

氏 名	神 永 洋 彰
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 677 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	V1b バソプレシン受容体欠損マウスの水分保持機構と深層学習による飲水行動の解析
論文審査委員	(委員長) 教授 尾 仲 達 史 (委 員) 教授 黒 尾 誠 教授 菊 地 元 史

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

V1b バソプレシン受容体（V1b 受容体）は、下垂体前葉に存在し、条件に応じて視床下部・下垂体・副腎系を活性化する。これまで V1b 受容体欠損マウス（V1bKO）は、脱水のストレス下において、活性化が減弱すると報告されている。また、腎臓の集合管における V1b 受容体は、水の再吸収を担う V2 バソプレシン受容体（V2 受容体）の作用を阻害すると報告されているが、V1b 受容体を欠失させて、V1b 受容体の V2 受容体への阻害作用を評価した例は本要旨作成時点では見当たらない。さらに、V2 受容体拮抗薬投与下における V1b 受容体の飲水行動に対する役割は未解明である。

生体では、血漿浸透圧の上昇や有効循環血液量の減少により、バソプレシンの分泌、レニン-アンギオテンシン系の活性化と共に、口渇による飲水行動が起こり、体液の恒常性を保つ。V1b 受容体が水電解質代謝や飲水行動に及ぼす影響については、これまで異なる実験結果が得られており一定の方向性が得られていない。本研究では、V2 受容体拮抗薬を用いて水利尿を惹起させた際、血漿浸透圧の上昇から飲水行動に至る段階で、V1b 受容体の有無により変化が生じるかを解明する。

また、飲水行動を評価する方法として、Deep Neural Network（DNN）モデルを作成し、動物実験での有用性を検討する。DNN モデルは、近年基礎研究や実臨床でも活用が期待されており、既知のリコメータや赤外線センサーとは異なる、新しい研究手法である。DNN モデルを用いることで焦点を絞った動物実験の評価法を構築でき、長時間に亘る実験動物の行動について、短時間で再現よく自動的に解析することが可能となる。これまでの動物実験において、痛みや睡眠などの解析で DNN モデルが活用されているが、飲水行動に着目した研究は少ない。また、代謝ケージ内でのマウスの飲水行動を DNN モデルで解析した報告は無く、本研究が最初となる。

### 2 研究方法

野生型マウス（WT）と V1bKO について、無処置または V2 受容体拮抗薬投与後に、代謝ケージ内での行動を 6 時間連続撮影した。この記録動画を元にして、飲水ボトルへのアクセスを検出する深層学習モデルを構築し、飲水行動のグラフを作成した。作成したモデルの詳細を次に示す。FFmpeg プログラムにより、映像 1 秒を 5 枚の画像へと変換し、6 時間の動画から約 10 万 8000 枚の画像を作成した。マウスを物体認識させるために、Python プログラムと Labellmg プログラムによって、「飲水

している画像」と「飲水していない画像」それぞれ 2000 枚強を、手動でラベル化した。Tensorflow object detection API と Python プログラムによって、ラベル化した画像を深層学習に用いて DNN モデルを作成し、Conda による仮想環境内で 10 万 8000 枚の画像を解析した。「飲水している画像」と「飲水していない画像」にそれぞれ「1」、「2」の番号を付与し、得られた特徴量を、R 計算プログラムによってグラフ化し、飲水行動を可視化した。グラフについては Igor Pro 9 によって、ヒルの式へと当てはめた。

また、各状態において、体重、飲水量、尿量の測定と血液検査を施行し、水電解質代謝を確認した。

今回の実験の結果、V1bKO において赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリットの値が高値となったため、さらに骨髄移植の実験を行った。9.5 Gy の放射線照射を行った WT に対して、無処置の WT または無処置の V1bKO から採取した骨髄細胞を静脈内注入し、移植 8 週後に血液検査を行った。

### 3 研究成果

作成した DNN モデルで得られた 10 万 8000 枚の画像の解析のうち、ラベル化に失敗した枚数は約 200 枚 (= 0.2%) であったことから、成功率は約 99.8% であった。実際にラベル化された画像 2228 枚を目視で確認したところ、5 枚 (= 0.2%) のラベル化が誤っていたことから、ラベル化の精度は約 99.8% であった。同一記録を用いた解析では再現性を確認した。

時間経過と、飲水ボトルへのアクセス回数の累積により作成した飲水行動のグラフによると、無投薬では WT に比べ、V1bKO の飲水行動が減少した。一方で、V2 受容体拮抗薬投与後では、WT に比べ、V1bKO は飲水行動を早期に開始することが判明した。V2 受容体拮抗薬投与後の飲水行動のグラフをヒルの式に当てはめると、飲水ボトルへの総アクセス回数の半分に到達するまでの時間が、V1bKO は 2.9 時間、WT は 3.3 時間であった。V2 受容体拮抗薬投与後のグラフ上で両群の差が大きいと考えられた投与 3 時間後において、V1bKO は WT よりも体重当たりの飲水量が多く、体重変化率が小さく、血清浸透圧は低値であり、これらの結果は飲水行動のグラフの結果と対応していた。

骨髄移植実験では、放射線照射を行った WT に、V1bKO の骨髄細胞を移植した場合、WT から移植した場合よりも赤血球数が高値となり、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) や血小板数が低値であった。

### 4 考察

今回、深層学習モデルを活用し、マウスの飲水行動を短時間で再現よく、自動的に解析可能であることが判明した。DNN モデルを用いたことで、V2 受容体拮抗薬投与 3 時間後付近に WT と V1bKO の間に大きな差を認めた。DNN は、薬理学的実験における有用性が示唆され、得られた情報により、動物の移動距離や移動の軌跡も表現可能と考えられる。今回の実験では、さらなる解析として、ケージ内でのマウスの動きを評価することで、飲水ボトルへのアクセスと飲水行動との関連がより正確に判断できる可能性がある。

V1bKO は WT と比較して、無処置では飲水行動の立ち上がり遅く、飲水行動が低下していたものの、飲水量や血清浸透圧の差は認めず、体液保持に必要な水分摂取を少ない回数で行っ

ている可能性があると考えられた。また、V2 受容体拮抗薬投与後の結果から、血漿浸透圧上昇を感知し飲水行動を開始するまでのいずれかの段階において、V1b 受容体が重要な役割を果たしていると考えられた。V1b 受容体は、V2 受容体拮抗薬による水利尿下における視床下部-下垂体-副腎系の反応を制御し、水分保持機構に影響を及ぼしている可能性がある。よって、V1b 受容体拮抗薬が脱水の予防に役立つ可能性がある。臨床においては、平時から脱水傾向である高齢者は、V2 受容体拮抗薬投与後に必要な反応である、口渇を自覚することで起こる飲水行動の反応系が低下しているため、V1b 受容体拮抗薬が有効である可能性がある。

V2 受容体拮抗薬を投与後、V1bKO と WT とで尿量の差を認めなかったことから、腎集合管の主細胞における V1b 受容体の発現は、V2 受容体を阻害した状況では機能的な意義を持たないと考えられた。

V1bKO の骨髓を移植した群において、赤血球数の増加や血小板数の低下を認めており、V1b 受容体は造血細胞レベルにおいて何らかの影響を及ぼしている可能性がある。

## 5 結論

飲水行動を解析する高い精度の深層学習モデルを構築し、その有用性を示した。

V1b 受容体は、水分保持機構を減弱させる作用を持つ可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

候補者は、多層ニューラルネットワークを用いた機械学習を利用して画像から飲水行動を識別する方法を確立させた。この方法を用い候補者は、バゾプレシン V1b 受容体ノックアウトの飲水行動、尿、赤血球数を検討している。すなわち、V1b 受容体ノックアウトマウスを用いバゾプレシン V2 受容体阻害剤を投与し水利尿を誘発させ、体液浸透圧を上昇させたときの尿と飲水行動を検討した。

その結果、V2 受容体阻害薬投与は V1b 受容体ノックアウトマウスにおいて野生型と同等に水利尿を誘発していることを確認した。それに対し、飲水行動が野生型に比べ V1b 受容体ノックアウトマウスで早期におき、投与 3 時間での飲水量も増加していることを見いだした。従って、V1b 受容体は体液浸透圧上昇による飲水行動に抑制的に関与する可能性が考えられた。

この V1b 受容体ノックアウトマウスにおける飲水行動促進の作用機序に関し、ノックアウトマウスでは元々の体液量に変化している可能性、浸透圧感受性に変化している可能性、循環血液量感受性に変化している可能性、バゾプレシン分泌に変化している可能性、糖質コルコイド減少によりミネラルコルチコイド作用が減少している可能性、代謝ケージというストレス環境に対する反応に差がある可能性があり今後のさらなる検討が必要であることが慎重に議論されている。

また、V1b 受容体ノックアウトマウスで赤血球数増加が観察された。この機序に関し、赤血球産生増加の可能性を検討している。エリスロポエチン濃度に変化は観察されなかったため、骨髓細胞の違いを考え、放射線照射した野生型マウスに V1b 受容体ノックアウトマウスの骨髓細胞を移植する実験を行っている。その結果、V1b 受容体ノックアウトマウスの骨髓細胞を移植すると赤血球数の増加という V1b 受容体ノックアウトマウスの現象が再現できた。従って、V1b 受容体

が赤血球産生を抑制している可能性が考えられた。しかし、過去の報告との矛盾があり今後の検討の必要性が議論されている。

本研究は、新しく行動を自動解析する手法を構築したこと、水代謝に関するさまざまな指標を測定しており評価できる。一方で、ノックアウトマウスの観察実験からの考察が主であり、V1b 受容体の詳細な作用機序については今後の検討に任されている。

論文に関し機械学習による画像解析で飲水行動を定量化するメリットとデメリット、浸透圧感受性・循環血液量感受性・口渇感・飲水行動・バゾプレシン分泌、水排泄の各ステップにおける V1b 受容体の働き、統計手法、対照動物の遺伝的背景、麻酔の記述、V2 受容体阻害状況における尿浸透圧、骨髓細胞における V1b 受容体発現、「関与」「関連」「影響」といった方向性が不明瞭で曖昧な記述があることについて指摘がなされた。これらの指摘に関し候補者は適切に対応し改定を行った。

## 最終試験の結果の要旨

候補者から、水代謝における V1b 受容体の働きに関し、浸透圧感受、循環血液量感受、飲水行動、バゾプレシン分泌、腎からの水利尿にわけて概説が示された。さらに、候補者が構築した深層神経ネットワークモデルによる飲水行動の画像解析について説明があった。続けて、V1b 受容体ノックアウトマウスの基礎値あるいは V2 受容体アンタゴニスト Tolvaptan、その偽薬 70%エタノール投与後の飲水行動、飲水量、体重、尿量、血清浸透圧、電解質濃度の説明があった。さらに、放射線照射した野生型マウスに対し、野生型あるいは V1b 受容体ノックアウトマウスの骨髓細胞を移植したときの赤血球数、ヘモグロビン濃度を測定している。その結果、候補者が構築した深層学習モデルによる画像解析で飲水行動が定量できること、さらに、この画像解析を用い V1b 受容体ノックアウトマウスの水代謝を検討した結果、Tolvaptan 投与された後の尿量増加、尿浸透圧に野生型マウスとの差はなかったのに対し、飲水行動と飲水量が V1b 受容体ノックアウトマウスで多く、その結果、体重減少と血清 Na<sup>+</sup>濃度上昇が緩和されていた。従って、V2 受容体の機能を阻害しておいた状態ではさらに V1b 受容体がなくとも水利尿は差がないが、飲水行動は V1b 受容体が抑制している可能性が示唆された。V1b 受容体ノックアウトマウスで飲水行動が早期に生じた機構について、もともとの体液量、不感蒸泄量、グルココルチコイド放出、バゾプレシン放出が変化している可能性を含め注意深い考察がなされた。

また、V1b 受容体ノックアウトマウスにおいて赤血球数の増加が観察された。そこでこの機構が赤血球産生に関するものかを検討する目的で、放射線照射した野生型マウスへの V1b 受容体欠損マウスの骨髓細胞の移植実験を行っている。その結果、赤血球数の増大が観察されたので骨髓細胞の V1b 受容体が赤血球産生を抑制している可能性が考えられた。しかし、過去の報告と矛盾しておりさらなる検討が必要である。全体に得られた結果に対して慎重な議論がなされた。

発表に対し、飲水と水利尿の双方を制御していない状況で飲水に関する V1b 受容体の働きを V1b 受容体の全身のノックアウトマウスの観察から考察することの限界、V2 受容体阻害状況において V1b 受容体の水排泄作用が観察できるのか、ノックアウトマウスの対照群のマウスの作成法、遺伝的背景の統制法、に関し質問がされた。候補者はこれらの質問に対し、真摯にそして適切に答えた。周辺知識も含め十分に学位にふさわしいと全員一致で判断した。