

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02814

研究課題名(和文)患者iPS細胞表現型からの孤発性パーキンソン病の層別化と最適治療の開発

研究課題名(英文)Classification of sporadic Parkinson's disease from patient iPS cell phenotypes

研究代表者

赤松 和土 (AKAMATSU, WADO)

順天堂大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60338184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病症例の9割を占める孤発性症例の層別化ができれば最適な治療の開発につながると考えた。本研究では、申請者がこれまで樹立した数百例の孤発性パーキンソン病患者iPS細胞由来ニューロンに対して各症例を客観的に分類可能な独自のシステムを構築することを目標とした。関心領域である細胞体のみ抽出するアルゴリズムを開発。サンプル数・遺伝性症例の種類が増加によって、マイトファジー異常を示す遺伝性症例に関しては正答率を100%に上昇させることに成功した。さらに細胞の形態をAIを用いた高速イメージャーを用いて判別し、未分化のiPS細胞の方において疾患群を74-79%と高い判別制度を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、多様性のある孤発性PDのうち特定の細胞表現型もしくは細胞における薬剤反応性から特定の集団を抽出し、患者からのデータ取得が比較的容易な遺伝情報や臨床情報を教師データとして深層学習を活用することによって孤発性PD症例の細胞病態表現型の差異を層別化する因子を同定することを目的とするが、その結果として、患者検体から比較的簡便に解析可能な層別化バイオマーカーが同定され、現在は画一的なPDの治療が各症例の層別化から選択した最適な治療法への確立に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We considered that the stratification of sporadic cases, which account for 90% of Parkinson's disease cases, would lead to the development of optimal treatment. The aim of this study was to construct an original system that could objectively classify each case of iPS cell-derived neurons from hundreds of patients with sporadic Parkinson's disease, which had been established by the principal investigator. (1) Developing an algorithm to extract only cell bodies, which is the area of interest (2) By increasing the number of samples and types of hereditary cases, we succeeded in increasing the correct response rate to 100% for hereditary cases that show mitophagy abnormalities. Furthermore, the morphology of cells was distinguished using an AI-based high-speed imager, and a high discrimination system of 74-79% was achieved for disease groups in undifferentiated iPS cells.

研究分野：病態神経科学

キーワード：パーキンソン病 iPS細胞 層別化 神経分化

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は中脳黒質ドーパミン作動性神経細胞が変性し神経伝達物質であるドーパミンが欠乏することにより運動症状を示す疾患であるが、その原因は不明である。現在の PD 患者に対する治療はドーパミン補充療法や脳深部刺激療法(DBS)などの対症療法が主流であるが、PD 症例の約 90%を占める孤発性症例においては、脳内に Lewy 小体と呼ばれる病理変化は共通するものの、患者の臨床経過や薬剤反応性にも多様性があり、神経細胞の細胞レベルでの変性原因が多様であることが推測されている。PD のうち約 10%を占める家族性症例では PARK1-24 まで原因遺伝子が同定され、その多くはミトコンドリア機能をはじめ、蛋白質分解・リソソーム系などに関与している分子であり多様性がある。一方で *SNCA*、*LRRK2* をなどの家族性症例の原因遺伝子は孤発性症例のリスク因子にもなることが知られている。

このような背景から、原因遺伝子が不明な孤発性 PD 症例に関しては、各症例の細胞表現型を解析し遺伝性症例と比較することによって、孤発性症例を分類することができれば、多様性に富んだ孤発性症例に対して根本的な治療法となる疾患修飾治療実現できるのではないかと申請者は考えてきた。申請者はそれまで順天堂大学の日本最大規模の PD 患者リソースを生かして、脳神経内科と共同で各種の遺伝性 PD-iPS 細胞(PARK2/4/6/8/9/14/22)を樹立し、そこから誘導したドーパミンニューロンの病態表現型を定量的に検出する方法を確立した。さらに家族性 PD 症例の iPS 細胞表現型を解析し複数の論文を報告し、さらに約 400 例の孤発性症例から検体を採取し、うち 150 症例を iPS 細胞として樹立し表現型解析を進行させ iPS 細胞表現型パネルを整備してきた。実際に PARK2/6 患者由来 iPS 細胞を用いて PARK2/6 に特徴的な表現型であるマイトファジー異常と細胞死を共に改善する薬剤を複数同定したが、4 症例の孤発性 PD 検体のうち PARK2/6 同様の表現型を示すのは 2 症例であり、同定した薬剤の効果があつたのは 1 症例で、他の 1 症例では全ての薬剤で効果がなかった (Stem Cell Reports 2020)。これらの結果から、孤発性 PD は細胞表現型で見ると多様性を有しており、適切な分類を行うためには高い客観性とスループット性/処理能力を有する新たな方法の確立が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は申請者が現在も整備を進めている遺伝性・孤発性 PD-iPS 細胞ライブラリの表現型解析において、孤発性 PD の画像データの機械学習を用いた直接解析および高速フローイメージャーを用いた細胞情報解析と画像化を用いることによって客観性とスループットを向上させ、孤発性 PD 症例の細胞病態表現型に基づく分類を可能にすることを目的とした。その結果として、現在は画一的な PD の治療が各症例の細胞表現型から分類した最適な治療法への確率に繋がることが期待できる。本研究のような孤発性 PD 症例を層別化するアプローチは世界的にも全く実施されておらず、多様な孤発性 PD の分子機構についても未解明であり、分担者の石川が所属する順天堂脳神経内科の持つ患者リソースと代表者の iPS 細胞からの神経分化誘導・病態表現型解析技術に加えて得たデータを、幹細胞研究の実績も有する分担者の清田が率いる理研医療 AI ユニットの機械学習・深層学習技術と、高速細胞フローイメージ解析に実績を有する太田の細胞解析技術によって解析し孤発性 PD の分類を実現しようという本研究課題は、本研究チームならではの極めて独創性の高い研究提案である。

3. 研究の方法

本研究では代表者の赤松が取得した遺伝性 PD 画像解析データに対して分担者の清田らが機械学習を用いた解析を行い、前述した各表現型の中で特にマイトファジー異常・細胞死を主軸として直接に免疫染色画像を深層学習で解析し分類に有効な特徴量を直接抽出する方法を確立する。申請者と分担者の石川らは分類器のシステム精度の向上のため必要な遺伝性 PD 解析データの補完を進め十分な正答率を有するシステムに改良することを目標とする。可能であればさらに臨床データもパラメータとして採用することによりさらに高精度な分類法の開発を目指す。一方、遺伝性 PD の原因遺伝子はその多くがミトコンドリアの機能と代謝に関与し、実際の患者細胞でもミトコンドリア形態異常を報告している。PARK14 の原因遺伝子である PLA2G6、近年順天堂で同定された遺伝性 PD 関連遺伝子である PSAP はいずれも脂質代謝にも関与しており、PD 患者細胞は膜構造異常からミトコンドリアのみにとどまらず細胞全体の微細形態異常を引き起こしていることが示唆される。分担者の太田の開発した高速 3D フローイメージャーを用いて患者 iPS 細胞から誘導したニューロンを mitotracker などの蛍光色素でラベルしたもの、もしくはノンラベルの細胞の形態のハイスループットなイメージ取得を行い、取得した細胞構造情報(細胞

全体およびミトコンドリア)を3D再構築した画像を作成し、その画像を機械学習させることによって形態を指標に患者・パーキンソン病を分類するシステムを確立する。さらに他の表現型を検出する蛍光色素を組み合わせることによって孤発性患者の分類を試みる。以上のような(1)PD-iPS細胞リソースとその解析(2)機械学習による画像解析(3)高速3Dフローイメージャーによる細胞形態解析を統合することによって孤発性PDの層別化方法の確立を目指すのが本研究のゴールである。

4. 研究成果

孤発性PD症例iPS細胞から取得した病態表現型解析データ(細胞死・シヌクレイン蓄積・マイトファジー異常の定量)から孤発性症例の適切な層別化を行うことを試みたが、通常の統計解析手法では困難であった。そのためには高い客観性とスループット性/処理能力を有する新たな方法の確立が必要であると考え、解析に用いた細胞画像もしくは細胞形態の解析から得たデータを機械学習・深層学習を用いて「正常と異常(特定の遺伝性PD)を高確率で判別する分類器」の確立を進めた。まず遺伝性PD-iPS細胞から得たデータ(n=4-7と少数)を機械学習を用いて分類するシステムの確立を試みたが、遺伝性PDの解析結果からどの遺伝性PDであるか?というタスクに関しても75%と高い正答率は得られなかった。そこで、(1)サンプル数を増加し、(2)機械学習でなく深層学習を用いる、(3)可能であれば臨床データを付加するを改善点として、理化学研究所健康医療データAI解析標準化ユニット(現・医療データ深層学習チーム)と、(1)関心領域である細胞体のみ抽出するアルゴリズムを開発(2)サンプル数・遺伝性症例の種類を増加によって、マイトファジー異常を示す遺伝性症例に関しては正答率を100%に上昇させることに成功した。その判別根拠をGrad-CAMを用いて解析を行ったところ、細胞核を判別の根拠としていることが明らかになった。さらにこの分類器が孤発性症例の判別に応用可能かを、実際に孤発性症例細胞を解析したデータを用いて解析の最適化を行った。一方で細胞の形態を東京大学先端科学技術センターで開発されたAIを用いた高速イメージャー(Ghost Cytometry)を用いて細胞形態による疾患と健常の直接の判別ができないかを検討した。正常対照とマイトファジー異常を示す遺伝性症例という比較で解析を開始したが、分化誘導したドパミン神経細胞を用いた場合の正答率は70%程度と高くはなく、未分化のiPS細胞の方が74-79%と高い判別制度を得ることが明らかになった。現在は異なる病態表現型が混在した多検体の判別に細胞形態が利用できるかを検討しているが、前述した理由により、遺伝性症例と家族性症例のiPS細胞の解析が進行するにあたって非共通点があることもわかってきた。

一方で並行してさらに孤発性PD-iPS細胞由来ドーパミンニューロンにおける病態表現型解析を進めたところ、その表現型には孤発性症例間でも大きな多様性があることが明らかになり、実際の孤発性の集団は複数のタイプの混成集団になっている上に、その表現型の強さも多様性を示し、孤発性PD自体は遺伝性PDと同様の細胞表現型を示すものの、前述したように特定の遺伝性PDに類似した表現型を有していても症例頃に異なる薬剤反応性を示すという結果からも、孤発性PD症例は必ずしも単一の遺伝性症例のタイプに収束するものではないのではないか?という示唆を得た。そのため、孤発性症例と遺伝性症例は層別化の観点では区別することが重要であるとの結論に至り、孤発性PD集団のみを用いた階層型クラスター解析を行い、細胞表現型に基づいて3つの症例群を同定した。このように孤発性PDのiPS細胞表現型で層別化することで臨床的バイオマーカーや候補化合物の同定が期待出来るが、実際の臨床現場で有益な孤発性症例の層別化手法を開発するにあたっては「細胞表現型解析」という最も煩雑な手順が最終的な制約となりうる。したがってそれぞれの細胞表現型やそれと紐づく症例群を比較的簡便なパラメータから予測する予測器を作成することで実効性のある患者層別化や創薬開発が可能であると考えた。申請者はこれまで末梢血採取時年齢や性別、身長、便秘の有無といった臨床データのみを共変量に加えることでAUC 0.69-0.86の精度で症例群を再構成することに成功しているが、症例数や解析パラメータの不足により、精度に問題が残るのが現状である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Liu Xing, Ishikawa Kei-ichi, Hattori Nobutaka, Akamatsu Wado	4. 巻 77
2. 論文標題 Generation of one induced pluripotent stem cell line JUCGRMi004-A from a Charcot-Marie-Tooth disease type 1A (CMT1A) patient with PMP22 duplication	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 103401 ~ 103401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2024.103401	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ishikawa Kei-ichi, Okuzumi Ayami, Yoshino Hiroyo, Hattori Nobutaka, Akamatsu Wado	4. 巻 76
2. 論文標題 Generation of hiPSCs (JUCGRMi003-A) from a patient with Parkinson's disease with PARK2 mutation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 103323 ~ 103323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2024.103323	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ishikawa Kei-ichi, Shiga Takahiro, Yoshino Hiroyo, Nishioka Kenya, Hattori Nobutaka, Akamatsu Wado	4. 巻 74
2. 論文標題 Generation of three clones (JUCGRMi002-A, B, C) of induced pluripotent stem cells from a Parkinson's disease patient with SNCA duplication	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 103296 ~ 103296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2023.103296	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Liu Lu, Yang Jiahao, Otani Yoshinori, Shiga Takahiro, Yamaguchi Akihiro, Oda Yasuaki, Hattori Miho, Goto Tsukimi, Ishibashi Shuichi, Kawashima-Sonoyama Yuki, Ishihara Takaya, Matsuzaki Yumi, Akamatsu Wado, Fujitani Masashi, Taketani Takeshi	4. 巻 24
2. 論文標題 MELAS-Derived Neurons Functionally Improve by Mitochondrial Transfer from Highly Purified Mesenchymal Stem Cells (REC)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 17186 ~ 17186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242417186	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ishikawa Kei-ichi, Shiga Takahiro, Funayama Manabu, Hattori Nobutaka, Akamatsu Wado	4. 巻 74
2. 論文標題 Generation of a control iPS cell line (JUCGRMi005-A) with no abnormalities in Parkinson's disease-related genes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 103271 ~ 103271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2023.103271	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ishikawa Kei-ichi, Shiga Takahiro, Funayama Manabu, Hattori Nobutaka, Akamatsu Wado	4. 巻 74
2. 論文標題 Generation of a control iPS cell line (JUCGRMi006-A) with no abnormalities in Parkinson's disease-related genes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 103270 ~ 103270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2023.103270	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Daida Kensuke, Funayama Manabu, Billingsley Kimberley J., Malik Laksh, Miano Burkhardt Abigail, Leonard Hampton L., Makarios Mary B., Iwaki Hirotaka, Ding Jinhui, Gibbs J. Raphael, Ishiguro Mayu, Yoshino Hiroyo, Ogaki Kotaro, Oyama Genko, Nishioka Kenya, Nonaka Risa, Akamatsu Wado, et al.	4. 巻 38
2. 論文標題 Long Read Sequencing Resolves a Complex Structural Variant in PRKN Parkinson's Disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Movement Disorders	6. 最初と最後の頁 2249 ~ 2257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mds.29610	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 該当する

1. 著者名 Yokota Mutsumi, Yoshino Yutaro, Hosoi Mitsuko, Hashimoto Ryota, Kakuta Soichiro, Shiga Takahiro, Ishikawa Kei-Ichi, Okano Hideyuki, Hattori Nobutaka, Akamatsu Wado, Koike Masato	4. 巻 11
2. 論文標題 Reduced ER-mitochondrial contact sites and mitochondrial Ca ²⁺ flux in PRKN-mutant patient tyrosine hydroxylase reporter iPSC lines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2023.1171440	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Torii Satoru, Arakawa Satoko, Sato Shigeto, Ishikawa Kei ichi, Taniguchi Daisuke, Sakurai Hajime Tajima, Honda Shinya, Hiraoka Yuuichi, Ono Masaya, Akamatsu Wado, Hattori Nobutaka, Shimizu Shigeomi	4. 巻 15
2. 論文標題 Involvement of casein kinase 1 epsilon/delta (Csnk1e/d) in the pathogenesis of familial Parkinson's disease caused by CHCHD2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/emmm.202317451	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Nakamura Ryota, Nonaka Risa, Oyama Genko, Jo Takayuki, Kamo Hikaru, Nuermaimaiti Maierdangiang, Akamatsu Wado, Ishikawa Kei-ichi, Hattori Nobutaka	4. 巻 17
2. 論文標題 A defined method for differentiating human iPSCs into midbrain dopaminergic progenitors that safely restore motor deficits in Parkinson's disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2023.1202027	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ukaji Takao, Takahashi-Shibata Mikako, Arai Daisuke, Tsutsumi Harumi, Tajima Shori, Akamatsu Wado, Matsumoto Fumihiko, Ikeda Katsuhisa, Usami Shin-ichi, Kamiya Kazusaku	4. 巻 69
2. 論文標題 Generation and characterization of a human iPSC line (JUFMD0i007-A) from a patient with Usher syndrome due to mutation in USH2A	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 103100 ~ 103100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2023.103100	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔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
研究分担者	清田 純 (SEITA JUN) (40793790)	国立研究開発法人理化学研究所・情報統合本部・チームリーダー (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	太田 禎生 (OTA SADA0) (70731214)	東京大学・先端科学技術研究センター・准教授 (12601)	
研究分担者	石川 景一 (Ishikawa Kei-ichi) (90733973)	順天堂大学・大学院医学研究科・准教授 (32620)	

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