

分子・形態共変動解析による未病創薬研究基盤の創成

研究代表者：東京科学大学 加納 ふみ

【基本構想】

治療効果が高く、副作用の少ない医薬品を創出するうえで、医薬品の作用点となる疾患関連性の高い標的分子を効率的に選定することは、製薬企業にとって重要な課題の一つである。従来の創薬では、すでに顕在化した病態において発現量や活性が大きく変化した分子を標的候補として探索することが多い。しかし、病態が進行した段階では、細胞状態の変化が不可逆になっている場合や、二次的・代償的な変化が多数含まれる場合があり、真に病態の発症や進行を制御する標的分子の同定は容易ではない。

「未病」は、病態発症前の細胞状態であり、健常状態と病態状態の間を行き来し得る可逆的な状態と定義される。したがって、未病状態における細胞状態変化を捉え、その制御因子を標的化することができれば、病態が顕在化する前に細胞状態を健常側へ回復させる新たな介入が可能となる。未病状態を標的とした創薬は、未病バイオマーカーの同定による診断薬開発を含め、従来の病態進行後を対象とした創薬とは異なる薬効が期待できる新たな創薬戦略である。大きな変化が見られないことが想定される「未病」細胞状態の検出には、単一標的分子でなく、多種の生体分子群の総体（ネットワーク）として「細胞状態の改善」を目指す創薬戦略が必要である。さらに、微妙な細胞状態変化や多様化したモダリティの薬効を精密に記述するためには、細胞内の多様な生体分子情報（遺伝子・タンパク質・代謝産物など）や細胞・オルガネラなどの形態・空間情報などの「多次元生物情報」の統合が求められる。

我々が開発した共変動ネットワーク解析法（PLOM-CON 解析法）は、細胞の蛍光抗体染色画像ビッグデータを基盤として、細胞内タンパク質の量、翻訳後修飾、細胞内局在、さらには細胞・オルガネラの形態情報を特徴量として定量化し、それらの特徴量間に生じる「時間相関」あるいは「細胞間相関」を指標として、細胞状態を共変動ネットワークとして可視化・解析する手法である。本手法の特徴は、個々の分子の平均的な量的変化のみを捉えるのではなく、複数の分子・形態特徴量の間に形成される関係性の変化、すなわち相関構造の変化を検出できる点にある。疾患の初期段階や薬剤応答の超早期段階では、個々のタンパク質量には顕著な変化が現れない場合でも、タンパク質間の連関、翻訳後修飾と局在の結び付き、あるいは細胞内構造との関係性が先行して変化する可能性がある。PLOM-CON 解析法は、このような従来の平均値ベースの解析では捉えにくい微細な細胞状態変化を、ネットワークの再構成として高感度に検出できる点に強みを有する。さらに、細胞におけるタンパク質の量的変化、翻訳後修飾状態、細胞内局在変化を統合的に取得できるため、細胞状態の変化を分子レベルと空間レベルの双方から記述することが可能である。これにより、未病状態や薬剤応答初期のように表現型変化が顕在化する前の段階においても、細胞内ネットワークの歪みや再配線を指標として、疾患関連性の高い制御因子や介入標的候補を抽出することが期待される。

この戦略的シーズ育成事業では、PLOM-CON 解析および早期予兆シグナル検出のため動的ネットワークバイオマーカー理論を技術的基盤として、アルツハイマー病(AD)患者由来の iPS 細胞の神経新生不全再現系を用い、AD の病態発症の「予兆(未病)形態マーカー」を分子情報に紐付いた形態(空間)情報から精度良く抽出する解析システムを構築する。これにより未病バイオマーカー創出の POC を達成するとともに、創薬標的候補の抽出や薬効の分子機構推定も一体的に実施可能な、汎用的な細胞状態解析プラットフォーム技術としての発展も目指す。

1. 研究目的

本事業の目的達成のため、細胞状態変化検出を得意とする PLOM-CON 法と、細胞状態変化の「予兆（＝早期警告）」シグナル検出の理論（動的ネットワークバイオマーカー（DNB）理論）を最適にカップルさせ、超早期で起こる AD 神経分化不全に関わる「未病バイオマーカー」を

同定し、所有する健常及び AD 患者由来 iPS 細胞の神経分化再現系を用いてそのマーカーの妥当性を検証・評価する。その結果を基に、PLOM-CON 法と DNB 理論を基軸にした「未病バイオマーカー」創出の POC を達成する。

本研究の基盤技術である「Protein Localization and Modification-based Covariation Network (PLOM-CON)解析法は、特定のシグナル入力におけるタンパク質群の「量・質・局在」の変化を、大量の細胞の蛍光抗体染色画像を基にしてタンパク質ごとに特徴量として定量化し、特徴量同士の「時間相関」あるいは「細胞間相関」を指標にタンパク質「共変動ネットワーク」として可視化する手法である（図1）。この共変動ネットワーク解析法は、細胞に入力したシグナルの超早期の変化を相関解析により高感度なタンパク質ネットワーク変化として捉える。また、時間同調性さえ担保されれば、他のオミクスデータ、細胞画像から得られる形態（空間）情報をすべて結びつけ、多次元の分子・形態統合共変動ネットワークとして描くことができる。加えて、シングルセルレベルの分子・形態情報のデータセットを DNB 理論に適用することにより、細胞の状態に伴う形態変化の「予兆」を捉え、それを共変動ネットワークの多様な解析手法を駆使して分子情報と紐付けられる。このように本グループで確立する技術は、超早期の細胞形態変化で未病状態を非侵襲的に検知し、さらに紐付けられた分子情報からその分子機構推定まで活用できる、これまでにない日本発・世界初の技術である。

この戦略的シーズ育成事業では、本研究室で保有するアルツハイマー病(AD)患者由来の iPS 細胞の神経分化不全再現系を用い、AD の病態発症の「予兆(未病)形態マーカー」を分子情報に紐付いた形態（空間）情報から精度良く抽出する解析システムを構築する。

2. 研究成果

これまでの研究において、健常者および AD 患者由来 iPS 細胞株を取得し、神経分化誘導を行ったところ、分化誘導 28 日後の AD 細胞では神経分化が十分に進行しない神経分化不全の表現型が観察された[1]。一般に、iPS 細胞は初期化された細胞であり、iPS 細胞からの神経分化は胎生期様の発生過程を反映していると考えられる。一方で、我々の分化誘導系では、老化マーカーである SA-βGal の検出や、一部の SASP (senescence-associated secretory phenotype) 関連因子の発現が認められ、老化様の細胞状態を伴うことが示唆された。また、成人ヒト脳においても海馬などで神経新生が認められること、さらに AD 患者脳では神経新生が阻害されていることが報告されている。したがって、我々の細胞系は、AD 患者で観察される神経分化阻害を一定程度反映するモデルであると考えられる。この神経分化不全は孤発性 AD 由来 iPS 細胞株 8 株と家族性 AD 由来 iPS 細胞株 2 株でも再現されており、AD 細胞株で広く認められる表現型である

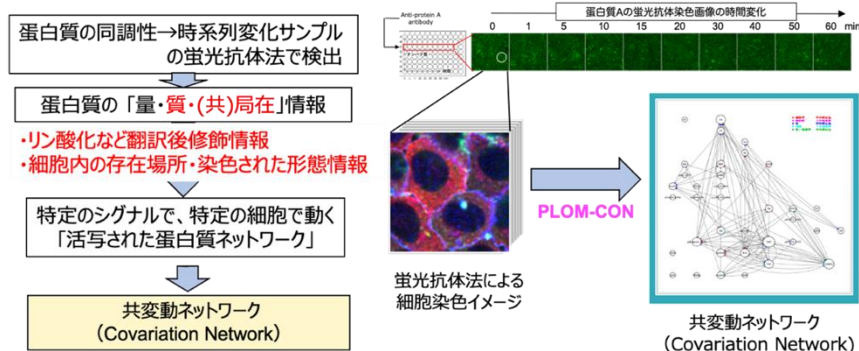


図1 PLOM-CON 解析法の概要

PLOM-CON 解析法とは、タンパク質特徴量の時間変化相関を元に共変動ネットワークを構築する技術である。タンパク質情報は、蛍光抗体法で特定タンパク質を蛍光染色した細胞画像から求める。特定の細胞環境におけるタンパク質の関係性を「相関」で表す。

[1]。また、我々は化合物スクリーニングにより、AD iPS 細胞の神経分化不全を回復させる化合物として ALK2/3 阻害剤 LDN-193189 (LDN)を同定している。興味深いことに、LDN 処理は神経分化誘導 7 日目から 12 日目までの神経幹細胞誘導期に限定して行った場合でも、AD 細胞の神経分化能を十分に回復させることを見出した（図2）。この結果は、神経分化初期における神経幹細胞分化過程での細胞状態制御が、AD 細胞の神経分化能の回復に重要であることを示している。そこで本研究では、神経分化初期における健常細胞と AD 細胞の状態差を高感度に検出することを目的として、形態—分子統合共変動ネットワーク解析を実施することとした。

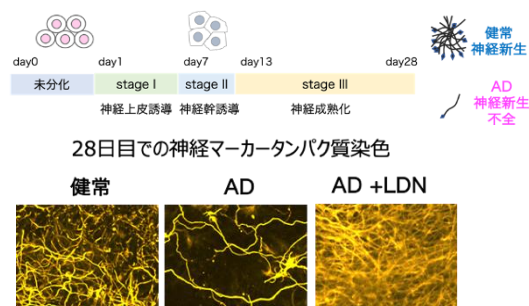


図2 神経分化誘導プロトコールと 28 日後の健常・AD・AD+LDN 条件での神経マーカータンパク質染色像

① PLOM-CON 解析パイプラインの高速化およびスケラビリティの確保

PLOM-CON 解析法は、主に①サンプル調製、②画像撮像（イメージング）、③画像解析、④数理解析の 4 工程で構成される。これまで、最終工程である「数理解析」には 1 ヶ月から 2 ヶ月を要しており、膨大な多次元データを扱う上での大きなボトルネックとなっていた。本手法の社会実装や多様な共同研究を並行して推進するためには、この解析プロセスの大幅なスピードアップとスケールアップが不可欠な課題であった。

そこで、本研究期間において、数理解析工程の効率化を目的に以下の施策を講じた。1. 解析体制の強化：数理解析を担当可能な人員を、従来の 1 名から 4 名体制へ

と拡充し、並列的な解析実行を可能とした。2. 解析パイプラインの標準化：研究室内の複数のメンバーが汎用的に利用できるよう、解析コードの整理・最適化を実施した。3. ワークフローの統合：個別に存在していた各解析コード間の連携をスムーズに繋ぎ込み、インプットデータからネットワーク構築までを一気通貫で実行できるパイプラインを構築した。

一連の効率化の結果、インプットデータから共変動ネットワークを導出するまでに要する期間を、従来の～10分の1に短縮することに成功した。これにより、数ヶ月を要していた大規模な解析が数週間単位で完結する体制が整った。本解析法の肝となるプロセスの大幅な時間短縮を実現したことは、今後関連する企業との共同研究や、多検体におよぶ臨床データの解析を円滑に実施する上で極めて重要な進展である。

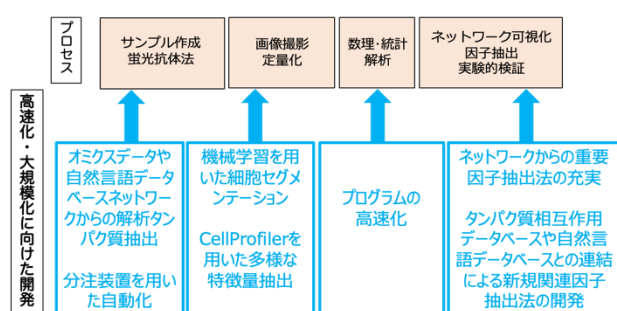


図3 PLOM-CON 解析法のプロセスと高速化・大規模化のための開発項目

② 時間相関型 PLOM-CON 解析法を駆使した形態特徴量の時間変化共変動ネットワーク構築

これまでの PLOM-CON 解析では蛍光抗体法による細胞染色画像をインプットとしてタンパク質の量・翻訳後修飾・局在情報を抽出し解析を実施してきた。今回は簡便な未病バイオマーカー検出を目指し、「形態特徴量」に着目した。形態特徴量とは、パターンやざらつき、規則性など、画像のテクスチャを表す特徴量であり、一つの画像から 100 以上の形態特徴量を抽出できることから、ネットワーク解析および後に行う DNB 解析にも活用可能であり、時間的にもコスト的にも負担の大きい蛍光抗体法のプロセスを最小化できると考えた。

まず、形態特徴量抽出のために用いる染色プローブおよび抗体の選定を行った。オルガネラや細胞骨格は細胞状態を反映する有用な形態指標となり得ると考え、各種オルガネラおよび細胞骨格に対する市販プローブ、ならびにそれらのマーカータンパク質に対する蛍光抗体法を実施した。その結果、形態や細胞内分布に興味深い変化を示すオルガネラ、細胞骨格マーカータンパク質を選定した。さらに、一細胞セグメンテーションのために核と細胞膜染色試薬も同時に染色し、これらの染色画像をネットワーク解析のためのインプットデータとして用いることとした。

次に、健常あるいはアルツハイマー病患者由来 iPS 細胞を神経分化誘導 7 日後、bFGF 刺激 0～6 時間の間での 10 点で細胞を固定し、プローブあるいは蛍光抗体法による染色を行った。細胞条件は、健常由来 iPS 細胞 (HC)、AD 由来 iPS 細胞 (AD)、LDN-193189 を同時処理した AD 由来 iPS 細胞 (LDN) の 3 条件である。電動ステージ搭載共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮像を行った。取得した画像に対してセグメンテーションを行い、一細胞ごとに細胞領域、核領域、各オルガネラ領域を規定した。さらに、同定した各領域の形態特徴量を抽出し、これらを PLOM-CON 解析に供した。

PLOM-CON 解析では、解析の目的に応じて 2 種類の共変動ネットワークを構築することができる。第一は、「時間変化相関」に基づく共変動ネットワークである。この解析では、bFGF 処理後 0～6 時間にわたる 10 タイムポイントのデータを連続的な時間変化として扱い、各タンパク質・形態特徴量が時間経過に伴ってどのように連動して変化するかを評価する。これにより、bFGF 刺激に対する細胞応答の過程で、どの分子・形態特徴量が時間的に協調して変動するかをネットワークとして可視化できる。

第二は、「細胞間相関」に基づく共変動ネットワークである。この解析では、各タイムポイントごとに取得された多数の単一細胞データを用い、同一時点における細胞間のばらつきを利用して、特徴量間の相関構造を計算する。すなわち、ある時点の細胞集団の中で、どのタンパク質・形態特徴量が細胞ごとに協調して高低を示すかを評価するものである。これにより、時間経過に伴って細胞集団内の共変動構造がどのように再編成されるかを、タイムポイントごとのスナップショットネットワークとして捉えることができる。

始めに、時間変化型共変動ネットワークを求めた。1000 以上の特徴量から構成されるネットワークであり、多数のクラスターに分かれた。多くのクラスターは各領域ごとに分かれており、同じオルガネラや細胞骨格の形態特徴量が強く相関するのは reasonable であると言える。その一方で、多くの構成要素からネットワーク間の違いを目視で検出するのは困難であった。そこで「相関異常度」を用いた変動特徴量の抽出を行った。相関異常度とは、2 つの条件間で構築した共変動ネットワークを比較し、各特徴量が他の特徴量と示す相関構造がどの程度変化したかを定量化する指標である。具体的には、各特徴量に接続する相関の強さや相関相手の変化を評価することで、条件間でネットワーク上の関係性が大きく変化した特徴量を抽出する。相関異常度解析の結果、HC と LDN 処理条件では大きな変化を示さず、AD 条件のネットワークにおいて特異的に変動する特徴量群は限定的であり、その変化量も必ずしも大きいものではなかった。一方で、抽出された特徴量の中には、特定のオルガネラ領域に由来する複数の形態特徴量が含まれていた (未発

表データ)。このことから、AD 細胞では全体的なネットワーク構造の大きな破綻というよりも、特定オルガネラの形態や細胞内分布に関わる局所的な共変動変化が生じている可能性が示唆された。したがって、これらのオルガネラ形態特徴量は、AD 特異的な細胞状態を反映する形態指標として有用である可能性がある。

③ 神経幹細胞分化過程を対象とした PLOM-CON 解析法を駆使した分子-形態統合共変動ネットワークの構築

さらに、これらの形態特徴量データと蛍光抗体法により取得した分子（タンパク質）特徴量データを統合し、形態-分子統合共変動ネットワークの構築を進めた。本解析は「時間変化相関」に基づき、形態特徴量とタンパク質特徴量が bFGF 処理後の時間経過に伴ってどのように連動して変化するかを評価するものである。具体的には、オルガネラや細胞骨格などから抽出した形態・分布・輝度に関する画像特徴量と、蛍光抗体染色により得られた各タンパク質の蛍光強度特徴量を同一の時間軸上で対応づけた。そして、形態特徴量と相関して変動するタンパク質特徴量を抽出することで、細胞形態やオルガネラ状態の変化に関与する分子ネットワークを明らかにすることを目的とした。これまでの研究において、シグナル伝達関連、神経分化関連転写因子などの 40 種類のタンパク質に対して、蛍光抗体染色により取得したタンパク質特徴量を用いた共変動ネットワークはすでに構築済みである。そこで本年度は、新たに取得・解析した形態特徴量に基づく共変動ネットワークを、この既存のタンパク質共変動ネットワークと統合した。これにより、分子レベルの変化と細胞・オルガネラ形態の変化を一体的に捉え、AD 細胞における神経分化初期の細胞状態異常を、形態—分子連関の変化として解析する基盤を構築した。構築した形態—分子統合共変動ネットワークについて、ネットワーク内で密に結合した特徴量群をクラスターとして抽出した。特に、形態特徴量とタンパク質特徴量が同一クラスター内に含まれる領域に着目することで、細胞・オルガネラ形態の変化と分子シグナル変化が連動して生じている可能性のある特徴量群を探索した。その結果、健常細胞および LDN により神経分化能が回復した AD 細胞では、特定オルガネラ形態とシグナル伝達分子の機能的連関が維持または回復しているのに対し、AD 細胞ではその連関が破綻している可能性を示唆した。今後は、このクラスターを構成するオルガネラ形態特徴量およびシグナル伝達分子に着目し、蛍光イメージングによる形態変化の定量、シグナル活性の評価、ならびに薬理学的介入実験を行うことで、AD 細胞における神経分化不全との関連性および LDN による回復機構への関与を検証する。

④ 細胞相関型シングルセル PLOM-CON 解析法を駆使した形態特徴量の細胞間共変動ネットワーク構築

次に、同一データセットを用いて、シングルセル型共

変動ネットワーク解析を実施した。シングルセル型共変動ネットワーク解析では、各タイムポイントにおいて取得された単一細胞ごとの形態・分子特徴量を用い、細胞間のばらつきに基づく特徴量間相関を算出する。すなわち、同一時点の細胞集団内で、どの特徴量が細胞ごとに協調して変動しているかを評価し、その相関構造を共変動ネットワークとして可視化する解析である。

本研究では、bFGF 処理後 0~6 時間の 10 タイムポイントについて、健常細胞、AD 細胞、AD 改善薬 LDN 処理細胞の 3 条件、および 2 種類の染色組み合わせを対象とし、合計 60 個のシングルセル共変動ネットワークを構築した。これにより、各時間点における細胞集団内のヘテロジェネイティ（不均一性）を、特徴量間の相関構造として動的に記述することが可能となった。

さらに、構築したネットワークに対して相関異常度を算出し、ヒートマップによる可視化を行った。これにより、健常、AD、および LDN 処理の 3 条件間で、どのタイムポイントにおいて、どの形態・分子特徴量を中心としたネットワーク構造の変化が生じているかを詳細に比較検討した。

相関異常度解析の結果、特定のオルガネラにおける形態特徴量では、特定の時間点で差異が大きくなるなどの変化は見られなかった。一方で、輝度に関連する特徴量群においては、全タイムポイントを通じて顕著な傾向が確認された。この結果は、LDN を投与しても輝度情報に反映される量的特徴については、健常状態まで十分に回復していない可能性を示している。一方で、時間変化に基づく PLOM-CON 解析では、疾患モデル条件に特徴的な変化が、ある特定のオルガネラの形態特徴量に認められ、LDN によってその時間的挙動が健常状態に近づく傾向が確認された。以上の結果から、本解析により、単一の特徴量の増減だけでは捉えにくい細胞状態の変化を、形態情報と分子情報の共変動構造として検出できることが示された。

細胞画像から抽出した形態特徴量を用いた共変動ネットワーク解析により、AD 細胞に特異的な変化を示す特定オルガネラ由来の形態特徴量を抽出することができた。さらに、タンパク質特徴量の時間相関変化を加えた形態—分子統合共変動ネットワーク解析を行った結果、健常細胞および LDN により神経分化能が回復した AD 細胞では、特定オルガネラ形態と特定分子の変動が連動しているのに対し、AD 細胞ではその共変動関係が失われている可能性を示した。すなわち、個々の特徴量の増減だけではなく、形態特徴量と分子特徴量の「関係性」そのものが、AD 細胞状態を反映する新規マーカーとなり得ることが示唆された。

今後は、当該クラスターを構成するタンパク質に着目し、ノックダウンや阻害剤処理によりその発現または活性を抑制した際に、特定オルガネラ形態がどのように変化するかを検証する。さらに、これらの介入が神経細胞分化過程に及ぼす影響を解析することで、抽出された形

態—分子共変動クラスターが AD 細胞における神経分化不全および LDN による回復機構に関与するかを実験的に明らかにする予定である。

【参考文献】

1. Nakatsu D, Kunishige R, Taguchi Y, Shinozaki-Narikawa N, Osaka K, Yokomizo K, Ishida M, Takei S, Yamasaki S, Hagiya K, Hattori K, Tsukamoto T, Murata M, Kano F. Stem Cell Reports. 2023 Mar 14;18(3):688-705. doi: 10.1016/j.stemcr.2023.01.004.

業績

【原著論文】

なし

【総説】

村田昌之、加納ふみ,実験医学増刊,44(5),627-634(2026)

【書籍】

なし

【口頭発表】

なし

【特許】

(1)国内特許出願 0 件

(2)国際特許出願 0 件