

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08423

研究課題名(和文) 機械学習による形態的特徴量を用いたiPS細胞由来洞結節細胞の選別と分子基盤の解明

研究課題名(英文) Deep learning-based identification of sinoatrial node-like pacemaker cells from SHOX2/HCN4 double positive cells differentiated from human iPS cells

研究代表者

久留 一郎 (HISATOME, Ichiro)

鳥取大学・医学部・特任教員

研究者番号：60211504

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)：我々が確立した洞結節細胞マーカー由来のdual reporter (HCN4並びにShox2)遺伝子を搭載したヒトiPS細胞から心筋分化誘導し、全細胞の70%が洞結節細胞(SAN)と同等の自動能活動電位を有していた。しかし残りの30%は心房および心室型の自動能であった。そこで機械学習がSANの細胞形態を選別できるかを課題とした。本細胞は形態に特徴を有し、二値化モデルを用いることでペースメーカー細胞を選別でき、その正確性はヒトの選別能力を有意に上回ることが確認された。以上から畳み込みニューラルネットワークを用いた機械学習は遺伝子搭載ヒトiPS細胞由来ペースメーカー細胞の形態を認識することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二値化モデルを用いた機械学習は遺伝子搭載ヒトiPS細胞由来ペースメーカー細胞の形態を認識していることが判明した。この結果は機械学習が遺伝子を搭載したヒトiPS細胞から分化誘導したペースメーカー細胞を選別採取出来る可能性を示している。今後は本機械学習を用いて遺伝子改変をしないヒトiPS細胞から心筋分化誘導後のペースメーカー細胞を純化できるかを検討するが、本研究が成功すれば徐脈性不整脈患者に対しての新たな再生医療となり得るために、医療に与える好影響は計り知れない。

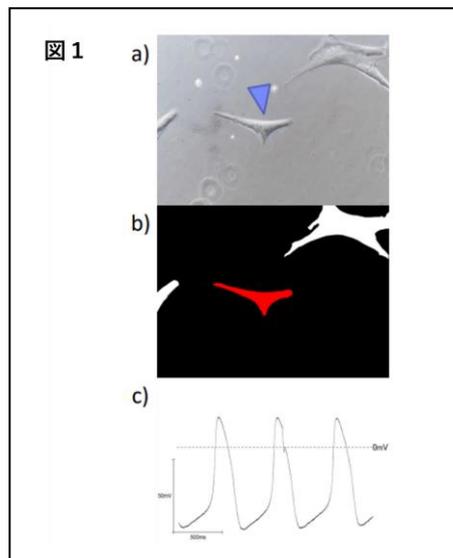
研究成果の概要(英文)：Cardiomyocytes derived from human iPS cells (hiPSCs) include cells showing sinoatrial node (SAN)- and non-SAN (atrial and ventricular)-like spontaneous action potentials (APs). We examined whether the deep learning technology could identify hiPSC-derived SAN-like cells showing SAN-type-APs by their shape. We acquired phase-contrast images for hiPSC-derived SHOX2/HCN4 double positive SAN-like and non-SAN-like cells, and made VGG16-based convolutional neural network (CNN) model, which classify an input image as SAN-like or non-SAN-like cell. Compared to human discriminability all parameter values as accuracy, recall, specificity and precision obtained from trained CNN model were higher than those of human classification. Deep learning technology could identify hiPSC-derived SAN-like cells with considerable accuracy.

研究分野：Cardiology

キーワード：iPS sinoatrial node deep learning automaticity

1. 研究開始当初の背景

洞房結節 (SAN) 細胞は自動性を示す。SAN 細胞の機能不全は徐脈性不整脈を引き起こす。徐脈性不整脈の治療には、人工ペースメーカーが移植される。しかし、電池寿命が短いなどの医学的な欠点があるため、生物学的ペースメーカーが提案されている。我々は、SHOX2 (short stature homeobox 2) と HCN4 (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated K⁺ channel 4) という 2 つの SAN 特異的遺伝子をマーカーとして、遺伝子操作したデュアルレポーター型ヒト iPS 細胞 (hiPSC) から得られた心筋細胞から SAN 様細胞を選択し、SAN 様ペースメーカー細胞を濃縮する新規方法を報告した。しかし、この方法は hiPSC の遺伝子操作が必要であり、生体ペースメーカーの開発への応用は困難である。心筋細胞の大きさや細胞内小器官は、その生理的性質と密接に関係していることが報告されている。ヒトの SAN 細胞は紡錘形をしており、ヒトの心房や心室の筋細胞よりもはるかに小さく、心室や心房の細胞とは異なる固有の活動電位 (AP) を持っている。AP パラメータは、hiPSC 由来心筋細胞における各細胞タイプの識別に最も有用である。そこで、hiPSC 由来心筋細胞の画像を用いて、SAN 型 AP を示す SAN 様細胞を、その細胞形状から識別できるのではないかと考えた。細胞形状の特徴量から特定の細胞を識別するために、畳み込みニューラルネットワーク (CNN) の深層学習技術が進んでいる。hiPSC 由来内皮細胞の同定や hiPSC 由来心筋細胞の品質管理への応用が報告されている。しかし、hiPSC 由来 SAN 様細胞をその形態的特性で識別するためのディープラーニング技術は確立されていない。



2. 研究の目的

本研究では、hiPSC から分化させた SHOX2/HCN4 二重陽性心筋細胞から、SAN 型 AP を示す SAN 様細胞を同定するディープラーニング技術を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

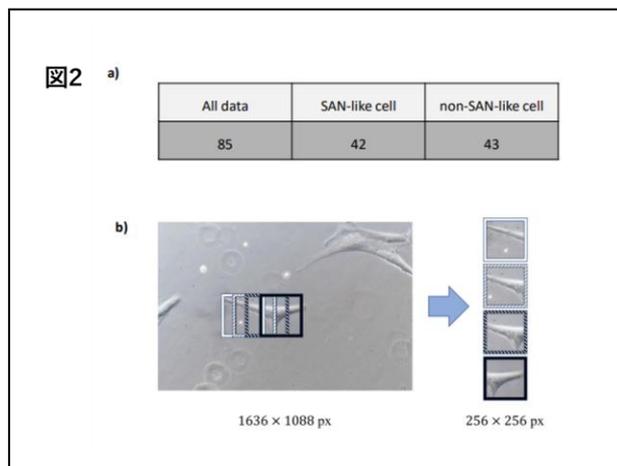
(1) デュアルレポーター-hiPSC 由来心筋細胞の APs の測定

SHOX2-mCherry/HCN4-EGFP デュアルレポーター遺伝子を保有する hiPSC を、既報のプロトコルを用いて心筋細胞に分化させた。hiPSC 由来の SHOX2/HCN4 ダブルポジティブ心筋細胞は、蛍光活性化セルソーティング (FACS) を用いて分別された。AP は、Axopatch-200B アンプ (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いたアンフォテリシン B-perforated パッチクランプ法で測定された。電流パルスの生成、データ取得、データ解析は、pCLAMP9 ソフトウェア (Molecular Devices) を用いて行った。細胞は、他 [3] に記載されているように、37°C で通常の Tyrode 溶液

で灌流した。SAN 様細胞は、Ma らが記載した基準に従って、SAN 型 AP を示す細胞として定義された。深層学習では、心室心筋細胞も心房心筋細胞も “非 SAN 様細胞” に分類した。

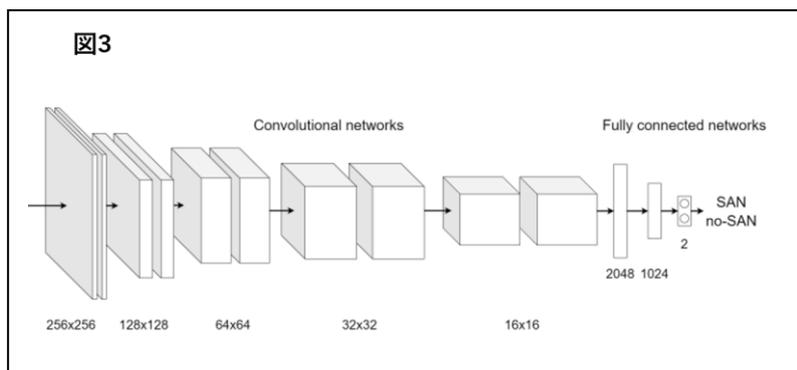
(2) ニューラルネットワークモデルの学習・評価用データセットの準備

電気生理学的特性を決定した hiPSC 由来心筋細胞の位相コントラスト画像 85 枚を取得し、1636 x 1088 pixel のグレースケール画像として保存した。各画像には複数の細胞が含まれており (図 1a)、そのうち少なくとも 1 つの細胞は、SAN 細胞の電気生理学的特性を有する「SAN 様細胞」 (図 1c) または心室細胞または心房細胞の電気生理学的特性を有する「非 SAN 様細胞」 (図 1b) として識別され符合が付けられ



心房細胞の電気生理学的特性を有する「非 SAN 様細胞」 (図 1b) として識別され符合が付けられ

ている。深層学習アルゴリズムの学習・評価用データセットを作成するために、データ増強を実施した。データ増強とは、既存のデータを用いてデータセットの修正コピーを作成することで、学習データを人為的に増やす手法である。まず、画像をランダムに分割し、SAN 様細胞と非 SAN 様細胞を含むように、80%と残りの 20%をそれぞれ訓練セットと検証セットに割り当てた (図 2a)。そして、トレーニングセットとバリデーションセットの画像を増やすために、256×256 ピクセルの小部分画像を原画像全体を覆うように、左上から右下へ 50 ピクセルのストライドで切り出して保存した (図 2b)。最後に、細胞を含まない小画素画像は除外された。得られた 5415 枚の小画素画像は、ディープニューラルネットワークの学習のための入力ブロックとして使用された。

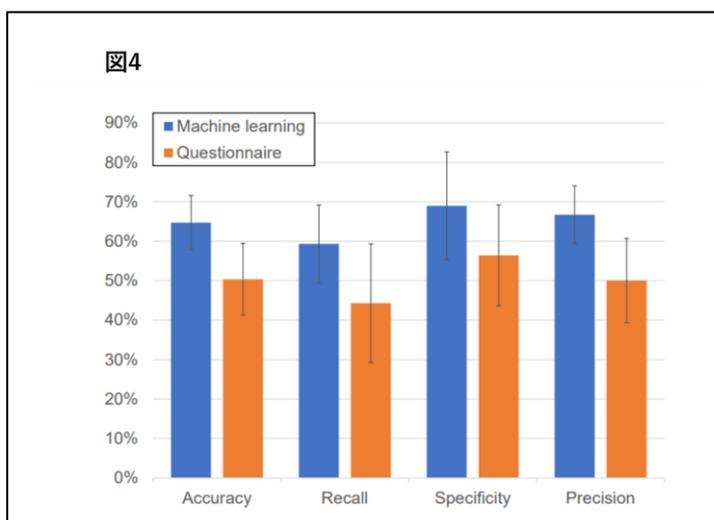


(3) ディープニューラルネットワークモデルの構築と評価

入力画像中の細胞を SAN 様細胞群と非 SAN 様細胞群に分類するために、VGG16 ベースの CNN モデルを用い、13 層の畳み込み層、5 層のマックスプーリング層、3 層の完全接続層を含む。各畳み込み層は、活性化のために Rectified Linear Units に接続されている。出力層にはソフトマックス活性化関数を使用されている。ネットワークの学習には、損失関数としてカテゴリ別クロスエントロピー関数が、最適化関数として適応的モーメント推定関数が用いられ、バッチ数は 32、最大学習エポック数は 100 である。ネットワーク構造は図 3 に示す通りである。学習処理は、CPU に Core i9-9820X (Intel、米国カリフォルニア州サンタクララ)、メモリ 32GB、GPU に GeForce GTX1080Ti (NVIDIA、米国カリフォルニア州サンタクララ) を搭載したパソコン (NEC、東京、日本) 上で TensorFlow/Keras フレームワークを用いて実施した。テストデータを用いて、CNN モデルの分類の精度、精密度、再現度、特異度を推定した。これらのパラメータ値は、ボランティア (n=14) を対象としたアンケートで推定した値と比較した。CNN モデルのテスト用と同じ細胞の写真を用いて、画像データ中の細胞が SAN 様細胞に分類されるかどうかを判定するテストにより調べた。

4. 研究成果

FACS で選別された SHOX2-mCherry/HCN4-EGFP 二重陽性細胞には、SAN 型、心房型、心室型の自発的 AP を示す細胞が含まれていた。我々は、ディープラーニング技術によって、SAN 型 AP を示す SAN 様細胞を特定できるかどうか、また具体的にどのように特定できるかを検討した。識別データの精度、精密度、再現度、特異度の 4 つのパラメータに基づいて、VGG16 ベースの CNN モデルを評価した。学習後の CNN モデルの性能を評価するため、テストデータセットを用いて 5 重のクロスバリデーション



を実施した。図 4 に示すように、学習済み CNN モデルで得られた精度、精密度、再現度、特異度の平均値は、それぞれ 0.6472 ± 0.0687 、 0.5933 ± 0.0986 、 0.6899 ± 0.1364 、 0.6673 ± 0.0731 、アンケートで得られたものは、それぞれ 0.5036 ± 0.0909 、 0.4429 ± 0.1505 、 0.5643 ± 0.1277 、 0.5004 ± 0.1066 であることがわかった。このように、すべてのパラメータ値が、人間の分類よりも CNN モデル同定で大きくなっていることがわかった。マッシュューズ相関係数 (MCC) は、問題の回帰係数の幾何平均であり、不均衡なクラスに対してロバストである。MCC は +1 ~ -1 の範囲であり、MCC が 0 の場合、予測はランダムとなる。モデル同定における MCC の値は 0.2881 ± 0.1360 であり、我々の CNN モデルはランダムな選択よりも高い予測性能を持つことが示唆された。これ

らの結果は、我々の VGG16 ベースの CNN モデルが、SAN 様細胞と非 SAN 様細胞をその形態によって、人間の識別やランダム予測よりも正確に識別できることを示している。本研究では、SAN 細胞に特徴的な AP 波形 (SAN 型 AP) を示す hiPSC 由来 SHOX2/HCN4 ダブル陽性 SAN 様細胞の自動識別手法の確立を試みた。その結果、学習後の CNN モデルは、MCC で推定した人間の判別やランダムな選択よりも、細胞の形状の特徴量によって hiPSC 由来心筋細胞の中から SAN 様細胞をより正確に判別できることが明らかとなった。これは、SAN 特異的マーカー遺伝子 SHOX2 および HCN4 を保有する hiPSC から分化した SAN 様細胞が、SAN 細胞としての形状の特徴量を保有できることを示す初めての報告である。ディープラーニング技術により、SAN 型 AP を示す SAN 様細胞をその形状からかなりの精度で識別できたことから、hiPSC 由来の SHOX2/HCN4 ダブルポジティブ SAN 様細胞は、その細胞形状に一定の特徴量を有していることが示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wakimizu T, Morikawa K, Fukumura K, Yuki T, Adachi T, Kurata Y, Miake J, Hisatome I, Tsuneto M, Shirayoshi Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 SHOX2 refines the identification of human sinoatrial nodal cell population in the in vitro cardiac differentiation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 239-249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.07.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	三明 淳一郎 (MIAKE Junichiro) (40372677)	鳥取大学・医学部・准教授 (15101)	
研究分担者	経遠 智一 (TSUNETO Motokazu) (60730207)	鳥取大学・医学部・助教 (15101)	
研究分担者	白吉 安昭 (SHIRAYOSHI Yasuaki) (90249946)	鳥取大学・医学部・准教授 (15101)	
研究分担者	森川 久未 (MORIKAWA Kumi) (90707217)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

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
---------	---------