

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	
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麻薬依存、②深層学習、③畳み込みニューラルネットワーク、④受容体、⑤ベータアレスチン、⑥生物発光共鳴エネルギー転移		

○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	研究者代表、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
Chortip Sajjaviya	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) 疼痛のない状態で麻薬を娯楽目的に使用した場合、容易に我々の生体は麻薬が体内に存在する状態に慣れた「依存症」に陥る。依存症は古くより知られる麻薬鎮痛薬の有害作用ですが、現段階で麻薬が起こす依存を効果的に治療する手段は非常に限られている。本研究では、麻薬をはじめとする薬物や、さらには賭博などの行為の習慣性が過度となる広い依存症の治療について、最新のコンピューター科学の力を最大限に取り入れ、新しい治療法を開発することを目的とした。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、対処法を開発することに挑戦した。

(2) 実験手法として、申請者らが独自に開発に成功したユニークな麻薬感受性を示す遺伝子改変マウスを解析対象として利用した。このマウスは依存症の病態の理解に加え、麻薬鎮痛薬を含む中枢神経薬の効果を効率良く解析するために有用と考えられる。その上で、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、依存の状態と治療過程を信頼度高く評価する方法を確立する。

(3) この研究で得られる成果として、世界的な社会問題となっている麻薬依存の克服に向けた貢献が期待できる。依存を取り巻く医学的、社会的問題状態は深刻であり、特に米国では、麻薬オピオイドの依存による過量投与によって、連日 100 人に及ぶ命が失われている。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、経済的、医療的な弱者である依存症の患者層を直撃し、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た。よって、麻薬を含む物質への依存症、並びの行為の依存は、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) 物体検出と追尾による依存状態の検出と評価系を確立する。近年の目覚ましい技術革新が生む計算力のハードおよびソフト面での進歩を、現実世界で直面する課題に応用した場合、ヒトが本来備える能力を超えて困難な問題に対処できると期待される。特に画像認識と判別に深層学習を用いる方法論は急速に成熟し、画像診断や病理診断の補助技術として応用が進められている。本研究では、麻薬依存症マウスモデルを作成し、その過程を動画から連続画像として 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、さらに 20.04 へと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、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 CUDA 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。これらソフトウェアのバージョンを合致させながら、最新の状態で計算機パフォーマンスを最大限に発揮させるため、仮想環境の中で試行的に計算環境を運用することを試みる。物体検出アプリケーションとしては、そのために、Google が提供する Tensorflow を利用し、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 から訓練画像を取得する。これまでに、深層学習を終えたリ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方法について確立しており、効率的、正確性の高い計算モデルを構築する。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し、治療開発に繋がる計算モデルを作成する。

(2) 動物実験において生体での理解と共に、細胞系を用いて分子レベルの依存症研究も展開する。特に、麻薬の依存に関係性が示唆される V1b 受容体について、その作用を調節する化合物の検索手段を確立し、実際に化合物のスクリーニングを実施する。具体的には、カルボキシル末端にロイシンが多く出現する V1b 受容体と、 β アレスチンの相互作用は、オピオイドの

依存症成立に必要な細胞内シグナルの開始点と考えられる。しかし、V1b- β アレスチン-オピオイドの 3 分子が相互作用するこの段階を評価する方法が存在せず、検出法の確立が課題であった。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ることから、この方法の改善を押し進める。

3. 研究の成果

(1) 物体検出する深層学習モデルの改善：我々は前年度に、画像分類課題において‘何が’写っているかについては、直列的な転移深層学習モデルを作成して 95%以上の高確率で正答可能となる学習条件を見出していた。今年度はさらに進んで‘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する正確性の向上に成功した。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前年度から引き続いて構築、改善した。

①Miniconda仮想環境を、Ubuntu OSバージョンを超えて汎用可能に構築：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場合には多くの時間と労力を要する。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のソースからの構築に代わり、必要なインストールを数分で終了する。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。UbuntuのOS 20.04においても安定して計算可能であった。Tensorflowバージョンは2.x系で進化を継続したが、この場合も最新の環境を導入可能であった。よって、中央演算子CPUと複数のGPUによる強力な並列計算が可能となった。この系を用いることにより、10日間に渡り継続的に記録した動画より100万枚を超える画像のビックデータより、依存に特長的な行動変化を捉える深層学習技術の開発に成功した。

(2) NanoBit-NanoBRET を構築し 3 分子相互作用の高感度化に成功：

①我々は、依存に関わると予想されるGタンパク質受容体の二量体と β アレスチンとの相互作用解析に、世界で初めてNanoBit-NanoBRETシステムを導入することに成功した（参考文献1）。相互作用の特異性を証明する細胞実験系として、BRETのドナータンパクを一定量として、アクセプタータンパクを増加させた場合のBRETの効率を測定、計算したところ、非特異的相互作用よりも遥かに高いアクセプターの蛍光を得て相互作用の特異性を証明した。

②V1b- β アレスチン間は、刺激非依存性に複合体が形成され、高感度化に成功したBRET計測において刺激と共にさらにBRETシグナルの増加を検出した。これにより、V1b- β アレスチンの相互作用は、非刺激時の構成的相互作用を第一段階とし、刺激に依存する第二段階の相互作用を仮定できることが、GPCRの中でも初めて明らかとなった。

③さらに、本研究の開始前には不可能であったV1b- β アレスチン-オピオイド受容体の3分子間相互作用の刺激依存性変化を見出すことに成功した。即ち、V1bは β アレスチンとオピオイド受容体のそれぞれと相互作用するため、両者を橋渡ししていることが明らかとなった。この3者の複合体をV1bあるいはオピオイドで刺激すると、3者間のBRETシグナルはさらに増強することが判明した。以上の結果より、オピオイド鎮痛薬の依存シグナルの起点となるV1b- β アレスチン-オピオイド受容体の機能的特徴を解明し、依存を抑制する方法の基盤的知見を得ることに成功した。

4. 研究の反省・考察

(1) 深層学習を用いた物体認識において、依存モデルマウスを 90%以上の正答率で検出する計算モデルを構築することに成功した。訓練に用いるラベル付き画像を 3,000 枚から 16,000 枚に増加させることにより、正確性は 95%以上に上昇することが判明した。さらに、Tensorflow のバージョン 2.9.1 は現時点で最新の機能を利用することに成功している。本研究の計画時点での物体認識システム構築の目標はほぼ達成されたと考えられるが、さらに、最近では画像判別アルゴリズムとして、ビジョントランスフォーマー (ViT) が注目されており、今後の課題として ViT を取り入れた判別系の導入が課題と考えられた。

(2) 依存シグナルの起点となる V1b- β アレスチン-オピオイド受容体複合体の機能解析において、3 分子間相互作用解析の手法である NanoBit-NanoBRET 法の導入に世界で初めて成功した。

この方法を用いることにより、これまでは困難であった V1b-β アレスチン間の相互作用を減弱あるいは、上昇を阻害する薬物の探索が可能となった。このような薬物は、麻薬耐性や依存性を減弱させる可能性が考えられ、スクリーニング法の確立は大きな前進と考えられた。時間的制限があり、実際に化合物の大規模スクリーニングには進むことができなかった。しかし今後実際に実施する場合には、今回の成果を踏まえて効率的に進めることが可能と考えられた。

(3) 本研究で開発に成功した 3 分子相互作用解析法は、700 種類を超える GPCR 受容体ファミリーに広く応用が可能である。これまでは、受容体から G タンパク質を介する情報伝達が治療薬開発の対象とされてきたが、β アレスチンを介する情報伝達は未だ薬物開発に至る例は少ない。加えて受容体側の二量体を形成する組み合わせは多岐にのぼるため、β アレスチンを加えた 3 分子が薬物開発対象となる次の段階の治療薬開発には、大きな成果が期待される。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Agonist dependency of the second phase access of β-arrestin 2 to the heteromeric μ-V1b receptor. Ngamlertwong N, Tsuchiya H, Mochimaru Y, Azuma M, Kuchimaru T, Koshimizu TA. Sci Rep. 2021 Aug 4;11(1):15813.

② Epidemiology and Risk Factors for Giant Coronary Artery Aneurysms Identified After Acute Kawasaki Disease. Masuda H, Ae R, Koshimizu TA, Matsumura M, Kosami K, Hayashida K, Makino N, Matsubara Y, Sasahara T, Nakamura Y. Pediatr Cardiol. 2021 Apr;42(4):969-977.

(2) 口頭発表

① Sensitive detection of agonist-dependent interaction between heteromeric mu-opioid and V1b vasopressin receptors and beta-arrestin 2. Ngamlertwong N., Tsuchiya H., Azuma M and Koshimizu TA 第94回日本薬理学会年会 Web開催

② Agonist-dependent second-phase access of β-arrestin 2 to μ-V1b receptor heteromer. Koshimizu TA and Ngamlertwong N. International narcotics research conference 2021. Web開催

(3) 出版物

なし