

「脊髄性筋萎縮症における新医療技術開発のための数理モデルの構築」

姫路獨協大学医療保健学部臨床工学科

八木 直美

1 研究の背景と目的

近年、生物医学などヒトの健康に関わる研究分野では、ビッグデータの研究にヘルスケアの未来がかかっているとされている。生物医学分野のデータマイニングには、生命現象に基づいてデータを整理、解析することが重要となる。生物医学ビッグデータはサンプル自身が高次元の特徴を持ち、高次元データを重ね合わせ、参照して学習しなければならない。また、生物医学データの取得は非常に特異的で、コストも高額である。それゆえに、生命システムや自然界の法則性を応用することが必要であり、合理的に見通すための仮説とモデルを構築し、その解釈と再現性が必要となる。そこで本研究では、工学的な定量性と再現性に基づいて、エビデンスベースの生物医学ビッグデータ解析を行い、脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA, 指定難病 3) [1]のみならず運動ニューロン疾患のための病態解明と病態に即した診断法、治療法への手法を開発することを目的とする。

2 研究方法・研究内容

SMAの原因遺伝子は、SMN1(survival motor neuron1)遺伝子である。SMN 遺伝子の近傍には、SMN 遺伝子と 5 塩基対のみが異なっている遺伝子が存在しており、SMN 遺伝子は SMN1 遺伝子、近傍の遺伝子は SMN2 遺伝子と名づけられている。SMA では、この SMN1 遺伝子が欠失・変異することで、SMN1 遺伝子による全長 SMN タンパク質の産生がなくなり、SMN2 遺伝子による不完全な SMN タンパク質が産生される。これにより、主に運動神経と骨格筋に関連した症状があらわれる。しかしながら、SMN1 遺伝子がコードする SMN タンパク質は全身で発現しているが、なぜ運動神経と骨格筋の局所にのみ重篤な症状が現れるのかという発症機構は解明されていない。そこで本研究では、ヒト神経芽腫細胞株を用いて SMN をノックダウンした SMN 神経モデルを作成し、ビッグデータ解析、人工知能等を用いて数理モデルを構築することによって、SMN 遺伝子の神経細胞の特異的な情報伝達機構を明らかにし、新しい医療技術開発へ進める (図 1)。

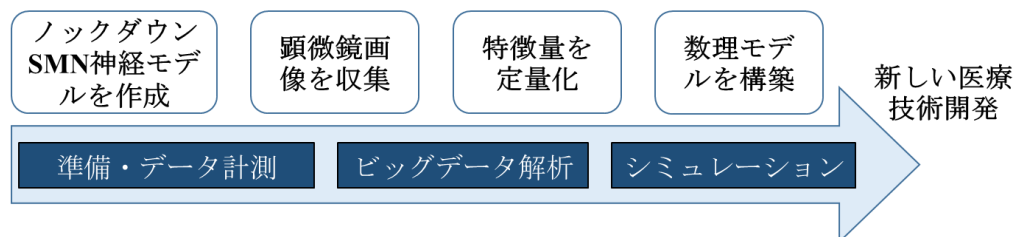


図1 研究実施計画の概要

方法1: SMN遺伝子をノックダウンしたSMN神経モデルを作成する

ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-BE(2)c にレンチウイルスを介して SMN 遺伝子 1,2 に共通する 3'非翻訳領域の配列を標的として shRNA[Sigma-Aldrich]を導入し、2 μ g/ml puromycin 存在下でクローンを選択した (SMN ノックダウン型細胞)。コントロール細胞は空ベクターを導入して、同様に 2 μ g/ml puromycin 存在下でクローンを選択した。次に、SMN ノックダウン型およびコントロール型のヒト神経芽腫細胞株 SK-N-BE(2)c を用いて 8%FCS/DMEMHam'sF12 で増殖後、ウェスタンブロッティングでタンパク質の発現を確認した (図 2)。さらに、5 μ M オールトランス型レチノイン酸を添加して 3 日間培養し、神経様細胞に分化誘導して細胞形態への影響を解析した。

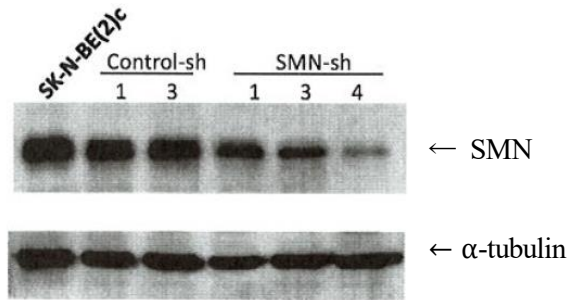
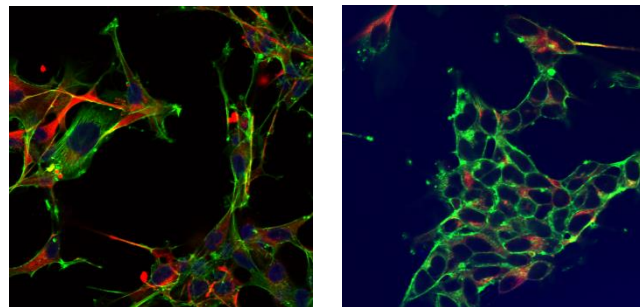


図2 ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-BE(2)c

抗 SMN 抗体、抗 α -tubulin 抗体、Phalloidin-Alexa488、Hoechst33342、Mitotracker 等により、ウエスタンブロット法と蛍光免疫染色を実施する。蛍光染色像の観察および画像撮影には、姫路獨協大学薬学部に設置されたレーザー共焦点顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss 社) を使用する (図 3)。レーザー光を対物レンズに通して試料上の焦点に当てて蛍光を発生させる。焦点前後で生じた蛍光フレアをピンホールで除き、焦点での発光だけをフォトマルで検出するため、試料を走査して微細構造の分かる明解な蛍光画像を得る (図 4)。SMN 正常神経モデルと SMN ノックダウン神経モデルを比較すると、突起数と突起の伸長の様子に大きな相違があることを確認できる。このようにデータ初見は取得済みであり、本研究ではサンプルサイズに基づいた正常神経モデルと SMN ノックダウン神経モデルを作成する (購入：細胞培養 (培地)、分化誘導試薬等)。



図3 レーザー共焦点顕微鏡 LSM510



(a) 正常神経モデル (突起数、伸長：多) (b) ノックダウン神経モデル (突起数、伸長：少)

図4 SMN細胞の蛍光画像の一例

方法2： 顕微鏡蛍光画像から特徴量を算出し、定量評価を行う

レーザー共焦点顕微鏡から取得できる蛍光画像は、断層画像である。この 2 次元 (2D) の断面画像から構築した全載標本の 3 次元 (3D) 画像を作成する。現在、顕微鏡画像の評価は、専用のソフトウェアで断層での差分を確認しながら目視観察している。それゆえに、本研究では解析モデルを断面として解析する 2D 解析に加え、細胞をモデル化し、立体的な視点でとらえた 3D 解析も実施し、多次元からの特徴量評価をすべて自動化抽出できるシステムを構築する (図 5)。

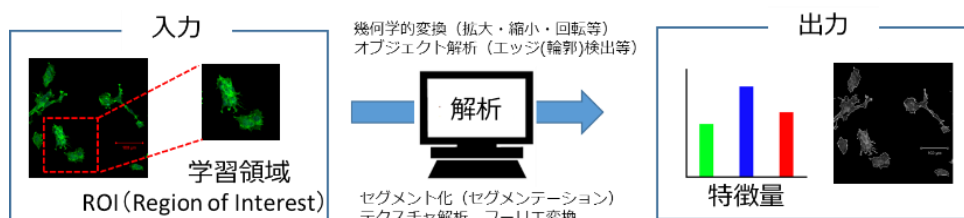


図5 細胞の定量的データを抽出

特徴量抽出の一例として、細胞形態を識別することによって、どのような性質の変化が出現するかを調査する。2D の全位相差画像からフィルタ処理等で細胞の輪郭を抽出し、イメージ領域のプロパティの計測 (regionprop 機能等を使用) によって楕円形にフィッティングし (図 6)、細胞の向き、長径方向の角度、突起の伸長方向 (図 7) を算出する。細胞の形状は凸包のピクセルの比率 (図 8) 等で認識する。

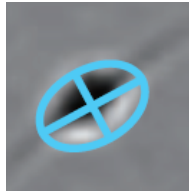


図6 楕円フィッティング

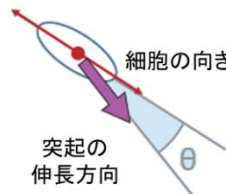


図7 突起の伸長方向

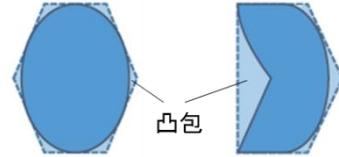
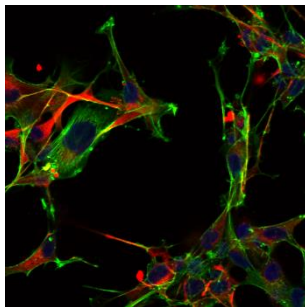


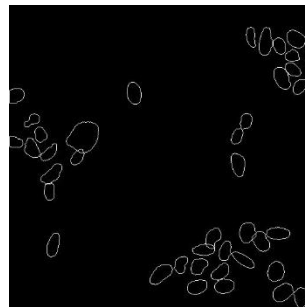
図8 凸包算出形状認識

方法3: 方法2で算出した特徴量および原画像、各処理画像等を用いて、人工知能に適応し最適化アルゴリズムおよび数理モデルを開発する

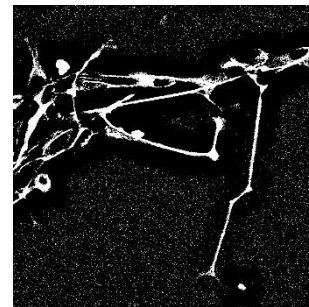
神経細胞特徴量および画像から人工知能等を用いて情報分析アルゴリズムを独自開発する。使用する画像は、原画像 (図 9a)、原画像から細胞抽出した画像 (図 9b)、原画像から細線化処理した画像 (図 9c) の 2D/3D 画像とする。



(a) 原画像



(b) 細胞抽出画像



(c) 細線化処理画像

図9 SMN 正常細胞画像処理データの一例

画像解析して得られた周波数領域値等の特性分布を用いて、パターンマッチング・ディープラーニング等の人工知能を適用して細胞成長不全との関連性を解明する。情報伝達の最適化アルゴリズムを構築しながらビッグデータ解析を実現した (図 10)。

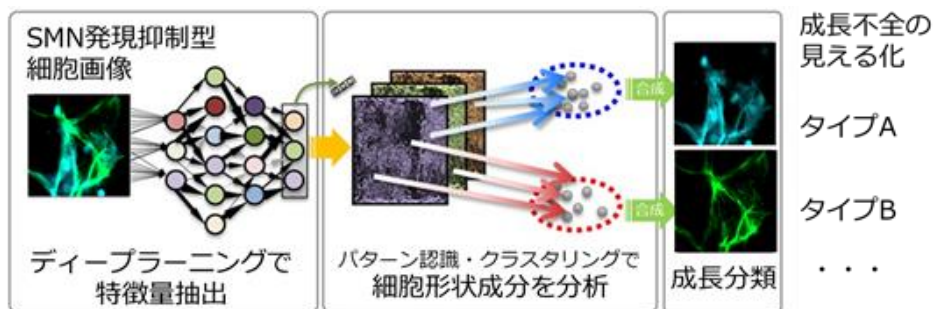


図10 人工知能を用いたビッグデータ解析

3 研究成果

レーザー共焦点顕微鏡 LSM510 で取得した細胞画像 (正常細胞 : 5 種類、SMN ノックダウン型細胞 : 6 種類) を用いて、数値解析ソフトウェア (Matlab R2021a, Mathworks) で画像処理アルゴリズムを開発し、数理モデル構築した。通常、細胞画像内では細胞同士の重なりがみられるが、watershed セグメンテーション法を用いて画像内で接触、重複している物体同士を分離した。明るい画素を位置の高い表面、暗い画素を位置の低い表面として扱

った。画像内の集水域(catchment basins)と流域の稜線(watershed ridge lines)を検出が可能となった。また、細胞を個々に分離後、楕円の離心率、オブジェクトの丸さ、領域内にもある凸包のピクセルの比率等の特徴量を算出し、細胞形態を識別することによって細胞核として認識させ、その細胞核から発現する突起を自動抽出した(図 11)。統計解析 JMP Pro ver. 14.2 を用いて突起伸長を比較した結果(図 12)、自動抽出では正常細胞 $77.3 \pm 5.3 \mu\text{m}$ (n=29)、SMN ノックダウン細胞 $51.8 \pm 5.3 \mu\text{m}$ (n=29) の有意差(p=0.0012)が認められた。多岐に渡る詳細な結果が得られ、さらに観察者による結果と同等の結果が得られたことも確認できた。

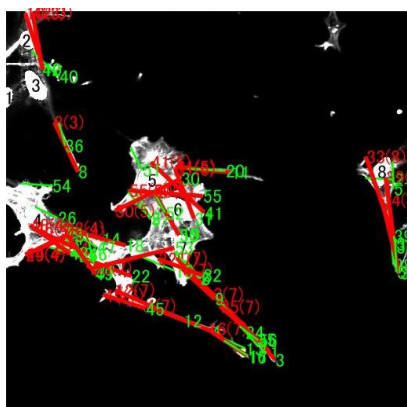


図11 細胞詳細解析結果の一例

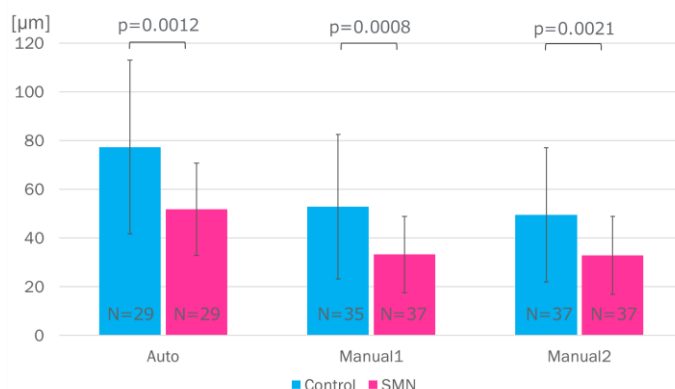


図12 突起伸長の比較結果

4 生活や産業への貢献および波及効果

多種多様な細胞集団から膨大な情報を引き出して活用することが可能となり、「AI×医療」「AI×創薬」「AI×スマートセル産業」などへの展開が期待される。臨床医学・創薬科学への応用に直結する斬新な視点からの研究成果として学術的貢献に加え、国民生活や産業界への波及効果も予想される。先行研究では、国内外問わず、生物医学ビッグデータに適したソフト・ハードウェアプラットフォーム、ビッグデータ保存、ビッグデータ分析マイニングなどの手段はまだ成熟しておらず、生物ビッグデータの研究は発展途上である。本研究は、医学現象の傾向分析と予測に役立ち、関連する遺伝病の研究や医療と医薬開発など幅広い生物医学の応用に役立つ。

参考文献

- [1] 神経変性疾患領域における基盤的調査研究班, “脊髄性筋萎縮 (指定難病 3) 一難病情報センター”, 2021-05-11, <https://www.nanbyou.or.jp/entry/135>