

## 博士学位論文内容要旨

[論文題目] 機械学習を用いた *in vitro* 神経回路活動の

解析法の開発

( Development of analysis methods for *in vitro*

neural circuit activities using machine learning )

[提出者] 東北工業大学大学院工学研究科

電子工学専攻

学生番号

181902

氏名

松田 直毅

指導教員

鈴木 郁郎

# 機械学習を用いた *in vitro* 神経回路活動の解析法の開発 (Development of analysis methods for *in vitro* neural circuit activities using machine learning)

松田 直毅 (Naoki Matsuda)

Development of an *in vitro* drug safety assessment based on the function of the neural network is required in preclinical studies. In particular, *in vitro* microelectrode array (MEA) assessment using human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived neurons holds promise as a method of seizure and toxicity evaluation. However, there are still issues surrounding the analysis methods used to predict seizure and toxicity liability as well as drug mechanisms of action. In this study, we developed an artificial intelligence (AI) capable of predicting the seizure liability of drugs in *in vitro* neural circuit activities. First, we developed a 4-step method that can accurately detect synchronized burst firing (SBF), which is a major parameter of the *in vitro* neuronal circuit activities, and developed the SBF detection AI using the SBFs detected by the 4-step method as teacher data. This SBF detection AI enables unified detection of SBFs and improves toxicity evaluation accuracy. Next, we developed an AI for predicting seizure liability of drugs and mechanism of action of drugs using raster plot images. It has become possible to realize dose-dependent toxicity determination of unlearned drugs, predict drug names, and rank drug toxicity risks. Finally, we discussed the approaches to have extrapolability *in vivo* in the developed *in vitro* method for predicting seizure liability. These results suggest that the developed AI analysis methods will greatly advance the method for predicting seizure liability of drugs using *in vitro* MEA data, and future practical application is expected.

## 1. はじめに

創薬開発において、臨床試験で副作用が検出された場合、コストと時間の大幅な損失が発生する為、非臨床段階での精度の高い副作用検出法が望まれている。臨床試験で脱落した候補化合物は、神経系で毒性が見つかる場合が多く、脱落した全化合物の34%が中枢神経系における副作用であることが報告されている<sup>1)</sup>。その原因は、非臨床段階で、神経毒性を検出できる評価系が十分でないこと、および実験動物とヒトにおける「種差の壁」の問題だとされている。神経毒性で最も重篤かつ頻度が高い毒性である痙攣は、臨床試験で発覚した場合、即開発中止になる場合が多く、非臨床段階での精度の高い評価系が強く求められている。有効な解決方法の一つはヒトへの外挿性を有しているヒト iPS 細胞由来ニューロンの利活用である。近年、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした医薬

品の痙攣毒性評価法の構築が期待されている。特に、神経ネットワーク活動を非侵襲ハイスループットに計測可能な微小電極アレイ (Micro electrode array; MEA) を用いた評価法が国内外で着目されており、産官学が連携したコンソーシアム等が立ち上がっている。これまでの研究により、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動および既知の痙攣陽性化合物による活動の変化は検出できるようになった<sup>2-14)</sup>。しかしながら、MEA から得られた神経活動のビックデータをどのように解析すれば、医薬品の痙攣毒性リスクを予測できるのか、解析法の構築が国内外の共通の課題となっている。

そこで本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの *in vitro* MEA データから医薬品の痙攣毒性を予測する解析法の開発を目的とした。具体的には、*in vitro* の中枢神経ネットワークの電気活動において、主要な電気活動

現象であり、主要な解析パラメータとなる同期的活動「同期バースト発火」を正確かつ施設間で統一的使用できる検出法の開発、神経ネットワーク活動の時系列パターンから医薬品の痙攣毒性予測や作用機序を予測する解析法の開発、開発した *in vitro* の痙攣毒性予測法を生体 (*in vivo*) への外挿性を担保できる予測法とする為の脳波における痙攣前兆状態検出 AI の開発である。

## 2. 4-step methods を用いた同期バースト発火検出法の開発

医薬品の応答解析の主要なパラメータは同期バースト発火の頻度や長さ、規則性、同期バースト内のスパイク数など、同期バースト発火に関するパラメータが用いられている。しかしながら、同期バーストを正確に検出する方法は確立しておらず、検出法も施設間で統一されていない為、検出法によって薬剤応答の結果が左右される状況となっている。ここでは、熟練の研究者が目的とする同期バースト発火の個数と長さを正確に検出可能な 4-step method を開発した。4-step method は、次の 4 つのステップで構成される。ステップ 1 : 発火間隔 (Inter Spike Interval : ISI) を算出し、ISI が閾値  $X$  ms 以下の場合、同一の同期バーストを構成する発火として定義した。ステップ 2 : 同期バーストを構成する発火数を算出し、発火数が  $X$  spikes / SBF 未満の同期バーストを非同期バーストと定義した。

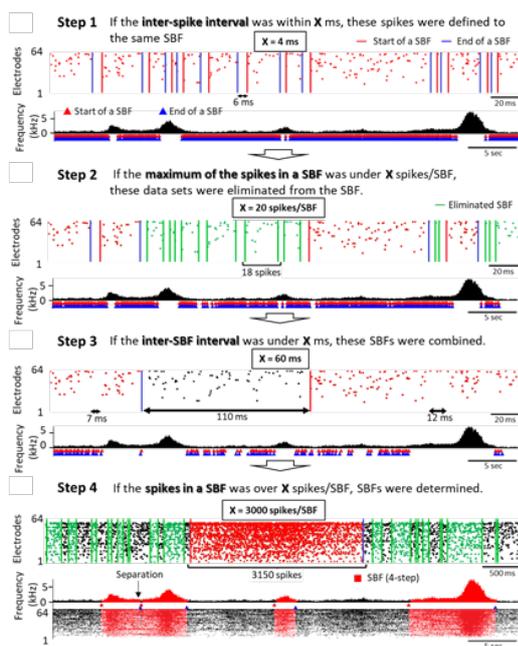


Fig.1 4-step SBF detection method.

ステップ 3 : 同期バースト間隔 (Inter Burst Interval : IBI) を算出し、IBI が閾値  $X$  ms 以下の場合、2 つの同期バーストを結合し、2 つのバースト間の発火を 1 つの同期バーストとして定義した。ステップ 4 : 同期バーストを構成する発火数を算出し、発火数が  $X$  spikes / SBF 未満の同期バーストを非同期バーストと定義した。(Fig. 1)。

従来のバースト検出法と 4-step method を用いて、ヒト iPS 細胞由来大皮質ニューロンを比較した結果、4step method は同期バーストの持続時間を正確に検出し、連続した同期バーストの識別と誤検出の防止を可能にした (Fig. 2)。

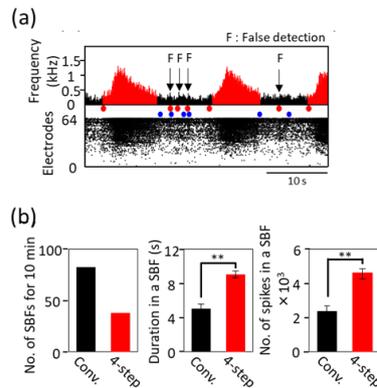


Fig.2. Difference in SBF detection between the conventional and 4-step methods. (a) The AWSDRs, raster plots showing a firing pattern typical for a low ratio of SBFs, and the SBFs detected by the conventional and 4-step methods. F indicates a false detection by the conventional method. (b) Analyzed SBFs by both methods. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

次に、施設間で統一した同期バースト発火の検出を実現する為、4-step method によって正確に検出した同期バースト領域のラスタプロット画像を学習した、同期バースト検出 AI を開発した (Fig. 3)。

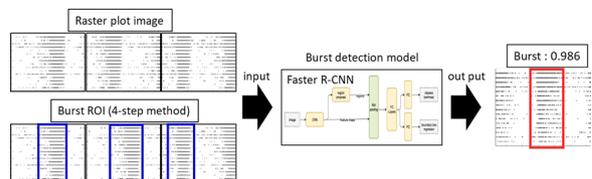


Fig.3. Schematic of the burst detection algorithm

作製した AI モデルが形状や強さが異なる同期バーストを正確に検出できるかを調べるため、培養状況や投与した痙攣陽性化合物が異なる 178 サンプルのデータを用いて 4-step method で検出した同期バーストと AI が検出した同期バーストを比較した (Fig.

4)。この同期バースト検出モデルは同期バーストの個数を100%、同期バーストの長さを92%の精度で同期バーストを検出した。バースト検出モデルは4-step method に比べ、研究者の目視による閾値設定を必要とせず、より高速に解析できる。また、国内外全施設の同期バースト発火を統一した基準で検出することが可能となることから、新しい解析プラットフォームとしての展開が期待される。

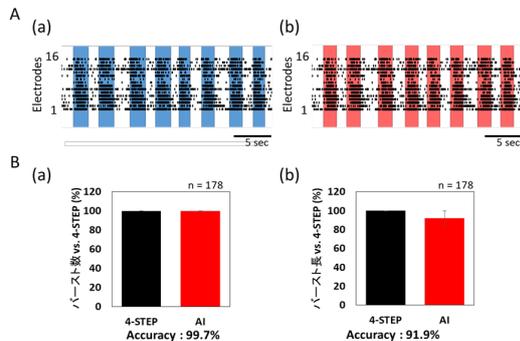


Fig.4. Difference in SBF detection between 4-step method and burst detection model. (A) Raster plots for 30 sec and Typical SBF detection using (a) 4-step methods and (b) burst detection model. The blue area shows the SBF detected. The red area shows the SBF detected by burst detection model. (B) Comparison of SBF analysis. (a) Number of SBFs/10 min. (b) Duration of an SBF. Black bar, 4-step detection method; red bar, burst detection model.

### 3. AI を用いた神経活動の毒性・薬剤名予測法の開発

ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた *in vitro* MEA データから医薬品の痙攣毒性リスクや作用機序の予測を可能とする、神経ネットワーク活動のラスタープロット画像を用いた痙攣リスク予測AIおよび薬剤名予測AIを開発した。(Fig. 5)。

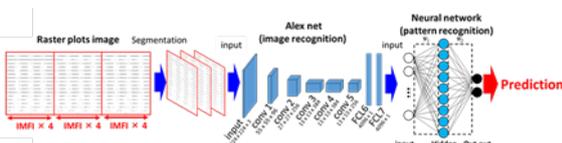


Fig.5 Data flow and architecture of seizure risk prediction model. w1 is the weight between the input layer and the hidden layer, w2 is the weight between the hidden layer and the output layer.

痙攣リスク予測AIは学習薬剤において90%以上の予測精度で痙攣陽性化合物と陰性化合物の応答を正確に分離し、未学習薬剤の痙攣リスクも用量依存的に判定した(Fig. 6)。薬剤名予測AIは13種類の化合物の応答と陰

性化合物の応答を識別し、全薬剤の平均予測精度は99.9±0.1%であった(Table. 1)。本AI予測法は、痙攣リスクの用量依存性、痙攣リスク確率に基づく痙攣リスクの順位付け、化合物の作用機序を識別する能力を有しており、精度の高い強力な新規痙攣リスク予測法としての有効性が示唆された。*in vitro* MEA データを用いた医薬品の痙攣毒性予測法を大きく前進させる成果であり、今後の実用が期待できる成果である。

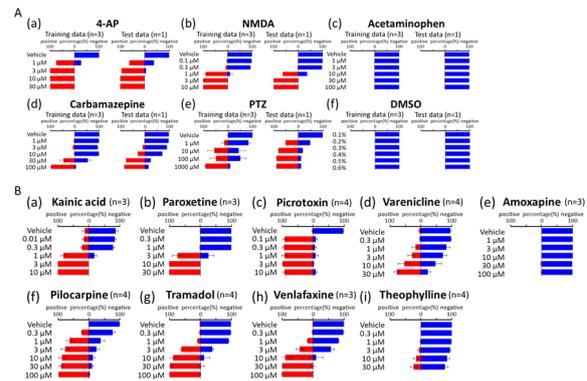


Fig.6 Dose-dependent prediction of seizure risk.

Table.1 Probability of drug name in each concentration data predicted by AI.

Drugs	Prediction	Concentration (μM)										
		Vehicle	1	3	10	30	100	1000	10000	100000	1000000	10000000
4-AP	negative control	99.7	28.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4-AP	0	70.5	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Amoxapine	negative control	100	61.8	18.8	28.7	14.0	0.3	0	0	0	0	0
	Amoxapine	0	38.2	81.2	71.3	85.9	99.7	100	100	100	100	100
Carbamazepine	negative control	99.4	95.1	89.3	70.6	1.4	0.1	0	0	0	0	0
	Carbamazepine	0.6	4.9	10.6	29.1	98.6	99.9	100	100	100	100	100
Kainic acid	negative control	99.5	94.7	97.4	0.1	0	0	0	0	0	0	0
	Kainic acid	0.5	4.5	1.7	99.9	100	100	100	100	100	100	100
NMDA	negative control	100	98.8	94.0	13.5	0.1	0	0	0	0	0	0
	NMDA	0	0.5	1.3	70.2	99.9	100	100	100	100	100	100
PTZ	negative control	100	82.8	29.2	19.4	0	0	0	0	0	0	0
	PTZ	0	12.2	58.4	77.5	100	100	100	100	100	100	100
Paroxetine	negative control	100	0.3	1	3	10	30	100	100	100	100	100
	Paroxetine	0	100	89.9	0	0	0	0	0	0	0	0
Picrotoxin	negative control	100	1.1	0.1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Picrotoxin	0	95.1	99.9	100	100	100	100	100	100	100	100
Pilocarpine	negative control	100	0.3	1	3	10	30	100	100	100	100	100
	Pilocarpine	0	75.6	16.9	2.1	0	0	0	0	0	0	0
Theophylline	negative control	99.7	21.1	82.4	97.6	100	100	100	100	100	100	100
	Theophylline	0.3	0.3	1	3	10	30	100	100	100	100	100
Tramadol	negative control	100	99.7	66.5	26.3	12.3	1.2	0	0	0	0	0
	Tramadol	0	0.3	9.0	33.1	73.3	87.3	98.8	100	100	100	100
Varenicline	negative control	100	0.3	1	3	10	30	100	100	100	100	100
	Varenicline	0	99.8	88.7	53.6	18.1	0.3	0	0	0	0	0
Venlafaxine	negative control	99.9	0.1	2.2	19.8	60.5	99.8	100	100	100	100	100
	Venlafaxine	0.1	97.3	68.5	32.6	0.1	0	0	0	0	0	0
Acetaminophen	negative control	100	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.6%	0	0	0	0
	others	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DMSO	negative control	100	0	0	0.1	0.2	0	0	0	0	0	0
	others	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### 4. 生体脳波における痙攣前兆検出法の開発

*in vitro* の毒性予測法をより精度の高い予測法とする為に、*in vivo* への外挿性を担保できる方法への取り組みを行った。精度の

高い予測法とするためには、偽陰性を排除する必要がある。そこで、*in vivo*で痙攣兆候が見られる場合の脳室内濃度を毒性用量として決定し、その用量での *in vitro* MEA データを毒性とラベルして AI に学習させる方法が有効であると考えられる。その為に、*in vivo* で痙攣前兆を検出する方法として脳波に着目し、痙攣の脳波特性を学習した周波数画像 AI を開発した (Fig. 7)。

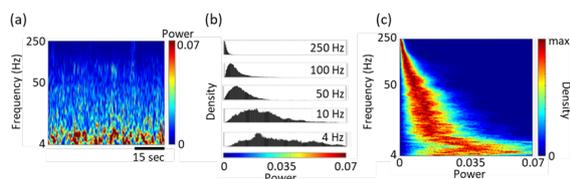


Fig.7 Histogram image of frequency intensity distribution (a) scalogram image. (b) histogram of frequency intensity distribution at each frequency. (c) Histogram image of frequency intensity distribution.

具体的には、痙攣の周波数特性を可視化する周波数強度分布ヒストグラム画像作製法を開発した。周波数強度分布ヒストグラム画像を学習した AI は、投与前の正常な脳波と痙攣状態を 100%の精度で判別するとともに、一般状態観察で痙攣が確認されるよりも早期に痙攣リスクを検出した。また、痙攣が観察されない低用量投与の脳波データから、痙攣リスクの検出に成功した (Fig. 8)。

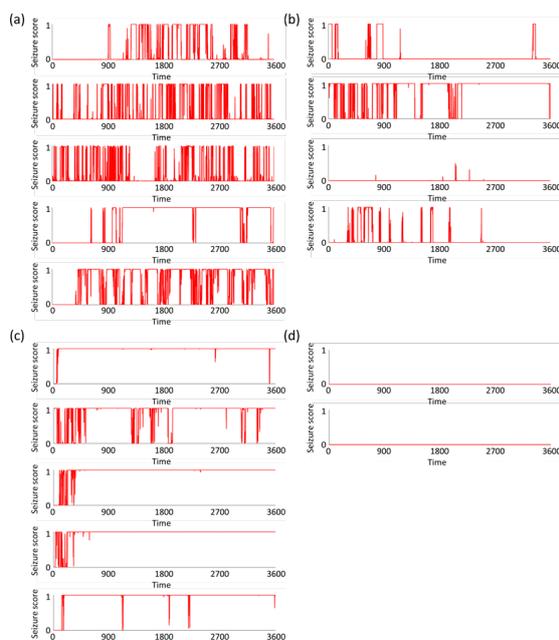


Fig.8 Prediction of seizure aura in ECoG data. (A) Seizures score by AI prediction. (a)4-AP, (b) strychnine, (c) Pilocarpine, (d)Vehicle.

痙攣前兆時の脳室内濃度における *in vitro*

MEA データを取得し、その用量を AI に学習させれば、より精度の高い *in vitro* 痙攣毒性予測法となることが期待される。

## 5. おわりに

本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの *in vitro* MEA データから精度の高い医薬品の痙攣毒性予測を実現することを目的に、機械学習を用いた神経回路活動の解析法を3つ開発した。初めに、培養中枢神経ネットワークの化合物評価パラメータとして最も重要な「同期バースト発火」を正確に検出する新しい手法 (4-step method) の開発した<sup>15)</sup>。 *In vitro* MEA データから同期バースト検出が行われ、約 50 年になるが、最も正確に検出できる方法であると考えられる。次に、施設間で統一した同期バースト発火の検出を実現する為に、開発した 4-step method で検出した同期バースト発火を教師データとした同期バースト発火検出 AI を開発した。同期バースト発火検出 AI は研究者の目視による閾値設定を必要しない為、国内外全施設の同期バースト発火を統一した基準で検出することが可能となり、新しい解析プラットフォームとしての展開が期待される。同期バースト発火関連パラメータは痙攣毒性予測の主要なパラメータである為、本研究で開発した同期バースト発火検出法は、神経機能を指標とした痙攣毒性評価系の構築を加速させる成果であると言える。また、本研究で開発した同期バースト発火検出法は、*in vitro* MEA データのみならず、脳スライスや *in vivo* 脳の電気活動データにも適用可能であり、Ca<sup>2+</sup>指示薬や膜電位感受性色素を用いた光イメージング法で取得されたデータにも適用可能である。神経科学領域において、幅広い汎用性を有し、様々な分野の基礎研究および応用研究へと展開できるものである。

次に、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた *in vitro* MEA データから医薬品の痙攣毒性リスクや作用機序の予測を可能とする、神経ネットワーク活動のラスタプロット画像を用いた痙攣リスク予測 AI および薬剤名予測 AI を開発した。ラスタプロットは同期バーストの情報を含んでおり、これまで研究者が算出してきた解析パラメータよりも遥かに多い 4096 次元の特徴量に基づき毒性や作用機序を予測する方法である。本 AI 予測法は、痙攣リスクの用量依存性、痙攣リスク確率に基づく痙攣リスクの順位付け、化合物の

作用機序を識別する能力を有しており、精度の高い新規痙攣リスク予測法としての有効性が示唆された。*in vitro* MEA データを用いた医薬品の痙攣毒性予測法を大きく前進させる成果であり、今後の実応用が期待できる。また、本研究で開発したラスタープロットを用いた機械学習法は、他に報告例が無く、新規性を有しているとともに、汎用性が非常に高い技術である。ラスタープロットは *in vitro* MEA データのみならず、*in vivo* の電気活動記録や  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬や膜电位感受性色素などの光イメージング計測によって得られる神経活動解析全般で使用されている。神経系の電気活動を対象とした基礎研究および応用研究全般に適用できる方法であることから、本研究開発の意義は非常に高いものである。

最後に、*in vitro* の毒性予測法をより精度の高い予測法とする為に、*in vivo* への外挿性を担保できる方法への取り組みについて述べた。*in vivo* で痙攣前兆を検出する方法として脳波に着目し、痙攣の脳波特性を学習した周波数画像 AI を開発した。具体的には、痙攣の周波数特性を可視化する周波数強度分布ヒストグラム画像作製法を開発し、機序の異なる痙攣前兆であっても共通する強度分布の変化を捉えることのできる AI を開発した。AI は、痙攣リスクの特徴を捉えることによって、投与前の正常な脳波と痙攣状態を 100% の精度で判別し、一般状態観察では難しかった痙攣前兆状態を検出することを可能とした。本研究により、前兆状態が観察された脳室内濃度の同定が可能となったことから、同定した用量に基づいて、*in vitro* MEA データの AI 解析法を修正して行くことで、*in vivo* への外挿性も担保でき、これまでに無い精度の前臨床段階における医薬品の痙攣毒性評価法が構築できると期待される。また、脳波から痙攣前兆状態を捉えることができる本技術は、動物実験の脳波データのみで痙攣毒性予測を行う方法としても有効であり、実用化が期待されるとともに、脳波データ全般に使用できる解析法であることから、医薬品の痙攣毒性予測のみならず、これまで評価が難しかった頭痛などの他の副作用検出にも有効であると考えられる。また、教師として学習させるデータを変更することで、脳機能の基礎研究および様々な応用研究にも適用できる技術であり、汎用性が非常に高い技術である。

本研究は、*in vitro* MEA データを用いた医薬品の痙攣毒性予測法を構築する為に、機械

学習を用いた神経回路活動の 3 つの解析技術を開発した。本研究開発により、前臨床試験における医薬品の痙攣毒性検出の精度が高くなると期待できる。また、本研究で開発した「機械学習を用いた神経回路活動の解析技術」は、データ駆動型神経科学を発展させる技術開発であるとも言える。

## Reference

1. Cook D, et al. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nature reviews Drug discovery* 13, 419-431 (2014).
2. Odawara A, Saitoh Y, Alhebshi A, Gotoh M, Suzuki I. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived
3. Ishii MN, Yamamoto K, Shoji M, Asami A, Kawamata Y. Human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons respond to convulsant drugs when co-cultured with hiPSC-derived astrocytes. *Toxicology* 389, 130-138 (2017).
4. Odawara A, Katoh H, Matsuda N, Suzuki I. Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture. *Scientific reports* 6, 1-14 (2016).
5. Bardy C, et al. Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, E2725-E2734 (2015).
6. Kreir M, et al. Do in vitro assays in rat primary neurons predict drug-induced seizure liability in humans? *Toxicology and Applied Pharmacology* 346, 45-57 (2018).

7. Bradley JA, Strock CJ. Screening for Neurotoxicity with Microelectrode Array. *Current Protocols in Toxicology* **79**, e67 (2019).
8. Amin H, Maccione A, Marinaro F, Zordan S, Nieus T, Berdondini L. Electrical responses and spontaneous activity of human iPS-derived neuronal networks characterized for 3-month culture with 4096-electrode arrays. *Frontiers in neuroscience* **10**, 121 (2016).
9. Odawara A, Matsuda N, Ishibashi Y, Yokoi R, Suzuki I. Toxicological evaluation of convulsant and anticonvulsant drugs in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks using an MEA system. *Scientific reports* **8**, 1-11 (2018).
10. Ojima A, Miyamoto N. Method for MEA Data analysis of drug-treated rat primary neurons and human ipsc-derived neurons to evaluate the risk of drug-induced seizures. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **138**, 823-828 (2018).
11. Tukker AM, Wijnolts FM, de Groot A, Westerink RH. Human iPSC-derived neuronal models for in vitro neurotoxicity assessment. *Neurotoxicology* **67**, 215-225 (2018).
12. Yokoi R, Okabe M, Matsuda N, Odawara A, Karashima A, Suzuki I. Impact of sleep-wake-associated neuromodulators and repetitive low-frequency stimulation on human iPSC-derived neurons. *Frontiers in neuroscience* **13**, 554 (2019).
13. Shirakawa T, Suzuki I. Approach to Neurotoxicity using Human iPSC Neurons: Consortium for Safety Assessment using Human iPS Cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, (2020).
14. Roberts R, et al. Can We Panelize Seizure? *Toxicological Sciences* **179**, 3-13 (2021).
14. Matsuda N, Odawara A, Katoh H, Okuyama N, Yokoi R, Suzuki I. Detection of synchronized burst firing in cultured human induced pluripotent stem cell-derived neurons using a 4-step method. *Biochemical and biophysical research communications* **497**, 612-618 (2018).