

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22975

研究課題名（和文）高感度磁束計による自発磁場の測定を用いた細胞評価法の確立

研究課題名（英文）Development of cell evaluation method using measurement of spontaneous magnetic field with high-sensitivity magnetometer

研究代表者

吉田 隆司（Yoshida, Takashi）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・講師

研究者番号：10546641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々は超高感度磁束計であるSQUIDセンサを用いて、iPS細胞由来心筋細胞の電気活動によって生じる微弱な自発磁場を計測することにより、細胞の状態を定量的に評価する手法の開発を行った。細胞由来の微弱な磁場シグナルを背景ノイズから検出する手法として、シミュレーションにより推定した細胞磁場と実測した背景磁場を合成した教師データによる深層学習が有効であることを示した。また周波数解析やScaledTemplate法といった従来の生体シグナル検出手法と比較したところ、深層学習がより優れた検出能力を持っていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞由来心筋細胞は再生医療や薬効試験における細胞材料として有望な候補だと考えられているが、その実用化にあたり高速かつ自動化可能な品質評価手法が求められている。当研究で我々の開発した、細胞由来の微弱な磁場信号を深層学習を用いて検出する手法が、非侵襲・非破壊的に細胞の電気的活動を評価することを可能とし、心筋シートなど再生医療材料の分化度・安全性の評価や、薬理試験における不整脈作用の検証といった用途に有望であると考えている。またこれまで細胞外電位や膜電位の測定では検出することが出来なかった電気生理学的情報が得られる新規手法としても期待される。

研究成果の概要（英文）：We have developed a method to quantitatively evaluate iPS cell-derived cardiomyocytes by measuring the weak spontaneous magnetic field generated by their electrical activity using a SQUID sensor. As a method for detecting weak magnetic field signals of cellular origin from background noise, we have shown that deep learning using supervised data generated by superimposing simulation-estimated cellular magnetic fields and measured background magnetic fields is an effective method. In comparison with conventional biological signal detection methods such as frequency analysis and the ScaledTemplate method, we were able to show that deep learning is superior.

研究分野：整形外科学

キーワード：生体磁気計測 計算機シミュレーション 深層学習 iPS細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞由来心筋細胞は再生医療や薬効試験において有望な細胞材料と考えられており、その実用化において定量的かつ高速な品質評価手法が必要とされている。再生医療の場合、最終産物の安全性検証(未分化細胞残存による腫瘍化のリスクなど)として分化度や成熟度に関する評価が必要である。また医薬品の安全性薬理評価には催不整脈性といった、細胞の電気活動に生じる異常や変化を検出することが求められる。現在一般的に用いられている電気生理学的特性の評価法には電極による細胞外電位の測定や膜電位感受性の蛍光色素等が存在している。しかし培養に特殊な器具が必要とされたり、細胞内への侵襲を伴ったりするなど、再生医療材料の評価手法としては問題点が存在している。

そこで我々は細胞からの自発磁場計測が無侵襲・非接触・非破壊的に行えることに着目した。細胞間を活動電位が伝播する際に電流が生じ、これに伴って磁場が誘発される。その磁場分布は細胞集団全体の電気生理学特性を反映したものであり、細胞活性を評価する物理的指標になると考えられる。本研究は我々のグループが開発した世界でもトップクラスの高感度を誇る超伝導量子干渉素子(SQUID)を用いて、iPS細胞由来分化心筋細胞の電気活動から誘発される磁場を測定することにより、細胞材料の分化度や成熟度を定量的に評価する画期的な手法を確立することを検討した。この手法が確立されれば、細胞試料の迅速かつ機械的なスクリーニングが可能となり、再生医療における移植材料の安全性評価プロセスの効率化に貢献出来ると考えた。

さらに分化心筋細胞に止まらず細胞全般に適用することが可能な無侵襲・非破壊的な細胞活性評価手法としての発展も考えられる。磁場信号は細胞集団間の電気伝播の異方性や細胞分布の状態を強く反映し、また生体の組成によって信号伝達が妨げられることもない利点がある。従ってこれまで細胞外電位測定や膜電位測定では検出することが困難であった生体情報を得ることが出来る革新的な手法となることも期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的はSQUIDセンサーにより微小な細胞由来の磁場シグナルを検出し、細胞品質の定量的な評価を行うことである。iPS細胞由来心筋細胞から自発的に生じる磁場は非常に微小であるため、目視や従来からの検出法では細胞由来の波形を検出することが困難であった。計測データから細胞の電気活動を評価するためには、システムノイズや外来の雑音磁場から微小細胞磁場のピーク頻度や位置を検出可能とする手法を確立する必要がある。

計算機シミュレーションによって細胞磁場の波形を推定し、そのデータを計測データと比較することでピーク領域(磁場変動の大きい領域)の検出を行うことを当初検討した。本研究期間中にシミュレーションデータを教師データとして用いた深層学習がピーク領域の検出に有効であることが見出された。さらに学習の各種設定や用いる教師データに検出精度が大きく左右されることも判明したため、精度改善のためパラメーターのチューニングや教師データの検証も並行して行った。

3. 研究の方法

パッチクランプ法で計測されたマウス iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位を再現する計算モデルを得るため、先行研究によるヒト iPS 細胞由来心筋細胞活動電位モデル(Paci モデル)とマウス胎児心筋細胞モデルをベースとし、遺伝アルゴリズムを用いてイオンチャネルのコンダクタンスを最適化した。活動電位を特徴づける5つのバイオマーカー(図1A: MDP, BF, Vmax, APD90, APD90/50)を指標に実験値と数値計算による波形の近似度をスコアとして計算し、実験値をより再現することが可能なモデルを最終的に採用した(図1B)。また分化ペースメーカー様細胞についても同様の手法により計算モデルを作成した。

次に得られた計算モデルを用いて、細胞集団中に生じる2次元興奮伝搬のシミュレーションを行い、細胞が作り出す磁場分布を計算した。心室タイプ心筋細胞とペースメーカー様細胞の細胞数比は先行研究の結果を参考に80%:20%とし、図1Cの分布を仮定し計算を行った。離散化単位は $dx=dy=60\mu m$, $dt=0.01ms$ とした。二次元の拡散方程式はCrank-

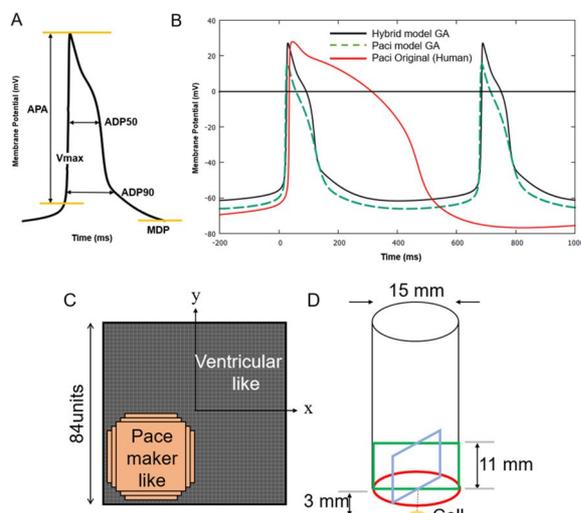


図1 (A) 活動電位モデル最適化に用いたバイオマーカー (B) 最適化前と最適化後の活動電位波形比較 (C)シミュレーションに用いた細胞分布 (D) 細胞とセンサーのセッティング

Nicolson 法を用いて計算し、磁場分布は細胞間の電流から Biot-Savart の法則に従って計算した。3 軸方向に配置された pickup コイルと細胞の位置関係は図 1D に示すように実際の実験時と同条件に設定し、SQUID センサーによる磁束密度計測値を推定した。

シミュレーションで推定した磁場波形にシステムノイズや外来の雑音磁場を含む現実のバックグラウンドデータを合成した。磁場信号の変動が大きいピーク領域と心電図でいえば拡張期に相当する変動が穏やかでほぼゼロに近いノンピーク領域の二種類に区分するラベリングを行い、深層学習の教師データとした (図 2)。振幅や波間距離のゆらぎ、および微小なノイズの付加を行ったデータを多数作成し、70%を学習

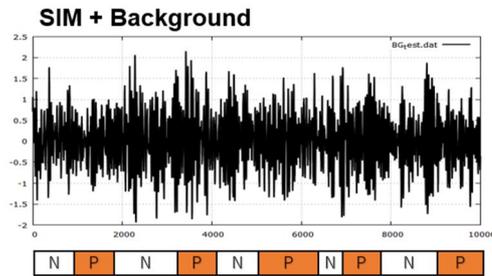


図 2 推定細胞磁場と背景磁場の合成による教師データおよびピーク領域(P)と非ピーク領域(N)のラベリング

用データ、10%を学習中の validation 用データ、20%を学習後の精度検証用テストデータに分割した。ネットワークのアーキテクチャとしては時系列データの分類に適した LSTM (Long short-term memory) を使用し、時系列データを FSST (Fourier synchro squeezed transform) によって時間 - 周波数領域のデータに変換してから学習に用いた。

細胞サンプル作成のため、マウス iPS 細胞を浮遊培養することにより胚様体を形成後、ディッシュに移して接着培養を行った。顕微鏡観察で自発拍動が見られ心筋細胞への分化が確認されたサンプルを磁場計測に用いた。SQUID センサーによる計測は磁気シールドボックス内で行い、またシミュレーションの妥当性およびピーク領域検出精度の検証用として、マイクロ電極プローブ(MEAs)で細胞外電位の計測も行った。

4. 研究成果

(1) マウス iPS 細胞由来心筋細胞・ペースメーカー様細胞 活動電位計算モデルの作成

マウス iPS 細胞由来心筋細胞の活動電位モデルは存在していなかったため、最初にマウス iPS 細胞由来心室タイプ心筋細胞のモデル作成を行った。まずヒト iPS 細胞由来心筋細胞モデル (Paci et al.) 単体をベースに遺伝アルゴリズムによる最適化を行ったが、実験値への近似度が低いモデルしか得られなかった。そこで iPS 由来心筋細胞が成体心筋細胞より未成熟な状態であることに着目し、自発拍動に関与する I_f (funny current) およびキネティクスがヒトとマウスで異なる I_{Kr} (delayed rectifier current) のイオンチャネル電流計算をマウス胎児心筋細胞モデル (Korhonen et al.) のものに置き換え、改めて遺伝アルゴリズムによる最適化を行った。この結果、実験値をより良く再現する計算モデルの作成に成功した。このモデルによる活動電位シミュレーションの結果(表 1)は、バイオマーカーの値が実験値とよく一致していた。また分化ペースメーカー様細胞についても、洞房結節の活動電位モデル (YNI モデル) をベースに遺伝アルゴリズムによるコンダクタンスの最適化を行い、実験値 (Ohno et al.) を再現する計算モデルを得ることが出来た。

表 1 最適化モデルと実験値 バイオマーカー比較

	実験値	最適化モデル	Original (ヒト)
MDP (mV)	-61.7 ± 0.9	-61.68	-76.75
BF (beats/min)	91 ± 11	91.1	36.4
Vmax (V/s)	19.0 ± 2.9	19.1	24.5
APD90 (ms)	154 ± 26	153.1	477.4
APD90/APD50	1.74 ± 0.06	1.74	1.25

(2) 細胞から生じる磁場分布の推定

(1) で得られた 2 種類の活動電位モデルを用いて、細胞集団の二次元興奮伝播シミュレーションを行い、磁場分布を計算した。図 3A は室温 (297K) 条件において、SQUID センサーで検出されると推定された Y 方向磁束密度の値を示す。図 3B はシミュレーションの妥当性検証として、細胞外電位の電極プローブによる測定値とシミュレーションによる推定値を比較したもので、計測値に近い波形や周期を示す数値計算の結果が得られていることを確認した。

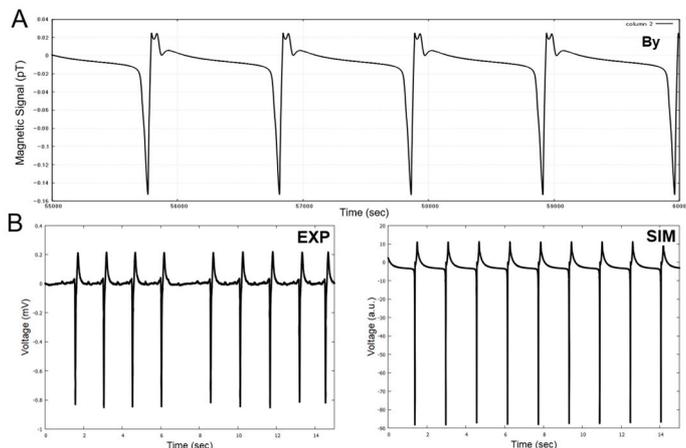


図 3 (A) マウス iPS 由来心筋細胞のシミュレーションから推定された自発磁場波形 (B) 細胞外電位 実験値とシミュレーションの比較

(3) 磁場信号検出に用いる深層ニューラルネットワークの学習

シミュレーションによって推定した磁場波形に対して、測定実験と同様のフィルタ処理を行った後、SQUID センサーによって測定されたシールドボックス内のバックグラウンド磁場と合成した。またピーク領域・非ピーク領域のラベリングデータを波形データとセットで準備し（図 4A）ニューラルネットワークの教師データとした。これらのデータを用いて深層学習を行った。学習が終わったネットワークの分類精度をテストデータによって検証した結果が図 4B の誤差行列である。

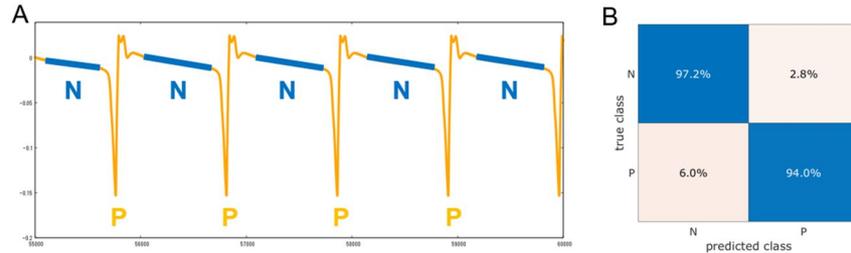


図 4 (A) シミュレーションデータへのラベリング例 (B) テストデータによるネットワークの分類精度検証

(4) 深層学習によるピーク波形検出手法の有効性検証テスト

実際の細胞サンプルから計測を行う前に、深層学習によるピーク波形検出の原理実証実験を行った。まずファンクションジェネレーターを用いて、(2)で推定した細胞磁場波形を電圧信号として出力し、抵抗を通し SQUID センサー近傍に直線状に張った導線に電流として印可することによって、模擬的な細胞磁場を発生させた。ピーク波形の発生周期を 1Hz に設定し、ピークの位置が確定しているグラウンドトゥルスデータとした。人工磁場をシールドボックス内で計測したデータを図 5A に示す。計測は細胞推定磁場と同等の強度に加えて、0.5 倍、5 倍、10 倍に強度を変えて各々測定を行った。細胞磁場と同等の強度の場合、背景雑音に埋もれたピーク波形を目視で検出することが困難なことはこの測定データからも確認された。

学習済みのネットワークによる検出結果を図 5B に示す。細胞磁場と同等強度のデータからは正解に対して 79% のピークが検出された。また 5 倍、10 倍の強度の信号を発生させた場合には全てのピーク (60 点/分) が正しく検出された。しかし電流を流さず、磁場を発生させなかったバックグラウンドデータからも僅かにピーク波形の誤検出が認められた。

従来の生体シグナル検出法に対する比較のため、同じ計測データからパターンマッチングの一種である ScaledTemplate 法によるピーク検出を行った。ScaledTemplate 法は検出目的の波形と対象の信号との二乗誤差を最小にするようなスケーリング係数と背景雑音の比を指標としてピーク検出を行う手法であり (Clements & Bekkers)、その結果を図 5C に示す。細胞磁場と同等強度のデータからはピーク波形を検出することが出来なかった (0.17 ± 0.20 点/分)、5 倍以上の計測データでは正しい検出数が得られており、目視と同程度の検出力を有していると考えられる。対して深層学習では目視で特定が困難である、細胞磁場と等倍強度のピークを 8 割近い精度で検出できており、その有効性・優位性が確かめられた。

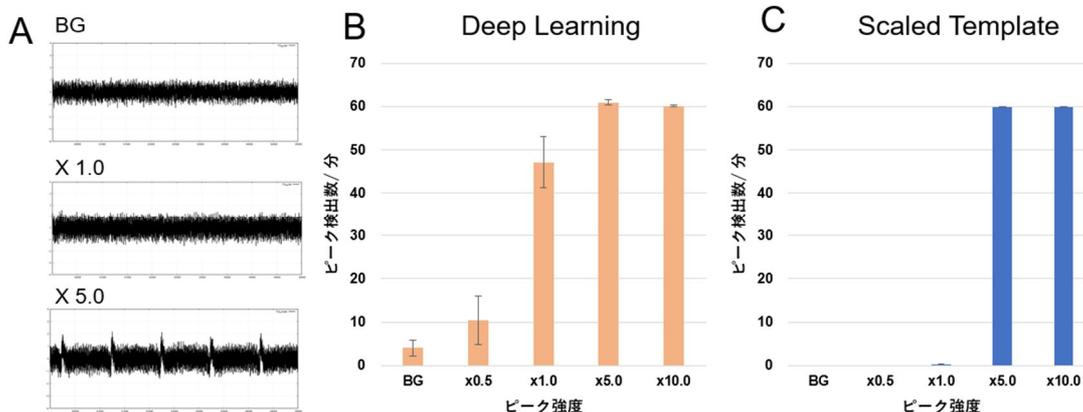


図 5 (A) 人工磁場の計測データ (B) 深層ネットワークによるピーク検出結果 (C) ScaledTemplate 法によるピーク検出結果

(5) マウス iPS 分化心筋細胞から測定した実データに対するピーク波形検出結果

原理検証実験に続き、SQUID センサーで実際にマウス iPS 細胞由来心筋細胞のサンプル (図 6A) を計測したデータから、学習済みのネットワークモデルを用いてピークの検出を行った。センサーの検出コイルに対して細胞サンプルの面積が小さいため、Z (鉛直) 方向の磁場については検出が困難であることが予想され、今回は Y 方向と X 方向の磁場データに絞って解析に用いた。

磁場の時系列データからネットワークを用いてピーク領域を特定した典型的な結果を図6Bに示す。ピークと判定された領域を色つきの帯で可視化した。また同時刻に計測した細胞外電位のデータと並べて比較したところ、両者のピーク位置の間に良い一致が認められた。

100mm ディッシュ及び MEA プロープ上で培養した分化心筋細胞サンプルと、対照群として培地のみサンプル、各々から得られた検出数の比較を図6Cに示す。いずれの場合も対照群と比較し、有意差が認められた。また磁場計測前に顕微鏡観察によりカウントした拍動数は100mm ディッシュサンプルで 20.6 ± 2.3 回/分、MEA プロープサンプルでは 24.6 ± 3.7 回/分であったが、これは深層学習による磁場信号のピーク検出数と一致している。逆に細胞が存在しない対照群からピークはほとんど検出されなかった。この結果により、検出されたピーク波形のタイミングや頻度は細胞集団の電気活動を反映していると考えられる。

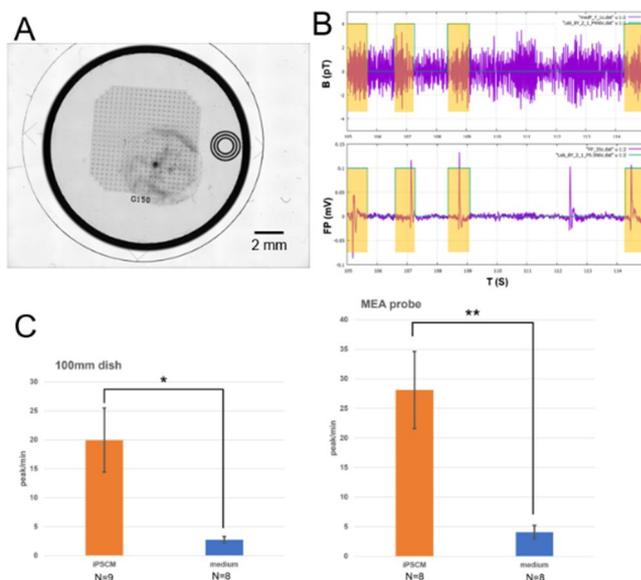


図6 (A) 自発拍動している分化心筋細胞 (B) 磁場信号の時系列データ上でピークと分類された領域を可視化したグラフ および同時刻に測定された細胞外電位信号のグラフ (C) 細胞サンプルとコントロール(培地のみ) 検出数比較

(6)総括、今後の展望

本研究において、シミュレーションによる推定波形を教師データとし、深層学習したニューラルネットワークを使用することにより、iPS細胞由来心筋細胞の微小な磁場ピーク信号を背景雑音から検出することが可能であることが示された。また既存のパターンマッチングやフィルタ処理によるノイズ除去などと比較してもこの手法の優位性を示すことが出来た。細胞集団の電気活動に対する物理的指標を磁場測定によって非侵襲的に得ることが可能な手法であり、再生医療における細胞品質評価や薬効試験のスクリーニングにおいて、有益なツールとなることが期待される。

ただし現時点では磁場ピークの位置の特定や周期といった時間情報を得ることにとどまっており、より定量的に細胞の電気生理学的特性を評価するためには、ピーク領域の波形情報も得られることが好ましい。深層学習によりピークと分類された領域から波形の情報抽出が可能となるよう、今後解析手法の改善を行っていく予定である。現在はピーク領域と一括りに扱っているが、心電図の様に複数の領域に細分化しラベリングを行っていくことが必要となるかもしれない。また今回実施することは出来なかったが、変時作用を持つ薬剤を細胞に投与した時に起きる活動周期の上昇/低下を正しく磁場データから検出することが可能かについても、検証実験を試みる予定である。さらに再生医療への臨床応用により直結することを鑑みて、ヒトのiPS分化心筋細胞を用いた実験を計画している。胚様体からより純化・選別した分化心筋細胞や心筋シートへと測定対象を変えていくことも視野にいれ、さらに研究を進めていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口武志, 足立善昭, 谷田任司, 岡佳伸, 吉田隆司, 高橋謙治, 田中雅樹
2. 発表標題 シミュレーション波形を用いたiPS細胞由来心筋細胞の自発磁場検出
3. 学会等名 第36回日本生体磁気学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口武志, 足立善昭, 谷田任司, 岡佳伸, 吉田隆司, 高橋謙治, 田中雅樹
2. 発表標題 深層学習を用いたiPS細胞由来心筋細胞の自発磁場検出
3. 学会等名 日本解剖学会 第97回 近畿支部 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口武志, 吉田隆司, 岡佳伸, 金郁喆, 高橋謙治
2. 発表標題 深層学習を用いたiPS細胞由来心筋細胞の自発磁場検出
3. 学会等名 第48回日本生体電気・物理刺激研究会
4. 発表年 2022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
研究分担者	足立 善昭 (Adachi Yoshiaki) (80308585)	金沢工業大学・先端電子技術応用研究所・教授 (33302)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山口 武志 (Yamaguchi Takeshi) (20593437)	金沢工業大学・先端電子技術応用研究所・研究員 (33302)	

	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 協 力 者	岡 佳伸 (Oka Yoshinobu)		

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