

深層学習を用いた異常心筋細胞同定法の開発とその心臓不整脈研究への応用

垣塚 太志（産業科学研究所）

市村 垂生（先導的学際研究機構）

永井 健治（産業科学研究所）

1 研究の背景

ヒト iPS 細胞をはじめとする幹細胞技術の進展により、心臓の収縮を担う心筋細胞を実験室内で作製することが可能となった。これにより、心疾患患者への心筋細胞移植治療の開発や、培養心筋細胞を用いたヒト心疾患の再現、メカニズム解明、治療薬の開発など、多岐にわたる応用研究が活発に進められている。

このような研究を効果的に推進する上で、作製した心筋細胞の品質を厳密に管理することは極めて重要である。心臓は細胞同士が密に連結して機能する組織であり、心筋細胞が同期して拍動することで効率的に血液を送り出す。一部の異常な細胞が非同期に発火した場合、心拍リズムを乱し不整脈の原因となる可能性がある。したがって、移植用途に限らず、in vitro モデルとして用いる際にも、異常細胞の混入を防ぎ、細胞集団全体の品質を厳密に管理することが求められる。

しかし、異常細胞の頻度が非常に低い場合、その検出は容易ではない。稀な異常細胞を検出するためには大量の細胞を観察する必要があるだけでなく、異常の種類や外観的特徴が事前に分かっていない場合も多く、ラベル情報に依存しない解析手法が必要とされる。

2 研究の目的

本研究では、大規模イメージング装置 AMATERAS^[1] による非染色明視野画像の取得と、自己教師表現学習を用いた機械学習ベースの異常検知手法を組み合わせ、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞集団に含まれる異常細胞のデータ駆動的探索を試みた。ラベル情報なしに、異常細胞を非侵襲的かつ効率的に検出する手法の開発を目的とした。

3 研究の方法

3.1 大規模明視野画像の取得

ヒト iPS 細胞から分化誘導して作製した心筋細胞を単層でコンフルエントに培養し、我々が開発した大規模イメージング装置 AMATERAS を用いて明視野画像を非染色で取得した。AMATERAS はサブ細胞解像度を維持しつつ、10.1 mm × 14.6 mm の超広視野をカバーできることから、1 ショットで数千～数万の細胞を同時に撮像可能である。

3.2 単細胞画像セットの作製

取得した広視野明視野画像を、深層学習ベースのセグメンテーション手法である CellPose^[2, 3] を用いて細胞領域に分割した。各細胞を中心とする 64 × 64 ピクセルの正方形領域を切り出し、単細胞画像として機械学習解析用データセットを構築した。

3.3 自己教師学習による特徴抽出と異常スコアリング

ラベルなしで表現学習が可能な SimCLR (Simple Framework for Contrastive Learning of Visual Representations)

^[4] を使用し、全単細胞画像を用いて自己教師学習を行い、各画像から特徴ベクトルを抽出した。その後、得られたベクトル間の K-Nearest Neighbor (KNN) 距離を用いて異常スコアを計算し、異常細胞の検出に用いた。

4 研究成果

まず、AMATERAS で撮像された明視野画像から、単一細胞に対応する 5,643 枚の画像を切り出した。これらを用いて SimCLR による自己教師学習を行い、KNN 距離を用いて各画像に対する異常スコアを算出した結果、スコア分布は図 1 に示す通りであった。

異常スコアに基づいて代表的な画像を確認したところ、スコアが低い細胞は見た目に特段の異常は見られなかった（図 2）。一方、異常スコアが最も高い細胞群を確認したところ、細胞内に複数の大きな液胞様構造が存在し、明らかな形態異常が認められた（図 3）。このことから、SimCLR と KNN 距離による異常検知は、実際に異常な形態を有する細胞の検出に有効であることが示唆された。

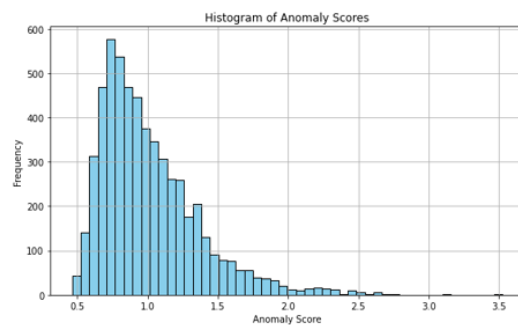


図 1: SimCLR と KNN で得られた異常スコアのヒストグラム

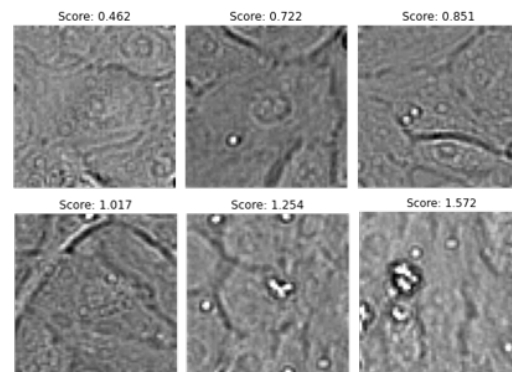


図 2: 異常スコアの低い細胞の代表例

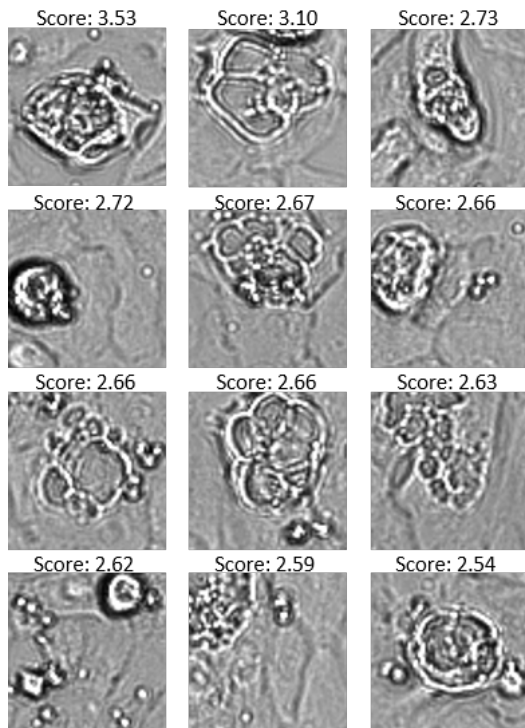


図 3: 異常スコアの上位 12 細胞

異常スコアが 2.0 以上の細胞 ($n=104$) は、全体の約 1.8% に相当し、これらの細胞の多くに液胞様の構造が観察された。さらに、これら異常細胞に対してカルシウム蛍光指示薬を用いたカルシウムイメージングを実施したところ、正常細胞が同期して発火するのにに対し、異常細胞は非同期に自発的なカルシウム発火を示すことが確認された (図 4)。

このような非同期自発発火は不整脈のリスク因子として知られており^[5]、本研究で検出された異常細胞が潜在的な不整脈誘発因子となりうることが示された。したがって、これらの異常細胞の混入を防ぐことは、再生医療および創薬応用において重要な品質管理課題である。

さらに、異常細胞の発生メカニズムを探るため、心筋細胞の作製過程を追跡したところ、細胞の継代後に異常細胞の出現頻度が増加することが判明した。特に、トリプシン処理後の培地交換により浸透圧様のストレスが細胞に加わることで、形態異常が誘発されることが明らかとなった。さらに、EDTA 溶液のみの処理でも同様の異常が引き起こされることが分かり、心筋細胞が一般的な培養細胞よりも継代時のカルシウムキレート剤処理に対して繊細である可能性が示唆された。

本研究により、データ駆動的なアプローチによって心筋細胞集団中に稀に存在する異常細胞を検出し、その形態的・機能的特徴を明らかにすることが可能であることが示された。今後は、検出精度のさらなる向上に加え、異常細胞除去技術やより厳密な培養技術の確立を通じて、再生医療および創薬研究に資する心筋細胞品質管理技術の実現が期待される。

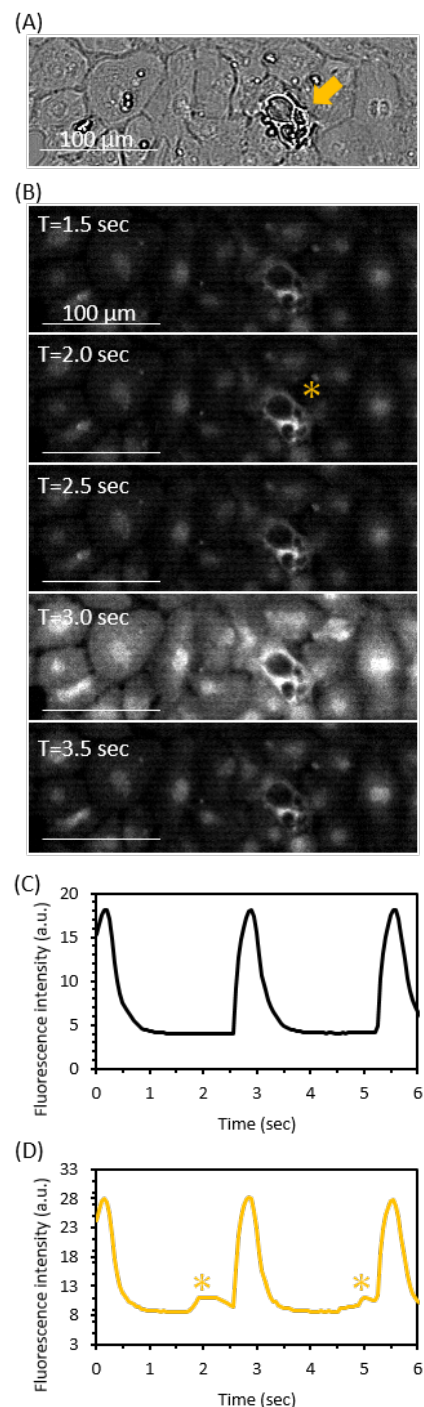


図 4: 異常細胞が示す非同期のカルシウムトランジェント

(A) 明視野画像。黄色矢印は検出された異常細胞を示している。(B) 蛍光指示薬を用いたカルシウムイメージング画像。T=2 で異常細胞が非同期なカルシウムトランジェントを示している (アスタリスク)。(C) 正常細胞の同期したカルシウムトランジェントの平均輝度。(D) A と B で示した異常細胞のカルシウムトランジェント。アスタリスクは非同期の発火タイミングを示す。

引用文献

- [1] Ichimura, Taro, et al. "Volumetric trans-scale imaging of massive quantity of heterogeneous cell populations in centimeter-wide tissue and embryo." *Elife* 13 (2025): RP93633.
- [2] Stringer, Carsen, et al. "Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation." *Nature methods* 18.1 (2021): 100-106.
- [3] Pachitariu, Marius, and Carsen Stringer. "Cellpose 2.0: how to train your own model." *Nature methods* 19.12 (2022): 1634-1641.
- [4] Chen, Ting, et al. "A simple framework for contrastive learning of visual representations." *International conference on machine learning*. PmLR, 2020.
- [5] Landstrom, Andrew P., Dobromir Dobrev, and Xander HT Wehrens. "Calcium signaling and cardiac arrhythmias." *Circulation research* 120.12 (2017): 1969-1993.

発表論文等

〔雑誌論文〕

- [1] Kakizuka, Taishi, Tohru Natsume, and Takeharu Nagai. "Compact lens-free imager using a thin-film transistor for long-term quantitative monitoring of stem cell culture and cardiomyocyte production." *Lab on a Chip* 24.24 (2024): 5290-5303.

〔学会発表〕

- [1] 垣塚太志, 市村垂生, 福島俊一, 永井健治, "トランススケールスコープと自動細胞培養ロボットを融合する試み——全自動 AMATERAS の理想と現実", 第 47 回日本分子生物学会年会, 2024.