

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08549

研究課題名(和文) 深層学習による画像解析を用いた顕微鏡画像からの新規抗動脈硬化治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of anti-atherosclerotic drugs using deep learning-based image analysis

研究代表者

楠本 大 (KUSUMOTO, Dai)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70571727

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)：昨今、加齢関連疾患の病態において細胞老化が重要な位置付けを占めていることが報告されている。特に、血管内皮細胞の老化は様々な臓器の病態進行に重要であることから、新規の治療標的であると考えられる。本研究では、人工知能技術の一つである畳み込みニューラルネットワークを用いて、細胞形態を指標として血管内皮細胞の老化度合いを定量的評価する技術(Deep-SeSMo)を開発した。Deep-SeSMoは分子生物学的ラベルを用いることなく、簡単な顕微鏡撮影のみで細胞老化が評価可能であり、ラベルフリーで薬剤スクリーニングが実行可能である。同システムを用いることで血管老化を抑制する候補化合物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では畳み込みニューラルネットワークを用いて、細胞老化の程度を高い精度を持って定量的に評価可能であることが判明した。従来、画像解析を用いて疾患細胞を分類することは可能であったが、本研究では学習済みモデルを用いて確率分布に従って出力を行うことで、その病的中間状態に対して定量的な連続評価を可能にしたことは新規性が非常に高い。本技術は、病的細胞評価方法の基盤的技術となる可能性があり、さらなる発展が期待される。また血管老化による臓器障害は今後もさらに増加することが予想されることから、本技術を用いて血管老化抑制薬の探索が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, many reports showed that cellular senescence plays an important role in age-related diseases. In particular, senescence of endothelial cells involve in the pathology of organ dysfunction, and are focused as the novel therapeutic target. We developed an automated quantitative scoring system to evaluate the state of endothelial cells from cellular morphology using senescence probability output from pre-trained convolutional neural network, Deep Learning-Based Senescence Scoring System by Morphology (Deep-SeSMo). Deep-SeSMo can examine cellular senescence only using phase-contrast microscopy, without the use of molecular labels. We conducted label-free high-throughput drug screening by using Deep-SeSMo, and identified novel candidate drugs suppressing vascular senescence.

研究分野：循環器内科学

キーワード：血管老化 細胞老化 人工知能 畳み込みニューラルネットワーク 新規評価指標 細胞形態 Deep-SeSMo

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

(1) 加齢関連疾患に対して細胞老化抑制薬が革新的治療になり得る

動脈硬化を基盤とした心血管疾患や脳血管疾患による死亡数は癌による死亡数にも匹敵するが、未だにリスク管理が主体であり根治的治療法は存在しない。動脈硬化などの加齢関連疾患の進行では、環境ストレスにより DNA 損傷が起こると細胞周期が停止し細胞老化が誘導される。細胞老化は癌化を抑制する保護的機構でもあると従来考えられたが、近年では炎症を周囲に波及させ細胞老化関連分泌物質 (SASP) を呈することで病態を著しく進行させる悪者であることが分かってきた (文献 1)。2011 年 Baker らは、組織中の一部の老化細胞を除去することで組織全体が“若返る”ことを Nature に報告し、細胞老化制御の大切さを世間に知らしめた (文献 2)。現在 ABT263 などの抗癌剤が老化細胞の除去を通じた抗老化治療薬として注目を集めているが、慢性疾患である動脈硬化に対して抗癌剤は使用困難である。そこでより副作用が低い新規の抗細胞老化薬の開発が必要であると考え、本研究では細胞老化を抑制可能な、画期的な治療法開発につながるスクリーニングシステム構築したいと考えた。

(2) AI を用いた細胞形態を指標とする細胞老化抑制薬のスクリーニングシステムの必要性

通常、新規薬剤開発のためには細胞の病的状態を反映する分子生物学的マーカーをラベル用いて認識する必要がある。細胞老化の場合は、SA-b-GAL 染色、p16, p21 などが指標となる。しかしラベルの付与には大きな手間とコストがかかるため大規模なシステム構築が難しく、また細胞老化という現象を単一の分子マーカーでとらえることには異論がある。蛍光ラベルを遺伝子組み換えにより老化マーカーの下流に付加する方法も考えられるが、本研究のように血管内皮細胞などの初代培養細胞を標的とする場合は難しい。細胞老化は平坦で肥大した細胞体、ヘテロクロマチンの凝集など、形態学的に大きな特徴がある事が古くより知られており、形態的变化が細胞老化の本質であるとされている。

近年人工知能の技術革新により、高い精度での画像解析が可能となった。細胞生物学分野でも応用が進んでおり、画像解析の技術を用いることで、ラベルフリーで細胞の種類や状態に関して解析が可能であることが判明した (文献 3)。そこで、本研究では人工知能の画像解析の技術を利用することで、顕微鏡画像の細胞形態のみを指標とした「ラベルフリー」のスクリーニングシステムを構築し、細胞老化抑制のための新規治療法を大規模に探索するシステム開発を行い、血管老化を抑制する薬剤を探索したいと考えた。

2. 研究の目的

深層学習の技術を用いて、血管内皮細胞の細胞老化度合いを細胞形態から定量的に評価するシステムを構築する。同システムを用いて分子生物学的ラベルを用いることなく、ラベルフリーで血管老化を抑制する薬剤探索のスクリーニングを行い、効果の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞老化を誘導して大量の顕微鏡画像を取得し、老化細胞の形態を学習する。

ストレスの負荷により、培養血管内皮細胞に細胞老化を誘導する。細胞老化に特徴的な形態はストレスの種類によらず同じであり、複数ストレスで細胞老化を誘導する。実験毎の条件の違いを補正するため 5 回以上独立して細胞老化を誘導し写真を取得する。先行研究より精度の高い学習には数万枚程度の大量の画像が必要だが (文献 3)、細胞 1 つ 1 つ切り取るプログラムを独自に開発済みであり、自動的に大量の入力画像作成が可能である。細胞画像は、「正常」「老化」の 2 群に分けて学習させ、様々なハイパーパラメーターを調整することで高精度の認識プログラムを構築する。

(2) 細胞老化の程度をスコア化し定量評価を可能にする。

深層学習の学習済みモデルを活用して、入力細胞画像の老化度合いを定量的に評価する「老化スコア」を構築できないか検証する。最終層からの出力結果を応用し、細胞老化の程度をスコア化できないか検証する。

(3) 構築したネットワークの汎化性能を評価する。

構築したネットワークが、常にどのような条件でも正しく細胞老化を定量的に評価可能か検証 (汎化性能の検証) する。学習に用いていない新しいデータセット (テストデータ) を複数のストレス誘導法にて取得し検証を行う。さらに、血管内皮細胞以外の細胞や、他臓器で取得された画像に対しても同様に高精度での判定が可能であるか検証する。

(4) 老化スコアを利用し細胞老化抑制の候補薬をスクリーニングにより抽出する。

構築した老化スコアを利用して、キナーゼ阻害剤ライブラリーを対象に、ラベルフリーの薬剤ス

クリーニングを実行する。顕微鏡画像を取得するだけで高速な効果薬判定が可能であるため、大規模な解析が可能である。より頑強な結果を得るためにスクリーニングは繰り返し行い、複数の細胞老化誘導法を用いることでストレスによらず細胞老化抑制可能な薬剤を判定する。スクリーニングにより同定した新規薬剤の効果を、既存の分子生物学的手法を用いて、検証する。また網羅的トランスクリプトーム解析を追加することで細胞老化抑制の新規メカニズムを検証する。

4. 研究成果

*文中の図は参考文献4より改変

(1) 老化内皮細胞を分類するモデルの学習

培養血管内皮細胞に酸化ストレス、カンプトテシン、複製ストレス3種類のストレス誘導剤を用いて細胞老化を誘導した。健康細胞と老化細胞それぞれの顕微鏡撮影を行った。撮影画像から画像中の細胞を同定し、1細胞ごとの画像切り抜きを行った(図1)。切り取り画像を畳み込みニューラルネットワークに投入し、健康か、老化か分類するようにモデルの学習を実行した。各種パラメーター調整を行い、最終的にはROC曲線のAUC 0.98、F1スコア 0.9以上、精度0.95以上の高精度で老化細胞の判別が可能であった(図2)。

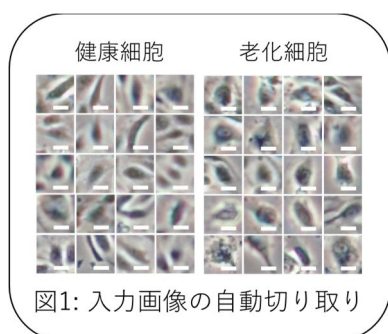


図1: 入力画像の自動切り取り

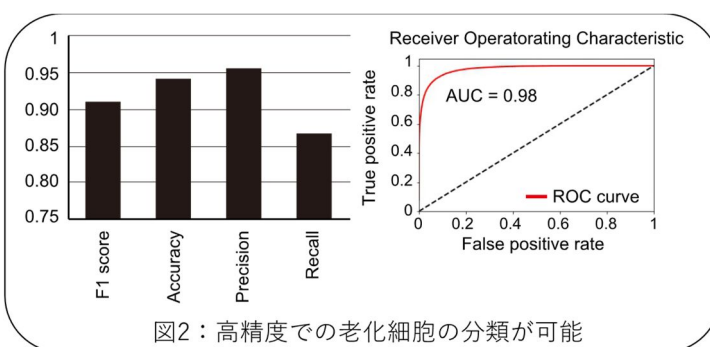


図2: 高精度での老化細胞の分類が可能

(2) 細胞老化を定量評価する老化スコアの作成

次に、学習済みのモデルを応用し、細胞老化を定量評価可能であるかどうか検証を行った。通常、分類のために学習を行ったモデルは、分類を行う課題のために使用される。しかし単に分類を行うのみでは老化細胞が分類されるだけで、薬剤スクリーニングを実行するためには定量的に細胞老化の評価を行う必要がある。本研究では、最終層の出力値である「老化確率」に着目することで、細胞老化の程度と非常に高い相関を持つ老化スコアの作成に成功した。老化スコアは、酸化ストレス濃度、抗癌剤であるカンプトテシン濃度、細胞の複製回数と非常に高い相関関係にあることから、細胞老化の定量評価に成功したと考えた(図3)。同システムを、Deep-SeSMo(Deep Learning-Based Senescence Scoring by Morphology)と名付けた (<https://github.com/Dai-Kusumoto/Deep-SeSMo>)

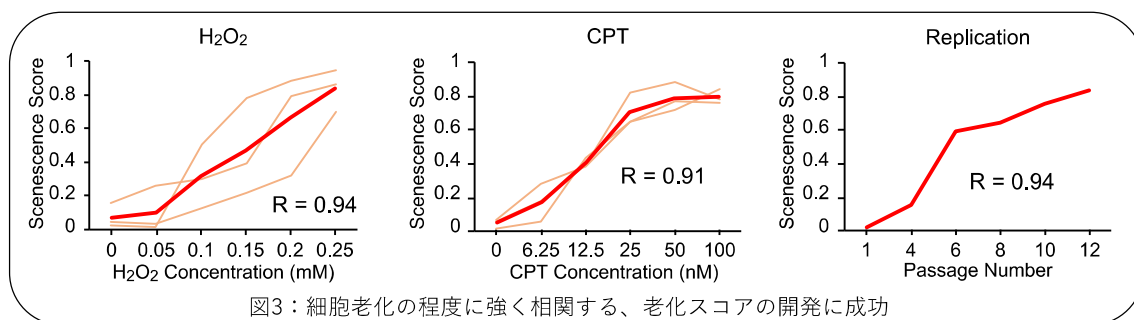


図3: 細胞老化の程度に強く相関する、老化スコアの開発に成功

(3) 細胞老化を定量評価する老化スコアの作成

Deep-SeSMo の性能評価のために、判定時間の計測を行った。本システムを用いると、老化状態を反映する分子マーカーを必要とせず、撮影した顕微鏡画像から細胞がどの程度老化しているかを0.1ミリ秒程度で判定可能であることが判明した(図4)。さらに本システムの汎化性能を調べるために、新規取得のデータセットに対しても性能の評価を行なったが、何度新規のデータを取得しても、また老化誘導の方法を変更しても高精度での評価が可能であることが判明した(図5)。さらに、他施設で取得したデータセットに対する検証も行い、他施設で取得したデータに対しても高精度での判定が可能であることから、高い汎化性能を有するシステムであると考えられた。また、血管内皮細胞以外にも同システムが応用可能であるか検証するため、線維芽細胞を用いた検証を行ったところ、同様に線維芽細胞でも定量的に細胞老化の評価が可能であ

った。実際に細胞老化抑制作用を有する化合物(メトホルミンなど)による抗老化の効果を正しく判定可能であるか検証を行ったところ、容量依存性に正しく効果を判定可能であり、薬剤スクリーニングが実行可能であると考えた。

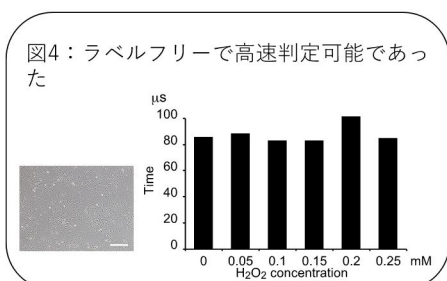


図4：ラベルフリーで高速判定可能であった

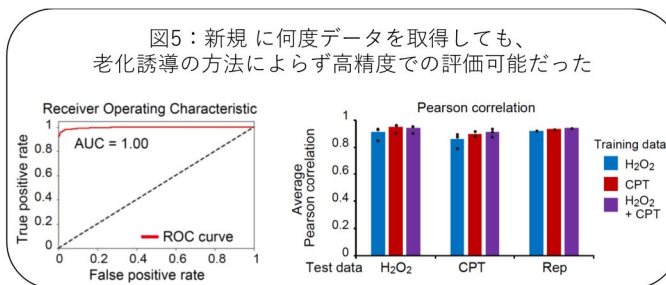


図5：新規に何度データを取得しても、老化誘導の方法によらず高精度での評価可能だった

(4) 薬剤スクリーニングの実行と候補化合物の検証

本システムを用いて実際に化合物ライブラリーを用いて薬剤スクリーニングを実行した。薬剤スクリーニングはより正しい結果を得るために、3つの老化誘導方法をそれぞれ2回繰り返し、さらに3種類の学習済みモデルでの検証を行い、合計18条件での検証を行った。老化抑制効果が高い薬剤の順にランキングを行ったところ、テレイン酸、Rock阻害剤、大豆イソフラボンの一種であるダイゼイン、MEK阻害剤などの薬剤を新規の老化抑制の薬剤候補として抽出することが出来た。これらの化合物が実際に抗老化作用を持っているか検証するため、培養血管内皮細胞に老化誘導を行った上でこれらの化合物を処理したところ、SA-ベータガラクトシダーゼ染色や、P21-P53、P16タンパクのウェスタンブロッティング、いずれにおいても老化が抑制されることが確認された。さらにRNAシーケンスによる網羅的解析を行い、その詳細なメカニズムの解析を行ったところ、老化細胞から惹起されるNFκBを介した炎症反応が抑制されることが判明した(図6)。

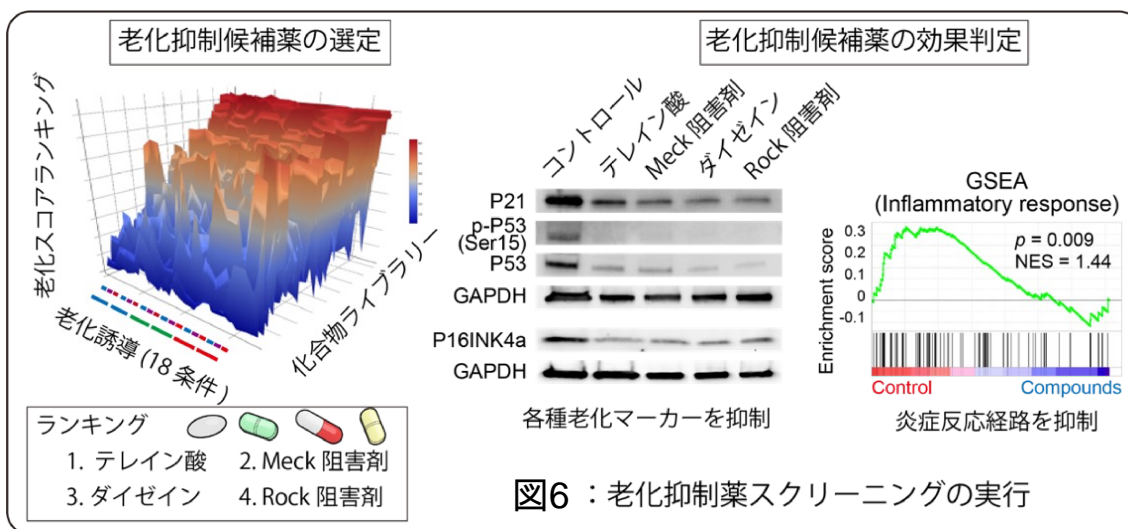


図6：老化抑制薬スクリーニングの実行

(5) 考察

以上の結果より、細胞老化を高い性能で定量評価することが可能であるAIに基づくシステム開発に成功したことが証明された。本システムを用いることで、今後血管老化抑制を目指した薬剤探索が加速することが予想される。また本研究は、ラベルフリーにて疾患の状態を細胞形態より定量評価を行う基盤的な技術を提供しており、今後薬剤スクリーニングを行う標準的な手法となる可能性があるランドマーク的な研究であると考えられる。今後のさらなる研究開発が期待される。

<参考文献>

- (1) Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine* **21**, 1424-1435 (2015).
- (2) Baker DJ, *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232-236 (2011).
- (3) Kusumoto D, *et al.* Automated Deep Learning-Based System to Identify Endothelial

Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 10, 1687-1695 (2018).

(4) Kusumoto D, et al. Anti-senescent drug screening by deep learning-based morphology senescence scoring. *Nat Commun* 12, 251 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kusumoto Dai, Seki Tomohisa, Sawada Hiromune, Kunitomi Akira, Katsuki Toshiomi, Kimura Mai, Ito Shogo, Komuro Jin, Hashimoto Hisayuki, Fukuda Keiichi, Yuasa Shinsuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Anti-senescent drug screening by deep learning-based morphology senescence scoring	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-020-20213-0	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 -

1. 著者名 Kusumoto D, Yuasa S	4. 巻 39
2. 論文標題 The application of convolutional neural network to stem cell biology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	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） 10.1186/s41232-019-0103-3. eCollection 2019.	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Dai Kusumoto, Tomohisa Seki, Hiromune Sawada, Toshiomi Katsuki, Mai Kimura, Shogo Itoh, Jin Komuro, Hisayuki Hashimoto, Keiichi Fukuda, and Shinsuke Yuasa
2. 発表標題 Anti-senescent drug screening by deep learning-based morphology senescence scoring
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Dai Kusumoto
2. 発表標題 Deep learning-based drug screening system to develop novel cardiovascular treatment
3. 学会等名 第4回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 楠本 大、澤田 拓宗、関 倫久、勝木 俊臣 木村 舞、小室 仁、橋本 寿之、湯浅 慎介、福田 恵一
2. 発表標題 深層学習を用いた画像解析による抗血管老化薬スクリーニングと新規抗老化薬の同定
3. 学会等名 日本血管生物医学会学術集会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠本 大、湯浅 慎介、福田 恵一
2. 発表標題 深層学習を用いた画像認識システムの疾患創薬への応用.
3. 学会等名 日本循環制御医学会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠本 大
2. 発表標題 Artificial Intelligence for Vascular biology
3. 学会等名 血管生物若手研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 プログラム、スクリーニング方法、至適濃度の特定方法、薬剤製造方法、モデル生成方法、情報処理方法、及び情報処理装置	発明者 楠本大	権利者 株式会社 Heartseed社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/ 581	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

AI画像認識により細胞の老化度をスコア化、血管老化を抑制する薬剤候補同定に成功
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2021/1/12/28-77467/>

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