

研究終了報告書

「機械学習による細胞力学環境の計測プラットフォーム構築」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：松永 大樹

1. 研究のねらい

細胞は細胞骨格と呼ばれる構造によりその形状を支え、それと同時に硬さなど周囲の力学環境のセンシングし自身の振る舞いを決定している。例えば培養されている基盤の硬さによって幹細胞の分化が変化する現象 [Engler *et al.*, 2006, Cell] や、異常張力を感知した場合に細胞がアポトーシスを起こす現象 [Chen *et al.*, 1997, Science] などが知られている。細胞が如何に収縮力を発揮し周囲環境をセンシングしているかを理解することは重要な課題であり、力学から細胞の振る舞いを説明するこの研究分野をメカノバイオロジーと呼ぶ。

細胞収縮力を計測する手法として最もよく用いられる手法として牽引力顕微法 (traction force microscopy; TFM) がある。この手法は細胞を培養するシリコン基板に蛍光粒子を埋め込み、蛍光粒子の移動量から基板の変形量を算出する。得られた変形量を用いて材料変形の逆問題を解くことにより最終的には細胞収縮力を定量化することができる。しかしこの手法は蛍光粒子の移動量を算出するために実験の最後に細胞を基板から剥がし蛍光粒子の基準の位置を取得する必要があること、またこの工程から収縮力を効率良く・高スループットに計測できないという欠点がある。

そこで研究代表者が所属する研究室(大阪大学基礎工学研究科・出口研究室)では、シワ基板による細胞収縮力計測法を開発した [Fukuda *et al.*, 2017, Dev. Growth Differ.]. テーブルクロスにシワが寄るように細胞の収縮力により基板表面にシワが発生し(図2参照)、シワの大きさと収縮力の相関から力の定性的な強さを判別できる。顕微鏡画像のシワから細胞収縮力の定性的な大きさが瞬時にわかるため有用な手法であるが、牽引力顕微法のように定量的な力の測定はできないのが欠点であった。また画像処理のみではシワを自動抽出できないことから大規模・体系的な分析が非常に困難であった。そこで本研究課題では機械学習を用いた細胞収縮力の自動定量化システムの構築を目指す。

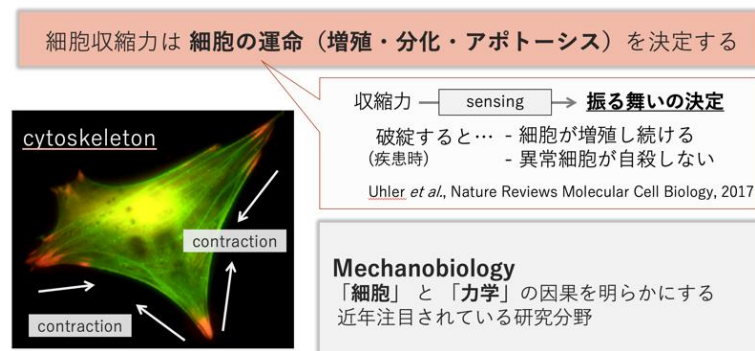


図 1. 細胞収縮力とメカノバイオロジー

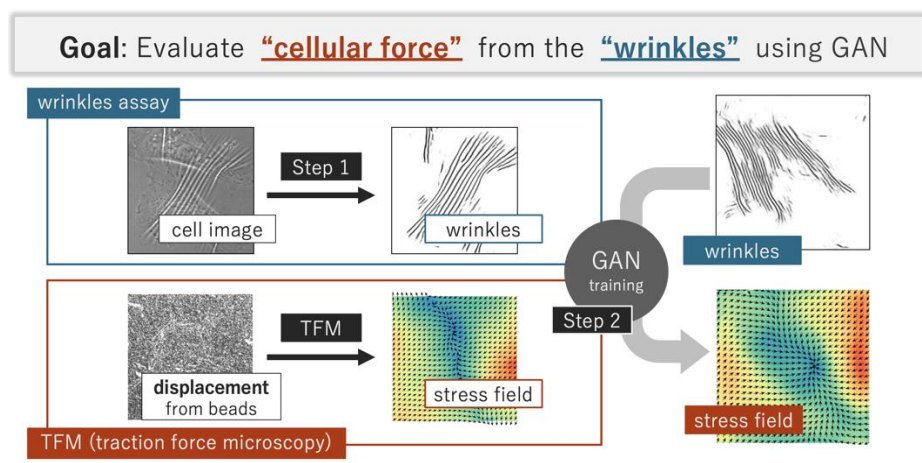


図 2. 本研究課題の概要

2. 研究成果

(1) 概要

図 2 を用い本研究の流れを説明する。本研究では「顕微鏡画像」から「細胞収縮力」を定量化する機械学習システムの構築を行った。システムは 2 ステップを経て実施され、第 1 ステップ(図 2 青枠部)では「顕微鏡画像」から力の評価指標となる「シワ」の自動抽出を行う機械学習システムの構築を行う[研究成果リスト 1]。顕微鏡画像の中からシワに該当する部分を特異的に抽出する作業はセグメンテーションのタスクに該当するが、本研究課題では U-Net 状のネットワークを用い学習を行った。詳細は以下の研究テーマ A にて報告する。

第 2 ステップ(図 2 右)は「シワ」と「細胞収縮力」の力学的な相関関係を機械学習システムに学習させた。シワを入力、細胞収縮力を出力とする力学的相関関係が明らかとなりその変換が可能になれば、最終的には顕微鏡画像を入力するだけで即時に細胞収縮力を定量化するシステムとなるため、収縮力の高スループット計測基盤と成り得る。ただシワでは細胞収縮力を定量評価することができないため、収縮力の定量評価には前述の牽引力顕微法(TFM; 図 2 赤枠部)を用いた。TFM にて得られた細胞収縮力とシワの関係を敵対的生成ネットワーク(GAN; Generative Adversarial Network)にて学習し、生成器によりシワから細胞収縮力を定量化することに成功した[研究成果リスト 3]。以上の詳細は以下の研究テーマ B にて報告する。

これら 2 ステップが ACT-X 開始当初の目標であったが、延長する研究として細胞内流動現象・分子の拡散動態を解析する基盤の開発を行った(研究テーマ C)。また本研究課題のスピノフとして、細胞・液滴の物性を評価する研究を実施した[研究成果リスト 2]。

(2) 詳細

■ 研究テーマ A「シワの自動抽出による細胞収縮力の定量化」

所属研究室(大阪大学基礎工・出口研究室)はシワにより細胞の収縮力を可視化する独自技術 [Fukuda *et al.* 2017; Ichikawa *et al.* 2017, J. Cell Sci.] を開発してきた。これまで画像処理・手作業によるなぞりによりシワを抽出を実施してきたが、人手の労力・正確さの確保が困難であった。そこで第 1 ステップのテーマ A では CNN にシワの特徴を学習させ、細胞の顕微鏡画像よりシワを自動抽出するシステムを開発した。

図 3 を用いこれまでに開発した CNN によるシワの自動抽出法について概要を述べる。CNN にシワの特徴を学習させるには、訓練データとして「細胞の顕微鏡画像」と「シワの画像」が必要となる(図 3 上図)。従って画像処理技術(2D-FFT とバンドパスフィルタ)を用い粗いシワの画像を生成し教師データとし、これら「顕微鏡画像」と「シワの画像」を用いて CNN にシワの特徴を学習させた。最終的に完成した CNN を用い、図 3 下図のように CNN のみによってシワの自動抽出が実現できた。機械学習で得られたシワは、画像処理のみで抽出したシワより遥かに明瞭であり約 91 倍の正解率(正解データは手作業で抽出したもの)を記録した。以上の研究成果は国際学術誌にて発表した [研究成果リスト 1]。

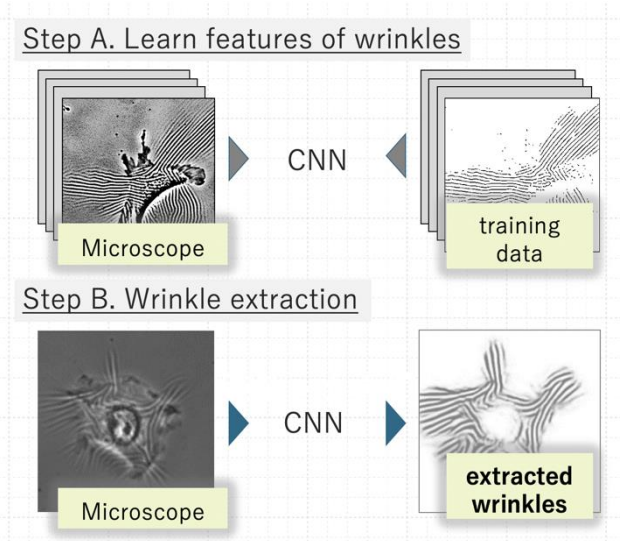


図 3. シワ画像の自動抽出システム

■ 研究テーマ B「GAN による細胞収縮力の計測」

研究テーマ A「シワの自動抽出による細胞収縮力の定量化」で開発した基盤をベースとし、テーマ B では顕微鏡画像から細胞収縮力を推定するシステムの構築を行った。本研究で用いているシワ基板による細胞収縮力の推定法では、シワの長さにより細胞の相対的な力の大きさを推定することができたが、細胞収縮力の定量評価が困難であった。一方、収縮力計測の最も有力の手法とされる牽引力顕微法は力の定量評価ができるものの、変位のマーカーとなる蛍光粒子を基板上に埋め込むなど手順が煩雑でスループットが低い。そこで本研究課題では入力画像を「抽出されたシワ画像」、出力画像を「細胞収縮力の分布」とする画像から画像へと変換する機械学習システムの構築を行った。なおトレーニングデータを取得するためシワを発生する特殊基板の中にビーズを埋め込むことにより、シワの可視化と牽引力顕微法による収縮力の測定が同時に行うことができる実験を実施している。機械学習には GAN (generative adversarial network) を用い、トレーニングデータとして 332 枚のデータセットを準備した。トレーニング後のテストデータによる細胞収縮力の推定例を以下の図 4 に示す。図よりどの細胞においても力の向き・強さともに ground truth の応力分布をよく再現していることが見て取れる。学習のパフォーマンスを測定するためテストデータと予測データの誤差を定量化したところ力の大きさとしては 33-35%、力の

向きは $19\text{--}20^\circ$ と小さい誤差で力の予測ができることがわかった。

以上、完成したシステムはシワの抽出のみで、つまりビーズの埋め込みを必要とせず、高速に大量の細胞についての収縮力を評価できるため重要な技術開発である。研究テーマ A の技術と組み合わせることにより「細胞の顕微鏡画像」から「収縮力」を推定できるシステムとなるため、生命科学の研究を強力にサポートする技術として期待される。以上の成果は国際学術誌“Communications Biology”に採択 [研究成果リスト 3] され ACT-X 研究期間内に課題の中心となる成果を報告することができた。

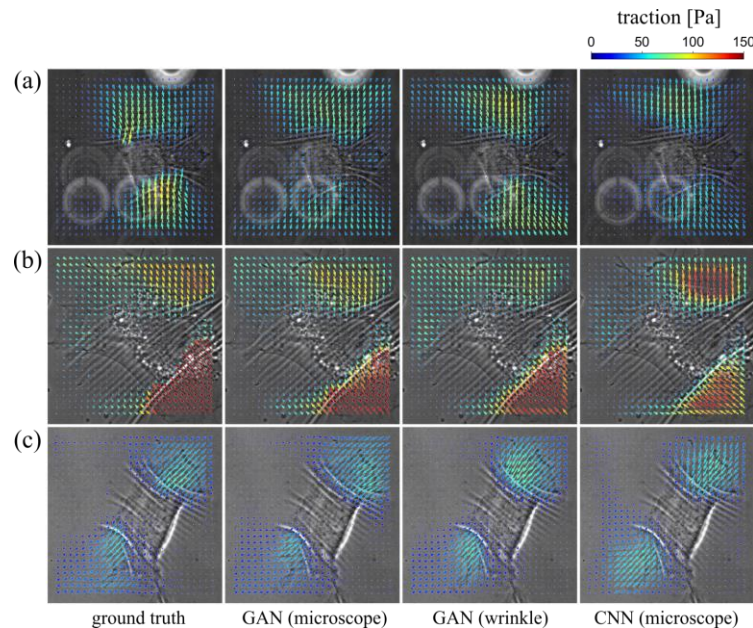


図 4. 機械学習システムによる細胞収縮力の推定

■ 研究テーマ C 「機械学習・数値計算融合による細胞内拡散動態解析」

これまで実施してきた細胞収縮力に関する解析とは別に、細胞内の分子拡散動態を評価するための技術開発を実施した。細胞内に含まれる分子の蛍光の揺らぎの時系列データを用いて分子の拡散係数を計測する蛍光相関分光法 (FCS; fluorescence correlation spectroscopy) と呼ばれる手法があるが、分子は純拡散だけでなく多様な動き (超拡散・亜拡散) をすることが知られており、十分にその動きが捕捉できているとは言えない。そこで本研究テーマでは、数値計算と機械学習を組み合わせることにより細胞内分子の拡散動態をより詳細に把握することを目指した。

数値計算は分子の動きを計算上で再現するために実施する。ランジュバン方程式を解き分子の動きを再現した上で、結果として生まれる蛍光の揺らぎの情報をデータベースとして保存する。数値計算により既知の動き (純拡散・超拡散・亜拡散) のラベルと、揺らぎの時系列データを得ることができるためこれをトレーニングデータとして用いる。本研究ではこれまで純拡散と超拡散の時系列データを擬似的に生成し、その動きの違いを LSTM (long short-term memory) により分類することがわかった。今後はこの研究を更に推し進めて、異常拡散指数などの物理量を計測することを目指す。またこれまで実施してきた細胞収縮力分布の計測データと組み合わせ、力と分子の拡散動態の相関を明らかにすることを目指す。

3. 今後の展開

本 ACT-X 研究では、細胞が発生するシワの顕微鏡から細胞収縮力を推定するシステムを構築できた。以上のシステムは顕微鏡画像から細胞収縮力を効率的に推定することを可能にするため、生命科学の研究を力強くサポートすることが期待されている。例えば、本システムは既に薬剤の投与に対する収縮力の変化の定量評価 [Nehwa, ... Matsunaga *et al.*, BBRC, 2019] に応用されているように、大規模なデータの取得が必要となるケースに対し効率的に力学データを評価をすることができるため発展性を持つ解析基盤である。

今後は収縮力の力学評価という「工学」の研究だけでなく生命現象の解析という「理学」としての研究の展開を目指している。研究代表者は令和 3 年度より さきがけ「複雑流動: 複雑な流動・輸送現象の解明・予測・制御に向けた新しい流体科学」に採択され、この力学解析基盤を活かし収縮力と細胞内流動現象・分子拡散動態の間にどのような時空間的相関があるか解析を進めることを計画している。

4. 自己評価

上記の通り、本研究課題では ACT-X 開始当初の構想を概ね達成できたと評価する。研究課題として当初から計画しテーマの根幹となる研究課題について二本の論文 [研究成果リスト 1,3] を期間内に発表することができた。なお現在 bioRxiv に公開されている 2 つ目の論文のプレプリントは、ImageJ/Fiji (生物分野で用いられる画像処理ソフトウェア) の開発者に興味深いとツイートされるなど高い注目を集めている。今回開発したシステム・解析基盤は細胞収縮力の高速・効率的な評価法となるため、生命科学の研究をサポートすることができる。この解析基盤を活かし、細胞 (本研究課題で用いた細胞とは異なる細胞) の収縮力評価について現在共同研究を実施しており、今後の更なる発展・展開が期待できる。またメインとなる研究を展開するだけでなく、細胞・液滴の力学に関するスピンオフ課題を展開し発表することができた。

研究代表者はもともと機械工学・物理の研究者であり ACT-X に採択される少し前から機械学習を用いた研究をはじめたばかりであった。ACT-X で頻繁に開かれた領域会議・サイトビジットでの発表機会にて多数のアドバイス・コメントを頂くことで、新たな視点や気づきを得ることが非常に多くあり研究を進める強力な一助となった。また同世代の優秀な若手研究者、それも情報系・数学系という自分とは異なる背景の研究者と交流し、研究に真摯に向き合う他研究者の姿勢に勇気づけられた。残念ながら具体的な共同研究などには発展させることができなかったものの、同世代の研究者と議論し得られたネットワークは今後の研究生生活、具体的には新領域開拓・新分野形成に活かせると思う。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文 (原著論文) 発表

研究期間累積件数: 4 件

1. “Image based cellular contractile force evaluation with small-world network inspired CNN: SW-UNet”, Honghan Li, Daiki Matsunaga*, Tsubasa S. Matsui, Hiroki Aosaki, Shinji Deguchi*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, volume 530, issue 3, pp.



概要：本研究では「細胞の顕微鏡画像」から「シワの画像」を特異的に自動抽出する機械学習システムの提案を行った。我々の先行研究では力の大きさの定性的な大きさを見積もるため 2D-FFT を用いた抽出や人の目による手書きによる抽出を実施していたが、早く・正確な自動抽出はこれまで困難であった。そこで本研究では U-Net タイプの機械学習システムを構築し、顕微鏡画像の中からシワの画像を特異的に抽出するシステムを構築した。機械学習で得られたシワは画像処理のみで抽出したシワより遥かに明瞭であり、約 91 倍の正解率(正解データは手作業で抽出したもの)を記録した。

2. Shunichi Ishida, Daiki Matsunaga* (co-first author), “Rheology of a dilute ferrofluid droplet suspension in shear flow: viscosity and normal stress differences”, *Physical Review Fluids*, 2020, volume 5, 123603

概要：磁性液滴とは強磁性コロイドを界面活性剤などで被膜し安定的に分散させた懸濁液であるが、この液滴は外部磁場を印加することにより磁化(超常磁性)し磁場方向へと伸長する性質が知られている。本研究では磁性液滴のこの伸長の性質を生かした懸濁液のレオロジー制御法を提案した。平行平板間に存在する磁性液滴に対し速度勾配方向に磁場を負荷した場合は粘性が最大 6.2 倍となる一方、速度方向に負荷した場合は 0.12 倍へと低減できることが明らかとなった。以上の成果は磁性液滴による溶液のレオロジー制御の可能性を示すものであり、流体制御分野において重要な成果である。

3. Honghan Li, Daiki Matsunaga* (co-first author), Tsubasa S. Matsui, Hiroki Aosaki, Genki Kinoshita, Koki Inoue, Amin Doostomohammadi, Shinji Deguchi*, “Wrinkle force microscopy: a machine learning based approach to predict cell mechanics from images”, *Communications Biology*, 2022, volume 5, 361

概要：本論文では入力画像を「抽出されたシワ画像」、出力画像を「細胞収縮力の分布」とする画像から画像へと変換する GAN による機械学習システムの構築・提案した。学習のパフォーマンスを測定するためテストデータと予測データの誤差を定量化したところ力の大きさとしては 33-35%、力の向きは 19-20° と小さい誤差で力の予測ができることがわかった。以上、完成したシステムはシワの抽出のみで、つまりビーズの埋め込みを必要とせず、高速に大量の細胞についての収縮力を評価できるため重要な技術開発である。

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

－ 主要な学会発表

1. 招待講演, APBiomech 2019, Taipei, “Controlling migration of ellipsoidal magnets in microfluid channels for biomedical applications”, Daiki Matsunaga, 2019/11
2. 招待講演, Biofluid Symposium 2021, Online, “Biomimetic fluid mechanics with magnetic

materials”, Daiki Matsunaga, 2021/6

3. 招待講演, 日本機械学会 第 33 回 バイオエンジニアリング講演会, “深層学習を用いた細胞力学計測基盤の構築”, 松永大樹, 李泓翰, 松井翼, 出口真次, 2021/6

– 受賞

1. Daiki Matsunaga, “Yamaguchi Medal”, Asian-Pacific Association for Biomechanics, 2019/11