

MEAによるin vitro神経毒性評価

研究分担者：鈴木郁郎 東北工業大学大学院工学研究科電気工学専攻 教授

研究要旨

ヒト誘導多能性幹細胞（iPSC）由来ニューロンを使用したin vitro微小電極アレイ（MEA）評価は、毒性評価の方法として有望である。我々はラスタプロット画像の特徴量を学習したAIを用いた毒性リスク検出法を開発してきたが、特徴量をもとにした判定結果の生物学的な解釈が難しいという側面がある。神経活動の状態を反映した標準的なパラメータは、神経活動変化の意味づけを可能とする。ここでは、MEA計測で標準的に用いられているバースト関連のパラメータ値を用いた機械学習手法による、化合物の毒性評価法を検討した。具体的には、MEA上に培養したヒトiPS細胞から化合物の用量依存的なデータを取得し、データから算出したバースト関連パラメータを用いたone-class SVMを作製した。作製したSVMモデルは、5種類の陽性化合物中3種類の化合物、および農薬関連の8種類の化合物中、7種類の化合物のリスクを検出した。すべての化合物の濃度依存的なリスク上昇を検出できたことから、毒性リスク予測手法として有効である可能性が示唆された。しかしながら、学習や毒性判定に使用するパラメータの種類を厳密に検討する必要がある。陽性化合物の毒性用量を再現性高く判定できる方法まで改良を重ねる必要がある。パラメータを用いた機械学習モデルについても複数検討することで最適なモデルを選択することも予測精度の向上に必要である。サンプル間のバラつきは実験プロトコルの確立で抑えられる側面はあるが、それ以上に細胞ロットに依存する為、バラつきに対しても頑健性を有する解析法を考慮する必要がある。

A. 研究目的

in vitro微小電極アレイ（MEA）評価は、OECDの神経毒性ガイドランスに掲載され、神経機能を指標とした化合物の毒性試験法として国内外で着目されている。ヒト誘導多能性幹細胞（iPSC）由来ニューロンの使用は、ヒトへの外挿性の観点および動物実験廃止の流れから需要が高い。我々は、ヒトiPS細胞由来ニューロンのMEA計測で得られるラスタプロット（発火タイミングの時系列データ）画像の特徴量を学習したAIによる化合物の毒性リスク検出法を開発してきた。しかしながら、ラスタプロット画像から抽出された特徴量に基づいた毒性判定結果は、生物学的な解釈が難しいという側面がある。神経活動の状態を反映したパラメータは、神経活動変化の意味づけを可能とする。従って、本研究では、MEA計測で標準的に用いられているバースト関連のパラメータ値を用いた機械学習手法による、化合物の毒性リスク評価法を検討した。

B. 研究方法

Human iPSC-derived cortical neurons (Neucyte Inc., USA) を24-wellMEAプレート上に培養し、培養4-5週目に自発活動および薬剤累積投与後の細胞外電位を取得した。薬剤は5種類の痙攣陽性化合物と4種類の陰性化合物および8種類の農薬関連化合物を使用した。痙攣陽性化合物として、4-AP, Kainic Acid, Pilocarpine, Picrotoxin, PTZ, 陰性化合物として、Acetaminophen, Amoxicilline, Aspirin, 農薬として、Cypermethrin, Deltamethrin, Dieldrin, Fenamidone, Lindane, Permethrin, Acetamidrid, Aldicarbを使用した。すべての薬剤の溶媒にはDMSOを使用した。

取得した細胞外電位からスパイクを検出し、スパイク時系列データのバースト解析を行った。バースト関連パラメータとして、①バースト内発火数、②バースト内の最大発火周波数、③最大発火周波数の変動係数、

④最大発火周波数間隔の変動係数を算出した。

陰性化合物と溶媒データの上記バースト関連パラメータを使用して、one-class SVM毒性予測モデルを作製し、未学習の陰性化合物と痙攣陽性化合物のデータを用いて予測精度検証を実施した。次に、作製した毒性予測モデルを使用して、農薬関連化合物データの毒性予測精度検証を実施した。

C. 研究結果

作製したSVMモデルの痙攣陽性化合物と陰性化合物の予測結果を図1に示す。リスクスコアは、陰性化合物データの外れ値($p \leq 0.05$)からの距離を示し、正のスコアは外れ値(毒性リスク)であること示している。作製したSVMは、陰性化合物を91%の精度で陰性と判定し、5種類の陽性化合物のうち3化合物を毒性と判定した。また、毒性判定できなかったPilocarpineとPTZも用量依存的にリスクスコアの上昇がみられた(図1)。

次に、SVMモデルの農薬関連化合物の毒性リスク予測結果を図2に示す。未学習のDMSOをすべて陰性と判定した。8種類の農薬関連化合物の内、7種類を毒性と判定した。また、毒性判定できなかったAldicarbも用量依存的にリスクスコアの上昇がみられた(図2)。

D. 考察

Pilocarpineが毒性判定されない結果となったが、動物で痙攣が認められる際の脳室内濃度は今回試験し最高用量 $30 \mu\text{M}$ より10倍高い為、AIの判定結果は正しいと考えられる。毒性が検出されなかったPTZに関しては、用量依存的な変化は検出されている為、化合物による神経活動の変化は捉えているが、PTZで顕著に変化するパラメータを考察し、AIモデルに組み込むことで改善されると考えられる。毒性判定される用量

がin vivoへの外挿性を有していることが重要となるが、Picrotoxin、4-AP、Kinic acidは概ねvivoを反映する用量で毒性が判定されていた。

陰性化合物においては、AmoxicillineとAspirinの一部濃度は陽性と判定された。今回使用したパラメータは陰性化合物においても変化が認められるパラメータであることを示唆している。偽陽性のリスクを排除するためには、パラメータ数の増加とともに適切なパラメータを選定する必要がある。

バースト関連パラメータを用いたone-class SVMで、陽性化合物のリスクスコアは濃度依存的に増加し、農薬の毒性リスクも検出できたことから、毒性リスク予測手法としての有効であることが示唆された。学習や毒性判定に使用するパラメータの種類を厳密に検討する必要があり、陽性化合物の毒性用量を再現性高く判定できる方法まで改良を重ねる必要がある。パラメータを用いた機械学習モデルについても複数検討することで最適なモデルを選択することも予測精度の向上に必要である。サンプル間のバラつきは実験プロトコルの確立で抑えられる側面はあるが、それ以上に細胞ロットに依存する為、バラつきに対しても頑健性を有する解析法を考慮する必要がある。

E. 結論

本研究により、ヒトiPS細胞由来神経ネットワークのMEA計測における化合物の毒性予測法として、国内外で標準的に使用されているバースト関連パラメータを用いたSVMモデルが有効であることが示唆された。予測精度の向上と再現性のある解析法への検討は必要であるが、標準的なパラメータを用いた方法である為、汎用性および予測結果の生物学的な考察が可能なモデルである。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 鈴木郁郎, ヒトiPS神経のMEA計測による化合物毒性リスク予測, 情報計算化学生物学会 (CBI学会) 2022年大会
2. 鈴木郁郎, In vitro神経活動に基づいた化学物質の神経毒性評価, シンポジウム「発達神経毒性の現状と今後の課題」第35回日本動物実験代替法学会
3. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎 ヒトiPS細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした化合物の毒性リスク評価法の検討, 第13回スクリーニング学研究会
4. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Ikuro Suzuki, Toxicity risk assessment method for compounds using human iPS cell-derived neurons, Neuroscience 2022

3. 総説

1. 鈴木郁郎, 「ヒトiPS神経の電気活動に基づいた化合物の毒性及び作用機序予測」 谷本学校 毒性質問箱 第24号, 2022, 20-31

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

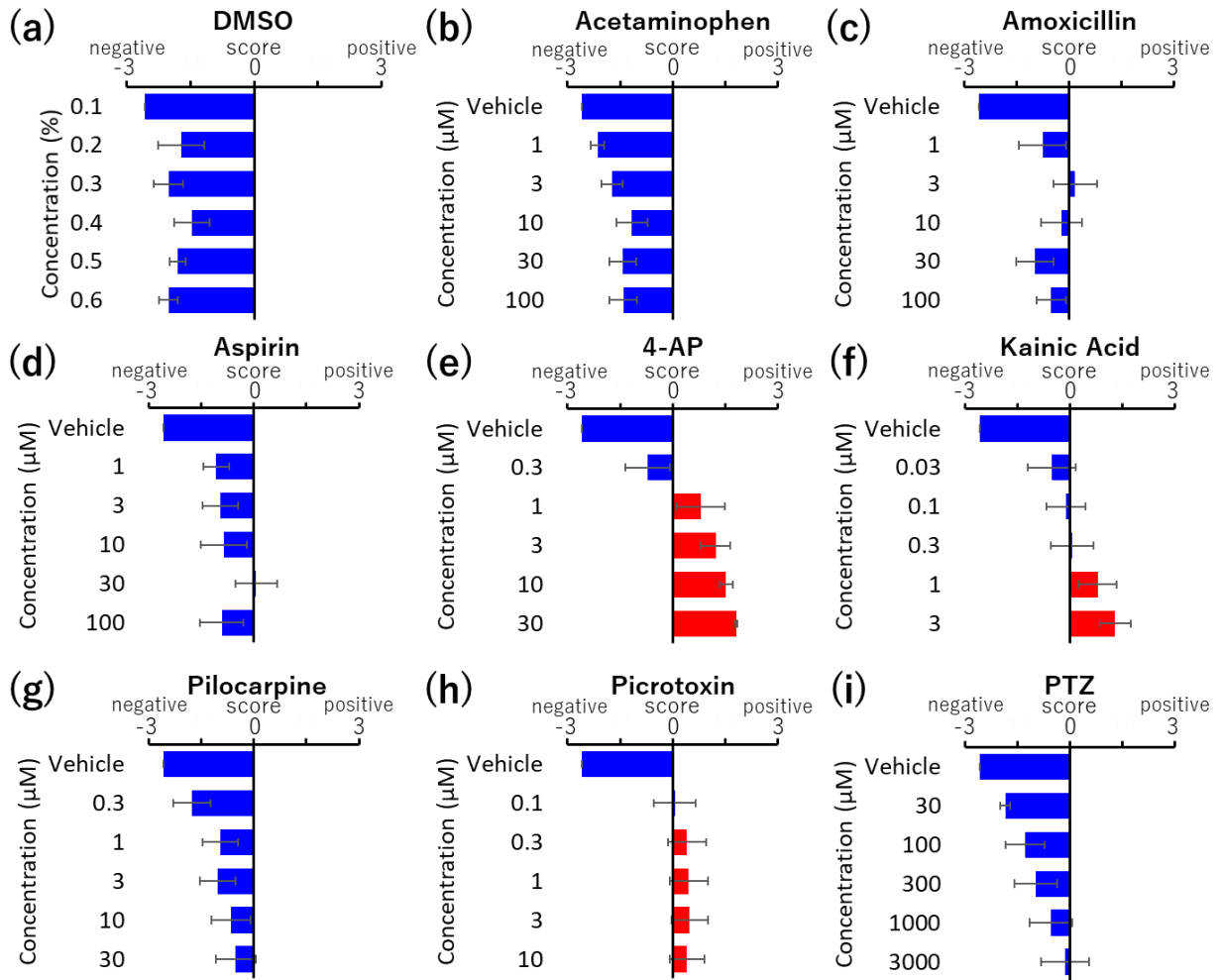


図 1. パースト関連パラメータ SVM による陽性化合物の毒性リスク予測
 (a) DMSO, (b) Acetaminophen, (c) Amoxicillin, (d) Aspirin, (e) 4-AP, (f) Kainic Acid, (g) Pilocarpine,
 (h) Picrotoxin, (i) PTZ. 青色：陰性判定された濃度、赤色：毒性判定された濃度

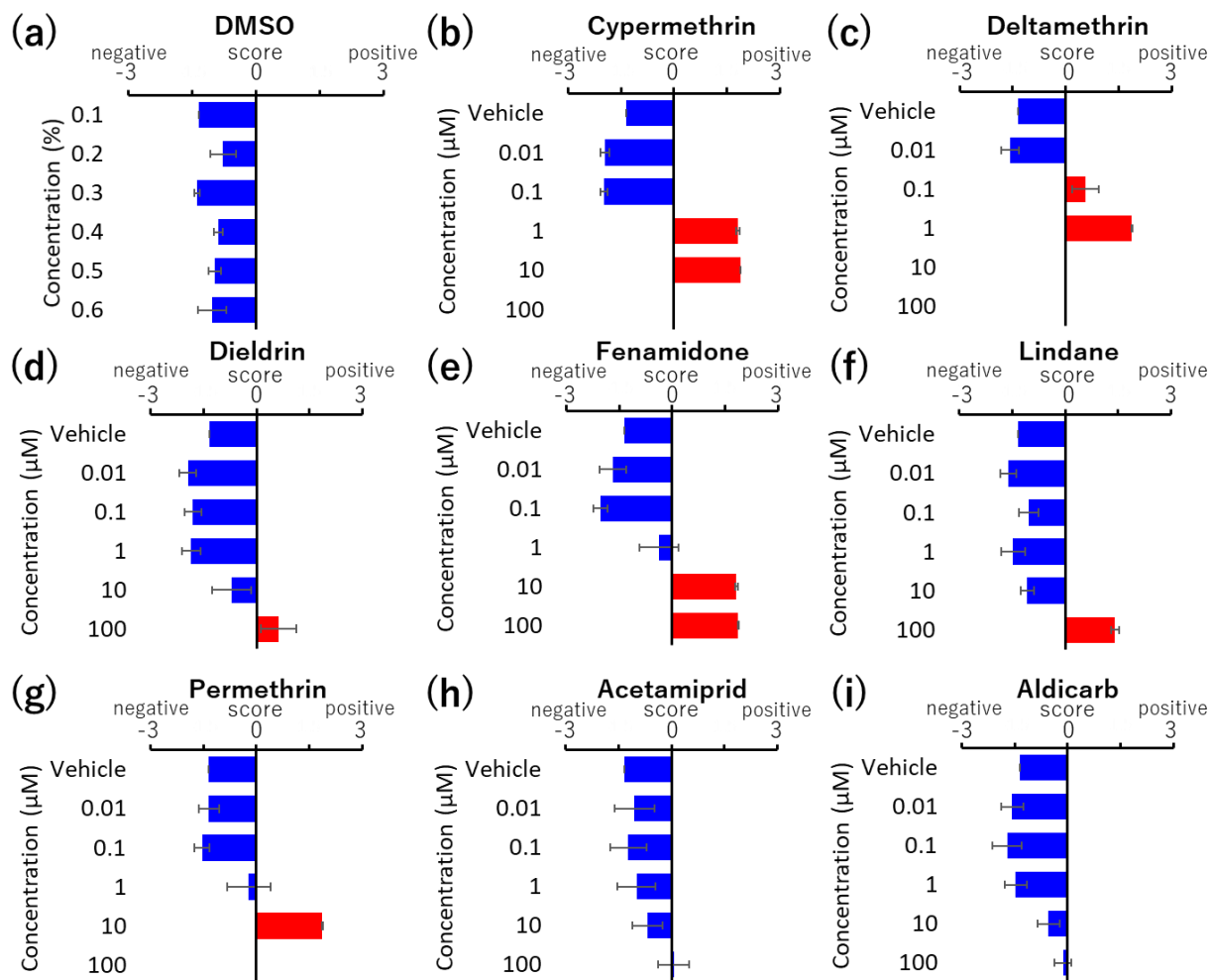


図 2. バースト関連パラメータ SVM による農薬の毒性リスク予測

(a) DMSO, (b) Cypermethrin, (c) Deltamethrin, (d) Dieldrin, (e) Fenamidone, (f) Lindane, (g) Permethrin, (h) Acetamiprid, (i) Aldicarb. 青色：陰性判定された濃度、赤色：毒性判定された濃度