

Title	深層学習を用いたヒトES, iPS細胞由来心筋細胞の分化、成熟度評価法の開発
Sub Title	Development of the evaluation method for differentiation and maturity of human ES, iPS cell-derived cardiomyocytes with deep learning
Author	藤田, 淳(Fujita, Jun) 舟橋, 啓(Funahashi, Akira)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>拍動心筋細胞の動画を全自動撮影し、ベクトル解析によって心筋細胞を同定することで非心筋細胞との領域を判別する拍動心筋細胞動画撮影システムを開発した。また、セグメンテーションアルゴリズムにより拍動する心筋細胞を効率的に評価する画期的な深層学習法の開発を行い、改良することでより正確な領域判定を可能にした。心筋と非心筋細胞を見分けるのに有効な分類器を機械学習により構築し、加えて学習器を可視化することで分類根拠を視覚的に示すことに成功した。拍動心筋細胞動画撮影システムにより効率的に教師データを取得し、学習機によるデータの解析を行った。さらに心筋細胞への分化、成熟過程における重要な遺伝子を確認した。</p> <p>We have developed a video imaging system for beating cardiomyocytes (CMs). The system was able to recognize beating CMs by vector analysis. It automatically captured their images and accurately identified regions of both CMs and non-CMs. In addition, we developed an epoch-making deep learning method that efficiently evaluated beating CMs by a segmentation algorithm, which enabled the more precise judgement of cell region. A classifier that was effective in distinguishing between CMs and non-CMs was also constructed by machine learning. Moreover, we succeeded in presenting the basis of classification by visualizing the learning device. The imaging system made it possible to efficiently acquire a large number of teaching data, which was a bottle neck in the existing analysis with artificial intelligence, and a large quantity of data was analyzed by the developed learning machine. Furthermore, we confirmed important genes in the process of differentiation into CMs and maturation of CMs.</p>
Notes	研究種目：挑戦的研究 (萌芽) 研究期間：2019～2020 課題番号：19K22625 研究分野：循環器内科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K22625seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22625

研究課題名（和文）深層学習を用いたヒトES、iPS細胞由来心筋細胞の分化、成熟度評価法の開発

研究課題名（英文）Development of the evaluation method for differentiation and maturity of human ES, iPS cell-derived cardiomyocytes with deep learning

研究代表者

藤田 淳（FUJITA, Jun）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任准教授

研究者番号：10306706

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：拍動心筋細胞の動画を全自動撮影し、ベクトル解析によって心筋細胞を同定することで非心筋細胞との領域を判別する拍動心筋細胞動画撮影システムを開発した。また、セグメンテーションアルゴリズムにより拍動する心筋細胞を効率的に評価する画期的な深層学習法の開発を行い、改良することでより正確な領域判定を可能にした。心筋と非心筋細胞を見分けるのに有効な分類器を機械学習により構築し、加えて学習器を可視化することで分類根拠を視覚的に示すことに成功した。拍動心筋細胞動画撮影システムにより効率的に教師データを取得し、学習機によるデータの解析を行った。さらに心筋細胞への分化、成熟過程における重要な遺伝子を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞由来心筋細胞の汎用化と産業化には大量の心筋細胞の品質を効率よく短時間で評価する方法を確立する必要がある。本研究によって心筋細胞の状態を位相差顕微鏡で観察した細胞の画像データのみから評価することが可能になった。これまでの研究では、画像解析のみで多能性幹細胞からの分化誘導効率や成熟度を評価することは極めて困難であり、学術的、社会的意義は非常に大きい。本研究成果は病態解明と創薬開発におけるES/iPS細胞研究のブレークスルーを達成するものであり、効率的な分化誘導法や成熟化法を開発するための強力なツールとなる。その成果は循環器領域にとどまらず他領域にも役立つ極めて汎用性の高い技術である。

研究成果の概要（英文）：We have developed a video imaging system for beating cardiomyocytes (CMs). The system was able to recognize beating CMs by vector analysis. It automatically captured their images and accurately identified regions of both CMs and non-CMs. In addition, we developed an epoch-making deep learning method that efficiently evaluated beating CMs by a segmentation algorithm, which enabled the more precise judgement of cell region. A classifier that was effective in distinguishing between CMs and non-CMs was also constructed by machine learning. Moreover, we succeeded in presenting the basis of classification by visualizing the learning device. The imaging system made it possible to efficiently acquire a large number of teaching data, which was a bottle neck in the existing analysis with artificial intelligence, and a large quantity of data was analyzed by the developed learning machine. Furthermore, we confirmed important genes in the process of differentiation into CMs and maturation of CMs.

研究分野：循環器内科

キーワード：人口知能 機械学習 セグメンテーション ヒトiPS細胞 ヒトES細胞 心筋細胞 分化誘導 成熟化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞)由来の心筋細胞は無限の可能性を秘めているが、この10年間の研究で臨床応用や産業化にむけて多くの問題点が指摘されている。我々は、ヒトiPS細胞から心筋細胞を大量培養し、代謝的純化法により高純度な心筋細胞を大量に獲得することに成功した(*Cell Metabolism 2016, Stem Cell Reports 2017*)。しかし、心筋細胞への分化誘導効率は一定でなくES/iPS細胞の継代数、エピゲノムの状態、培養士の技術や細胞培養環境等様々な影響を受ける。さらに分化後の心筋細胞は幼若であることが明らかになっている。心筋細胞の分化および成熟度を評価するには、ゲノムやエピゲノムの変化、電子顕微鏡による構造解析、電気生理学的解析が必須となっているが、臨床応用と産業化の品質評価法としては現実的な方法ではない。なぜならいずれも時間と費用がかかり、培養ごとの細胞の品質評価には結びつかないからである。すなわち、ヒトES/iPS細胞由来の心筋細胞を疾患の病態解明や創薬開発に用いるには既存の解析法に頼らない簡便かつ革新的な品質評価法の確立が必須である。

培養中の細胞からサンプルを抽出することなく形態観察のみで品質評価が可能になれば極めて有用だが、位相差顕微鏡を用いた目視における細胞の判別には限界があった。そこで、人工知能(AI)による深層学習を用いた細胞評価法が研究されてきたが、細胞培養におけるこれまでのAIによる機械学習では個々の細胞の形態パターンの選別しかできなかった。本研究ではAI技術を活用したセグメンテーション(領域分割)アルゴリズムを応用して細胞の動態と個々の細胞の多角的な情報を用いる。セグメンテーションアルゴリズムには先行研究が存在するが、研究分担者によるセグメンテーションアルゴリズムは唯一「インスタンスセグメンテーション」を実装している。分割したそれぞれの領域を個別の領域として認識することが可能であり、物体が密集した画像から個々の物体を同定(分割)し、人の目では気づけない特徴を画像解析に応用することで先行研究の分割精度を大きく凌駕することに成功している。

画像解析データと細胞の遺伝子発現情報、代謝情報等との対比を行い、心筋細胞の分化誘導効率と成熟度を評価するアルゴリズムを作製することができれば、心筋細胞の品質評価だけでなく、効率的な心筋細胞の分化誘導法や成熟化法を開発するための強力なツールとなる。

2. 研究の目的

本研究の目的は疾患病態解明、創薬に用いるヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞の分化誘導の運命決定プロセスと成熟心筋細胞への成長過程をAI(人工知能)を用いて解析し、位相差顕微鏡像のみでヒトES/iPS細胞由来の心筋細胞の分化誘導効率と成熟化をモニタリングすることが可能な簡便で信頼性の高い画期的な品質評価法を確立することである。これまでの形態を識別するだけの人工知能(AI)による機械学習と異なり、本研究では研究分担者の開発したセグメンテーション(領域分割)アルゴリズムによる解析を行う。ヒトES/iPS細胞から心筋細胞への分化方向に運命付けられた細胞がどのような増殖、形態変化、拍動を示すのかを解析することで心筋細胞への分化誘導効率を早期に判別することを可能にする。また、同様の手法で心筋細胞の成熟段階を評価することが可能になる。これまでの研究では、画像解析のみで多能性幹細胞由来心筋細胞の分化誘導効率や成熟度を評価することは困難であり、本研究成果により個々のロットのゲノムやエピゲノムを解析しなくても培養細胞の位相差顕微鏡画像のみで心筋細胞の分化誘導効率と成熟度の評価が可能になる。本挑戦的技術の開発は病態解明と創薬開発におけるES/iPS細胞研究のブレークスルーを達成するものであり、その成果は循環器領域にとどまらず他領域にも役立つことが期待される。

3. 研究の方法

(1)画像解析アルゴリズムを用いた多能性幹細胞由来心筋細胞の分化誘導効率評価法の開発

多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導効率にはばらつき(フローサイトメトリーでの解析では分化誘導効率は平均的に30-90%程度)があり、拍動する心筋細胞領域と主に増殖性細胞で構成される非心筋細胞領域が混在する。二次元平面大量培養法でWntシグナルを活性化するCHIR99021により中胚葉細胞へと分化誘導し、Wntシグナル阻害剤のIWR-1を用いて心筋細胞へと終分化させる(*Stem Cell Reports 2017*)。複数のヒトiPS細胞株から心筋細胞へと分化誘導し、様々な分化誘導効率における拍動心筋細胞の動画データを取得する。取得した動画データを研究分担者の開発したAIによるセグメンテーションアルゴリズムによって解析し、心筋細胞領域と非心筋細胞領域の正確な評価システムを開発する。位相差顕微鏡を用いて分化細胞の画像をタイムラプスイメージングにて撮影し、中胚葉細胞、拍動心筋細胞の動態、増殖、拍動に関して深層学習を用いた画像解析を行う。また、各分化誘導過程における未分化幹細胞、中胚葉細胞、心筋細胞の転写遺伝子や代謝産物の発現を解析し拍動効率と照合する。心筋細胞の分化誘導に重要な遺伝子、代謝物の発現変動と遺伝子制御ネットワークを同定する。さらに心筋細胞への分化誘導過程における遺伝子、代謝変化と画像解析のデータがどのようにリンクするかを解析し、位相差顕微鏡の画像から心筋分化誘導効率を推定するアルゴリズムを作製する。

(2)画像解析アルゴリズムを用いた多能性幹細胞由来心筋細胞の成熟度評価法の開発

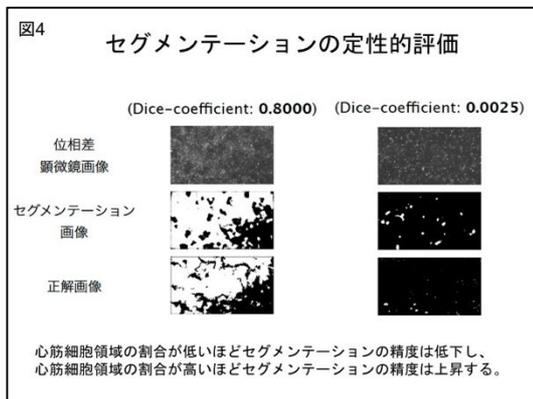
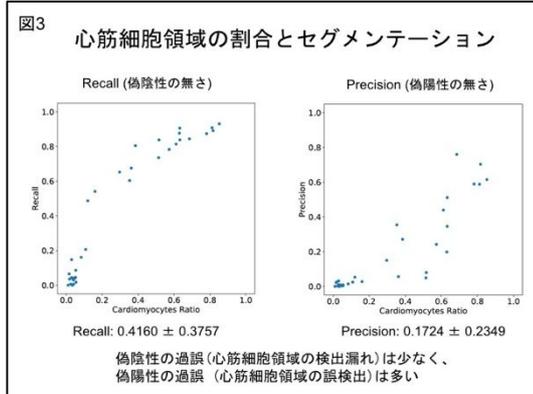
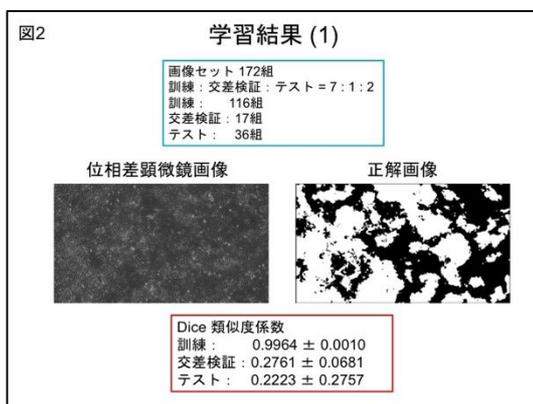
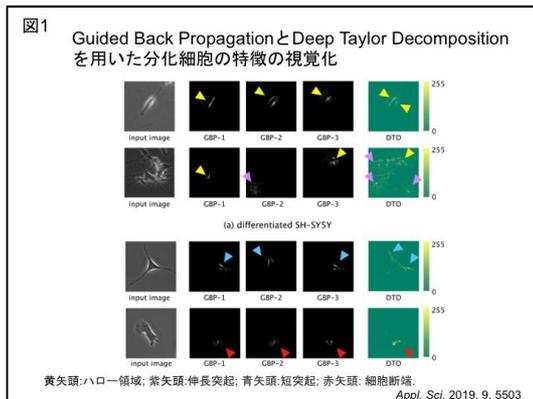
分化効率評価法によって高効率な分化誘導が確認された心筋細胞を純化精製培地(無グルコース、無グルタミン、乳酸添加培地)を用いた代謝的純化法によって純化精製する(*Cell Metabolism 2016*)。この代謝的純化法により純度95%以上の心筋細胞を確実に獲得することが可能になる。分化誘導しただけの心筋細胞と異なり純化精製した心筋細胞は未分化幹細胞や増殖性の非心筋

細胞が除去されているために数ヶ月間にわたり長期培養することが可能である。純化心筋細胞を長期培養し、遺伝子発現解析と代謝解析を行う。純化精製直後、培養数ヶ月後の純化心筋細胞を位相差顕微鏡のタイムラプスイメージングで撮影する。心筋細胞の拍動、動態および形態を機械学習によって解析し、心筋細胞の成熟化を推定するアルゴリズムを作製する。

4. 研究成果

多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導効率
は実験ごとに大きなばらつきがあるため心筋細胞の誘導効率を非侵襲的に評価する必要がある。複数のヒト iPS 細胞株を用いて多層性スタックプレートを用いた二次元培養法にて心筋細胞へと分化誘導し研究を行った。心筋細胞と非心筋細胞の領域を AI に機械学習で判別させるためには大量の教師データを取得する必要がある。しかし、AI に学習させるのに必用十分な教師データを用意するために手作業で画像撮影を行うには多大な労力を必要とする。これまでの機械学習による細胞評価システムの開発データでは大量の画像を手作業で取得する必要性があり、多大な時間と労力を必要とすることがボトルネックになっていた。とりわけ、心筋細胞の画像データを解析するには拍動データを取得する必要があるため難度が高い。本研究においても数百枚から 1000 枚以上の教師データが必要になると予想されたため、これまでにない画期的な拍動心筋細胞の動画撮影システムを開発する必要があった。そこで初年度は、ソニーのモーションベクターと片岡製作所の細胞プロセッシング装置を組み合わせることで培養皿上で拍動する心筋細胞領域を全自動で撮影し、拍動方向のベクトル解析によって心筋細胞を同定することで非心筋細胞との領域を判別するシステムを開発した。このシステムにより汎用性の高い位相差顕微鏡を用いた心筋細胞同定システムが確立され、研究を飛躍的に促進することが可能になった。この全自動心筋細胞拍動評価システムにより、人間の肉眼では判別困難な微細な拍動を有する心筋細胞を大量の画像データの中から確認することが可能となり、さらにヒト多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導過程、純化精製後、成熟過程においてマイクロアレイ、メタボローム解析を行い、分化誘導と代謝変化に重要な遺伝子を確認した。

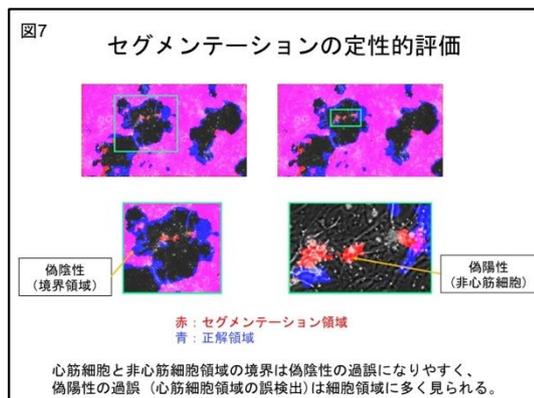
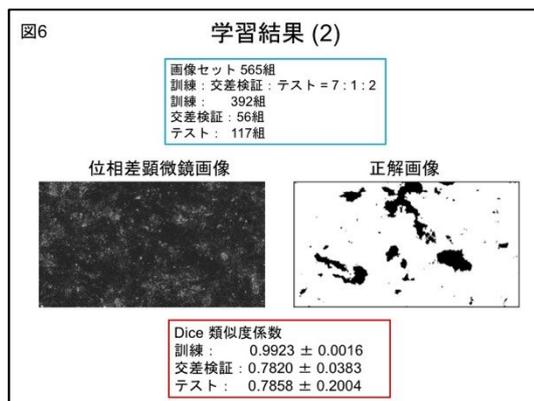
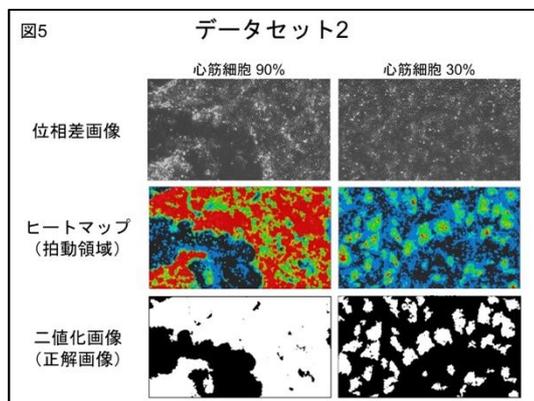
また、研究分担者の舟橋は、セグメンテーションアルゴリズムにより拍動する心筋細胞を効率的に評価する画期的な深層学習法の開発を行い、改良することでより正確な領域判定を可能にした。さらに、細胞分類を行う学習器については、まず心筋細胞よりも解析の容易な神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用いて非侵襲的に位相差顕微鏡画像から SH-SY5Y 細胞の分化・未分化を判別できる学習器を構築した。本学習器の精度は、Accuracy で 0.943、F-measure でも 0.943 となり、先行研究との比較においてはいずれの精度指標においても本学習器の精度が上回った。さらに、局所的な特徴を可視化する Guided Back Propagation および大局的な特徴を可視化する Deep Taylor Decomposition を用いて確認したところ、学習器は分化細胞の特徴としてハロー領域と伸長する神経突起が、未分化細胞の特徴として短い神経突起と細胞のエッジをも抽出していたことが確認された(図 1)。初年度は神経芽細胞

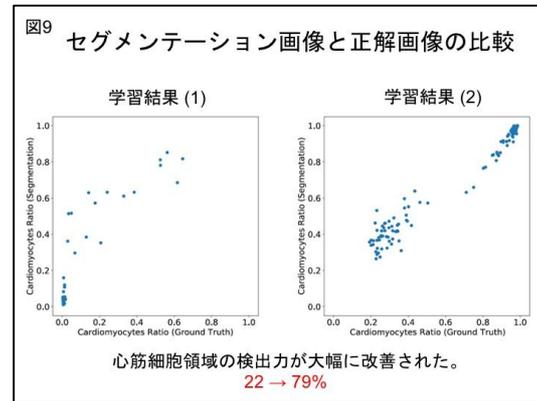
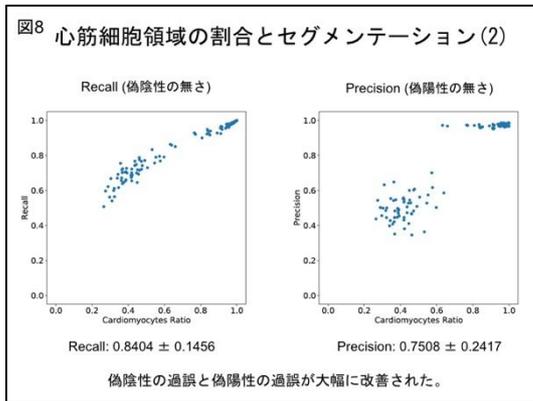


と短い神経突起と細胞のエッジをも抽出していたことが確認された(図 1)。初年度は神経芽細胞

胞腫 SH-SY5Y を対象に学習を行ったが、同様の技術を心筋細胞にも適用することによって動画解析システムと組み合わせることで心筋細胞の分化誘導効率と純化精製効率を評価することが可能になると考えられた。本法により心筋細胞と非心筋細胞を見分けるのに有効な分類器を機械学習により構築し、加えて学習器を可視化することで分類の根拠を視覚的に示すことに成功した(*Appl. Sci.* 2019, 9, 5503)

2020年度には、2019年度に確立した拍動心筋細胞動画撮影システムを用いて培養皿上で拍動する心筋細胞の動画を全自動で撮影し、拍動方向のベクトル解析によって心筋細胞を同定することで非心筋細胞との領域の判別を可能にした。本画像システムにより効率的な教師データの取得が可能になり、取得した画像から心筋細胞のセグメンテーションを行う学習器により解析した。本研究に用いた画像データは、位相差顕微鏡による画像が拍動の有無によってヒートマップで二値化され、さらには心筋細胞の蛍光免疫染色により心筋細胞領域が確認されている。まず最初に位相差顕微鏡と正解画像セット 172組を訓練、交差検証、テストへと7:1:2の割合に分割し、それぞれ119組、17組、36組の画像を用いて解析を行った。深層学習による心筋細胞領域のセグメンテーション解析において学習器を用いた心筋細胞の同定率は22%程度と低いことが確認された(図2)。心筋細胞領域の割合とセグメンテーション精度の関係を確認したところ、偽陰性の過誤(心筋細胞領域の検出漏れ)は少なく、偽陽性の過誤(心筋細胞領域の誤検出)が多いことがあきらかになった(図3)。また、セグメンテーション精度と心筋細胞領域の割合の関係を定性的に確認すると、心筋細胞領域の割合が高い画像のセグメンテーション精度は約80%に達したが、心筋細胞領域の割合が低い画像のセグメンテーションは約1%と非常に低いことが確認された(図4)。この低い精度となった画像の心筋細胞領域の割合を確認したところ、想定していた分化誘導効率である30-90%より遥かに低いことがわかった。そこで、次に分化誘導効率の異なるヒトiPS細胞由来心筋細胞の教師データを効率良くさらに約600組獲得し実験を行った。各々の画像データはFlow cytometryによるTroponin-Tの陽性率、すなわち心筋細胞の含有率のデータと紐付いているため教師データとして最適化されている。心筋細胞含有率が約90%と約30%のデータを用いることによって心筋細胞領域の検出力を確認した(図5)。位相差顕微鏡画像と正解画像セットの565組を前回と同様に訓練、交差検証、テストへ7:1:2の割合に分割し、それぞれ392組、56組、117組の画像データを用いて解析を行った。これにより学習器による心筋細胞の同定率はセグメンテーション精度を表すDice類似度係数で0.2223 ± 0.2757から0.7858 ± 0.2004へと飛躍的に改善された(図6)。心筋細胞領域の割合とセグメンテーション精度の関係からは極端に心筋細胞領域が少ない画像は除外されたデータセットであることが確認された。また、心筋細胞と非心筋細胞領域の境界は偽陰性の過誤になりやすく、偽陽性の過誤(心筋細胞領域の誤検出)は細胞領域に多く見られた(図7)。今回のデータ解析では偽陰性の過誤(心筋細胞領域の検出漏れ)と偽陽性の過誤(心筋細胞領域の誤検出)が大幅に改善されていることが明らかになった(Recall(偽陰性の無さ): 0.4160 ± 0.3757 → 0.8404 ± 0.1456 Precision(偽陽性の無さ): 0.1724 ± 0.23490. > 7508 ± 0.2417)(図3、8)。今回の結果より非心筋細胞領域が少ない教師データでは学習器はより正確に心筋細胞領域の割合を検出できることがあきらかになった(図9)。これらの結果より、今後RecallとPrecisionをあげることにより心筋細胞の検出率をより高めることが可能であると予想された。





国内外における位置づけとインパクトと今後の展望

従来の抗体を用いた免疫染色法やフローサイトメトリー、および遺伝子解析による品質評価法では多能性幹細胞由来心筋細胞の汎用化と産業化は困難である。それゆえに大量の心筋細胞の品質を効率よく短時間で評価する必要があるため、位相差顕微鏡画像を用いた革新的な品質評価法を構築する必要がある。本研究で開発した自動画像取得システムにより、深層学習に必要な大量の教師データを効率よく獲得することが可能になった。本画像解析システムは iPS 細胞由来の心筋細胞だけでなく、血管内皮細胞や神経細胞等の他細胞の画像を取得するのも非常に有用であり、今後の細胞解析に大きく貢献することが可能である。また、本データを用いて研究分担者の舟橋は、セグメンテーションアルゴリズムにより、拍動する心筋細胞を効率的に評価する画期的な深層学習法と最新の機械学習アルゴリズム（これまでのセマンティックセグメンテーションによる評価法とは異なり区画化した領域ごとに心筋細胞を定量的に評価できる画期的な細胞分類を行う学習器 (Appl. Sci. 2019, 9, 5503) を実装することに成功した。さらに、その際に得た知見、特に学習に強く寄与した画像の特徴を用いて教師データの解析をい 95% 以上の判定評価を目指している。これらの研究成果より、本研究によってもたらされる細胞評価システムの確立は幹細胞生物学と再生医療、Organ-on-chip の領域に極めて大きなインパクトを残したと考えられる。さらに、分化誘導、成熟化の各ステージにおける iPS 細胞由来心筋細胞の分化、成熟、代謝の遺伝子発現を確認しており、深層学習による画像解析データと組み合わせることにより多能性幹細胞から中胚葉細胞、心筋細胞への分化プロセス、幼若心筋細胞から成熟心筋細胞への成熟度の評価法を完成させることが可能である。

本研究成果によって心筋細胞の状態を位相差顕微鏡で観察した細胞の画像データのみから評価することが可能になった。これまでの研究では、画像解析のみで多能性幹細胞からの分化誘導効率や成熟度を評価することは極めて困難であり、学術的、社会的意義は非常に大きい。本研究成果は病態解明と創薬開発における ES/iPS 細胞研究のブレークスルーを達成するものであり、効率的な分化誘導法や成熟化法を開発するための強力なツールとなる。その成果は循環器領域にとどまらず他領域にも役立つ極めて汎用性の高い技術である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ooka Maya, Tokuoka Yuta, Nishimoto Shori, Hiroi Noriko F., Yamada Takahiro G., Funahashi Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 Deep Learning for Non-Invasive Determination of the Differentiation Status of Human Neuronal Cells by Using Phase-Contrast Photomicrographs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 5503 ~ 5503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app9245503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Jun	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of Cardiac Regenerative Medicine Using Human iPS Cell-derived Cardiomyocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2302/kjm.2020-0009-IR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 舟橋 啓
2. 発表標題 畳み込みニューラルネットワークを用いた神経分化判別および特徴量解析
3. 学会等名 山口大学 AIシステム医学医療研究教育センター セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 舟橋 啓, 徳岡 雄大
2. 発表標題 機械学習による画像分類
3. 学会等名 AIによる生物画像解析トレーニングコース (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 淳
2. 発表標題 Development of Cardiac Regenerative Therapy Using Cardiac Spheroids
3. 学会等名 Japanese Circulation Society 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田 淳
2. 発表標題 Cardiac regenerative therapy for severe heart failure with iPS cell-derived cardiomyocytes
3. 学会等名 The Japanese Society for Regenerative Medicine 2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	舟橋 啓 (FUNAHASHI Akira) (70324548)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・准教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------