

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：12601  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K15753  
研究課題名（和文）Development of cell image data analysis method for highly accurate 3D vesicle movement detection based on computer vision techniques  
研究課題名（英文）Development of cell image data analysis method for highly accurate 3D vesicle movement detection based on computer vision techniques  
研究代表者  
Lee Seohyun (Lee, Seohyun)  
東京大学・定量生命科学研究所・特任助教  
研究者番号：00847973  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、生きている細胞内小胞の3次元軌跡をナノスケールでデータを取得し、高精度でその運動を解明することを目標とした。従来の研究では、高度化されたイメージング技術により細胞と細胞内部の器官の位置は正確に撮影できるが、そのイメージデータから実際位置を計算する段階で誤差が発生する問題があった。本研究で提案したイメージ処理アルゴリズムにより、特に3次元の座標を計算するための二重焦点光学系から得た二つのイメージに線形座標変換を適用することでイメージマッピングの正確度をナノスケールで達成することができた。また、このようなイメージ処理及び最終的な3次元座標計算を一度にできるソフトウェアも開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
がん細胞をはじめとする病気の原因となる細胞を外部の薬剤を利用して制御するためには、細胞内で行われる情報伝達パターンに関する知識が最も重要である。本研究では、細胞内での情報伝達を担当する小胞の運動を解析するため、小胞の3次元軌跡を高精度で得られるアルゴリズムを提案した。そのアルゴリズムによって実験者のマニュアルな操作による測定及び計算の誤差を最小限に抑え、簡単な操作でナノスケール精度の3次元座標データが得られる。したがって、本研究は薬剤開発や関連研究の基礎となる意義を持ち、細胞内での情報の伝達に関するあらゆる研究に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to acquire three-dimensional trajectory data of intracellular vesicles in living cells at the nanoscale and to elucidate their motion with high precision. In conventional studies, the positions of cells and intracellular organelles could be accurately captured using advanced imaging techniques, but there was an issue of errors occurring during the stage of calculating actual positions from the image data. With the image processing algorithm proposed in this study, the accuracy of image mapping was achieved at the nanoscale by applying linear coordinate transformation to two images obtained from the dual-focus optical system used for calculating three-dimensional coordinates, particularly. Furthermore, we developed software capable of performing such image processing and calculating the final three-dimensional coordinates at once.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞内物質輸送 小胞 イメージ処理

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤や特定の細胞を対象とした薬物開発には、細胞間のコミュニケーションや細胞内のシグナル伝達に関する深い知識が必要である。このような細胞内外での情報伝達システムは、細胞内の小胞による物質輸送が主要な役割を果たしている。従って、細胞内物質輸送に関連する小胞の運動様式を把握することは、生物物理学の分野で広く研究されている状態である。しかし、生きた細胞内の小胞の動きをイメージングして実際の運動特性を把握するには、イメージング段階での光学系の安定性の確保やカメラで撮影後に得られたイメージから小胞の軌跡データを解析する際の信頼性問題が存在し、大きなチャレンジが必要となる。特に、実際の小胞の3次元軌跡をそのイメージから取り出す第一の段階と比べ、定量的なデータ化を行う第二のステップでは、デジタルイメージ処理技術が解析の基盤となるが、現在の生物物理学の分野では、まだそのような技術が体系的に導入されていない状況であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞内小胞のイメージングから得られる多焦点蛍光イメージデータをコンピュータビジョン技術で解析し、小胞の3次元座標データを高精度で取得する細胞内動力学関連の融合研究の枠組みを確立することを目指した。特に、複数の焦点面から得られた細胞イメージの幾何学的関係を把握し、小胞の位置を特定できる汎用ソフトウェアの開発を本研究の最終目標とした。

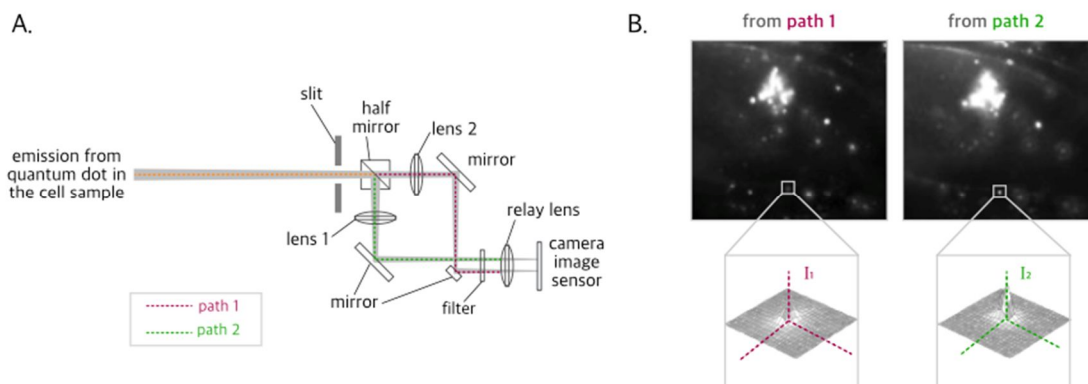


図1。 本研究の背景となる多焦点による3次元イメージング：(A) レンズの位置を調節して焦点が異なる二つのイメージが得られる光学系。(B)異なる焦点を持つ二つのイメージからターゲットの小胞の位置を特定できるが、マニュアル的な方法では精度が低い問題があった。(Figure is from Lee, et al., SPIE, 2023)

### 3. 研究の方法

本研究では、生きている細胞内に量子ドットなどを入れることで小胞の生成を誘導し、その小胞が輸送される様子を、多焦点イメージングを用いてイメージデータとして確保した。焦点の異なる二つのイメージを、線型座標変換アルゴリズムに基づいてイメージマッピングを行った。また、撮影画像の読み込みから3次元座標の計算まで自動的に行うソフトウェアを Matlab を用いて作成した。

- (1) 細胞内小胞の3次元イメージング：本研究では、実験対象として KPL-4 細胞という人乳がん細胞の種類である運動性の高い細胞を用意し、小胞を蛍光ラベリング物質としてナノスケール蛍光物質の量子ドットを用意した。光学系は基本的に Dual focus optics (Watanabe et al., BBRC, 2007)に基づいて作成し、二つのリレーレンズの位置を調節することで焦点の異なる二つのイメージを取得することができた。
- (2) 得られた二つのイメージ(イメージペア)は焦点距離だけ異なる関係であることに着目し、イメージ間幾何関係を線型座標変換で切り替えることが可能な関係として把握した。線型座標変換アルゴリズムによって片方のイメージから設定された複数の特定点がペアのイメージからも検出できるマッピングを行った。

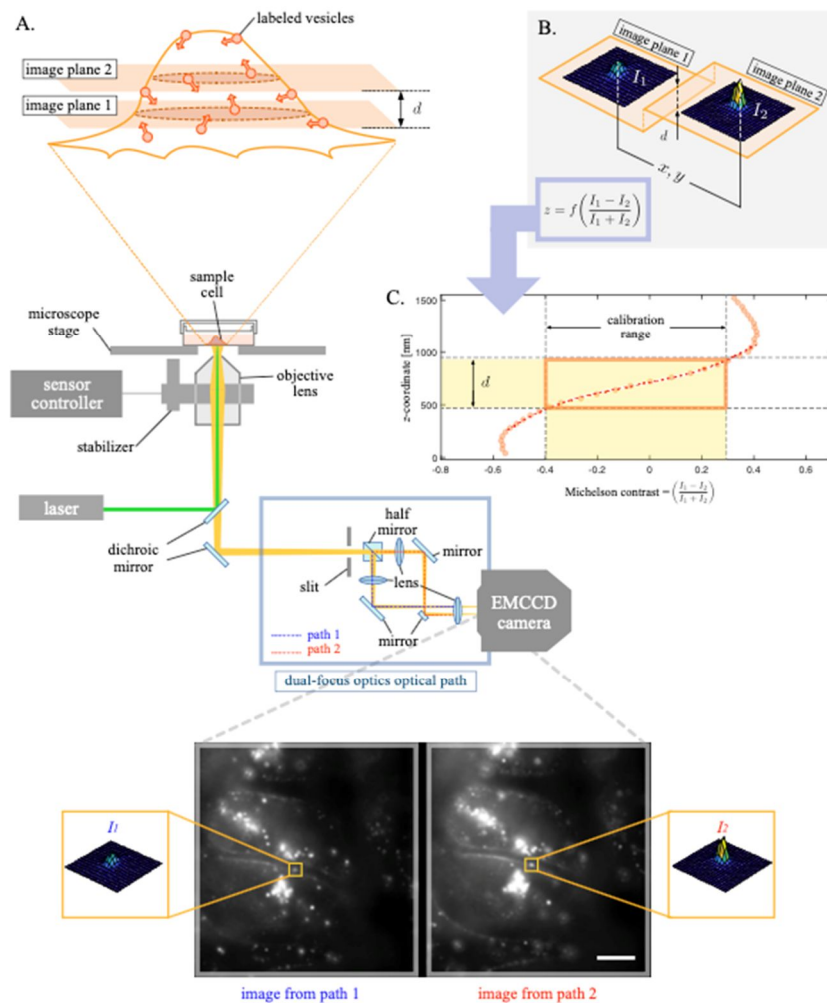


図2。本研究で利用された多焦点の光学系システムによるターゲット小胞の3次元データ取得プロセス：(A) 多焦点顕微鏡の光学系と細胞内の焦点面の位置関係及び細胞内(量子ドットでラベリングされた)小胞の一例。(B) 二つの焦点面で得られる小胞の光強度比較式 (C) 光強度比較式と小胞のz軸上の位置の相関関係を表すキャリブレーショングラフ。(Figure is from Lee, et al., SPIE, 2023)

(3) イメージのマッピングに使われたアルゴリズムは線型座標変換であり、具体的な方法は以下となる。まず、イメージペアの中で片方のイメージにあるターゲット小胞の位置を  $p = (p_x, p_y)$  として表した場合、線型変換マトリックス  $A$  によって座標変換された位置  $p'$  はオフセット  $c = (c_x, c_y)$  を含め  $p' = pA + c$  として表現できる。このように変換された座標  $p'$  は  $(p'_x, p'_y) = (p_x, p_y)A + (c_x, c_y)$  として、焦点面の異なるペアのイメージの中で同一のターゲットに対応する。実際のマッピングでは、このような対応関係の  $p$  と  $p'$  のセットを複数選択して座標変換マトリックスを計算し、同一の光学系で撮影されたイメージペアに関してはマトリックスを再計算しないようにすることで、計算量を減らすようにした。

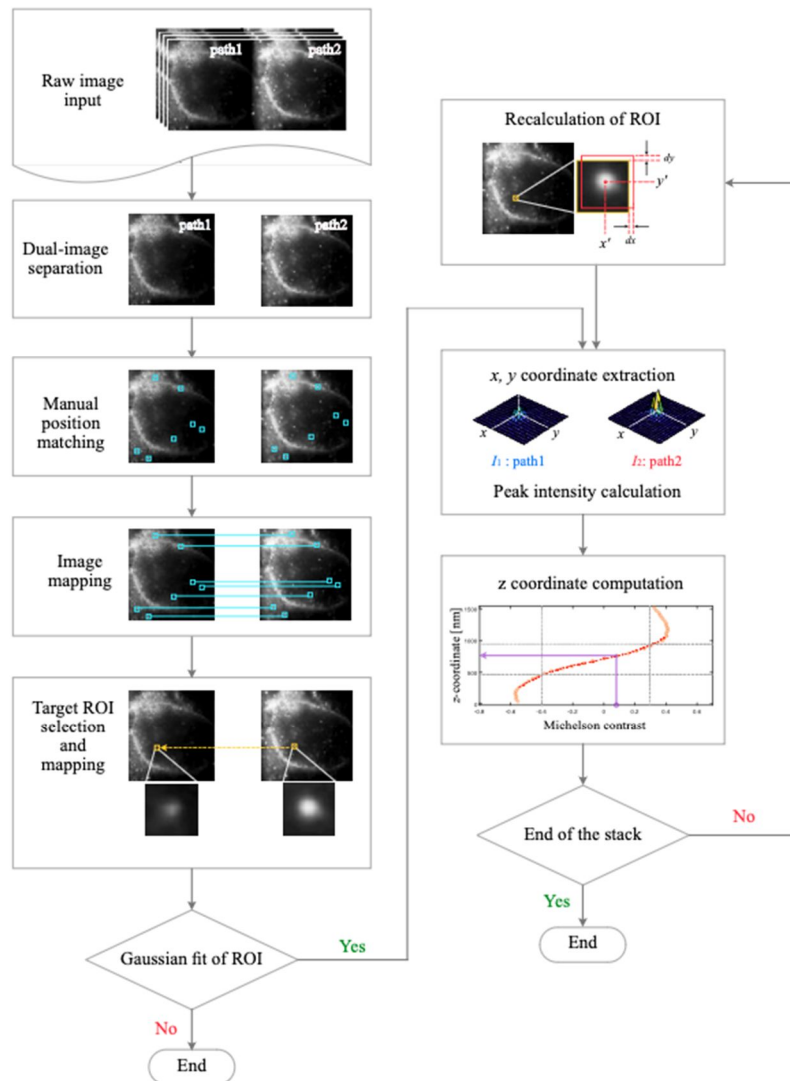


図3。本研究で提案された線型座標変換アルゴリズムが小胞の3次元位置計算に適用される流れを示すフローチャート。焦点面の異なるイメージペアは線型座標変換によりマッピングされ、片方のイメージからターゲットを選択すると自動的にペアイメージからも同一なターゲットが検出され、最終的な3次元座標データが計算される。(Figure is from Lee, et al., SPIE, 2023)

#### 4. 研究成果

前述した一連の流れを Matlab というプログラミング言語を用いて、stand-alone のソフトウェアとして作成し、ユーザーが必要に応じて簡単に利用できる環境を構築した。さらに、便利な機能を追加したソフトウェアとしてデータ取得過程の容易性を目指した。例えば、複数のターゲット小胞の位置を同時に追跡する場合を考え、ROI (Region of interest)の色をそれぞれ異なるようにすることで、二つのイメージでペアになるターゲットを区分できるようにした。なお、ターゲット小胞を追跡する際に計算量が増加することを最小限に抑えるため、イメージを表示しなくても追跡できる選択肢も提供するように作成した。

作成したソフトウェアを利用して3次元座標を取得する場合と従来のマニュアル的な特定・検出方法を比較すると、ソフトウェアを利用する場合はイメージマッピング後ターゲットを追跡する段階でそれぞれ異なる  $x, y$  座標の傾向を示すペアは排除されるため、マニュアル方法に比べ圧倒的な性能を見せた。ソフトウェアのパイプラインは図3のようになる。

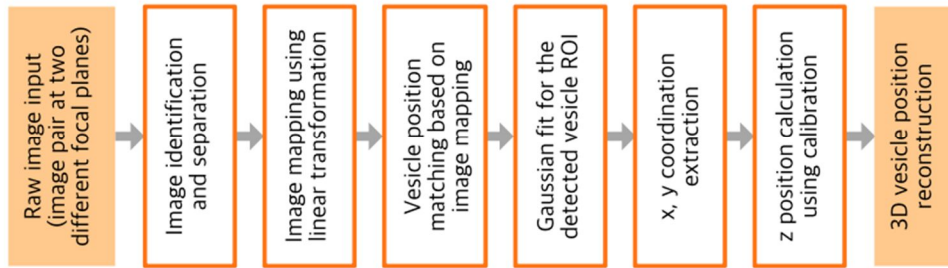


図4。本研究の最終的な結果となる3次元小胞運動軌跡自動計算ソフトウェアのデータ処理パイプライン。ユーザーは撮影装置で得られた二つのイメージペアを読み込むことで他のマニュアル操作なしでもターゲットの3次元軌跡を取得することができる。(Figure is from Lee, et al., SPIE, 2023)

本研究では、細胞内の情報伝達物質である小胞の運動を高精度で解明するために最も基礎データのなる3次元座標検出をナノスケールで実現する方法を提案した。従来の多焦点イメージングによる座標計算では、イメージペアからマニュアル的にターゲットの小胞の位置を決めるため、撮影されたイメージ自体の解像度は高いものの、解析段階で誤差が発生する可能性が高かった。本研究で提案した方法は多焦点光学系から得られたイメージペアを幾何関係を用い、線型座標変換のアルゴリズムを適用することで高精度3次元座標検出を実現することである。さらに、イメージペアから3次元座標抽出まで自動化するソフトウェアも開発することに成功し、細胞内での情報伝達を研究する様々な学問分野に貢献することを期待している。

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<br>Lee Seohyun, Kim Hyuno, Higuchi Hideo                                      | 4. 巻<br>10         |
| 2. 論文標題<br>Extended Dual-Focus Microscopy for Ratiometric-Based 3D Movement Tracking | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>Applied Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>1,12 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/app10186243                                       | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Lee Seohyun, Kim Hyuno, Higuchi Hideo, Ishikawa Masatoshi  | 4. 巻<br>21         |
| 2. 論文標題<br>Visualization Method for the Cell-Level Vesicle Transport Using Optical Flow and a Diverging Colormap | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>Sensors  | 6. 最初と最後の頁<br>1,13 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/s21020522   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi, Masatoshi Ishikawa                                  |
| 2. 発表標題<br>A machine learning approach to transport categorization for vesicle tracking data analysis |
| 3. 学会等名<br>SPIE Photonics West BiOS 2021（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi, Masatoshi Ishikawa  |
| 2. 発表標題<br>Classification of Metastatic Breast Cancer Cell using Deep Learning Approach                         |
| 3. 学会等名<br>2021 IEEE International Conference on Artificial Intelligence in Information and Communication（国際学会） |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi, Masatoshi Ishikawa, Ryuichiro Natato                           |
| 2. 発表標題<br>A Generative Adversarial Network Approach to Metastatic Cancer Cell Images                            |
| 3. 学会等名<br>2022 IEEE International Conference on Artificial Intelligence in Information and Communication (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi, Masatoshi Ishikawa                                     |
| 2. 発表標題<br>Deep learning approach for metastatic cancer cell classification using live-cell imaging data |
| 3. 学会等名<br>SPIE Photonics West BiOS 2022 (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Seohyun Lee, Hyuno Kim, Masatoshi Ishikawa, Hideo Higuchi                                 |
| 2. 発表標題<br>Understanding of vesicle transport using machine learning and image processing technology |
| 3. 学会等名<br>The annual meeting of the Biophysical Society of Japan                                    |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi, Masatoshi Ishikawa  |
| 2. 発表標題<br>Optical flow of vesicles: Computer vision approach for endocytosis of nanoparticles in a living cell |
| 3. 学会等名<br>SPIE Photonics West BiOS 2020 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi, Masatoshi Ishikawa                                    |
| 2. 発表標題<br>Visualization and Data Analysis for Intracellular Transport using Computer Vision Techniques |
| 3. 学会等名<br>2020 IEEE Sensors Applications Symposium (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Seohyun Lee, Hyuno Kim, Hideo Higuchi, Masatoshi Ishikawa                         |
| 2. 発表標題<br>Estimation of Vesicle Transport near the Cellular Membrane using Image Processing |
| 3. 学会等名<br>2020 OSA Imaging and Applied Optics Congress (国際学会)                               |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|