

研究終了報告書

「神経変性疾患における YAP 依存的ネクローシスに至る運命決定の解析」

研究期間：2020 年 12 月～2023 年 3 月

研究者：田中 ひかり

1. 研究のねらい

神経疾患研究領域においては、神経細胞死が認知機能低下の主要メカニズム(少なくともその一つ)であることはコンセンサスを得ている。そして神経細胞死は治療可能な段階(可逆的段階)と治療不可能な段階(不可逆的段階)を隔てる重要な病態過程であるため、細胞死を予測することや、この前兆を知り制御することは極めて重要である。実際に研究代表者の先行研究において、アルツハイマー病や前頭側頭葉変性症などの複数の神経変性疾患における共通病態として TRIAD(Transcriptional Repression Induced Atypical cell Death)という YAP 依存的なネクローシスが病態に深く関わってきていることを明らかにした(Tanaka et al., Nat Commun 2020, Tanaka et al., Commun Biol 2021, Homma and Tanaka et al., LSA 2021)。TRIAD は、形態学的には小胞体の顕著な拡張と核の縮小を特徴とし、生化学的には細胞生存維持に必須な YAP の機能低下を分子基盤としている(Hoshino et al, JCB 2006; Tanaka et al., Nat Commun 2020)。興味深いことに、ACT-X 研究期間中には TRIAD 細胞から放出された HMGB1 が周辺細胞の TLR に結合し、PKC 活性化、Ku70 リン酸化による DNA 損傷修復機能低下を介して、最終的に周辺細胞の TRIAD を誘導することが示された。そして TRIAD→HMGB1→TRIAD という予想しなかったメカニズムを基盤として、ネクローシスが指数関数的に増加していくことを解明した(Tanaka et al., Nat Commun 2020, Tanaka et al., Commun Biol 2021)。加えて、TRIAD を起こしているニューロンが加齢に伴う細胞死そのものである可能性が強く示唆された(Tanaka et al., Commun Biol 2021)。

そこで本研究は AI を用いて YAP 依存的ネクローシスの 1 細胞内での細胞死に至る運命決定までのプロセスを明らかにし、この運命予測を目標とした。さらに併せてその結果を用いてまだ正常な段階で YAP 依存的ネクローシスを阻止する方法を明らかにすることも目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では申請者の研究室で樹立し、すでに論文でも報告した神経変性疾患で最も患者数の多いアルツハイマー病のモデル iPS 細胞(Tanaka et al., Mol Psy 2018, Tanaka et al., Nat Commun 2020)を用いて分化誘導し、神経細胞を作成した。そして初年度から 2 年度にかけて、この神経細胞の経時的変化の高解像度動画撮影を行い、画像データの取得をした。そしてその画像を用いて実際にそれらの 1 画像内の複数神経細胞を「これから TRIAD がおきる細胞」と、「TRIAD がおこらない細胞」としたクラス分類を行い、SSD によって学習を行なったところ、一見正常な段階で将来 TRIAD に至ることを AI で予測すること成功した。その際に AI が細胞内のどの部分を用いてその判断を行ったのかを解析し、AI が認識に用いた部位を確認することができた。

一方、研究開始時には AI が認識に用いた部位から特徴部位を推測しそれにあわせた治療実

験を行う予定であった。しかし想定より AI が遥かに多くの特徴を認識に用いており、形態のみの情報から治療実験を立てるのは難しいこと、そしてこのことは分子レベルで非常に複雑な前兆が起こっていることが推測された。

また、ACT-X 研究期間中には学習データにも使用したアルツハイマー病のモデル iPS 細胞および正常 iPS 細胞由来神経細胞を用いて TRIAD の加速度的な増加につながるメカニズムを明らかにした他(Tanaka et al., Commun Biol 2021)、TRIAD が老化細胞死と同一である可能性(Tanaka et al., Commun Biol 2021)も明らかにした。また、2 年度目よりチャレンジ支援にて TRIAD と他の細胞死の前兆を同様の AI 画像解析を用いて見分けることも行った。

(2) 詳細

研究項目 1. 神経変性疾患モデルヒト iPS 細胞を神経変性疾患モデルニューロンに分化誘導

アルツハイマー病の神経変性疾患モデルヒト iPS 細胞を樹立しており、これらを feeder-free 培養、Neurosphere 法を用いて pan-neuron に分化誘導した。

研究項目 2. 生細胞の継時的イメージの取得

研究実施計画時に予定し、途中までデータ取得を行っていた医科歯科大共通機器 FV-10i が故障し(修理不能証明も提出された)、急遽追加予算の支援もいただき、横河電機社共焦点顕微鏡 CQ1 を用いて同様に30分間隔の生細胞イメージングを行うことができた(増額支援)。さらに取得した複数 Z スライス明視野画像から、ハイコンテツ解析ソフトウェア CellPathfinder の Deep Learning 機能を利用した解析を用いて、位相差顕微鏡で撮像されるような細胞の輪郭まで精度高く認識が可能なデジタルコントラスト画像を作成した。

研究項目 3. YAP 依存的ネクローシス発生前の教師データを作成

取得した細胞の画像内の神経細胞を「これから細胞死がおきる細胞」と、YAP 依存的ネクローシスが起らない(正常なヒト由来ニューロン)「細胞死がおこらない細胞」そしてすでに「細胞死を起こしはじめている細胞」としてクラス分類した。実際にこの TAG データをもとに SSD を用いてトレーニングを行った。

研究項目 4. 教師データをもとに実際に細胞死を予測できることを確認

研究項目 3 の教師データとして用いていないイメージ中の細胞について、AI が「これから細胞死がおきる細胞」と判断するのか、「細胞死がおこらない細胞」と判断するのかを実際の結果照らし合わせながらテストした。その結果非常に高い正答率を得た

研究項目 5. AI が何を判断基準として「これから細胞死がおきる細胞」と認識したのかを解析

AI の教師データや実際の解析データを抽出し AI の判定基準を解析した。その結果 SSD の複数の層において特徴を抽出することに成功はした。

研究項目 6. AI が認識した判断基準をもとに、生化学実験でその再現がとれることを確認する

研究開始時には AI が認識に用いた部位から特徴部位を推測しそれにあわせた治療実験を行う予定であった。しかし研究項目 5 のデータからも推測されるに、予測外に AI が遥かに多くの特徴を認識に用いており、形態のみの情報から治療実験を立てるのは難しいことがわかった。そして併せてこのことは分子レベルで非常に複雑な前兆が起こっていることを示唆していた。

研究項目 7. [2 年次途中からの追加課題]

本課題と並行(一部は先行)して行なってきた in vivo 実験系を主とした研究において前頭側頭葉変性症の発症前段階でもこの YAP 依存的ネクローシスが起こっており、病態に影響を及ぼすということを明らかにした(Homma H, Tanaka H (co-first author) et al., 2021 LSA)。また、この際驚くべきことに他のアポトーシス等の細胞死の頻度は YAP 依存的ネクローシスと比較して非常に低く、YAP 依存的ネクローシスが病態進行における細胞死の大部分を占めているということも病態モデルマウスレベルで明らかとなった(Homma H, Tanaka H (co-first author) et al., 2021 LSA, Tanaka et al., Commun Biol 2021)。すなわち YAP 依存的ネクローシスに至るまでの運命予測とともに、他の細胞死の運命予測を可能にし、一見正常に見える早期段階でその違いをみることは、病態に至る根本的な原因を明らかにすることにつながるという新たな可能性が期待できる。そこで、当初の計画に加えて今回強制的にアポトーシスを起こした細胞の教師データを作成し、同様の運命予測を行なっていく一連の実験を追加した。

その結果アポトーシスについても AI が予測可能な AI を確立することができた。

その他の成果

ACT-X 研究期間中には学習データにも使用したアルツハイマー病のモデル iPS 細胞および正常 iPS 細胞由来神経細胞を用いて TRIAD の加速度的な増加につながるメカニズムを明らかにした他(Tanaka et al., Commun Biol 2021)、TRIAD が老化細胞死と同一である可能性(Tanaka et al., Commun Biol 2021)も明らかにした。また、YAP 依存的なネクローシスがアルツハイマー病だけでなく前頭側頭葉変性症においても起こっていること(Jin et al., Commun Bio 2021, Homma and Tanaka et al., Life Science Alliance 2021)を論文で報告した他、神経細胞以外の細胞(ミクログリア)が炎症反応により神経細胞の細胞死を誘導するメカニズムの一つを論文で報告した(Jin, Shiwaku and Tanaka et al., Nat Commun 2021)。さらに細胞の形態観察をもとに細胞の構造に重要な分子の同定(Jin and Tanaka et al., Nat Commun)に成功した。

ACT-X 研究を通じて実現した、当 ACT-X 研究領域内外の研究者や産業界との連携

ACT-X 領域会議を通じて、この研究を分子レベルの変化と結びつけることの重要性の後押しを多くの先生からいただいた。また、本領域では細胞培養・疾患研究を行なっている研究者は非常に少ない一方で、代表者が普段何気なく得ている大量なデータを想像以上に有効活用できることの可能性を知った。

3. 今後の展開

本研究提案で着目している TRIAD ネクローシスは神経変性疾患および加齢による細胞死の共通病態であり、「治療可能な段階」であるか「不可能な段階」であるかの大きな分かれ目となる細胞死の前兆を AI で形態学的に予測することに加え、その前兆の分子レベルでの変化を AI との融合で突き止めるものである。ゆえにこの研究の最終的な目標は未だ治療法の存在しない神経変性疾患の新規治療法もしくは予防法を明らかにすることである。まずは ACT-X 期間中に樹立した「将来細胞死に至るニューロン形態の AI を用いた予測技術」を応用し、神経変性疾患のニューロン細胞死の分子機構を 1 細胞レベルで明らかにする。その後、

この中核分子を用いてモデルマウスの治療実験を行なっていきたい。

また、本研究課題の疾患そのものの研究とは異なる重要な側面は、AIを用いて人の目では捉えられなかった変化を捉えることを可能にしたという点である。そこに遺伝子変化をリンクすることができれば、この手法は神経変性疾患のみならず多くの疾患研究において有効な革新的技術になりうる。ゆえに、この技術が完成した際には、この手法を多くの研究者に共有し、広く普及させたいと考えている。

4. 自己評価

当初使用する予定であった共通機器が故障するといった大きなトラブルに見舞われたが、ACT-X の更なる支援をいただいたことで、無事大きな遅れを取らずに大半を達成することができた。また、これにより当初予定していたよりもかなり解像度の良い細胞死の長時間タイムラプスデータを結果として得ることができた。また、一部想定外のデータを得ることになったが、このことは次の重要な研究テーマの提案へと繋げることができた。

研究実施体制に変更はなく、大半を代表者独自に進め、一部については所属分野の准教授の指導を得ながら進めることができた。研究費についても前述の通り追加の支援をいただいて顕微鏡の有償利用ができた他、iPS 細胞培養に必要な消耗品類に使用した。

科学技術・社会への波及効果としては、未だ治療法の存在しない神経変性疾患の新規治療法もしくは予防法を明らかにするための一端を進めることができた他、人の目では捉えられなかった変化を AI で捉えることができたことは非常に重要である。また、本領域会議を通じて多くのアドバイスをいただく中で、新たな挑戦的課題へと発展させる計画を立てることができた。

さらに、本領域では細胞培養・疾患研究を行なっている研究者は非常に少ない一方で、代表者が普段何気なく得ている大量なデータを想像以上に有効活用できることの可能性を知った。今後は、可能な限りそういった細胞を扱うことができない情報系分野の研究者と連携を進めたいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. **#Tanaka H**, Kondo K, Fujita K, Homma H, Tagawa K, Jin X, Jin M, Yoshioka Y, Takayama S, Masuda H, Tokuyama R, Nakazaki Y, Saito T, Saido T, Murayama S, Ikura T, Ito N, Yamamori Y, Tomii K, Bianchi ME, *Okazawa H. HMGB1 signaling phosphorylates Ku70 and impairs DNA damage repair in Alzheimer's disease pathology. *Commun Biol*, **4**, 1175 (2021)

アルツハイマー病において加齢とともに TRIAD が加速的に増加するメカズムを解明し、それを仲介する最重要因子が HMGB1 であることを同定した。さらに、HMGB1 で誘導される TRIAD 細胞死が、老化の最終形としての細胞死と同一であることも明らかになった。これは、HMGB1 抗体治療等のアルツハイマー病あるいは他の認知症を含む神経変性疾患全般・および老化による認知症を対象とする根本治療へ発展することが期待される。

2. #Jin M, #Shiwaku H, #Tanaka H (co-First Author), Obita T, Ohuchi S, Yoshioka Y, Jin X, Kondo K, Fujita K, Homma H, Nakajima K, Mizuguchi M, *Okazawa H. Tau activates microglia via the PQBP1-cGAS-STING pathway to promote brain inflammation. Nat Commun 12, 6565 (2021)

複数の神経変性疾患の病態に関与するタウ蛋白質が、脳内ミクログリアにおいて、エイズウイルスの細胞内受容体として知られている PQBP1 に認識され cGAS-STING 系の細胞内シグナルを誘導して、脳炎症を誘発する分子メカニズムを報告した。また脳内ミクログリアに限定して PQBP1 を抑制することで、タウ蛋白質による脳炎症を抑えることを示した。

3. #Homma H, #Tanaka H (co-First Author), Meihua Jin, Xiaocen Jin, Huang Y, Yoshioka Y, Bertens J.F.C, Tsumaki K, Kondo K, Shiwaku H, Tagawa K, Akatsu H, Atsuta N, Katsuno M, Furukawa K, Ishiki A, Waragai M, Ohtomo G, Iwata A, Yokota T, Haruhisa I, Arai H, Sobue G, Sone M, #Fujita K, *Okazawa H. DNA damage in embryonic neural stem cell determines FTLDs' fate via early-stage neuronal necrosis. Life Science Alliance 15, e202101022 (2021).

前頭側頭葉変性症において、胎児期の脳内の神経幹細胞で起きる DNA 損傷が、出生後の早期神経細胞死「YAP 依存的ネクローシス」を誘発し、病態進展の鍵を握ることを明らかにした。また、この細胞死を標的とする治療法の可能性を実験的に示した。

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 総説(国際誌・招待)

Tanaka H and Okazawa H. PQBP1: The Key to Intellectual Disability, Neurodegenerative Diseases, and Innate Immunity Int J Mol Sci, published 2022, 23(11):6227

2. 2021.11.15 プレスリリース

「認知症の原因タンパク質が脳炎症を起こす仕組みを解明」

3. 2021.10.11 プレスリリース

「神経変性が加速する分子メカニズムを解明」

4. 2021.8.12 プレスリリース

「スパコンを駆使したビッグデータ解析による アルツハイマー病と前頭側頭葉変性症に共通する病態の解明」

5. 2021.6.15 プレスリリース

「前頭側頭葉変性症胎児期の DNA 損傷が数十年後の発症に影響する」