

研究経過報告書

1. 研究課題名：次世代位相差顕微鏡と AI 技術を活用した病原体感染細胞を自動検出する新規画像診断システム創出のための基盤構築

2. 研究代表者氏名：島崎 健太郎

3. 研究発表（論文、著書、学会発表等があれば記載してください）

論文 1 (下線部: 研究代表者, *: Co-correspondence):

Kentaro Shimasaki*, Yuko Okemoto-Nakamura, Kyoko Saito, Masayoshi Fukasawa, Kaoru Katoh, Kentaro Hanada*, Deep learning based-segmentation of subcellular organelles in high-resolution phase-contrast images, **Cell structure and function**, 49(2), 57-65, 2024.

4. 研究実績（必要であれば図を用いても構いません）

(1) 研究開始当初の背景

ウイルス、細菌などの病原体に感染した宿主細胞では特徴的な形態変化が誘導されることが、固定標本を主とした光学顕微鏡や電子顕微鏡観察により明らかにされている。これら技術は、感染症の基礎研究のみならず、病原体の医学的診断にも用いられている。我々が構築したアポダイズド位相差(APC)顕微鏡システムは、生きた細胞内におけるオルガネラ等の微細構造を、無染色条件で高解像に観察することができる (Shimasaki et al., 2024a)。実際に、黄熱ウイルス(YFV)感染細胞においてこれまでに報告内のない特徴的な構造変化を可視化することに成功しており (Saito et al., 2022)、本顕微鏡システムの感染症研究に対する有用性を示してきている。

(2) 研究の目的

本研究では、人工知能(AI)技術を活用することで、感染により誘導される細胞内微細構造の変動を指標として APC 画像から YFV 感染細胞を自動検出する AI モデルを構築することを目的とする。本研究の遂行を通じて、臨床検体を用いた細胞感染実験において、染色等の煩雑な操作を要することなく、無染色で感染の有無が診断可能となるような、病原体感染細胞の新規画像診断システム創出のための基盤を確立することを目指す。

(3) 研究の方法

当初は、既報のフラビウイルス感染蛍光インジケーター (Arias-Arias et al., 2020) を用いた実験を計画していたが、実際に当該インジケーター遺伝子を入力しインジケーター発現細胞を樹立したところ、報告にあるような感染に応答した蛍光は認められなかった。従って、本研究課題申請時に掲げていたバックアッププランである、「**YFV 感染細胞における APC 画像上の各オルガネラの動態変化を、オルガネラ AI 抽出モデルを用いて形態に関する定量情報を解析することで、感染により誘導される細胞内構造変化をオルガネラレベルで理解すること**」、に研究方針を切り替える必要が生じた。

蛍光マーカーを用い対象オルガネラを蛍光ラベルした細胞においてライブイメージングを実施し、近同時に撮像された APC 画像および蛍光画像を取得した。得られた蛍光像を領域情報へと変換し、対象オルガネラ AI 抽出モデル構築のためのデータセットを得た。APC 画像を学習画像、領域画像を教師画像とした深層学習を実施し、対象オルガネラ抽出モデルを構築した。深層学習は、画像認識の分野で広く利用されている Convolutional Neural Network の一種である U-net (Ronneberger et al., 2015) アーキテクチャに、エンコーダーには ConvNeXt (Liu et al., 2022) を組み合わせたプラットフォームで実施した。得られたモデルの性能は、薬剤処理により誘導されたオルガネラ形態変動を、AI 抽出結果が検出可能かをもちて評価した。YFV 感染細胞、および非感染細胞のタイムラプス観察により取得した APC 画像に対して、性能の担保された AI 抽出モデルを適用しオルガネラ形態情報を取得した。得られた形態情報を用いて多変量特徴量解析を行い、各タイムコースにおけるオルガネラ動態定量情報を取得し、感染による微細構造の変動が検出されているかを評価した。

(4) 研究成果

ミトコンドリア、脂肪滴を対象としたオルガネラ AI 抽出モデルを深層学習により構築し、その抽出精度を評価した。ミトコンドリアを断片化することが知られている CCCP を処理したところ、蛍光像、AI 抽出像共に、刺激依存的な細胞当たりのミトコンドリアの長さの有意な減少が確認できた (図 1, 上パネル)。また、脂肪滴の産生を誘導すること

が知られているオレイン酸を処理した細胞においても、蛍光像と AI 抽出像共に、刺激依存的な細胞当たりの脂肪滴量の有意な増加が認められた (図 1, 下パネル)。

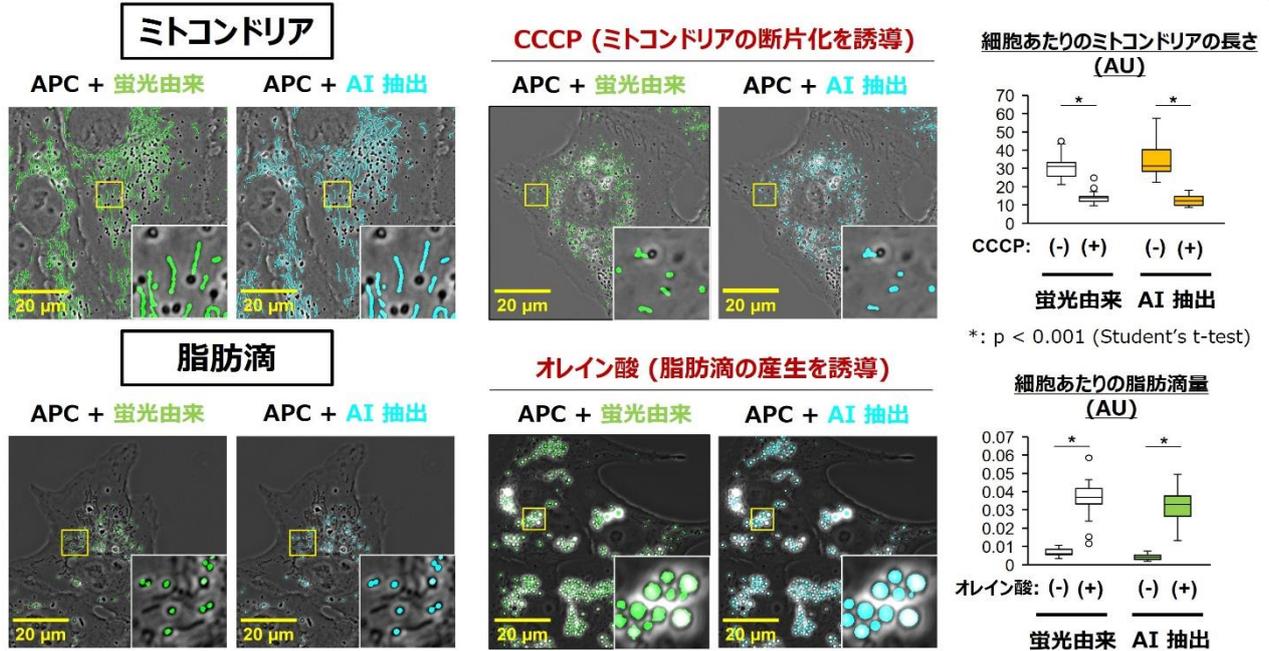


図 1. 構築したミトコンドリア、脂肪滴に対する AI 抽出モデルの性能評価

以上の結果から、APC 画像からミトコンドリア、脂肪滴といったオルガネラの変動を、**蛍光像と同程度の精度で検出可能な AI 抽出モデルを構築することができた**。本成果を Cell structure and function 誌に報告、論文掲載に至っている (論文 1)。

続いて、構築した AI 抽出モデルを、YFV 感染細胞、および非感染細胞のタイムラプス APC 画像に適用し、各タイムコースにおけるミトコンドリア、脂肪滴の形態情報を取得した。これら形態情報を用い、各ミトコンドリアの大きさ、1 細胞あたりの数、ミトコンドリアと脂肪滴の接触頻度、などの定量情報を網羅的に解析 (多変量特徴量解析) することで、各オルガネラの形態に関する 257 個の特徴量に関する定量情報を得た (図 2)。

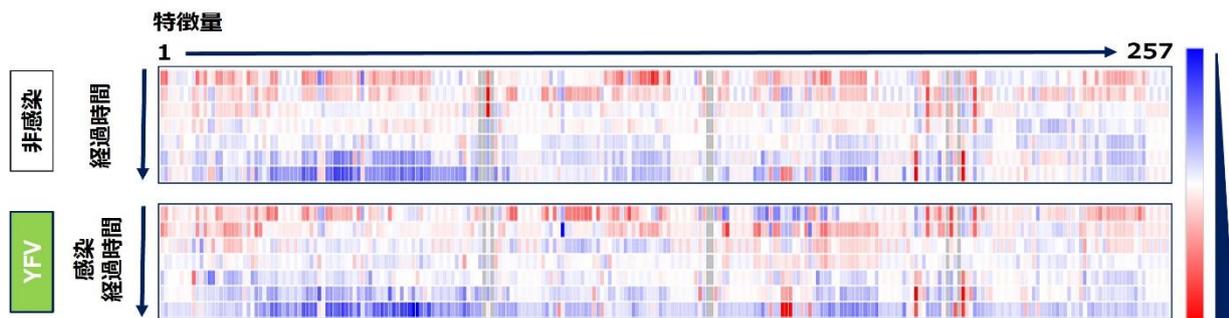


図 2. YFV 感染が誘導するオルガネラ動態変化を指標とした AI 抽出領域の多変量特徴量解析

今後は、これら網羅的定量情報に対する統計学的解析手法を含めた画像解析基盤の更なる整備がなされることで、従来の解析手法では見逃されていた定量情報が得られる。これら定量情報に基づいた病原体の判別が可能となれば、無染色生細胞画像を用いた新規診断システムへの基盤として運用できる可能性がある。また、このような新情報から病原体感染現象に対する学術的問いが生み出され、さらには、予防法・治療法開発への重要なヒントが提供されると期待される。