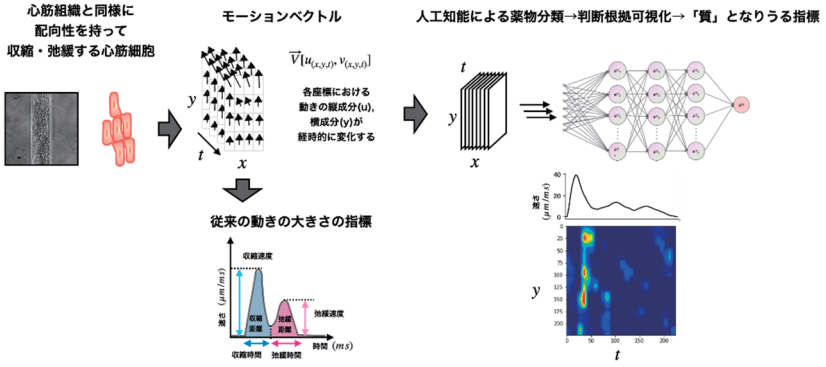
95　心筋細胞の動きの「質」を評価する人工知能の開発	内藤　篤彦

【目的】心不全は様々な疾患が原因となって心臓のポンプ機能が低下し、むくみや息切れといった症状が生じる症候群であり、世界中でその患者数は増え続けている。心不全患者の予後を改善させる薬物は存在するもののその効果は限定的であるため重症心不全患者の予後は進行癌と同様に不良であり、心不全に対する画期的な治療薬の開発は望まれ続けている。心不全は心臓のポンプ機能低下が引き起こす症候群であるため、短絡的には心筋細胞の収縮力を向上させる薬物は心臓のポンプ機能を向上させ、心不全症状を軽減できると考えられる。ところが実際には、カテコラミン等の心筋細胞の収縮力を向上させる薬物は心不全患者の長期予後を悪化させ、心不全治療において中心的な役割を果たしている β 遮断薬は心筋細胞の収縮力を低下させる。また、心筋細胞の収縮力を低下させる薬物であっても Na チャネル遮断薬や非 DHP 系 Ca 拮抗薬（以下 Ca 拮抗薬）、心毒性を示す薬物は心不全を増悪させる。これらの臨床的な事実は、心不全の治療薬を開発する目的で実施する薬物スクリーニングにおいて「心筋細胞の収縮力」だけを指標にしても臨床的に有用な薬物は同定できない可能性を示している。本研究の目的は、心筋細胞の動きの「質」を評価する人工知能を開発し、「心筋細胞の収縮力」ではなく「心筋細胞の動きの『質』」を指標とした表現型スクリーニングを通じて心不全に対する新規治療薬の開発を可能にすることである。

【方法】一定の幅で播種できるよう培養底面を加工した 96 well プレート（マイクロパターンプレート）にヒト iPS 細胞由来心筋細胞（iPS 心筋）を播種し、拍動する様子を SI8000（SONY 社）を用いて撮像した。続いて、撮像した動画からモーションベクトルを算出するシステムを構築し、算出されたモーションベクトルから iPS 心筋に投与された薬物を予測する深層学習モデルを構築し、動きの質の指標となりうる特徴量を考察した。

【結果】マイクロパターンプレートに播種した心筋細胞は、一般的な分散培養の実験系に比べて配向性を付与した方向に細胞の動きが集中していた。この結果から、マイクロパターンプレートを用いた実験系は、分散培養の実験系より生体の心筋細胞に近い配向性を持った収縮弛緩運動が起き、心筋の動きの「質」を評価しやすい細胞実験系である可能性が示唆された。続いて、心筋の動きの「質」を評価するために重要な特徴量を調査するため、前工程で抽出したモーションベクトルから薬物添加の有無を予測する畳み込みニューラルネットワークベースの深層学習モデルの構築を試みたところ、Ⅰ型心筋症を誘導する抗がん薬ドキソルビシン、Ⅱ型心筋症を誘導するトラスツズマブの添加の有無を予測する深層学習モデルにおいて約 85.6%の予測精度を達成した。構築モデルの予測根拠を可視化したところ、ドキソルビシンを添加したデータでは弛緩の終了時、トラスツズマブを添加したデータでは収縮の終了時におけるモーションベクトルが予測に強く寄与していることが明らかとなった。これらの結果は、収縮や弛緩の終了時のモーションベクトルのバランスが、収縮最大速度や収縮弛緩総移動距離といった既存の「収縮力の大きさ」ではない心筋細胞の動きの「質」を表す特徴量になりうることを示唆していると考えられる。

本研究の概略



95. 心筋細胞の動きの「質」を評価する人工知能の開発

内藤　篤彦

東邦大学 医学部 生理学講座 細胞生理学分野

Key words：心不全，iPS 細胞由来心筋細胞，モーションベクトルイメージング，人工知能

緒　言

心臓は身体中に血液を巡らせるポンプであり、生命を維持する源である。心不全は様々な疾患が原因となって心臓のポンプ機能が低下し、むくみや息切れといった症状が生じる症候群であり、世界中でその患者数は増え続けている。心不全患者の予後を改善させる薬物は存在するもののその効果は限定的であるため重症心不全患者の予後は進行癌と同様に不良であり、心不全に対する画期的な治療薬の開発は望まれ続けている。筆者はこれまで、遺伝子工学や分子生物学的実験手法を利用した心不全研究と並行して、10 年以上にわたりヒト iPS 細胞由来心筋細胞（ヒト iPS 心筋）を利用した心不全に対する創薬研究を複数の製薬企業と共同で行ってきた。生理的表現型を解析可能なヒト iPS 心筋の長所を生かすべく化合物の表現型スクリーニングを行ってきたが、全ての製薬企業が「心筋細胞の収縮力向上」を指標としたスクリーニングを要求してきた。ところが実際には、心筋細胞の収縮力向上と心不全の病態改善は必ずしも相関するとは限らない。例えば、カテコラミン等の心筋細胞の収縮力を向上させる薬物は心不全患者の長期予後を悪化させ、心不全治療において中心的な役割を果たしている β 遮断薬は心筋細胞の収縮力を低下させる。また、心筋細胞の収縮力を低下させる薬物であっても Na チャネル遮断薬や非 DHP 系 Ca 拮抗薬（以下 Ca 拮抗薬）、心毒性を示す薬物は心不全を増悪させる。これらの臨床的な事実は、心不全の治療薬を開発する目的で実施する薬物スクリーニングにおいて「心筋細胞の収縮力」だけを指標にしても臨床的に有用な薬物は同定できない可能性を示している。

本研究の目的は、心筋細胞の動きの「質」を評価する人工知能を開発し、「心筋細胞の収縮力」ではなく「心筋細胞の動きの『質』」を指標とした表現型スクリーニングを通じて心不全に対する新規治療薬の開発を可能にすることである。

方　法

1. 実験材料・装置

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞（ヒト iPS 心筋）は，Asclestem®（ナカライテスク）および iCell2® cardiomyocyte（以下 iCell2 と表記、富士フイルム）を使用した。心筋細胞の動画撮影には SI8000C（ソニー）を使用した［1］。一定の幅で播種できるよう培養底面に生体分子接着性の加工と非接着性の加工を縞状に施した 96 well マイクロパターンプレート（以下マイクロパターンプレート）は東洋合成社にオーダーメイド品を発注し使用した。

2. 細胞培養

Asclestem は、附属の培地を用いてメーカーのプロトコル通りに解凍し、10% Fetal Bovine Serum および 1% penicillin/streptomycin を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium を用いて、37℃、5% CO_2 の恒温培養器内で維持した。iCell2 は、メーカー推奨の解凍用培地（M1001）を用いてメーカーのプロトコル通りに解凍し、メーカー推奨の維持培地（M1003）を用いて 37℃、5% CO_2 の恒温培養器内で維持した。ヒト iPS 心筋細胞の維持のため、毎日半量の培地交換を行った。

3. iPS 心筋細胞の収縮弛緩の撮像

ヒト iPS 心筋を 96 well プレートに播種し、iPS 心筋の自立拍動が安定するまで細胞を維持した。その後，4 倍および 10 倍対物レンズ、150 frames/sec の条件で拍動動画を撮影した。

4. モーションベクトル抽出

SI8000C に付属する解析ソフトウェアを用いて、撮影した拍動動画から細胞播種領域を関心領域として設定し、収縮速度や距離等の既存のパラメタ解析を行った。また、深層学習に使用するモーションベクトルの抽出は、python 3.9 から画像処理ライブラリ OpenCV を利用したプログラムを自作し実施した。

5. 深層学習モデル

モーションベクトルを入力とする深層学習モデルは、pytorch 1.11 を用いて構築した。ハイパーパラメタの最適化は optuna 3.0 を利用した。構築モデルの性能評価はホールド・アウト法で正答率を指標として実施した。

結果および考察

1. 分散培養とパターン培養のモーションベクトルの比較

心筋の動きの「質」を評価するためのスクリーニング系の開発には、スループット性を損なわずに生体に近い培養実験環境の構築が必要である。我々は、マイクロパターンプレートを使用することで iPS 心筋の収縮弛緩方向に影響を与え、生体の心筋に近い動きの「質」を評価する実験系の構築可能性を検討した。分散培養環境下における iPS 心筋は 1 回の収縮―弛緩のサイクルで様々な方向に収縮していたが、マイクロパターンプレートで配向性を付与した環境では、配向性を付与した方向に細胞の動きが集中していた（図 1）。この結果から、マイクロパターンプレートを用いることにより、より生体の心筋細胞に近い配向性を持った収縮弛緩運動が起きることが示唆された。

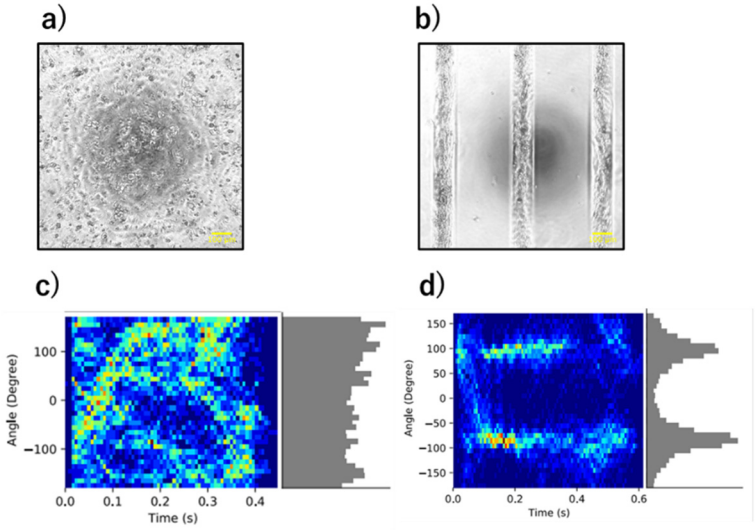


図 1. 分散培養と配向性培養の比較

a、b） 分散培養（a）およびマイクロパターン培養（b）環境下における iPS 心筋細胞の位相差顕微鏡像の一例。

c、d） 分散培養（c）およびマイクロパターン培養（d）環境下において、細胞が 1 回収縮―弛緩を行った際の動きの向きの角度のヒストグラムの一例。左のヒートマップは縦軸が時間、横軸が角度を表し、全ピクセル、全時間で計算されたモーションベクトルの角度がどの時間および角度で観測されたかという頻度を表している。右のグレーのヒストグラムは、全時間におけるモーションベクトルの角度の頻度情報を表している。

2. モーションベクトルデータ計算パイプラインの構築

次に、大量の iPS 心筋拍動を撮影した動画データからモーションベクトルを抽出するプログラムを作成した（図 2）。本プログラムでは、細胞播種領域における物体の動きをモーションベクトルとして検知し、1 ピクセルごとのモーションベクトルの時間変化が格納されたテンソルを出力する。出力データの領域内平均を算出することで、SI8000C の付属ソフトウェアから算出された収縮弛緩速度の時間変化が再現可能であり、本プログラムの妥当性が検証された。

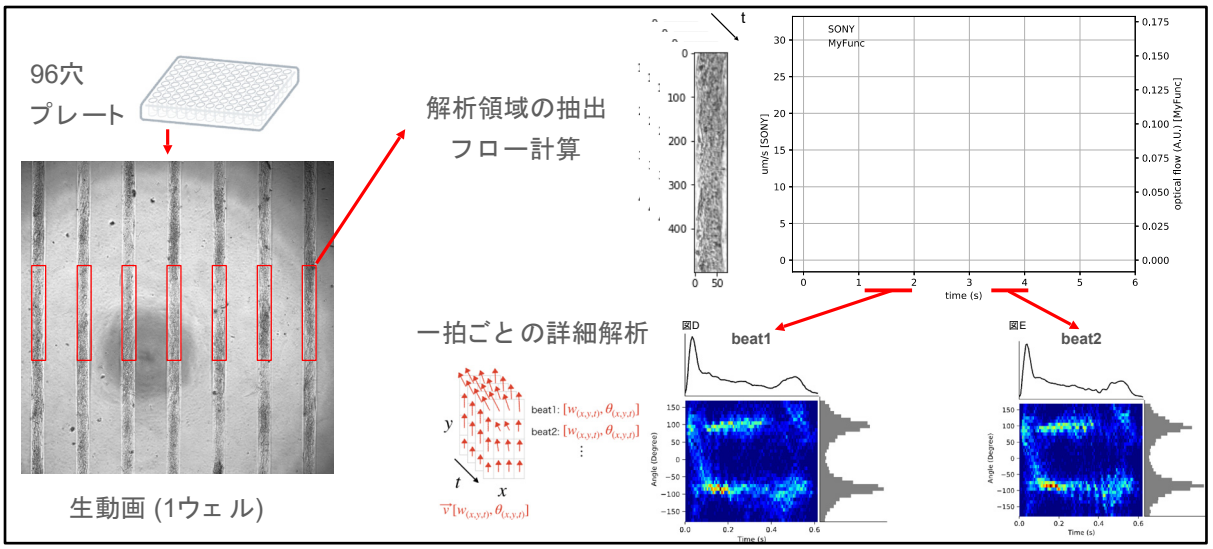


図 2. モーションベクトル計算プログラムの概略図
SI8000C で撮影した動画像から 1 拍動における全ピクセルのモーションベクトルを計算するワークフローの概念図。

3. モーションベクトルを入力とする人工知能モデルの構築

続いて、心筋の動きの「質」を評価するために重要な特徴量を調査するため、前工程で抽出したモーションベクトルから薬物添加の有無を予測する深層学習モデルの構築を試みた。本研究におけるモーションベクトルデータは幅方向の情報量が少ないことから、多次元モーションベクトルデータを「高さと時間の 2 次元画像が幅方向に複数チャンネル存在する画像データ」の様に取り扱い、画像分類の深層学習モデルとして広く用いられる畳み込みニューラルネットワーク（CNN）による分類を試みた（図 3）。

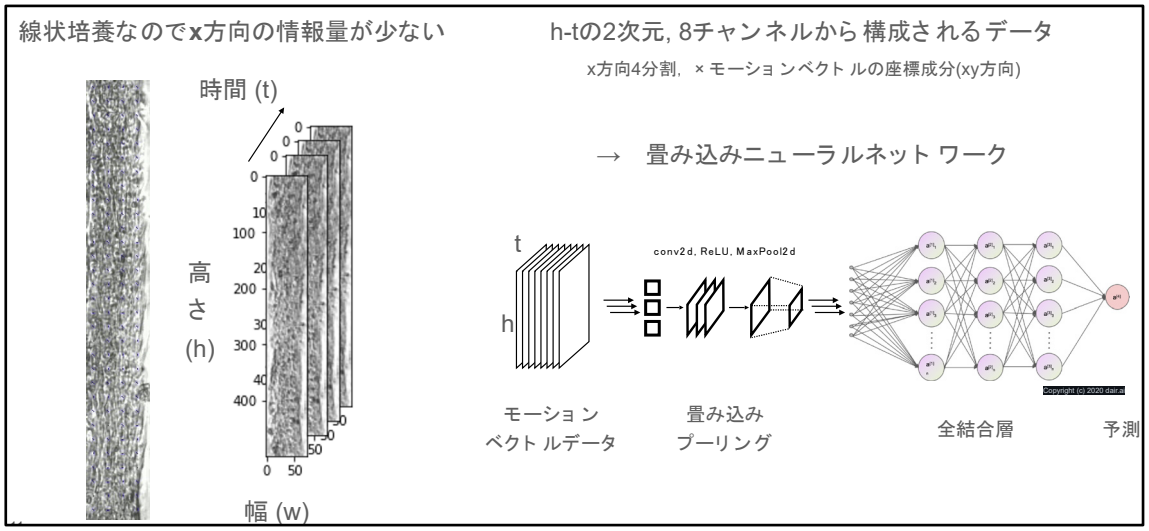


図 3. 深層学習モデルの概略図
幅方向の情報が少ないモーションベクトルから、心機能に影響を及ぼす薬物添加の有無を予測するモデルの概念図。

CNN のハイパーパラメタや入力データのオーグメンテーションを調整したところ、Ⅰ型心筋症を誘導する抗がん薬ドキソルビシン、Ⅱ型心筋症を誘導するトラスツズマブの添加の有無を予測する深層学習モデルにおいて約 85.6%の予測精度を達成した（図 4）。

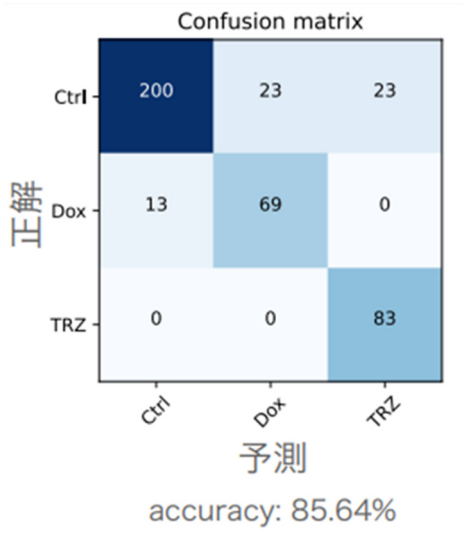


図 4. 深層学習モデルによる予測結果の混同行列
Ctrl：薬物添加なし、Dox：ドキソルビシン、TRZ：トラスツズマブ。

また、構築モデルの予測根拠を可視化したところ、ドキソルビシンを添加したデータでは弛緩の終了時、トラスツズマブを添加したデータでは収縮の終了時におけるモーションベクトルが予測に強く寄与していることが明らかとなった（図 5）。これらの結果は、収縮や弛緩の終了時のモーションベクトルのバランスが、収縮最大速度や収縮弛緩総移動距離といった既存の「収縮力の大きさ」ではない心筋細胞の動きの質を表す指標になりうることを示唆していると考えられる。

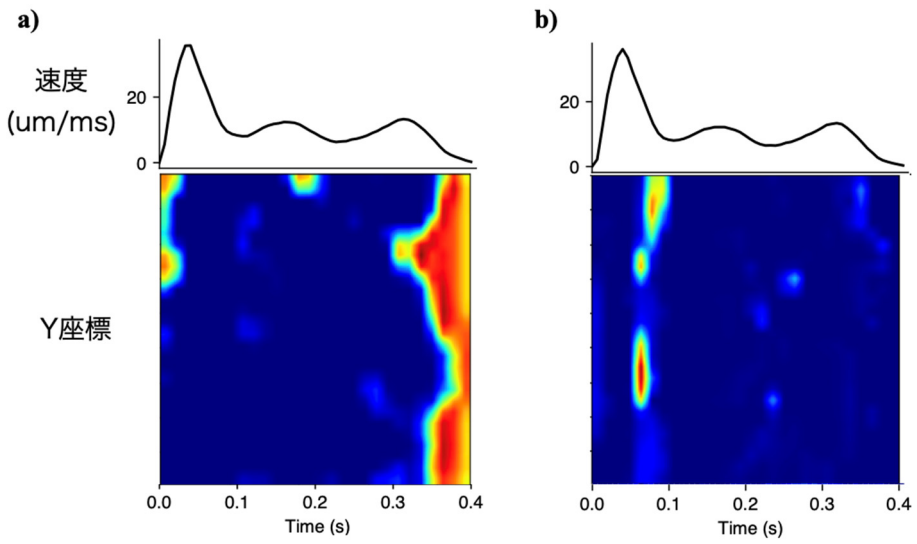


図 5. Grad-CAM による予測根拠の可視化

ドキソルビシン（a）およびトラスツズマブ（b）を添加した iPS 心筋の多次元モーションベクトルデータを構築したモデルに入力した際に、どの数値を重視して予測結果を出力したかを Grad-CAM によって図示した一例。上部の線グラフは各時間におけるモーションベクトルの平均値、すなわち平均移動速度の時間変化を表す。1 回目のピークが心筋の収縮、2 回目以降のピークが心筋の弛緩を表す。下部のヒートマップは、Y 座標―時間平面における Grad-CAM の計算結果を表す。予測において重視した領域は黄色～赤色で表されている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東邦大学医学部生理学講座細胞生理学分野の間木重行である。

文　献

1） Izumi-Nakaseko H, Chiba K, Hagiwara-Nagasawa M, Satsuka A, Goto A, Nunoi Y, Kambayashi R, Matsumoto A, Takei Y, Kanda Y, Naito AT, Sugiyama A. Optimizing the Direction and Order of the Motion Unveiled the Ability of Conventional Monolayers of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes to Show Frequency-Dependent Enhancement of Contraction and Relaxation Motion. Front Cell Dev Biol. 2020 Sep 10;8:542562. PMID: 33015053; doi: 10.3389/fcell.2020.542562.