

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：31303

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15344

研究課題名（和文）単一軸索伝導速度計測と軸索形態の機械学習に基づいたミエリン機能障害評価法の開発

研究課題名（英文）Development of a myelin dysfunction assessment method based on single axon conduction velocimetry and machine learning of axon morphology.

研究代表者

柴田 実可子 (Shibata, Mikako)

東北工業大学・工学部・研究員

研究者番号：40887056

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：MEA上に培養した感覚ニューロンに陰性化合物と抗がん剤を暴露した後の免疫染色画像、インピーダンス値の変化を計測した。本成果より、インピーダンス値の変化に着目することで形態学的変化が起きる濃度より低濃度で末梢神経障害を検出可能であった。次に添加24時間後の染色画像の機械学習を用いて、より低用量での差異を検出可能なAIを作成した。作成したAIは未学習データにおいても、陰性化合物を陰性と判定し、Vincristineを陽性と判定した。さらに、ミエリン障害陽性化合物であるSuraminの毒性を10 $\mu$ Mから検出した。作成したAIはこれまで検出が出来なかった用量での薬剤性ミエリン障害の予測が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したMEAを用いたインピーダンス計測による末梢神経障害の検出法および、染色画像の機械学習を用いた薬剤性ミエリン障害の予測法は、いずれも先行研究で報告されている毒性濃度や形態変化が認められる濃度と比較して、低濃度で早期に障害を予測できる評価系であり、創薬開発の探索段階におけるスクリーニングにおいて有効なin vitro試験として期待できる。

研究成果の概要（英文）：Immunostained images and changes in impedance values were measured after exposure of sensory neurons cultured on MEA to negative compounds and anticancer agents. The results showed that by focusing on changes in impedance values, it was possible to detect peripheral neuropathy at concentrations lower than those at which morphological changes occur. Next, an AI that could detect differences at lower doses was created using machine learning of stained images 24 hours after addition. The created AI judged negative compounds as negative and vincristine as positive in the unlearned data. It also detected toxicity of Suramin, a myelin-disrupting positive compound, from 10  $\mu$ M. The AI was able to predict drug-induced myelin damage at previously undetectable doses.

研究分野：農学

キーワード：末梢神経障害 MEA 感覚ニューロン 薬剤性ミエリン障害 抗がん剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤等の化学的療法の副作用として高頻度で発生する、薬剤性のミエリン障害は、末梢神経でミエリンを形成するシュワン細胞の障害により引き起こされる。末梢神経におけるミエリン形成メカニズムは古くから同定されているが、薬剤性のミエリン障害のメカニズムは未解明である。末梢神経のターンオーバーは遅く、化学療法の神経毒性の影響は予測できず、化合物ごとの投与量の基準はない。ミエリン障害を早期に予測できれば、創薬開発の探索段階における化合物の選別、薬剤の有効性、副作用の評価や作用機序、リード化合物におけるリスクの順位付け、リスクを回避する為の化合物の修飾等が可能となり、創薬開発におけるコストと時間の大幅な削減につながることから、末梢神経のミエリン障害検出および評価法の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

薬剤性のミエリン障害は、末梢神経でミエリンを形成するシュワン細胞の障害により引き起こされる化学療法誘発性末梢神経障害 (CIPN) である。抗がん剤等の副作用として高頻度で発生し、感覚異常や運動障害を引き起こす。ミエリンは軸索に沿って伝達される電気信号の速度を増加させる絶縁体として機能しており、障害を受けると軸索伝導速度の低下や、伝導のブロックが起こる。ミエリンにおける毒性検出は、これまでモデル動物を用いた軸索伝導速度の算出 (尾部神経伝導速度計測) や、形態解析 (X 線解析、染色法) による検出が行われてきた。しかしながら、既存の方法は労力を要し、検出感度も低く、ミエリン障害の可能性のある化学物質を大規模にスクリーニングするには現実的な方法ではない。また、末梢神経組織はターンオーバーが遅く発症が遅れるために、化学療法のミエリン障害毒性は予測できず、投与量の基準も確立されていない。本研究では、薬剤性のミエリン障害を *in vitro* で検出する為に、電気計測および軸索形態画像の機械学習を用いた評価手法を検討した。

### 3. 研究の方法

薬剤性のミエリン障害を *in vitro* で検出する為に、電気計測および画像計測を用いた評価手法を検討するために、感覚ニューロンとシュワン細胞を MEA チップ上で培養し、ミエリン障害を及ぼす Bortezomib をはじめとする抗がん剤 4 種類と陰性化合物である Sucrose、DMSO を添加し、24、72、168 時間後の電気活動とインピーダンスおよび細胞形態を計測した。

感覚ニューロンとシュワン細胞を MEA チップ上で培養し、ミエリン障害を及ぼす Suramin と末梢神経障害陽性化合物である Vincristine と陰性化合物である Sucrose、DMSO を添加し、添加後 24 時間後に取得した染色画像を取得した。取得した画像を分割し、画像認識モデルである Inception V1 を用いて、末梢神経障害を予測するモデルを作成した。モデルの学習には陰性化合物として DMSO、Sucrose 10  $\mu$ M、末梢神経毒性陽性化合物として Vincristine 0.003、0.03  $\mu$ M を使用した。モデルの検証には、学習化合物の未学習データと、未学習化合物の Suramin のデータを使用した。毒性判定は陰性化合物の毒性確率の 2SD 範囲を基準とした。

### 4. 研究成果

図 1 に MEA 上に培養した感覚ニューロンに陰性化合物 (DMSO, Sucrose) および抗がん剤を 168 時間暴露した後の免疫染色画像とインピーダンス値の変化を示す。陰性化合物では神経突起が

計測領域の全体を占めるほどに成長し、インピーダンス値も暴露後 168 時間において、すべての電極で約 40 k を維持した。抗がん剤を低濃度で暴露した場合、免疫染色画像から明らかな形態学的変化は観察されなかったが、Bortezomib を除く 3 種類の抗がん剤 (Paclitaxel, Vincristine, Oxaliplatin) でインピーダンス値が減少した。Paclitaxel 1 $\mu$ M と Bortezomib 0.01 $\mu$ M を暴露した場合、免疫染色画像から軸索の断片化が観察された。Vincristine 0.03  $\mu$ M を暴露した場合、神経突起が凝集することで、神経突起間に空洞が形成された。高濃度の抗がん剤を暴露した場合、72 時間以降でインピーダンス値の明らかな減少が観察され、168 時間後にはさらに顕著に減少した。この結果から、MEA で計測したインピーダンス値が抗がん剤に対する感覚ニューロンの形態学的変化と対応しており、さらに、インピーダンス値の変化に着目することで形態学的変化が起きる濃度よりも低濃度で早期に末梢神経障害を検出可能であることが示唆された。

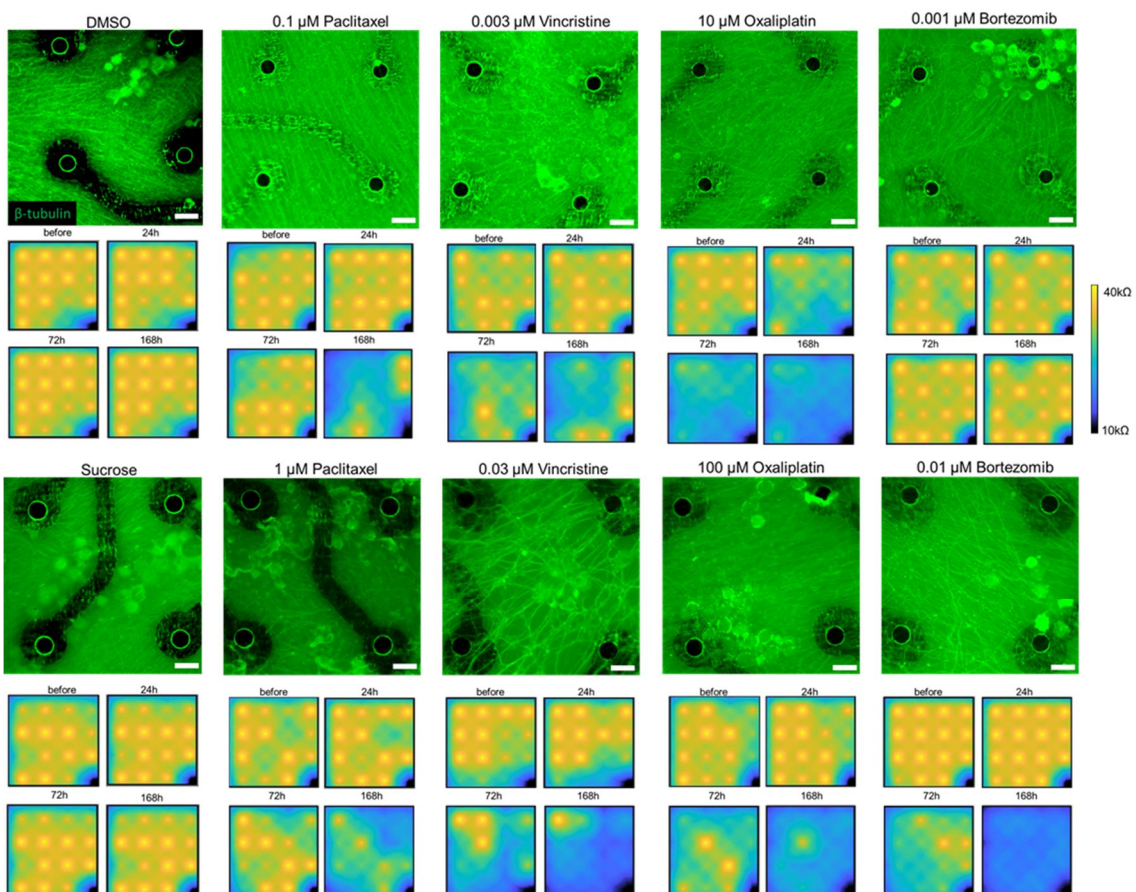


図 1. 培養された感覚ニューロンの 168 時間暴露後の代表的な免疫染色画像、とおよび DMSO、Sucrose、0.1  $\mu$ M および 1  $\mu$ M Paclitaxel、0.003  $\mu$ M および 0.03  $\mu$ M Vincristine、10  $\mu$ M および 100  $\mu$ M Oxaliplatin、0.001  $\mu$ M および 0.01  $\mu$ M Bortezomib の暴露前、24 時間、72 時間、168 時間暴露後のインピーダンスカラーマップ。In immunofluorescence images, green is  $\beta$ -tubulin, and scale bar = 20  $\mu$ m.

次に、添加後 24 時間後に取得した染色画像の機械学習を用いて、より低用量での差異が検出可能な AI を作成した。作成した AI は未学習データにおいても、陰性化合物である DMSO と Sucrose を陰性と判定し、Vincristine を陽性と判定した。さらに、ミエリン障害陽性化合物である Suramin の毒性を 10  $\mu$ M から検出した。先行研究で報告されている Suramin の毒性濃度は 200  $\mu$ M であるため、作成した AI はこれまで検出が出来なかった用量での薬剤性ミエリン障害の予測

が可能であることが分かった。

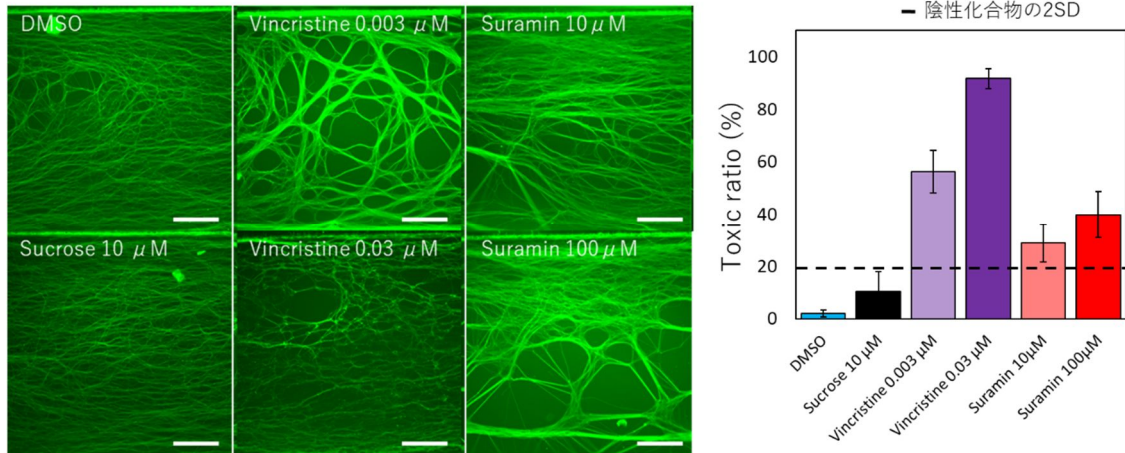


図 2. 培養された感覚ニューロンの 24 時間曝露後の代表的な免疫染色画像と、AI が予測した未学習データの毒性確率。scale bar = 50 μm.

本研究で開発した MEA を用いたインピーダンス計測による末梢神経障害の検出法および、染色画像の機械学習を用いた薬剤性ミエリン障害の予測法は、いずれも先行研究で報告されている毒性濃度や形態変化が認められる濃度と比較して、低濃度で早期に障害を予測できる評価系であり、創薬開発の探索段階におけるスクリーニングにおいて有効な *in vitro* 試験として期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoki Matsuda, Mikako Shibata, Xiaobo Han, Ikuro Suzuki.
2. 発表標題 Development of a method for predicting pain and mechanism of action of compounds based on firing of single DRG neuron.
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Mikako Shibata, Ikuro Suzuki.
2. 発表標題 Development of the prediction method of peripheral neuropathy based on firing pattern of each single neuron.
3. 学会等名 Safety Pharmacology Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田直毅, 韓笑波, 柴田実可子, 永福菜美, 石橋勇人, 鈴木郁郎
2. 発表標題 高時空間分解能を有する電気イメージングによる化合物の神経応答
3. 学会等名 第13回スクリーニング学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 韓笑波, 柴田実可子, 松田直毅, 鈴木郁郎
2. 発表標題 In vitro assessment of drug-induced peripheral pain in DRG neurons at single cell level using CMOS-MEA
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田直毅, 韓笑波, 柴田実可子, 鈴木郁郎
2. 発表標題 Development of assessment for peripheral neuropathy of compounds based on firing of single DRG neuron
3. 学会等名 日本安全性薬理研究会第14回学術年会
4. 発表年 2023年

〔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