

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20663

研究課題名（和文）バーチャル心筋細胞の実現 - 機械学習による実形状モデル生成・統合解析・統計評価 -

研究課題名（英文）Realization of a virtual cardiomyocyte: image-based mesh construction using machine learning, integrated simulation and statistical analysis

研究代表者

波田野 明日可 (Katayama, Asuka)

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・講師

研究者番号：20707202

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：正常マウスとMuscle Lim Proteinノックアウト（MLPKO）マウスの心筋細胞の3次元電子顕微鏡画像に対し、機械学習を用いて自動形状抽出に成功した。さらにシミュレーション可能なメッシュとする手法を確立した。正常マウスとMLPKOマウス両方について、マウス心筋細胞の実形状を反映した形状モデルを用いて力学電気生理連成解析を行い、膜電位やCa動態といった電気生理現象や、収縮現象の再現、比較を行った。MLPKOマウスでは凝集したミトコンドリアの存在により拡散現象が阻害され、Ca²⁺濃度空間勾配が正常マウスよりも大きく、収縮力に偏りが生じ、効率が低下することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では心筋細胞の電子顕微鏡画像から機械学習を用いて形状を抽出し、解析可能なメッシュを構築することに成功した。学術的には、近年広がりを見せる画像ベースの解析の中で常に課題となる、メッシュ構築の困難さを克服する一つの手法を示すことができた。また心筋細胞における電気・生理・力学連成現象を実形状の中で再現したのは本研究が初めてである。正常マウスと構造タンパクのノックアウトマウスの比較においては、病理状態で頻りに観察されるミトコンドリア凝集が収縮力低下につながるメカニズムを解明し、心筋細胞の病理状態解明に貢献した。

研究成果の概要（英文）：3D structure of control and Muscle LIM protein knockout (MLPKO) mouse was successfully segmented using deep learning from serial block-face scanning electron micrograph images. We constructed real 3D structural FE mesh based on electron micrograph images from the segmented structure. We extended our coupled simulation of mechanics and electrophysiology with incorporating the real 3D structures. Electrophysiology and mechanical contraction were simulated and compared between control and MLPKO model. In MLPKO model, the aggregation of mitochondria hampers diffusion of calcium ions. We observed that higher gradient of calcium ion in MLPKO model increased inhomogeneity in force generation and lower the efficiency of contraction.

研究分野：生体のマルチフィジックス解析

キーワード：心筋細胞 機械学習 Image based modeling 有限要素法 マルチフィジックス解析

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は規則的で精緻な微細構造を持っている。構造を担う遺伝子に異常があると微細構造が乱れて心筋細胞の機能的変化(収縮力の低下や応答性の低下など)を伴う。加えて外的要因、例えば大動脈狭窄による心不全の心臓でも細胞の微細構造が乱れることが報告されている。これらの病態心筋細胞においては微細構造の形態的变化と同時に酵素活性などの生理的变化も生じている。各々の機能的変化への影響を実験的に分離することは難しい。加えて収縮は電気・生理・力学が連成した複雑な現象であるため、形態やタンパク活性等の構成要素の変化が及ぼす影響を演繹的に予測し説明することが困難である。形態的变化の如何なる要素(小器官の間の距離やサイズ等)が、どのような生理的变化を通して、或いは直接的に、機能的変化を引き起こすのか。強い相互作用のある電気・生理・力学連成システムの中で、形態的变化から受ける現象の起点となる生理的变化は何か。これが機能的変化のメカニズム解明の大きな課題となっている。形態とともに電気・生理・力学現象を再現し、複雑な相互作用の結果を予測できる統合シミュレーションが実現されれば、形態的变化のみを与えた解析または生理的变化のみを与えた解析を行うことで、それぞれの影響を分離して評価できる。影響プロセスを分析することで、形態変化を原因とする一連の変化を因果関係も含めて特定できる。

形態モデルには仮定をできる限り削いだ忠実な実形状モデルを用いる必要がある。メカニズムが明らかでない場合、不用意な仮定に基づく簡易化は重要な要素を欠く可能性が高いからである。ただし実形状モデルには、個々の細胞の個体差が含まれる問題がある。個体差によらない形態的变化の影響を評価するためには、多数の細胞から取得した実形状モデルの解析結果を統計的に評価することで解決できる。しかし多数の実形状モデル作成の必要が生じるため、膨大な手間と時間を要する従来の人手による形状モデル作成は現実的ではない。近年の機械学習による画像処理技術の発達により、画像からのモデル構築を自動化し、手間・時間の問題を抜本的に解決できる可能性が高くなってきた。自動化により多数の細胞由来の実形状モデルが作成可能になれば、実験と同様に多数の解析結果を統計的に分析することで個体差による問題も解決可能である。

2. 研究の目的

機械学習を用いて電子顕微鏡 3D 画像より自動的に形状モデルを生成する手法を確立し、実心筋細胞形態モデルを用いた生理・力学連成解析 - バーチャル心筋細胞 - を実現する。細胞の形態的变化と生理的变化の影響を分離して評価し、機能的変化のメカニズム解明を目指す。自動化による多数モデルの解析を実施し統計的な分析を行うことで、細胞の個体差に依らない形態的变化の影響の評価を可能とする。

3. 研究の方法

正常マウスと Muscle Lim Protein ノックアウト(MLPKO)マウスの心筋細胞の Serial block face scanning electron micrograph 画像を共同研究先より提供を受け、機械学習を用いてそのミトコンドリア・筋原線維の自動抽出する。機械学習については、脳細胞の電子顕微鏡画像で実績のあった CDeep3M を用いて実施する。心筋細胞ではミトコンドリアの密度が他細胞よりも高く、そのためミトコンドリア同士が接触して存在している。多くの細胞セグメンテーションを行う機械学習モデルにおいては、ミトコンドリアの抽出が可能であるが、接触して存在するものを分離するものは我々が見る限り存在しなかった。ミトコンドリアのサイズは病理状態における細胞形態変化として多く報告されるものであり、個としてのミトコンドリアの認識は重要である。そこで、ミトコンドリア領域のセグメンテーションと、ミトコンドリア外膜のセグメンテーションを実施し、その二つの結果を用いて画像処理プログラムを介すことにより、個々のミトコンドリアの分離を実現する(図1)。

セグメンテーションされた画像から解析可能な有限要素メッシュを作成する。微小な細胞内小器官の形状をそのままメッシュ化すれば、計算負荷の観点から解析実施が不可能となってしまう。そこで、細胞の約 50%を占める筋原線維、40%程度を占めるミトコンドリアと、それ以外の領域の 3 つを定義して有限要素とし、微細な小器官は実際の位置に即した節点に配置することで計算量を低減する。

理想化形状における心筋細胞の電気・生理・力学連成シミュレーターは、過去の研究において開発済みである。理想化形状モデルは反応・現象のモデル化という観点からは達成度は高い一方、形状の模擬に関しては幾何的な模擬にとどまっていた。上記で作成する実形状モデルにシミュレーターを適用する。シミュレーションにおいては、収縮のトリガとなる膜イオンチャンネルによ

る電気現象・Ca や ATP 等の反応拡散による収縮タンパクの活性化を，反応拡散解析と力学平衡解析とを有限要素法によりそれぞれ解く．力学解析からは変位を，反応拡散解析からは発生収縮力を各タイムステップにおいて渡し，弱連成により相互作用を表現する．

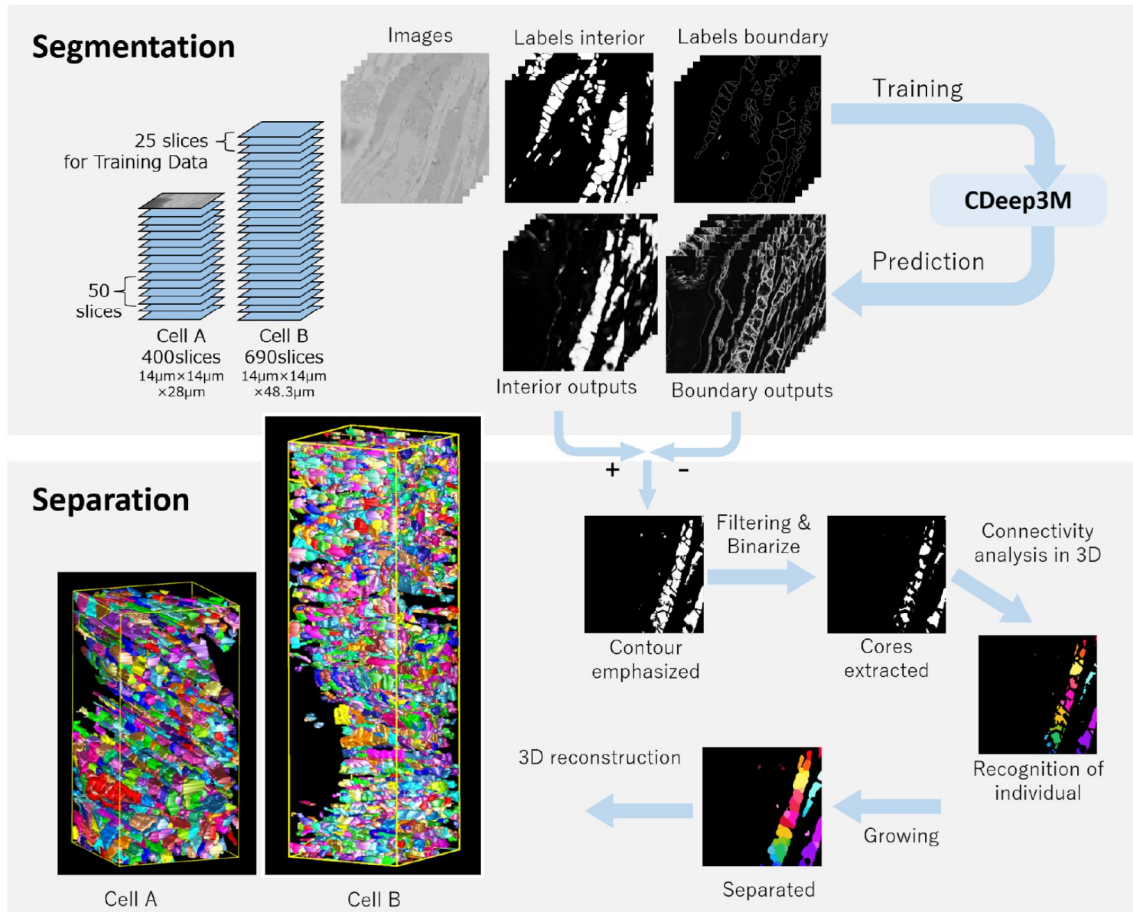


図1 ミトコンドリアのセグメンテーションと，個々の分離方法の概念図．左下の2枚の画像は2つの細胞についてミトコンドリアを3次元再構築したものである．色の違いは個々のミトコンドリアを区別するために与えている．論文[1]より転載．

[1] Hatano et al. “Isolation and reconstruction of cardiac mitochondria from SBEM images using a deep learning-based method” *Journal of Structural Biology*, 214 (2022) 107806

4．研究成果

機械学習による画像のセグメンテーション

機械学習により，ミトコンドリアのセグメンテーションを50枚の教師データを用いてF1-score 95%の正確さで実施することができた．過去の報告にある値(74% by Hussain et al., 61% with IMOD by Hussain et al., 2018)より高い値であり，また人の手作業によるセグメンテーション(96% by Haberl et al. (2018))に近い正確さであるといえる．図2(論文[1]より転載)に教師データの数とセグメンテーションの正確さの関係を図2に示す．約5枚の教師データを越えたところでF1-scoreの上昇が穏やかになり，92~95%で頭打ちとなる．5枚程度の教師データを用意すれば，90%以上のF1-scoreでミトコンドリアのセグメンテーションが行えるという結果となった．しかし同じ心筋細胞の電子顕微鏡画像データであっても，異なる条件で撮影された場合には，教師データセットの使いまわしがあまり有効とは言えない結果になったが，これは画像セットが2つしかなかったことに起因する可能性もあり，さらなる検証が必要である．

分離における，ミトコンドリアピクセルの個認識における正解率は80%であった．分離が失敗すると，大きな不正解面積が生じるため，正解率の低下に大きく影響する．図3(論文[1]より転載)に分離の成否について評価を行った画像を転載する．

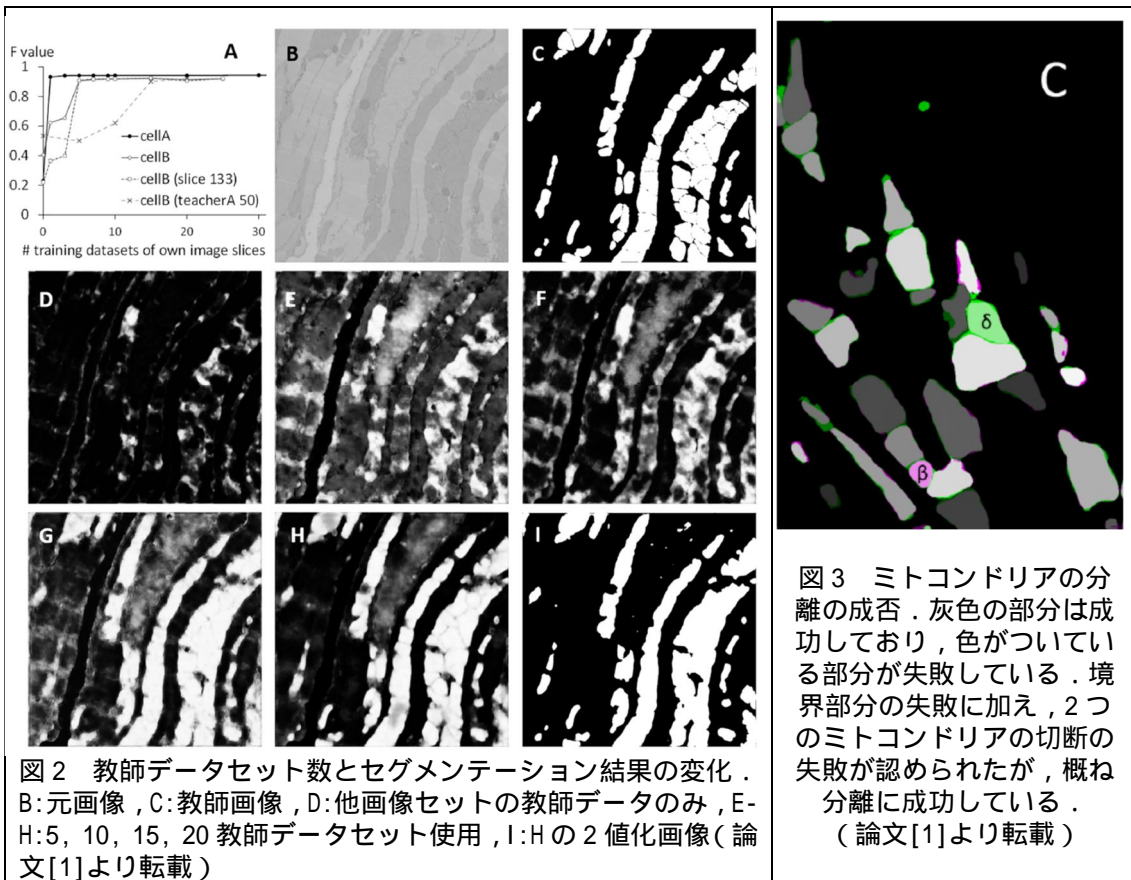


図2 教師データセット数とセグメンテーション結果の変化．
 B:元画像，C:教師画像，D:他画像セットの教師データのみ，E-
 H:5，10，15，20教師データセット使用，I:Hの2値化画像(論
 文[1]より転載)

図3 ミトコンドリアの分離の成否．灰色の部分は成功しており，色がついている部分が失敗している．境界部分の失敗に加え，2つのミトコンドリアの切断の失敗が認められたが，概ね分離に成功している．
 (論文[1]より転載)

電気・生理・力学連成有限要素解析

正常マウスと MLPKO マウス両方について，マウス心筋細胞の実形状を反映した形状モデルを作成した．力学電気生理連成解析を行い，膜電位や Ca 動態といった電気生理現象や，収縮現象の再現，比較を行った．今回使用した画像において，MLPKO マウスは Control と比べて筋原線維とミトコンドリアの配列の乱れを生じさせていた．その結果，大きなミトコンドリア柱の存在により拡散現象が阻害され，Ca²⁺濃度空間勾配が Control よりも大きくなることが明らかになった．さらに，このようにして生じた大きな濃度勾配により，収縮力の分布についても偏りが生じ，収縮の効率が低下することが示された．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asuka Hatano, Makoto Someya, Hiroaki Tanaka, Hiroki Sakakima, Satoshi Izumi, Masahiko Hoshijima, Mark Ellisman, Andrew D. McCulloch	4. 巻 214
2. 論文標題 Isolation and reconstruction of cardiac mitochondria from SBEM images using a deep learning-based method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Structural Biology	6. 最初と最後の頁 107806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jsb.2021.107806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Asuka Hatano, Makoto Someya, Hiroaki Tanaka, Hiroki Sakakima, Satoshi Izumi, Masahiko Hoshijima, Mark Ellisman, Andrew D. McCulloch
2. 発表標題 Automated 3D reconstruction of isolated mitochondria from cardiomyocyte SBEM images
3. 学会等名 Annual meeting of biophysical society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Someya Makoto, Tanaka Hiroaki, Asuka Hatano, Satoshi Izumi, Masahiko Hoshijima, and Andrew D. McCulloch
2. 発表標題 Development of an Ultrastructural Model of Cardiomyocytes Based on Electron Microscopy
3. 学会等名 11th Asian-Pacific Conference on Medical and Biological Engineering (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yu Mochizuki1, Hiroki Sakakima, Asuka Hatano, Satoshi Izumi
2. 発表標題 Excitation contraction coupling simulation on model of a cardiomyocyte based on electron microscope images
3. 学会等名 the 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Asuka Hatano
2. 発表標題 Multiphysics simulation of cardiomyocytes reveals the critical role of the subcellular ultrastructure
3. 学会等名 The 6th Symposium on Theoretical and Applied Mechanics (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of California San Diego		