

変動する機械的圧縮刺激に対する  
メラノーマ細胞の応答性に関する研究

2021 年度

森倉 峻

学位論文 博士（工学）

論 文 題 目

変動する機械的圧縮刺激に対する  
メラノーマ細胞の応答性に関する研究

2021 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

森倉 峻

# 目次

## 第 1 章 緒言

1.1 機械的刺激に対するメラノーマの応答 .....	1
1.2 機械的圧縮刺激印加培養装置 .....	4
1.3 四次元細胞顕微鏡法 .....	7
1.4 研究目的 .....	12

## 第 2 章 時系列情報を取得可能な機械的圧縮刺激印加培養装置

2.1 概要 .....	15
2.2 性能評価	
2.2.1 デジタル画像相関法を用いたクリープ試験 .....	16
2.2.2 細胞培養試験 .....	21

## 第 3 章 光散乱性ハイドロゲル内における細胞形状変化を計測可能なラベルフリー四次元細胞計算顕微鏡法

3.1 可逆的次元変換法	
3.1.1 双方向符号化理論 .....	29
3.1.2 性能評価 .....	34
3.2 シングルショット三次元細胞計算顕微鏡法	
3.2.1 概要 .....	46
3.2.2 試料および実験方法 .....	47
3.2.3 結果および考察 .....	59

## 第4章 変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞集団の応答性

4.1 概要	65
4.2 試料および実験方法	66
4.3 結果および考察	72

## 第5章 変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ単一細胞の応答性

5.1 二次元メラノーマモデルにおける応答性評価	
5.1.1 概要	77
5.1.2 試料および実験方法	78
5.1.3 結果および考察	80
5.2 三次元メラノーマモデルにおける応答性評価	
5.2.1 概要	83
5.2.2 試料および実験方法	84
5.2.3 結果および考察	86

## 第6章 結言

6.1 結論	92
6.2 今後の展望	94

謝辞	95
----	----

参考文献	96
------	----

研究業績	112
------	-----

## 図リスト

Fig. 1.1 Conceptual diagram of the questions posed in this study: “*How does melanoma respond to fluctuated mechanical compression?*”.

Fig. 1.2 Approaches that combines the application of compression to cell with maintenance culture.

Fig. 1.3 Overview of conventional dimension transformation algorithms.

Fig. 1.4 Relationship between the chapters in this paper.

Fig. 2.1 Cell culture device for imposing mechanical compression with temporal observation(CMT).

Fig. 2.2 Creep test in CMT.

Fig. 2.3 Creep test during mechanical compression in CMT.

Fig. 2.4 Fabrication of the 2D melanoma model. B16F10 cells were seeded in a cylindrical area in the PDMS mold on a cell culture dish.

Fig. 2.5 Cell culture test in CMT.

Fig. 3.1 Conceptual diagram of Dimension Transformer with Bidirectional Coding Theory.

Fig. 3.2 Accuracy of the decoded data strings using BCT (n=1000, mean  $\pm$  S.D.).

Fig. 3.3 Execution time in encoding and decoding with a 1D random number array of integers generated from a discrete uniform distribution.

Fig. 3.4 Reversible dimensional transformation without information loss using DiT. The data values

contained in the voxels of the original and reconstructed data were all consistent.

Fig. 3.5 Reconstruction of the self-shielding 3D object with DiT. The data values contained in the voxels of the original and reconstructed data were all consistent.

Fig. 3.6 Reconstruction of mutual shielding 3D object with DiT. The data values contained in the voxels of the original and reconstructed data were all consistent.

Fig. 3.7 Raw data and calibration test.

Fig. 3.8 Dataset construction and single-shot three-dimensional cellular computational microscopy (STCM) architecture.

Fig. 3.9 Learning results of mapping from the single phase-contrast microscopy image to the 3D cell shape using by STCM.

Fig. 4.1 Image analysis using ImageJ.

Fig. 4.2 Progression of B16F10 cells in a 2D melanoma model under mechanical intermittent compression.

Fig. 4.3 Cell viability and cell proliferation assay.

Fig. 4.4 Quantification of cell migration and invasion capacity.

Fig. 5.1 Phenotypic plasticity of melanoma cells in two-dimensional cell culture model under the intermittent mechanical compression.

Fig. 5.2 Representative phase-contrast microscopy images and three-dimensional cell shape images reconstructed by STCM at 12 h culture duration.

Fig. 5.3 Time-course change of the percentage of cell number in each cluster at control, T=4, T=8 group.

Fig. 5.4 Phenotypic plasticity of melanoma cells in three-dimensional cell culture model under the intermittent mechanical compression.

## 表リスト

Table 3.1 Performance of the generated 2D compressed map with PSNR, mSSIM, and CCC. These metrics were calculated by comparing them with 2D ground truth data.

Table 3.2 Performance of the reconstructed 3D cell voxel data with centroid error, relative volume error, relative surface error and absolute error of three-dimensional morphology index. These metrics were calculated by comparing them with 3D ground truth data.

Table 3.3 Comparison of the 3D cell shape reconstruction on the established dataset using IoU, Accuracy, Precision, Recall, and F-measure. These metrics are calculated as the mean value in the test data. The best number for each metric is highlighted in bold.

Table 3.4 The number of parameters, memory footprint and inference time on the established dataset. The memory footprint was calculated with a batch size of 2. The inference time was measured in each epoch with a batch size of 2. The resolution of the input and output size were  $32^2$  and  $32^3$ , respectively. The best number for each metric is highlighted in bold.

Table 4.1 RT-qPCR primer sequences.



## 略語一覽

2D-CMI: two-dimensional cell morphology index

3D-CMI: three-dimensional cell morphology index

ALM: acral lentiginous melanoma

AMT: amoeboid to mesenchymal transition

BCT: bidirectional coding theory

BIC: Bayesian information criterion

calcein-AM: calcein acetoxymethyl ester

CCC: concordance correlation coefficient

cGAN: conditional generative adversarial network

CMT: cell culture device for imposing mechanical compression with temporal observation

DA: data augmentation

DiT: dimension transformer

DIC: digital image correlation

DMEM-high glucose: Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose

ECM: extracellular matrix

FBS: fetal bovine serum

GMM: Gaussian mixture model

IoU: intersection over union

mSSIM: mean structural similarity index measure

PBS: phosphate-buffered saline

PDMS : polydimethylsiloxane

PI: propidium iodide

PSNR: peak signal to noise ratio

ROI: region of interest

STCM: single-shot three-dimensional cellular computational microscopy

SOTA: state of the art

SSM: superficial spreading melanoma

MAT: mesenchymal to amoeboid transition

## 記号一覧

$\mathbb{N}_0$  : 非負整数全体を成す集合

$\mathbb{N}$  : 自然数全体を成す集合

$\mathbb{Z}$  : 整数全体を成す集合

$\mathbb{R}$  : 実数全体を成す集合

# 第1章 緒言

## 1.1 機械的刺激に対するメラノーマの応答

近年、メラノーマの発症率が世界的に増加し続けていることが報告されており、メラノーマに対する効果的な治療法の確立が切望されている[1]–[3]。進展が極めて早いメラノーマは他の悪性腫瘍に比べて高い死亡率を示し、予後の悪い難治性疾患である[4]。ダカルバジン抗がん剤を用いた化学療法[5], [6]が長年支持されてきたが、アナフィラキシーショックや重篤な肝障害などの極めて深刻な副作用[7], [8]を示す一方で奏効率は低いことが重大な懸念事項であった[9]。そこで、近年の分子生物学の隆盛を受けて、特定の遺伝子変異を治療ターゲットとする分子標的療法[10], [11]や、免疫阻害チェックポイント剤を用いた免疫療法[12], [13]などの画期的な治療法が次々と開発された。これらの治療法はメラノーマのメジャーサブタイプである、表在性拡がり型メラノーマ (superficial spreading melanoma: SSM) に対して効果を発揮した。SSMは顔や腕などの紫外線曝露部に発症するため、紫外線曝露を起因とした多くの遺伝子変異が認められている[14]–[19]。特定の遺伝子変異をターゲットとした分子標的療法や免疫療法は、SSMに対し極めて高い奏効率を示すことが知られている[20]–[23]。しかしながら、主に足裏に発症するマイナーサブタイプの末端黒子型メラノーマ (acral lentiginous melanoma: ALM)は、紫外線曝露との関連性が低く遺伝子変異の発生自体が少ないため[24], [25]、分子標的療法や免疫療法などの新たな治療法に対する感受性が未だ低い[26]。したがって、ALMのような紫外線曝露との関連性の低いマイナーサブタイプに対しても効果的な治療法を開発することが強く求められている。ここで、マイナーサブタイプの進展プロセスには、紫外線曝露による遺伝子変異とは全く異なるプロセスが存在すると指摘されている[27], [28]。近年、メラノーマの進展プロセスに与える新たな因子として、メラノーマを囲む物理環境や機械的刺激が注目され始めた。Minagawaらは、臨床試験において機械的刺激が強く負荷される部位においてメラノーマの進展が促進されていることを報告した[29]。Liuらは静的な物理的環境の違いによってメラノーマの進展が変化することを報告した[30]。以上のように、メラノーマは静的な機械的刺激に応答して進展プロセスを変化させることが徐々に明らかとなってきた。しかしながら、生体内で発生する機械的刺激や物理環境は常に変動するため、メラノーマの進展プロセスを深

く理解するためには変動する機械的刺激下における応答性を解明する必要があるが、現時点でほとんどのプロセスが未解明である。

そこで、本研究では、変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞の応答性を細胞集団レベルおよび単一細胞レベルで解明する（図 1.1）。次節以降、本研究の目的を達成するために必要な以下 2 つの要素を説明する。

1. 機械的圧縮刺激印加培養装置（1.2 節）
2. 四次元細胞顕微鏡法（1.3 節）

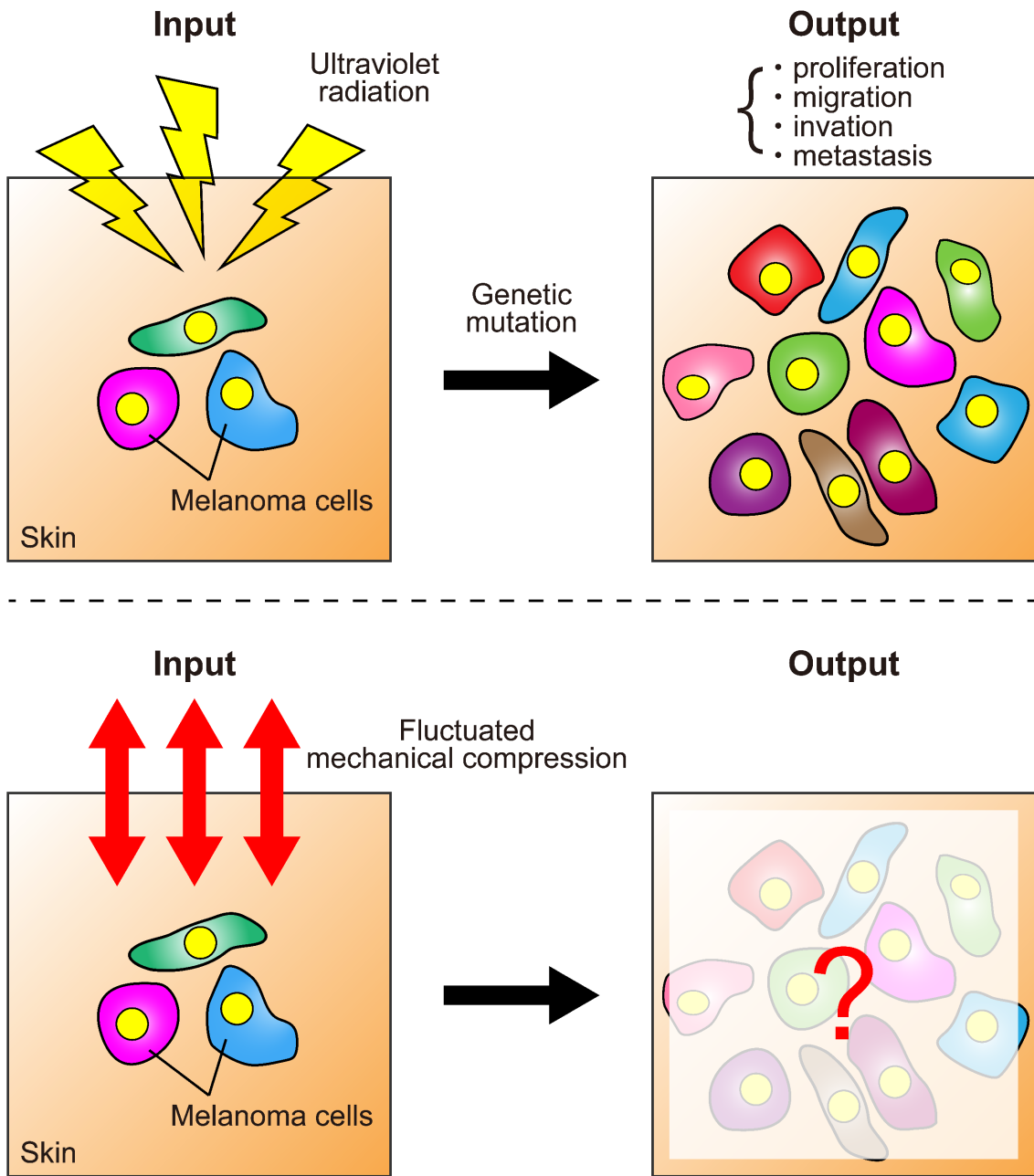


Fig. 1.1 Conceptual diagram of the questions posed in this study: “How does melanoma respond to fluctuated mechanical compression?”.

## 1.2 機械的圧縮刺激印加培養装置

本節では、機械工学的観点から細胞試料に対する圧縮刺激の印加と維持培養を両立するアプローチを網羅的に整理する。機械的圧縮刺激印加培養装置は、入力要素、試料要素および出力要素の3つの要素によって分類することができる(図 1.2)。ここで、入力要素とは圧縮刺激を試料に作用させる機械的要素、出力要素とは試料の応答を測定する機械的要素を指す。

入力要素は、物理的状态と物理的構造の違いによって大別される。物理的状态の観点からは液体か固体に分類される。具体的に、液体を用いた圧縮刺激の印加では静水圧[31], [32], 固体では機械的圧力[33]-[35]が用いられる。物理的安定性に優れる機械的圧力は、静水圧に比べて安定した圧力刺激の持続的印加を可能とする。物理的構造の観点からは点構造か面構造の入力要素に分類される。点構造は局所的な圧縮刺激を、面構造は広範囲な圧力刺激の印加を可能とする。点構造による圧縮刺激の印加では、図 1.2 に示すように原子間力顕微鏡に代表されるカンチレバー構造が用いられる[36], [37]。面構造による圧縮刺激の印加ではマイクロ流体デバイスに代表される膜機構[38]-[40]や、錘などの円柱機構[41], [42]が用いられる。

試料要素は、生物学的階層および細胞担体構造の違いによって大別される。生物学的階層の観点からは単一細胞レベルか細胞集団レベルに分類される。細胞-細胞間相互作用を可能な限り排除する場合は単一細胞レベル、細胞-細胞間相互作用を考慮する場合は細胞集団レベルで試料を構築する。細胞担体構造の観点からは二次元構造か三次元構造に分類される。二次元的な細胞培養皿上で細胞を培養する場合、二次元構造となる。三次元的な細胞外マトリクス(extracellular matrix: ECM)によって細胞が立体的に分散培養される場合、三次元構造となる。近年、ECMは細胞試料にとって物理的な足場であると同時に、生化学的および生物力学的な相互作用の場でもあることが明らかとなってきたため、三次元培養による細胞試料も広く用いられるようになってきた[43], [44]。

出力要素は測定の時間分解能によって分類され、エンドポイント測定またはタイムラプス測定が存在する。エンドポイント測定においては、刺激の印加が開始もしくは終了した時点においてのみ測定するため詳細な時系列情報は取得できない。一方で、タイムラプス測定においては、試料の応答を任意の時点で測定するため詳細な時系列情報を取得できる。

本研究では、細胞集団レベルおよび単一細胞レベルのメラノーマ細胞で構築される二次元的もしくは三次元的な細胞培養モデルを試料要素とする。本研究の目的達成には、

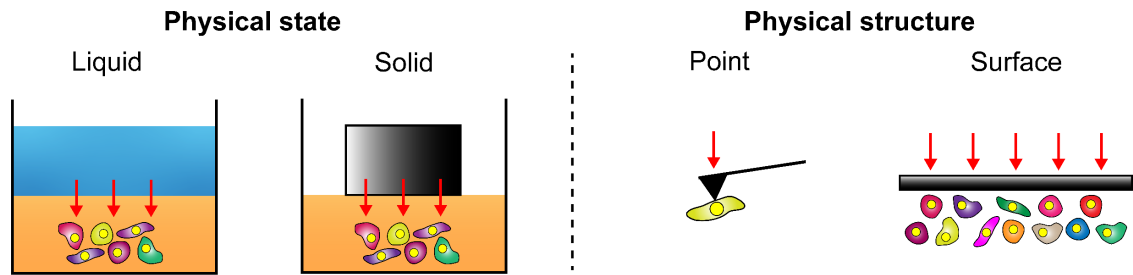
1. 細胞集団および単一細胞レベルの試料に同様の刺激を安定して負荷できること
2. 細胞挙動の時系列情報を取得可能であること

が必要である。上記の必要条件を満たす入力要素と出力要素の性質は、それぞれ

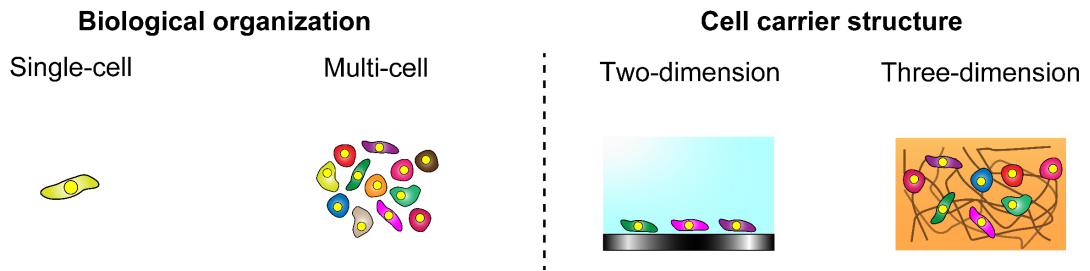
1. 面構造による機械圧縮を印加可能な入力要素
2. タイムラプス測定可能な出力要素

である。広範囲な刺激を印加できる面構造によって、細胞集団および単一細胞レベルに一樣な圧縮刺激を印加することができる。また、物理的安定性に優れる機械的圧力を用いることで、安定した圧縮刺激を持続的に印加することができる。面構造による機械的圧力を印加する要素の機構として膜機構もしくは円柱機構が挙げられるが、いずれも圧力印加周辺部においては局所的な栄養供給不足が発生する。また、円柱機構を用いた圧縮刺激の印加では、圧縮軸と光軸が重なるため光路を確保できずタイムラプス測定できない。そこで、本研究においては圧縮刺激印加と栄養供給および光路確保を両立する機構を考案することで、時系列情報を取得可能な機械的圧縮刺激印加培養装置を開発する必要がある。

Input



Biological specimens



Output

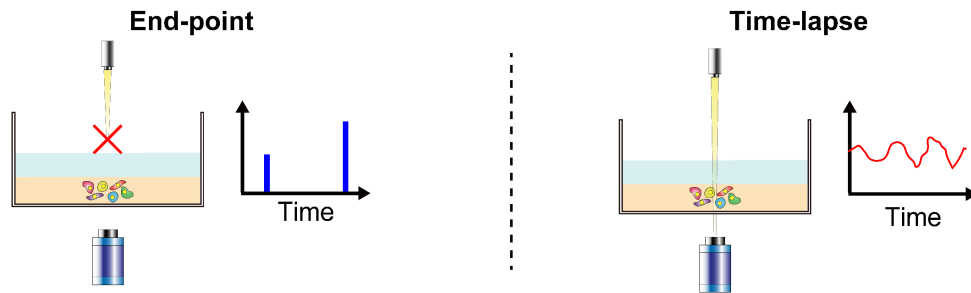


Fig. 1.2 Approaches that combines the application of compression to cell with maintenance culture.



### 1.3 四次元細胞顕微鏡法

本節では、三次元細胞形状の時間的変化を観察する四次元細胞顕微鏡法を網羅的に整理する。ここで、細胞顕微鏡法は試料の光学的性質によって適切なアプローチが異なるため、本節では光散乱性ハイドロゲルに包埋されたメラノーマ細胞を試料として設定する。

四次元細胞顕微鏡法は、空間情報を測定する三次元細胞顕微鏡法と、時間情報を測定するタイムラプスイメージングの組合せによって構築される。一般的に、光散乱性ハイドロゲル内における三次元細胞顕微鏡法では蛍光顕微鏡法が広く用いられている。蛍光顕微鏡法では、蛍光物質を用いて細胞内の特定の分子を標識する。しかしながら、蛍光顕微鏡法は光毒性や光退色、生理活性阻害によって細胞挙動を変化させることが知られており、蛍光顕微鏡法によるタイムラプス観察は生理学的な細胞挙動に影響を及ぼす可能性がある[45]–[47]。そこで、蛍光物質を用いずに細胞挙動をタイムラプス観察可能なラベルフリー顕微鏡法の確立が必要である。また、メラノーマ細胞に含まれるメラニン色素は可視光を含む幅広い波長範囲の光線を強く吸収する[48]。光吸収に伴う光毒性[49], [50]や発熱効果（光熱効果）[51], [52]はメラノーマ細胞の生化学的反応を大きく変化させる。生理学的環境下におけるメラノーマの応答性を測定するためには、光照射の回数を限界まで減らしたシングルショットラベルフリー顕微鏡法が必要である。

近年、計算顕微鏡法と呼ばれる新たな顕微鏡法がシングルショットラベルフリー顕微鏡法を達成可能な方法論として注目されている。シングルショット計算顕微鏡法は、光学的アプローチと情報学的アプローチに大別できる。

光学的アプローチでは、光学理論に基づき光伝搬を解析することで細胞像を計算機上に再構築する。本節では、光学的アプローチを顕微鏡法および干渉法に分類する。

顕微鏡法は、光学システムおよび演算システムの違いによって分類できる。光学システムは、照明光の性質によって空間コヒーレント結像系および部分的空間コヒーレント結像系に大別される。空間コヒーレント結像系では、点光源から発せられた空間コヒーレント光を単一方向から試料に照射することで光強度分布を取得し、光強度分布からフーリエ変換法を介して像を再構築する[53], [54]。部分的空間コヒーレント結像系では、位相分布を持った部分的空間コヒーレント光を試料に照射し光強度分布を取得する[55]。光強度分布から波動方程式や強度輸送方程式に基づき光伝搬を解析的に計算することで像を再構築する[56], [57]。演算システムは、試料内における散乱回数を1回に近似する線形演算と、複数回の散乱を考慮する非線形演算に大別される。線形演算では、光強度分布を試料の振幅

分布と点像強度分布関数の畳み込み線形システムと近似し、点像強度分布関数のデコンボリューションによって解析的に像を再構築する[58]. 点像強度分布関数は点光源の像面上における強度分布を示す関数であり、線形性による取り扱い易さから広く利用されている. 非線形演算では、試料を伝搬する光の波面変化を逐次的に反復計算することで像を再構築する. 反復計算には膨大な計算量が要求されるが、計算機の著しい発展に伴って有限差分時間領域法[59], [60]やビーム伝搬法[61], [62]などの高精度な非線形演算法が開発されてきた. これらの演算においては、光輸送方程式によって記述される光伝搬に基づく理論的解析が必要とされるが、多重散乱位相物体内においては光散乱の等方性を仮定する拡散近似[63]や2次以上の多重散乱を無視するボルン近似[64]など様々な近似を用いる必要がある.

干渉法では、シングルショットイメージングを可能とするデジタルホログラフィ技術に注目が集まっている[65]. デジタルホログラフィでは、レーザのような高コヒーレンス光源を物体光および参照光に分離する[66], [67]. 物体光と参照光の位相差によって生成される干渉縞を撮像する. 干渉縞における光強度分布は位相差によって決定されるため、計算機上で位相情報を抽出し光伝搬を解析することで三次元像を再構築する. 近年、物体光の2次元情報を空間的に多重化する空間光変調素子を用いたシングルショットデジタルホログラフィーが開発された[66], [67].

以上のように、光学的アプローチによるシングルショット計算顕微鏡法は、厳密な理論的解析によって高い測定精度が担保されることから、理論的および実験的側面から著しい発展を遂げてきた. しかしながら、多重散乱位相物体である光散乱性ハイドロゲルでは異方的な光散乱や強い多重散乱が生じるため、光学的アプローチを用いた本研究における試料に対するイメージングは現時点で困難である.

情報学的アプローチは、近年の深層学習分野の発展によって急速に注目され始めた方法論である. 深層学習では、計算機が入力情報と出力情報のデータ構造を学習することで、入出力関係を結ぶ非線形写像を推定する. 深層学習モデルの学習プロセスにおいて、光伝搬などの物理現象を仮定する必要がないため、現時点の光学的アプローチでは観察の難しいタスクにおいて新たな道筋を見いだせる可能性が高い[68], [69]. たとえば、Wuらは蛍光標識した細胞骨格の二次元蛍光顕微鏡像から三次元細胞骨格形状を推測するモデルを開発した[70]. Blundellらは単分子局在顕微鏡を用いたタンパク質の二次元蛍光顕微鏡像から三次元タンパク質形状を推測するモデルを開発した[71]. これらの先行研究では、高コントラストな細胞像を取得することができる蛍光顕微鏡像が入力画像として用いられた. しか

しながら，本研究においては細胞形状をラベルフリーに計測する必要があるため，ラベルフリー顕微鏡像を入力画像とする必要がある．ここで，ラベルフリー顕微鏡像の性質を整理する．一般的に，明視野顕微鏡で撮像されたラベルフリー顕微鏡像はノイズの少ない画像となる一方で，低コントラストな画像となる[72]．位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡で撮像されたラベルフリー顕微鏡像は高コントラストな画像となる一方で，周囲構造に起因するノイズやハローなどのアーチファクトが画像に映り込む．以上のように，ラベルフリー顕微鏡像はコントラストとノイズがトレードオフな関係にあるため，1枚のラベルフリー顕微鏡像から三次元細胞像を再構築しようとする試みは未だ存在しない．

続いて，深層学習分野における三次元像再構築技術を整理する．一般的な三次元像再構築技術では，複数の視点（マルチショット）から撮影された二次元画像と三次元データ間の非線形関数を深層学習モデルによって近似することで，複数枚の二次元画像から三次元像を再構築する[73]–[76]．マルチショット三次元像再構築に用いられる深層学習モデルでは，深層ニューラルネットワークが広く使用されている．深層ニューラルネットワークとは，入力要素と出力要素が重み付きエッジによって接続されたニューラルネットワークの多層構造によって構築される数理モデルである．ニューラルネットワークでは，入力から出力を予測し予測値と正解値の誤差を逆伝搬させることで予測精度を向上させる．深層ニューラルネットワークの学習には極めて膨大な計算量が要求されるが，計算機の著しい性能向上と数理モデルの発展によってマルチショット三次元像再構築の予測精度は劇的に向上してきた[75], [76]．しかしながら，最先端の深層学習技術を以ってしても，単一の視点（シングルショット）から撮影された二次元画像から三次元像を再構築するシングルショット三次元像再構築は依存として難しいタスクであることが知られている[77]．これは，予測する出力次元数が入力次元数に比べて著しく大きい状況下では，精度高く予測することが極めて困難であるという事実に基づく[78]．

そこで，二次元データから三次元データへの再構築タスクを何らかの方法によって二次元データから二次元データへの予測タスクに再定義することで，入力次元数と出力次元数の解離を克服すれば高精度なシングルショット三次元像再構築顕微鏡法を構築できると仮説を立てた．本仮説の実証においては，

- (1) 出力要素の三次元データを二次元データに次元変換
- (2) 入力要素の二次元データから，出力要素の二次元データを予測
- (3) 予測された出力要素の二次元データを三次元データに次元変換する

の3つのステップを踏む必要がある。

第二ステップに関して、二次元データから二次元データを予測するタスクは深層学習分野において画像対画像変換タスクとして知られ、汎用な深層学習モデルが多数報告されている[79]–[81]。これらの深層学習モデルは、教師あり学習モデルと教師なし学習モデルに大別される。教師あり学習モデルでは、一対一の関係にある画像ペアを教師データセットとして構築し、入力と出力の関係を学習する。教師なし学習モデルでは、与えられた画像群データセットにおける、データ同士の構造を学習する。本研究では、教師あり学習モデルを用いて、入力画像から出力画像を推定する。

第一および第三ステップの実行に必要な次元変換アルゴリズムを整理する。高次元空間から低次元空間に情報を埋め込む次元変換アルゴリズムでは、高次元データの特徴量を抽出し次元数を削減することで低次元空間に埋め込む[82], [83]。特徴量抽出による次元数削減は不可逆的な情報損失を生じさせる（図 1.3a）。例えば、図 1.3b に示すような三次元物体を二次元平面に投影する次元変換では、投影面の反対側の情報は埋め込み完了時に完全に失われる（自己遮蔽）。また、重なり合った複数の三次元物体を二次元平面に投影する次元変換においても、重なり合った領域の情報は失われ再構築することは原理的に不可能となる（相互遮蔽）。自己遮蔽や相互遮蔽による不可逆的な情報損失は三次元再構築タスクにおいて致命的であり、一度失われた情報を再度取り戻すことは不可能である[84], [85]。すなわち、情報損失のない可逆的な次元変換法は現時点で存在しない。

以上、本研究において、情報損失のない可逆的な次元変換法を開発することで、高精度なシングルショット三次元細胞計算顕微鏡法を構築する。構築した顕微鏡法とタイムラプスイメージングを組み合わせることで、変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞の生理学的な応答性を測定可能なラベルフリー四次元細胞顕微鏡法を確立する。

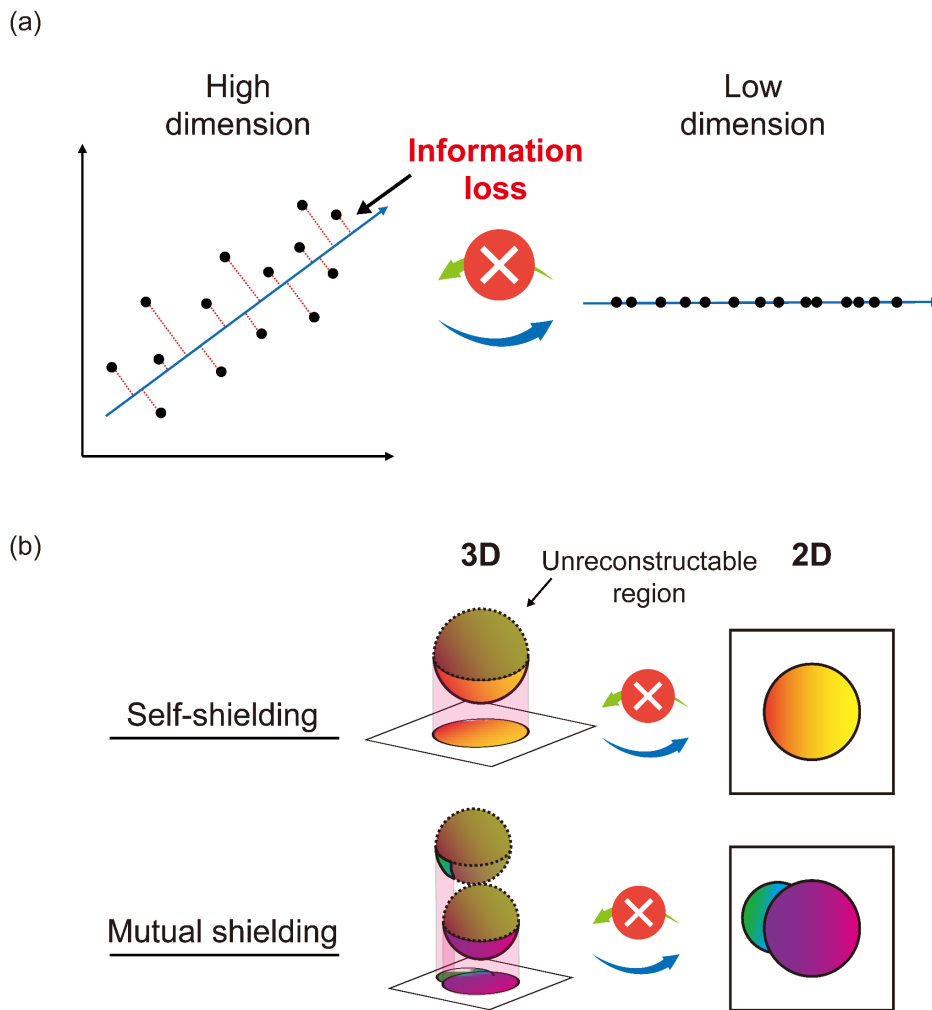


Fig. 1.3 Overview of conventional dimension transformation algorithms. (a) Schematic of the dimensionality transformation algorithm. Embedding in a low-dimensional space causes irreversible information loss. (b) Schematic of self-shielding and mutual shielding. Irreversible information loss is fatal in 3D reconstruction tasks, and once the information is lost, it cannot be regained.

## 1.4 研究目的

1.1 節では本研究の対象となるメラノーマについて概説し、機械的圧縮刺激に対するメラノーマの応答性を解明することの重要性を述べた。しかしながら、動的な機械的圧縮刺激に対するメラノーマの応答性は未だ明らかにされていない。そこで、本研究では変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞の応答性を細胞集団レベルおよび単一細胞レベルで解明することを最終目的とする。本研究目的の達成には、機械的圧縮刺激印加培養装置および四次元細胞顕微鏡法が必要である。

1.2 節では、細胞試料に対する圧縮刺激の印加と維持培養を両立するアプローチを整理した。細胞集団および単一細胞レベルの試料に同様の刺激を安定して負荷するためには、面構造の機械的圧力を印加する必要があることを述べた。しかしながら、面構造による圧力印加では局所的な栄養不足が生じるとともに、圧縮軸と光軸が重なるために光路を確保できずタイムラプス観察することができない、面構造による機械的圧力の印加と栄養供給、そしてタイムラプス観察を両立する培養装置は未だ存在していない。

1.3 節では、光散乱性ハイドロゲルに包埋されたメラノーマ細胞を試料として設定した上で、三次元細胞形状の時間的変化を観察する四次元細胞顕微鏡法を整理した。四次元細胞顕微鏡法は、空間情報を捉える三次元細胞顕微鏡法と時間情報を捉えるタイムラプスイメージングによって構築される。一般的に、光散乱性ハイドロゲル内の細胞をイメージングする三次元細胞顕微鏡法として、細胞を蛍光標識する蛍光顕微鏡法が広く用いられている。しかしながら、蛍光標識は細胞の生理学的応答を変化させる。また、メラノーマ細胞は光照射によっても生理学的応答を変化させる。生理学的条件下におけるメラノーマ細胞の応答性をタイムラプス観察するためには、光照射回数を限界まで減らしたシングルショットラベルフリー顕微鏡法が必要不可欠である。近年、計算顕微鏡法と呼ばれる新たな顕微鏡法がシングルショットラベルフリー顕微鏡法を達成可能な方法論として注目されている。シングルショット計算顕微鏡法は、光学的アプローチと情報学的アプローチに大別される。光学的アプローチは厳密な光学理論に基づく高精度測定が担保される一方で、多重散乱位相物体である光散乱性ハイドロゲルに包埋された細胞形状を捉えることは原理的に難しい。情報学的アプローチは、近年著しい発展を遂げている深層学習モデルに基づく。深層学習では光伝搬などの物理現象を仮定せずに入出力データの関係性を推定できるため、光散乱性ハイドロゲル内の細胞形状を捉えられる可能性がある。一方で、入出力データにおける顕著な次元数の解離によって1枚の二次元顕微鏡像から三次元形状を精度高く測定

することは難しい。そこで、出力の三次元データを二次元データに可逆的に次元変換できれば、測定精度を向上させることができると仮説を立てた。しかしながら、現時点で情報損失のない可逆的次元変換法は存在していない。

以上、本研究では変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞の応答性を細胞集団レベルおよび単一細胞レベルで解明することを目的として、時系列情報を取得可能な機械的圧縮刺激印加培養装置および光散乱性ハイドロゲル内の細胞形状変化を取得可能なラベルフリー四次元細胞顕微鏡法を確立する。確立した方法論をもって、時間スケールで変動する間欠的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞集団およびメラノーマ単一細胞の応答性を調査する。

本論文における各章の関連を図 1.4 に示す。第 2 章では、圧縮刺激印加と栄養供給および光路確保を両立する機構を考案することで、時系列情報を取得可能な機械的圧縮刺激印加培養装置を開発する。第 3 章では、光散乱性ハイドロゲル内の三次元細胞形状の時間的変化を計測可能なラベルフリー四次元細胞顕微鏡法の確立に向けて、情報損失のない可逆的な次元変換法の開発を介して高精度なシングルショット三次元細胞計算顕微鏡法を構築する。第 4 章では、間欠的圧縮刺激がメラノーマ細胞集団の進展速度に与える影響を調査する。第 5 章では、間欠的圧縮刺激がメラノーマ単一細胞の細胞形態分布に与える影響を調査する。第 6 章では、結言として各章で得られた内容をまとめ、本研究の成果を要約する。

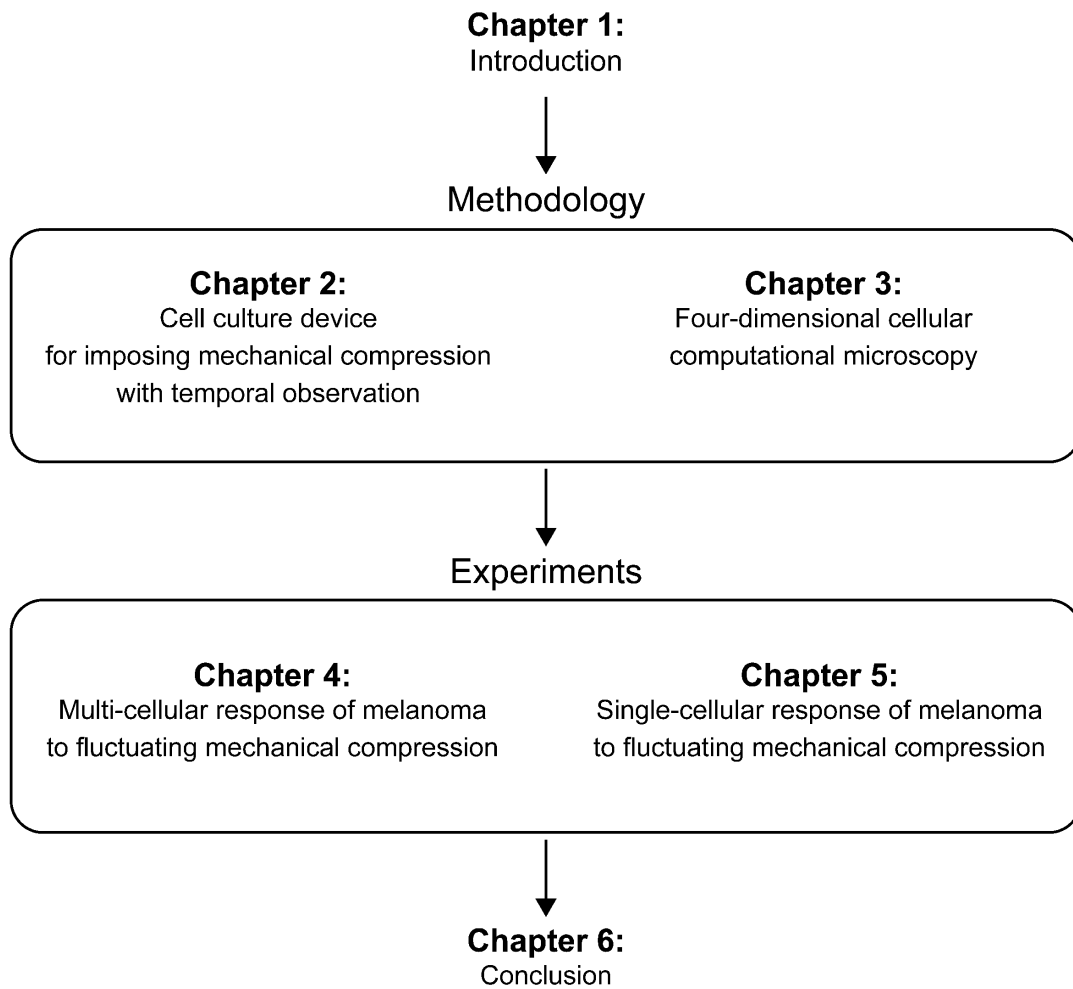


Fig. 1.4 Relationship between the chapters in this paper.



## 第 2 章 時系列情報を取得可能な機械的圧縮刺激印加培養装置

### 2.1 概要

本節において、機械的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞の応答性を経時的に観察可能な培養装置（Cell culture device for imposing mechanical compression with temporal observation : CMT）の概要を述べる。

図 2.1 に CMT の概要図を示す。本研究では皮膚の立体構造を模擬してハイドロゲル内にメラノーマ細胞を包埋したメラノーマモデルを刺激印加対象とする。CMT は汎用培養皿、Cell Culture Insert (pore size;  $\phi 8.0 \mu\text{m}$ , BD Falcon Inc, Franklin Lakes, NJ, USA) および SUS304 製円筒状錘によって構成される。Cell Culture Insert は底面が PET 製多孔質膜によって構成される汎用フィルタ培養デバイスであり、円筒形状に加工した錘と併用することで、面構造による機械的圧縮刺激の印加と栄養供給および光路確保を両立させた。これらの装置を図 2.1 のように配置することで、機械的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞の応答性をタイムラプス測定できるようになる。円筒状錘の重さを調整することで任意の荷重を観察対象に負荷することができるが、本研究においては観察対象に  $7.7 \times 10^2 \text{ Pa}$  の圧縮応力[41], [86]が印加されるように、内径 25 mm, 外径 30 mm, 高さ 16 mm になるように加工した。ここで、複数の先行研究[41], [86]によって圧縮応力  $7.7 \times 10^2 \text{ Pa}$  の印加はがん細胞の細胞運動を促進させることが報告されており、本研究においても細胞運動の活発な  $7.7 \times 10^2 \text{ Pa}$  を圧縮応力値に設定した。

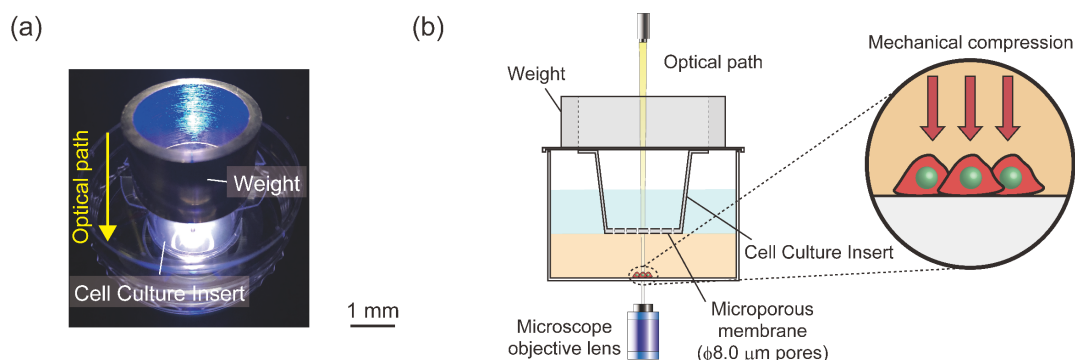


Fig. 2.1 Cell culture device for imposing mechanical compression with temporal observation(CMT).

(a) Photograph. (b) Schematic side view. Red arrows indicate the direction of compression.

## 2.2 性能評価

### 2.2.1 デジタル画像相関法を用いたクリープ試験

#### 2.2.1.1 概要

本節において、CMT の機械的圧縮刺激印加性能をクリープ試験によって評価する。CMT は粘弾性体であるハイドロゲルを介してメラノーマ細胞に機械的圧縮刺激を印加する。一般的に、持続的な荷重を粘弾性材料に印加した際、時間経過に伴ってひずみが増加するクリープ変形が発生する[87]-[90]。CMT における機械的圧縮刺激印加時においては、培養皿の表面に対して水平方向にクリープ変形が生じるが、水平方向のハイドロゲルの変形はメラノーマ細胞にせん断応力を与える可能性がある。クリープ変形の持続時間（遅延時間）が機械的圧縮刺激の印加時間に比べて無視できる場合には細胞が受けるせん断応力は無視できるが、遅延時間が印加時間と同程度もしくは印加時間以上の場合、細胞が受けるせん断応力は無視することができない。この場合、CMT は機械的圧縮刺激だけでなく、せん断刺激も細胞に印加してしまうため、メラノーマ細胞に対する機械的間欠的圧縮の効果を評価する上で交絡因子となってしまう。そこで、本実験において CMT 内におけるクリープ変形の遅延時間を測定する。

#### 2.2.1.2 試料および実験方法

本節におけるクリープ試験においては、機械的圧縮刺激の印加対象としてマイクロビーズ包埋 I 型コラーゲンゲルを使用し、機械的圧縮刺激下におけるひずみの変化をデジタル画像相関法（digital image correlation: DIC）によって測定した。ひずみの時間変化に対してクリープ曲線を非線形フィッティングすることで、CMT において発生するクリープ変形の遅延時間を評価した。

I 型コラーゲンは皮膚内の真皮層を構成する主成分であり[91], [92]、メラノーマモデルを構成するハイドロゲル材料として採用した。また、本実験においてはクリープ変形のマーカーとして、マイクロビーズを I 型コラーゲンゲルに包埋した。具体的に、コラーゲン酸性溶液 I-AC 3 mg/ml（KOKEN）と再構成緩衝液（新田ゼラチン）、10 倍 DF 濃縮培養液（新田ゼラチン）を 8 : 1 : 1 の比率で混合することで最終濃度 2.4 mg/ml の I 型コラーゲン中性溶液を作製した。再構成緩衝液は 50 mM 水酸化ナトリウム、260 mM 炭酸水素ナトリ

ウム, 200 mM HEPES で構成される. 続いて, 直径 20  $\mu\text{m}$  のポリスチレン製マイクロビーズ(Polybead; 18329, Polysciences Inc.)を I 型コラーゲン中性溶液に最終濃度 5 v/v%で混合し, 直径 60 mm の培養皿に混合液 2 ml を滴下した. 温度 37°C, CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 湿度 95%に制御された炭酸ガスインキュベータ内で 20 分間静置させることでゲル化させ, コラーゲンの上部に Cell Culture Insert および円筒状錘を設置した.

DIC はサンプルのひずみの時間的変化を連続撮像した時系列画像から測定する非接触計測法であり [93], [94], 本実験においてはコラーゲンゲルのタイムラプス画像を用いてひずみ変化を測定した. 具体的に, CCD カメラ(DP73, Olympus Inc.)を搭載した位相差顕微鏡 (CKX41, Olympus Inc.) を用いて, 機械的圧縮刺激印加開始時点から 1 分間隔で 30 分間のタイムラプス撮像を実施した. DIC では, 変形前後のサンプル画像から類似した輝度値分布を探索することで変形ベクトルを算出しひずみを測定する (図 2.2a). 探索する輝度値分布は解析窓と呼ばれる. 変形前後の画像に任意の解析窓を設定し, 解析窓同士の輝度値分布の相互相関係数を算出する. ここで, 変形前の解析窓は固定され, 変形後の解析窓は特定の探索領域内において走査される. 相互相関係数が最大となった解析窓の位置を変形後の位置とし, 変形前後の解析窓の変位ベクトルを算出する. 画像内に設定した解析領域において解析窓を走査し, それぞれの地点の変位ベクトルから Green-Lagrange ひずみ  $s_{xx}, s_{xy}, s_{yy}$  を算出することでサンプルのひずみ分布を算出する. ここで,  $s_{xx}, s_{yy}$  は画像内の xy 方向における法線ひずみ成分を,  $s_{xy}$  はせん断ひずみ成分を表す. 基準時点を刺激印加開始時点に設定し, 任意時点でのサンプル画像と基準時点でのサンプル画像を用いた DIC によるひずみ分布の算出によって, ひずみ分布の時間的変化を測定することができる. 本実験においては, 数値解析ソフトウェア MATLAB (Version 9.9.0.1570001 (R2020b), MathWorks Inc., USA) のオープンソースソフトウェア Ncorr[95]を用いて, DIC によるひずみ測定を実施した. また, 計算量の削減を目的としてサンプル画像内に解析対象領域 (Region of Interest: ROI) を設定し, ROI における解析窓および探索領域の走査を実施した.

続いて, ROI における各地点の法線ひずみ成分の二乗ノルム  $s = \sqrt{s_{xx}^2 + s_{yy}^2}$  を算出し, 二乗ノルム  $s$  の中央値  $S$  を任意時点のひずみの代表値  $S(t)$  として算出した. サンプルのひずみの時間的変化に対してクリープ曲線を非線形フィッティングすることで遅延時間を算出する. 一般的に, 生体組織やコラーゲンゲルなどのバイオマテリアルのクリープ現象は, 一般化 Kelvin-Voigt モデルを用いて記述される [96], [97]. 本実験においては, 3 要素の一般

化 Kelvin-Voigt モデルを非線形フィッティングする数理モデルとして用いた. 図 2.2b で表される一般化 Kelvin-Voigt モデルは次式で記述される.

$$\gamma(t) = \frac{\sigma_0}{E_1} + \frac{\sigma_0}{E_2} \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right) \quad (2.1)$$

$$\tau = \frac{\eta}{E_2} \quad (2.2)$$

ここで,  $\gamma(t)$ は時間依存のひずみ関数,  $\sigma_0$ は印加応力,  $E_i (i = 1,2)$ は弾性係数を,  $\eta$ は粘性係数を,  $\tau$ は遅延時間を示している. 非線形フィッティングではオープンソース統計解析ソフトウェア R (version 3.5.3) を使用して, 非線形最小二乗法である Levenberg-Marquardt 法 [98]を用いて, 実験値 $S(t)$ に対するクリープ曲線 $\gamma(t)$ を近似した. 具体的に, 印加応力 $\sigma_0 = 7.7 \times 10^2$  Pa として, 本実験ではパラメタ $\{E_1, E_2, \tau\}$ を推定した. 実験値 $S(t)$ に対する近似クリープ曲線 $\gamma(t)$ の適合度は Pearson 相関係数を用いて評価した.

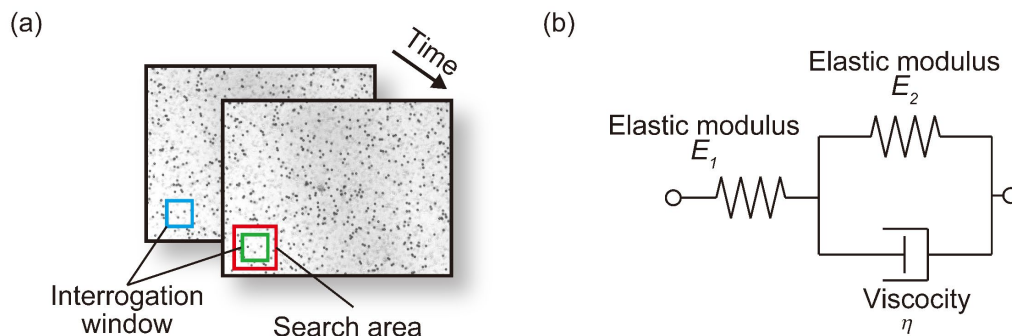


Fig. 2.2 Creep test in CMT. (a) Schematic of digital image correlation method (DIC). (b) Schematic of three-element generalized Kelvin-Voigt model.

### 2.2.1.3 結果および考察

機械的圧縮刺激下におけるコラーゲンゲルの時間的な変形を撮像した位相差顕微鏡像の時系列画像を図 2.3a に示す。画像内の黒い斑点はマイクロビーズであり、小枠内に拡大された図は同一の観察地点においてマイクロビーズが時間経過に伴って移動している様子を示している。クリープ試験によって取得したひずみの代表値の時間的な変化と、一般化 Kelvin-Voigt モデルを用いて非線形フィッティングしたクリープ曲線を図 2.3b に示す。ひずみの時間的な変化の測定結果から、時間経過に伴いひずみが増加し一定のひずみに収束する様子が認められた。これは典型的なクリープ変形におけるひずみの時間的な変化である。また、Pearson 相関係数の中央値は 0.968 (図 2.3c) であり、高い適合度でクリープ曲線を推定できたことが示された。遅延時間の測定結果を図 2.3d に示す。遅延時間の中央値は 8 分程度であり、機械的圧縮刺激の印加時間として想定する数時間オーダーに比べて極めて小さいことが示された。

これらの結果から、CMT におけるクリープ変形の遅延時間は機械的圧縮刺激の印加時間に比べて無視できる程度であり、細胞が受けるせん断応力は無視できる。すなわち、CMT は機械的圧縮刺激下におけるメラノーマ細胞の応答性を解析するのに適した培養装置として機能していることが示された。

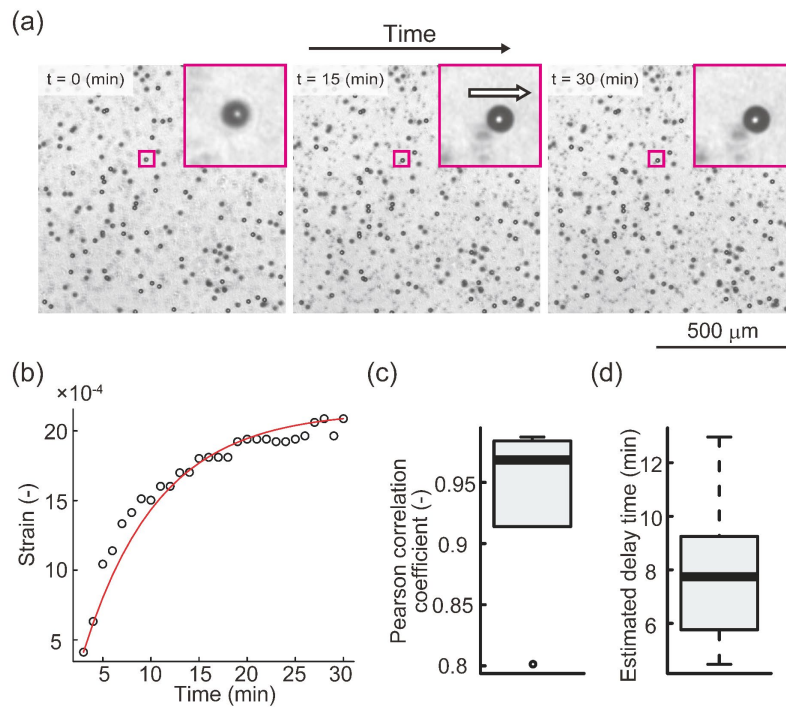


Fig. 2.3 Creep test during mechanical compression in CMT. (a) Representative time-lapse images acquired by phase-contrast microscopy. The black dot object in the image indicates a polystyrene microsphere. The white arrow indicates the direction of displacement. (b) Representative experimental data and estimated creep curve fitted by the three-element Kelvin-Voigt model. Experimental data are shown as plot points and Estimated creep curve is shown as red solid line. (c) Boxplot of Pearson's correlation coefficients. The median of the Pearson's correlation coefficients between the experimental data and the estimated creep curves was 0.968 ( $n = 6$ ). (d) Boxplot of estimated delay time. The median estimated delay time was 7.74 min ( $n = 6$ ).

## 2.2.2 細胞培養試験

### 2.2.2.1 概要

本節において、CMT の培養性能を細胞培養試験によって評価する。時系列情報を取得可能な機械的圧縮刺激印加培養装置として機能するために必要最低限要求される性能は、

1. 細胞が生存可能な培養環境であること
2. 機械的圧縮刺激によって細胞内に生化学反応を誘発できる培養環境であること
3. 時系列情報を取得可能な培養環境であること

の三点である。そこで、本節においてはマウスメラノーマ由来細胞株（B16F10 細胞，理研セルバンク）を用いてそれぞれを、

1. calcein-AM/PI 二重蛍光染色による細胞生存性評価
2. rhodamine-phalloidin 蛍光染色による F アクチン細胞骨格のリモデリング評価
3. 画像解析による細胞群挙動の時系列評価

によって性能評価する。

### 2.2.2.2 試料および実験方法

本節における細胞培養試験においては二次元メラノーマモデルを構築し、CMT の培養性能を評価した。二次元メラノーマモデルは、メラノーマの発生する皮膚の力学的な三次元環境を模擬して、二次元平面上に特定の円形領域に播種した B16F10 細胞群と三次元構造を有する I 型コラーゲンゲルによって構成される（図 2.4）。ここで、二次元メラノーマモデルは表皮層から真皮層に浸潤を開始する進展の初期段階を模している。

二次元メラノーマモデルを構成する B16F10 細胞は高転移性のメラノーマモデル細胞として広く用いられる細胞株であり [99]–[102]，高い細胞増殖能と遊走能を有する [103]，[104] ことで外部環境に対する優れた応答性を示す細胞株であることから本研究に適した細胞株として採用した。具体的に、本研究において B16F10 細胞は凍結アンプル解凍後 2 回の継代作業を経た後に試料として用いた。維持培養期間では、高グルコース含有ダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco’s modified Eagle’s Medium-high glucose: DMEM-high glucose, Gibco）+ 10% ウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum: FBS）+ 1% 抗生物質-抗真菌剤（Antibiotic-Antimycotic）に調整した培養液を用いた。維持培養は温度 37°C，CO<sub>2</sub> 濃度 5%，湿度 95% に制御された炭酸ガスインキュベータ内で行い、コンフルエントによる細胞同士の接触阻

害を避けるため 2-3 日に 1 回継代作業を行った。継代作業では、培養液を除去した後にリン酸緩衝食塩水 (Phosphate-buffered saline: PBS) を用いた細胞洗浄処理を実施し、トリプシン溶液 (0.25% Trypsin+0.985 mM ethylenediaminetetraacetic acid-2Na) を用いたトリプシン処理を、温度 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5%、湿度 95%に制御された炭酸ガスインキュベータ内で 2 分 30 秒間静置することで B16F10 細胞を培養皿から剥離し細胞懸濁液を作製した。続いて、遠心分離器を用いて細胞懸濁液を 1000 rpm で 3 分間、室温で遠心分離することで細胞を沈殿させ、上清を吸引した後に培養液に再懸濁することで、新しい細胞懸濁液を作製した。最後に、新しい細胞懸濁液を適切な細胞濃度で、培養皿に再播種することで継代作業を実施した。また、メラノーマは生体内環境において、皮膚の表皮層において水平に円状に進展 (水平進展期) した後に真皮層に向けて垂直に進展 (垂直進展期) する二段階の進展様式を示す[105], [106]。二次元メラノーマモデルにおいては、水平進展期直後の垂直進展期初期を模擬することを目的として、培養皿への播種領域を円形領域に制御した。具体的に、ポリジメチルシロキサン (polydimethylsiloxane: PDMS) 製を用いた円柱状培養モールドを構築し、円柱状培養モールド内に B16F10 細胞を播種および培養することで、播種領域を円形領域に制御した。PDMS は生体適合性を示すシリコンであり、PDMS 上で細胞培養を行う研究にも幅広く利用されている[107]-[109]高分子材料である。PDMS の作製においては、主剤と硬化剤を 10:1 の比率で混合した後に培養皿に流し込み、真空デシケータ内で 30 分間の脱気処理を実施した。続いて、温度 60°Cに保たれている乾燥炉内で 3 時間静置させることで熱硬化を生じさせた後に、培養皿から PDMS を取り除いた。硬化させた PDMS に対して直径 4 mm の生検トレパンを用いて円柱状の穴を開けることで、円柱状培養モールドを作製した。PDMS 製円柱状培養モールドは、作製後に洗浄および乾燥作業、120 度で 20 分間のオートクレーブ滅菌を経てから培養試験に用いた。

二次元メラノーマモデルの作製方法を図 2.4 に示す。直径 60 mm の培養皿上に設置した PDMS 製培養モールド内に B16F10 細胞を  $8.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種した後に、DMEM-high glucose + 10%FBS + 1% Antimycotic-Antibiotic で調整した培養液を用いて 1 日間炭酸ガスインキュベータ内で静置培養した。1 日間の静置培養期間終了後に培養皿から PDMS 製培養モールドおよび培養液を除去し、PBS + 1% Antimycotic-Antibiotic で細胞群を洗浄した。最後に、最終濃度 2.4 mg/ml に調整した I 型コラーゲン中性溶液 2 ml を細胞群の上部から滴下し、20 分間の炭酸ガスインキュベータでの静置によってゲル化させることで二次元メラノーマモデルを構築した。二次元メラノーマモデルの培養には DMEM-high glucose + 10%



FBS + 1% Antimycotic-Antibiotic に調整した培養液を使用し、炭酸ガスインキュベータ内での培養を実施した。

CMT における細胞生存性評価の実験方法を述べる。定常機械的刺激を印加した compression 群と錘を除した control 群を炭酸ガスインキュベータ内で 32 時間培養した後、生細胞染色用蛍光色素 calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM: 励起波長 490 nm, 蛍光波長 515 nm) と死細胞染色用蛍光色素 propidium iodide (PI: 励起波長 535 nm, 蛍光波長 617 nm) を用いた二重蛍光染色し、蛍光顕微鏡 (CKX41, Olympus Inc.) で撮像することで定性的な細胞生存性の評価を実施した。calcein-AM は細胞膜透過性を有する蛍光色素であり、生細胞の細胞質内エステラーゼによる加水分解効果によって緑色の蛍光を発するため、生細胞の蛍光標識として用いられている[110], [111]。また、PI は細胞膜非透過性の蛍光色素であり、細胞核内の DNA の二重らせん構造に結合し赤色の傾向を発する死細胞の蛍光標識として用いられている[112], [113]。calcein-AM/PI 二重蛍光染色処理では具体的に、培養終了時に培養液を除去し、無血清培養液 DMEM-high glucose + 1% Antimycotic-Antibiotic に添加した後に、30 分間炭酸ガスインキュベータ内で静置した。続いて、calcein-AM/PI および無血清培養液を混合し、最終濃度 2  $\mu\text{g/ml}$  に調整することで蛍光染色液を作製した。二次元メラノーマモデルの静置終了後、無血清培地を除去した後に蛍光染色液を添加し、炭酸ガスインキュベータ内で 45 分間静置することで蛍光染色を実施した。

CMT における F アクチン細胞骨格のリモデリング評価の実験方法を述べる。本実験においては、培養 8 時間および培養 32 時間経過時点における compression 群と control 群に対して rhodamine-phalloidin (PHDR1, Cytoskeleton Inc.: 励起波長 535 nm, 蛍光波長 585 nm) を用いた F アクチン蛍光染色および蛍光顕微鏡による撮像を実施することで、F アクチン細胞骨格の形態変化を定性的に評価した。rhodamine-phalloidin はローダミン蛍光色素を標識したファロイジンによって形成され、F アクチン細胞骨格に対して特異的に結合することで F アクチン細胞骨格を可視化する[114], [115]。F アクチンは細胞骨格を主に構成するタンパク質であり、細胞に対する力学的刺激に応答して構造変化 (リモデリング) を示すことが知られている[116]-[118]。rhodamine-phalloidin 蛍光染色処理では具体的に、培養終了時に培養液を除去した後に 4% Paraformaldehyde 溶液を添加し 10 分間室温で静置することで固定処理を行った。固定処理後に Paraformaldehyde 溶液を除去し、0.1% Triton X-100 溶液を添加し 5 分間室温で静置することで膜透過処理を行った。Triton X-100 溶液を除去

後, 0.7% rhodamine-phalloidin 溶液を添加し炭酸ガスインキュベータ内で 30 分間静置することで rhodamine-phalloidin 蛍光染色処理を実施した.

CMT における細胞群挙動の時系列評価の実験方法を述べる. 本実験においては, 培養 0, 8, 32 時間経過時点における compression 群と control 群の細胞占有領域を, CCD カメラ (DP73, Olympus Inc) を搭載した位相差顕微鏡 (CKX41, Olympus Inc.) を用いて経時的に撮像した. 細胞群挙動の時系列変化を定量的に解析するために, 培養時間ごとの細胞占有面積を, 汎用画像解析ソフトウェア (ImageJ, NIH) を用いて測定した. 具体的に, 細胞播種領域の輪郭を手動抽出し, 抽出した輪郭の面積を細胞占有面積として測定した. 続いて, 各時刻における細胞占有面積を  $a_t = \{a_t \in \mathbb{Z} | t \geq 0, t \in \mathbb{Z}\}$  と定義し, 各時刻における浸潤面積  $I_t$  を次式によって定義した.

$$I_t = a_t - a_0 \quad (2.3)$$

定量データに対する統計学的仮説検定では, 有意水準 5% と設定し片側検定による Welch's t-test を実施した.

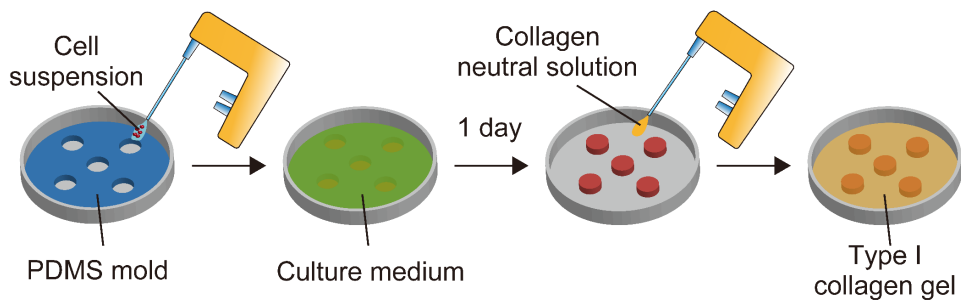


Fig. 2.4 Fabrication of the 2D melanoma model. B16F10 cells were seeded in a cylindrical area in the PDMS mold on a cell culture dish. After one day of culture, the mold was removed from the dish and covered with neutralized type I collagen gel.

### 2.2.2.3 結果および考察

CMTにおける細胞生存性の評価を目的とした、培養 32 時間時点における calcein-AM/PI 二重蛍光染色像を図 2.5a に示す。緑色蛍光像が生細胞、赤色蛍光像が死細胞を示している。結果、培養 32 時間経過時点において compression 群および control 群いずれの試料群においても高い細胞生存性を示すことが認められた。CMT の培養環境が、細胞が生存可能な培養環境であることが示された。

CMT における F アクチン細胞骨格のリモデリング評価を目的とした、培養 8 時間および 32 時間経過時点における rhodamine-phalloidin 蛍光染色像を図 2.5b に示す。赤色蛍光像が F アクチンを示し、細胞播種領域の周縁部を撮像している。培養 8 時間経過時点で compression 群においては F アクチン細胞骨格の顕著な伸長が認められた一方で、control 群においては F アクチン細胞骨格の伸長は認められなかった。培養 32 時間経過時点においては、両試料群で F アクチン細胞骨格の顕著な伸長が認められた。これらの結果から、CMT を用いた機械的圧縮刺激は細胞骨格の伸長を促進させ、生化学反応としての細胞骨格のリモデリングが生じることが示された。ここで、Tse らは機械的圧縮刺激 ( $7.7 \times 10^2$  Pa) の印加が乳がん細胞の細胞骨格の伸長を促進させたことを示している[41]。本実験における機械的圧縮刺激の印加 ( $7.7 \times 10^2$  Pa) による細胞骨格の伸長は Tse らの知見と合致する結果である。これらの結果から、CMT の培養環境が機械的圧縮刺激によって細胞内に生化学反応を誘発できる培養環境であることが示された。

CMT における細胞群挙動の時系列評価を目的とした、培養 0, 8, 32 時間経過時点における細胞播種領域の位相差顕微鏡像を図 2.5c に、培養 0 時間時点における細胞播種面積を基準とした時の培養 8 時間および 32 時間経過時点における浸潤面積の測定結果を図 2.5d に示す。結果、培養 8 時間経過時点において compression 群の浸潤面積が control 群に比べて有意に増加した一方で、培養 32 時間経過時点での両試料群における浸潤面積に有意差は認められなかった。これらの結果は機械的圧縮変形刺激が B16F10 細胞群の運動能を一過的に促進させることを示している。ここで、Tse らは培養 16 時間経過時点におけるエンドポイント観察によって、機械的圧縮変形刺激が細胞骨格の伸長を介して乳がん細胞の運動能を促進させたことを報告している[41]。Tse らの先行研究を考慮すると、本研究における細胞骨格のリモデリング結果および浸潤面積の結果は、8 時間の機械的圧縮刺激は細胞骨格の伸長を介して B16F10 細胞群の運動能を一過的に促進させたことを示唆している。

機械的圧縮刺激下における一過的なメラノーマ細胞群挙動を明らかにしたことは、CMTの培養環境が時系列情報を取得可能な培養環境として機能していることを示している。

以上、これらの細胞培養試験の結果より、CMTが時系列情報を取得可能な機械的圧縮刺激印加培養装置として機能していることが示された。

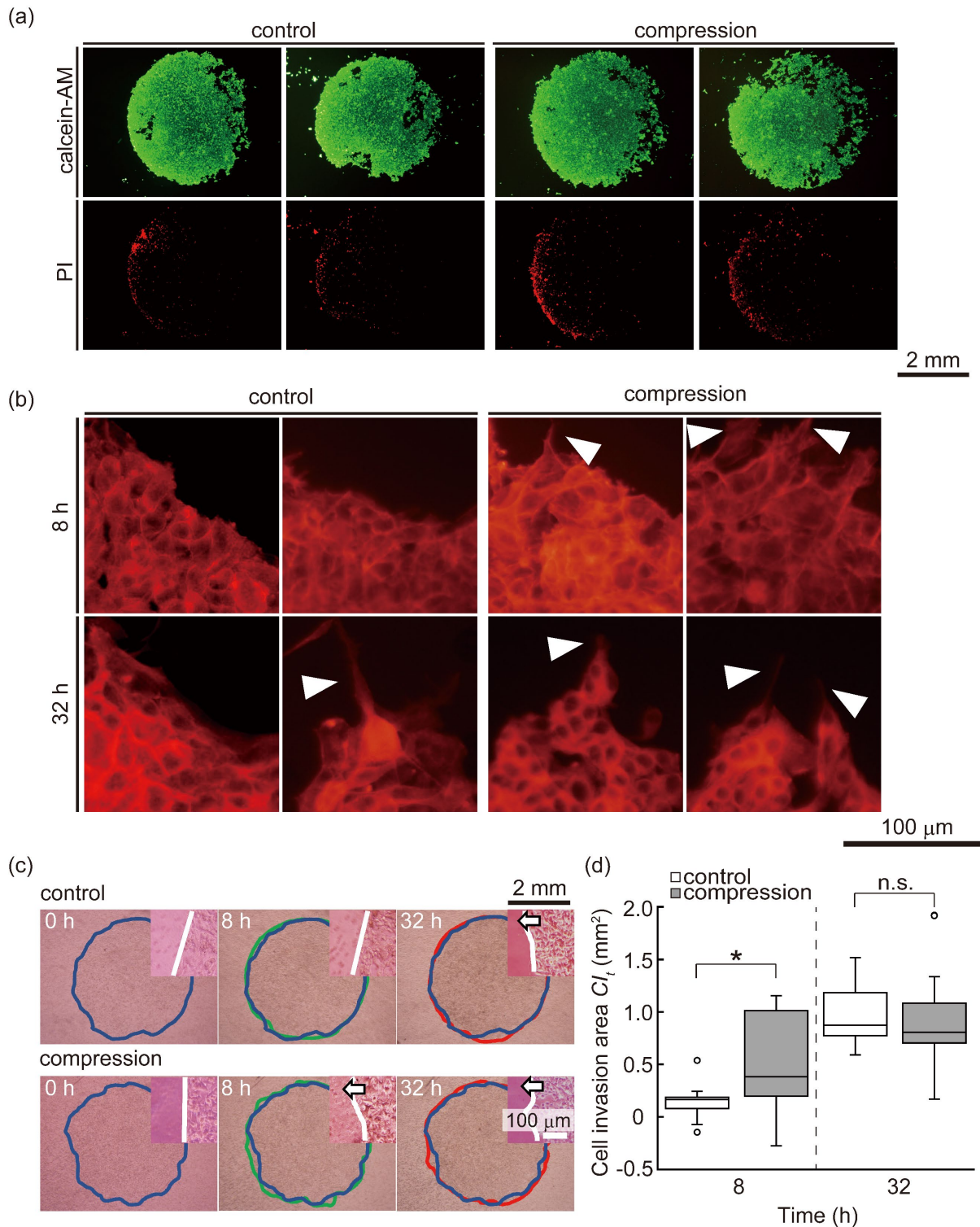


Fig.2.5 Cell culture test in CMT. (a) Fluorescent microscopic images of B16F10 cells in the melanoma model stained by calcein-AM/PI (propidium iodide) at 32 h of culture. Live cells exposed to calcein-AM showed green fluorescence, while dead cells allowed PI to enter the cell membrane and label the cell nucleus with red fluorescence. (b) Fluorescent microscopic images of B16F10 cells in the melanoma model stained by rhodamine-phalloidin at each time point in the outer edges

of the cell-adhered area. White arrowheads indicate an elongation of F-actin filaments. (c) Microscopic images of B16F10 cells in control and compression groups. The migration of cells subjected to compressive stress was compared to control groups at each time point. The blue lines indicate the cell-adhered area at 0 h of culture, the green lines indicate one at 8 h of culture, and the red lines indicate one at 32 h of culture. The upper right images show the boundary region between the cell-adhered area and the collagen gel, with the white lines marking the boundary. The white arrows indicate the invasion of B16F10 cells into the collagen gel. (d) The cell invasion area at 8 h and 32 h of culture. Sample size for each group was n=13. Experimental data were examined for significant differences using Welch's t-tests. \* indicates a significant difference compared to control group ( $p < 0.05$ ).

# 第3章 光散乱性ハイドロゲル内における細胞形状変化を計測可能な高速ラベルフリー四次元細胞計算顕微鏡法

## 3.1 可逆的次元変換法

### 3.1.1 双方向符号化理論

本節において、情報損失のない可逆的圧縮変換法 (Dimension Transformer: DiT) の構築に向けて、双方向符号化理論 (Bidirectional coding theory: BCT) を確立する。DiT は非負整数で構成される高次元データを、BCT を用いて一次元下の低次元データに情報損失なく可逆的に変換する。たとえば、三次元ボクセルデータを二次元データに次元変換する場合、ボクセルデータを一次元データ列の集合と捉え、BCT を用いてすべての一次元データ列を一意のスカラーに変換することで 2 次元圧縮マップに次元圧縮する (図 3.1a)。BCT は本研究において新たに確立した情報符号理論であり、非負整数で構成される一次元データ列  $D = \{a_{n-1}, a_{n-2}, \dots, a_0 | a_i (0 \leq i \leq n-1) \in \mathbb{N}_0 \wedge n \in \mathbb{N}\}$  と零次元スカラー  $S \in \mathbb{R}$  の可逆的な変換を可能にする。

BCT の基本的枠組みについて述べる。BCT のアイデアは、フーリエ展開に代表される線形基底展開  $f(x) = \sum_m \beta_m h_m(x)$  に基づく。線形基底展開とは、対象空間に属する元を基底関数の線形結合として表現する方法である。一次元データ列の要素  $a_i$  を係数  $\beta_m = a_i$ 、要素の空間的位置  $i$  を基底スカラー  $r$  の冪指数に据えた基底  $h_m(x) = r^i$  を考え、線形結合  $\sum_i a_i r^i$  によって一意のスカラーを得る。

BCT の具体的なアルゴリズムについて述べる。BCT は、一次元データ列  $D$  から零次元スカラー  $S$  へ変換する符号化方向において

1. 瞬時符号化
2. 基数変換
3. Min-max 正規化

の三つのステップによって構築される。零次元スカラー  $S$  から一次元データ列  $D$  へ変換する復号化方向においては、これら三つのステップの逆順を辿る。

瞬時符号化に関して、複数の情報源記号  $s_i (i = 1, 2, \dots, n)$  で構成される情報源記号列  $S = \{s_1, s_2, \dots, s_n\}$  と、情報源記号語を符号化した符号語  $c_i (i = 1, 2, \dots, n)$  で構成される符号語列  $C =$

$\{c_1, c_2, \dots, c_n\}$ を考える．符号とは情報源記号列 $S$ を符号語列 $C$ に変換する写像 $\phi : S \rightarrow C$ と捉えることができ，復号とは符号語列 $C$ から情報源記号列 $S$ に変換する逆写像 $\phi^{-1} : C \rightarrow S$ と捉えることができる．瞬時符号化とは瞬時性を満たす符号語列 $C' = \{c'_1, c'_2, \dots, c'_n\}$ に変換する写像 $\phi' : S \rightarrow C'$ である．瞬時符号 $c'_i$ は前方方向から符号語を読み取った際に直ちに一意の情報源記号 $s_i$ に復号可能な符号として定義される．瞬時符号は，瞬時性の定義によって情報源記号列 $S$ と符号語列 $C'$ が全単射関係にある一意復号可能性を同時に満たし，情報源記号列 $S$ と符号語列 $C'$ は1対1の関係で対応している．瞬時性の必要十分条件は，符号語列に含まれる任意の符号語 $c'_i$ が他の符号語 $c'_j (i \neq j)$ の接頭語にならない語頭条件を満たすことである．一般的に，語頭条件の判定には符号語列の集合を枝木のように表した符号木を用いる（図 3.1b）．符号木とは頂点（節点）と辺（枝）によって構成され，出発点（根）を始点として終点までの向きが存在する有向グラフである．符号語を形成する符号記号は枝に，符号語は節点に表す．始点から終点までの向きにおいて，上位および下位に存在する節点をそれぞれ親および子と呼び，節点において子の無い節点を葉と呼ぶ．ここで，任意の符号語 $A$ が他の符号語 $B$ の親に相当する節点に存在する場合， $A$ は $B$ の接頭語であるという．すなわち，語頭条件とは符号語が全て葉に位置する場合と同値である．たとえば，情報源記号列 $S = \{a, b, c, d\}$ を符号語列 $C = \{0, 10, 110, 111\}$ に変換する符号化 $\phi_1 : \{a \rightarrow 0, b \rightarrow 10, c \rightarrow 110, d \rightarrow 111\}$ は，符号語が全て葉に位置する語頭条件を満たすため，瞬時符号化であることが理解できる（図 3.1b）．一方で，符号化 $\phi_2 : \{a \rightarrow 0, b \rightarrow 01, c \rightarrow 010, d \rightarrow 11\}$ は，節点に位置する符号語が存在するため語頭条件を満たすことができず，非瞬時符号化であることが理解できる（図 3.1c）．符号化 $\phi_1$ および $\phi_2$ による符号語はいずれも符号長の異なる非等長符号であるが，符号長の等しい等長符号に変換する符号化 $\phi_3 : \{a \rightarrow 00, b \rightarrow 01, c \rightarrow 10, d \rightarrow 11\}$ は常に語頭条件を満たす瞬時符号となる（図 3.1d）．そこで，本研究における瞬時符号化ステップでは，データ列 $D$ を構成する各要素 $a_i$ に対して前方ゼロパディングすることで符号語列を等長符号に符号化し，情報源記号列であるデータ列 $D$ に対して全単射関係にある符号語列 $D_c = \{b_{n-1}, b_{n-2}, \dots, b_0\}$ に瞬時符号化した．本研究における瞬時符号化を $\psi : D \rightarrow D_c$ とする時， $\psi(a_i) = b_i (i = 1, 2, \dots, n)$ に対応する．ゼロパディングする桁数 $N$ は

$$N = \lceil \log_{10}(r - 1) \rceil \quad (3.1)$$

$$r = \{2^b | b \in \mathbb{N}\} \quad (3.2)$$

と定義した．ここで，関数 $\lceil x \rceil$ は $\lceil x \rceil = \min\{k \in \mathbb{Z} | x \leq k\}$ で定義される天井関数であり，自然数 $b$ はデータ列 $D$ の要素 $a_i$ を格納するメモリに割り振られるビット数である．たとえば，要素



が 8 ビットのメモリ上に格納されるデータ列  $D = \{0, 3, 14, 121\}$  は桁数  $N = \lceil \log_{10}(2^8 - 1) \rceil = 3$  で前方ゼロパディングされる符号化  $\psi : \{0 \rightarrow 000, 3 \rightarrow 003, 14 \rightarrow 014, 121 \rightarrow 121\}$  によって、符号語列  $D_c = \{003, 014, 121\}$  を得る。

続いて、瞬時符号化によって得られた符号語列  $D_c$  を水平方向に結合した数字列  $D_n = b_{n-1}b_{n-2} \dots b_0$  に変換し、数字列  $D_n$  を基数  $r$  によって表現された  $r$  進数  $D_n(r)$  と捉える。基数変換法を用いて、 $r$  進数  $D_n(r)$  を 10 進数  $D_n(10)$  に変換することで 10 進数スカラーを得る (式 3.3)。

$$D_n(10) = \sum_{i=0}^{n-1} b_i \cdot r^i \quad (3.3)$$

$D_n(10)$  への基数変換は、 $r^k$  を基底関数、 $b_i$  を係数として線形結合する線形基底展開と捉えることができるため、全単射性が担保される。ただし、データ列  $D$  におけるデータ長の情報に関わるいくつかのゼロパディング情報は、基数変換の際に消失する恐れがある。たとえば、8 ビットのデータ列  $D = \{0, 121, 14\}$  の場合、 $D_n(r) = 000121014$  であり  $D_n(10) = 0 \cdot 256^2 + 121 \cdot 256^1 + 14 \cdot 256^0 = 30990$  であるが、BCT における復号化方向において  $D_n(10) = 30990$  を  $r$  進数  $D_n(r)'$  に基数変換した際  $D_n(r)' = 121014$  となり、データ列  $D$  の前方情報が消失してしまう。データ長が任意の有限長であるデータ列に対する基数変換ステップの一意性を担保するためには、データ長の情報をスカラーに埋め込むことが必要不可欠である。

そこで、データ列  $D$  のデータ長  $n$  を用いて次式で定義されるスカラー  $d_n$  によって、基数変換された 10 進数スカラー  $D_n(10)$  の Min-max 正規化を行い、データ長の情報をスカラーに埋め込む。スカラー  $d_n$  はデータ列  $D$  に対して、 $D_n(10)$  が取りうる最大値と同値である。

$$d_n = \sum_{i=0}^{n-1} (r-1) \cdot r^i = r^n - 1 \quad (3.4)$$

式 3.4 で定義されたスカラー  $d_n$  を用いて、BCT における Min-max 正規化は次式で定義される。Min-max 正規化処理は線形関数であり全単射性が担保されている。

$$S = \frac{1}{d_n} \sum_{i=0}^{n-1} a_i \cdot r^i = \frac{1}{r^n - 1} \sum_{i=0}^{n-1} a_i \cdot r^i \quad (3.5)$$

以上のように、全単射性が担保される 3 つのステップを経ることでデータ列  $D$  を一意のスカラー  $S$  に埋め込むことができる。図 3.1e にデータ列  $D$  が基数  $r = 2$  および基数  $r = 256$  の場合の計算例を示す。基数  $r = 2$  とは 1 bit データ列、基数  $r = 256$  とは 8 bit データ列に対応する。

BCT は全てのステップが線形演算であるため理論的には情報損失を生じさせないが、計算機を用いた BCT の実装においては、計算機上の浮動小数点演算を起因とする丸め誤差やフロー現象（オーバーフローおよびアンダーフロー）によって情報損失が生じる場合がある。たとえば、10 進数スカラーは単精度浮動小数点演算において 6～9 桁の情報、倍精度浮動小数点演算では 15～17 桁の情報しか保持することができず、それ以上の桁数の情報はメモリサイズの不足によって消失する。そこで、本研究においては任意精度演算によって BCT を実装する。任意精度演算では、データ列  $D$  を瞬時符号化した符号語列  $D_c$  の総語長に相当するメモリサイズを確保することで、上述の情報損失の発生を回避する（図 3.1f）。具体的に、すべての演算過程において IEEE754-2008 の decimal floating-point format[119]を用いて演算を行い、仮数部のメモリサイズ（有効桁数） $P$  を次式のように定義した。

$$P = \begin{cases} n \cdot \lceil \log_{10}(r-1) \rceil & \text{if } r \geq 3 \\ n & \text{if } r = 2 \end{cases} \quad (3.6)$$

ここで、 $n$  はデータ列  $D$  のデータ長である。

式 3.1～式 3.6 に示されるように、BCT の実装において情報損失を失わずに可逆的に次元変換するための必須情報は、データ列  $D$  の基数  $r$  とデータ長  $n$  である。両者の情報は次元変換するデータのメタ情報であるため、次元変換前後のデータを格納するメモリとは異なる外部メモリに格納および共有した。

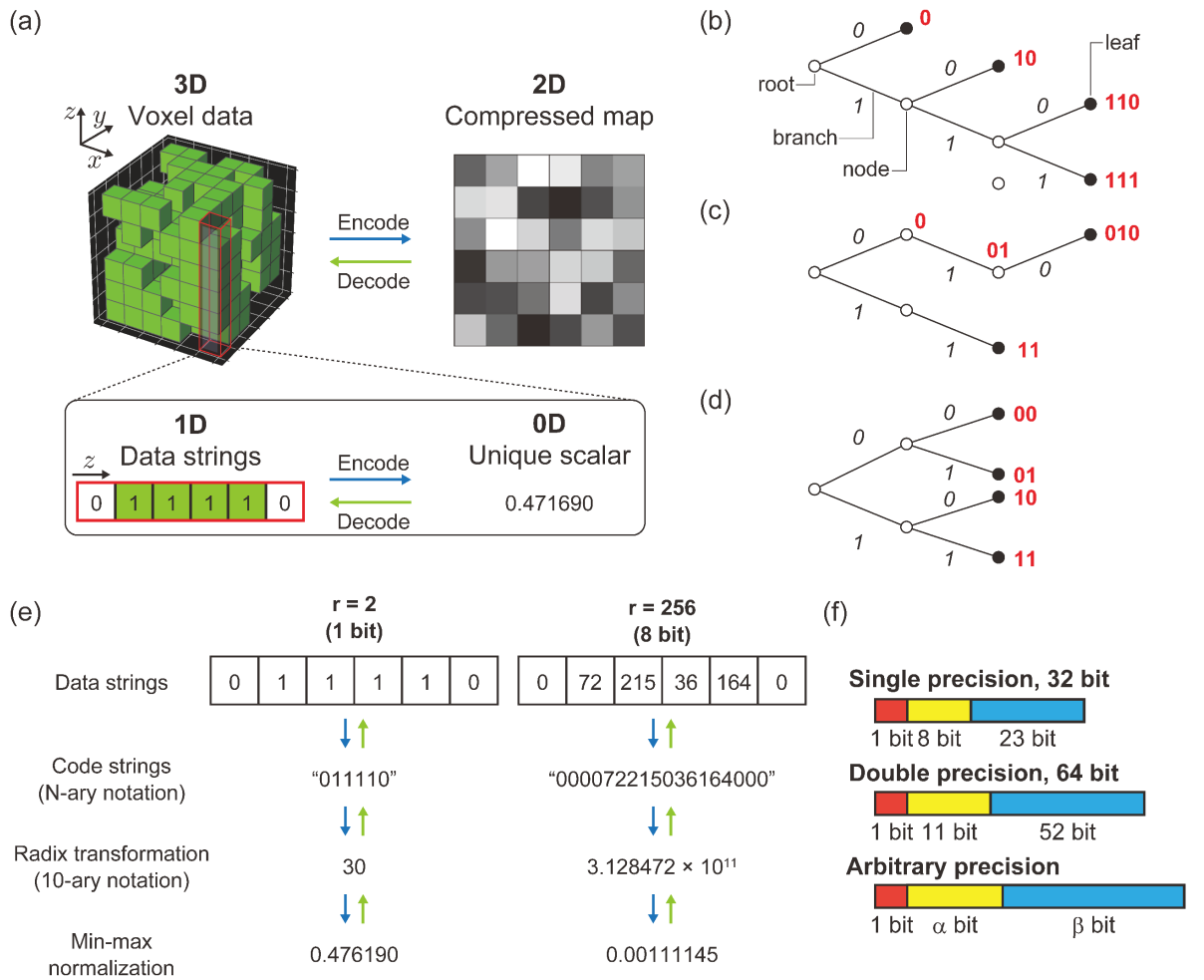


Fig. 3.1 Conceptual diagram of Dimension Transformer with Bidirectional Coding Theory. (a) Schematic of the Dimension Transformer (DiT) in the scenario in which 3D voxel data was converted into the 2D compressed map. We first extracted 1D data strings along one axis of the voxel data and then converted them to a 0D scalar using Bidirectional Coding Theory (BCT). By repeating this transformation on the elements of the compressed surface, dimensional compression was achieved. (b) Code tree. The edge is branch, the white point is node, and the black point is leaf. The starting point that is the parent of all nodes is called root. The italicized symbol indicates the code symbol assigned to the branch, and the red bold text indicates the code word. (c) Example of non-instantaneous code. (d) Example of equal-length code. Equal-length code always satisfy instantaneity (e) Schematic of the BCT algorithm in data with 1-bit and 8-bit elements. We considered the code strings as a scalar in N-ary notation, and then convert it to a scalar in 10-ary notation using radix transformation. (f) Schematic of the state of memory storage in the single, double, and arbitrary-precision arithmetic. For the arbitrary-precision arithmetic, the memory size could be adjusted arbitrarily.

## 3.1.2 性能評価

### 3.1.2.1 概要

本節において、BCT の性能を評価する。BCT が情報損失のない可逆的な次元変換法として機能するために必要最低限要求される性能は、

1. 符号化および復号化の精度が 100%であること
2. 現実的な実現可能性を満たすこと

の二点である。そこで、本節においては数値実験を用いてそれぞれを、

1. 符号化および復号化精度の評価
2. 計算量、処理時間およびデータ圧縮率の評価

によって性能評価する。

また、情報損失のない可逆的な次元変換法 DiT の実証に向けて、DiT を用いた符号化及び復号化精度も評価する。

### 3.1.2.2 実験方法

任意精度演算を用いた BCT の精度を数値実験により評価した。任意のデータ長を持つ一次元データ列に対する BCT の次元変換精度がすべて 100% の時、情報損失のない可逆的な次元変換法の確立を実証できる。具体的に、データ長  $n$  で乱数生成された一次元データ列  $X_i (i = 1, 2, \dots, n)$  を入力、任意精度演算による BCT を用いた符号化および復号化ステップによって得たデータ列  $Y_i (i = 1, 2, \dots, n)$  を出力とした時に、任意のデータ長における入力と出力データの一致または不一致をバイナリに評価することで、精度評価を評価した。精度は次式のように定義した。

$$Accuracy = \begin{cases} 1 & \text{if } X_i = Y_i \\ 0 & \text{if } X_i \neq Y_i \end{cases} \quad (3.7)$$

乱数生成においては疑似乱数生成器 Mersenne Twister[120]を用いて、一様分布の非負整数乱数列を生成した。対照実験として、単精度および倍精度演算による数値実験を実施した。対照実験に関して、データ列およびスカラー間の符号化および復号化ステップにおける BCT の実装は常に任意精度演算で行い、符号化されたスカラーに対する単精度、倍精度および任意精度浮動小数点形式でのメモリ格納によって、任意精度演算による BCT の性能を評価した。また、入力データをデータ列に格納するメモリは 1 bit または 8 bit を想定し、それぞれのビット数における性能評価を実施した。

任意精度演算による BCT の実行可能性の評価に向けて、BCT の計算量、処理時間およびデータ圧縮率を評価した。BCT の計算量および処理時間が現実的に実行不可能なほど膨大な計算量または長時間に及ぶ場合、BCT の実行可能性は低い。また、データ圧縮率の下界を評価することで、情報量保存の観点から BCT の妥当性を評価した。計算量の評価には、計算量の上界である最悪時間計算量をランダウ記法によって評価した。処理時間の評価には、Intel(R) Core(TM) i5-8250U CPU @ 1.60GHz 上での実処理時間を計測した。データ圧縮率の評価には、IEEE754-2008 の decimal floating-point format の定義に基づきデータ圧縮率の下界を理論的に導出した。また、入力データをデータ列に格納するメモリは BCT の精度評価実験と同様に、1 bit または 8 bit における性能評価を実施した。

DiT の性能評価に向けて、BCT の精度評価実験と同様に式 3.7 で定義される精度を用いて DiT の精度を評価した。DiT を用いて次元変換するオブジェクトの形状は、自己遮蔽および相互遮蔽の発生する形状に設定した。具体的に、自己遮蔽形状には球オブジェクト (sphere object)、楕円体オブジェクト (ellipsoid object)、トーラスオブジェクト (torus

object), 相互遮蔽形状には三次元位置重なりオブジェクト(3D overlapping object), 融合オブジェクト(fused object), 複数位置重なりオブジェクト(complex overlapping object)の計 6 種類を設定した. また, 入力データを格納するメモリは BCT の精度評価実験と同様に 1 bit または 8 bit における性能評価を実施した.

### 3.1.2.3 結果および考察

BCT の精度評価の結果を図 3.2 に示す．図 3.2a はデータ列の要素が 1 bit，図 3.2b はデータ列の要素が 8 bit でメモリに格納される場合と対応する．結果，一般的な単精度および倍精度浮動小数点演算を用いた BCT では情報が失われるのに対して，任意精度演算を用いた BCT では情報を失うことなく一次元データ列を一意のスカラーに変換できることが示された．また，単精度および倍精度浮動小数点演算を用いた BCT によって情報損失なく復号できる最大のデータ長  $L_{max}$  は 1 bit データの場合 23 および 52 であることが示された．本結果は，IEEE754 浮動小数点形式の演算における仮数部のメモリサイズとそれぞれ一致している．IEEE 754 浮動小数点形式では，仮数部のメモリサイズは実数の有効桁数に等しい．そのため，データ長が有効桁数以下であれば，情報を失わずに圧縮できるという適切な結果となった．8 bit データの場合，最大データ長  $L_{max}$  はそれぞれ 2 および 6 であることが示された．これは，浮動小数点形式の仮数部のメモリサイズ  $M$  を用いて  $L_{max} = \lfloor \log_2 2^M \rfloor = \lfloor \frac{M}{8} \rfloor$  で計算できる．ここで， $\lfloor x \rfloor$  は  $\lfloor x \rfloor = \max\{k \in \mathbb{Z} | k \leq x\}$  と定義される床関数である．最大データ長  $L_{max}$  と仮数部のメモリサイズ  $M$  の関係性を一般化すると，最大データ長  $L_{max}$  は次式で算出することができる．

$$L_{max} = \lfloor \log_2 2^M \rfloor = \lfloor \frac{M}{b} \rfloor \quad (3.8)$$

ここで， $b$  はデータ列の要素を格納するメモリのビット数である．式 3.8 は，データのビット数に合わせて仮数部のメモリサイズを増加させることで最大データ長を増加させることが可能であることを示唆しており，任意精度演算による BCT を用いた情報損失のない可逆的な次元変換の成功を裏付けている．

BCT の実現可能性の評価に向けた計算量と処理時間の評価に関して，BCT の最悪時間計算量は  $O(n^2)$  であり，データ長が数千オーダであれば数秒以内に処理が完了することが示された（図 3.3）．これらの結果から，BCT は実現可能な計算量および処理時間であることが示された．BCT を構成するアルゴリズムの中で最も計算量が多い演算部は基数変換処理部である．本研究では基数変換処理を単純な乗算および除算で実装したため最悪時間計算量が  $O(n^2)$  となったが，Karatsuba アルゴリズム[121]と Schönhage-Strassen アルゴリズム[122]を用いることで，理論的にはそれぞれ  $O(n^{1.58})$ ， $O(n \cdot \log n \cdot \log \log n)$  まで計算量を改善することができる．

BCT の実現可能性の評価に向けたデータ圧縮率の下界に関して、理論式の誘導を以下に示す。データ列の要素を格納するメモリのビット数を  $x \in \mathbb{N}$  (bits), データ長を  $y \in \mathbb{N}$  とした時、データ列の総メモリサイズ  $T_D$  は

$$T_D = xy \text{ (bits)} \quad (3.9)$$

と算出される。また、BCT によって次元変換されたスカラーの総メモリサイズ  $T_S$  は、IEEE745-2008 decimal floating-point format の定義および式 3.6 による有効桁数  $P$  の定義により、天井関数  $\lceil x \rceil$  を用いて

$$T_S = \begin{cases} 32 \left\lceil \frac{1}{9} (y \lceil \log_{10} 2^x - 1 \rceil + 2) \right\rceil \text{ (bits)} & \text{if } x \geq 2 \\ 32 \left\lceil \frac{1}{9} (y + 2) \right\rceil \text{ (bits)} & \text{if } x = 1 \end{cases} \quad (3.10)$$

と算出される。式 3.9 および式 3.10 を用いてデータ圧縮率  $f(x, y) := \frac{T_S}{T_D}$  は次式のように算出される。

$$f(x, y) = \begin{cases} \frac{1}{xy} \cdot 32 \left\lceil \frac{1}{9} (y \lceil \log_{10} 2^x - 1 \rceil + 2) \right\rceil & \text{if } x \geq 2 \\ \frac{1}{xy} \cdot 32 \left\lceil \frac{1}{9} (y + 2) \right\rceil & \text{if } x = 1 \end{cases} \quad (3.11)$$

本節における理論的解析の目的は、データ圧縮率の下界  $\alpha := \inf (f(x, y))$  s.t.  $x, y \in \mathbb{N}$  を算出することである。  $x = 1$  の時、データ圧縮率  $f(x, y)$  は式 3.11 より

$$f(x, y) = \frac{1}{y} \cdot 32 \left\lceil \frac{1}{9} (y + 2) \right\rceil \quad (3.12)$$

である。ここで、  $p := \left\lceil \frac{1}{9} (y + 2) \right\rceil \in \mathbb{N}$  とした時、  $y$  の定義域は

$$p - 1 < \frac{1}{9} (y + 2) \leq p \Leftrightarrow 9p - 11 < y \leq 9p - 2 \quad (3.13)$$

である。式 3.13 で示される  $y$  の定義域において、データ圧縮率  $f(x, y)$  の最小値は  $y = 9p - 2$  の時であり、

$$\min(f) = \frac{32p}{9p - 2} = \frac{32}{9 - \frac{2}{p}} \quad (3.14)$$

である。ゆえに、  $x = 1$  の時データ圧縮率  $f(x, y)$  の下界は

$$\alpha(x = 1) = \lim_{p \rightarrow \infty} \min(f) = \frac{32}{9} \approx 3.56 \quad (3.15)$$

である。続いて  $x \geq 2$  の時、データ圧縮率  $f(x, y)$  は式 3.11 より



$$f(x, y) = \frac{1}{xy} \cdot 32 \left\lceil \frac{1}{9} (y \lceil \log_{10} 2^x - 1 \rceil + 2) \right\rceil \quad (3.16)$$

である．ここで， $m := \lceil \log_{10} 2^x - 1 \rceil \in \mathbb{N}$ とした時， $x$ の定義域は

$$m - 1 < \log_{10} 2^x - 1 \leq m \Leftrightarrow \log_2(10^{m-1} + 1) < x \leq \log_2(10^m + 1) \quad (3.17)$$

である．また， $n := \lceil \frac{1}{9}(ym + 2) \rceil \in \mathbb{N}$ とした時， $y$ の定義域は

$$n - 1 < \frac{1}{9}(ym + 2) \leq n \Leftrightarrow \frac{9(n-1) - 2}{m} < y \leq \frac{9n - 2}{m} \quad (3.18)$$

である．式 3.17 および式 3.18 に示される $x$ および $y$ の定義域において，データ圧縮率の最小値は $x = \log_2(10^m + 1)$ かつ $y = \frac{9n-2}{m}$ の時であり，

$$\begin{aligned} \min(f) &= \frac{32n}{\frac{9n-2}{m} \cdot \log_2(10^m + 1)} = \frac{1}{\frac{1}{m} \log_2 10^m \left(1 + \frac{1}{10^m}\right)} \cdot \frac{32}{9 - \frac{2}{n}} \\ &\Leftrightarrow \min(f) = \frac{1}{\log_2 10 + \frac{1}{m} \log_2 \left(1 + \frac{1}{10^m}\right)} \cdot \frac{32}{9 - \frac{2}{n}} \end{aligned} \quad (3.19)$$

である．ゆえに， $x \geq 2$ の時データ圧縮率 $f(x, y)$ の下界は

$$\alpha(x \geq 2) = \lim_{m, n \rightarrow \infty} \min(f) = \frac{32}{9 \cdot \log_2 10} \approx 1.07 \quad (3.20)$$

である．したがって，式 3.15 および式 3.20 により，データ圧縮率 $f(x, y)$ の下界は

$$\alpha(x, y \in \mathbb{N}) = \frac{32}{9 \cdot \log_2 10} \approx 1.07 \quad (3.21)$$

である．以上より，データ圧縮率の下界は約 1.07 であることが理論的に示され，BCT を用いた次元変換では次元圧縮後にメモリサイズが増加することが示された．これは，次元変換による情報損失の回避がメモリサイズの増加につながることを示唆しており，情報量保存の観点から BCT が妥当なアルゴリズムであることが示された．メモリサイズの増加は，データ列から圧縮されたスカラーの格納形式に起因する．本研究の任意精度演算では，スカラーは IEEE754-2008 の decimal floating-point format で格納されている．式 3.11 に示すように，IEEE754-2008 形式を用いた任意精度演算では有効桁数の天井関数を用いて算出した総メモリサイズに応じて記憶メモリを割り当てるため，切り上げ操作による余分なメモリ割り当てがメモリサイズの肥大化を引き起こしていると推測される．これらの BCT の計算量，処理時間，データ圧縮率の評価によって，BCT の実現可能性が担保されることが示された．

DiT を用いた三次元オブジェクトの次元変換の結果を図 3.4～図 3.6 に示す。すべてのオブジェクト形状において DiT の精度は 100%であり、情報損失のない可逆的な次元変換法 DiT の実証に成功した。図 3.4 に示すように DiT は自己遮蔽や相互遮蔽を生じさせるオブジェクト形状であっても、情報損失なく三次元ボクセルデータを二次元圧縮マップに変換することが示された。また、DiT は ellipsoid や torus などの複雑な形状にも適用可能であり（図 3.5）、fused objects や complex overlapping object などの三次元的に複雑に重なり合ったオブジェクトも次元変換できることが示された（図 3.6）。

以上、従来の次元圧縮アルゴリズムで問題となっていた自己遮蔽や相互遮蔽などの情報損失を回避できる、可逆的な次元圧縮法 DiT の開発に成功した。主成分分析などの従来の次元圧縮アルゴリズムでは、次元圧縮する対象データをデータ空間の固有空間に投影することでデータの次元を下げる[123]。固有空間と対象データの間での投影誤差は、情報損失を生じさせる。これに対して、本研究で DiT アルゴリズムはメタデータ空間（データ列のインデックス番号空間）の基底空間上にデータを写像し、基底変換と正規化処理によってデータの次元を変換する。したがって、投影処理を行わない次元圧縮アルゴリズムを構築したことが、情報損失が発生しない DiT の確立に成功した主な理由であると推察される。情報損失のない可逆的な次元変換法の構築に成功したことで、高次元データを取り扱う機械学習分野や情報源符号化および暗号化技術を取り扱う情報工学分野において様々な波及効果が期待される。

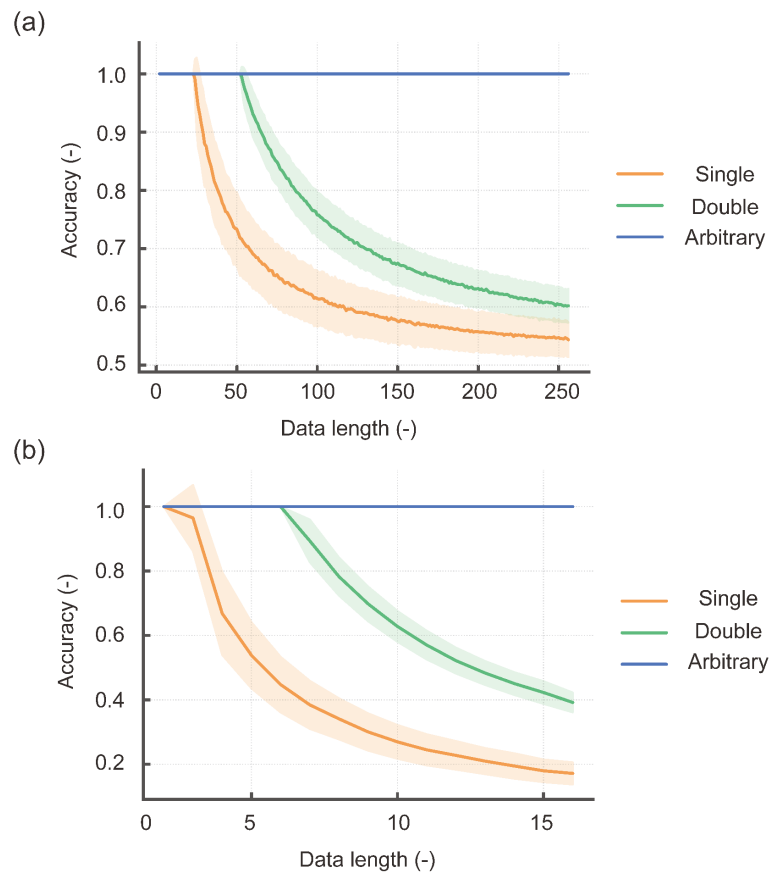


Fig. 3.2 Accuracy of the decoded data strings using BCT ( $n=1000$ , mean  $\pm$  S.D.). The blue line indicates the accuracy with arbitrary-precision arithmetic, orange with single precision, green with double precision (a) 1-bit elements (b) 8-bit elements.

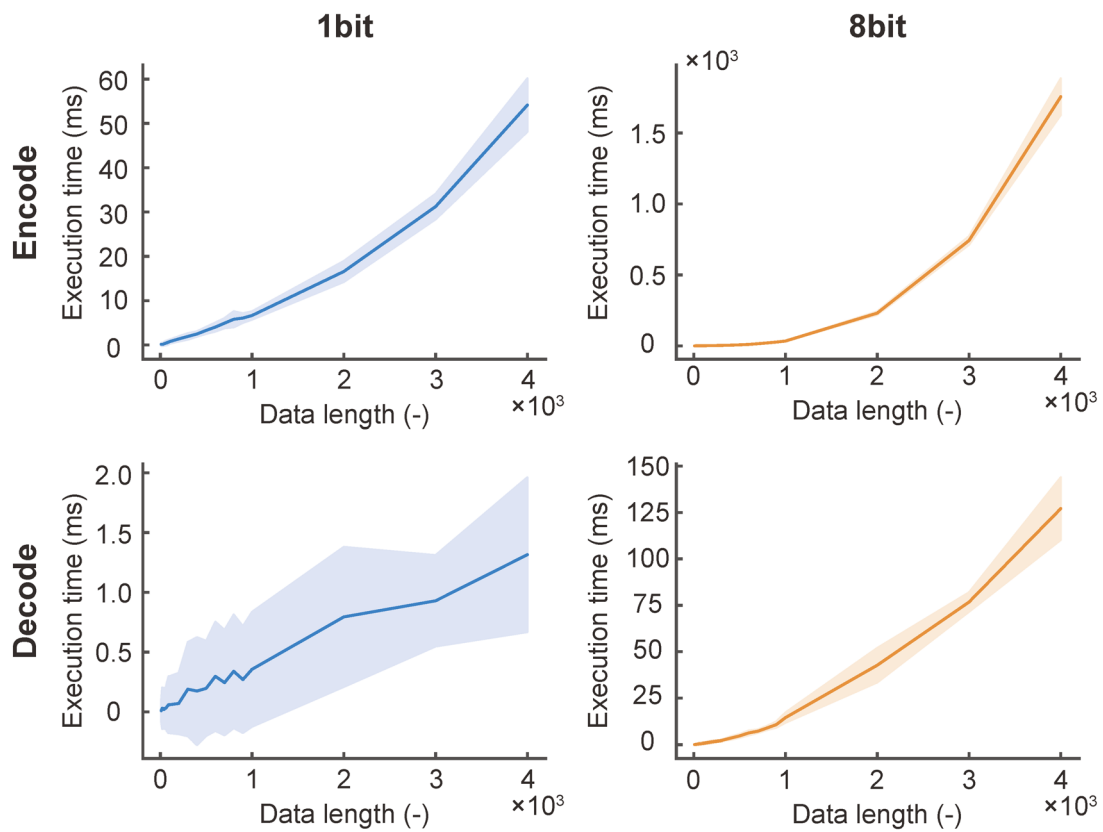


Fig. 3.3 Execution time in encoding and decoding with a 1D random number array of integers generated from a discrete uniform distribution. The left column indicates the results for data with 1-bit elements, and the right column for 8-bit elements ( $n=1000$ , mean  $\pm$  S.D.).

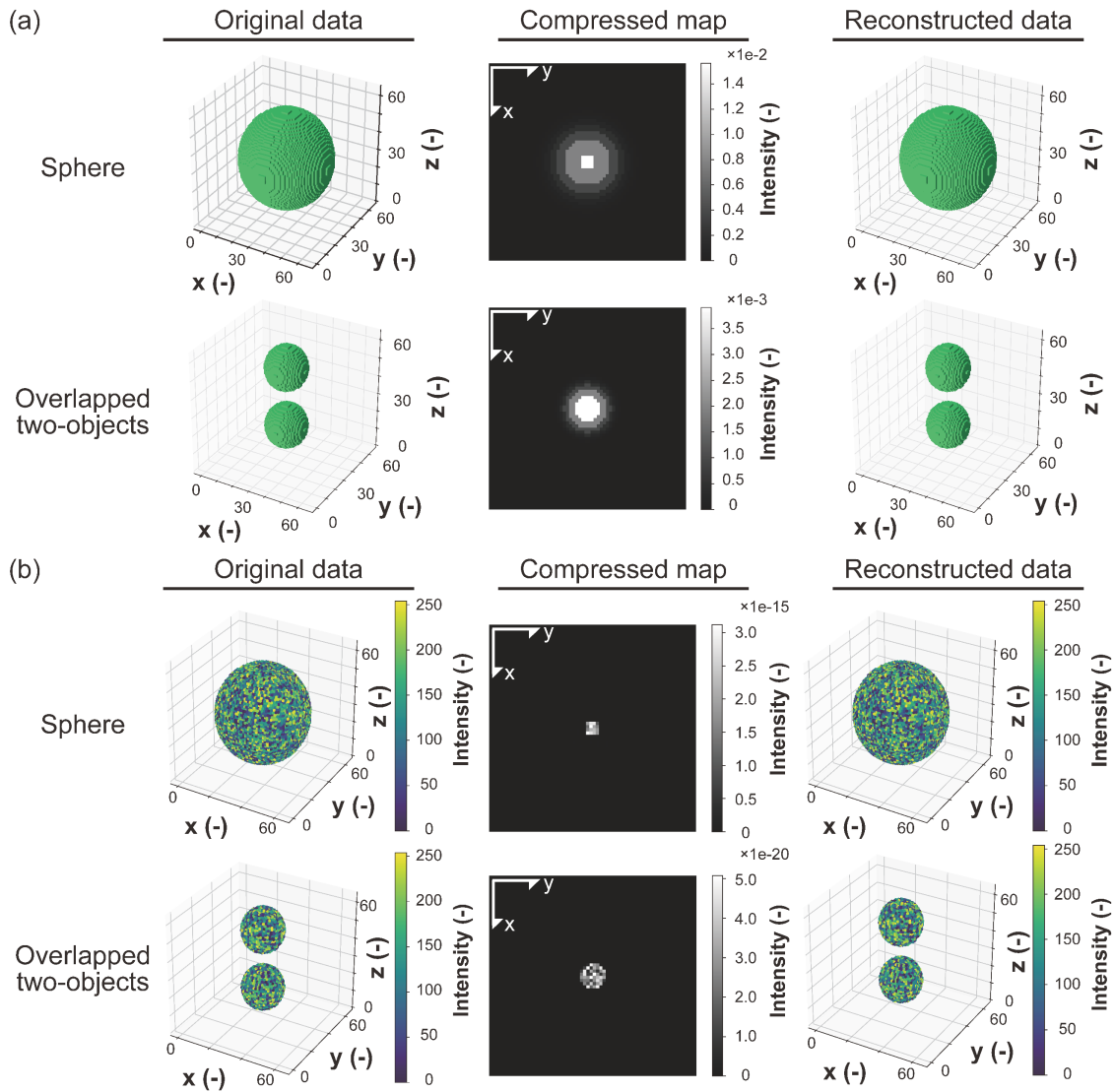


Fig. 3.4 Reversible dimensional transformation without information loss using DiT. The data values contained in the voxels of the original and reconstructed data were all consistent. The top row indicates sphere objects(self-shielding), and the bottom indicates 3D overlapped objects(mutual shielding). The left column indicates the original data, the center indicates the compressed map, and the right indicates the reconstructed data. (a) data with 1-bit elements. (b) data with 8-bit elements. Yellow voxels indicate high values, green voxels indicate middle values and blue voxels indicate low values.

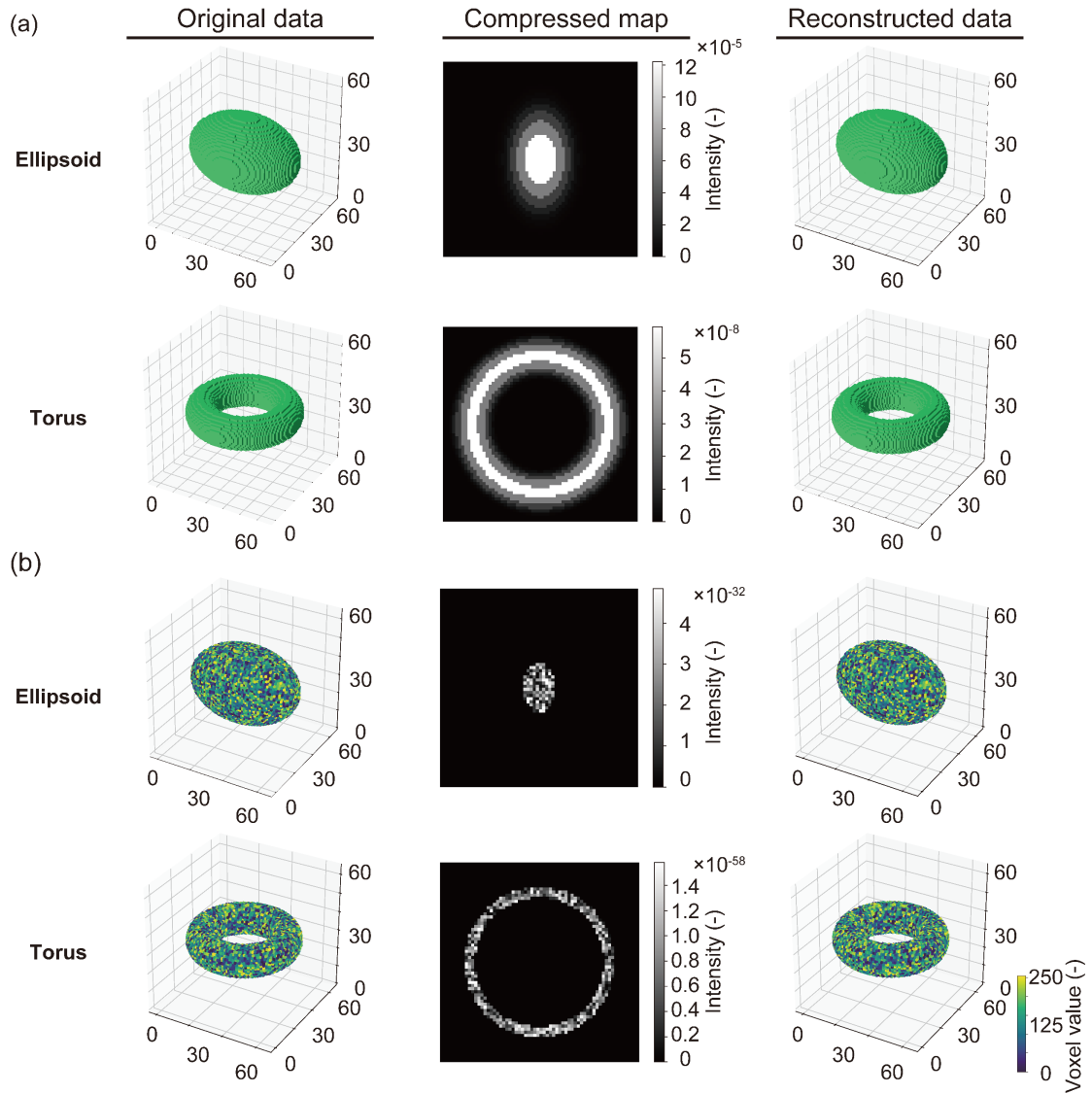


Fig. 3.5 Reconstruction of the self-shielding 3D object with DiT. The data values contained in the voxels of the original and reconstructed data were all consistent. The top row indicates the ellipsoid and the bottom indicates torus. The left column indicates the original data, the center indicates the compressed map, and the right indicates the reconstructed data. (a) data with 1-bit elements. (b) data with 8-bit elements. Yellow voxels indicate high values, green voxels indicate middle values and blue voxels indicate low values.

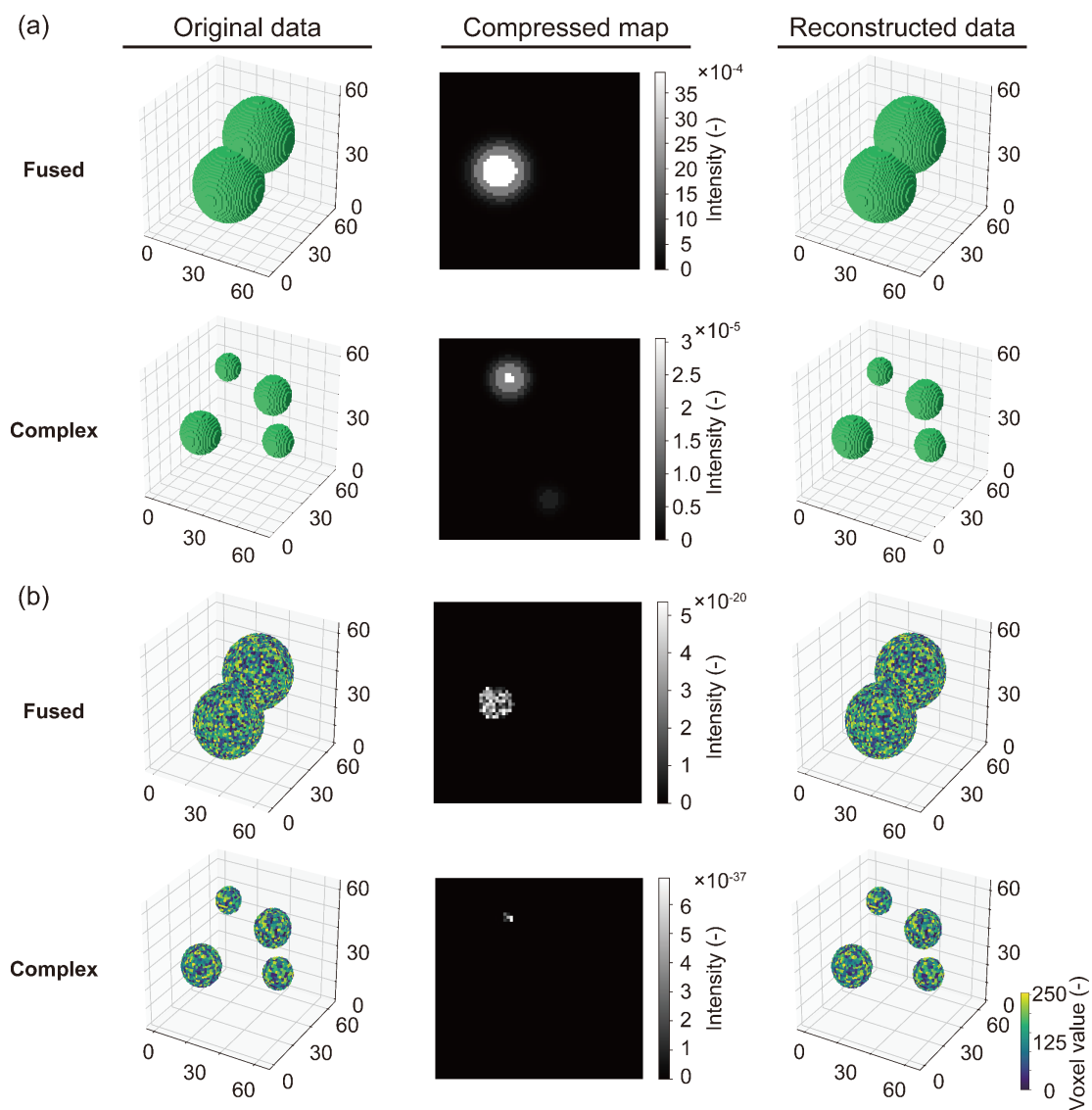


Fig. 3.6 Reconstruction of mutual shielding 3D object with DiT. The data values contained in the voxels of the original and reconstructed data were all consistent. The top row indicates fused objects, and the bottom indicates three-dimensional complexed overlapping objects. The left column indicates the original data, the center indicates the compressed map, and the right indicates the reconstructed data. (a) data with 1-bit elements. (b) data with 8-bit elements. Yellow voxels indicate high values, green voxels indicate middle values and blue voxels indicate low values.

## 3.2 シングルショット三次元細胞計算顕微鏡法

### 3.2.1 概要

本節において、光散乱性ハイドロゲル内の三次元細胞形状の時間的変化を計測可能なラベルフリー四次元細胞顕微鏡法の確立に向けて、シングルショット三次元細胞計算顕微鏡法 (single-shot three-dimensional cellular computational microscopy: STCM) を確立する。本研究においては、近年注目される深層学習モデルを非線形関数近似器として捉え、1枚の二次元位相差顕微鏡像から光散乱性ハイドロゲル内の三次元細胞形状を計測する、深層学習ベースのSTCMを構築する。ここで、深層学習においては一般的に、出力次元数が入力次元数に比べて極めて大きいようなタスクは精度向上が難しいタスクとして知られている [78]。具体的に、二次元データから三次元データを推測することは困難であり、深層学習ベースのシングルショットイメージング確立におけるボトルネックとなっている。そこで、本研究においては、DiTを用いた次元変換によって従来のタスクを入力次元と出力次元が同等な画像対画像変換タスクに再定義することで出力データの推定精度を向上させ、1枚の二次元顕微鏡画像から光散乱性ハイドロゲル内の三次元細胞形状を高い精度で測定可能な新たなイメージング手法の構築を試みる。

STCM構築のワークフローについて述べる。1枚の二次元顕微鏡画像を入力、DiTの符号化ステップを用いて三次元細胞ボクセルデータを次元変換した二次元圧縮マップを出力とするデータセットを構築する。構築したデータセットを用いて入出力の画像対画像変換を表現する非線形関数を深層学習により近似させる。学習済みモデルを用いて、1枚の二次元顕微鏡画像から二次元圧縮マップを推定し、DiTの復号化ステップを用いて二次元圧縮マップから三次元細胞形状を再構築する。



### 3.2.2 試料および実験方法

本節において、STCM の構築を目指して、データセット構築、ネットワーク構造および評価方法について述べる。STCM は、3.1 節で構築した DiT および画像対画像タスクにおいて汎用な条件付き敵対生成ネットワーク (conditional generative adversarial network: cGAN) である pix2pix モデル[79]で主に構築される。また、STCM は一般的な深層学習のワークフローと同様に学習過程と推論過程の 2 つのステップで構成され、推論過程において学習モデルの評価を実施する。

#### 3.2.2.1 データセット構築

三次元細胞形状の正解データを構築するための試料として、光散乱性ハイドロゲル内に分散培養した三次元細胞培養モデルを作製した。三次元細胞培養モデルでは、データセット内のデータの多様性を確保するため、マウス横紋筋由来細胞株 (C2C12 細胞, 理研セルバンク), ヒト乳がん由来細胞株 (MCF7 細胞, JCRB セルバンク) およびヒト大腸癌由来細胞株 (DLD1 細胞, JCRB セルバンク) の 3 種類の細胞株を使用して、I 型コラーゲンゲルに分散培養させた。C2C12 細胞はマウス由来の細胞株であり、MCF7 細胞および DLD1 細胞はヒト由来のそれぞれ異なる組織から樹立された細胞株である。また、C2C12 細胞と MCF7 細胞は間葉系細胞の特徴を示し、DLD1 細胞は上皮系細胞の特徴を示す。このように複数の生物種や異なる組織から樹立された細胞種を選択した三次元細胞培養モデルをデータセットの試料とすることで、本研究で構築する STCM の汎用性を確保した。すべての細胞種は DMEM-high glucose + 10%FBS + 1% Antimycotic-Antibiotic 培養液を用いて、2.2.2.2 節に記載した手順で炭酸ガスインキュベータ内での維持培養および継代作業の後に試料として用いた。続いて、2.2.1.2 節に記載した手順で作製した最終濃度 2.4 mg/ml の I 型コラーゲン中性溶液に、細胞を  $6.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>3</sup> の濃度で懸濁することで細胞含有 I 型コラーゲン中性溶液を作製した。炭酸ガスインキュベータで 20 分間静置させることでゲル化させ、三次元細胞培養モデルを作製した。三次元細胞培養モデルは C2C12 細胞, MCF7 細胞, DLD1 細胞ごとに作製し、すべての培養モデルにおいて DMEM-high glucose + 10%FBS + 1% Antimycotic-Antibiotic 培養液を用いて炭酸ガスインキュベータ内で 1 日間維持培養した。

三次元細胞形状のボクセルデータの取得を目的として、1 日間の維持培養終了時に calcein-AM を用いて細胞を蛍光染色した。蛍光染色手順は 2.2.2.2 節に記載した手順と同様である。2.2.2.2 節で述べたように calcein-AM は細胞透過性のある色素であり、本実験にお

いては細胞質の形状を標識する蛍光物質として用いた。三次元細胞形状のボクセルデータの取得に向けて、10倍対物レンズ（UPLFLN10X2PH, Olympus Inc.）を搭載した共焦点レーザー走査型顕微鏡（FV3000 および FV31S-SW v2.3.2.169 software, Olympus Inc.）を用いた共焦点顕微鏡像の撮像を、z軸方向に1  $\mu\text{m}$  ずつ走査することで連続スライス画像を取得した。励起レーザーの波長は488 nm、蛍光フィルタの波長は520 nmとした。また、共焦点顕微鏡像の取得と同じ位置において、位相差顕微鏡像も同時に取得した。共焦点顕微鏡像は三次元細胞形状の蛍光顕微鏡像、位相差顕微鏡像は二次元細胞顕微鏡像として用いた。撮像されたデータはxy平面が1024  $\times$  1024 pixel, xy平面空間分解能が1.243  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , z軸方向が288 pixelであった。

データセット構築の手順を述べる。共焦点顕微鏡像の連続スライス画像をz軸方向に結合し、三次元蛍光顕微鏡像を取得した（図3.7a）。ここで、対物レンズと試料の間の大きな屈折率差によって、共焦点顕微鏡による撮像した三次元細胞形状はz軸方向に延伸していた。そこで、直径10  $\mu\text{m}$  のポリスチレン性蛍光マイクロビーズ（Fluoresbrite Plain Microspheres (2.5% Solids-Latex) 10.0  $\mu\text{m}$  YG, Polysciences Inc.）を用いたキャリブレーション試験を実施し、MATLABのImage Processing Toolbox（Version 11.2）を用いてマイクロビーズ共焦点顕微鏡像のz軸方向の長さを測定した。結果、共焦点顕微鏡像のz軸方向の長さは40.0  $\pm$  0.0244  $\mu\text{m}$  (n=668, mean  $\pm$  S.E)であり、z軸方向に4倍程度延伸していることを明らかにした（図3.7b）。この結果から、三次元蛍光顕微鏡像から抽出した生の三次元細胞データ（32  $\times$  32  $\times$  128 pixels）を、局所平均化アルゴリズムを用いてz軸方向に4倍圧縮し、前処理を実施することで細胞形状全体を捉えた二値化ボクセルデータ（32  $\times$  32  $\times$  32）を得た（図3.8a）。前処理では、Minimumフィルタ（kernel size: 5  $\times$  5  $\times$  5）、Medianフィルタ（kernel size: 5  $\times$  5  $\times$  5）、Gaussianフィルタ（ $\sigma$ : 1.0）、Meanアルゴリズムによる二値化およびOpening morphology演算（kernel size: 5  $\times$  5  $\times$  5）の順で実施した。前処理したボクセルデータを、DiTの符号化ステップにおいて二次元圧縮マップ（32  $\times$  32 pixels）に変換した（図3.8b）。圧縮マップのデータ範囲はDiTおよびBCTの定義により[0,1]の範囲である。ここで、ボクセルデータから圧縮マップへの次元変換の過程では任意精度演算を実施し、圧縮マップは倍精度浮動小数点形式のデータとしてメモリに格納した。これは、現時点で開発されている深層学習用フレームワークソフトウェアが任意精度演算データに対応しておらず、半精度、単精度および倍精度浮動小数点形式のデータにのみ対応しているためである。3.1節で示したBCTの精度評価によって、倍精度浮動小数点形式でのメモリ上の格

納では、データ長 32 の 1 bit データ列を情報損失なくスカラーに変換できることは既に理論的および実験的に示されている。本実験におけるボクセルデータの次元変換においても、情報損失を生じずに精度 100% で次元変換できることが認められた。続いて、蛍光顕微鏡像取得時に同時に撮像された位相差顕微鏡スタック画像の中から、生の三次元細胞データと同様の中心座標で撮像された位相差顕微鏡像 (32 × 32 pixels) を抽出した (図 3.8c)。位相差顕微鏡像は、Minimum フィルタ (kernel size: 5 × 5)、Median フィルタ (kernel size: 5 × 5)、Gaussian フィルタ ( $\sigma$ : 1.0) の順で前処理を実施した。前処理した後に、Min-max 正規化を実施することで位相差顕微鏡像のデータ範囲を [0, 1] の範囲に変換し、圧縮マップと同様のデータ範囲とした。続いて、同じ空間座標で得られた位相差顕微鏡画像と圧縮マップのペアをデータセットとした (図 3.8d)。データセット全体を、学習過程に用いる学習データセットおよび推論過程に用いるテストデータセットに分割した。学習データセットは訓練データセットおよび検証データセットに分割し、訓練データセットで学習されたモデルの精度をエポック毎に検証データセットで評価した。訓練データセット、検証データセットおよびテストデータセットは約 8:1:1 の比率のサンプルサイズとなるように調整し、最終的にそれぞれ 264 件、34 件および 34 件とした。また、検証データセットで最高精度を得たモデルを用いて、テストデータセットにおける推論を実施し性能を評価した。評価する精度には、3.2.2.3 節で述べる Intersection over Union (IoU) を使用した。

### 3.2.2.2 ネットワーク構造

STCM のネットワーク構造について述べる．STCM のネットワークは pix2pix モデルを基に構築された．pix2pix モデルは生成器と識別器の 2 つの学習モデルを内包するネットワーク構造であり，それぞれの学習モデルを交互に学習させる．識別器は正解画像と生成器によって生成された画像の真偽を正確に判断するように学習させる（図 3.8e）．生成器は識別器を欺くように，正解画像に近い画像を生成するように学習させる．本研究においては，生成器は二次元位相差顕微鏡画像から二次元圧縮マップへの写像を学習することで，二次元データから三次元データを直接推定するという計算困難さを回避している．推定された二次元圧縮マップは DiT の復号化ステップを用いて三次元細胞形状ボクセルデータに変換されて出力される．識別器のネットワークは PatchGAN[79]，生成器のネットワークは U-net[124]によって構成される深層ニューラルネットワーク構造である（図 3.8f）．本研究における，STCM の損失関数  $\mathcal{L}$  は次式のように定義した．

$$\mathcal{L} = \arg \min_G \max_D \mathcal{L}_{cGAN}(G, D) + \lambda \mathcal{L}_{L1}(G) \quad (3.22)$$

ここで， $G$  は入力画像  $x$  から出力画像  $y$  への写像を学習する生成器を， $D$  は生成画像に偽ラベルを付け，正解画像に真ラベルを付けるように学習する識別器を示している．また， $\mathcal{L}_{cGAN}(G, D)$  は cGAN の損失関数を， $\mathcal{L}_{L1}(G)$  は正則化制約条件としての L1 ノルム損失関数を示す． $\lambda$  は正則化係数を示し，制約条件としての正則化の強さとして作用する．本研究においては，pix2pix モデルにおいて推奨される正則化係数  $\lambda = 1000$  での学習を実施した． $\mathcal{L}_{cGAN}(G, D)$  および  $\mathcal{L}_{L1}(G)$  はそれぞれ次式のように定義した．

$$\mathcal{L}_{cGAN}(G, D) = \mathbb{E}_{x,y}[\log D(x, y)] + \mathbb{E}_x[\log(1 - D(x, G(x)))] \quad (3.23)$$

$$\mathcal{L}_{L1}(G) = \mathbb{E}_{x,y}[\|y - G(x)\|_1] \quad (3.24)$$

ここで， $\mathbb{E}$  は期待値を示している．生成器は損失関数  $\mathcal{L}$  を減少させる方向，識別器は損失関数  $\mathcal{L}$  を増加させる方向にネットワークの重みを最適化させ，学習を進める．また，効率的な学習に向けて，データセット内の圧縮マップに対してバイアス加算演算をオンライン上で実施した．圧縮マップの輝度値を  $G_{i,j}$  ( $i, j = 1, 2, \dots, 32$ ) とした時，バイアス加算演算後の輝度値を  $G_{i,j}^*$  とした時，演算は次式のように定義される．

$$G_{i,j}^* = \begin{cases} G_{i,j} + bias & \text{if } G_{i,j} \neq 0 \\ G_{i,j} & \text{if } G_{i,j} = 0 \end{cases} \quad (3.25)$$

ここで、*bias*は輝度値に加算する小数であり、本実験においては0.5に設定した。検証時においてはバイアス項を減算した。テストデータにおける推論時には、推定された三次元形状に対して後処理によるノイズ除去を実施した。後処理では、Closing morphology 演算 (kernel size:  $19 \times 19 \times 19$ )、Opening morphology 演算 (kernel size:  $1 \times 1 \times 1$ ) および Median フィルタ (kernel size:  $3 \times 3 \times 3$ ) 処理を実施した。後処理における kernel size は、検証データセットを用いたランダムサーチによって決定した。

STCM ネットワークの実装方法について述べる。本研究では、Intel(R) Xeon(R) CPU E5-1620 v3 @ 3.50GHz および GeForce TITAN X GPU を用いて STCM ネットワークの学習を実施した。STCM ネットワークは PyTorch フレームワーク[125]によって実装され、倍精度演算による学習を実施した。損失関数の最適化には Adam アルゴリズム[126]を使用し、エポック数 250 およびバッチサイズ 2 での学習を実施した。学習率は、125 エポック後に直線的に減衰するように設定した。バッチサイズとは、ミニバッチ法において使用する訓練データセットの小分割データ件数である。ミニバッチ法とは、訓練データセットを一括で学習するのではなく、訓練データセットからランダムに抽出された小分割データセットを用いて学習し、それを反復することで訓練データセット全体を網羅的に学習する学習法であり、学習モデルの精度が向上することが知られている。また、STCM の性能を向上させるために、データ拡張(data augmentation: DA)を実施した。本研究においては、三次元細胞ボクセルデータおよび位相差顕微鏡像を xyz 軸の正負方向に 5 pixel ずつ移動させてクロップしたデータを訓練データに追加するオフライン DA を実施した。ただし、データリークによる不当な精度向上を避けるために、訓練データセットにのみオフライン DA を実施した。オフライン DA 実施後のデータセットの構成は、訓練データセット、検証データセットおよびテストデータセットでそれぞれ 2188 件、34 件および 34 件であった。また、1/2 の確率でデータを左右反転、上下反転および回転させるオンライン DA も実施した。回転角度は 90 度、180 度、270 度とした。

また、STCM ネットワークの性能を比較検討するために、1 枚の二次元画像データから三次元オブジェクトを推定するタスクにおいて現時点で世界最高精度 (state of the art: SOTA) のモデルも実装し、同一のデータセットを用いた性能を評価した。具体的に、SOTA モデルとして Pix2Vox モデル[75]および Pix2Vox++モデル[76]を用いた。これらのモデルではエンコーダ・デコーダモデルである 3D U-net ネットワークが採用されている。両者の先行研究においては、学習が速いが精度が低い F タイプと、学習が遅いが精度が高い A タイ

アの 2 種類のアーキテクチャが構築されている。本実験においては Pix2Vox-A および Pix2Vox++-A アーキテクチャを用いて学習を実施した。また、STCM ネットワークの学習と同一条件での学習を実施するために、エポック数 250 およびバッチサイズ 2 での学習を実施した。その他のハイパーパラメータは、先行研究[75], [76]において推奨されていた値に設定した。

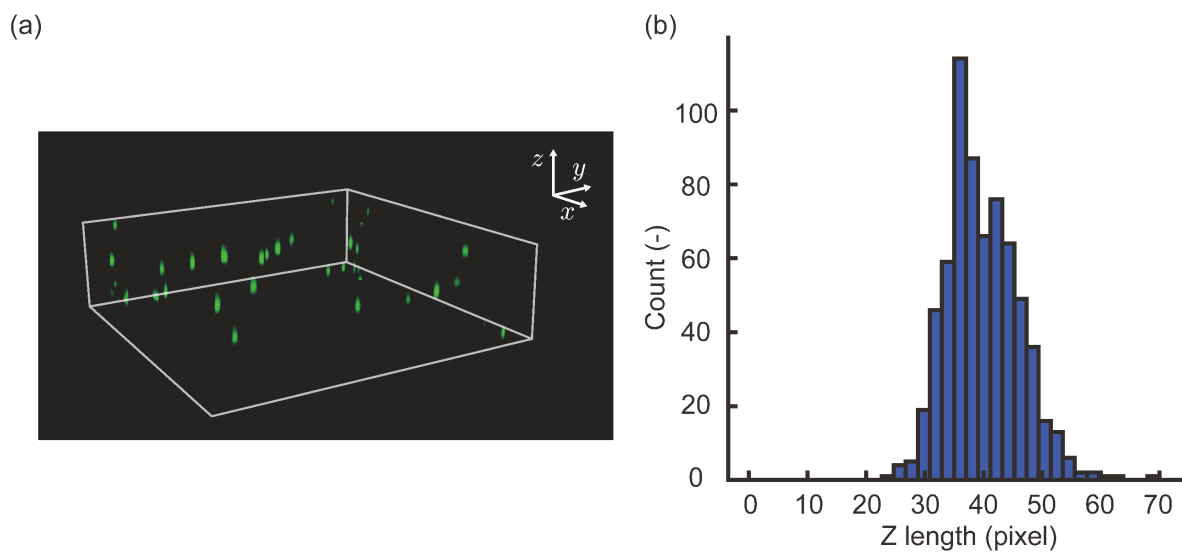


Fig. 3.7 Raw data and calibration test. (a) Representative raw fluorescence staining image of cells captured using confocal laser microscopy. Cell shape in the raw data was elongated in the z-axis direction. (b) Results of the calibration test using fluorescence microbeads with a diameter of 10  $\mu\text{m}$ . Length of the beads in the z-axis direction was  $40.0 \pm 0.0244 \mu\text{m}$  ( $n=668$ , mean  $\pm$  S.E). Considering that the confocal microscopy images were scanned in the z-axis direction with a spatial resolution of 1  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ , it was indicated that the reconstructed images were elongated about 4 times.

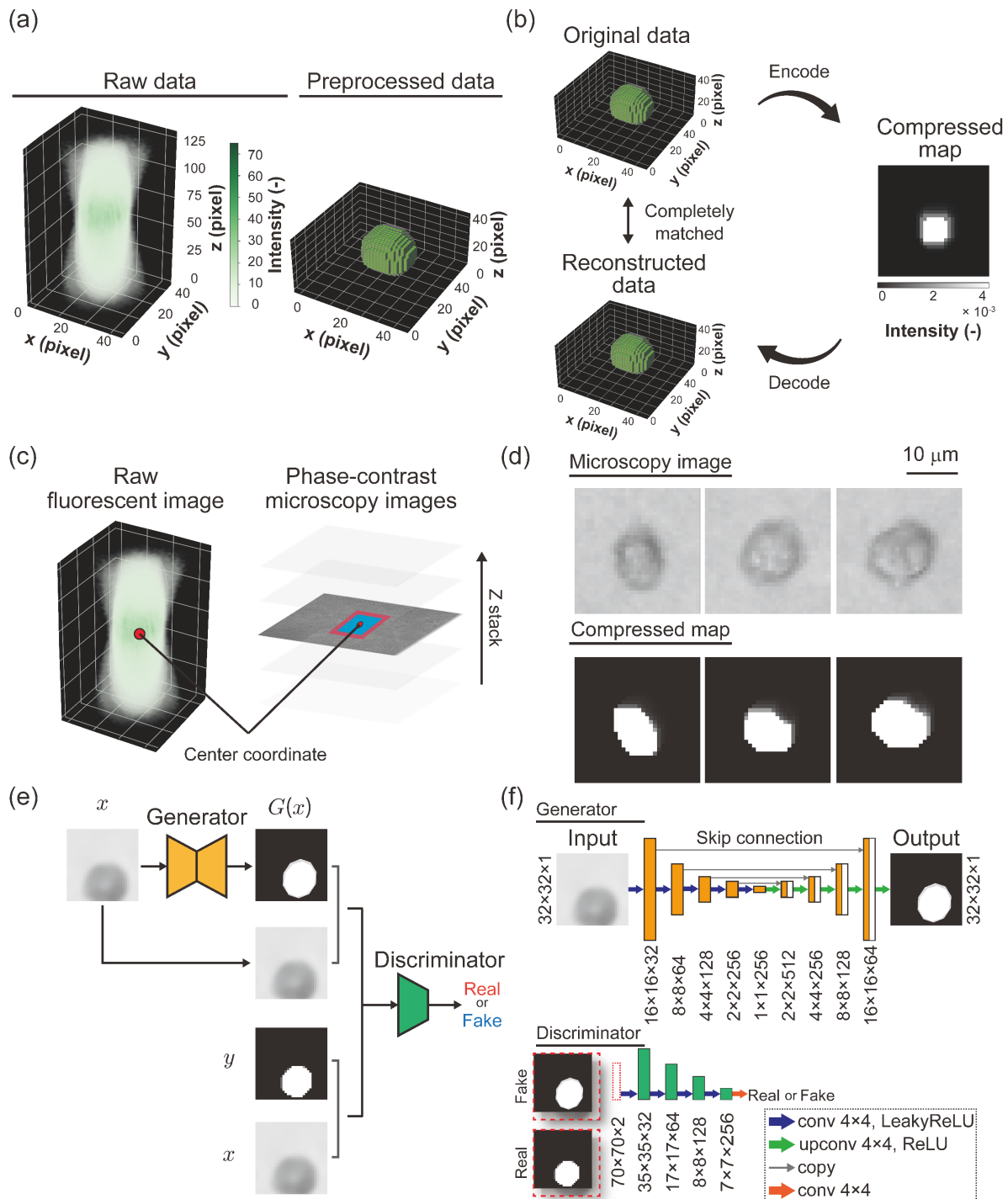


Fig. 3.8 Dataset construction and single-shot three-dimensional cellular computational microscopy (STCM) architecture. (a) Representative raw data and preprocessed data. (b) Representative data on the dimensional transformation of three-dimensional fluorescence microscope data by DiT. The top-left image indicates the original fluorescence data, and the middle-right image indicates the compressed data. The bottom-left image indicates the reconstructed data from the compressed data.



The reconstructed data was consistent with the original data, and the information in the original data was completely embedded in the compressed map. (c) Extraction position of phase-contrast microscopy image from the raw florescent image. Red dots indicate the center coordinates of the three-dimensional cell shape, which is the basis for the extraction. Blue area indicates the extraction area of the phase-contrast microscopy image. (d) Representative paired dataset which consisted of the phase-contrast microscopy image and compressed map. The data size was  $32^2$  resolution. (e) Overview of the STCM architecture.  $x$  and  $y$  denote the phase-contrast microscopy image and the ground truth data of the compressed map.  $G(x)$  denote the generated compressed map from the input  $x$ . The discriminator determines the authenticity of input-output data pairs, and the generator learns the input-to-output mappings. (f) Network of the generator and discriminator. The generator and discriminator consisted of U-Net and PatchGAN, respectively. Conv and upconv denote the convolution layer and up-convolution layer, respectively.

### 3.2.2.3 評価方法

STCM の性能評価として、モデルの推測精度および計算複雑性を定量的に評価した。計算複雑性は空間複雑性と時間複雑性で構築され、空間複雑性は総パラメタ数およびメモリ使用量、時間複雑性は学習時間で評価される。空間複雑性が低いほどモデルは省メモリ性に優れ、時間複雑性が低いほどモデルは高速な学習を可能とする。本研究においては、空間複雑性および時間複雑性が低い計算複雑性を示すモデルを軽量なモデルと定義する。

本研究における推測精度の評価では、生成された 2D データと再構築された 3D データの品質を正解データと比較して定量的に評価した。

2D データの定量的品質評価では、大域的指標と局所的指標を用いて画像類似性を評価した。具体的に、大域的指標として一致相関係数 (CCC) を、局所的指標としてピーク S/N 比 (PSNR) および平均構造類似度指標 (mSSIM) を採用した。CCC は画素値や画素値分布の違いを厳密に反映することで大域的な類似性を示す。PSNR は同一位置の画素値の差を反映することで局所的な画素値の類似性を、mSSIM は注目する画素値分布の類似性を反映することで局所的な構造の類似性を示す。これらの指標は次式のように定義した。

$$CCC = \frac{2\rho\sigma_x\sigma_y}{\sigma_x^2 + \sigma_y^2 + (\mu_x^2 - \mu_y^2)} \quad (3.26)$$

$$\rho = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x + \sigma_y} \quad (3.27)$$

$$PSNR = 10 \cdot \log_{10} \left( \frac{MAX^2}{MSE} \right) \quad (3.28)$$

$$MSE = \frac{1}{mn} \sum_{i=0}^{m-1} \sum_{j=0}^{n-1} [x(i,j) - y(i,j)]^2 \quad (3.29)$$

$$mSSIM = \frac{1}{M} \sum_{i=0}^M SSIM_i \quad (3.30)$$

$$SSIM = \frac{(2\mu_x\mu_y + C_1)(2\sigma_{xy} + C_2)}{(\mu_x^2 + \mu_y^2 + C_1)(\sigma_x^2 + \sigma_y^2 + C_2)} \quad (3.31)$$

ここで、 $x$ と $y$ はそれぞれ生成画像と正解画像を示す。 $(\mu_x, \mu_y)$ ,  $(\sigma_x, \sigma_y)$ ,  $\sigma_{xy}$ はそれぞれ ROI における画素値の平均、標準偏差および共分散を示す。 $MAX$ は画像データの取りうる最大画素値を示し、本研究では 255 に設定した。 $m$ と $n$ は画像の幅と高さである。SSIM は幅 11 の正規化 Gaussian kernel 内で計算され、mSSIM は SSIM の平均値を計算される。 $C_1$ と $C_2$ は

計算不安定さを避けるために設定する定数で，本研究においては $C_1 = (0.01 \cdot 255)^2$ ， $C_2 = (0.03 \cdot 255)^2$ と設定した．これらの指標の値は大きいほど画像類似性が高いことを示している．

3D データの定量的品質評価では，大域的指標と局所的指標を用いて三次元ボクセルデータの構造類似性を評価した．具体的に，大域的指標として中心間誤差，相対体積誤差，相対表面積誤差および三次元形態指標の絶対誤差を採用した．三次元形態指標は次式で定義される三次元形態の無次元指標である．

$$\text{Three dimensional cell morphology index} = \frac{S^{\frac{3}{2}}}{6\sqrt{\pi} \cdot V} \quad (3.32)$$

ここで， $V$ は細胞体積， $S$ は細胞表面積であり，完全球体であれば 1，複雑な形状であれば 1 より大きくなる．局所的指標として IoU, Accuracy, Precision, Recall および F-measure を採用した．IoU は三次元再構成タスクの精度を評価するための形状類似度の指標として広く使用されており [127], [128]，本研究においては局所的な構造類似性の指標として採用とした．Accuracy, Precision, Recall および F-measure は局所的なボクセル予測性能の指標として採用した．Accuracy はデータ全体でオブジェクト領域および背景領域として正しく予測されたボクセルの割合を示す．Precision は生成オブジェクト領域に占める正解オブジェクト領域の割合を示し，Recall は正解オブジェクト領域に占める生成オブジェクト領域の割合を示す．F-measure は Precision と Recall の調和平均として計算され，オブジェクトが正しく生成されたかどうかを評価する．以上の大域的指標と局所的指標は次式のように定義した．

$$\text{centroid error} = \sqrt{(c_x^g - c_x^r)^2 + (c_y^g - c_y^r)^2 + (c_z^g - c_z^r)^2} \quad (3.33)$$

$$\text{relative volume error} = \frac{\|v^g - v^r\|}{v^r} \quad (3.34)$$

$$\text{relative surface error} = \frac{\|s^g - s^r\|}{s^r} \quad (3.35)$$

$$\text{absolute error of three dimensional morphology index} = \|m^g - m^r\| \quad (3.36)$$

$$\text{IoU} = \frac{TP}{TP + FP + FN} \quad (3.37)$$

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{TP + FP + FN + TN} \quad (3.38)$$

$$Precision = \frac{TP}{TP + FP} \quad (3.39)$$

$$Recall = \frac{TP}{TP + FN} \quad (3.40)$$

$$F - measure = \frac{2(Precision \times Recall)}{Precision + Recall} \quad (3.41)$$

ここで、 $(c_x, c_y, c_z)$ は重心の $x, y, z$ 座標を、 $v$ は物体の体積、 $s$ は物体の表面積、 $m$ は式 3.32 で定義される三次元形態指標を示す。また、 $g$ は生成データ、 $r$ は正解データを示す。本研究では、正解データのオブジェクト領域において生成されたまたは生成されなかったオブジェクトの数をそれぞれ真陽性 $TP$ および偽陰性 $FN$ と定義した。また、正解データの背景領域に生成されたまたは生成されなかったオブジェクトの数をそれぞれ偽陽性 $FP$ および真陰性 $TN$ と定義した。中心間誤差、相対体積誤差、相対表面積誤差およびは三次元形態指標の絶対誤差は値が小さいほど、IoU, Accuracy, Precision, Recall および F-score は値が大きいほど構造類似性が高いことを示す。Precision および Recall はトレードオフな関係にあり、構造類似性の評価と同時に学習モデルの性質を評価することができる。Precision に比べて Recall が高いほど保守的、低いほど積極的なボクセル予測を行うモデルであることが示される。ここで、構造類似性の局所的指標として採用した 5 つの指標は SOTA モデルとの比較指標として広く採用されているため、本研究においても SOTA モデルにおける評価を実施する対照実験を実施した。

続いて、モデルの計算複雑性の評価として、STCM および SOTA モデルの総パラメタ数、メモリ使用量および学習時間を測定した。具体的に、ニューラルネットワーク層内の総パラメタ数を測定し、バッチサイズ 2 におけるメモリ使用量を測定した。また、Intel(R) Xeon(R) CPU E5-1620 v3 @ 3.50GHz および GeForce TITAN X GPU を用いた実装環境において、同一のデータセットにおけるバッチサイズ 2 およびエポック数 250 での学習時間を計測した。

### 3.2.3 結果および考察

学習過程における生成器と識別器における損失関数の代表的な推移をそれぞれ図 3.9a と図 3.9b に示す. 一般的な cGAN モデルの学習過程における損失関数の挙動と同様に, 生成器と識別器における損失関数は振動し STCM が十分に学習されたことを示している. 図 3.9c に mean IoU の代表的な推移を示す. 最も高い mean IoU を獲得したエポックにおける学習モデルを用いて, テストデータセットに対する STCM の性能を評価した. 図 3.9d および図 3.9e に示すように, STCM は二次元圧縮マップと三次元ボクセルデータいずれにおいても, 正解に近いデータを生成できることが示された.

STCM の性能評価として, モデルの推測精度および計算複雑性を評価した. STCM の推測精度を評価するために, 推測した 2D データおよび 3D データの品質を定量的に評価した. STCM の推測した 2D データの定量的品質評価に向けて, PSNR, mSSIM および CCC を用いて大域的および局所的な画像類似性を評価した. 一般的に, PSNR は約 30 dB[129], mSSIM は約 0.98[130]を超えると局所的な画素値の類似性が高く局所的な構造の類似性が高いとされている. 表 3.1 に示すように, 生成画像は高い PSNR と mSSIM (mean PSNR: 62.6 dB, mean mSSIM: 0.990) を示した. また, CCC は約 0.95[131]を超えると大域的な画像類似性が高いとされているが, 生成画像では CCC (mean CCC :  $5.86 \times 10^{-2}$ ) が低いことが示された (表 3.1). STCM の推測した 3D データの定量的品質評価に向けて, 中心間誤差および相対体積誤差を用いて大域的な構造類似性を評価した. 表 3.2 に示すように中心座標誤差の中央値は 1.48  $\mu\text{m}$ , 相対体積誤差の中央値は 0.494, 相対表面積誤差の中央値は 0.323, 三次元細胞形態指標の絶対誤差は 0.0393 であった. 細胞の平均直径は約 20  $\mu\text{m}$  であることから, STCM は高い精度で中心座標を推定できることが示された. また, 体積, 表面積および三次元細胞形態指標に関しても, 高い精度で形状を推定できることが示された. 続いて, IoU, Accuracy, Precision, Recall, F-measure を用いて局所的な構造類似性を評価した. 形状類似度を評価する IoU に関して, STCM は現在の SOTA モデルに比べて最も高い精度を示した (表 3.3). また, Accuracy, Recall および F-measure に関しても同様に STCM が最も高い精度を示した. 一方で, Precision に関してのみ, Pix2Vox++モデルが最も高い精度を示した. STCM モデルの計算複雑性を評価するために, 空間複雑性の指標としてモデルの総パラメタ数およびメモリ使用量, 時間複雑性の指標として学習時間を測定した. いずれの指標においても STCM は SOTA モデルに比べて顕著に小さく, 計算複雑性の

低いモデルであることが示された (表 3.4). これらの結果から, STCM は 1 枚の位相差顕微鏡像から三次元細胞形状を精度高く計測できる軽量なモデルであることが示された.

STCM の実証に成功した要因として重要なポイントは, 情報損失のない可逆的な次元変換法である DiT によって, 二次元データから三次元データへの再構築タスクを二次元データから二次元データへの予測タスクに再定義する再定義した点にある. 推測する出力次元数を減らすことで, 調整すべき数パラメタ数を大幅に減らしたことが効果的な学習に寄与したと考えられる. 同様に, 総パラメタ数の減少は学習時間の大幅な短縮に繋がった. 生成された二次元画像の品質に関して, PSNR と mSSIM は局所的な画像類似性を評価しているのに対して, CCC は大域的な画像類似性を厳密に評価している. したがって, PSNR と mSSIM が高く CCC が低いという結果は, 画像の大部分を占める背景領域は精度高く推定できているため局所的な画像類似性が高いが, 画像占有率が背景領域よりも小さいオブジェクト領域の推測は背景領域の推測に比べて比較的難しいことを示している. STCM が SOTA モデルに比べて最も高い IoU 精度を示したことは, STCM が従来モデルに比べて高い精度で三次元形状を推定できたことを示している. ここで, Precision が高いモデルは積極的に, Recall が高いモデルは保守的にオブジェクトを生成する. そのため, Precision および Recall に関する本結果は, STCM は保守的にオブジェクトを生成する一方で, SOTA モデルの Pix2Vox++モデルは積極的にオブジェクトを生成したことを示している. また, Accuracy および F-measure に関する本結果は, STCM が精度高くオブジェクトを生成したことを示している.

以上, 本実験によって, 1 枚の位相差顕微鏡像から光散乱性ハイドロゲル内の三次元細胞形状を高い精度で計測可能な STCM の実証に成功した. 光散乱性ハイドロゲル内で培養される細胞をシングルショットでイメージングする顕微鏡法を世界で初めて構築した本成果は, 顕微鏡分野を基軸として細胞生物学や生物学など幅広い学際領域の発展に貢献する. また, 情報工学の伝統的な知見に基づいた新たな可逆的次元変換法を用いて, 三次元形状推測タスクを画像対画像変換タスクに再定義し高精度な深層学習モデルを構築するというユニークなアプローチは, 深層学習分野の発展に寄与することが期待される. 本研究においては, STCM をタイムラプスイメージングと組み合わせることでラベルフリー四次元細胞顕微鏡法を確立することができる.

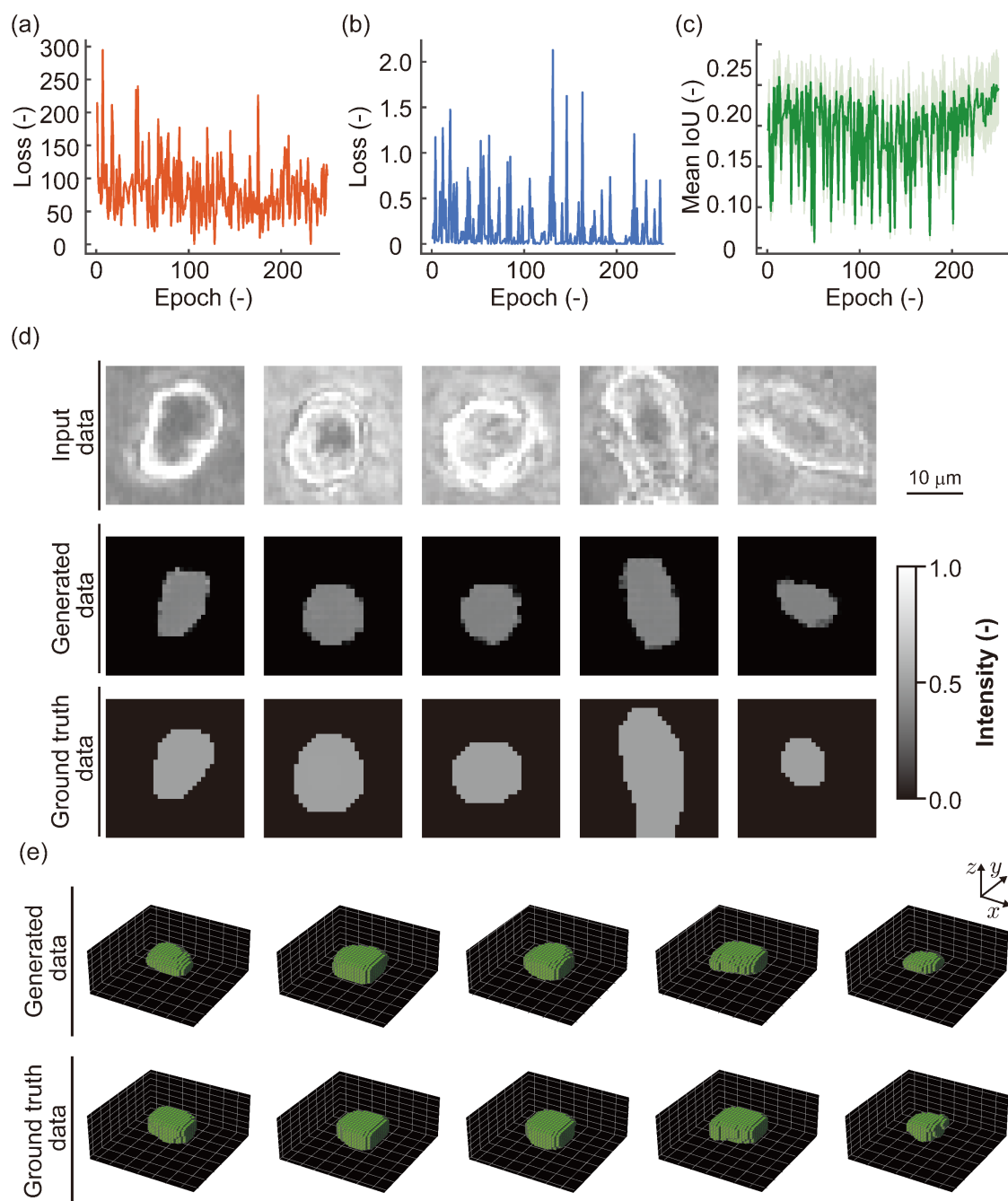


Fig. 3.9 Learning results of mapping from the single phase-contrast microscopy image to the 3D cell shape using by STCM. (a) (b) Representative loss transition in the generator and discriminator, respectively. It was indicated that the learning was progressing with oscillating loss values. (c) Representative mean IoU transition in the validation dataset ( $n=34$ , mean  $\pm$  C.I.). It was indicated that the IoU tended to shift for convergence after approximately 50 epochs. (d). Representative phase-contrast microscopy image, the generated compressed map and the ground truth data, which

were in the top, middle and bottom row, respectively. The images were extracted in the top 10 of CCC. (e). Representative images of the generated voxel data which was reconstructed from the compressed map and the ground truth data, which were in the top and bottom row, respectively. The green region indicates the reconstructed object. Each data corresponds to the data order in Fig. 4d and was included also within the top 10 of IoU.



Table 3.1 Performance of the generated 2D compressed map with PSNR, mSSIM, and CCC. These metrics were calculated by comparing them with 2D ground truth data.

	PSNR (dB)	mSSIM (-)	CCC (-)
mean	62.6	0.990	$5.86 \times 10^{-2}$
s.e.	0.397	$9.04 \times 10^{-4}$	$2.79 \times 10^{-2}$

Table 3.2 Performance of the reconstructed 3D cell voxel data with centroid error, relative volume error, relative surface error and absolute error of three-dimensional morphology index. These metrics were calculated by comparing them with 3D ground truth data.

	Centroid error ( $\mu\text{m}$ )	Relative volume error (-)	Relative surface error (-)	Absolute error of three-dimensional morphology index (-)
median	1.48	0.494	0.323	0.0393
s.e.	0.133	0.470	0.185	0.00551

Table 3.3 Comparison of the 3D cell shape reconstruction on the established dataset using IoU, Accuracy, Precision, Recall, and F-measure. These metrics are calculated as the mean value in the test data. The best number for each metric is highlighted in bold.

	Pix2Vox	Pix2Vox++	Ours
IoU	0.56839	0.57759	<b>0.59093</b>
Accuracy	0.95937	0.96040	<b>0.97679</b>
Precision	0.82141	<b>0.82465</b>	0.60384
Recall	0.69038	0.71076	<b>0.99021</b>
F-measure	0.70696	0.71147	<b>0.71151</b>

Table 3.4 The number of parameters, memory footprint and inference time on the established dataset. The memory footprint was calculated with a batch size of 2. The inference time was measured in each epoch with a batch size of 2. The resolution of the input and output size were  $32^2$  and  $32^3$ , respectively. The best number for each metric is highlighted in bold.

	Pix2Vox	Pix2Vox++	Ours
Parameters (M)	114	96.3	<b>4.86</b>
Memory (MB)	985	797	<b>20.2</b>
Inference time			
Average (s)	322	366	<b>166</b>
Total (h)	22.4	25.5	<b>11.6</b>

## 第 4 章 変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞集団の応答性評価

### 4.1 概要

本章において、変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞集団の応答性を解明する。一般的に、細胞挙動に関わる遺伝子の発現量は外部刺激に対して数分から数時間オーダーの時間スケールで変動することが知られている[132], [133]が、近年、いくつかの細胞種において数時間スケールの周期的な機械的刺激が遺伝子発現を誘発し細胞挙動を変動させることが明らかとなってきた[134]。そこで、本実験においては、数時間オーダーで周期的に切り替わる機械的圧縮刺激はメラノーマ細胞集団の集団挙動に影響を及ぼすと仮説を立て、細胞培養試験を実施した。具体的に、異なる周期の間欠的圧縮刺激が二次元メラノーマモデルにおけるメラノーマ細胞集団の進展速度に与える影響を調査した。ここで、メラノーマ細胞集団の進展プロセスにおいては、

1. 細胞死
2. 細胞増殖
3. 細胞遊走
4. 細胞浸潤

の 4 つの因子が作用する。細胞死とは、アポトーシスまたはネクローシスによって細胞膜や細胞核が破綻し細胞が不可逆的な機能不全に陥った状態を指す。細胞死は細胞の生死反転に使われる calcein-AM/PI 二重染色によって評価することができる。細胞増殖とは、細胞分裂によって細胞数が増加する状態を指し、calcein-AM/PI 二重染色によって検出された細胞数を算出することで評価することができる。また、細胞遊走とは細胞骨格のリモデリングによって細胞が運動する状態を指し、細胞骨格の形態学的解析によって評価することができる。細胞浸潤とは ECM を構成するコラーゲンを分解しながら細胞遊走する状態を指し、コラーゲン分解酵素の遺伝子発現解析を実施することで評価することができる。

そこで、本研究においてはそれぞれの因子に対して以下 4 つの定量的評価を実施した。

1. calcein-AM/PI 二重染色による死細胞率評価
2. calcein-AM/PI 二重染色による細胞数増加率評価
3. rhodamine-phalloidin/DAPI 二重蛍光染色による F アクチン細胞骨格のリモデリング評価
4. RT-qPCR によるコラーゲン分解酵素の遺伝子発現評価

## 4.2 試料及び実験方法

本実験では、異なる周期の間欠的圧縮刺激が二次元メラノーマモデルにおけるメラノーマ細胞集団の応答性に与える影響を調査した。二次元メラノーマモデルは円形領域に B16F10 細胞を播種した後に上部から I 型コラーゲンゲルで固定することで、立体的な皮膚構造を模擬した培養モデルである。本実験で用いる二次元メラノーマモデルは、2.2.2.2 節に記載した手順に従って作製した。ただし、PDMS 製円柱状培養モールドの直径は 1.5 mm とし、細胞播種密度を  $1.6 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$  に調整した。試料群として、 $7.7 \times 10^2 \text{ Pa}$  の圧縮刺激を 2 時間印加および 2 時間除荷する 4 時間周期の間欠的圧縮刺激群 (T=4 群) と、4 時間印加および 4 時間除荷する 8 時間周期の間欠的圧縮刺激群 (T=8 群) および圧縮刺激を印加しない control 群を用意した。

異なる周期の間欠的圧縮刺激がメラノーマ細胞集団の進展速度に与える影響を評価するために、培養 0, 8, 16, 24 時間経過時点においてメラノーマ細胞の占有領域を CCD カメラ (DP73, Olympus Inc.) を搭載した位相差顕微鏡 (CKX41, Olympus Inc.) によってタイムラプス撮像した。進展速度の定量的評価に向けて、各時刻における細胞占有面積を ImageJ を用いた画像解析によって測定し、次式で定義される進展距離  $P_t$  を算出した。ImageJ による画像解析では、位相差顕微鏡像のノイズ除去および領域抽出に向けて Subtract ground 処理、Minimum フィルタ、Invert 処理および Otsu アルゴリズムによる二値化を実施した (図 4.1a)。

$$P_t = \sqrt{\frac{a_t}{\pi}} - \sqrt{\frac{a_0}{\pi}} \quad (4.1)$$

ここで、 $a_t$  は各時刻における細胞占有面積、 $a_0$  は培養 0 時間経過時点における細胞占有面積を示す。各時刻における進展距離を最小二乗法によって線形回帰し、回帰直線の傾きによって進展速度を測定した。また、回帰直線の適合度は決定係数によって評価した。

間欠的圧縮刺激が細胞死および細胞増殖に与える影響の定量的評価に向けて、培養 24 時間経過時点における calcein-AM/PI 二重蛍光染色を実施し、ImageJ を用いて生細胞数および死細胞数を評価した。calcein-AM は生細胞の細胞質を緑色に、PI は死細胞の細胞核を赤色に蛍光染色する。calcein-AM/PI 二重蛍光染色は 2.2.2.2 節に記載した手順に沿って実施した。蛍光染色された細胞は CCD カメラ (DP73, Olympus Inc.) および蛍光装置 (U-LH50HG, Olympus Inc.) を搭載した蛍光顕微鏡 (CKX41, Olympus Inc.) を用いて撮像した。生細胞数は calcein-AM 蛍光顕微鏡像に対して、ImageJ の ITCN プラグインを用いて測定した (図

4.1b). ITCN プラグインでは、撮像画像中における輝度値の極大点を検出し、設定された細胞の直径および細胞間の最小距離の範囲内における極大点の個数を計測することで細胞数を測定する。死細胞数は PI 蛍光顕微鏡像に対して、ImageJ を用いた Otsu アルゴリズムによる二値化および watershed アルゴリズムによるセグメンテーションを実施することで測定した (図 4.1c)。細胞死の定量的指標として死細胞率を、細胞増殖の定量的指標として細胞数増加率を次式によって算出した。

$$dead\ cell\ rate = \frac{D}{A + D} \quad (4.2)$$

$$cell\ number\ increase\ rate = \frac{C}{C_{control}} \text{ where } C = A + D \quad (4.3)$$

ここで、 $A$ は生細胞数、 $D$ は死細胞数である。また、 $C_{control}$ は control 群における総細胞数である。

間欠的圧縮刺激が細胞遊走に与える影響の定量的評価に向けて、培養 24 時間経過時点における rhodamine-phalloidin/DAPI 二重蛍光染色を実施し、ImageJ を用いて F アクチン細胞骨格のリモデリングを評価した。DAPI は細胞膜不透過性の核染色色素であり固定サンプルにおける細胞核の蛍光染色に広く用いられる [135], [136]。rhodamine-phalloidin 蛍光染色を 2.2.2.2 節に記載した手順に沿って実施した後に、300 nM の DAPI 溶液 (励起波長 535 nm, 蛍光波長 585 nm) を添加し炭酸ガスインキュベータで 5 分間静置した。DAPI 溶液を除去した後に、PBS + 1% antimycotic/antibiotic を用いた 5 分間の洗浄処理を 3 回繰り返した。蛍光染色された細胞は calcein-AM/PI 二重蛍光染色を撮像した装置と同じ蛍光顕微鏡を用いて撮像した。F アクチン細胞骨格のリモデリングに関する定量的指標として、単位細胞あたりの F アクチン繊維長を次式によって算出した。

$$F\ actin\ filament\ length\ per\ cell = \frac{L}{N} \quad (4.4)$$

ここで、 $L$ および $N$ はそれぞれ撮像画像中の総アクチン繊維長および細胞核数である。総アクチン繊維長は、rhodamine-phalloidin 蛍光顕微鏡像に対して ImageJ を用いた Bandpass フィルタ、Otsu アルゴリズムによる二値化および Skeletonize 処理を実施することで測定した (図 4.1d)。Skeletonize 処理では、オブジェクトのピクセル幅が 1 pixel になるまで繰り返しモルフォロジー演算を行う画ため、Skeletonize された二値化画像の画素値の合計は撮像画像の総アクチン繊維長に相当する。細胞核数は DAPI 蛍光顕微鏡像に対して、ImageJ を

用いた Mean アルゴリズムによる二値化および watershed アルゴリズムによるセグメンテーションを実施することで測定した。

間欠的圧縮刺激が細胞浸潤に与える影響の定量的評価に向けて、培養 24 時間経過時点における RT-qPCR による遺伝子発現解析を実施した。本実験において遺伝子発現解析する対象遺伝子は、細胞浸潤に関わるシグナル伝達経路において下流に位置する ECM 分解酵素遺伝子とした。RT-qPCR とは対象遺伝子から発現した mRNA の相対発現量を定量的に測定する方法であり、total RNA 抽出、cDNA 逆転写、リアルタイム PCR の 3 つのステップによって構成される。total RNA 抽出ステップでは、対象サンプルからすべての RNA を抽出する。cDNA 逆転写ステップでは抽出した RNA を cDNA に逆転写する。リアルタイム PCR では cDNA に含まれる対象遺伝子を増幅させ、増幅量を計測することで対象遺伝子の相対発現量を測定することができる。RT-qPCR による相対発現量の測定には、対象遺伝子としてハウスキーピング遺伝子およびターゲット遺伝子の 2 種類が必要である。ハウスキーピング遺伝子は遺伝子発現量の基準量として機能し、ターゲット遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子の発現量によって相対的に算出される。本実験においては、ハウスキーピング遺伝子として Gapdh 遺伝子、ターゲット遺伝子として Mmp14 遺伝子の相対発現量を測定した。GAPDH は解糖系の重要な因子であり、最もよく用いられるハウスキーピング遺伝子の一つである[137]。MMP14 は ECM を分解する重要な酵素であり、メラノーマ細胞の進展を促進するタンパク質を活性化する因子である[138]。RT-qPCR の手順を述べる。培養 24 時間経過時点におけるメラノーマモデルから total RNA を抽出する。total RNA 抽出ステップでは、NucleoSpin RNA キット (740955.50, Takara Bio Inc.) を用いた。続いて、total RNA 抽出液とおよび cDNA 合成溶液 (PrimeScript Master Mix (Perfect Real Time), RR036A, Takara Bio Inc.) を混合した cDNA 溶液を用いて、サーマルサイクラー (Thermal Cycler Dice Real Time System Lite, TP700, Takara Bio Inc.) によって total RNA を cDNA に逆転写した。cDNA 逆転写ステップにおいては、37 度 15 分、85 度 5 秒の順で温度制御した。Biophotometer (6131, Eppendorf) を用いて cDNA 濃度を測定した後に、希釈液 (RNase-free water, 9012, Takara Bio Inc.) を用いて最終濃度 10 ng/ml の cDNA 溶液を作製した。作製した cDNA 溶液、蛍光標識溶液 (TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus), RR820A, Takara Bio Inc.)、プライマー (Takara Bio Inc.) および希釈液を混合して、Takara Bio Inc. 社の指定する濃度に調整した qPCR 溶液を作製した。プライマーの塩基配列は表 4.1 に示す。そして、リアルタイム PCR 装置 (Thermal Cycler Dice Real Time System Lite, TP700, Takara

Bio Inc.) を用いて qPCR 溶液をリアルタイム PCR することで、対象遺伝子の相対定量を実施した。リアルタイム PCR ステップでは 95 度 5 秒、60 度 30 秒のサイクルを 60 回繰り返した。相対発現量の算出には  $\Delta\Delta C_t$  法を用いた。 $\Delta\Delta C_t$  法とは、遺伝子増幅によって所定の蛍光強度を示した際の増幅サイクル数を  $C_t$  値とした時に、式 4.5 および式 4.6 で定義される  $\Delta\Delta C_t$  を算出し、相対発現量  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  を算出する方法である。

$$\Delta\Delta C_t = (\Delta C_t)_{sample} - (\Delta C_t)_{control} \quad (4.5)$$

$$\Delta C_t = (C_t)_{target} - (C_t)_{house\ keeping} \quad (4.6)$$

ここで、*sample* は観察対象の試料群、*control* はコントロール試料群を示している。*target* はターゲット遺伝子、*house keeping* はハウスキーピング遺伝子を示している。また、本実験においては、RT-qPCR による遺伝子発現解析の再現性を担保するために、Technical replicate および Biological replicate を 3 回実施した。また、リアルタイム PCR 後に融解曲線分析を実施することでプライマーダイマーが発生していないことを確認した。さらに、全ステップを通じてコンタミネーションが発生していないことを確認するために、total RNA を含まずに cDNA 合成溶液のみで構成されるコントロール溶液を作製し cDNA 逆転写ステップを実施することでネガティブコントロール溶液を作製した。cDNA 溶液をネガティブコントロール溶液に置き換えた qPCR 溶液を用いてリアルタイム PCR することで、コンタミネーションの有無が確認できる。たとえば、ネガティブコントロール溶液を用いたリアルタイム PCR によって遺伝子増幅が確認された場合、いずれかのステップでコンタミネーションが発生したと判断できる。本実験における、ネガティブコントロール溶液を用いたリアルタイム PCR では、遺伝子増幅が確認されず、コンタミネーションは発生していないことを確認した。

定量データに対する統計学的仮説検定では、有意水準を 5% および 1% に設定し Dunnett 検定による多重検定を実施した。

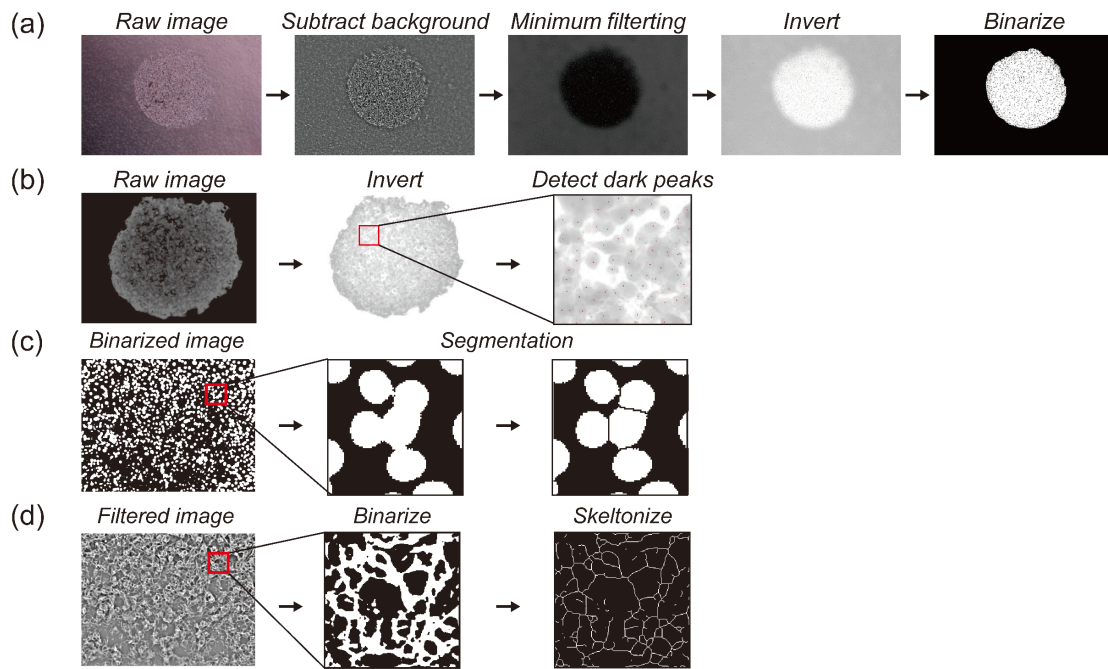


Fig. 4.1 Image analysis using ImageJ. (a) Quantification of cell-occupied area to evaluate cell progression. (b) Quantification of the number of viable cells using the ITCN plugin in ImageJ. (c) Quantification of the number of nuclei using binarization and segmentation. (d) Quantification of total F-actin length using binarization and skeletonization.



Table 4.1 RT-qPCR primer sequences.

<b>Gene Name</b>	<b>Gene Bank Accession Number</b>	<b>Sequence(5'-3')</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Product Size (bp)</b>
<i>Gapdh</i>	NM_001289726.1	Forward:		
		TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	63.9	3939
		Reverse:	63.9	
		TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG		
<i>Mmp-14</i>	NM_008608.4	Forward:		
		CCTCAAGTGGCAGCATAATGAGA	63.7	83
		Reverse:	64.3	
		TGGCCTCGAATGTGGCATAC		

### 4.3 結果および考察

培養 0 時間および 24 時間経過時点における各試料群の代表的な位相差顕微鏡像を図 4.2a に示す。白い破線が培養 0 時間経過時点、黄色い破線が培養 24 時間経過時点における細胞占有領域を示す。培養 0,8,16,24 時間経過時点における進展距離の定量結果を図 4.2b に示す。各色に対応した破線は、各時刻における進展距離を最小二乗法によって線形回帰した回帰直線である。すべての回帰直線において決定係数は 0.98 を超え、高い適合度で回帰直線を推定できたことを示している。進展速度は 4.2 節による定義によって回帰直線の傾きに相当する (control 群 : 2.10  $\mu\text{m}/\text{h}$ , T=4 群 : 1.70  $\mu\text{m}/\text{h}$ , T=8 群 : 2.47  $\mu\text{m}/\text{h}$ )。結果、T=4 群の進展速度は control 群に比べて低下し、T=8 群の進展速度は control 群に比べて増加した。機械的圧縮刺激を 2 時間印加および 2 時間除荷する 4 時間周期の間欠的圧縮刺激は、メラノーマ細胞集団の進展速度を抑制させたことが示された。一方で、機械的圧縮刺激を 4 時間印加および 4 時間除荷する 8 時間周期の間欠的圧縮刺激は、メラノーマ細胞集団の進展速度を促進させたことが示された。4.1 節で記載したように、メラノーマ細胞集団の進展プロセスには、細胞死、細胞増殖、細胞遊走および細胞浸潤の 4 つの因子が作用する。そこで、本実験においては異なる周期の間欠的圧縮刺激がそれぞれの因子に対して与える影響を各試料群において定量的に評価した。

細胞死および細胞増殖に対する影響の定量的評価に向けた、培養 24 時間経過時点における各試料群の calcein-AM/PI 二重蛍光染色像を図 4.3a に示す。Merge 像において、緑色蛍光像が生細胞、赤色蛍光像が死細胞を示す。画像解析によって測定した死細胞率および細胞数増加率を図 4.3b および図 4.3c に示す。死細胞率に関して、T=4 群および T=8 群ともに control 群に比べて増加する傾向が認められたが、T=4 群において最も増加する傾向が認められた。細胞数増加率に関して、T=4 群と control 群間において細胞数増加率に有意な差は認められなかった一方で、T=8 群の細胞数増加率は control 群に比べて有意に増加した。

細胞遊走に対する影響の定量的評価に向けた、培養 24 時間経過時点における各試料群の rhodamine-phalloidin/DAPI 二重蛍光染色像を図 4.4a に示す。Merge 像において、赤色蛍光像が F アクチン細胞骨格、青色蛍光像が細胞核を示す。画像解析によって測定した単位細胞あたりの F アクチン繊維長を図 4.4b に示す。結果、T=4 群は control 群に比べて有意水準 1% で顕著に減少し、T=8 群は control 群に比べて有意水準 5% で有意に減少した。また、T=4 群は T=8 群に比べて減少する傾向が認められた。

細胞浸潤に対する影響の定量的評価に向けた、培養 24 時間経過時点における各試料群の MMP14 遺伝子発現量の相対定量結果を図 4.4c に示す。結果、T=4 群は control 群に比べて減少する傾向が認められた一方で、T=8 群は control 群に比べて増加する傾向が認められた。

細胞死の増加は進展速度を低下させ、細胞数の増加は進展速度を向上させる。一般的に、細胞は遊走する際に F アクチン細胞骨格をリモデリングし細胞が遊走する方向に F アクチン繊維が伸長するため[139]-[142]、F アクチン繊維の延伸は細胞の運動能と相関し[143]-[145]、F アクチン繊維の収縮は細胞遊走を進展速度を低下させる。また、コラーゲンを分解する MMP14 の発現量はメラノーマ細胞の浸潤能と相関するため[138], [146]-[151]、発現量の増加は進展速度を向上させ発現量の低下は進展速度を低下させる。本実験結果とこれらの知見を考慮すると、4 時間周期の間欠的圧縮刺激は細胞死の誘発、F アクチン繊維の収縮による細胞遊走能の低下および MMP14 発現量の低下による細胞浸潤能の低下によって進展速度を抑制させたことが示された。一方で、8 時間周期の間欠的圧縮刺激は、細胞増の増加および MMP14 発現量の増加による細胞浸潤能の増加によって進展速度を促進させたことが示された。

以上、本実験によって、間欠的圧縮刺激の周期に依存してメラノーマ細胞集団の進展速度が変化することが示された。本成果は、機械的圧縮刺激下におけるメラノーマ細胞集団の挙動をより深く理解することに繋がる。

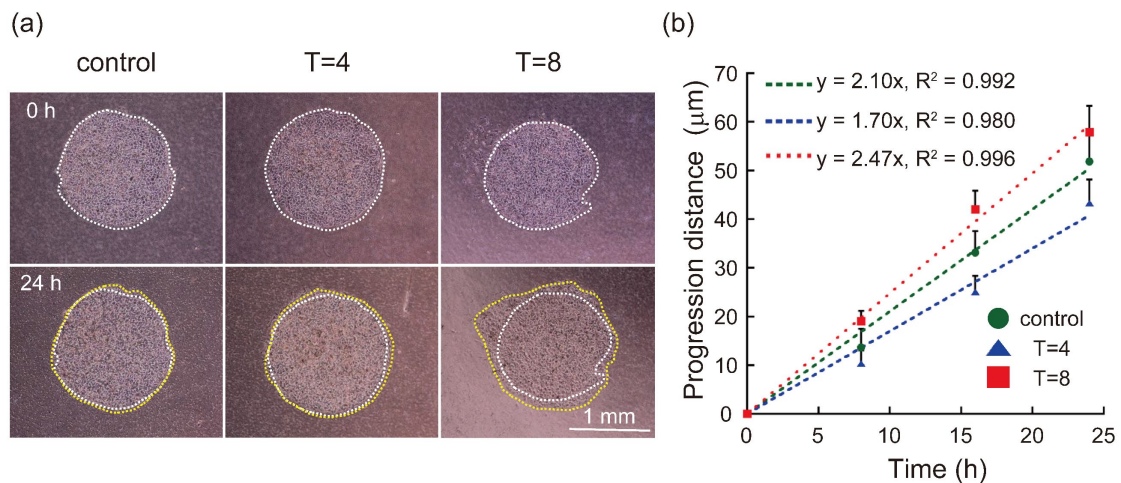


Fig. 4.2 Progression of B16F10 cells in a 2D melanoma model under mechanical intermittent compression. (a) Representative phase-contrast microscopy image. The white dotted lines indicate the cell-adhered area at 0 h of culture, and the yellow dotted lines indicate the cell-adhered area at 24 h of culture. (b) Quantification of progression distance. The green circles indicate the progression distance in the control group, the blue triangles indicate the T = 4 group, and red rectangles indicate the T = 8 group. The green, blue, and red dashed lines indicate a regression line to the progression distance in the control, T = 4, and T = 8 groups, respectively ( $n \geq 12$ , data represents the mean  $\pm$  S.E).

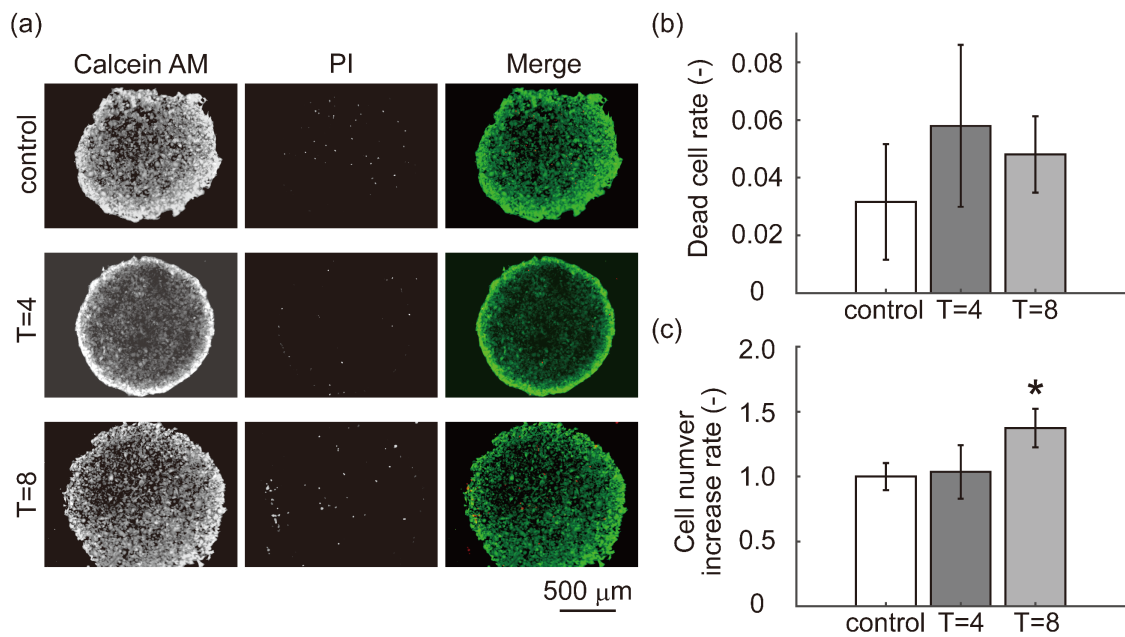


Fig. 4.3 Cell viability and cell proliferation assay. (a) Representative fluorescent images stained by calcein AM/PI at 24 h culture duration. In the merged images, the green fluorescence indicates live cells, and the red fluorescence indicates dead cells. (b) Quantification of dead cell rate (n = 3, mean  $\pm$  S.D.). (c) Quantification of cell number increase rate (n = 3, mean  $\pm$  S.D.). Dunnett's test was used to compare groups. Asterisk indicates a significant difference compared to the control group ( $p < 0.05$ ).

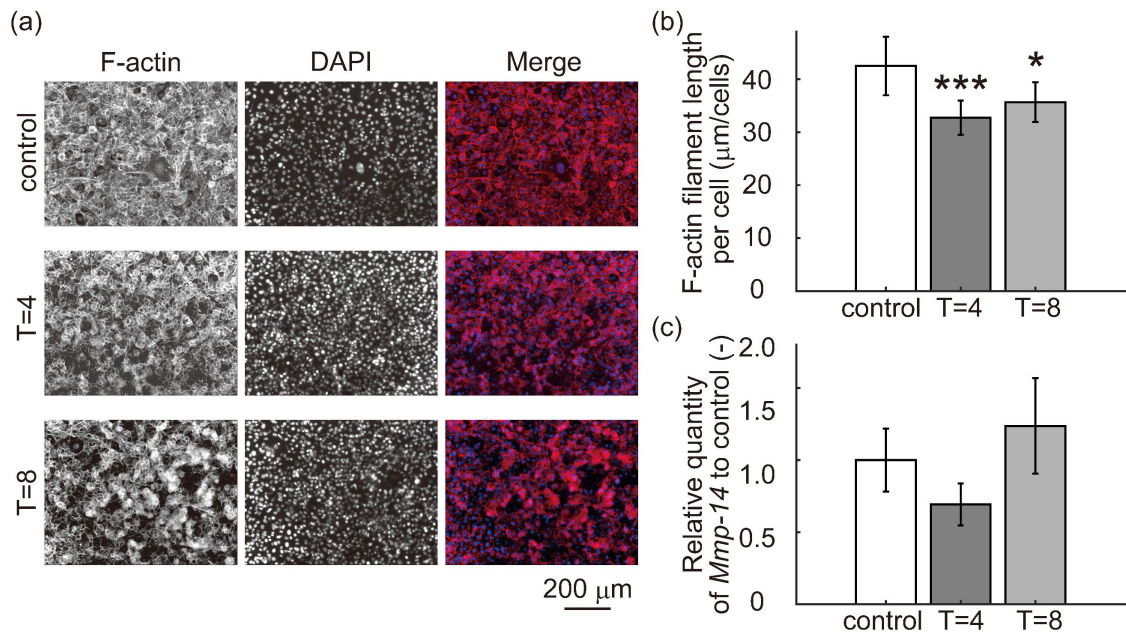


Fig. 4.4 Quantification of cell migration and invasion capacity. (a) Representative fluorescence images stained by rhodamine-phalloidin/DAPI at 24 h of culture. In the merged images, the red fluorescence indicates F-actin filaments, and the blue fluorescence indicates nuclei. (b) Quantification of F-actin filament length per cell ( $n \geq 3$ , mean  $\pm$  S.D.). (c) Relative quantity of *Mmp-14* ( $n = 3$ , mean  $\pm$  S.D.). Dunnett's test was used to compare groups. Asterisks indicate a significant difference compared to the control group (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

# 第5章 変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ単一細胞の応答性

## 5.1 二次元メラノーマモデルにおける応答性評価

### 5.1.1 概要

本節では、二次元メラノーマモデルを用いて、変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ単一細胞の二次元的な応答性を解明する。一般的に、メラノーマ細胞は静的な外部刺激に応じて表現型を可逆的に転換する表現型可塑性を示すことが知られている[152]。具体的に、間葉系様式 (mesenchymal) およびアメーバ系様式 (amoeboid) と呼ばれる2つの表現型を外部環境に応じて柔軟に変化させる表現型の転換現象が知られ、転換の方向によって MAT (mesenchymal to amoeboid transition) および AMT (amoeboid to mesenchymal transition) と呼ばれる。間葉系様式とは、葉状仮足や糸状仮足と呼ばれる細胞骨格の特徴的な仮足構造を形成する紡錘状の表現型であり、細胞骨格のリモデリングおよび ECM 分解酵素の分泌によってゆっくりと直線的に遊走する[152], [153]。葉状仮足や糸状仮足は、主にアクチンの重合と脱重合の繰り返しによって細胞骨格の立体的構造が時空間的に制御されることで形成される[154], [155]。アメーバ系様式とは、ブレブと呼ばれる細胞膜の特徴的な球状突起を形成する球状の表現型であり、特定方向のブレブ形成による物理的な重心移動によって素早くランダムな方向に遊走する[156], [157]。ブレブは、細胞骨格と細胞膜の解離を起因とする細胞内静水圧の局所的増加によって細胞膜が物理的に膨張することで形成される[158]。アメーバ系様式は間葉系様式と比べて高速に遊走することが知られており[30]、表現型可塑性は悪性腫瘍の進展プロセスに影響を及ぼす[159]。そこで、本実験においては、数時間オーダで周期的に切り替わる間欠的圧縮刺激がメラノーマ単一細胞の表現型可塑性に影響を及ぼすと仮説を立て、細胞培養試験を実施した。具体的に、異なる周期の間欠的圧縮刺激がメラノーマ単一細胞の二次元的な細胞形態分布に与える影響を調査した。

## 5.1.2 試料および実験方法

本実験では、二次元メラノーマモデルを用いて、異なる周期の間欠的圧縮刺激がメラノーマ単一細胞の二次元的な応答性に与える影響を調査した。二次元メラノーマモデルは、B16F10 細胞を培養皿上に  $3.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した後に、上部から I 型コラーゲンゲルで固定することで立体的な皮膚構造を模擬した培養モデルである。B16F10 細胞は 2.2.2.2 節に記載した手順に従って維持培養および継代培養を経た後に試料とした。I 型コラーゲンゲルは 2.2.1.2 節に記載した手順に従って作製した。試料群として、 $7.7 \times 10^2$  Pa の圧縮刺激を 2 時間印加および 2 時間除荷する 4 時間周期の間欠的圧縮刺激群 (T=4 群) と、4 時間印加および 4 時間除荷する 8 時間周期の間欠的圧縮刺激群 (T=8 群) および圧縮刺激を印加しない control 群を用意した。

間欠的圧縮刺激が細胞形態に与える影響の定量的評価に向けて、培養 24 時間経過時点における calcein-AM 蛍光染色を実施し、画像解析によって蛍光顕微鏡像から領域抽出した細胞形態を評価した。一般的に、細胞形態の評価には rhodamine-phalloidin などの細胞骨格を標識する蛍光染色が主に採用されるが、メラノーマにおいて特徴的なアメーバ系様式は細胞質の形状によって形態が決定されるため、細胞骨格を標識する蛍光染色はアメーバ系様式の細胞形態評価に向かない。そこで、本実験においては、細胞質を緑色蛍光標識する calcein-AM を用いた蛍光染色によって、間葉系様式およびアメーバ系様式の細胞形態を評価する。calcein-AM 蛍光染色は 2.2.2.2 節に記載した手順に沿って実施した。蛍光染色された細胞は CCD カメラ (DP73, Olympus Inc.) および蛍光装置 (U-LH50HG, Olympus Inc.) を搭載した蛍光顕微鏡 (CKX41, Olympus Inc.) を用いて撮像した。画像解析による領域抽出では、ImageJ を用いた Otsu アルゴリズムによる二値化によって細胞形態を抽出した。細胞形態は次式のように定義される二次元細胞形態指標 (two-dimensional cell morphology index: 2D-CMI) を用いて評価した。

$$\text{Two dimensional cell morphology index} = \frac{L^2}{4\pi A} \quad (5.1)$$

ここで、 $L$  は細胞の周囲長、 $A$  は細胞面積である。二次元細胞形態指標は 1 に近いほど真円に近く、1 より大きいほど複雑な形状であることを示す。

間欠的圧縮刺激が細胞形態分布に与える影響の定量的評価に向けて、混合ガウスモデル (Gaussian mixture model: GMM) を用いた細胞形態パラメタのクラスタ解析を実施した。クラスタに属する細胞数割合を試料群ごとに算出することで、細胞形態分布を評価した。



間欠的圧縮刺激が細胞形態分布に影響を及ぼす場合、試料群ごとの細胞数割合は変化し細胞形態分布が変化する。GMM とは、データ分布に対して最も適合度の高い混合ガウス分布を推定する教師なし機械学習モデルである。混合ガウス分布とは独立変数  $x$  に対して複数のガウス分布を線形結合した分布であり、混合ガウス分布  $p(x)$  は次式のように定義される。

$$p(x) = \sum_{i=1}^k \pi_i N(x|\mu_i, \Sigma_i) \text{ s.t. } 0 \leq \pi_i \leq 1 \wedge \sum_{i=1}^k \pi_i = 1 \quad (5.2)$$

ここで、 $k$  はガウス分布の数、 $(\pi_i, \mu_i, \Sigma_i)$  は  $k$  番目のガウス分布における混合係数、平均ベクトルおよび分散共分散行列である。本研究における混合ガウス分布の最尤推定には EM アルゴリズムを用いた。ここで、GMM では各サンプルの割り当てられたガウス分布がそのサンプルのクラスタであり、ガウス分布の数はクラスタ数と同値である。そのため、任意のクラスタ数において混合ガウス分布を推定し、混合ガウス分布のデータ分布に対する適合度をクラスタ数ごとに評価することで、データ分布に対して最適なクラスタ数を推定することができる。適合度の評価には式 5.3 のように定義されるベイズ情報量規準 (Bayesian information criterion: BIC) を採用し、最適なクラスタ数  $K$  は式 5.4 のように定義した。

$$BIC_k = 2 \cdot \ln(L) - M_k \cdot \ln(n) \quad (5.3)$$

$$K = \operatorname{argmax}(BIC_k) \text{ s.t. } 0 \leq k \leq 10 \quad (5.4)$$

ここで、 $BIC_k$  はガウス分布数  $k$  における BIC、 $L$  は尤度関数、 $M_k$  はガウス分布数  $k$  における独立変数の数、 $n$  はサンプル数を表す。本研究においては、GMM によるクラスタ解析を汎用統計解析ソフトウェア R を用いて実施した。

### 5.1.3 結果および考察

培養 24 時間後におけるメラノーマ細胞の蛍光染色像を図 5.1a に、それぞれの試料群における二次元細胞形態指標の分布を図 5.1b に示す。T=4 群の細胞形態分布は control 群と比べて分散の大きな分布を示した一方で、T=8 群においては control 群と比べて分散の小さな分布を示した。すべての試料群における二次元細胞形態指標の分布を図 5.1c、GMM を用いて推定した混合ガウス分布のガウス分布数に対する BIC を図 5.1d に示す。図 5.1d より、データ分布に対してクラスタ数  $K = 3$  が最適な混合ガウス分布であることが示され、データ分布に対して最適なクラスタ数は 3 つであることが示された。

クラスタ数 3 で構成される混合ガウス分布において、それぞれのクラスタに含まれる蛍光染色細胞像を図 5.1e に示す。Cluster1 に含まれる細胞群は円状に近く複数のブレブ形成が認められたため、アメーバ系様式であると推察される。Cluster2 に含まれる細胞群は紡錘状であり、葉状仮足や糸状仮足の形成が認められたため、間葉系様式であると推察される。Gabbireddy らは、三次元的な狭い空間に閉じ込められたメラノーマ細胞がアメーバ様様式と間葉系様式を同時に発現させることを報告している[160]が、この知見と本実験の結果は合致している。一方で、Cluster3 に含まれる細胞群は、円状の中心部分から複数の糸状仮足を形成する複雑な形状を示しており、これらは従来のアメーバ系様式や間葉系様式とは異なる形状である。Holle らは癌細胞のアメーバ系様式と間葉系様式のスイッチング現象はバイナリな関係ではなく、連続的に形状が変化する確率的な関係にあることを報告している[161]。また、Huang らは連立常微分方程式を用いた分岐解析によってアメーバ系様式と間葉系様式のハイブリッドな特徴を有するハイブリッド表現型が外部刺激によって発現する可能性を示唆し[162]、Bergert らは乳がん細胞におけるハイブリッド表現型の存在を報告している[163]。これらの知見と本実験の結果を考慮すると、Cluster3 における細胞群はアメーバ系様式と間葉系様式のハイブリッド表現型であると考えられる。

各試料群においてそれぞれのクラスタに含まれる細胞数の割合を図 5.1f に示す。control 群において、Cluster1 および Cluster2 に属する細胞数割合がそれぞれ約 50%であることが示された。三次元的な環境下においてアメーバ様様式と間葉系様式が等確率で発現したとする Gabbireddy らの報告[160]と合致している。一方で、T4 群においては control 群と比べて Cluster1 および Cluster2 の発現確率が減少し、Cluster3 の発現確率が増加した。4 時間周期の間欠的圧縮変形刺激が MAT または AMT を促進しハイブリッド表現型の獲得に寄与した可能性が示された。また、T=8 群においては、control 群と比べて Cluster1 の細胞数が増

加し Cluster2 の細胞数が減少する傾向が示された。8 時間周期の間欠的圧縮変形刺激は間葉系様式からアメーバ様式に移行する MAT を促進させ、アメーバ系様式の発現を促進させた可能性が示された。

以上、4 時間周期の間欠的圧縮変形刺激はハイブリッド表現型の発現を促進させ、8 時間周期の間欠的圧縮変形刺激は AMT の促進を介してアメーバ系様式の発現を促進させたことを明らかにした。本実験によって、間欠的圧縮刺激の周期に依存して二次元的な細胞形態分布が変化することを示し、変動する機械的圧縮刺激に対してハイブリッド表現型の発現が変化することを初めて明らかにした。ここで、ハイブリッド表現型は近年存在が認識され始めた未知な表現型であり、表現型獲得メカニズムや細胞生物学的意義は未だ不明であることが多い。機械的圧縮刺激に対するハイブリッド表現型の応答を初めて示した本実験の成果は、メラノーマ細胞の応答性を深く理解することに繋がるだけでなく、細胞生物学や腫瘍学に対して新たな知見を提示する。

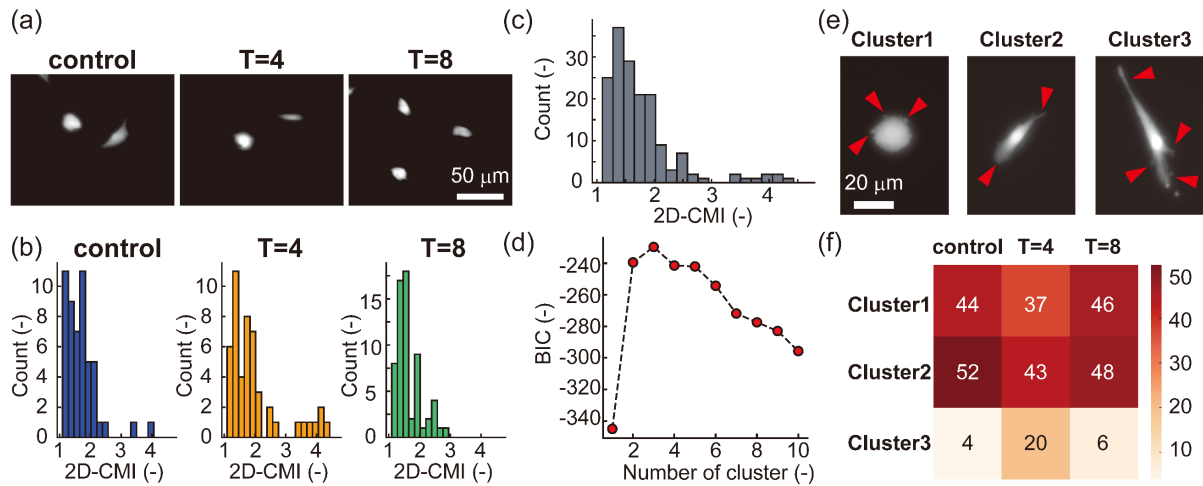


Fig. 5.1 Phenotypic plasticity of melanoma cells in two-dimensional cell culture model under the intermittent mechanical compression. (a) Representative fluorescent images stained by calcein AM at 24 h culture duration. (b) Histogram of the two-dimensional cell morphology index (2D-CMI) in control (n=52 cells), T=4 (n=51 cells), T=8 (n=63 cells) group. (c) Histogram of the two-dimensional 2D-CMI in whole data (n=166 cells). (d) Relationship between BIC and the number of Gaussian distributions. (e) Representative fluorescent images belonging to each cluster. Red triangles indicate characteristic protrusions. (f) Heatmap of the percentage of cell number in each cluster.

## 5.2 三次元メラノーマモデルにおける応答性評価

### 5.2.1 概要

本節では、三次元メラノーマモデルを用いて、変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ単一細胞の三次元的な応答性を解明する。ここで、三次元モデルメラノーマモデルは真皮層に単一細胞で浸潤する進展の中期段階を模している。5.1 節では、間欠的圧縮刺激の周期に依存してメラノーマ単一細胞の二次元的な細胞形態分布が変化することを示した。しかしながら、二次元メラノーマモデルにおける細胞培養試験では二次元的な細胞形態情報しか評価することができない。生体内環境で細胞形態は立体的であることから、メラノーマ単一細胞の生理学的応答性を厳密に評価するためには三次元的な細胞形態を評価する必要がある。たとえば、三次元的には形態が異なる細胞であっても、二次元的な細胞形態解析では同じ細胞形態と評価される恐れがある。そこで、第3章で構築したシングルショット三次元細胞計算顕微鏡法（STCM）およびタイムラプスイメージングを組み合わせたラベルフリー四次元細胞顕微鏡法を用いて、細胞培養試験を実施する。具体的に、異なる周期の間欠的圧縮刺激が三次元メラノーマモデルにおけるメラノーマ単一細胞の細胞形態分布に与える影響を調査した。ラベルフリー四次元細胞計算顕微鏡法では、1枚の位相差顕微鏡像から三次元細胞形状をSTCMによって計測し、タイムラプス撮像によって取得した時系列画像にSTCMを連続的に適用する。

## 5.2.2 試料および実験方法

本実験では、異なる周期の間欠的圧縮刺激が三次元メラノーマモデルにおけるメラノーマ単一細胞の応答性に与える影響を調査した。三次元メラノーマモデルは I 型コラーゲンゲルに B16F10 細胞を三次元分散培養させた培養モデルである。本実験で用いる三次元メラノーマモデルは、3.2 節に記載した手順に従って最終濃度 2.4 mg/ml に調整した I 型コラーゲン中性溶液に対して、 $6.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>3</sup> の濃度で B16F10 細胞を懸濁しゲル化させることで構築した。試料群は 5.1 節と同様に、 $7.7 \times 10^2$  Pa の圧縮刺激を 2 時間印加および 2 時間除荷する 4 時間周期の間欠的圧縮刺激群 (T=4 群) と、4 時間印加および 4 時間除荷する 8 時間周期の間欠的圧縮刺激群 (T=8 群) および圧縮刺激を印加しない control 群を用意した。

間欠的圧縮刺激が細胞形態に与える影響の定量的評価に向けて、ラベルフリー四次元細胞計算顕微鏡法を用いて各時刻における三次元細胞形状を測定した。STCM による細胞形状の測定では、位相差顕微鏡像から細胞領域を含む正方形領域 (32 × 32 pixels) を切り出し、位相差顕微鏡像のデータ範囲を [0, 1] の範囲に変換する Min-max 正規化を実施した。変換培養期間は 24 時間とし、培養開始時点から 2 時間ごとに位相差顕微鏡像を用いてタイムラプス撮像した。細胞形態は次式のように定義される三次元細胞形態指標 (three-dimensional cell morphology index: 3D-CMI) を用いて評価した。

$$\text{Three dimensional cell morphology index} = \frac{S^{\frac{3}{2}}}{6\sqrt{\pi} \cdot V} \quad (5.5)$$

ここで、 $V$  は細胞体積、 $S$  は細胞表面積である。三次元細胞形態指標は 1 に近いほど球体に近く、1 より大きいほど複雑な形状であることを示す。細胞体積および細胞表面積は、MATLAB の Image Processing ToolBox (Version 11.2) を用いて測定した。

間欠的圧縮刺激が細胞形態分布に与える影響の定量的評価に向けて、5.1 節と同様に、GMM を用いて細胞形態分布に対する混合ガウス分布の推定を行った。ガウス分布数は 5.1 節で得られた結果に基づき 3 に設定した。それぞれの時刻において測定された細胞形態分布に対して最も適合度の高い混合ガウス分布を推定し、クラスタに属する細胞数割合を試料群ごとに算出することで各時刻における細胞形態分布を評価した。各時刻  $t$  におけるそれぞれのクラスタの細胞数割合を  $r_t^i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) とし、開始時点に対する細胞数割合の変化分  $\Delta r_t^i$  を次式を用いて算出した。

$$\Delta r_t^i = r_t^i - r_0^i \quad (5.6)$$

続いて、それぞれの試料群における変化分 $\Delta r_t^i$ を control 群で規格化し、次式のように定義される $\Delta\Delta r_t^i$ を算出した。

$$\Delta\Delta r_t^i = (\Delta r_t^i)_{target} - (\Delta r_t^i)_{control} \quad (5.7)$$

ここで、 $(\Delta r_t^i)_{target}$ は間欠的圧縮刺激を加えた試料における変化分 $\Delta r_t^i$ を、 $(\Delta r_t^i)_{control}$ は刺激を印加しない control 群における変化分 $\Delta r_t^i$ である。 $\Delta\Delta r_t^i$ は control 群に対する試料群の細胞形態分布変化の増減を表す。

### 5.2.3 結果および考察

それぞれのクラスタに属する代表的な位相差顕微鏡像および STCM によって再構築された三次元細胞形状を図 5.2 に示す. 図 5.2 上段に示される各クラスタにおける代表的な細胞形状と 5.1 節の考察を考慮すると, Cluster1 はアメーバ系様式, Cluster2 は間葉系様式, Cluster3 はハイブリッド表現型であると推察される. 図 5.2 下段に示される uncertainty quantification の結果より, Cluster1 の代表的な三次元細胞形状はランクとしては比較的下位に位置する一方で低い uncertainty を示すことが認められた. また, Cluster2 の代表的な三次元細胞形状は比較的上位のランクに位置し, Cluster3 の代表的な三次元細胞形状は比較的上位のランクに位置すると同時に低い uncertainty を示すことが認められた. 以上の結果から, 図 5.2 上段に示した三次元細胞形状がそれぞれ属するクラスタの代表的な形状であることが示された.

control 群, T=4 群および T=8 群における, 各時刻でのそれぞれのクラスタの細胞数割合  $r_t^i$  の時間変化を図 5.3 に示す. それぞれの試料群で細胞数割合が時間経過に伴って変動する様子が認められた. 本結果は, 三次元細胞形状が可逆的に変動する表現型可塑性が生じていることを示す. 続いて, T=4 群および T=8 群における, control 群に対する細胞形態分布変化の増減の時系列変化  $\Delta\Delta r_t^i$  をそれぞれ図 5.4a および図 5.4b に示す. T=4 群においては細胞形態分布が振動する傾向が認められた. 一方で, T=8 群においては細胞形態がアメーバ系様式からハイブリッド表現型に移行する傾向が認められた. これらの結果は, 間欠的圧縮刺激の周期に依存して細胞形態分布の時間的変化が異なることを示しており, 変動する機械的圧縮刺激に対してハイブリッド表現型の発現が時間的に変動することを初めて明らかにした.

細胞形態分布の時間的な変化を考察する. 細胞生存や増殖, 遊走, 浸潤などの特異的な表現型獲得に重要な役割を担う Notch-Hes シグナル伝達経路[164]は, 約 2 時間周期で周期的に活性化することが知られている[165]–[167]. また, 細胞内転写因子の発現を制御する NF- $\kappa$ B は, 細胞質と細胞核間を周期的に移行し遺伝子発現を数時間周期で振動させることが報告されている[168], [169]. 近年, 機械的刺激は Notch-Hes シグナル伝達経路の活性化[170]–[173]や NF- $\kappa$ B の活性化[174]–[177]に直接的な影響を及ぼすことが明らかとなってきた, これらの知見から, 2 時間印加および 2 時間除荷する間欠的圧縮刺激は, Notch-Hes シグナルや NF- $\kappa$ B の振動発現に同期し, 獲得表現型を振動させた可能性がある. ここで, Hes 遺伝子の振動現象そのものが細胞増殖や分化にとって重要な役割を担っており



[178], [179], 振動発現を失い持続的に過剰発現した Hes 遺伝子はマウス ES 細胞を単一の分化方向に誘導することが報告されている[180], [181]. 細胞種が異なるため詳細なメカニズムは不明であるが, 4 時間印加および 4 時間除荷する間欠的圧縮刺激は Notch-Hes シグナルの発現振動を収束させたことで, 単一方向の分化を誘導した可能性がある.

第 4 章および第 5 章の結果を踏まえ, 本研究成果から考察できる臨床に反映できる知見について述べる. 4 時間周期の間欠的圧縮刺激は,

- 細胞集団における進展速度の抑制
- 単一細胞における細胞形態分布の振動

を誘導した. これらの知見は, 細胞周囲の環境に対する細胞の適応が収束する前に新たな力学的環境を強制的に構築することで, 再び細胞を力学的環境への適応期間に巻き戻し, 細胞遊走や浸潤のための細胞表現型に変化させずにメラノーマの進展速度を抑制するような新たなメカノバイオロジー的治療法の確立に寄与する可能性がある. ただし, 細胞形態を振動させることは表現型可塑性を高めることと等価であり, 表現型可塑性は薬物療法に対するメラノーマの治療抵抗性を高めてしまう. そのため, メカノバイオロジー的治療法による進展速度の抑制は, 転移段階への移行を予防するような予防医療もしくは緩和医療としての臨床的な価値を生み出すと考えられる. 一方で, 8 時間周期の間欠的圧縮刺激は,

- 細胞集団における進展速度の促進
- 単一細胞における単一方向の分化

を誘導した. 単一方向の分化誘導は, 治療抵抗性を誘導する表現型可塑性を低減させることと等価であり, 分化先の表現型に有効な薬剤を投与することでより効果的に細胞死を誘導することができる. 8 時間周期の間欠的圧縮刺激と薬剤を併用することで, 高い奏効率を示す治療法を確立できる可能性がある. ただし, メラノーマの進展速度の促進は転移段階への移行を早めてしまうため, 転移を予防する治療法との併用も必要不可欠となる.

以上, 4 時間周期の間欠的圧縮刺激はメラノーマ細胞の細胞形態分布を振動させ, 8 時間周期の間欠的圧縮刺激はメラノーマ細胞の単一方向の分化を誘導させることを明らかにした. 本実験によって, 間欠的圧縮刺激の周期に依存して三次元的な細胞形態分布の時間的な変化が異なることを示し, 変動する機械的圧縮刺激に対してハイブリッド表現型の発現が時間的に変動することを初めて明らかにした. 5.1 節で述べたように, ハイブリッド表現型はその応答性が未知な表現型である. 変動する機械的圧縮刺激に対するハイブリッド表現

型の時間的变化を初めて捉えた本研究の成果は、基礎生物学分野の発展への寄与が期待される。また、本実験で確立したラベルフリー四次元細胞計算顕微鏡法は光散乱性ハイドロゲル内の三次元細胞形状の時間変化をラベルフリーに計測する汎用的な方法論であるため、基礎生物学だけでなく生物工学や生物医学などの応用生物学分野に対して極めて高い波及効果をもたらす。

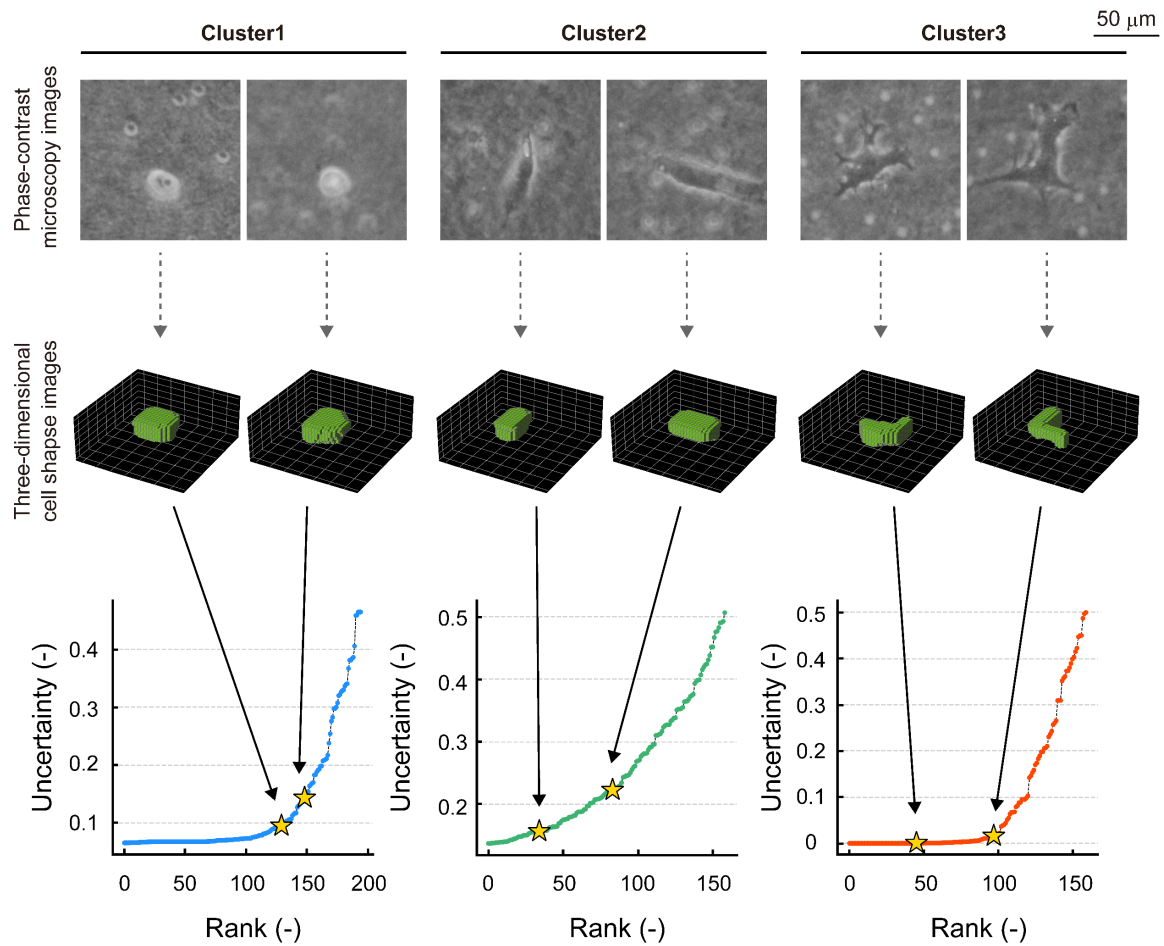


Fig. 5.2 Representative phase-contrast microscopy images and three-dimensional cell shape images reconstructed by STCM at 12 h culture duration. The bottom row shows the uncertainty plot for each cluster. The star-shaped plots show the uncertainty in each of the representative three-dimensional cell shape images shown in the middle row.

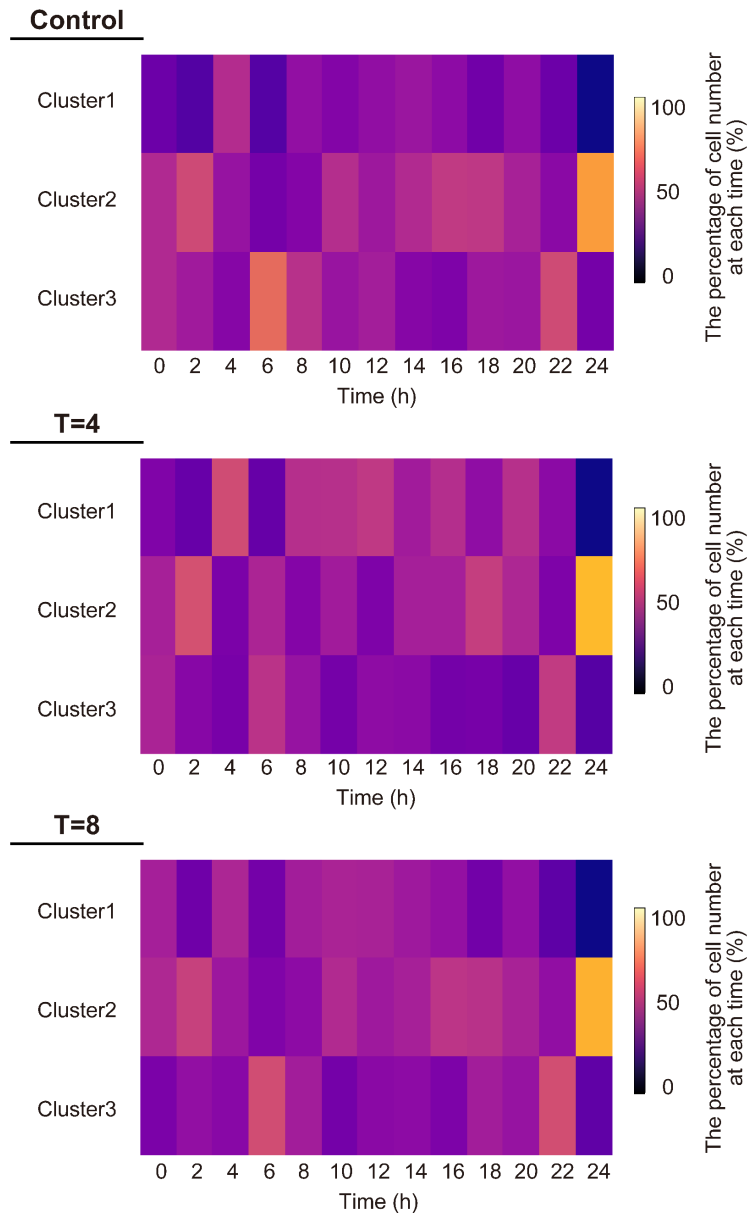


Fig. 5.3 Time-course change of the percentage of cell number in each cluster at control, T=4, T=8 group.

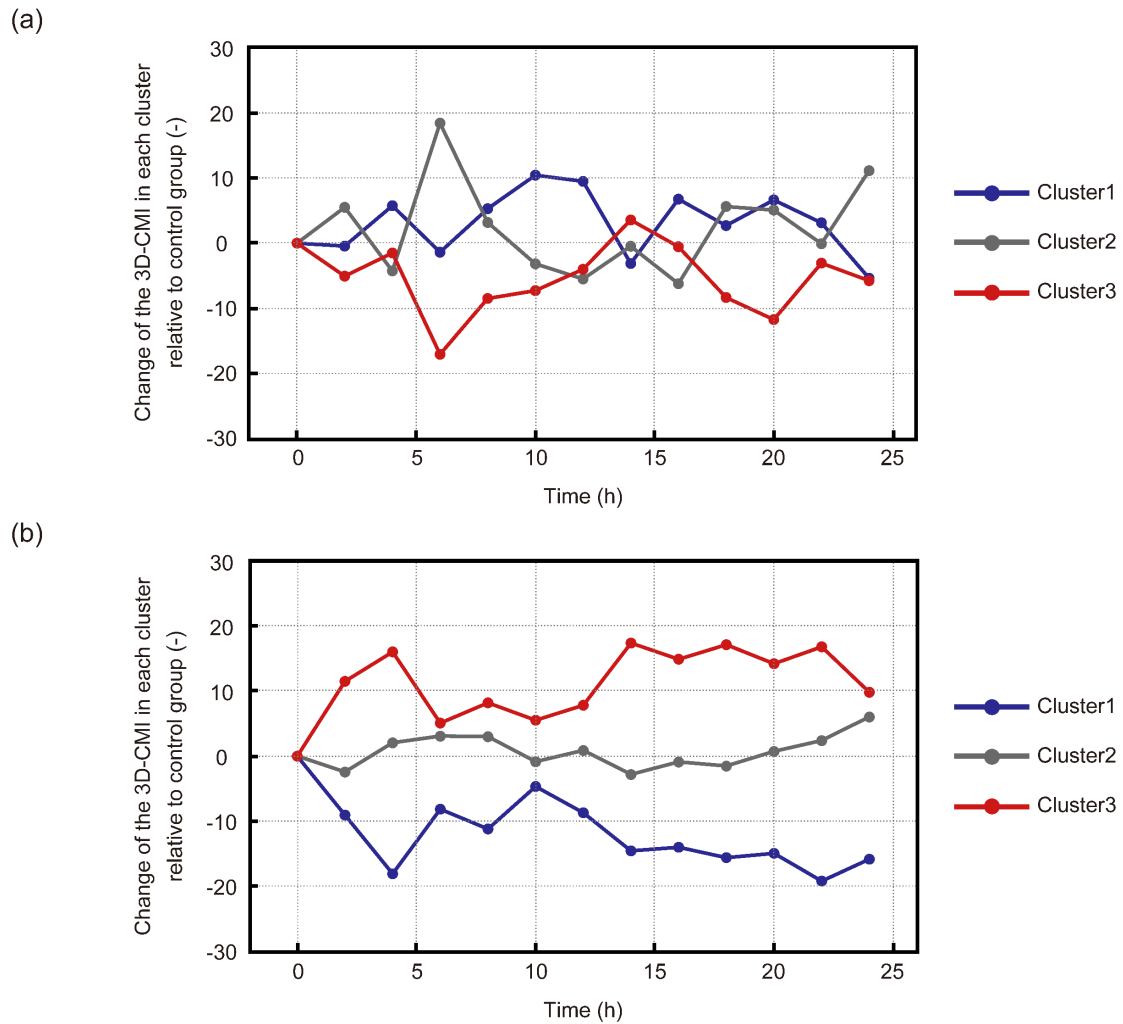


Fig. 5.4 Phenotypic plasticity of melanoma cells in three-dimensional cell culture model under the intermittent mechanical compression. (a) Time-course change of the three-dimensional cell morphology index (3D-CMI) in each cluster relative to control group at T=4 group. (b) Time-course change of the 3D-CMI in each cluster relative to control group at T=8 group. The average number of analyzed cells at each time point in whole groups was approximately 516 cells.

## 第6章 結言

### 6.1 結論

本研究では、変動する機械的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞の応答性を細胞集団レベルおよび単一細胞レベルで解明することを目的とし、時系列情報を取得可能な機械的圧縮刺激印加培養装置および光散乱性ハイドロゲル内の細胞形状変化を取得可能なラベルフリー四次元細胞顕微鏡法を確立した。確立した方法論をもって、時間スケールで変動する間欠的圧縮刺激に対するメラノーマ細胞集団およびメラノーマ単一細胞の応答性を調査した。結果、以下の結論を得た。

- 圧縮刺激印加と栄養供給および光路確保を両立する機構を考案したことで、時系列情報を取得可能な機械的圧縮刺激印加培養装置を開発した。
- 新たに開発した双方向符号化理論に基づく情報損失のない可逆的な次元変換法を構築したことで、高精度なシングルショット三次元細胞計算顕微鏡法の構築に成功した。タイムラプスイメージングと組み合わせることで、光散乱性ハイドロゲル内の細胞形状変化を取得可能なラベルフリー四次元細胞顕微鏡法の確立を可能にした。
- 間欠的圧縮刺激の周期に依存してメラノーマ細胞集団の進展速度が変化することを明らかにした。
- 間欠的圧縮刺激の周期に依存して二次元的な細胞形態分布および三次元的な細胞形態分布の時間的変化が異なることを示した。特に、未知な表現型であるハイブリッド表現型の発現が、変動する機械的圧縮刺激に対して周期依存的に変化することを明らかにした。

以上、細胞集団レベルおよび単一細胞レベルいずれにおいても、メラノーマ細胞は変動する機械的圧縮刺激に対して周期依存的な応答性を示すことを明らかにした。開発した機械的圧縮刺激印加培養装置は簡便かつ低コストな方法論でもあるため高い汎用性がある。双方向符号化理論に基づく可逆的な次元変換法は、情報損失のない次元圧縮を達成したこと

で、高次元データを取り扱う機械学習分野や情報源符号化および暗号化技術を取り扱う情報工学分野において高い波及効果が期待される。深層学習ベースのシングルショット三次元細胞顕微鏡法は、光散乱性ハイドロゲル内に包埋された三次元細胞形状をシングルショットで高精度にイメージングすることを初めて可能にしたことで、顕微鏡分野を基軸として細胞生物学や生物工学など幅広い学際領域の発展に貢献する。また、情報工学の伝統的な知見に基づいた新たな可逆的次元変換法を用いて、三次元形状推測タスクを画像対画像変換タスクに再定義し高精度な深層学習モデルを構築するというユニークなアプローチは、深層学習分野の発展に寄与することが期待される。汎用な位相差顕微鏡によるタイムラプスイメージングと組み合わせたラベルフリー四次元細胞顕微鏡法は汎用性の高い方法論であり、基礎生物学だけでなく生物工学や生物医学などの応用生物学分野に対して高い波及効果をもたらす。そして、未だ不明な部分の多いハイブリッド表現型の発現が、変動する機械的圧縮刺激の周期に依存して劇的に変化することを明らかにした本研究の成果は、メラノーマ細胞の深い理解につながるだけでなく、細胞生物学や腫瘍学などの基礎生物学において重要な知見を新たに提示する。

## 6.2 今後の展望

第2章において、時系列情報を取得可能な機械的圧縮刺激印加培養装置を開発した。本研究においては圧縮荷重部の円筒状錘を手動で設置または除去していたが、この機構を自動制御することで様々な周期の機械的圧縮刺激を印加することができるようになる。

第3章において、情報損失のない可逆的次元変換法を開発した。データ圧縮率の理論導出において次元圧縮後にデータ量が増加することが示されたが、計算機上の任意精度演算における浮動小数点形式を変更することで、データ量の増加を抑制できる可能性がある。また、基数変換過程において計算量の少ないアルゴリズムを採用すれば、計算時間の短縮に繋がる。可逆的次元変換法は、非負整数値で格納されたデータであれば、理論上どのような次元のデータであっても一次元下の空間に情報を埋め込むことができる。本研究においては三次元形状を二次元空間に埋め込んだが、動画像などの三次元行列で表現されるデータも二次元空間に埋め込むことができるため、動画像に対する演算処理の計算時間を短縮することができる可能性がある。シングルショット三次元細胞計算顕微鏡法の開発では汎用な `pix2pix` モデルを利用したが、画像対画像変換タスクを実行する深層学習技術の発展は著しいため、`pix2pixHD` や `PGGAN` など最先端のモデルを利用すればさらなる精度向上が期待できる。また、`pix2pix` モデルのような畳み込み演算に基づくアーキテクチャではなく、`TransGAN` や `GPT-3` など畳み込み演算を用いない `Transformer` アーキテクチャを利用すれば精度が向上する可能性がある。ラベルフリー四次元細胞計算顕微鏡法に関して、本研究では時間オーダの時間分解能におけるタイムラプス撮像を実施したが、ビデオレート位相差顕微鏡などを用いて時間分解能を短くすれば、従来の方法論では測定できなかったような細胞挙動の高速現象を発見できる可能性がある。

第4章および第5章において、間欠的圧縮刺激がメラノーマ細胞の応答性に与える影響を評価した。本研究では未知なハイブリッド表現型の形態学的評価を実施したが、細胞内における分子生物学的反応を時空間的かつ網羅的に解析する時空間トランスクリプトームと組み合わせることで、ハイブリッド表現型に関するさらなる深い理解を得ることができる。また、三次元的な広がりを持つ細胞形状に対して、アスペクト比や角度など様々な指標による解析を実施することで、新たな知見の提示に繋がる可能性がある。



## 謝辞

本研究は、筆者が慶應義塾大学大学院理工学研究科後期博士課程在学中に、同大学理工学部宮田昌悟准教授の指導のもとに行ったものである。宮田先生には学部4年生から博士3年生までの6年間、研究のイロハから研究の楽しさまで懇切丁寧にご指導いただきました。興味の対象が発散してしまう癖のある私を何度も軌道修正していただいたおかげで、この博士論文があります。宮田先生に頂いた多くの学びをこれからも大切にしながら、研究者人生を歩んでいきたいと思えます。本誌面を借りて、心より深く御礼申し上げます。

尾上弘晃教授、須藤亮教授、舟橋啓准教授および塚本哲准教授には、大変ご多用にも関わらず副査をご快諾いただきまして誠にありがとうございました。また、日ごろから大変お世話になっております小茂鳥潤教授、竹村研治郎教授、三木則尚教授、浅井誠特任教授および高橋英俊専任講師にも深く御礼申し上げます。

そして、共同研究において何度も深いディスカッションをさせていただきました舟橋啓准教授、山田貴大専任講師および徳岡雄大さんには、改めて深く感謝申し上げたいと思えます。研究に関する白熱したご指導を幾度となく頂戴しただけでなく、舟橋研究室の皆様との何気ない会話にいつも快く受け入れくださったこと、心から感謝しております。桜の木の下で得た皆様とのご縁に深く感謝しながら、今後も変わらぬお付き合いをさせていただきたいと思っています。

倉科佑太助教や今城哉裕さん、白怜士助教、善明大樹さんをはじめとして深く深くご指導いただきました先輩方、日ごろのささやかな喜びを与えてくださった研究室の同期や後輩達、そして何より日々切磋琢磨させて頂いた博士同期の長友竜帆君、板井駿君、難波江佑介君にも、深く感謝申し上げたいと思えます。

最後に、メラノーマに対する固い信念を授けてくれた愛犬、何かと抜けていることの多い私を28年間支えてくださった家族、そしてこれから新たな家族として一緒に人生を歩む妻に対して、心からの深い御礼と感謝の意を示したいと思えます。博士課程までの長い道のりに付き添っていただいた皆様への感謝と、これから先の未知なる世界に期待を込めて結びとさせていただきます。

## 参考文献

- [1] E. De Vries, F. I. Bray, J. W. W. Coebergh, and D. M. Parkin, “Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: Rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia,” *Int. J. Cancer*, vol. 107, no. 1, pp. 119–126, 2003.
- [2] A. Stang, E. Pukkala, R. Sankila, B. Söderman, and T. Hakulinen, “Time trend analysis of the skin melanoma incidence of Finland from 1953 through 2003 including 16,414 cases,” *Int. J. Cancer*, vol. 119, no. 2, pp. 380–384, 2006.
- [3] D. Koh, H. Wang, J. Lee, K. S. Chia, H. P. Lee, and C. L. Goh, “Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the skin: Analysis of the Singapore Cancer Registry data 1968-97,” *Br. J. Dermatol.*, vol. 148, no. 6, pp. 1161–1166, 2003.
- [4] E. A. Rozeman, T. J. A. Dekker, J. B. A. G. Haanen, and C. U. Blank, “Advanced Melanoma: Current Treatment Options, Biomarkers, and Future Perspectives,” *Am. J. Clin. Dermatol.*, vol. 19, no. 3, pp. 303–317, 2018.
- [5] L. Serrone, M. Zeuli, F. M. Segà, and F. Cognetti, “Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview.,” *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 21–34, 2000.
- [6] G. Cocconi *et al.*, “Treatment of Metastatic Malignant Melanoma with Dacarbazine plus Tamoxifen,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 327, no. 8, pp. 516–523, 1992.
- [7] S. Abhyankar, S. P. Rao, L. Pollio, and S. T. Miller, “Anaphylactic Shock due to Dacarbazine (NSC 45388),” *Am. J. Dis. Child.*, vol. 142, no. 9, doi: 10.1001/archpedi.1988.02150090016009, 1988.
- [8] M. Durymanov, A. Permyakova, and J. Reineke, “Pre-treatment With PLGA/Silibinin Nanoparticles Mitigates Dacarbazine-Induced Hepatotoxicity,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, doi: 10.3389/fbioe.2020.00495, 2020.
- [9] G. J. Hill, E. T. Kremenz, and H. Z. Hill, “Dimethyl triazeno imidazole carboxamide and combination therapy for melanoma IV. Late results after complete response to chemotherapy (central oncology group protocols 7130, 7131, and 7131A),” *Cancer*, vol. 53, no. 6, pp. 1299–1305, 1984.

- [10] S. Y. Morita and S. N. Markovic, "Molecular targets in melanoma: Time for 'ethnic personalization," *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 12, no. 5, pp. 601–608, 2012.
- [11] P. A. Ascierto *et al.*, "The role of BRAF V600 mutation in melanoma," *J. Transl. Med.*, vol. 10, no. 1, pp. 1-9, 2012.
- [12] M. P. Rausch and K. T. Hastings, "Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Melanoma: From Basic Science to Clinical Application," *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*, Codon Publications, Chapter 9, pp. 121–142, 2017.
- [13] M. S. Carlino, J. Larkin, and G. V. Long, "Immune checkpoint inhibitors in melanoma," *Lancet*, vol. 398, no. 10304, pp. 1002–1014, 2021.
- [14] R. L. Bowman *et al.*, "UVB mutagenesis differs in Nras- And Braf-mutant mouse models of melanoma," *Life Sci. Alliance*, vol. 4, no. 9, doi: 10.26508/lsa.202101135, 2021.
- [15] R. C. Hennessey *et al.*, "Ultraviolet radiation accelerates NRas-mutant melanomagenesis: A cooperative effect blocked by sunscreen," *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 30, no. 5, pp. 477–487, 2017.
- [16] A. Besaratinia and G. P. Pfeifer, "Sunlight ultraviolet irradiation and BRAF V600 mutagenesis in human melanoma," *Hum. Mutat.*, vol. 29, no. 8, pp. 983–991, 2008.
- [17] A. Viros *et al.*, "Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53," *Nature*, vol. 511, no. 7510, pp. 478–482, 2014.
- [18] A. Platz, S. Egyhazi, U. Ringborg, and J. Hansson, "Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site," *Mol. Oncol.*, vol. 1, no. 4, pp. 395–405, 2008.
- [19] M. V. Heppt *et al.*, "Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care," *BMC Cancer*, vol. 17, no. 1, p. 536, 2017.
- [20] J. Larkin *et al.*, "Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 381, no. 16, pp. 1535–1546, 2019.
- [21] H. Hammers and C. Robert, "Immune checkpoint inhibitors in melanoma in the metastatic, neoadjuvant, and adjuvant setting," *Curr. Opin. Oncol.*, vol. 32, no. 2, pp. 106–113, 2020.
- [22] J. Mackiewicz and A. Mackiewicz, "BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients," *Contemp. Oncol.*, vol. 22, no. 1A, pp. 68-72, 2018.

- [23] T. Fujimura, Y. Fujisawa, Y. Kambayashi, and S. Aiba, “Significance of BRAF Kinase Inhibitors for Melanoma Treatment: From Bench to Bedside,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 9, doi: 10.3390/cancers11091342, 2019.
- [24] J. W. Hong, S. Lee, D. C. Kim, K. H. Kim, and K. H. Song, “Prognostic and clinicopathologic associations of BRAF mutation in primary acral lentiginous melanoma in Korean patients: A preliminary study,” *Ann. Dermatol.*, vol. 26, no. 2, pp. 195–202, 2014.
- [25] F. Tas and K. Erturk, “Acral Lentiginous Melanoma Is Associated with Certain Poor Prognostic Histopathological Factors but May Not be Correlated with Nodal Involvement, Recurrence, and a Worse Survival,” *Pathobiology*, vol. 85, no. 4, pp. 227–231, 2018.
- [26] N. K. Hayward *et al.*, “Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes,” *Nature*, vol. 545, no. 7653, pp. 175–180, 2017.
- [27] J. W. C. Chang, “Acral melanoma: A unique disease in Asia,” *JAMA Dermatology*, vol. 149, no. 11, pp. 1272–1273, 2013.
- [28] J. A. Curtin *et al.*, “Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no. 20, pp. 2135–2147, 2005.
- [29] A. Minagawa, T. Omodaka, and R. Okuyama, “Melanomas and Mechanical Stress Points on the Plantar Surface of the Foot,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 374, no. 24, pp. 2404–2406, 2016.
- [30] Y. J. Liu *et al.*, “Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells,” *Cell*, vol. 160, no. 4, pp. 659–672, 2015.
- [31] K. Montagne, H. Uchiyama, K. S. Furukawa, and T. Ushida, “Hydrostatic pressure decreases membrane fluidity and lipid desaturase expression in chondrocyte progenitor cells,” *J. Biomech.*, vol. 47, no. 2, pp. 354–359, 2014.
- [32] D. Yoshino and M. Sato, “Early-stage dynamics in vascular endothelial cells exposed to hydrostatic pressure,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 141, no. 9, 2019.
- [33] K. Kaarj and J. Y. Yoon, “Methods of Delivering Mechanical Stimuli to Organ-on-a-Chip,” *Micromachines*, vol. 10, no. 10, doi: 10.3390/mi10100700, 2019.
- [34] K. K. Y. Ho, Y. L. Wang, J. Wu, and A. P. Liu, “Advanced microfluidic device designed for cyclic compression of single adherent cells,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, no. 148, doi: 10.3389/fbioe.2018.00148, 2018.

- [35] Y. Wang *et al.*, “Mechanical compaction directly modulates the dynamics of bile canaliculi formation,” *Integr. Biol. (United Kingdom)*, vol. 5, no. 2, pp. 390–401, 2013.
- [36] V. Lulevich, T. Zink, H. Y. Chen, F. T. Liu, and G. Y. Liu, “Cell mechanics using atomic force microscopy-based single-cell compression,” *Langmuir*, vol. 22, no. 19, pp. 8151–8155, 2006.
- [37] J. Zemła, J. Danilkiewicz, B. Orzechowska, J. Pabijan, S. Seweryn, and M. Lekka, “Atomic force microscopy as a tool for assessing the cellular elasticity and adhesiveness to identify cancer cells and tissues,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 73, pp. 115–124, 2018.
- [38] Y. Nakashima, Y. Yang, and K. Minami, “Development of a micro cell compression stimulator for evaluating real-time cellular responses,” *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 83, no. 5, doi: 10.1063/1.4717683, 2012.
- [39] F. Si, B. Li, W. Margolin, and S. X. Sun, “Bacterial growth and form under mechanical compression,” *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, 2015.
- [40] S. H. Park, W. Y. Sim, B. H. Min, S. S. Yang, A. Khademhosseini, and D. L. Kaplan, “Chip-Based Comparison of the Osteogenesis of Human Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells under Mechanical Stimulation,” *PLoS One*, vol. 7, no. 9, doi: 10.1371/journal.pone.0046689, 2012.
- [41] J. M. Tse *et al.*, “Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 3, pp. 911–916, 2012.
- [42] G. R. Kidiyoor *et al.*, “ATR is essential for preservation of cell mechanics and nuclear integrity during interstitial migration,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, 2020.
- [43] L. Bruckner-Tuderman, K. Von Der Mark, T. Pihlajaniemi, and K. Unsicker, “Cell interactions with the extracellular matrix,” *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 1–5, 2010.
- [44] F. Rosso, A. Giordano, M. Barbarisi, and A. Barbarisi, “From Cell-ECM Interactions to Tissue Engineering,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 199, no. 2, pp. 174–180, 2004.
- [45] R. Dixit and R. Cyr, “Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: Effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy,” *Plant J.*, vol. 36, no. 2, pp. 280–290, 2003.
- [46] T. Bernas, M. Zarebski, R. R. Cook, and J. W. Dobrucki, “Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin: Role of anoxia and photon flux,” *J. Microsc.*, vol. 215, no. 3, pp. 281–296, 2004.

- [47] B. F. Godley, F. A. Shamsi, F. Q. Liang, S. G. Jarrett, S. Davies, and M. Boulton, "Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 22, pp. 21061–21066, 2005.
- [48] G. Zonios, A. Dimou, I. Bassukas, D. Galaris, A. Tsolakidis, and E. Kaxiras, "Melanin absorption spectroscopy: new method for noninvasive skin investigation and melanoma detection," *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–8, 2008.
- [49] A. Sparsa *et al.*, "Blue light is phototoxic for B16F10 murine melanoma and bovine endothelial cell lines by direct cytotoxic effect.," *Anticancer Res.*, vol. 30, no. 1, pp. 143–147, Jan. 2010.
- [50] P. S. Oh *et al.*, "Effect of blue light emitting diodes on melanoma cells: Involvement of apoptotic signaling," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 142, pp. 197–203, 2015.
- [51] Y. Liu, K. Ai, J. Liu, M. Deng, Y. He, and L. Lu, "Dopamine-melanin colloidal nanospheres: An efficient near-infrared photothermal therapeutic agent for in vivo cancer therapy," *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 9, pp. 1353–1359, 2013.
- [52] Q. Jiang *et al.*, "Erythrocyte-cancer hybrid membrane-camouflaged melanin nanoparticles for enhancing photothermal therapy efficacy in tumors," *Biomaterials*, vol. 192, pp. 292–308, 2019.
- [53] V. Elser, "Phase retrieval by iterated projections," *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 20, no. 1, pp. 40–55, 2003.
- [54] R. W. Gerchberg, "A practical algorithm for the determination of phase from image and diffraction plane pictures," *Optik (Stuttg.)*, vol. 35, pp. 237–246, 1972.
- [55] T. E. Gureyev, A. Roberts, and K. A. Nugent, "Partially coherent fields, the transport-of-intensity equation, and phase uniqueness," *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 12, no. 9, pp. 1942–1946, 1995.
- [56] C. Dorrer and J. D. Zuegel, "Optical testing using the transport-of-intensity equation," *Opt. Express*, vol. 15, no. 12, pp. 7165–7175, 2007.
- [57] N. Streibl, "Phase imaging by the transport equation of intensity," *Opt. Commun.*, vol. 49, no. 1, pp. 6–10, 1984.
- [58] C. Dalitz, R. Pohle-Fröhlich, and T. Michalk, "Point spread functions and deconvolution of ultrasonic images," *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 62, no. 3, pp. 531–544, 2015.

- [59] A. K. Dunn, C. L. Smithpeter, A. J. Welch, and R. R. Richards-Kortum, “Finite-difference time-domain simulation of light scattering from single cells,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 2, no. 3, pp. 262–266, 1997.
- [60] R. Drezek, A. Dunn, and R. Richards-Kortum, “A pulsed finite-difference time-domain (FDTD) method for calculating light scattering from biological cells over broad wavelength ranges,” *Opt. Express*, vol. 6, no. 7, pp. 147-157, 2000.
- [61] A. K. Glaser, Y. Chen, and J. T. C. Liu, “Fractal propagation method enables realistic optical microscopy simulations in biological tissues,” *Optica*, vol. 3, no. 8, pp. 861-869, 2016.
- [62] J. Van Roey, J. van der Donk, and P. E. Lagasse, “Beam-propagation method: analysis and assessment.,” *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 71, no. 7, pp. 803–810, 1981.
- [63] B. Chen, K. Stamnes, and J. J. Stamnes, “Validity of the diffusion approximation in bio-optical imaging,” *Appl. Opt.*, vol. 40, no. 34, pp. 6356-6366, 2001.
- [64] K. Kwon, “The Second-Order Born Approximation in Diffuse Optical Tomography,” *J. Appl. Math.*, vol. 2012, doi: 10.1155/2012/637209, 2012.
- [65] A. A. Arun Anand and B. J. Bahram Javidi, “Digital holographic microscopy for automated 3D cell identification: an overview (Invited Paper),” *Chinese Opt. Lett.*, vol. 12, no. 6, pp. 060012–060017, 2014.
- [66] M. Huang, H. Qin, and Z. Jiang, “Real-time quantitative phase imaging by single-shot dual-wavelength off-axis digital holographic microscopy,” *Appl. Opt.*, vol. 60, no. 15, pp. 4418-4425, 2021.
- [67] H. Sun *et al.*, “Visualization of fast-moving cells in vivo using digital holographic video microscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 13, no. 1, doi: 10.1117/1.2841050, 2008.
- [68] T. I. Anderson, B. Vega, J. McKinzie, S. A. Aryana, and A. R. Kovscek, “2D-to-3D image translation of complex nanoporous volumes using generative networks,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, 2021.
- [69] H. Zhuge, B. Summa, J. Hamm, and J. Q. Brown, “Deep learning 2D and 3D optical sectioning microscopy using cross-modality Pix2Pix cGAN image translation,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 12, no. 12, pp. 7526-7543, 2021.
- [70] Y. Wu *et al.*, “Three-dimensional virtual refocusing of fluorescence microscopy images using deep learning,” *Nat. Methods*, vol. 16, no. 12, pp. 1323–1331, 2019.

- [71] B. J. Blundell, C. Sieben, S. Manley, E. Rosten, Q. Ch'ng, and S. Cox, "3D Structure from 2D Microscopy images using Deep Learning," *Front. Bioinforma.*, vol. 1, doi: 10.3389/fbinf.2021.740342, 2021.
- [72] J. Sapudom, J. Waschke, K. Franke, M. Hlawitschka, and T. Pompe, "Quantitative label-free single cell tracking in 3D biomimetic matrices," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, 2017.
- [73] X. F. Han, H. Laga, and M. Bennamoun, "Image-based 3d object reconstruction: State-of-the-art and trends in the deep learning era," *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.*, vol. 43, no. 5, pp. 1578–1604, 2021.
- [74] C. B. Choy, D. Xu, J. Y. Gwak, K. Chen, and S. Savarese, "3D-R2N2: A unified approach for single and multi-view 3D object reconstruction," *arXiv*, arXiv:1604.00449, 2016.
- [75] H. Xie, H. Yao, X. Sun, S. Zhou, and S. Zhang, "Pix2Vox: Context-aware 3D Reconstruction from Single and Multi-view Images," *arXiv*, arXiv:1901.11153, 2019.
- [76] H. Xie, H. Yao, S. Zhang, S. Zhou, and W. Sun, "Pix2Vox++: Multi-scale Context-aware 3D Object Reconstruction from Single and Multiple Images," *Int. J. Comput. Vis.*, vol. 128, no. 12, pp. 2919–2935, 2020.
- [77] A. Johnston and G. Carneiro, "Single View 3D Point Cloud Reconstruction using Novel View Synthesis and Self-Supervised Depth Estimation," in *Proceedings of 2019 Digital Image Computing: Techniques and Applications (DICTA)*, pp. 1-8, 2019.
- [78] D. Jarrett and M. van der Schaar, "Target-Embedding Autoencoders for Supervised Representation Learning," *arXiv*, arXiv:2001.08345., 2020.
- [79] P. Isola, J. Y. Zhu, T. Zhou, and A. A. Efros, "Image-to-image translation with conditional adversarial networks," *arXiv*, arXiv:1611.07004., 2017.
- [80] J. Y. Zhu, T. Park, P. Isola, and A. A. Efros, "Unpaired Image-to-Image Translation Using Cycle-Consistent Adversarial Networks," in *Proceedings of the IEEE International Conference on Computer Vision*, pp. 2223–2232, 2017.
- [81] T. Karras, T. Aila, S. Laine, and J. Lehtinen, "Progressive growing of GANs for improved quality, stability, and variation," *arXiv*, arXiv:1710.10196., 2018.
- [82] C. O. S. Sorzano, J. Vargas, and A. P. Montano, "A survey of dimensionality reduction techniques," *arXiv*, arXiv:1403.2877, 2014.



- [83] S. Velliangiri, S. Alagumuthukrishnan, and S. I. Thankumar Joseph, “A Review of Dimensionality Reduction Techniques for Efficient Computation,” *Procedia Comput. Sci.*, vol. 165, pp. 104–111, 2019.
- [84] Z. Pei *et al.*, “Occluded-object 3D reconstruction using camera array synthetic aperture imaging,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 3, pp. 1–22, 2019.
- [85] N. D. Reddy, M. Vo, and S. G. Narasimhan, “Occlusion-net: 2D/3D occluded keypoint localization using graph networks,” in *Proceedings of the IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, pp. 7326–7335, 2019.
- [86] D. T. Butcher, T. Alliston, and V. M. Weaver, “A tense situation: Forcing tumour progression,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 2, pp. 108–122, 2009.
- [87] X. Hong, J. P. Stegemann, and C. X. Deng, “Microscale characterization of the viscoelastic properties of hydrogel biomaterials using dual-mode ultrasound elastography,” *Biomaterials*, vol. 88, pp. 12–24, 2016.
- [88] C. Y. Lin, “Alternative Form of Standard Linear Solid Model for Characterizing Stress Relaxation and Creep: Including a Novel Parameter for Quantifying the Ratio of Fluids to Solids of a Viscoelastic Solid,” *Front. Mater.*, vol. 7, no. 11, doi: 10.3389/fmats.2020.00011, 2020.
- [89] R. Sopakayang and R. De Vita, “A mathematical model for creep, relaxation and strain stiffening in parallel-fibered collagenous tissues,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 33, no. 9, pp. 1056–1063, 2011.
- [90] R. V. Hingorani, P. P. Provenzano, R. S. Lakes, A. Escarcega, and R. Vanderby, “Nonlinear viscoelasticity in rabbit medial collateral ligament,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 32, no. 2, pp. 306–312, 2004.
- [91] W. N. Meigel, S. Gay, and L. Weber, “Dermal architecture and collagen type distribution,” *Arch. Dermatological Res.*, vol. 259, no. 1, pp. 1–10, 1977.
- [92] G. Brianezi, F. Grandi, E. Bagatin, M. M. S. S. Enokihara, and H. A. Miot, “Dermal type I collagen assessment by digital image analysis,” *An. Bras. Dermatol.*, vol. 90, no. 5, pp. 723–727, 2015.
- [93] M. Sutton, C. Mingqi, W. Peters, Y. Chao, and S. McNeill, “Application of an optimized digital correlation method to planar deformation analysis,” *Image Vis. Comput.*, vol. 4, no. 3, pp. 143–150, 1986.

- [94] T. C. Chu, W. F. Ranson, and M. A. Sutton, “Applications of digital-image-correlation techniques to experimental mechanics,” *Exp. Mech.*, vol. 25, no. 3, pp. 232–244, 1985.
- [95] J. Blaber, B. Adair, and A. Antoniou, “Ncorr: Open-Source 2D Digital Image Correlation Matlab Software,” *Exp. Mech.*, vol. 55, no. 6, pp. 1105–1122, 2015.
- [96] J. S. E. Ortiz and R. E. Lagos, “A viscoelastic model to simulate soft tissue materials,” *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 633, doi: 10.1088/1742-6596/633/1/012099, 2015.
- [97] H. Jayabal, N. N. Dingari, and B. Rai, “A linear viscoelastic model to understand skin mechanical behaviour and for cosmetic formulation design,” *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 41, no. 3, pp. 292–299, 2019.
- [98] J. J. Moré, “The Levenberg-Marquardt algorithm: Implementation and theory,” *Numerical Analysis*, vol. 630, pp. 105–116, 1978.
- [99] S. Burghoff *et al.*, “Growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells is not critically dependent on host CD73 expression in mice,” *BMC Cancer*, vol. 14, no. 898, 2014.
- [100] M. Potez *et al.*, “Characterization of a B16-F10 melanoma model locally implanted into the ear pinnae of C57BL/6 mice,” *PLoS One*, vol. 13, no. 11, 2018.
- [101] V. Bobek, K. Kolostova, D. Pinterova, G. Kacprzak, J. Adamiak, and J. Kolodziej, “A Clinically Relevant , Syngeneic Model of Spontaneous , Highly Metastatic B16 Mouse Melanoma,” *Anticancer Res.*, vol. 30, no. 12, pp. 4799–4803, 2010.
- [102] W. W. Overwijk and N. P. Restifo, “B16 as a Mouse Model for Human Melanoma,” *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 39, no. 1, pp. 20-21, 2001.
- [103] I. R. Hart, “The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma,” *Am. J. Pathol.*, vol. 97, no. 3, pp. 587–600, 1979.
- [104] C. Danciu *et al.*, “A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior,” *Cancer Cell Int.*, vol. 13, no. 75, doi: 10.1186/1475-2867-13-75, 2013.
- [105] P. Ciarletta, L. Foret, and M. Ben Amar, “The radial growth phase of malignant melanoma: Multi-phase modelling, numerical simulations and linear stability analysis,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 8, no. 56, pp. 345–368, 2011.
- [106] G. Li and M. Herlyn, “Dynamics of intercellular communication during melanoma development,” *Molecular Medicine Today*, vol. 6, no. 4. pp. 163–169, 2000.

- [107] S. L. Peterson, A. McDonald, P. L. Gourley, and D. Y. Sasaki, “Poly(dimethylsiloxane) thin films as biocompatible coatings for microfluidic devices: Cell culture and flow studies with glial cells,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 72, no. 1, pp. 10–18, 2005.
- [108] M. Griffith *et al.*, “Nano- and Micro-Patterned S-, H-, and X-PDMS for Cell-Based Applications: Comparison of Wettability, Roughness, and Cell-Derived Parameters,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, p. 51, doi: 10.3389/fbioe.2018.00051, 2018.
- [109] H. Kim *et al.*, “Simple and fast polydimethylsiloxane (PDMS) patterning using a cutting plotter and vinyl adhesives to achieve etching results,” in *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, pp. 1885–1888, 2017,.
- [110] J. M. Bernhard, J. K. Blanks, C. J. Hintz, and G. T. Chandler, “Use of the fluorescent calcite marker calcein to label foraminiferal tests,” *J. Foraminifer. Res.*, vol. 34, no. 2, pp. 96–101, 2004.
- [111] Y. Ohno, K. Fujita, T. Toyofuku, and T. Nakamura, “Cytological observations of the large symbiotic foraminifer *Ammonia* *kudakajimensis* using calcein acetoxymethyl ester,” *PLoS One*, vol. 11, no. 11, 2016.
- [112] Z. Darzynkiewicz, G. Juan, X. Li, W. Gorczyca, T. Murakami, and F. Traganos, “Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis),” *Cytometry*, vol. 27, no. 1, pp. 1–20, 1997.
- [113] L. C. Crowley, A. P. Scott, B. J. Marfell, J. A. Boughaba, G. Chojnowski, and N. J. Waterhouse, “Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2016, no. 7, pp. 647–651, 2016.
- [114] A. R. McDonald, D. J. Garbary, and J. G. Duckett, “Rhodamine-phalloidin staining of f-actin in rhodophyta,” *Biotech. Histochem.*, vol. 68, no. 2, pp. 91–98, 1993.
- [115] B. Chazotte, “Labeling cytoskeletal F-Actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 5, no. 5, doi: 10.1101/pdb.prot4947, 2010.
- [116] F. Merino, S. Pospich, and S. Raunser, “Towards a structural understanding of the remodeling of the actin cytoskeleton,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 102, pp. 51–64, 2020.
- [117] X. Li *et al.*, “Tensile force-induced cytoskeletal remodeling: Mechanics before chemistry,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 16, no. 6, doi: 10.1371/journal.pcbi.1007693, 2020.

- [118] X. Shao, Q. Li, A. Mogilner, A. D. Bershadsky, and G. V. Shivashankar, “Mechanical stimulation induces formin-dependent assembly of a perinuclear actin rim,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 20, pp. 2595–2601, 2015.
- [119] IEEE Computer Society, “IEEE Standard for Floating-Point Arithmetic (IEEE Std 754™-2008),” *IEEE Comput. Soc.*, pp. 1–58, 2008.
- [120] M. Matsumoto and T. Nishimura, “Mersenne twister,” *ACM Trans. Model. Comput. Simul.*, vol. 8, no. 1, pp. 3–30, 1998.
- [121] A. Karatsuba and Y. Ofman, “Multiplication of Many-Digital Numbers by Automatic Computers.,” *Physics-Doklady*, vol. 7, pp. 595–596, 1963.
- [122] R. Van Meter and K. M. Itoh, “Fast quantum modular exponentiation,” *Phys. Rev. A - At. Mol. Opt. Phys.*, vol. 71, no. 5, doi: 10.1103/PhysRevA.71.052320, 2005.
- [123] N. Migenda, R. Moller, and W. Schenck, “Adaptive dimensionality reduction for neural network-based online principal component analysis,” *PLoS One*, vol. 16, no. 3, doi: 10.1371/journal.pone.0248896, 2021.
- [124] O. Ronneberger, P. Fischer, and T. Brox, “U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation,” *arXiv*, arXiv:1505.04597., 2015.
- [125] A. Paszke *et al.*, “PyTorch: An imperative style, high-performance deep learning library,” *arXiv*, arXiv:1912.01703, 2019.
- [126] D. P. Kingma and J. L. Ba, “Adam: A method for stochastic optimization,” *arXiv*, arXiv:1412.6980., 2017.
- [127] C. B. Choy, D. Xu, J. Y. Gwak, K. Chen, and S. Savarese, “3D-R2N2: A unified approach for single and multi-view 3D object reconstruction,” *arXiv*, arXiv:1604.00449., 2016
- [128] M. Tatarchenko, A. Dosovitskiy, and T. Brox, “Octree Generating Networks: Efficient Convolutional Architectures for High-resolution 3D Outputs,” *arXiv*, arXiv:1703.09438., 2017
- [129] J. Y. Hsiao, K. F. Chan, and J. Morris Chang, “Block-based reversible data embedding,” *Signal Processing*, vol. 89, no. 4, pp. 556–569, 2009.
- [130] X. Chen, J. Zheng, Y. Chen, M. Zhao, and C. J. Xue, “Quality-retaining OLED dynamic voltage scaling for video streaming applications on mobile devices,” in *Proceedings of Design Automation Conference*, pp. 1000–1005, 2012.

- [131] L. I.-K. Lin, “A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility,” *Biometrics*, vol. 45, no. 1, p. 255, 1989.
- [132] N. Bendjilali *et al.*, “Time-course analysis of gene expression during the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic response,” *G3 Genes, Genomes, Genet.*, vol. 7, no. 1, pp. 221–231, 2017.
- [133] A. Aguayo-Orozco, F. Y. Bois, S. Brunak, and O. Taboureau, “Analysis of Time-Series Gene Expression Data to Explore Mechanisms of Chemical-Induced Hepatic Steatosis Toxicity,” *Front. Genet.*, vol. 9, no. 396, doi: 10.3389/fgene.2018.00396, 2018.
- [134] J. H. C. Wang, B. P. Thampatty, J. S. Lin, and H. J. Im, “Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts,” *Gene*, vol. 391, no. 1–2, pp. 1–15, 2007.
- [135] N. Parisis *et al.*, “Initiation of DNA replication requires actin dynamics and formin activity,” *EMBO J.*, vol. 36, no. 21, pp. 3212–3231, 2017.
- [136] T. P. Driscoll, B. D. Cosgrove, S. J. Heo, Z. E. Shurden, and R. L. Mauck, “Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem Cells,” *Biophys. J.*, vol. 108, no. 12, pp. 2783–2793, 2015.
- [137] R. D. Barber, D. W. Harmer, R. A. Coleman, and B. J. Clark, “GAPDH as a housekeeping gene: Analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues,” *Physiol. Genomics*, vol. 21, no. 3, pp. 389–395, 2005.
- [138] V. Thakur and B. Bedogni, “The membrane tethered matrix metalloproteinase MT1-MMP at the forefront of melanoma cell invasion and metastasis,” *Pharmacological Research*, vol. 111. Academic Press, vol. 111, pp. 17–22, 2016.
- [139] D. T. Woodrum, S. A. Rich, and T. D. Pollard, “Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method,” *J. Cell Biol.*, vol. 67, no. 1, pp. 231–237, 1975.
- [140] T. D. Pollard and J. A. Cooper, “Actin and Actin-Binding Proteins. A Critical Evaluation of Mechanisms and Functions,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 55, no. 1, pp. 987–1035, 1986.
- [141] S. Suetsugu, “Shaping the membrane at submicron scale by BAR proteins and the actin cytoskeleton,” *Seikagaku*, vol. 86, no. 5, pp. 637–649, 2014.
- [142] M. L. Gardel, I. C. Schneider, Y. Aratyn-Schaus, and C. M. Waterman, “Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration,” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 26, pp. 315–333, 2010.

- [143] T. D. Pollard and G. G. Borisy, “Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments,” *Cell*, vol. 112, no. 4, pp. 453–465, 2003.
- [144] M.-F. Carlier and D. Pantaloni, “Control of Actin Assembly Dynamics in Cell Motility,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 32, pp. 23005–23009, 2007.
- [145] G. Jacquemet, H. Hamidi, and J. Ivaska, “Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 36, pp. 23–31, 2015.
- [146] A. Altadill *et al.*, “Liver expression of matrix metalloproteases and their inhibitors in hepatocellular carcinoma,” *Dig. Liver Dis.*, vol. 41, no. 10, pp. 740–748, 2009.
- [147] K. B. Hotary, E. D. Allen, P. C. Brooks, N. S. Datta, M. W. Long, and S. J. Weiss, “Membrane Type I Matrix Metalloproteinase Usurps Tumor Growth Control Imposed by the Three-Dimensional Extracellular Matrix,” *Cell*, vol. 114, no. 1, pp. 33–45, 2003.
- [148] M. Seiki, “The cell surface: The stage for matrix metalloproteinase regulation of migration,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 14, no. 5, pp. 624–632, 2002.
- [149] K. Shaverdashvili, P. Wong, J. Ma, K. Zhang, I. Osman, and B. Bedogni, “MT1-MMP modulates melanoma cell dissemination and metastasis through activation of MMP2 and RAC1,” *Pigment Cell Melanoma Res.*, vol. 27, no. 2, pp. 287–296, 2014.
- [150] H. Sato *et al.*, “A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells,” *Nature*, vol. 370, no. 6484, pp. 61–65, 1994.
- [151] A. Ranjan and R. D. Kalraiya, “Invasive potential of melanoma cells correlates with the expression of MT1-MMP and regulated by modulating its association with motility receptors via N-glycosylation on the receptors,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, doi: 10.1155/2014/804680, 2014.
- [152] M. L. Taddei *et al.*, “Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 12, no. 24, doi: 10.1186/1478-811X-12-24, 2014.
- [153] J. E. Bear and J. M. Haugh, “Directed migration of mesenchymal cells: Where signaling and the cytoskeleton meet,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 74–82, 2014.
- [154] L. Haviv *et al.*, “Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 13, pp. 4906–4911, 2006.
- [155] M. Nemethova, S. Auinger, and J. V. Small, “Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella,” *J. Cell Biol.*, vol. 180, no. 6, pp. 1233–1244, 2008.

- [156] G. Charras and E. Paluch, “Blebs lead the way: How to migrate without lamellipodia,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 9, pp. 730–736, 2008.
- [157] E. K. Paluch and E. Raz, “The role and regulation of blebs in cell migration,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 25, no. 5, pp. 582-590, 2013.
- [158] K. Aoki *et al.*, “A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 13, pp. 1863–1871, 2016.
- [159] K. Talkenberger, E. Ada Cavalcanti-Adam, A. Voss-Böhme, and A. Deutsch, “Amoeboid-mesenchymal migration plasticity promotes invasion only in complex heterogeneous microenvironments,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [160] S. R. Gabbireddy, K. W. Vosatka, A. J. Chung, and J. S. Logue, “Melanoma cells adopt features of both mesenchymal and amoeboid migration within confining channels,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–10, 2021.
- [161] A. W. Holle *et al.*, “Cancer Cells Invade Confined Microchannels via a Self-Directed Mesenchymal-to-Amoeboid Transition,” *Nano Lett.*, vol. 19, no. 4, pp. 2280–2290, 2019.
- [162] B. Huang, M. Lu, M. K. Jolly, I. Tsarfaty, J. Onuchic, and E. Ben-Jacob, “The three-way switch operation of Rac1/RhoA GTPase-based circuit controlling amoeboid-hybrid-mesenchymal transition,” *Sci. Rep.*, vol. 4, no.1, pp. 1–11, 2014.
- [163] M. Bergert, S. D. Chandradoss, R. A. Desai, and E. Paluch, “Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 36, pp. 14434–14439, 2012.
- [164] J. L. Ables, J. J. Breunig, A. J. Eisch, and P. Rakic, “Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 12, no. 5, pp. 269–283, 2011.
- [165] Y. Niwa, Y. Masamizu, T. Liu, R. Nakayama, C. X. Deng, and R. Kageyama, “The Initiation and Propagation of Hes7 Oscillation Are Cooperatively Regulated by Fgf and Notch Signaling in the Somite Segmentation Clock,” *Dev. Cell*, vol. 13, no. 2, pp. 298–304, 2007.
- [166] H. Hirata *et al.*, “Oscillatory expression of the BHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop,” *Science (80-. )*, vol. 298, no. 5594, pp. 840–843, 2002.
- [167] R. Kageyama, T. Ohtsuka, and T. Kobayashi, “Roles of Hes genes in neural development,” *Dev. Growth Differ.*, vol. 50, pp. 97–103, 2008.

- [168] S. Zambrano, I. de Toma, A. Piffer, M. E. Bianchi, and A. Agresti, “NF- $\kappa$ B oscillations translate into functionally related patterns of gene expression,” *Elife*, vol. 5, doi: 10.7554/eLife.09100, 2016.
- [169] D. E. Nelson *et al.*, “Oscillations in NF- $\kappa$ B signaling control the dynamics of gene expression,” *Science*, vol. 306, no. 5696, pp. 704–708, 2004.
- [170] J. Wang *et al.*, “Mechanical stimulation orchestrates the osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells by regulating HDAC1,” *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 5, doi: 10.1038/cddis.2016.112., 2016.
- [171] S. Loerakker, O. M. J. A. Stassen, F. M. ter Huurne, M. Boareto, C. V. C. Bouten, and C. M. Sahlgren, “Mechanosensitivity of Jagged–Notch signaling can induce a switch-type behavior in vascular homeostasis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 16, pp. 3682–3691, 2018.
- [172] J. Manokawinchoke, P. Sumrejkanchanakij, P. Pavasant, and T. Osathanon, “Notch Signaling Participates in TGF- $\beta$ -Induced SOST Expression Under Intermittent Compressive Stress,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 232, no. 8, pp. 2221–2230, 2017.
- [173] F. Ziouti *et al.*, “NOTCH signaling is activated through mechanical strain in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells,” *Stem Cells Int.*, vol. 2019, doi: 10.1155/2019/5150634, 2019.
- [174] S. Agarwal, P. Long, A. Seyedain, N. Piesco, A. Shree, and R. Gassner, “A central role for the nuclear factor-kappaB pathway in anti-inflammatory and proinflammatory actions of mechanical strain,” *FASEB J.*, vol. 17, no. 8, pp. 899–901, 2003.
- [175] M. Anghelina, D. Sjostrom, P. Perera, J. Nam, T. Knobloch, and S. Agarwal, “Regulation of biomechanical signals by NF- $\kappa$ B transcription factors in chondrocytes,” *Biorheology*, vol. 45, no. 4, pp. 245–256, 2008.
- [176] A. Kumar and A. M. Boriek, “Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy,” *FASEB J.*, vol. 17, no. 3, pp. 386–396, 2003.
- [177] Y. Lu *et al.*, “Compressive mechanical stress may activate IKK-NF- $\kappa$ B through proinflammatory cytokines in MC3T3-E1 cells,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 37, no. 9, pp. 1729–1735, 2015.
- [178] H. Shimojo, T. Ohtsuka, and R. Kageyama, “Oscillations in Notch Signaling Regulate Maintenance of Neural Progenitors,” *Neuron*, vol. 58, no. 1, pp. 52–64, 2008.



- [179] S. Ochi, Y. Imaizumi, H. Shimojo, H. Miyachi, and R. Kageyama, “Oscillatory expression of Hes1 regulates cell proliferation and neuronal differentiation in the embryonic brain,” *Dev.*, vol. 147, no. 4, doi: 10.1242/dev.182204, 2020.
- [180] T. Kobayashi, H. Mizuno, I. Imayoshi, C. Furusawa, K. Shirahige, and R. Kageyama, “The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells,” *Genes Dev.*, vol. 23, no. 16, pp. 1870–1875, 2009.
- [181] T. Kobayashi and R. Kageyama, “Hes1 oscillations contribute to heterogeneous differentiation responses in embryonic stem cells,” *Genes (Basel)*., vol. 2, no. 1, pp. 219–228, 2011.

## 研究業績

### ■ 定期刊行誌掲載論文（主論文に関連する原著論文） 2件

1. Morikura T, Miyata S. Mechanical Intermittent Compression Affects the Progression Rate of Malignant Melanoma Cells in a Cycle Period-Dependent Manner. *Diagnostics*, 2021, 11(6), 1112. (IF: 3.24, 2019/2020)
2. Morikura T, Miyata S. Effect of Mechanical Compression on Invasion Process of Malignant Melanoma Using In Vitro Three-Dimensional Cell Culture Device. *Micromachines*, 2019, 10(10), 666. (IF: 2.523, 2019/2020)

### ■ 定期刊行誌掲載論文（その他の論文） 3件

1. Imashiro C, Takeshita H, Morikura T, Miyata S, Takemura K, Komotori J. Development of accurate temperature regulation culture system with metallic culture vessel demonstrates different thermal cytotoxicity in cancer and normal cells., *Sci. Rep.*, 2021, 11(1), 21466. (IF: 3.998, 2019/2020)
2. Imashiro C, Hirano M, Morikura T, Fukuma Y, Ohnuma K, Kurashina Y, Miyata S, Takemura K. Detachment of cell sheets from clinically ubiquitous cell culture vessels by ultrasonic vibration. *Sci. Rep.*, 2020, 10(1), 9468. (IF: 3.998, 2019/2020)
3. Bansai S, Morikura T, Onoe H, Miyata S. Effect of Cyclic Stretch on Tissue Maturation in Myoblast-Laden Hydrogel Fibers. *Micromachines*, 2019, 10(6), 399. (IF: 2.523, 2019/2020)

## ■ 受賞 4件

1. 森倉 峻, バイオエンジニアリング部門 Outstanding Student Presentation, 日本機械学会, 高速ラベルフリー三次元細胞形状計測に向けた深層学習に基づくシングルショット計算顕微鏡法 (日本機械学会 第32回バイオフィロンティア講演会), 2022 Jan 13.
2. Nagatomo T, Morikura T, 優秀賞, 慶應義塾先端科学技術研究センター (KLL), 技術特化型 ICO プラットフォームの構築と LABLIC の事業化 (第20回 慶應科学技術展 KEIO TECHNO-MALL アイデアコンテスト), 2019 Dec 13.
3. 森倉 峻, Young Investigator's Award 優秀賞, 日本生体医工学会, 間欠的圧縮変形刺激が in vitro 三次元悪性黒色腫モデルの細胞増殖を伴う浸潤プロセスに与える影響 (第58回 日本生体医工学会大会), 2019 June 7.
4. 森倉 峻, BEST POSTER AWARD, CELLAB-SOCU SUMMER SYMPOSIUM, 機械的圧縮刺激が悪性黒色腫の進展プロセスに与える影響, 2018 Sep 6.

## ■ 国際学会 9件

1. Morikura T, Miyata S, Super-depth microscopy for observing cells located deep within three-dimensional hydrogel culture, The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, Online, 2021 Dec 3.
2. Nishi R, Oda Y, Morikura T, Miyata S, Effect of hydrogel stiffness on growth and invasion process of tumor spheroid, The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, Online, 2021 Dec 4.
3. Yoshida R, Harada K, Morikura T, Miyata S, Effect of mechanical stimulation on migration mode of malignant melanoma, The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, Online, 2021 Dec 3.
4. Ishii K, Morikura T, Abe K, Sakamoto T, Kurihara T, Miyata S, Effect of mechanical shaking during cell-seeding process on distribution of cells in dishes, TERMIS 6th world congress 2021, Online, 2021 Sep.
5. Harada K, Morikura T, Miyata S, Effect of Static Compression on Cell Morphology of In Vitro 3D Melanoma Model, 2020 BMES Virtual Annual Meeting, San Diego, USA, 2020 Oct 15.
6. Morikura T, Miyata S, Effect of Static Compression on Invasion Process of Malignant

Melanoma Cells Within In Vitro Three-Dimensional Culture, ICBME 2019, Singapore, Singapore, 2019 Dec 9.

7. Morikura T, Ushida T, Miyata S, Effect of Mechanical Intermittent Compression on Invasion of In Vitro 3D Melanoma Model, 2019 BMES Annual Meeting, Philadelphia, USA, 2019 Oct 17.
8. Morikura T, Miyata S, Effect of Mechanical Compression on Invasion Process of Malignant Melanoma Using In Vitro Three-Dimensional Cell Culture Model, 8th World Congress of Biomechanics, Dublin, Ireland, 2018 July 12.
9. Morikura T, Miyata S, Effect of mechanical static compression on progression of malignant melanoma with accelerated melanogenesis and cytoskeletal change, International Symposium on Advanced Technologies for Mechano-biology and Regenerative Medicine, Yokohama, Japan, 2018 Sep 21.

#### ■ 国内学会 22 件

1. 宮田 昌悟, 植野 馨太, 森倉 峻, 阿部 公揮, 坂本 禎志, 栗原 隆, 細胞培養操作における細胞回収時の剥離条件が多能性幹細胞の品質に与える影響, 第 21 回日本再生医療学会総会, オンライン会場, 2022 年 3 月発表予定
2. 森倉 峻, 徳岡 雄大, 山田 貴大, 板井 駿, 長友 竜帆, 原田 慧吾, 三木 則尚, 尾上 弘晃, 舟橋 啓, 宮田 昌悟, 高速ラベルフリー三次元細胞形状計測に向けた深層学習に基づくシングルショット計算顕微鏡法, 日本機械学会 第 32 回バイオフロンティア講演会, オンライン会場, 2022 年 1 月発表済
3. 宮本 将貴, 西 遼太, 小田 雄大, 森倉 峻, 宮田 昌悟, 癌細胞スフェロイド観察のためのライトシート顕微鏡系の構築および周囲基質の剛性が癌細胞の浸潤に与える影響の検討, 日本機械学会 第 32 回バイオフロンティア講演会, オンライン会場, 2022 年 1 月発表済
4. 吉田 莉子, 森倉 峻, 宮田 昌悟, 悪性黒色腫培養モデルへの多様な周期的圧縮刺激を印加可能な培養デバイス, COMSOL Simulations Week 2021, オンライン会場, 2021 年 12 月発表済
5. 宮田 昌悟, 西 遼太, 小田 雄大, 森倉 峻, 癌細胞スフェロイドを用いた“閉じ込め腫瘍モデル”の構築とスフェロイド成長による力学的環境変化, COMSOL

Simulations Week 2021, オンライン会場, 2021年12月発表済

6. 森倉 峻, 宮田 昌悟, 間欠的圧縮変形刺激下における悪性黒色腫細胞の進展様式と表現型可塑性, 日本機械学会 2021年度年次大会, オンライン会場, 2021年9月8日発表済
7. 西 遼太, 小田 雄大, 森倉 峻, 宮田 昌悟, 癌細胞スフェロイド周囲の力学的環境が浸潤特性に与える影響, 日本機械学会 2021年度年次大会, オンライン会場, 2021年9月7日発表済
8. 森倉 峻, 原田 慧吾, 宮田 昌悟, 周期的圧縮刺激が悪性黒色腫細胞の遊走様式に与える影響, 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会, オンライン会場, 2021年6月26日発表済
9. 宮田 昌悟, 坂齊 史奈子, 太田 貴之, 須見 隆弘, 馬淵 将来, 森倉 峻, 尾上 弘晃, 力学的刺激を用いた骨格筋および心筋の生体外再構築の試み, 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会, オンライン会場, 2021年6月26日発表済
10. 宮田 昌悟, 石井 皓士, 森倉 峻, 阿部 公揮, 坂本 禎志, 栗原 隆, 細胞培養操作における播種の均一性および回収時の剥離強さが iPS 細胞の品質に与える影響, 第20回日本再生医療学会総会, オンライン会場, 2021年3月発表済
11. 石井 皓士, 森倉 峻, 阿部 公揮, 坂本 禎志, 栗原 隆, 宮田昌悟, 細胞の均一播種のための自動細胞培養播種デバイスの開発, 日本機械学会 第31回バイオフロンティア講演会, 信州大学繊維学部, 長野県, 2020年12月13日発表済
12. 森倉 峻, 宮田 昌悟, 間欠的圧縮変形刺激が *in vitro* 三次元悪性黒色腫モデルの細胞増殖および遊走能に与える影響, 日本機械学会 第30回バイオフロンティア講演会, 霧島国際ホテル, 鹿児島, 2019年7月19日発表済
13. 森倉 峻, 宮田 昌悟, 間欠的圧縮変形刺激が *in vitro* 三次元悪性黒色腫モデルの細胞増殖を伴う浸潤プロセスに与える影響, 第58回日本生体医工学会大会, 沖縄コンベンションセンター, 沖縄, 2019年6月7日発表済
14. 森倉 峻, 宮田 昌悟, 機械的圧縮変形刺激がメラノーマ細胞の細胞骨格リモデリングに与える影響, 第42回バイオレオロジー学会年会, 北九州国際会議場, 福岡, 2019年6月1日発表済
15. 坂齊 史奈子, 森倉 峻, 善明 大樹, 宮田 昌悟, 繰り返し張刺激が筋芽細胞含有ゲルファイバの組織成熟化に与える影響, 日本機械学会 第9回マイクロ・ナノ工学

- シンポジウム講演会，札幌市民交流プラザ，北海道，2018年10月31日発表済
16. 山本 将司，善明 大樹，森倉 峻，宮田 昌悟，Deep Learning 画像判別を用いた細胞識別における光学倍率と対象細胞サイズの影響，日本機械学会 第29回バイオフィロンティア講演会，千葉大学，千葉，2018年12月15日発表済
  17. 坂齊 史奈子，森倉 峻，尾上 弘晃，宮田 昌悟，筋系細胞ファイバへの引張刺激印加装置の開発，日本機械学会 第29回バイオフィロンティア講演会，千葉大学，千葉，2018年12月15日発表済
  18. 西 遼太，森倉 峻，善明 大樹，宮田 昌悟，三次元共培養モデルにおいて乳癌細胞浸潤に及ぼす脂肪細胞の影響，日本機械学会 第29回バイオフィロンティア講演会，千葉大学，千葉，2018年12月15日発表済
  19. 森倉 峻，宮田 昌悟，圧縮刺激に伴うメラニン生成亢進が三次元悪性黒色腫モデルの浸潤能に与える影響，日本機械学会 第29回バイオフィロンティア講演会，千葉大学，千葉，2018年12月15日発表済
  20. 森倉 峻，宮田 昌悟，機械的圧縮刺激が悪性黒色腫の進展プロセスに与える影響，CELLAB-SOCU SUMMER SYMPOSIUM，山陽小野田市立山口東京理科大学，山口，2018年9月6日発表済
  21. 森倉 峻，宮田 昌悟，定常圧縮刺激が *in vitro* 三次元悪性黒色腫モデルの浸潤能に与える影響，第57回日本生体医工学会大会，札幌コンベンションセンター，北海道，2018年6月20日発表済
  22. 森倉 峻，宮田 昌悟，悪性黒色腫の生体外浸潤モデルの構築と力学的刺激の影響，日本機械学会 第30回バイオエンジニアリング講演会，京都大学，京都，2017年12月15日発表済

■ 研究費 7件

1. Morikura T, 2020年度森記念製造技術財団, 後期博士課程支援, 年間 1000 千円, 2020.
2. Morikura T, 2019年度森記念製造技術財団, 後期博士課程支援, 年間 1000 千円, 2019.
3. Nagatomo T, Morikura T, 慶應義塾先端科学技術研究センター KLL 2020年度 KLL 指定研究プロジェクト インキュベーション活動支援 (単年度), 年間 1500 千円, 2020.
4. Morikura T, 潮田記念基金, 2020年度潮田記念基金による博士課程学生研究支援プログラム (研究科推薦枠), 年間 505 千円, 2020
5. Morikura T, 2019年度森記念製造技術財団, 後期博士課程支援, 年間 1000 千円, 2019.
6. Morikura T, 慶應義塾先端科学技術研究センター (KLL), 2020年度 KLL 後期博士課程研究助成金, 年間 300 千円, 2020
7. Morikura T, 慶應義塾先端科学技術研究センター (KLL), 2019年度 KLL 後期博士課程研究助成金, 年間 300 千円, 2019
8. Nagatomo T, Morikura T, 慶應義塾先端科学技術研究センター (KLL), 2019年度 KLL 指定研究プロジェクト インキュベーション準備支援 (単年度), 年間 300 千円, 2019
9. 慶應義塾先端科学技術研究センター (KLL), 2018年度 KLL 前期博士課程研究助成金, 年間 150 千円, 2018

■ 奨学金 (3件)

1. Morikura T, 2021年度森記念製造技術財団, 後期博士課程支援 給与奨学金, 年間 2400 千円, 2021.
2. Morikura T, 2020年度森記念製造技術財団, 後期博士課程支援 給与奨学金, 年間 2400 千円, 2020.
3. Morikura T, 2019年度森記念製造技術財団, 後期博士課程支援 給与奨学金, 年間 2400 千円, 2019.

■ その他 5件

1. 長友 竜帆, 森倉 峻, 技術特化型 ICO プラットフォームの構築と LABLIC の事業化, 第 20 回 慶應科学技術展 KEIO TECHNO-MALL, 東京国際フォーラム, 来場者に向けて当技術内容を発表, 2019 年 12 月 13 日
2. 森倉 峻, KOREA-YONSEI-WASEDA-KEIO Mechanical Engineering Graduate Student Symposium 2019, 当シンポジウムのファシリテータを務めた, 2019 年 12 月 2 日
3. 森倉 峻, 善明 大樹, 宮田 昌悟, 川崎市立木月小学校との連携授業「ケーキ☆サイエンス」, 当教育イベントのファシリテータを務めた, 2019 年 10 月 28 日
4. 福田 恵一, 宮田 昌悟, 鈴木 隼人, 森倉 峻, 未分化ヒト iPS 細胞の大量培養を可能とする培養基材, 第 19 回 慶應科学技術展 KEIO TECHNO-MALL, 東京国際フォーラム, 来場者に向けて当技術内容を発表, 2018 年 12 月 14 日
5. 森倉 峻, 宮田 昌悟, 機械的圧縮刺激が悪性黒色腫の進行プロセスに与える影響, バイオエンジニアリング部門若手講演交流会, 日本機械学会 バイオエンジニアリング部門, 若手交流会にて研究内容を発表, 2018 年 7 月 22 日