

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究振興資金

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用 —深層学習による中枢神経薬の効果判定—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①深層学習 ②薬物依存 ③バズプレシン受容体		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
興 水 崇 鏡	分 子 薬 理 学 部 門	教 授	研究代表者、深層学習、データベース作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
土 屋 裕 義	分 子 薬 理 学 部 門	講 師	動物行動解析、動物モデルの解析
東 森 生	分 子 薬 理 学 部 門	学 内 講 師	組織学的評価、個体での化合物評価
持 丸 雄 太	分 子 薬 理 学 部 門	助 教	細胞モデルの解析、遺伝子解析
Nuttawadee Ngamlertwong	分 子 薬 理 学 部 門	博 士 課 程	受容体相互作用解析、光学的測定
Chortip Sajjaviriya	分 子 薬 理 学 部 門	博 士 課 程	行動の深層学習と解析、薬物効果判定
Fujianti Casmad	分 子 薬 理 学 部 門	博 士 課 程	免疫組織化学的解析
神 永 洋 彰	分 子 薬 理 学 部 門	博 士 課 程	生化学的解析、薬物効果判定

マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用 — 深層学習による中枢神経薬の効果判定 —

1. 研究の目的

- (1) 本研究では、麻薬の娯楽目的の使用で起きる「依存症」の典型例を軸に、薬物や行為の習慣性が過度となる場合の治療について、コンピューター科学の力を最大限に取り入れて開発することを目的としている。具体的には、コンピュータービジョンによる画像取り込みと認識に加えて、物体認識の進んだ学習能力を世界に先駆けて依存症の理解に導入し、対処法を開発する。
- (2) そのための解析対象として、申請者らが独自に開発したユニークな麻薬感受性を示す遺伝子改変マウスを利用する。このマウスを通じた依存症の病態の理解に加えて、麻薬鎮痛薬を含む中枢神経薬を、依存を避けながら鎮痛効果を安全に得るための投与方法を開発し、この過程の依存の状態を信頼度高く評価できる方法を確立する。
- (3) この研究がもたらすと考えられる社会貢献は、依存を取り巻く医学的、社会的問題の解決に寄与することである。米国では、連日 100 人に及ぶ命がオピオイド依存による過量投与で失われている。この数は、米国の銃と交通事故による死者を合わせた数よりも多く、米国大統領令により危機的状況クライシスが宣言され、英国でも同様にプレクライシスとされる。新型コロナウイルスによる感染症は、依存症の患者を直撃し、依存症患者の死亡率を平時よりもさらに高めることに繋がっている。よって、麻薬を含む物質依存症は、鎮痛治療に伴う現代の世界的難題と言える。この難題への突破口と、安全で先進的痛み治療の確立が我が国でも求められている。

2. 研究の計画

- (1) 前年度までの成果を踏まえて 2020 年度の進展を計画した。前年度までに、依存症を判定できる深層学習の初期数式モデルの作出を達成しておりその評価と改善を進める。実験手技としては、モルヒネを 10 日間連日投与し、野生型および V1b 遺伝子欠損マウスについて依存症動物モデルを作成する。この過程をビデオ記録し、動画を連続画像として 1 秒間に 5 枚の精緻な切り出しを行う。続いて深層学習のための OS を Ubuntu 16.04 から 18.04 へバージョンアップして計算速度と効率の上昇を達成する。Tensorflow はバージョンが 1.x から 2.x へ向上しており、最新のソフトウェアに更新して Keras ソフトウェアと一体で解析を進める。複数の GPU 用グラフィックボードは、Nvidia 社のドライバーソフト CUDA9 を導入し、並列計算環境を構築する。続いて画像内の物体の教師付き深層学習の環境を構築する。そのために、Google が提供する物体検出アプリケーションを改変し、マウスの行動パターンを 5D テンソルデータとして学習させる。その際、190 万枚の最新画像データベース ImageNetV4 からも訓練画像を取得する。また、すでに深層学習を終えたりカレントニューラルネットワークモデルを転用し学習効果を向上させる。得られた計算結果を用い、新たな依存マウスを検出できるか検証する。以上より、信頼度が高く依存状態を検出する計算モデルを作成する。
- (2) 細胞系において V1b 受容体に作用を示す化合物の検索手段を確立する。V1b 受容体と β アレスチンの相互作用は、オピオイドシグナルに重要な役割を果たすと考えられるが、この相互作用を評価する方法が存在せず、医療分野への応用が阻まれていた。これまでに我々は、多くの条件検討を重ねることにより、精緻に V1b 受容体と β アレスチンの相互作用を検出する手技を確立しつつあり、本年度もこの方法の改善を押し進める。

3. 研究の成果

- (1) 画像分類の段階で「何が」写っているかについては、直列的な深層学習モデルにて 95% 以上の高確率で正答可能となる学習条件を見出した。さらに進んで「何処に」どのような「状態（コンテキスト）」で存在するかを学習により判断可能となった。すなわち、マウスを物体として検知しラベル化することで意味づけを行うことが可能であった。計算環境としては、オープンソース主導で革新を続けるコンピュータサイエンスの成果を、直ちに本研究に応用す

るため、トライアンドエラーが可能で柔軟な深層学習計算環境を昨年度の成果から引き続いて構築、使用した。これまで OS 更新時には、全ソフトウェアバージョンの整合性を見直し、ソースからビルドして動作確認する時間と労力を要した。そこで、OS に依存しない仮想環境に変更した。パッケージマネージャの Miniconda は、数日かけていた計算環境構築を数分で終了する。このため、挑戦的なプログラムも素早く試行可能であった。特に Tensorflow バージョンが 2.x に進化した際には、他のプログラムとの整合性を整える必要性から環境の試作的構築と改善が必要であった。さらに、中央演算子 CPU に加えて複数の GPU を加えた強力な並列計算が可能となった。仮想環境は機械学習のために R プログラムを利用する際にも有用可能であった。その上で、深層学習後の特徴抽出について、大きなデータを対象に効率良く解析を実施した。

(2) 物体認識されて XY 座標を付与したマウスのオープンフィールドにおける行動から、薬剤非投与のコントロール記録において V1bKO マウスの運動量が低下することを発見している。この事実自体、新しい知見でありその機序を明らかにすることが不安行動と V1b 受容体の関係性を明らかにできると考える。本研究の依存モデルに関しては、モルヒネ投与時には行動量の全体的な増加が見られることは知られるため、自発的運動量に影響する脳部分に V1b 受容体が働くことが考えられ、今後の実験結果を考察する上で重要な知見と考えられる。

(3) 脳内の依存状態を細胞系において再構築し、V1b とオピオイド受容体の相互作用に新たな計測法を見出して、リアルタイムモニタリングの感受性を向上させた。V1b 受容体は、無刺激時にも細胞内に局在し、 μ オピオイド受容体や β アレスチン 2 と恒常的な複合体を形成する特異な性質を持つ。これら 3 分子の相互作用を検出し、V1b 受容体拮抗作用から、依存のシグナルを抑制する化合物をスクリーニングする方法を開発した。これによりこれまで不可能だった薬物スクリーニングが可能となり、既存の他の受容体の薬物スクリーニングにおいても、感度を従来よりも 100 倍高めることができることが判明した。

(4) V1b- μ 受容体- β アレスチン 2 複合体の検出のために、新しい NanoBit-NanoBRET 測定法を世界で最初に G タンパク質受容体に応用することに成功した (論文投稿中)。受容体同士の相互作用をさらに詳細に解析した結果、相互作用の様子を頭打ちとなる曲線 (hyperbolic curve) 上に近似させることが可能であり、V1b- μ 受容体複合体で特異的な相互作用が起こっていることを証明した。この成果は、受容体複合体の存在が単に非選択的な発現系の影響によるものでなく、生物学的に意味を持つことを示唆しており、我々の実験系の理論的基盤に値すると考えられた。

4. 研究の反省・考察

(1) 幾つかの実験は現在も進行中である。我々は、複合体形成に必須である V1b 受容体カルボキシル基末端のロイシンリッチセグメントを、ゲノム編集により欠失させた点変異マウスの作出に成功した。この部位は、細胞を用いた実験系で依存形成に重要と判明しており、V1b-アレスチン相互作用の重要性を明らかにすることが可能となる。また、鎮痛に関わる G タンパク質シグナルを保持した状態で、アレスチンを介する ERK リン酸化酵素経路シグナルで新たな治療の標的を探索することが可能である。

(2) マウスを物体として深層学習モデルで認識する場合、当初 3000 枚を学習に用いてモデルを作成した。90%台の正確性で認識が可能であったが、学習に用いる画像を増やしたところ、正確性は上昇することが判明した。使用の用途によるが、今後も深層学習モデルのさらなる改善を試みることが可能である。

(3) 部位特異的 V1b 欠損動物作成のための loxP 配列挿入マウスの作成に成功し解析を進めている。脳内の部位特異的受容体欠損を作成し、チャンネルロドプシン発現マウスの開発を進めている。以上の如く、研究の進行は着実であり、最終年度にはこれまでの結果と合わせて大きな成果が期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Critical role of V1a vasopressin receptor in murine parturition. Tsuchiya H, Fujimura S, Fujiwara Y, Koshimizu TA. *Biol Reprod.* 2020 Apr 15;102(4):923-934. doi: 10.1093/biolre/ioz220.

(2) 口頭発表

- ① Sensitive detection of agonist-dependent interaction between heteromeric m-opioid and V1b vasopressin receptors and β -arrestin 2. Ngamlertwong N., Tsuchiya H., Azuma M. and Koshimizu T. 第94回日本薬理学会年会 シンポジウム 2021年3月
- ② Distribution of mammal-like melanin concentrating hormone type 1 and 2 receptor expressing neurons in the brain of a basal actinopterygian fish, *Polypterus senegalus*. Azuma, M. Koshimizu T. 第94回日本薬理学会年会 一般演題 2021年3月
- ③ Deep neural network approach for understanding water-taking behavior after Tolvaptan. Kaminaga, H. Mochimaru, Y. Azuma, M. Tsuchiya, H. Koshimizu, T. 第94回日本薬理学会年会 一般演題 2021年3月
- ④ Successful detection of agonist-induced interactions between receptor dimers and β -arrestin Ngamlertwong, N. Tsuchiya H. and Koshimizu, T. 第142回日本薬理学会関東部会 一般演題 2020年 6月
- ⑤ V1bバゾプレシン- μ オピオイドヘテロ受容体と β アレスチン2の相互作用解析 興水 崇鏡、Nuttawadee Ngamlertwong、土屋 裕義 日本生化学会年会

(3) 出版物

- ① なし