

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22622

研究課題名（和文）機械学習を用いた大脳組織電子顕微鏡画像解析プラットフォームの開発

研究課題名（英文）Development of a platform for analyzing cerebral tissue electron microscopy images using machine learning

研究代表者

河合 宏紀（Kawai, Hiroki）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・客員研究員

研究者番号：20784391

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、電子顕微鏡画像取得の様々なステップを自動化する技術が発展し、膨大な情報量の電子顕微鏡画像が得られるようになってきた。しかし、その解析は未だ手動に頼る部分が多く、組織微細構造解析の律速になっている。そこで本研究では、近年目覚ましい発展を遂げている機械学習を用いて大脳組織電子顕微鏡画像解析ツールを開発し、細胞内オルガネラのセグメンテーションを効率化することでこれまで不可能だったオルガネラ微細構造の解析を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞においては複雑な細胞間相互作用と細胞内イベントを同時に解析することが求められており、そのためには電子顕微鏡を用いて、細胞レベル・細胞小器官レベルといった異なるスケールの解析を行う必要があり、その解析にかかる時間は膨大である。本研究で開発したプラットフォームを用いることで、今後の神経科学の研究が大幅に効率化され、神経細胞の形態やシナプス形成の制御メカニズムの解明に必須の情報を提供すると期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, technologies have been developed to automate various steps of electron microscope image acquisition, and electron microscope images with enormous amounts of information can now be obtained. However, the analysis of these images still relies heavily on manual operations, and this is still the rate-limiting factor in the analysis of tissue microstructures. In this study, we developed a tool for analyzing electron microscopy images of cerebral tissue using machine learning, which has made remarkable progress in recent years, to improve the efficiency of intracellular organelle segmentation, thereby enabling the analysis of organelle microstructure that has been impossible until now.

研究分野：深層学習を用いた生物画像解析

キーワード：深層学習 電子顕微鏡 画像解析 オルガネラ ミトコンドリア クリステ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

大脳は高次機能を司る複雑な組織であり、多数の神経細胞が莫大な数のコネク션을形成することで制御されている。この神経細胞間のコミュニケーションの結果起こる細胞内シグナル伝達では  $\text{Ca}^{2+}$  が中心的な役割を果たす。この  $\text{Ca}^{2+}$  動態は神経細胞内で局所的に厳密に制御されていることが知られている。そのため、 $\text{Ca}^{2+}$  動態を制御するメカニズムを明らかにすることが、神経細胞の活動を知るためには重要である。この  $\text{Ca}^{2+}$  動態の制御は、ミトコンドリアや小胞体が重要な役割を担っていることが知られており、我々の研究グループは、この  $\text{Ca}^{2+}$  動態がミトコンドリア-小胞体間の直接の相互作用によって制御されていることを見出してきた。そのため、神経細胞におけるミトコンドリアや小胞体の微細構造を空間的な情報を共に明らかにすること必要がある。そこで、電子顕微鏡の高い解像度での解析が行われてきたが、オルガネラ全体をトレース（セグメンテーション）して再構成することには、非常に労力と時間がかかり、解析のボトルネックになっている。

近年、数十~数百もの細胞体を含む巨大な 3 次元電子顕微鏡画像を用いて神経細胞の形態および細胞間シナプス結合の詳細を明らかにするコネクトミクス分野において、画像処理と機械学習によるセグメンテーションの高速化の試みが進んできた。しかし未だ完全な自動化には至っておらず、最終的には人による何べ数千時間にも及ぶ膨大な修正作業が必要であり (Motta, Berning, Boergens, Staffle et al., Science 2019)、さらなる改善が望まれている。また、細胞内のオルガネラ解析までを含めて解析を行うためのプラットフォームは十分に開発されてきていなかった。従って、機械学習を取り入れ、最終的な人による修正までを含めた解析を可能とするプラットフォームを開発する必要があった。

## 2. 研究の目的

我々の研究グループは、多次元 viewer ライブラリの導入やインタラクティブな操作に対応したパイプラインの最適化によって、3 次元電子顕微鏡像を効率的に解析するプロトタイプアプリケーションを開発し、短時間の作業で、神経細胞内のオルガネラ外形のセグメンテーションを可能にしていた。しかし、このプロトタイプでは大規模なデータセットを処理するワークフローを取り入れるまでには至っていなかった。そこで、プロトタイプアプリケーションを発展させ、大規模なデータセットの解析を可能にするワークフローを取り入れたアプリケーションとしての更なる開発を目的とした。また、実際に開発したアプリケーションが、生物学的な発見を達成することができることを確かめることを目的とし、電子顕微鏡像を用いたオルガネラ外形およびその内部構造の解析までを行うこととした。

## 3. 研究の方法

本研究で開発するアプリケーションは、深層学習との親和性を重視し、python 言語で GUI まで含めて記述することとした。また、そのために、以下の方針で開発を行った。

- 3 次元電子顕微鏡像に対して効率的にアノテーションを行ったり、セグメンテーション結果の修正を行ったりするためには、3 次元画像データを扱うことのできる viewer が必要である。そこで、そこで基礎となるライブラリとして、python のための多次元 viewer ライブラリである napari (<https://napari.org/>) を利用することとした。napari の plugin として開発することで、ユーザーにとってもアクセスのしやすいものとなることが期待される。
- アノテーションから機械学習の学習および推論、セグメンテーションの前処理・後処理、セグメンテーション後の結果の解析等、機械学習の機能だけではなく、機械学習モデルによる推論の前後に必要な機能付加を効率良く行うことのできるプラットフォームとして開発を行った。
- 我々が開発したプロトタイプアプリケーションにおいて使用していたアルゴリズムでは主に 2 次元の各スライスでオルガネラをセグメンテーションしていた。深層学習には 3 次元ボリュームを入力とする方法もあるが、2 次元スライスを入力とする場合は 3 次元ボリュームを入力する場合に比べて学習データが少なく済むというメリットがある。しかし、オルガネラやその内部構造には非常に微小な構造があり、前後複数枚のスライスのオルガネラ形状から総合的な判断を必要とする場面も多く、アルゴリズムの改善が必要であった。そこで 3 次元の情報を使用したより精度の高いアルゴリズムの開発・検討を試みた。

さらに、生物学的な知見が実際に開発したアプリケーションによって得られるかを確かめるために、ミトコンドリアおよびミトコンドリアの内部構造であるクリステをセグメンテーションして、その構造を調べた。

## 4. 研究成果

- Python-based platform for human-in-the-loop (HITL) workflow (PHILOW) の開発

まず、プロトタイプアプリケーションを発展させ、napari plugin として開発を進めた。開発した PHILOW を用いた解析のワークフロー

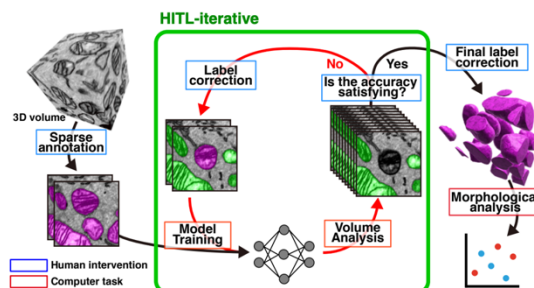


図1. PHILOWを用いた電子顕微鏡像解析のワークフロー

一においては、画像のアノテーションからモデルの学習およびその結果の修正までを含めて実行できる (図 1)。また、対話的 (human-in-the-loop:HITL) 深層学習を取り入れ、学習・推論・修正を繰り返すことで効率的に深層学習モデルを作成することができるようになった。

## 2. Three-axis prediction (TAP) 法の開発による精度改善

3次元的な情報を取り入れるために、xy 方向だけではなく、yz 方向と zx 方向からもスライスを作成して推論を行い、1つのボクセルごとにそれらの結果を統合して最終的な結果とする手法を開発した。これにより、特にオルガネラの端で xy スライスだけでは判断不能な箇所の推論精度を向上させることができた。

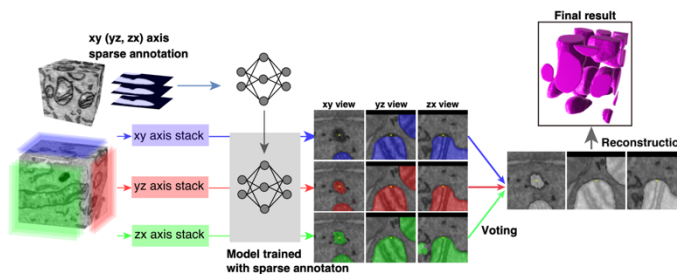


図2. TAP法を用いた3次元電子顕微鏡像のセグメンテーション

## 3. ミトコンドリアおよびクリステ構造のセグメンテーション

TAP 法と PHILOW の開発によって、3次元電子顕微鏡像の解析を高効率かつ高精度に行うことができるようになったので、ミトコンドリアのクリステ構造をセグメンテーションし、3次元再構築を試みた。その結果、クリステ構造はミトコンドリアごとに様々な構造をとっていることがわかった。更に、クリステ構造には板状の lamellar 構造と、チューブ状の tubular 構造が存在することが知られていたが、これまで考えられていたよりも多くの tubular 構造が存在する事が明らかになった (図 3)

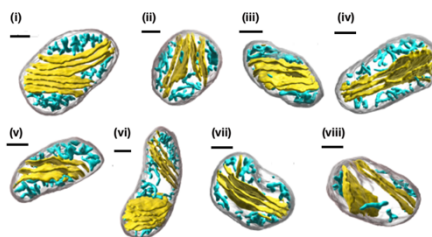


図3. クリステ構造の例 (黄色 : lamellar、シアン:tubular)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Suga Shogo, Nakamura Koki, Humbel Bruno M., Kawai Hiroki, Hirabayashi Yusuke	4. 巻 -
2. 論文標題 An interactive deep learning-based approach reveals mitochondrial cristae topologies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biorxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.06.11.448083	査読の有無 無
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
---------------------------	-----------------------	----

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