

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2022
課題番号：18K17973
研究課題名（和文）アルコール依存に伴う精神・神経症状の治療応用を目指した汎用スクリーニング系開発

研究課題名（英文）Development of a general-purpose screening system, intending to developing treatments for alcohol-related neurological and psychiatric symptoms

研究代表者
荻 寛志 (Ogi, Hiroshi)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・客員講師

研究者番号：70563188

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）：神経細胞の元となる神経幹・前駆細胞を用い、アルコールや環境化学物質の胎生期曝露の影響を形態学的・分子遺伝学的に解析できるin vitroスクリーニングシステムを構築した。システムにはAI技術を活用し、神経細胞の成熟状況を示す複数のタンパク質の画像を入力として、推定される曝露物質を出力するものである。本研究全体を通して、精神・神経系への影響を評価したい化学物質を細胞へ曝露し、画像解析により影響が近い既存物質を提示するという、汎用的なスクリーニング系につながる成果が得られた。将来的には、化学物質とともに治療薬候補を曝露し、影響軽減（治療効果）を測定することで、治療薬開発へ貢献できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルコール依存や胎児性アルコール症候群、環境化学物質曝露など、神経発達や精神症状につながる疾患は、根本的な治療法が確立されていなかったり治療に長時間を要したり経済的な損失にもつながるなど社会的な課題であるにもかかわらず、治療開発・影響評価では複雑な表現型を統合的に評価することが難しく、結果として開発に時間がかかることや総合的な治療に至らない状況であった。今回開発した汎用的なスクリーニング系は、問題となる様々な化学物質について同一のシステムで評価が可能であり、化学物質とともに治療薬候補を曝露し影響軽減（治療効果）を測定することで治療薬開発への貢献が期待できる点が社会的な意義となる。

研究成果の概要（英文）：We developed a general-purpose in vitro screening system which is capable of analyzing effects of fetal substance exposure by molecular biological method using neural stem cells. This screening system utilize AI technologies to infer exposed substance from protein-stained cell culture images. Through this study, we established a proof-of-concept for a general-purpose in vitro screening method consisting of neural stem cell culture and image analysis. By exposing cells to candidate compound simultaneously and evaluating shift of inference result, the screening system contribute to develop treatments for neurological and psychiatric diseases.

研究分野：神経科学

キーワード：スクリーニング 胎生期曝露 神経幹・前駆細胞 画像解析 AI

1. 研究開始当初の背景

不適切な飲酒によるアルコール健康障害は、本人の健康を損なうばかりでなく、飲酒運転・暴力・虐待・自殺など周囲を巻き込んだ問題と関連する。本邦では平成 25 年にアルコール健康障害対策基本法が成立するなど対策に力を入れられている状況である。

アルコール健康障害の中核をなすアルコール依存症の治療は、抗酒薬や精神症状に対する治療など投薬も行われるが、精神療法を中心としたリハビリ療法が中心であり、長い時間を要し、しばしば再発する。このため、より効果的な治療法・治療薬の開発が望まれている。

また、アルコール摂取による本人への直接的障害の他に、妊娠中の母親の飲酒による胎内の子供への影響(胎児性アルコール症候群)も問題であり、米国政府機関の報告では妊娠期間中のアルコール摂取は 550 万ドルの経済損失を産むとされている。胎児性アルコール症候群は神経発達障害の一種であり、多動や注意障害など様々な精神症状を呈し、予防以外の治療法は確立されていない。

胎児性アルコール症候群と同様に妊娠中の母体を介した曝露による健康影響が懸念される物質としてビスフェノール A (BPA) などの環境化学物質がある。胎児期の BPA 曝露により脳・神経細胞の発達や出生児の行動に影響を及ぼす可能性を示唆する報告が挙げられており、欧州連合では規制が強化されている。

アルコール依存や胎児性アルコール症候群、胎児期の環境化学物質曝露など、神経発達や精神症状につながる疾患の治療開発・影響評価では複雑な表現型を統合的に評価することが難しく、開発や評価に時間がかかることや総合的な治療に至らないことが課題であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、前述のアルコール依存症や胎児性アルコール症候群、環境化学物質曝露といった社会問題を背景とし、治療法の研究開発における課題を解決するために、「人工知能技術を活用し、複雑な表現型を統合的に評価することで治療法探索が可能な汎用スクリーニング系を開発すること」である。本スクリーニング系では、定量化が容易な少数の表現型だけでなく、多数の表現型を総合的に評価でき、疾患ごとに個別の系を構築する必要が無いいため神経発達や精神症状を伴う疾患の治療法開発全体の効率化につながることを期待される。

3. 研究の方法

行動表現型によるスクリーニング系として、汎用的な多数の行動表現型を同時かつ自動的に検出が可能な IntelliCage システムとモデル動物(げっ歯類)を用いる方法を計画した。IntelliCage では自由探索・空間認知・衝動性・不安の表現型を確認するタスクを順次課し、合わせて条件ごとに分けたコーナー訪問回数やコーナー滞在時間など多数(数十以上)の基本的な計測値を抽出する。モデル動物として、慢性的間欠的アルコール曝露法(Watanabe Y et al., Int J Neuropsychopharmacol, 2014)によるアルコール依存モデルと、Brady MLら(Alcohol Clin Exp Res, 2012)の方法による胎児性アルコール症候群モデルを用いる。

行動表現型による系の研究は、研究施設の改修工事の影響により遂行が困難となったため、代替としてヒト胎児脳由来神経幹・前駆細胞(NSPCs)による胎生期曝露モデルを用い、アルコールや環境化学物質の胎生期曝露の影響を形態学的・分子遺伝学的に評価可能なスクリーニング系構築を試みた。NSPCs の分化誘導中にアルコール等を曝露させ、神経分化に関連するタンパク質について免疫細胞化学を実施し、画像解析により曝露物質を推定することが可能なシステムの構築である。

4. 研究成果

行動表現型によるスクリーニング系の要は、多数の指標を自動計測可能な IntelliCage である。本自動計測システムは、動物飼育ケージ内に 4 箇所(2箇所)の飲水用コーナーが配置され、飲水用コーナー内にはコンピュータ制御可能なドアと LED 照明、空気噴出口(エアパフ)が設置されている。飲水(あるいはより嗜好性が強い液体)を報酬、エアパフを罰則とし、報酬や罰則が与えられる場所や条件を様々に設定し、それらに対する動物の行動を記録・解析することで実験が成立する。個体ごとの記録は、主にコーナー進入時の ID 読取りセンサーと、飲水口手前のセンサー(ノーズポークセンサー) 飲水ボトルの接触検知について、時刻と継続時間が記録される。自動計測システムからはこれらの行動記録がテキストファイルにて出力されるが、空間認知・衝動性・不安などのコンテキストで行動を解析するには、より解釈に適したデータ形式や数値データに整える必要がある。我々はこれまでも Perl 言語と Excel マクロを組合せて、自動計測システムの生出力データを解釈可能な状態に整形するツールを整備してきたが(Ogi H et al., Brain Behav, 2013) 今回、空間認知機能に関する高度な解析を可能とするため新たなツールを追加した。今回想定した空間認知機能に関するタスクは、飲水可能なコーナーを 4 箇所の内 1 箇所限定し、その 1 箇所を時計回りあるいは反時計回りに巡回させるものである(飲水可能コーナーに侵入すると LED が点灯し、飲水可能であることを示す)。動物が飲水可能コーナーで飲水すると、

飲水可能なコーナーが入替るため、効率的に飲水するためにはコーナーの飲水可否について空間的な規則性を認識する必要がある。2回のコーナー訪問のパターンとしては、同じコーナーへの連続訪問、隣接コーナーへの訪問、対角線上のコーナーへの訪問に分けられ、3回以降については、今回のタスクでは認知機能が高い場合は時計回り（あるいは半時計周り）の訪問が期待される。一方、げっ歯類の行動としては飲水目的以外のコーナー訪問もあるため、飲水を目的とした訪問か否かを分けて解析する必要もある。飲水目的か否かは、飲水時にドアを鼻で突く行為（ノーズポーク）を課すことで、ノーズポークの有無で切り分けることが可能と考えられる。このように、コーナー訪問パターンとその傾向の変化を目的別に比較解析することで、従来の単純なエラー率（飲水不可コーナーへの訪問率）を指標とする行動評価と比較して、精密な評価が可能となるであろう。準備的な実験では、上記飲水可能コーナー制限を設けた状況では、全コーナーで飲水可能な状況と比較して時計回りパターンの訪問が増加するという結果を得ることができた。

個体の行動指標は表現型として最外周に位置し、アルコールや化学物質の影響評価あるいは治療効果評価を行う上で効果が高いと考えられるものの、動物を用いなければならない点や、最終的な行動につながる多数の要因を個々に確認できない点が、治療開発の観点からは不利となる。これらの解決策として、培養細胞によるスクリーニング系と行動表現型によるスクリーニング系の二段階構成とすることが考えられる。我々は以前よりヒト胎児脳由来神経幹・前駆細胞（NSPCs）を用いて中枢神経系疾患の研究を行ってきたが、今回はアルコールや環境化学物質の胎生期曝露モデルを構築した。培養方法についてはファルネらの報告（Kiso-Farnè K et al., *Acta Histochem Cytochem*, 2022）に詳細が説明されているが、rhEGF や rhFGF、rhLIF を用いた浮遊培養にて細胞集塊を形成させ、その後ポリ-L-リジンでコーティングされたディッシュに播種し分化誘導をかけるというものである。播種3時間後に対象物質を曝露しそのまま7日間培養する。対象物質としては、エタノール（3.41nM）とBPA（0.1nM、1nM、10nM、100nM）を用い、7日後に神経分化状況を指標とするため、抗Nestin抗体と抗Doublecortin（DCX）抗体を用いた免疫細胞化学を施し、イメージングサイトメーターにて画像取得を行った。神経細胞の分化状況に関する指標としては、細胞の数や配置、神経突起などの形状、分化状況に応じて発現する各種のタンパク質などがあるが、今回これらを統合的に用いる方法として、免疫細胞化学画像をAI技術で解析し曝露物質を推定する画像評価システムを構築した（荻、京府医大誌、2022）。システムの概要を図1に示す。免疫細胞化学画像は培養領域全面について取得する。領域全面に渡り局所的な情報と大域的な情報両方を活用するため、得られた画像を細分化し、細分化された画像に対してAIにて曝露物質の推定を行う。AIによる局所領域の推定結果を集約し培養全体としての推定結果を出力する（図1A）。AIネットワークとしては単純な3層構造のConvolutional Neural Network（CNN）で構築した（図2B）。また、全結合層の手前に強めのDropoutを設けている。これら単純なネットワーク構造とDropoutはいずれも過学習を抑制するためのものであるが、理由としては次の2点が挙げられる。1点目は、今回の画像評価システムでは培養領域全面を入力とするため、局所的にみると曝露の影響が現れていない箇所の存在が予想されること。2点目として、加えて今回の実験においては、濃度の違いはあるものの対象物質は2種類、神経分化マーカーは2種類と、表現型のバリエーションは多くないことが予想されることである。図1CはAIへの入力画像の例である（正確にはここから2分の1のサイズがランダムに切り出されてAIに入力される）。2つの免疫細胞化学画像をRGB合成したものである。図1D-Fは、構築したAIにおいて画像のどの部分が曝露物質の推定に寄与しているかを示しているもので、それぞれ中央図ヒートマップ画像の赤色部分や、右側図マゼンタ枠部分の寄与が高いことを示す。曝露なし群では突起部分の寄与はほとんどなく（図1D）、アルコール曝露群では突起部分の寄与がみられ（図1E）、BPA曝露群では細胞の多くの部分の寄与が確認された（図1F）。図1Gは学習に使用した培養サンプルの総合的な推定結果を示している（E：曝露なし群n=6、V：アルコール曝露群n=5、X：BPA曝露群n=8）。統合的な判断に撮影画像（フィールド）単位の結果を含めるかどうかの判定クライテリアは「確信度が高いAI結果が所定割合含まれているかどうか」としており、図中の参照フィールド率は全フィールド数に対して判定クライテリアを満たすフィールドの割合を示す。推定クラス確率が画像評価システム出力結果に相当し、判定クライテリアを満たすフィールド結果の、各クラスへの推定結果割合を示す。正解数は14/19（74%）であった。図1Hは、学習に用いていない培養サンプルに対する評価結果であり、正解数は3/4（75%）であった。今回の画像評価システムの構築、特にAI部分については、ネットワーク構造や学習データの選別など注意深く進めた結果、図1D-Fで示されるように細胞の特徴が推定判断に使われ、システム全体の精度としても75%という良好な結果が得られた。しかし構築を誤ると意図しないシステムとなってしまうため、注意が必要である。図1I-Jはそのような意図しない状態の例であり、細胞以外の領域で推定判断が行われてしまっていることを示している。

本研究全体を通して、精神・神経系への胎生期曝露影響を評価したい化学物質をNSPCsへ曝露し、神経細胞系マーカーで免疫細胞化学を実施し、画像評価システムにて影響に近い既存物質を提示するという、汎用的なin vitroスクリーニング系につながる成果が得られた。今回は対象物質としてアルコールとBPAの2種類であったが、物質を増やすためにはより複雑な表現型に対応できるよう、マーカーの増加、観察タイムポイントの増加、AIネットワークの変更などが必要になるだろう。将来的には、化学物質とともに治療薬候補を曝露し、影響軽減（治療効果）を測定することで、治療薬開発へ貢献できると考えられる。

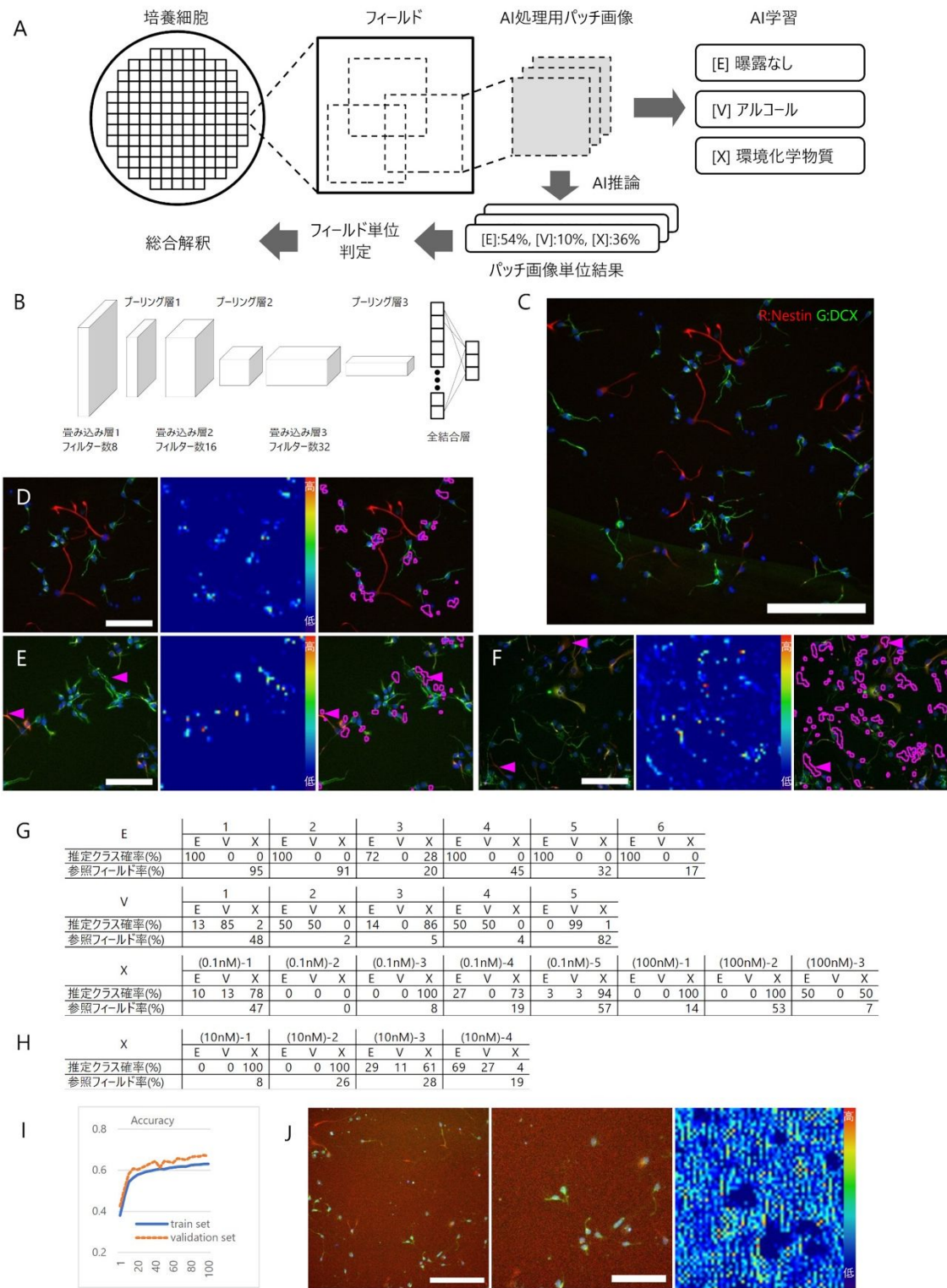


図 1: 化学物質胎生期曝露 in vitro スクリーニングシステム構築実験(荻, 京府医大誌, 2022 より)。A) スクリーニングシステム概要。B) システム内で使用している AI。C) AI への入力画像。D-F) 推定に寄与している箇所。G) 学習に用いた培養サンプルの評価結果。H) 学習に用いていない培養サンプルの評価結果。I-J) 意図しない学習状態。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 荻真志	4. 巻 131
2. 論文標題 医学研究における画像解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 京都府立医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 941-953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32206/jkpum.131.12.941	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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