境における線維芽細胞とその細胞間コミュニケーションの同定［3］

解析技術を扁平上皮癌のデータセットに適用し、腫瘍微小環境から得られた単一細胞間の共局在関係を調べた（図 2A）。特に、腫瘍間質境界でがん悪性度に寄与する可能性があるとの報告のある腫瘍特異的ケラチノサイト（Tumor specific keratinocyte : TSK）を中心とした細胞間コミュニケーションに着目して解析を行った（図 2B）ところ、TSK は線維芽細胞集団と共局在していることがわかり、特に、腫瘍間質境界において、これらの細胞集団が、細胞外マトリックスの分解およびリモデリングによる癌細胞の浸潤など、腫瘍の進行に関与するプロセスに関連する MMP14、INHBA が発現している可能性が示唆された。さらに、扁平上皮癌の異なる臨床検体で、*in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学により、扁平上皮癌の他の生物学的標本における INHBA（図 2C）とその二量体であるアクチビン A（図 2D）の発現パターンを確認したところ、腫瘍前縁に位置する腫瘍細胞と線維芽細胞の両方で INHBA の RNA レベル、タンパク質レベルでの高発現が認められ、その再現性が確認された。

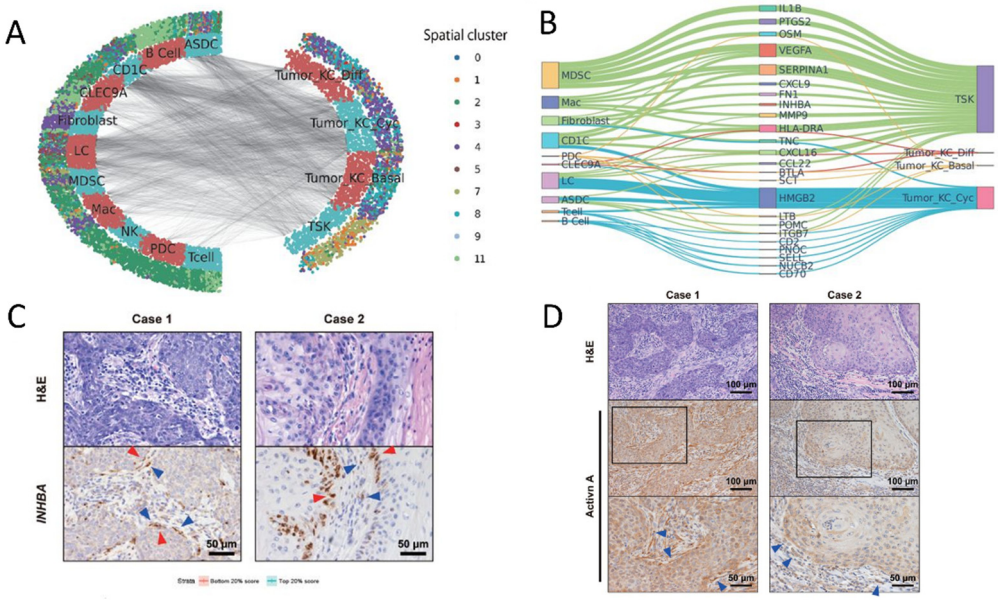


図 2. 扁平上皮癌のデータセットの解析結果

A) 腫瘍細胞と免疫細胞または間質細胞の間の共局在ネットワーク。

B) 免疫細胞または間質細胞から腫瘍細胞への細胞間コミュニケーション。

C) INHBA 特異的アンチセンスプローブによる ISH。

D) 抗アクチビン A 抗体による免疫組織化学染色。

2. 大腸癌浸潤先進部がん微小環境における SPP1＋マクロファージとその細胞間コミュニケーションの同定［6］

解析技術を適用し、アジア人大腸がん患者（23 名）のシングルセル RNA シークエンスデータとアジア人大腸癌患者（1 名）の空間トランスクリプトームデータの統合解析を実施した。まず、アジア人大腸がん患者（23 名）のシングルセル RNA シークエンスデータを用いて次元圧縮を行い、その結果、上皮細胞は 14 個のクラスターに分類された（図 3A、B）。この 14 種のクラスターの中で、大腸癌浸潤先進部に局在するクラスター5 、クラスター7 の 2 種類に注目したところ、大腸癌浸潤先進部と共局在している細胞として $SPP1^{+}$マクロファージが同定された。さらに、腫瘍の悪性度と関連が指摘されている $SPP1^{+}$マクロファージを中心とした細胞間コミュニケーションに着目した解析を行ったところ、大腸癌浸潤先進部の大腸癌細胞から分泌される HLA-G により $SPP1^{+}$マクロファージが生産され、$SPP1^{+}$マクロファージは更なる $SPP1^{+}$マクロファージの誘引／CD8 の細胞障害性の低下／大腸癌細胞の増殖能・浸潤能の亢進等をしていることが示された。これらの解析結果について、大腸癌検体 20 例に対して免疫組織化学染色を施行する事によってその再現性を確認した。また、マウスの大腸癌細胞における HLA-G ノックアウトによりマウスの皮下移植腫瘍の増殖能低下と $SPP1^{+}$マクロファージ局所集積の回避を確認した。本研究で明らかにした HLA-G は第 2 の免疫チェックポイントを制御する上で重要な役割を担う分子として期待される。大腸がんでは免疫チェックポイント阻害剤に対する適応として MSI-H 大腸がんが知られており実装化されているが、本研究の成果により症例数の多い MSS 大腸癌に対する新たな治療アプローチになる可能性が示唆された。

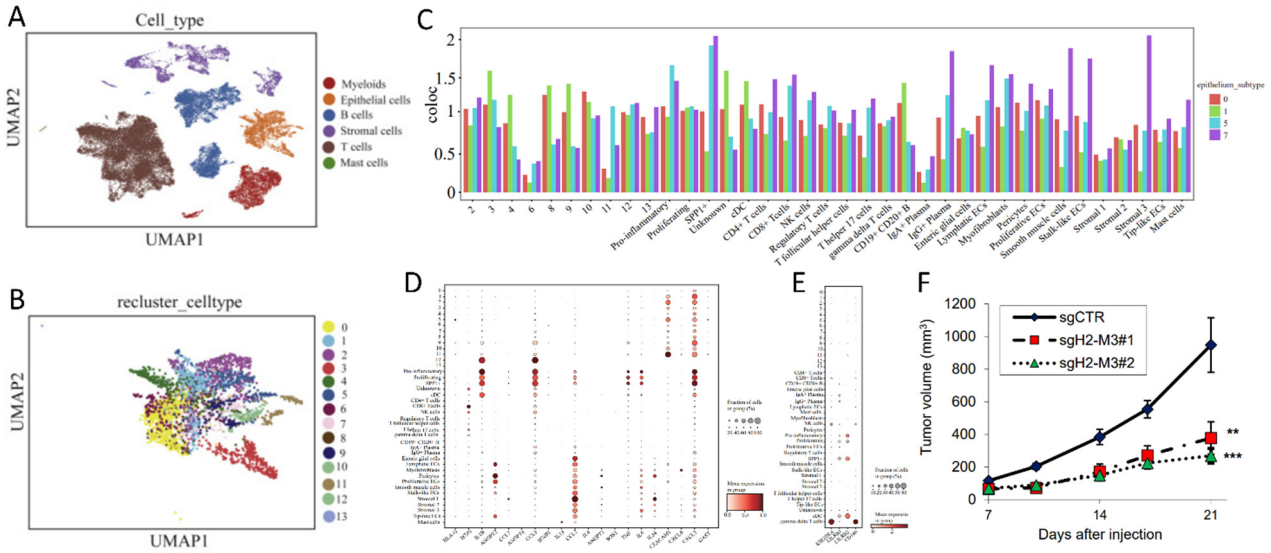


図 3. 大腸癌のデータセットの解析結果

A) 全大腸癌細胞の UMAP プロット。

B) 上皮細胞の UMAP プロット。

C) 浸潤前縁部で癌細胞と共局在化した細胞の数。

D) $SPP1^{+}$マクロファージクラスターにおける受容体-リガンドペアの濃縮を示す相互作用解析結果。

E) $CD8^{+}$T 細胞クラスターにおける受容体-リガンドペアの濃縮を示す相互作用解析結果。

F) MC-38 細胞におけるコントロール（sgCTR）、マウス HLA-G オルソログ H2-M3 欠失（sgH2-M3#1、#2）した場合の腫瘍体積。N＝10／グループ。エラーバーは SEM を示す。Dunn の多重比較検定により、**p＜0.01、***p＜0.001 とする。

3. 肺線維症モデルにおけるリンパ管構造変化、および肺転移モデルにおけるリンパ管構造変化の可視化［4］

解析技術を適用した結果、ブレオマイシンによる肺線維症モデルではリンパ管が損傷し、対照群や生理食塩水投与群とは大きく異なるリンパ管構造を示すことがわかった（図 4A）。これらの構造の違いはパーシステントホモロジー法で明確に区別された（図 4B）。また、マウス黒色腫細胞 B16F10 の尾静脈注射による肺転移モデルでのがん転移とリンパ管の CUBIC による可視化も行った（図 4C）。がん転移とリンパ管の 3 次元の距離を解析し、がん細胞移植から 10 日後ではリンパ管が多くの転移したがん細胞と接するようになっていることがわかった（図 4D）。さらにパーシステントホモロジー法によりがん転移後の肺のリンパ管を解析したところ、転移したがん細胞とリンパ管が接するように見える数日前に一時的に構造が変化している可能性が示唆された（図 4E）。これらの脈管解析の新たなパイプラインは今後さまざまな病態モデルにおける構造変化解析基盤としての活用が期待される。

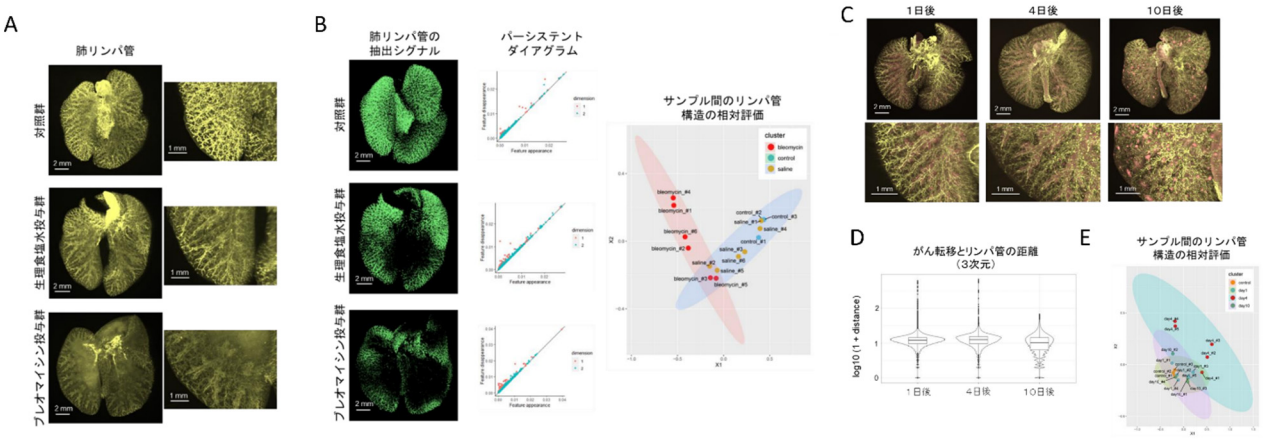


図 4. 肺線維症モデルでのリンパ管構造の変化、および肺転移モデルでのがん転移およびリンパ管の可視化

ブレオマイシン投与により肺線維症を誘導した Prox1-GFP マウスでのリンパ管構造の観察を行った。また、赤色タンパク質 mCherry が発現したマウス黒色腫細胞 B16F10 を Prox1-GFP マウスの尾静脈から注射し、肺転移を誘導した。対照群、生理食塩水投与群、ブレオマイシン投与群の肺リンパ管の様子（左）。その拡大図（右）

A） 対照群、生理食塩水投与群、ブレオマイシン投与群の肺リンパ管の様子（左）。その拡大図（右）

B） A の画像から機械学習によりシグナルを抽出した画像（左）。パーシステントホモロジー法により解析されたパーシステントダイアグラム図（中央）。対照群（control）、生理食塩水投与群（saline）に比べて、ブレオマイシン投与群（bleomycin）の脈管構造パターンの相対評価プロット

C） B16F10 細胞の移植から 1 日後、4 日後、10 日後の肺リンパ管（黄色）および B16F10 の転移（赤色、上）。拡大図（下）

D） B16F10 細胞のがん転移とリンパ管との距離を 3 次元で測定した結果。

E） B16F10 細胞の移植から 1 日後（day1）、4 日後（day4）、10 日後（day10）および対照群（control）の肺リンパ管についてパーシステントホモロジーで解析した結果。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学病院別府病院外科の三森功士教授、東京大学先端科学技術研究センターの大澤毅准教授である。

文　献

1） Nagaharu K, Kojima Y, Hirose H, Minoura K, Hinohara K, Minami H, Kageyama Y, Sugimoto Y, Masuya M, Nii S, Seki M, Suzuki Y, Tawara I, Shimamura T, Katayama N, Nishikawa H*, Ohishi K*. A bifurcation concept for B-lymphoid/plasmacytoid dendritic cells with largely fluctuating transcriptome dynamics. Cell Rep. 2022 Aug 30;40(9):111260. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111260. PMID: 36044861

2） Minoura K, Abe K, Nam H, Nishikawa H, Shimamura T*. A mixture-of-experts deep generative model for integrated analysis of single-cell multiomics data. Cell Rep Methods. 2021 Sep 15;1(5):100071. doi: 10.1016/j.crmeth.2021.100071. eCollection 2021 Sep 27. PMID: 35474667

3） Kojima Y, Mii S, Hayashi S, Hirose H, Ishikawa M, Akiyama M, Enomoto A, Shimamura T. Single-cell colocalization analysis using a deep generative model. bioRxiv. doi: 10.1101/2022.04.10.487815.

4) Takahashi K, Abe K, Kubota SI, Fukatsu N, Morishita Y, Yoshimatsu Y, Hirakawa S, Kubota Y, Watabe T, Ehata S, Ueda HR, Shimamura T*, Miyazono K. An analysis modality for vascular structures combining tissue-clearing technology and topological data analysis. Nat Commun. 2022 Sep 12;13(1):5239. doi: 10.1038/s41467-022-32848-2. PMID: 36097010

5) Hayashi S, Koseki J, Shimamura T*. Bayesian statistical method for detecting structural and topological diversity in polymorphic proteins. Comput Struct Biotechnol J. 2022 Nov 21;20:6519-6525. doi: 10.1016/j.csbj.2022.11.038. eCollection 2022. PMID: 36467576

6) Ozato Y, Kojima Y, Kobayashi Y, Hisamatsu Y, Toshima T, Yonemura Y, Masuda T, Kagawa K, Goto Y, Utou M, Fukunaga M, Gamachi A, Imamura K, Kuze Y, Zenkoh J, Suzuki A, Niida A, Hirose H, Hayashi S, Koseki J, Oki E, Fukuchi S, Murakami K, Tobo T, Nagayama S, Uemura M, Sakamoto T, Oshima M, Doki Y, Eguchi H, Mori M, Iwasaki T, Oda Y, Shibata T, Suzuki Y, Shimamura T*, Mimori K*. Spatial and single-cell transcriptomics decipher the cellular environment containing HLA-G+ cancer cells and SPP1+ macrophages in colorectal cancer. Cell Rep. 2023 Jan 31;42(1):111929. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111929. Epub 2023 Jan 18. PMID: 36656712