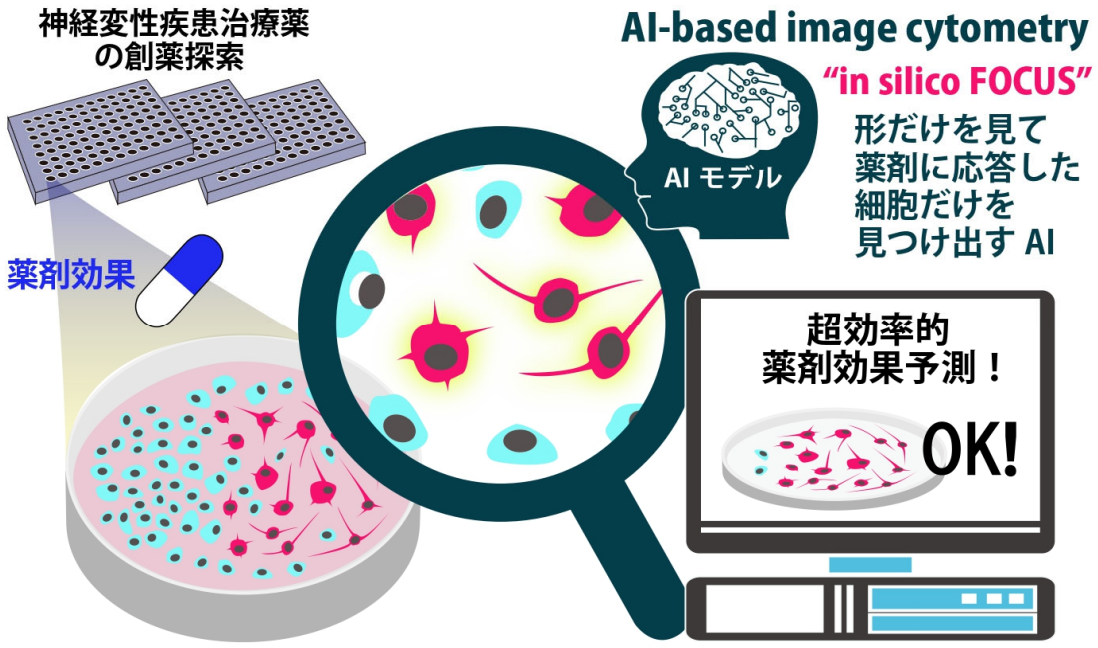


「細胞の形」から治療薬を超効率的に予測

～AI 判定によって高度に選別する解析技術開発に成功～

国立大学法人東海国立大学機構　名古屋大学大学院創薬科学研究科の加藤　竜司准教授、蟹江　慧　助教、日本学術振興会の今井　祐太　特別研究員（DC2）（名古屋大学大学院博士後期課程学生（研究当時））、名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学の勝野　雅央　教授、飯田　円　助教のグループは、神経変性疾患[注1)]のひとつである球脊髄性筋萎縮症（SBMA）[注2)]の治療薬探索を目的とした創薬探索技術として、「細胞の形[注3)]」の情報のみから薬剤の治療効果を予測する細胞画像解析技術[注4)]の開発に成功しました。

本研究では、モデル神経細胞[注5)]が治療薬に応答する「細胞の形」に注目し、細胞集団の中から「薬剤に応答して形を変えた細胞」だけを人工知能（AI）判定によって高度に選別する解析技術『in silico FOCUS：インシリコ・フォーカス[注6)]』を開発しました。この技術を用いることで、通常では見分けることができなかった「治療薬の効果（病気のモデル細胞の形が健常な形に近づく変化）」を高感度かつ安定に評価できるようになり、煩雑な破壊的実験を行わずに治療効果を高精度で予測できることが分かりました。この成果から、SBMA モデル細胞に対する薬剤投与後の画像だけで新薬開発を加速できる可能性が示唆され、これまで効率的探索の難しかった疾患治療薬の探索に広く応用が期待されます。

本研究成果は、2022 年 6 月 16 日付ネイチャー・リサーチ社のオンライン学術雑誌「Scientific Reports」に掲載されました。

本研究は、2019 年度名古屋大学 NU 部局横断イノベーション創出プロジェクト等の支援のもとで行われたものです。

【ポイント】

・SBMA 治療薬を探索するには、神経細胞モデルを用いた効率的・定量的なスクリーニング技術[注 7)]が必要だが、神経細胞モデルを用いた従来の薬効評価法は煩雑で時間がかかり、効率的な大量スクリーニングは困難だった。
・本研究では、SBMA 細胞モデルが薬剤に応答して形が変わる現象に注目し、細胞の顕微鏡画像における薬剤応答情報（細胞の形の変化）だけを用いて、SBMA の治療薬効果を予測する技術開発に成功した。
・本解析技術は、ラベルフリー[注 8)]の非侵襲的評価技術なため、マーカーが同定されていない細胞、病態が未解明な細胞、染色ができない治療用細胞などの薬剤評価や品質評価が可能である。
・本解析技術は、画像撮影だけで薬効予測が可能なため、通常数十万細胞を用いて数時間かかっていた薬効解析評価を、その 100 分の 1 程度の細胞数でわずか数分以内に短縮が可能な超効率的なスクリーニング技術である。
・解析技術の中核となる『in silico FOCUS』は、「薬剤に応じて形が変化した細胞」だけを自動判定する AI モデルによって、少数の細胞が示す薬剤応答を高感度に検出し、安定な評価データとして出力する全く新しいラベルフリーイメージサイトメトリー技術である。
・『in silico FOCUS』から得られる情報で学習した治療効果の予測 AI モデルは、病気モデル細胞が薬剤で回復する状態を、画像のみから 100%の精度で判別する性能を示した。

【研究背景と内容】

球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は、運動ニューロンと骨格筋の変性・脱落により筋力低下や筋萎縮が進行する遺伝性の難病です。症状が進行すると呼吸不全等により致命的になりますが、症状を改善する根本的な治療法は見出されていません。勝野教授らの研究により、2017 年に抗アンドロゲン療法[注 9)]の治療薬としてリュープロレリン酢酸塩[注 10)]が承認されましたが、性機能抑制や骨格筋のタンパク同化作用[注 11)]抑制などの副作用があり、さらなる病態メカニズムの解明と新たな治療薬候補の探索が望まれていました。

創薬において新しい治療薬候補を探すには、治療薬の効果を検証できる実験評価方法と、多数の分子候補を迅速かつ効率的に網羅探索できる工学技術との融合によるスクリーニング技術の確立が重要です。

従来、病気のモデル細胞を用いた薬剤スクリーニング技術としては、蛍光細胞染色によるハイコンテントアナリシス（HCA）[注 12)]が多くの製薬企業で導入されて来ていました。しかし、細胞を蛍光染色する侵襲的評価では特定の時期の効果しか評価できないことや、染色対象となる分子が特定される必要があるため、メカニズムがまだ解明中の病気のモデルには応用できないという限界がありました。近年では非侵襲的な画像の AI 解析事例などが増えてきていますが、ヘテロ性の高い細胞集団では有効な AI を作ることが極めて難しいことが課題でした。

本研究チームでは、勝野教授らの医学系グループの開発した病気のモデル神経細胞を用いた薬剤評価法と、加藤准教授らの工学系グループの開発した細胞画像解析・人工知能（AI）技術の分野融合技術開発によって、1 細胞レベルの薬剤応答変化を定量化し、高感度に薬剤効果検出する AI によるイメージサイトメトリー技術『in silico FOCUS：インシリコ・フォーカス』の開発を実現しました。

【研究成果】

神経変性疾患治療薬の創薬探索における細胞を用いた薬剤効果のスクリーニングにおいて、本研究では「細胞の形だけをみて薬剤応答した細胞を見つけ出す AI」によって、高感度・安定的に薬剤効果を評価し、高精度で薬剤効果を予測できる超効率的なスクリーニング技術を開発しました（図 1）。

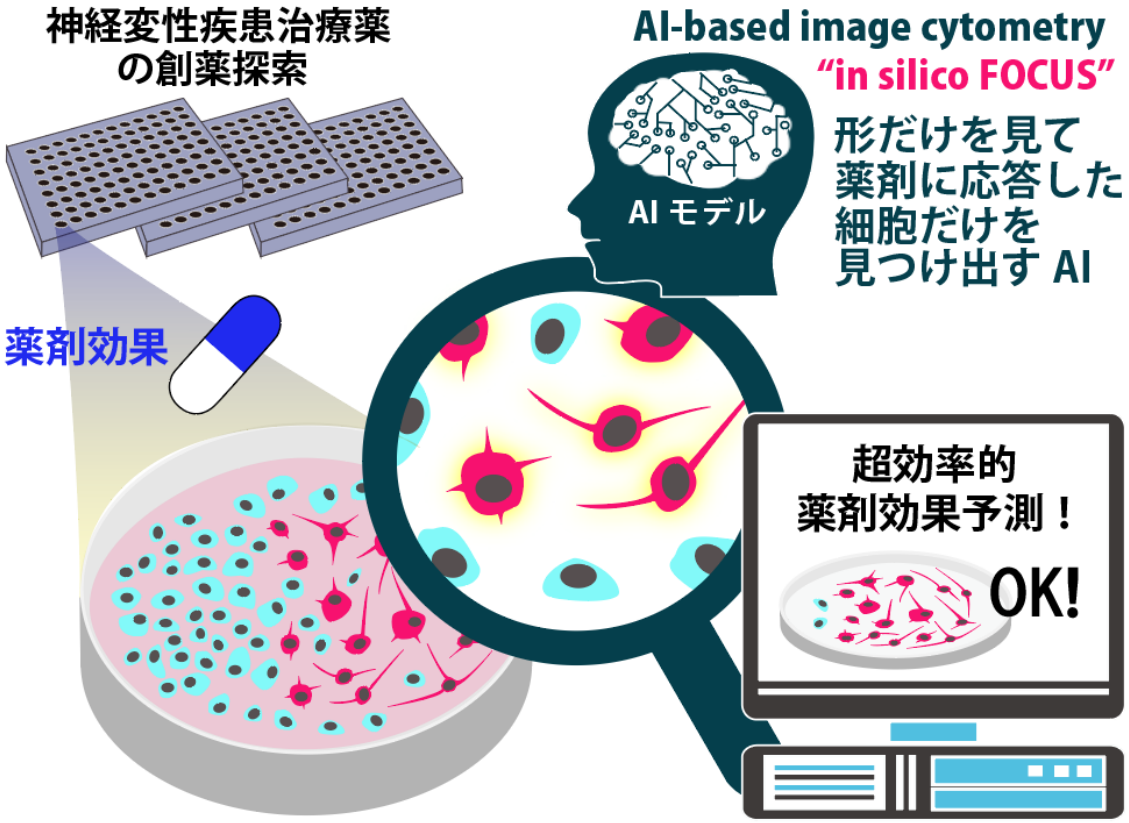


図 1：本研究成果の概要

様々な細胞培養技術によって、近年は薬剤評価を効率的・効果的に行うための細胞モデルが構築されるようになってきました。病気のモデル細胞と呼ばれる細胞は、病気の発症メカニズムの原因となる現象を示す細胞で、生体外で薬の治療効果を判定することで、人体での評価に近い創薬探索を可能にすることが知られています。創薬探索では、何万～何十万種類もの様々な分子の影響を大量かつ網羅的に評価することが求められます。この、大量の候補薬剤の評価と探索をする技術が「スクリーニング技術」と呼ばれ、生物と工学の高度な融合技術で構築されます（図 2）。

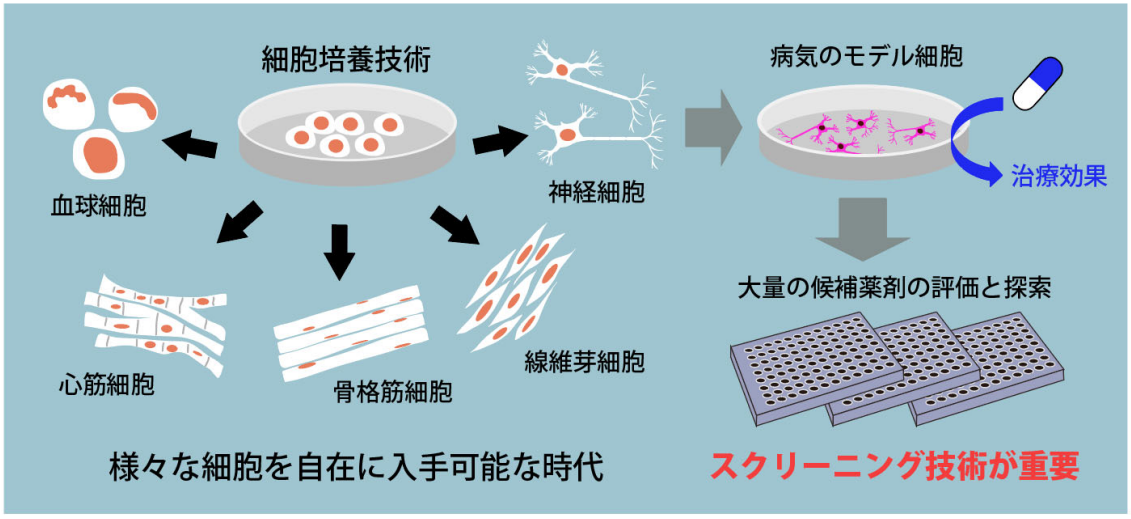


図 2：細胞を用いた創薬スクリーニングの発展

細胞を用いた創薬スクリーニングでは、実際に細胞に薬剤を投与し、その応答を計測・定量した結果を用いて安全性や有効性を評価し、たくさんの薬剤分子の中から、より安全で、より効果的な分子を絞り込んで行きます。

この薬剤評価を効率的に行うパワフルな技術として近年注目されるのが「画像解析」です。細胞の顕微鏡画像の中のわずかな変化を、人間が記憶できないほどの膨大な情報として記録・定量して評価する画像解析を用いた創薬スクリーニングは、High Content Screening（HCS）と呼ばれ、現在の創薬をリードしています。

しかし HCS には、「染色のコストや手間」と「染色対象が特定されていないと利用できない」という大きな制限がありました。細胞や病気はまだ、多くのことが未解明・不明であることが多く、「何を、いつ染色すべきか」が分かりません。このため、HCS に利用できる細胞や、検証できる疾患には限界がありました。

しかし一方で、染色をしないと、細胞の画像解析は技術的にとても難しくなります。白黒でしか表現されない細胞画像は、コンピュータには「どこが細胞か」を理解することがとても難しいのです。さらに、扱う細胞の均質性が低いとき、白黒の画像に現れる細胞の挙動の変化はとてもわずかになってしまい、検出が難しいという課題がありました（図 3）。

本研究で対象とする疾患は、神経変性疾患のひとつである球脊髄性筋萎縮症（SBMA）で、病態にはまだ不明なところが多く、そのモデル細胞の評価を簡単に染色で求めることが難しい細胞でした。また、神経細胞は均一性の維持が難しく[注 13)]、薬剤に応答してくれる細胞は、全体集団の一部しかないという難しさがありました。

そこで本研究は、AI 技術を応用して「薬剤に応答した一部の細胞だけを計測する」解析技術『in silico FOCUS：インシリコ・フォーカス』を開発しました。（図 3）

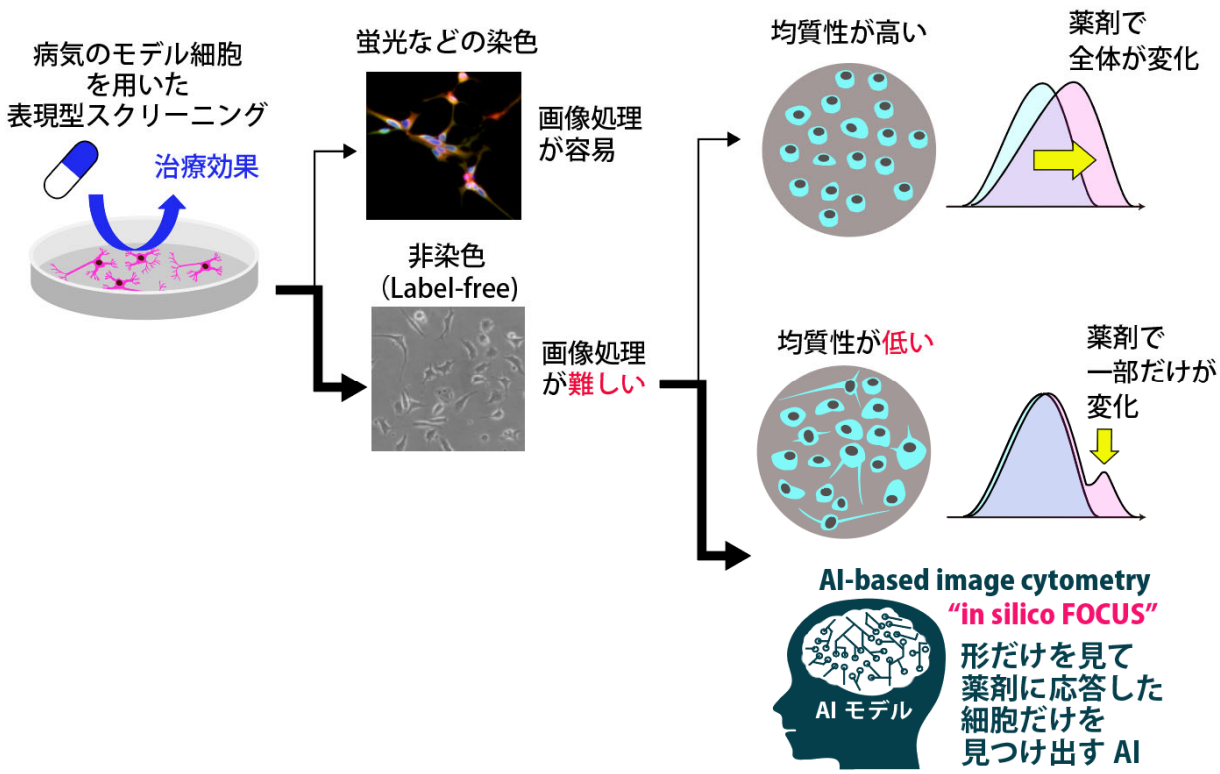


図 3：本研究で開発した『in silico FOCUS』が解決する細胞を用いた表現型スクリーニング技術の課題

本研究で開発した「ラベルフリーの細胞画像解析を用いた薬剤スクリーニング技術」は、図 4 に示すような解析ステップで構築されています。第一に、薬剤なしの細胞集団の「形の特徴」を AI に学習させます。形の特徴の数値化には、細胞の染色を必要としないため、煩雑な実験なしに生きたままの細胞の画像撮影をするだけで AI とトレーニングすることができます。その後、AI に「薬剤なしの集団」と比較して「あまりにも変化が大きい細胞」を判定させます。これが『薬剤応答細胞』です。この判定結果より、コンピュータの中には、画像の中にたとえ 1 万細胞いても、その中の「薬剤に応答した細胞の情報だけ」が濃縮して蓄積されます。この結果、薬剤応答を高感度・安定に評価することができるようになるのです。この技術は、コンピュータ内で（in silico）、特定の細胞に「焦点を合わせる」技術のため、『in silico FOCUS (in silico analysis of featured-objects concentrated by anomaly discrimination from unit space）』と名付けられました（図 4）。

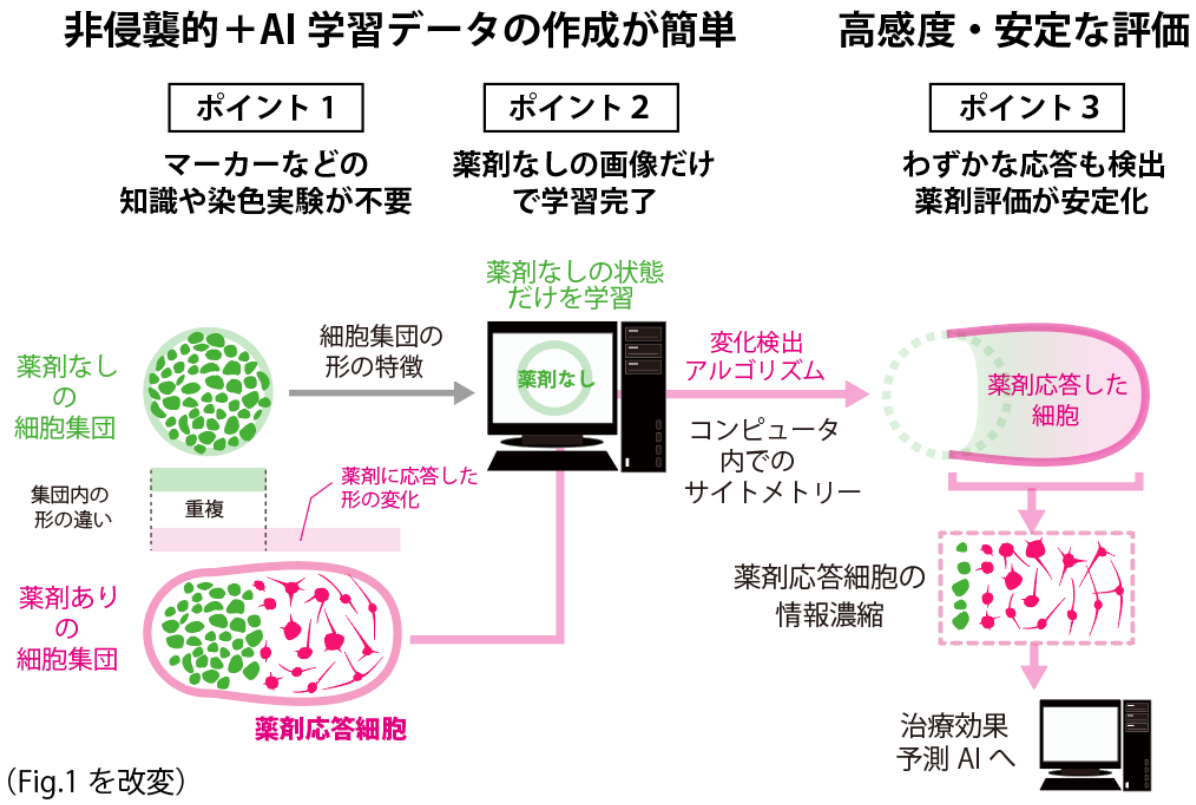


図 4：『in silico FOCUS』技術の概要

この解析技術を使うと、SBMA のモデル細胞 NSC34 の「健常モデル細胞（24Q）」と「病気モデル細胞（97Q）」は、目視でははっきり違いが分からず、単純な形態計測データの比較だけではクラスタリングでも分類ができませんでしたが、『in silico FOCUS』を使った解析を行うことで、2 つの異なる細胞として明確に、かつ、何回行っても（安定に）見分けられることが分かりました（図 5）。

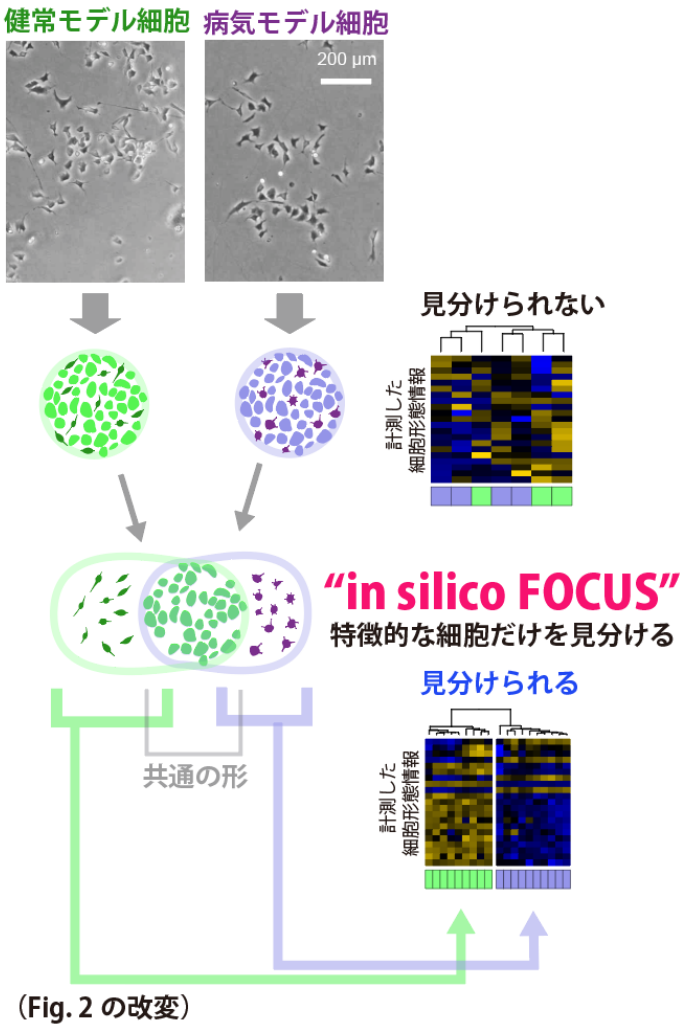
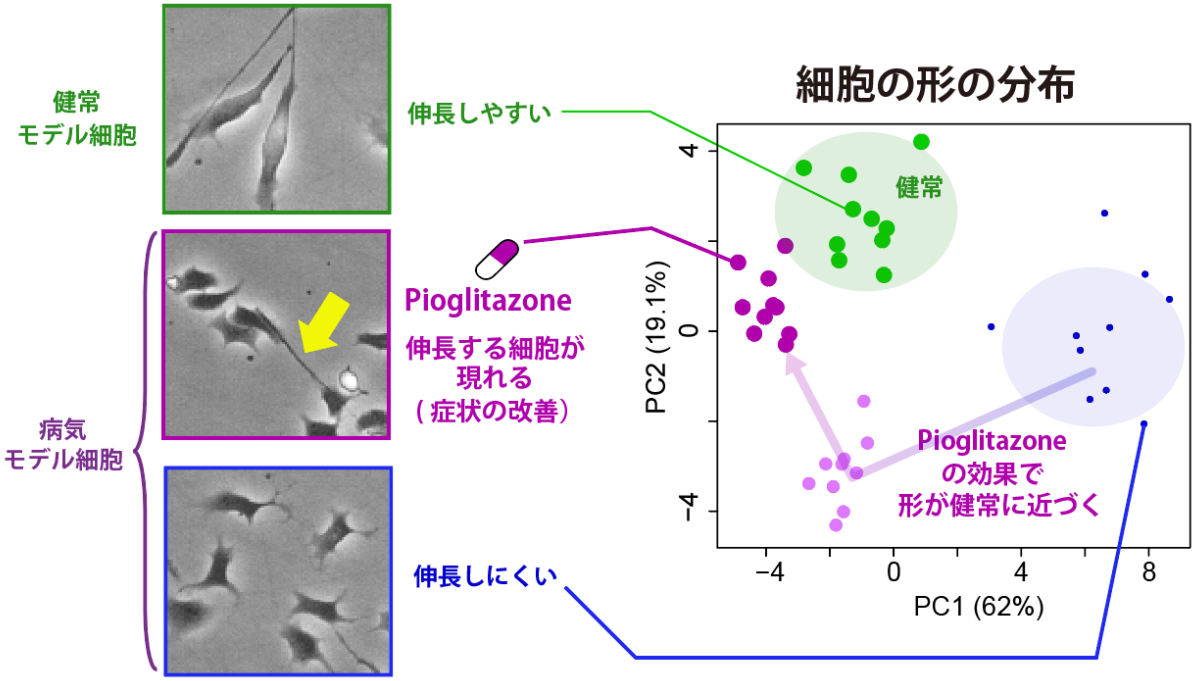


図 5：『in silico FOCUS』を用いた細胞判別例

この開発技術の妥当性を確認するため、①神経モデル細胞を用いた評価系のポジティブコントロールであるデヒドロテストステロン（DHT）による健常細胞の応答を確認したところ、破壊的試験で確認されていた健常モデル細胞の薬剤応答と相関する形態変化を確認することができました。

また、勝野教授、飯田助教らが発見してきた疾患機構の改善薬剤候補分子 Pioglitazone の効果（テストステロンと共に投与することにより症状が改善する効果）を、形態変化（病気モデル細胞の形状が健常モデル細胞に近づく変化）として評価できることが証明されました（図 6）。



（Fig. 5 の改変）

図 6：Pioglitazone の効果による細胞形態評価の例（病気モデル細胞の形態が健常モデル細胞に近づくことを表現できた）

さらに、この形態変化を学習させた AI モデルは、DHT による健常モデル細胞の活性化も、Pioglitazone による病気モデル細胞の改善も、100%の精度で画像から予測するできることが分かりました。

以上の結果から、本開発技術は従来の煩雑な実験と同等に、SBMA の神経モデル細胞の細胞の形の情報だけで、薬剤による症状回復を高精度に予測でき、今後 SBMA 治療薬候補を効率的に探索できる新技術を開発できたと言えます。

【今後の展開】

本研究では、『in silico FOCUS』が SBMA 治療薬候補をより広く探索し、治療メカニズムの解明を加速できる可能性が示唆されました。

このため、今後は『in silico FOCUS』を用いたさらなる新薬剤候補分子の探索を進めることが期待され、現在すでに本研究グループや製薬会社と共にこの探索に挑戦しつつあります。

また、本研究で開発された『in silico FOCUS』は、ラベルフリーな非侵襲的評価技術なため、マーカーが同定されていない細胞、病態が未解明な細胞、染色ができない治療用細胞などの薬剤評価や品質評価が可能です。本技術は、さらに他のこれまで薬剤探索や評価が難しかった疾患や細胞に、展開を広げていくことが期待されます。特に、「細胞異常」を規定することが難しい再生医療等製品の品質管理などにも応用されることが期待され、加藤准教授らの研究グループはすでにいくつかの企業と、細胞製造製品の品質管理にこの技術を応用しつつあります。

【成果の意義】

本研究の成果である『in silico FOCUS』は、従来の実験技術では効率的な薬剤スクリーニングが難しかった SBMA 治療薬の探索を、大きく加速することができる技術開発だと言えます。通常数十万細胞を用いて数時間かかっていた薬効解析評価を、その 100 分の 1 程度の細胞数でわずか数分以内に短縮が可能であり、創薬探索効率が大幅に向上することが期待されます。

『in silico FOCUS』は、ラベルフリーの非侵襲的評価技術なため、マーカーが同定されていない細胞、病態が未解明な細胞、染色ができない治療用細胞などの薬剤評価や品質評価が可能です。このため、他のこれまで薬剤探索や評価が難しかった疾患や細胞に、展開を広げていくことが期待されます。特に、「細胞異常」を規定することが難しい再生医療等製品の品質管理などにも応用されることが期待されます。

【用語説明】

注 1）神経変性疾患：

特定の種類の神経細胞の進行性に障害が起きる病気の総称。神経細胞の中や周囲に異常なタンパク質が蓄積しており、それにより細胞が弱って死んでいく。

注 2）球脊髄性筋萎縮症（SBMA）：

SBMA は Spinal and Bulbar Muscular Atrophy の略。成人に発症する遺伝性の神経変性疾患で、男性のみが発症し、全身の筋力低下や食べ物の飲み込みにくさ、しゃべりにくさ等の症状が現れ、徐々に進行する。

※SBMA の病態メカニズム：

SBMA を引き起こす原因分子の 1 つとして、アンドロゲンホルモンであるテストステロンなどの受容体である「アンドロゲン受容体（AR）」タンパク質における、ポリグルタミンという異常な構造の影響が知られている。この異常をもつアンドロゲン受容体は、本来正常な刺激となるべき男性ホルモンと結合し、細胞核の中に蓄積してしまうことで、神経や骨格筋における細胞死を引き起こしてしまう。SBMA の病態における AR の影響は、勝野教授の研究グループが解明してきた SBMA の重要な機構の 1 つで、まだ全てが明らかになっていない。このため、神経細胞側や筋肉細胞側にもまだ病気の原因となる機構があるのではないかと考えられており、新しい分子機構の解明や、SBMA の症状を治療する新しい医薬品分子の探索にはまだ挑戦が必要。

注 3）細胞の形：

培養された細胞は、細胞の自身の品質や活性に応じて形を変化することが知られており、細胞培養の教科書などにおいても「細胞状態を現す重要な特徴」であるとされている。また、細胞は周囲の影響（薬剤投与の影響）に対しても敏感に形を変化させることが知られている。本研究で用いられた神経モデル細胞も、健康な状態であれば多様な形態をとることが知られている。具体的には、神経細胞として細く長く伸びる

ような形態や、複数の突起状の伸展を見せる。多くの場合、これらの細胞形態の変化は、人間は雰囲気として感じることができるため、細胞培養や薬剤応答評価における重要な「目印」として経験的に活用されている。
しかし、細胞は不定形なアメーバ状の形態をしており、その成長と分裂と共に、伸展の度合いやタイプも千変万化に変化する。このため、人が目で見て気づく形態変化があったとしても、これを数値的に定義することは困難で、コンピュータに形態のルールを学習させるためには、高度な解析技術が必要とされる。

注 4）細胞画像解析技術：
　細胞の顕微鏡写真をコンピュータ処理によって処理し、画像中の細胞の形状や変化を定量的に定量化する解析技術。加藤准教授らは、細胞の位相差顕微鏡画像の画像処理およびデータ解析によって、細胞の形の情報を網羅的に計測・分析し、細胞品質や薬剤応答予測する技術をこれまで開発してきた。加藤准教授らの細胞画像解析技術の特徴は、ラベルフリーの細胞画像を用いて「細胞の形を定量化する技術」な点であり、非破壊的に生きたままの細胞を評価し続けることができる技術なため、蛍光などの染色細胞画像を用いた画像解析技術よりも安定な解析が難しいとされる分野の解析である。

注 5）モデル神経細胞：
　SBMA の病態メカニズム（AR がテストステロンの投与によって細胞内に集積し、毒性を示してしまう現象）を模倣した神経細胞（AR-24Q：健常モデル細胞と AR-97Q：疾患モデル細胞）。健常モデル細胞は、AR におけるポリグルタミンの繰り返しが正常細胞と同じであり、テストステロンを投与しても、細胞死が生じない。疾患モデル細胞は、AR におけるポリグルタミンの繰り返しを人為的に増幅してあり、テストステロンを投与すると細胞死が生じる。さらに、勝野教授、飯田助教らが発見してきた疾患機構の改善分子 Pioglitazone をテストステロンと共に投与すると、応答が正常細胞に近づくことが証明されている。

注 6）in silico FOCUS（インシリコ・フォーカス）
　in silico analysis of featured-objects concentrated by anomaly discrimination from unit space の略称。「in silico」は「コンピュータ内で」を示すバイオインフォマティクスの用語。この解析法は、コンピュータ内で「薬剤に応答して形を変えた細胞」だけをメモリ内で選別・濃縮し、「他の形態変化した細胞」の情報を捨てる、という細胞形態変化度の自動判定 AI アルゴリズムによるイメージサイトメトリー技術（＝画像情報を用いて 1 細胞ずつを計測・選抜する技術）。この技術では、「通常の状態で生じる形態変化」という状態を AI に学習させることで、「薬剤応答で生じた特殊な形態変化」を自動的に判定し、メモリ内で「形態変化細胞を濃縮したデータ」を蓄積することが可能になる。この結果、わずかな変化を高度に検出し、偶発的な変化に惑わされることがなく安定に、薬剤応答を定量的に解析できるようになった。

注 7）スクリーニング技術：

スクリーニング（Screening）とは、種々の評価法を用いて薬剤候補となり得る複数種類の分子を評価し、候補分子群（化合物やタンパク質のライブラリ）の中から、新規医薬品として有効な候補分子を選抜する作業。スクリーニングでは、大量の分子候補との評価を実現するために、作業効率やコスト削減が重要な開発ポイントとなる。

本研究で開発されたスクリーニング技術は、「表現型スクリーニング」と呼ばれ、候補分子を直接細胞に投与してみることで生じる「細胞応答」を計測・定量化して、薬剤候補となり得る分子を選び出す技術である。近年では、細胞培養や遺伝子編集技術が発展したため、様々な病気のモデル（病気と同じような応答を起こす）細胞が作られるようになり、表現型スクリーニングは大きな注目を集めている。表現型スクリーニングは、「どうなるか分からないが、実際に薬を投与した応答をみてみよう」というコンセプトで評価が行われるため、分子機構や病態の理解が不十分な病気や細胞であっても、スクリーニング系の構築に挑戦しやすい利点がある。しかし、一方で「応答は見られたが、それが何を意味したかが分かりにくい」という欠点もあり、よく検証された細胞モデルでなければ適応が難しい現実がある。本研究は、勝野教授らが開発した SBMA の神経細胞モデルの評価系が確立していたことが成功の要因。

注 8）ラベルフリー：

細胞が染色されていない状態。細胞を可視化して評価するには、細胞を殺してから蛍光分子などで標識・染色して撮影する方法（ラベル化された画像での評価）と、細胞を殺さずに生かしたまま非染色で撮影する方法（ラベルフリー画像を用いた評価）との 2 種類がある。前者は、細胞の注目したい部分を染めるため、画像中の「目的エリア」がはっきりし、細胞の認識や計測を行う画像処理が行いやすい利点があるが、染色コストが高く、死んだ細胞の状態しか評価できないという欠点がある。後者は、細胞を生かしたまま撮影できるため、ライブ観察や経時変化の情報を取得することができる利点があるが、画像内に情報が少なく、画像中の細胞認識や計測処理が極めて難しいという欠点がある。画像処理の容易さから、染色画像による死細胞の画像解析技術は創薬スクリーニング技術としても多数報告事例があるが、ラベルフリーの細胞画像の創薬スクリーニング技術はまだほとんど報告事例がない。

注 9）抗アンドロゲン療法：

SBMA の原因の 1 つである異常型 AR の細胞内蓄積を、男性ホルモン（テストステロン）の分泌を抑制することで止めようとする治療法。勝野教授、飯田助教らは、この治療法の開発を長年進めており、リュープリン SR を用いた医師主導治験などを実施し、有効性を示してきた。

注 10）リュープロレリン酢酸塩：

黄体形成ホルモン刺激ホルモンアナログ。テストステロンの分泌を抑制する。

注 11）骨格筋のタンパク同化作用：
　タンパク質の吸収を促進して、筋肉の成長を促すこと。

注 12）ハイコンテントアナリシス（HCA）：
　High content analysis（HCA）は、バイオから得られる大量の情報量（High content）を用いて包括的・統合的に生命現象を解析しようとする技術であり、ゲノムやプロテオーム、画像などの網羅的計測データを扱う。特に画像は、1 細胞内の細胞内小器官の発現や局在まで数値化できる性能を有しており、1 枚の画像から大量の情報を得ることや、さらに経時的に大量情報を連結して扱うことができる効率的なバイオデータの取得モダリティとして知られる。特に蛍光で細胞や細胞内小器官などを染色した画像の解析から創薬探索を行う技術は、High content screening（HCS）と呼ばれ創薬の現場の網羅的薬剤候補分子探索にも広く用いられている。しかし一方で、HCS の多くは「蛍光染色」を必要とするため、蛍光標識分子や標識対象が定まっていない現象に応用できないことや、非侵襲的に細胞応答を観察できないという課題もある。

注 13）神経細胞の均一性の維持が難しい：
　多くの細胞は、多様であり均質性は高くない。がん細胞や不死化されたような特殊な細胞は、培養容器の中に存在する多数の細胞集団が、形や性質が類似し、均質性が高いことが知られている。しかし一方で、神経細胞の多くは非常に多様性に富んでおり、同じ細胞集団の中にも様々な亜集団が存在することが知られている。このため、神経細胞において、薬剤に応答しやすい細胞は全集団中の一部であることが多く、その応答をデータ化するためには、大量の細胞をまとめて評価するか、毎回一部の亜集団を分離装置によって選抜するなどの煩雑な実験が必要とされてしまう。本研究で用いた神経モデル細胞は、大量細胞を破砕して遺伝子やタンパク質を計測すると薬剤応答が計測できるが、少量の細胞で多種類の薬剤を網羅的に評価することは難しいという実験的課題があった。また、細胞の不均一性の問題から、画像解析によって多数の細胞を計測したとしても、「反応した細胞」と「反応していない細胞」が混じってしまい、明確な結果が得にくいという実験安定性の課題もあった。さらにラベルフリー（非染色）での評価は、「反応した細胞」を定義できない（＝どのような反応を薬剤応答と理解してよいかわからない）ことから、生きたままの細胞評価は極めて困難であると考えられていた。

【論文情報】

雑誌名：Scientific Reports
論文タイトル：
Label-free morphological sub-population cytometry for sensitive phenotypic screening of heterogenous neural disease model cells
著者：
Yuta Imai[1], Madoka Iida[2], Kei Kanie[1], Masahisa Katsuno[2,3,4,5], Ryuji Kato[1,3,5,]*

[1]Department of Basic Medicinal Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya University, Tokai National Higher Education and Research System, Furocho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan
[2]Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Tokai National Higher Education and Research System, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan
[3]Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University, Tokai National Higher Education and Research System, Furocho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan
[4]Department of Clinical Research Education, Nagoya University Graduate School of Medicine, Tokai National Higher Education and Research System, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan
[5]Institute of Glyco-core Research (IGCORE), Nagoya University, Tokai National Higher Education and Research System, Furocho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan

DOI：10.1038/s41598-022-12250-0
URL：https://www.nature.com/articles/s41598-022-12250-0