

# 機械学習によるがん化シグナルに特異的な $\gamma$ -H2AX foci パターンの抽出

## —ストレス応答予測における $\gamma$ -H2AX foci パターン認識の有効性—

### 概要

ヒストン H2A のバリエーションである H2AX は、放射線によって曝露された細胞でリン酸化され、DNA 損傷部位でドット状の構造体 ( $\gamma$ -H2AX foci) を作ることで蛍光免疫組織学的解析で明らかになっています。これまでに我々は、ヒストンアセチル化酵素 TIP60 が、このリン酸化された H2AX をさらにアセチル化し、がん抑制を促すことを見出していますが、このアセチル化活性が $\gamma$ -H2AX foci 形成にどのような影響を持つのかについては不明でした。今回、京都大学生命科学研究科の井倉毅准教授、古谷寛治講師、井倉正枝研究員からなるグループは、TIP60 のアセチル化活性を阻害した細胞と阻害していないコントロール細胞を用いて放射線照射後の $\gamma$ -H2AX foci の輝度と大きさについて蛍光免疫染色の画像データを機械学習解析し、がん化に特異的な $\gamma$ -H2AX foci のパターンが存在することを見出しました。今後、この成果は、放射線発がんのリスク回避の予測や抗がん剤の安全性評価などに貢献できることが期待されます (図 1)。本研究成果は 2022 年 12 月 24 日に国際学術誌「Genes to Cells」にオンライン掲載されました。

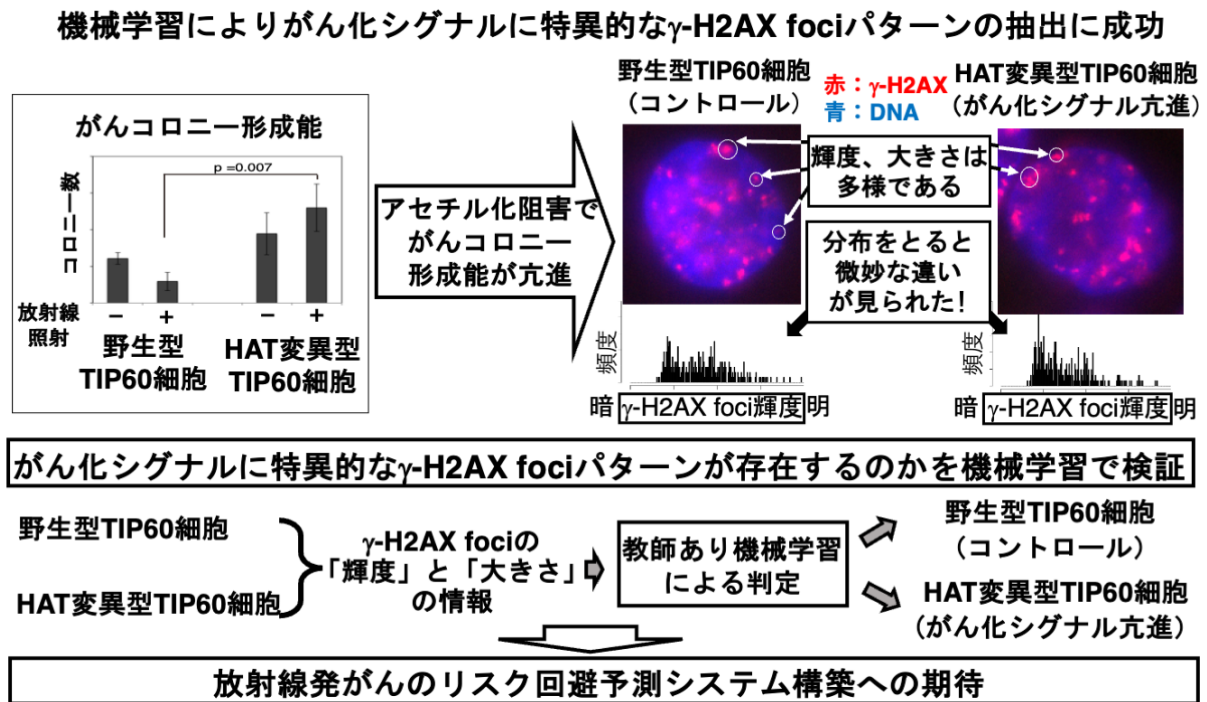


図 1：放射線照射後の $\gamma$ -H2AX foci の輝度と大きさが多様であることに着目し、蛍光免疫染色の画像データを機械学習解析することで、がん化に特異的な $\gamma$ -H2AX foci のパターンが存在することを初めて証明しました。本システムは、低線量率放射線におけるリスク予測評価、放射線誘発がん予防、抗がん剤の変異原性判定、毒性検査などに将来的に貢献することができます。

## 1. 背景

染色体 DNA を折りたたむ役割を果たすとして知られているヒストンタンパク質の一つである、H2AX タンパク質<sup>\*1</sup>は、放射線を受けた細胞ではリン酸化と呼ばれる化学修飾を受けます。リン酸化された H2AX ( $\gamma$ -H2AX) は放射線などにより傷ついた DNA の上に集積し、DNA 損傷の修復などの化学反応を行うためのプラットフォームとして働く重要な役割をはたします。この $\gamma$ -H2AX は免疫抗体染色<sup>\*2</sup>という手法で細胞核内の多数のドット状の構造体 ( $\gamma$ -H2AX foci<sup>\*3</sup>) として観察されます。我々のグループでは、これまでに、ヒストン H2AX がリン酸化だけでなく、ヒストンアセチル化酵素 (HAT<sup>\*4</sup>) TIP60 によってアセチル化され、アセチル化された $\gamma$ -H2AX が損傷 DNA に取り込まれることにより DNA 損傷シグナルを活性化させることを明らかにし、この TIP60 のアセチル化活性を細胞内で阻害するとがん化シグナルが亢進することを見出してきました (Ikura T., et al., Mol. Cel. Biol. 2007., Ikura M., et al., Mol. Cel. Biol. 2015, 2016, 2022)。一方、蛍光免疫組織学的解析による 1 細胞核内の個々の $\gamma$ -H2AX foci の輝度、大きさは、それぞれ異なり、多様であることに着目し、TIP60 のアセチル化を阻害した細胞 (HAT 変異型 TIP60 発現細胞) と阻害していない細胞 (野生型 TIP60 細胞) 間で、 $\gamma$ -H2AX foci 画像における輝度と大きさの分布を比較したところわずかな違いがあることに気づきました。TIP60 のアセチル化酵素活性を細胞内で阻害すると足場非依存性のコロニー形成能が増大することを我々は明らかにしていることから (Ikura M., et al., Mol. Cel. Biol. 2022)、このアセチル化が $\gamma$ -H2AX foci の輝度と大きさになんらかの影響を与え、がん化シグナルと関連する $\gamma$ -H2AX foci のパターンが潜んでいる可能性が示唆されました。しかしながらこの可能性については全く検討されてきませんでした。

## 2. 研究手法・成果

近年の機械学習解析の発展は、画像解析において大きな成果を上げています。人工知能 (AI) を用いることで、人間の目では検出できない微妙な変化やパターンを識別します。教師あり機械学習では、私たちがアノテーションした教師データを機械学習により学習させ、未知のデータが正解かどうかを判定します。また、教師なし機械学習では検出したパターンの似ているものをグループ化 (クラスタリング) します。本研究では、これらの機械学習の手法を用いて、野生型 TIP60 細胞と HAT 変異型 TIP60 細胞間の $\gamma$ -H2AX foci のパターンを解析しました。まず、教師あり機械学習を行ったところ、 $\gamma$ -H2AX foci の「輝度」と「サイズ」の情報を教師データとして用いて学習させることで初めて HAT 変異型 TIP60 細胞を効率よく言い当てることができるようになりました (図 1)。この教師あり機械学習により比較的がんリスクが低い低線量率放射線においても HAT 変異型 TIP60 細胞を言い当てることができました。すなわち、非常に微妙ながん化シグナルの亢進も検出する、高感度な手法であることを示しています。さらに教師なし機械学習として Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) 法により次元削減を行い、k-means 法を用いてクラスタリングを行うことで、 $\gamma$ -H2AX foci の輝度、大きさを元にしたグループ分けを試みました。その結果、HAT 変異型 TIP60 細胞を多く含むグループ (Group 3) を同定することができました (図 2)。これはがん化シグナルに特異的な $\gamma$ -H2AX foci パターンを持つ細胞が細胞集団として存在することを初めて実証した成果です。

### 3. 波及効果、今後の予定

今回構築した、機械学習により $\gamma$ -H2AX foci パターンからがん化シグナルが亢進しているかどうかを判定するシステムは、低線量率放射線におけるリスク予測評価、放射線誘発がんの予防、抗がん剤の変異原性判定や毒性検査などに将来的に貢献することができると考えられます。

我々の成果は、多様なシグナルの中から意味のある特徴的なパターンを抽出するにあたり機械学習によるアプローチが有効であることを示しています。一方で、今回の機械学習による、がん化シグナルの亢進を指し示す $\gamma$ -H2AX foci パターンの抽出は完全ではありませんでした。その理由は、幾つか考えられます。その一つとして考えられるのは、顕微鏡画像が2次元の免疫抗体染色であった点です。高解像度顕微鏡による3次元の $\gamma$ -H2AX foci の構造情報や、細胞核内の空間情報が完全な抽出に必要である可能性があります。その他の可能性として、野生型 TIP60 細胞においてもがんシグナルに特異的な $\gamma$ -H2AX foci パターンが確認されたことから、TIP60 のアセチル化酵素活性に依存しないがんシグナルに特異的な $\gamma$ -H2AX foci パターンに影響を与える因子の存在が考えられます (図2)。この因子の同定に関しては、H2AX を含めたタンパク質複合体解析アプローチと今回の機械学習解析との融合研究によるアプローチを遂行することで可能となります。今後、がん化シグナルに特異的な $\gamma$ -H2AX foci パターンを見定めることが、発がんリスクの精度の高い予測システムの構築につながることを期待されます。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会科学研究費・基盤研究(B)「放射線障害応答の多様性を規定する動的クロマチン制御を介した NAD 代謝ネットワーク」(20H04336、代表:井倉毅)、同・基盤研究(C)「線量率効果におけるアセチル化シグナルの多様性とエピジェネティクス制御」(19K12321、代表:井倉正枝)、公益財団法人鈴木謙三記念医科学応用研究財団、放射線災害・医科学研究拠点(ともに井倉毅)、情報・システム研究機構戦略的研究プロジェクト、東北大学加齢医学研究所共同研究(ともに古谷寛治)による支援を受けました。

#### <用語解説>

\*1 **ヒストン H2AX**:DNA を折りたたむ役割を果たすヒストンタンパク質、ヒストンバリエーションの一つ。特殊なクロマチン(染色体 DNA と蛋白質を含む構造体)構造を付与する役割を持つ。

\*2 **免疫抗体染色法**:リン酸化 H2AX など特定の細胞内因子を認識する抗体に蛍光標識を付加させ、その抗体を用いて標的因子が細胞内のどこに位置するかを同定する実験手法。蛍光免疫染色ともいう。

\*3  **$\gamma$ -H2AX foci**:リン酸化された H2AX が細胞核内の DNA 損傷が生じた場所に集積し、免疫抗体染色法により可視化した際にドット状のシグナルとして細胞核内に観察される構造体。

\*4 **HAT**:ヒストンタンパク質にアセチル化修飾を付加する酵素 (*Histone Acetyltransferase*) の略語

#### <研究者のコメント>

Bulk の細胞を用いた実験では見出すことのできなかつた個々の細胞の微弱なシグナルを抽出することに機械学習などの数理的なアプローチが有用であることを今回体感できたことは我々にとって貴重な経験でした。今後、既存の生化学、分子生物学と機械学習を含めた数理的アプローチとの融合研究を展開し、社会的貢献度の高い研究を目指していきたいと思っております。

<論文タイトルと著者>

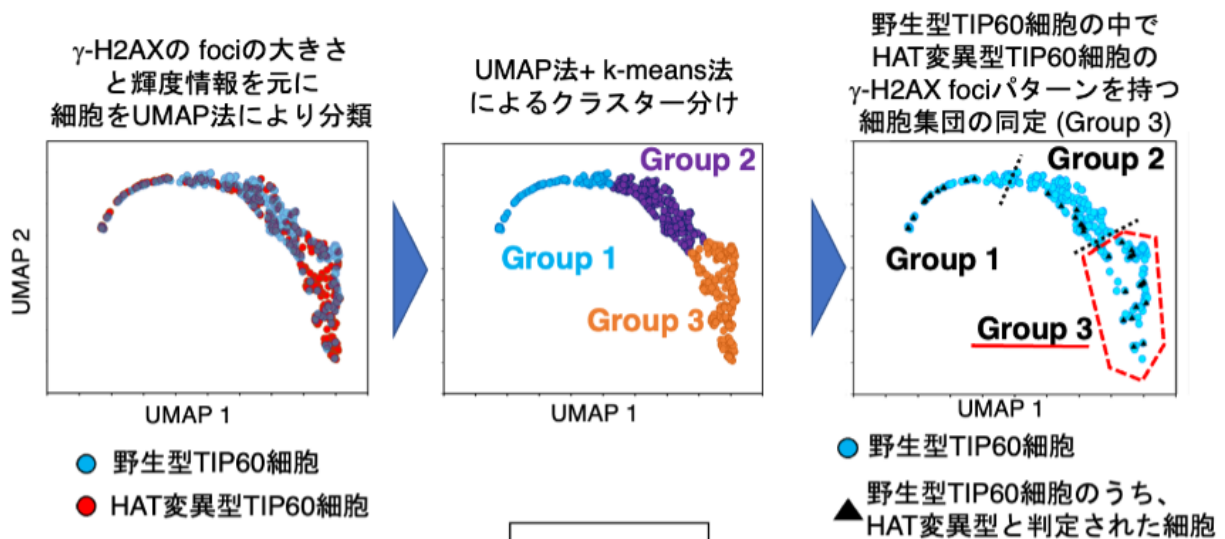
タイトル：Machine learning extracts oncogenic-specific  $\gamma$ -H2AX foci formation pattern upon genotoxic stress (機械学習によるゲノム損傷ストレス下におけるがん化シグナルに特異的な  $\gamma$ -H2AX foci パターンの抽出)

著者：Kanji Furuya, Masae Ikura, Tsuyoshi Ikura

掲載誌：Genes to Cells, DOI: 10.1111/gtc.13005

<参考図表>

図2  $\gamma$ -H2AXの fociの輝度と大きさを元にした教師なし機械学習 (UMAP解析) による細胞集団のクラスタリング



アセチル化活性を持つ野生型TIP60細胞においてもがん化シグナルに特異的な $\gamma$ -H2AX foci パターンを持つ細胞集団を検出した

Oncogenic な $\gamma$ -H2AX foci パターンはアセチル化活性にすべて依存しているわけではない