



Label-free classification of cells based on supervised machine learning of subcellular structures

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2019-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 尾崎, 裕介 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003561

博士（医学） 尾崎 裕介

論文題目

Label-free classification of cells based on supervised machine learning of subcellular structures

(細胞内構造の教師付き機械学習に基づいた非標識による細胞分類)

論文の内容の要旨

[はじめに]

細胞を形態学的特徴から分類する手法には、細胞内のタンパク質や分子等を染色しその分布を蛍光顕微鏡で観察する手法が主流であり、屈折率などの光学的な特徴に基づいて観察する手法の報告はまだ少ない。一方で近年人工知能の発展は目覚ましく、画像診断や組織診断の領域にも急速に広がっている。そこで、細胞内の光学的特徴を機械学習させ、健常人白血球と培養がん細胞を識別できるか検討した。

[材料ならびに方法]

健常人より EDTA 入り採血管に採血し、Lymphoprep・溶血剤(VersaLyse Lysing Solution)を用いて白血球を抽出した。培養がん細胞は HCT116、SW480、DLD-1、Panc-1、HepG2 を使用した。

細胞の観察は定量位相顕微鏡(Quantitative Phase Microscopy: QPM)を利用した。物質には屈折率×距離で定義される光学的厚み(位相値)があり、QPM は細胞の光学的な厚みの積分値(optical path length: OPL)を数 nm の高い分解能で、2 次元分布として得ることができる。この原理により、無色透明な細胞を、染色や固定なしにダメージを与えることなく高コントラストに撮影することができる。

抽出した白血球・各種培養がん細胞を QPM で撮影し、細胞の大きさに依らない特徴量を抽出するため OPL を光路長(path length: PL)、直径(diameter: D)で除した値 OPL/PL 、 OPL/D を定義し、得られた画像から HOG 特徴量を抽出した。この HOG 特徴量を白血球・培養がん細胞 250 例ずつ機械学習の学習データとして使用し、両者を識別する識別器を作成しその性能を検証した。

[結果]

白血球における OPL の細胞内分布は均一である一方、培養がん細胞では不均一であり、変化量をベクトルで示す HOG 特徴量を抽出すると培養がん細胞において変化量が大きかった。白血球・各種培養がん細胞の大きさ分布は異なっていたが、大きさを規格化した OPL/PL 、 OPL/D の分布は一致していた。

機械学習の結果得られた識別器における白血球の特徴は、細胞中央において OPL/PL 、 OPL/D の変化が乏しく細胞内が均一であることであった。一方、培養がん細胞の特徴は細胞中央における OPL/PL 、 OPL/D の変化が大きく細胞内が不均一であることであった。学習データを識別器にかけて検証したところ、白

血球と培養がん細胞の値の重なりが最も小さかったのは OPL/ PL から HOG 特徴量を抽出した場合であり、同識別器は DET 曲線の比較においても、その AUC が最も高かった。

次に識別器が細胞内のどのような違いを認識しているかを検討するため、細胞内の OPL/ PL 勾配を変化させた擬似細胞モデルを作成し検証した。OPL/ PL 勾配が 0% から 14% へと増加するに従い識別結果の値は 4.7 から -2.6 へと減少した。これは白血球の特徴から培養がん細胞の特徴へと変化することを示唆しており、識別器は細胞内の不均一性に基づいてがん細胞を識別できると考えられた。本研究は浜松医科大学臨床研究倫理委員会の承認の下に行った。

[考察]

本手法は細胞障害性が少なく、また細胞内の不均一性に基づいて鑑別しており、がん細胞の特徴を捉えているという特徴がある。

今回の検討では白血球と培養がん細胞を識別する指標の中で最も精度が高いのは細胞の大きさによる分類であった。一方で我々はこの細胞識別手法を用いて血中循環腫瘍細胞(Circulating tumor cells: CTC)の検出を目指しており、CTC と白血球は大きさの違いからは識別できないことが知られている。既存の CTC 検出法は細胞表面マーカーに依存しているが、がん種やがんの進行の過程においても変化するため、CTC の一部しか検出できていない。本手法を CTC の検出に応用するには大量の細胞数を観察するための撮影システムを構築する必要があるが、細胞の大きさや表面マーカーに依存せず、細胞障害性のない検出方法として期待される。

また、近年の報告では腫瘍細胞が PD-1 や CTLA4 を介して T 細胞に作用し宿主の免疫応答を抑制していることが分かり、免疫チェックポイント阻害剤によってこの応答を阻害することで抗腫瘍効果が確認されている。腫瘍細胞が白血球へ作用しその形態を変化させている可能性があり、本手法を利用してがん患者由来の白血球の形態的特徴を明らかにすることで、免疫チェックポイント阻害剤の効果予測に応用できる可能性がある。

[結論]

QPM 画像と機械学習を組み合わせた非標識の細胞識別手法を開発し、細胞内の不均一性によって白血球と培養がん細胞を識別することができた。この手法を応用することで、新たな CTC の検出手法として期待される。