

性不整脈の発生予測のどの部分に応用可能かについての現時点での専門家の意見をまとめた。

### C. 研究結果

ヒト幹細胞由来心筋細胞の活動電位あるいは field potential を指標にした開発候補化合物の電気生理学的作用の評価に基づく安全性薬理試験への応用研究が国内外の複数の研究機関で進められている。薬物性再分極遅延はヒト幹細胞由来心筋細胞の field potential 持続時間(文献 1)あるいは活動電位持続時間(文献 2)の延長から推定することが可能である。しかしながら、ヒト幹細胞由来心筋細胞の反応は、ヒト心筋における薬理反応と定性的には類似するが、定量的評価を正確に実施するためには解決すべき課題がいくつかある。例えば、iPS 由来心筋細胞の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  といった代表的なイオンチャネル発現密度を native ヒト心筋あるいは不整脈を発生しやすい患者と同程度に調整する手法、徐拍に伴う生理的再分極遅延を薬物による再分極遅延から分離して評価するための拍動数の制御法、目的に応じた細胞型(たとえば心室筋様の活動電位波形を示す細胞)を選択的に作製する手法、活動電位持続時間は発達段階で変化するので評価のタイミングを推定する指標の開発、クローンごとに薬物反応性が均一であることを確認する指標(iPS 由来心筋細胞の規格化)等も必要である。薬物による QT 間隔の延長が薬物による不整脈発生の予測指標として従来から特に注目されてきた。しかし同程度の QT 間隔の延長を来す場合でも質的な差、すなわち torsades de pointes (TdP)\* の誘発率に違いがあることが知られている。安全な QT

間隔の延長と危険な QT 延長とを区別するために、TdP の発生リスクを直接証明できる催不整脈試験に期待が寄せられている。したがって、危険な不整脈を予測することが可能な薬物スクリーニングシステムをヒト幹細胞由来心筋細胞を用いて構築する必要がある。従来の in vivo 研究で QT 間隔の Poincaré plots 解析\* が期外収縮の発生予測に有用であることが示されている。同様に、ヒト iPS 由来心筋細胞においても、活動電位持続時間から Poincaré plots を作成することにより、期外収縮の原因となる早期後脱分極の発生を予測できることを示すデータが報告されている(文献 2)。しかし、現在の技術レベルではヒト幹細胞由来心筋細胞集団にスパイラルリエントリー\* を発生基盤とする TdP そのものを再現することはできない。

### D. 考察

ICH S7B ガイドラインでは、動物およびヒト細胞を利用した in vitro~in vivo モデルを組み合わせた安全性薬理試験が記載されている(文献 3)。前項の研究結果で述べた現時点におけるヒト幹細胞由来心筋細胞の課題を克服し、さらに動物幹細胞由来心筋細胞とヒト幹細胞由来心筋細胞の電気生理学的特徴が類似していて、かつ動物幹細胞由来細胞が動物致死性不整脈モデルの予測に有効であれば、ヒト幹細胞由来細胞はヒトの同様の病態において有効な予測手段になると推定できる(図 1)。以上のように、ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた薬物スクリーニングシステムには、従来のイオンチャネルアッセイに加えて不整脈検出モデルとしての応用という 2 つの役割が期待されている(図 1)。

## E. 結論

ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた薬物スクリーニングシステムは、今後、さらに改良を加えることにより、開発候補化合物の催不整脈作用の予測精度を高めるための有効な手段になると考えられる。

### 用語解説

\*Torsades de pointes (TdP):多形性心室頻拍の一種で、QRS 波の振幅と周期長が 1 拍ごとに変化し、基線の周囲をねじれながら振動するように見えるものである。定義上 TdP は QT 延長に合併する。

\*QT 間隔の Poincaré plots 解析:n 番目の QT 間隔と n+1 番目の QT 間隔を連続的にプロットする手法。催不整脈作用が既に知られている抗ヒスタミン薬のテルフェナジンや抗不整脈薬のベプリジルを投与すると QT 間隔延長と一拍ごとの QT 間隔のばらつきが増大が同時に観察され、その後に致死性不整脈が出現することが知られている。

\*スパイラルリエントリー:渦巻き型の興奮旋回。致死的不整脈である心室細動の実体である。

### 参考文献

1. Tanaka T, et al. In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Com.* 2009; 385: 497-502.
2. Malin KB, et al. Quantified proarrhythmic potential of selected human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res.*

2010; 4: 189-200

3. THE ICH STEERING COMMITTEE (2005), The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals (S7B), The international conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH), The Guideline was recommended for adoption at Step 4 of the ICH process in May 2005 (<http://www.ich.org/>).

## F. 研究発表 学会発表

1. 杉山 篤:非循環器治療薬の心臓への作用:薬物性 QT 延長評価の新展開, 安全性評価研究会, 東京(2010. 11).
2. Sugiyama A: New proarrhythmic model for drug-induced QT-prolongation, KoNECT-KITARO Joint Symposium, Lee Kun-Hee Auditorium, Seoul National University Cancer Research Institute, Seoul, Korea (2011. 2).

## G. 知的所有権の取得状況

無し

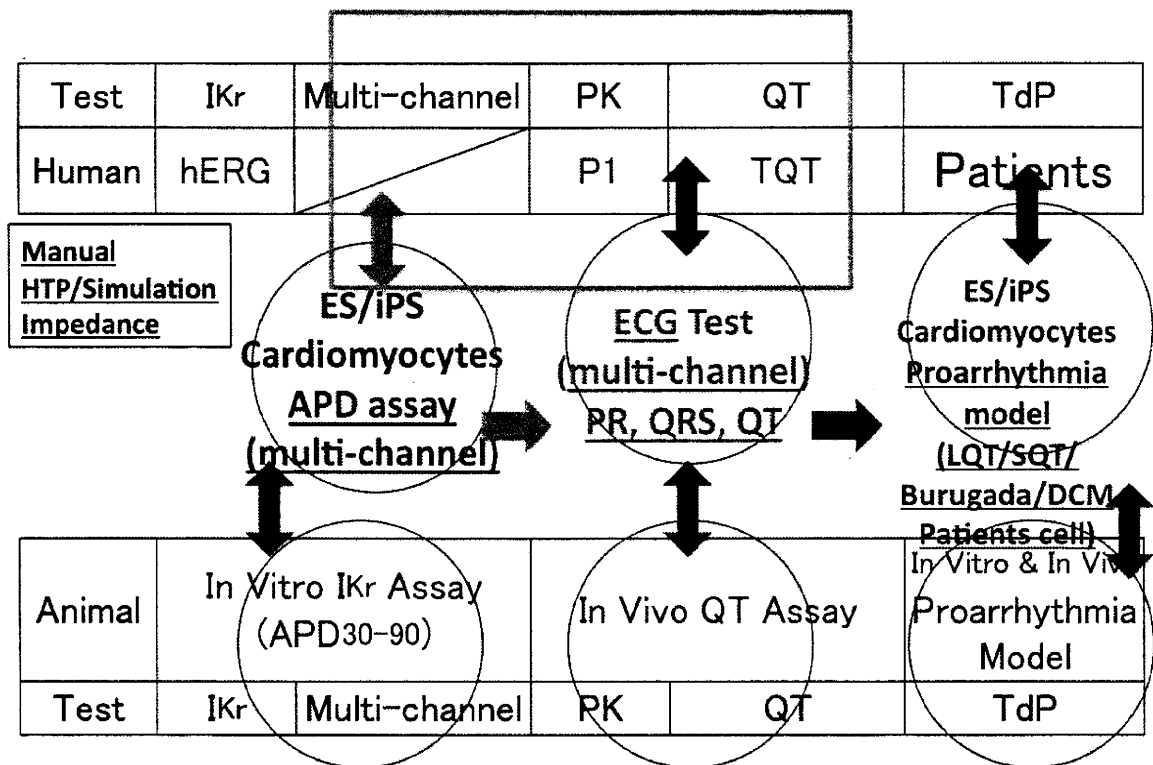


図1 ヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた薬物スクリーニングシステムの位置づけ。

hERGテストは $K^+$ チャンネルへの薬物の作用を評価するだけであるが、ヒト幹細胞由来心筋細胞から得られるfield potentialや活動電位は種々のチャンネルに対する作用を評価することができる。このようなイオンチャンネルアッセイに加えて不整脈検出モデルとしての応用も期待できる。IKr: 遅延整流 $K^+$ 電流の速い成分; PK: 薬物動態学; QT: QT間隔、心室筋の脱分極と再分極に要する時間を反映する; TQT: 綿密なQT試験、E14ガイドラインで規定されている; PR: PR間隔、房室伝導が抑制される場合に延長する。QRS: QRS幅、心室内伝導が抑制される場合に延長する; DCM: 拡張型心筋症; SQT: QT短縮症候群; LQT: QT延長症候群; APD: 活動電位持続時間

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業）  
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」  
平成 22 年度分担研究報告

－ヒト由来幹細胞の心筋分化に関する調査研究－

研究分担者：諫田 泰成（国立医薬品食品衛生研究所薬理部 第二室長）

研究要旨：平成 19 年 11 月に我が国で樹立されたヒト iPS 細胞は、ヒト ES 細胞と異なり倫理面の問題がなくヒト細胞標本を作成できることから、創薬応用が期待される。本研究ではヒト iPS 細胞から心筋細胞の作製を試み、安全性薬理試験に応用する上での問題点を検討した。ヒト iPS 細胞（京都大学 201B7 株）から作製した胚様体（embryoid body; EB）を basic FGF を含まない分化培地で培養することにより拍動を開始する EB を解析の対象とした。その結果、ヒト iPS 細胞由来の拍動 EB は拍動数のバラツキが非常に大きいことが明らかになった。従って、ヒト iPS 細胞由来の拍動 EB を用いる安全性薬理試験の開発には、少なくとも拍動数がそろった EB の作製技術が必要であると考えられる。被験物質の心筋に及ぼす作用を適切に評価する安全性薬理試験としては薬剤性 QT 延長の有無の評価が重要である。MEA 多点電極システムを用いて拍動 EB の QT 間隔を調べた結果、ヒト iPS 細胞由来の拍動 EB を用いた QT 間隔の測定は可能であった。しかしながら、上述したように、拍動 EB の拍動数のバラツキが多いことから、薬剤性 QT 延長の評価には拍動数が均一な EB が必要である。また、EB には心房、心室、結節が含まれると考えられることから、各種細胞の割合やイオンチャネルの機能が一定の範囲内におさまるような品質評価の基準を設定する必要があると考えられる。本研究において、我々は、ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導系および MEA 多点電極システムを用いた QT 間隔の測定系を確立した。今後、拍動数が均一で安定供給が可能な拍動 EB の作製方法が開発されれば、医薬品候補化合物の薬剤性 QT 延長の安全性評価に有用であると期待される。

キーワード：QT 延長、不整脈、ヒト iPS 細胞

**A. 研究目的**

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を用いて安全性薬理試験が可能なのか明らかにすることである。まず、マウス ES 細胞とヒト iPS 細胞から EB の作製を行い、拍動する EB が得られたので、心筋細胞として解析に使用した。次に、拍動 EB の拍動数を比較し、そのバラツキを解析することにより、拍動 EB を用いた安全

性薬理試験が可能であるのか検討した。

**B. 研究方法**

(1) マウス ES 細胞の培養

マウス ES 細胞 R1 株（American Type Culture Collection, USA）を、マウス ES 用培地（15%FBS、500U/mL LIF を添加した DMEM）を用いてマイトマイシン処理マウス繊維芽細胞（ミリポア）上で

培養した。

#### (2) マウス ES 細胞の心筋分化誘導

マウス ES 細胞のコロニーをトリプシン (0.25%) により single cell にした後、1000cells/100 $\mu$ l/well の割合で 96 穴プレート (住友ベークライト) に播種することにより EB を作成した。さらに LIF を除去したマウス ES 用培地を用いて 1~2 週間浮遊培養することにより拍動 EB が得られた。EB を無作為に 30 個選び、ビデオ撮影して拍動数を解析した。

#### (3) ヒト iPS 細胞の培養および未分化マーカーの発現

ヒト iPS 細胞 201B7 株 (京都大学で山中 4 因子のレトロウイルスを用いて樹立) は、理研バンクより購入し、basic FGF (R&D Systems) を添加した霊長類 ES/iPS 細胞用培地 (リプロセル) を用いてマイトマイシン処理 SNL 細胞 (ECACC) 上で培養した。培養した。ヒト iPS 細胞の未分化状態は、細胞を 4%PFA で固定後、未分化マーカー Nanog および Tra-1 に対する抗体 (BD) で染色しフローサイトメーター (BD Aria II) により解析した。

#### (4) ヒト iPS 細胞の心筋分化誘導

ヒト iPS 細胞のコロニーをスクレーパーではがすことにより小さな塊を作成し、iPS 細胞用培地を用いて 4 日間浮遊培養して EB を作成した。さらに 3~4 週間、分化培地 (20%FBS を含む  $\alpha$ MEM) で浮遊培養を行い、拍動 EB を得た。拍動 EB を無作為に 30 個選び、ビデオ撮影して拍動数を解析した。

#### (5) 多点電極システム

拍動 EB をフィブロネクチン (10 $\mu$ g/ml) でコートした MEA 電極アレーディッシュ

ユ (Multi Channel Systems, Germany) にのせて、細胞外電位の変化を測定した。

### C. 研究結果

我々はまずマウス ES 細胞を用いて、single cell を 96-well plate に播種することにより EB を作成したところ、直径が約 200 $\mu$ m 程度でかなり大きさが揃った EB が得られた。しかしながら、拍動数については、平均値は  $77 \pm 33$  bpm で、最大 171 bpm、最小 28 bpm であり (図 1)、EB によって様々であることが明らかになった。

次に、ヒト iPS 細胞を用いて心筋に分化誘導を行った。iPS 細胞の未分化状態はマーカーである Nanog および Tra-1 の発現により確認した (図 2)。ヒト iPS 細胞はマウス ES 細胞と異なり single cell にすると死んでしまうため、EB は小さな塊により作成する方法を選択した。また分化誘導は拍動 EB を細胞外電位測定に使用するため、接着培養ではなく浮遊培養による条件の最適化を行った。その結果、3~4 週間の浮遊培養により拍動 EB が得られた。拍動数を解析した結果、平均値は  $56 \pm 20$  bpm (最大 93、最小 3) であり、マウス ES 細胞と同様、拍動数は EB 間で大きなバラツキが認められた (図 3)。

さらに、ヒト iPS 細胞由来の拍動 EB を用いて、細胞外電位変化の測定が可能であるのか検証した。その結果、電極の上に EB が接着した場合には (図 4)、心電図を測定することが可能であるが、心電図は EB によって異なることが示された (図 5)。従って、ヒト iPS 細胞由来 EB はバラツキが大きい、多点電極システムによる細胞外電位の測定は可能であると考えられた。

### D. 考察

本研究において、我々はマウスES細胞およびヒトiPS細胞から拍動EBの作成に成功した。また、多点電極システムを用いて心電図を解析する実験系を確立した。

ガイドラインに向けた拍動EBの問題点として、ヒトiPS由来の拍動EBはマウスES由来の拍動EBと同様に、拍動数のバリエーションが非常に大きいことが明らかになった。ヒトiPS由来EBの拍動数はマウスES由来EBと比較して全体的に少ない傾向が認められたが、この理由として、通常心拍数がマウスは数百bpmに比べて人は60~70bpmと少ないことを反映しているものと思われる。ヒトiPS細胞はマウスES細胞とは異なりsingle cellにできないため、個々のEBの大きさが不均一な上に、EBに含まれる心室や心房、結節の割合も様々であるためと考えられる。最近報告されたヒトnaïve iPS細胞はマウスESと同様にsingle cellにできることから (Hanna J. et al. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:9222-7 (2010))、分化抵抗性がなく心筋に分化誘導が可能であれば、大きさについてはばらつきが小さくなる可能性がある。また、第2回安全性薬理学会において、拍動EBから単離した心筋細胞は静止膜電位が浅く薬剤性QT延長に寄与するKチャンネル(IKr)の機能も弱いことが報告され、分化誘導の日数によって心筋細胞の性質が異なる可能性も指摘された。最終的には心室筋細胞の割合やイオンチャンネルなどの分化細胞の標準化が必要である。我々はQT間隔の測定系として、細胞外電位測定システムが利用可能であることを

明らかにした。EBを用いた多点電極システムアッセイは、高額な機器が必要であるものの、非常に簡便でありパッチクランプのような特別な実験技術は必要としない利点がある。拍動数が均一で安定したEB作成が可能になれば、スループット性が上がることも予想される。また、MEA電極アレイディッシュの問題点として電極の上に拍動EBをうまく乗せる技術が必要である。今回、コート剤として、フィブロネクチン以外に、ゼラチン、ポリエチレンイミン等を試したが、EBの接着において特に差は認められなかった。今後、簡便なEB接着法の開発が望まれる。

EB以外の評価法として、個々の心筋細胞を単離する方法があげられる。現在、多形性心室性頻拍であるtorsades de pointesの予測として、hERGチャンネルを強制発現させたヒト胎児腎由来HEK293細胞を用いたQT延長の評価(hERG試験)が行われている。活動電位持続時間が遅延する心室筋細胞を用いることにより、QT延長の予測性が向上すると考えられる。パッチクランプ法で個々の心筋細胞の活動電位を解析すれば、波形により心室筋細胞を選択してQT延長の評価が可能となる。しかしながら、個々の心筋細胞を解析する場合は、EBに含まれる心筋の割合も高くはないため大変なコストと労力が必要である。スループット性がないため、非臨床試験における早期スクリーニングには不向きであるが、非臨床試験の後期段階では候補化合物が絞られており化合物評価に対して応用できる可能性がある。

また、心筋細胞から作製した細胞シートも有用なアプローチである。Cellartis社(USA)では、ヒトES細胞から心筋細胞を $\alpha$ MHC等のプロモーターを利用して精製

し、シート状に加工したものを販売している。シートを用いた QT 延長の評価が可能であるのか今後の研究の進展が期待される。以上述べてきたように、ヒト iPS 由来心筋細胞の EB はばらつきが大きいいため、EB を用いて QT 延長を評価系するためには、少なくとも拍動数が均一で安定な EB 作成技術の進展が必要不可欠である。もしそのような心筋細胞が得られれば、薬剤性 QT 延長の評価に応用できる可能性がある。現在、S7B ガイドラインで用いられる hERG 試験は疑陽性が多いのが問題であり、ヒト iPS 細胞などヒト幹細胞由来心筋細胞でその課題を克服できれば、S7B を補完するようなガイドラインに発展することが期待される。

#### E. 結論

本研究において、ヒト iPS 細胞から拍動する EB を作製し、拍動 EB を用いた細胞外電位の実験系を構築した。今後、ヒト iPS 細胞から均一で安定な心筋細胞を分化誘導する方法が開発されれば、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を利用した安全性薬理試験法としてガイドラインに応用できる可能性が考えられる。

#### F. 研究発表

学会発表

1. 第 2 回日本安全性薬理研究会若手研究者討論会、2011 年 2 月 18 日、東京

#### G. 知的所有権の取得状況

無し

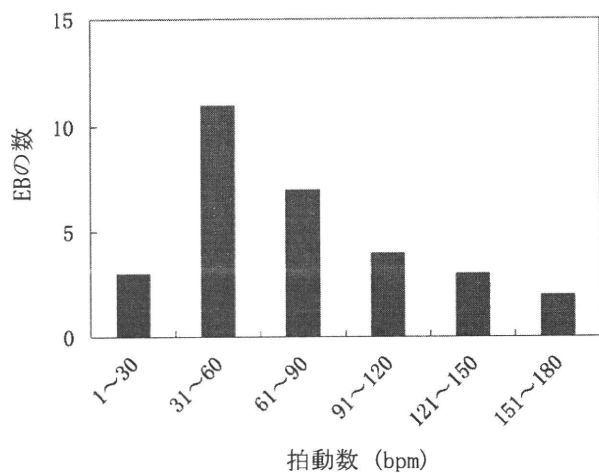


図1 マウスES由来EBにおける拍動数の解析

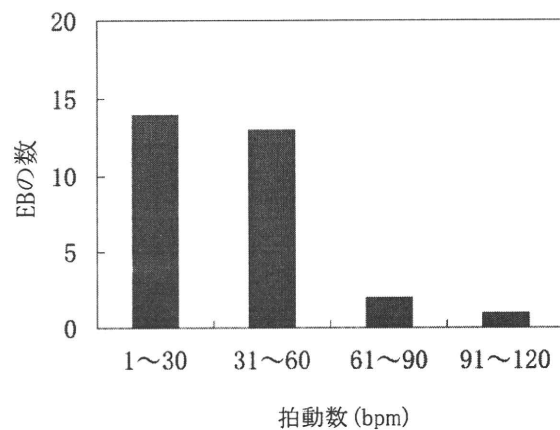


図3 ヒトiPS由来EBにおける拍動数の解析

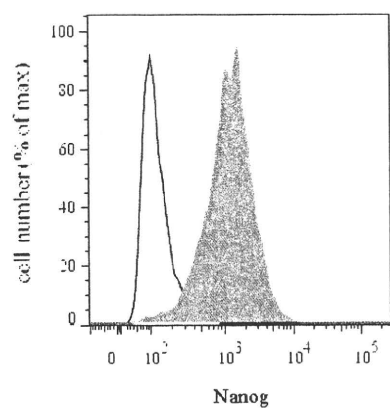
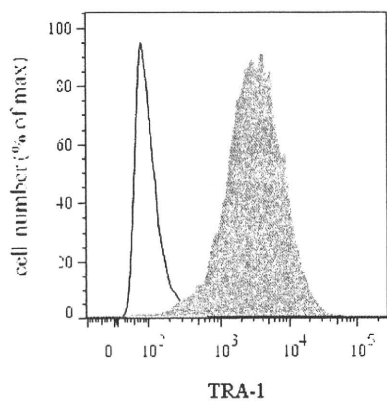


図2 ヒトiPS細胞における未分化マーカーの発現

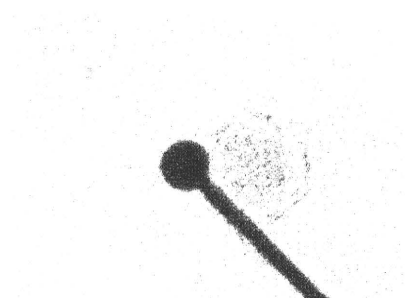


図4 電極ディッシュ上のヒトiPS由来EB



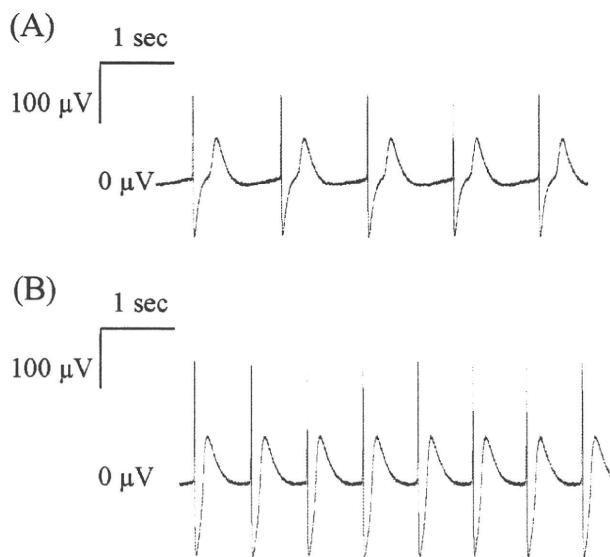


図5 ヒトiPS細胞由来EBにおける細胞外電位の測定

拍動EBを用いて、多点電極システムにより細胞外電位を測定した。(A)(B)はそれぞれ別のEBの波形を示す。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業）  
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」  
平成 22 年度分担研究報告

－ヒト由来幹細胞の神経分化に関する調査研究－

研究分担者：佐藤 薫（国立医薬品食品衛生研究所薬理部 第一室長）

研究要旨：ヒト iPS 細胞作成法やヒト iPS 細胞から中枢神経系細胞を分化誘導する方法について文献調査を行ったところ、安全性薬理試験に求められる再現性高く均質な神経細胞を iPS 細胞から直接作成するためのプロトコルが現状では確立していないことが明らかとなった。しかし、中枢神経細胞に関しては心臓や肝臓とは異なり、神経幹細胞塊 (neurosphere) の状態で増殖、凍結、融解が可能である。そこで、我々は、大阪医療センターより供与された健常人 fibroblast から作成された iPS に由来する neurosphere から中枢神経細胞を分化誘導した。その結果、再現性良く興奮性グルタミン酸作動性神経細胞と抑制性 GABA 作動性神経細胞が分化誘導されることが分かった。また、分化誘導 20 日目、30 日目にシナプス機能マーカーの発現ならびに細胞内カルシウム変動測定を行ったところ、分化誘導 30 日目にはシナプス機能が成熟し、神経回路機能が発現していることがわかった。このように、iPS 細胞由来の神経幹細胞塊である neurosphere をスタートラインとすれば均質な神経細胞標本を再現性良く得ることが可能であり、神経系安全性評価系を構築することが可能であることが示唆された。今後の課題として、安全性評価に適した neurosphere のロットを探索することが重要となるであろう。

キーワード：iPS、neurosphere、神経分化、神経回路

A. 研究目的

本研究は、医薬品開発の迅速化の実現に向けたレギュラトリーサイエンスの基盤整備に資するために、ヒト幹細胞(ES または iPS)から分化誘導した神経細胞が、医薬品の安全性薬理試験に応用可能であるかどうか調査研究することを目的とする。安全性薬理試験の実現のためには標本の均質性、安定性、再現性が求められる。そこで、特に創薬応用への期待が高いヒト iPS 細胞について、分化誘導法や均質性についての文献調査を行う。これにより浮かび上がった問題点について考察し、パイロット実験を実践することで、複数の研究機関でのバリデーション研究に必要な実験プロトコル提案への道筋をつける。

B. 研究方法

1. 文献調査

iPS 細胞の分化誘導法や均質性について文献調査を行った。文献は、山中らによる iPS 細胞樹立(Cell 131(5) 861-, 2007)以降のものを検索した。

2. ヒト iPS neurosphere からの神経回路分化誘導

大阪医療センターより健常人 fibroblast 由来 iPS 由来 neurosphere (passage 9) が供与された。neurosphere は浮遊状態で大阪医療センターより直接持ち帰った。そのままフラスコに播種し 6 日間インキュベート後、neurosphere を single cell にして直ちにポリオルニチン/フィブロネクチンコートしたスライドチャンバーにまき直す方法 (single cell 法) と、single cell を 4 日間

sphere 形成条件で培養してから上記コートしたスライドチャンバーにまき直す方法 (sphere 法) の二種の方法により播種し、B27 supplement を含む分化誘導培地に切り替えた(図 1)。20-30 日間培養後、Tuj1(神経細胞マーカー), GFAP(アストロサイトマーカー), Nestin(神経幹細胞マーカー), MAP2(樹状突起マーカー), PSD95(シナプス後部マーカー) の発現を免疫組織化学的に検出した。また、細胞内カルシウム濃度の変動を fura2-AM 法を用いて AQUACOSMOS/RATIO システム(浜松ホトニクス, Japan)で測定した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する規程に従った。なお、本実験におけるヒト iPS 細胞の使用に関しては国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会において「ヒト iPS 細胞を用いた新規 *in vitro* 毒性評価系の構築と創薬研究」として平成 21 年 12 月 25 日に承認を受けた。本細胞の個人情報に関しては(独)国立病院機構 大阪医療センターにおいて連結不可能匿名化した後、さらなる匿名化(連結不可能匿名化の上 2 重匿名化)を行った上で提供されているため国立医薬品食品衛生研究所には個人情報はない。ストックバイアルは施錠可能な国立医薬品食品衛生研究所薬理部第一室にて有人監視のもと液体窒素中保管している。実験に使用した細胞は実験終了後全てオートクレープし廃棄した。また、今後 *in vitro* 安全性評価系のヒト神経細胞への適合を行う上で欠かせない樹立済ヒト神経幹細胞を大阪医療センターより受け入れるため、研究課題「樹立済ヒト神経幹細胞および分化細胞を用いた *in*

*vitro* 毒性評価系の構築」を国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会に申請し平成 22 年 12 月 16 日に承認された。

## C. 研究結果

### 1. 文献調査

ヒト iPS 細胞について、分化誘導法や均質性についての文献調査を行った。Kiskinis らはこれまでに報告された iPS 化プロトコルについてまとめている (Kiskinis and Eggan, Clin Invest 120 (1) 51-, 2010)。iPS 化した細胞は skin fibroblast, bone marrow mesenchymal cells, keratinocytes, peripheral blood cells, adipose stem cells と多岐にわたっている(図 2)。また、リプログラミングに用いた因子も Oct4 (O) +Sox2 (S) +Klf4 (K) +c-Myc (M) の山中 4 因子、O+S+K+M+hTert (T) +SV40LT (SV)、O+S+K+M+ Nanog (N)、O+S+K、O+S+バルプロ酸、O+S+K+M+N+L (Lin28)、O+S+N+L、O+S+K+M+N+L+SV と様々である。Gene delivery に用いた方法も retroviral vector, lentiviral vector, piggyBac transposon, episomal vectors, recombinant proteins などがあった。Miura らは 11 通りの方法で樹立した 36 種類のマウス iPS 細胞株から作製した二次ニューロスフェア (Secondary neurosphere: SNS) の奇形腫形成傾向を評価した(図 3; Miura et al., Nat Biotech. 27 (8) 743-, 2009)。胎仔由来線維芽細胞 (MEF) から樹立した iPS 細胞に由来する SNS の奇形腫形成は、ES 細胞由来の SNS と同等であった。対照的に、成体組織 (TTF, Hep, Stm) から樹立した iPS 細胞に由来する SNS では、由来する組織によって奇形腫形成傾向が大きく変

化し、奇形腫形成率は未分化細胞の残存率と相関していた。このように、iPS 細胞樹立プロトコルがそれぞれの研究室独自のプロトコルを用いているため非常に多岐にわたること、また、樹立した iPS 細胞株から作成した SNS の奇形腫形成能が由来する組織によって大きく異なることからわかる通り、現在の iPS 細胞を取り巻く研究状況では分化後の形質を安定的にそろえることが困難であることが示唆された。

## 2. ヒト iPS neurosphere からの神経回路分化誘導

<分化誘導 20 日目>

位相差顕微鏡像では single cell 法と sphere 法の両標本ともほぼ confluent となり、神経細胞の特徴的な形態(細胞体、長い突起等)を持つ細胞が現れた(図 4)。Tuj1, GFAP, Nestin の発現を免疫組織化学的に検出したところ、single cell 法では Tuj1 を発現する突起が数多く観察された。また、1 視野につき 1-2 細胞程度、GFAP 陽性の細胞が見いだされた。樹状突起マーカー MAP2 陽性の樹状突起も観察されたが、シナプス後部マーカー PSD95 は樹状突起上に弱く発現が観察されたのみであった。Sphere 法では single cell 法とほぼ同様の Tuj1 発現パターンを示したが、GFAP 強陽性の細胞は見られなかった。また、もともと sphere のあったところに nestin 陽性の細胞が放射状に分布している様子が観察された。分化誘導 20 日目の single cell 法標本を用いて細胞内カルシウム変動測定を行った。細胞は還流装置により 50  $\mu$ M picrotoxin 8 min, 50  $\mu$ M NMDA 1 min, 100  $\mu$ M ATP 1 min, 80 mM KCl 1min, 5  $\mu$ M ionomycin 30 s の順に刺激した。これらの刺激の内、ATP

刺激に対してのみ顕著な細胞内カルシウム濃度上昇を呈した細胞が観察された(14/30)。Ionomycin に対しては全ての細胞が細胞内カルシウム濃度上昇を示したことから、本実験システムおよび細胞が正常に機能していることが確認された。一方、sphere 法標本では上記いずれの刺激に対しても反応を記録できなかったことから、sphere 法では増殖性の細胞の活性が高く光透過性が低くなる場合があることが示唆された。

<分化誘導 30 日目>

sphere 法では増殖性細胞の活性が著しく、分化誘導 30 日目には multi cell layer となっていたため、免疫組織化学的な観察ができなかった。Single cell 法では Tuj1 強陽性の神経突起が確認された。また、GFAP 強陽性の細胞数が 20 日目に比較してさらに増加していた。また、MAP2 陽性の樹状突起の上部にスパイン様の PSD95 クラスタリングを見いだした。これらのサンプルを用いて細胞内カルシウム変動測定を行った。50  $\mu$ M picrotoxin 3 min, 100  $\mu$ M L-glu 2 min, 50  $\mu$ M NMDA 2 min, 100  $\mu$ M ATP 2 min, 80 mM KCl 2min, 5  $\mu$ M ionomycin 1 min の順で細胞を刺激した。Single cell 法サンプルでは picrotoxin 反応性(37/66)、L-glu 反応性(13/66)、NMDA 反応性(1/66)、ATP 反応性(66/66)、high K<sup>+</sup> 反応性(66/66)の細胞が観察された。また、全ての細胞で ionomycin による細胞内カルシウム濃度上昇を確認した。その他の刺激に比べ、ATP により細胞内カルシウム濃度は著しく上昇した。Sphere 法サンプルでは L-glu 反応性(35/63)、ATP 反応性(63/63)、high K<sup>+</sup> 反応性(52/63)の細胞が観察されたが、single cell 法に

比べ反応は小さかった。また、*microtoxin* に応答する細胞は見受けられなかった。以上の結果は、ヒト iPS 由来 *neurosphere* から興奮性グルタミン酸作動性神経回路と抑制性 GABA 作動性神経回路の分化誘導に成功したことを示している。

## D. 考察

### 1. 文献調査

2007 年に山中らが iPS 細胞樹立を報告して以来 (Cell 131(5) 861-, 2007)、倫理的問題を解決した ヒト stem cell として iPS 細胞研究の裾野が爆発的に広がってきた。神経系分野においては、再生医療への応用はもとより、*in vitro* の安全性評価系に、これまでほとんど使用することができなかったヒト神経細胞標本の適用を可能にすることから、予測性の向上、創薬の高速化・高効率化を実現し、創薬過程に大きな変革をもたらすことが期待されている。このような *in vitro* 実験系における iPS 細胞の実用化は再生医療における、iPS 細胞のヒトへの直接的な適用よりも早期の実現が予想されているが、現段階の研究状況で果たしてそれが可能なのかどうか、文献調査および補足実験により検討・考察を行った。今回の文献調査により iPS 細胞の基となった細胞種や iPS 化プロトコルが非常に多岐にわたることが明らかとなった (Kiskinis and Eggan, Clin Invest 120 (1) 51-, 2010)。これは、結果として作成される iPS 細胞の性質に大きな差が生じることを示唆している。マウス由来 iPS 細胞の奇形腫形成能が基となった細胞種によって大きく異なることは (Miura et al., Nat Biotech. 27(8) 743-, 2009)、これを裏付けるものである。iPS 細

胞から神経細胞を分化誘導するプロトコルも研究室毎に異なるため、その結果生成される神経細胞の性質も非常にばらつく結果となる。安全性評価系に用いられる標本はまず再現性が高くなければならない。これにより安定かつ信頼性の高い評価系の実現が可能になるが、上記の知見を鑑みると、各研究室が作成している iPS 由来神経細胞は、それぞれ異なる特性を持っているのが現状のようである。iPS 細胞を目的臓器の細胞に分化させるためには、iPS から胚様体を作り、胚様体から目的臓器幹細胞からなる幹細胞塊を作り、これを分化誘導培地内で接着培養する必要がある。しかし、神経系はその他の臓器と異なり、幹細胞塊 (*neurosphere*) の状態で増殖、凍結、融解が可能、という大きなメリットがある。安全性評価に適した *neurosphere* のよいロットを探索し、それを増幅して評価系構築のための大規模なバリデーション研究も将来的には可能であろう。そこで、我々は今後、各研究機関が保有している *neurosphere* の供与を依頼し、*neurosphere* から分化誘導した神経細胞の性質、生理的特徴について詳細に検討することにした。

### 2. iPS 細胞創薬応用に向けた補足実験—ヒト iPS *neurosphere* からの神経回路分化誘導

大阪医療センターより供与されたヒト fibroblast 由来 iPS 由来 *neurosphere* からの神経細胞分化誘導を試みた。分化誘導 20 日目には Tuj1 陽性細胞が多数見受けられたが、細胞内カルシウム変動の結果から、機能的には未成熟であることが明らかとなった。シナプス後部マーカーである PSD95 の発現も弱くクラスターリングなどの局在が検出できなかったこと

もこれを裏付けている。一方、分化誘導 30 日目では NMDA 反応性、L-glu 反応性の細胞が現れたほか、picrotoxin により応答する細胞が現れたことから、機能的な興奮性グルタミン酸作動性神経回路と抑制性 GABA 作動性神経回路の分化誘導に成功したことが示唆された。また、電位依存性カルシウム受容体の発現や ATP 受容体の発現も示唆される。このとき、PSD95 が樹状突起上のスパイン様突起にクラスタリングしている様子も観察することができた。細胞外液をカルシウムフリーにすると細胞内カルシウム濃度がすぐに低下したことから、自発発火によるカルシウム上昇が常に起こっていることも示唆される。興味深いことに、sphere 法サンプルでは L-glu に反応する細胞数が single cell 法よりも多く、その反応強度も全ての細胞でほぼ同程度であった。Sphere 法で分化誘導をかけると sphere 内の細胞が同期して分化誘導されるのかもしれない。しかし、Sphere 法ではサンプルの光透過性が悪いこと、single cell 法では細胞のバリエーションが多岐にわたり分化も早いことを考え合わせると、single cell 法で分化誘導をかけた方が望ましいと結論できる。

分化誘導 20 日目から ATP に対してのみ、ほぼ全ての細胞がカルシウム応答を示した。30 日目には ATP に対する反応強度がさらに増加した。Lin らは P2Y 受容体を介したシグナル伝達が神経前駆細胞の増殖を促進し、最終的な神経分化に対しては negative regulator になっていることを示唆している (Lin et al., Dev Biol. 302 (1) 356-, 2006)。しかし、我々の結果では L-glu に反応した細胞でも ATP に対して大きな反応を示した。発達

と共にプリン受容体の発現プロファイルが変化し、同時にその機能も変化している可能性が考えられ非常に興味深い。

分化誘導 20 日目に見受けられた GFAP 陽性細胞数が 30 日目にはかなり増加していた。長いファイバーを持つことから radial glia である可能性も高く、nestin との二重染色を行う必要がある。神経細胞の機能成熟とこの GFAP 陽性細胞数に相関がある可能性もある。

今回の結果は、neurosphere から機能的な興奮性グルタミン酸作動性神経回路と抑制性 GABA 作動性神経回路が分化誘導できることを示しており、neurosphere の有用性を裏付けている。また、分化誘導も neurosphere 法よりも single cell 法のほうが評価系構築には適していることが明らかとなった。ただし、neurosphere の中に増殖活性の高い細胞があり、これまでのところ 40 日目までしか培養できていない。現在、分化誘導用のコーティング条件検討やグリア細胞インサートの適用等によりこれらの問題解決に当たっている。

## E. 結論

現段階の研究状況でヒト iPS をスタートラインとした場合、iPS 由来神経細胞を使った安全性評価系は安定性、再現性が不十分であることが懸念される。それを打開するため、ヒト iPS 由来 neurosphere をスタートラインとした神経系安全性評価系構築基盤を確立した。neurosphere からの興奮性グルタミン酸作動性神経回路と抑制性 GABA 作動性神経回路の分化誘導に成功した。これは neurosphere の有用性を示唆する結果である。

F. 研究発表（発表誌名巻号・ページ・  
発行年等も記入）

学会発表

1. 佐藤 薫、高橋華奈子、中澤憲一、石井一野澤 玲子、竹内 幸一、関野祐子、ナイフルミック酸によるヒトグルタミン酸トランスポーター EAAT1 の基質依存的な調節 第 84 回 日本薬理学会年会(2011. 3, 横浜市)
2. 高木 淳平、佐藤 薫、鈴木 岳之、パロキセチンはリポポリサッカライドによって引き起こされるグルタミン酸トランスポーター活性の低下を抑制する第 84 回 日本薬理学会年会(2011. 3, 横浜市)
3. 佐藤 薫、James E Goldman, 関野 祐子、生後初期脳のリスクアセスメントシステムの構築、日本薬学会第 132 回年会(2011. 3, 静岡市)

# Protocol

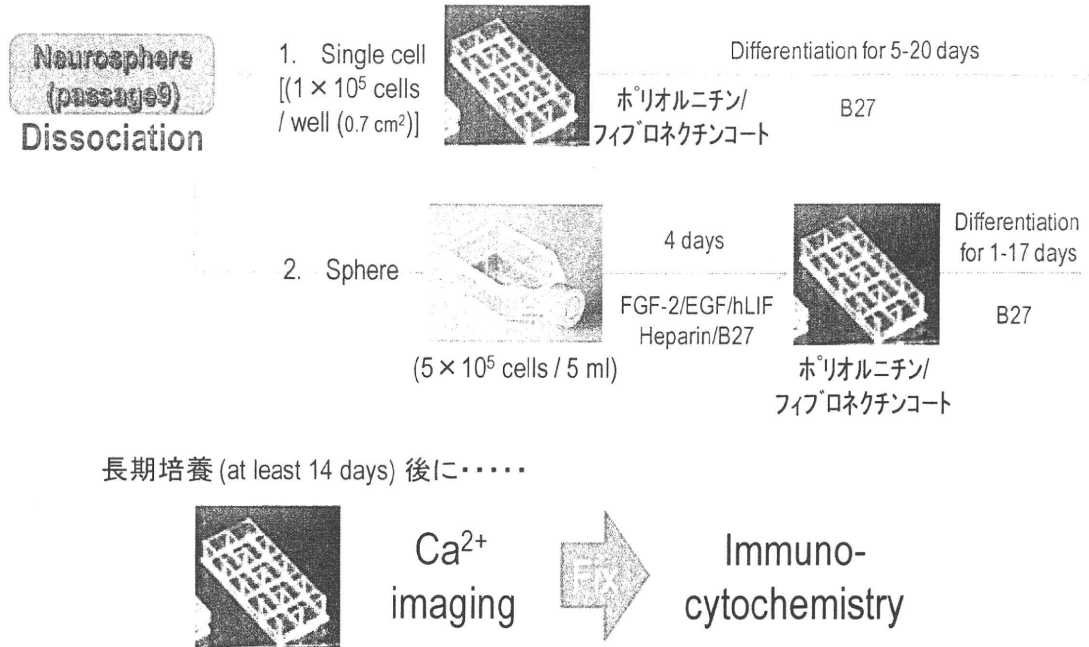


図 1. ヒト iPS 由来 neurosphere の分化誘導プロトコル

本研究では neurosphere を single cell にして直ちにポリオルニチン/フィブロネクチンコートしたスライドチャンバーにまき直す方法(single cell 法)と、single cell を 4 日間 sphere 形成条件で培養してから上記コートしたスライドチャンバーにまき直す方法(sphere 法)の二種の方法により播種し、B27 supplement を含む培地に切り替えることで分化誘導をかけた。

Table 1

Mouse and human iPS cells have been generated in a variety of ways

Cell type	Reprogramming factors	Method of delivery	Timeline (wk)	Efficiency	Genomic integration	Genomic integration removed
<b>Human</b>						
Skin fibroblasts and bone marrow mesenchymal cells	O.S.K.M or O.S.K.M.T.SV or O.S.K.M.N or O.S.K	Retroviral vectors	2-5	0.001%-1%	Yes	No
Skin fibroblasts	O.S.K or O.S + VPA	Retroviral vectors	4	0.001%-0.01%	Yes	No
Keratinocytes	O.S.K.M or O.S.K	Retroviral vectors	1-2	1%	Yes	No
Peripheral blood cells	O.S.K.M	Retroviral vectors	2	0.01%-0.02%	Yes	No
Skin fibroblasts and keratinocytes	O.S.K.M or O.S.K.M.N	Lentiviral vectors <sup>A</sup>	3-4	0.002%	Yes	No
Skin fibroblasts	O.S.N.L or O.S.N.L.M.K	Lentiviral vectors	2-3	0.01%-1%	Yes	No
Skin fibroblasts	O.S.K.M or O.S.K	Lentiviral vectors <sup>A</sup>	3-5	NR	Yes	Partial <sup>B</sup>
Embryonic fibroblasts	O.S.K.M	piggyBac transposon <sup>A</sup>	2-4	NR	Yes	No
Embryonic fibroblasts	O.S.K.M	piggyBac transposon <sup>A</sup>	2-4	0.005%-0.01%	Yes	No
Skin fibroblasts	O.S.N.L.M.K.SV	Episomal vectors	NR	0.003%-0.006%	No	-
Adipose stem cells	O.S.K.M	Lentiviral vectors	2-3	0.2%	Yes	No
Skin fibroblasts	O.S.K.M	Recombinant proteins <sup>C</sup>	8	0.001%	No	-

図 2. これまでに報告された iPS 化プロトコル

元になる細胞とリプログラミング法が非常に多岐にわたるため、iPS からスタートした場合に、性質の安定した神経細胞を分化誘導し安全性薬理試験に応用可能な標本を得ることは難しいと思われる。

Kiskinis and Eggen, J Clin Invest 120 (1) 51- (2010) より抜粋。



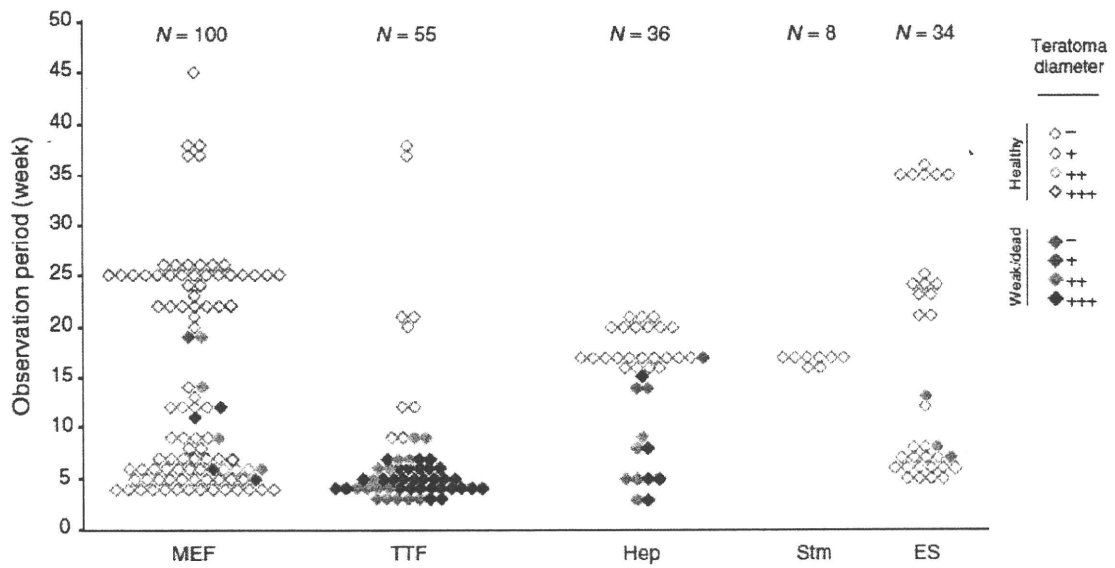


図 3. iPS 株間における奇形腫形成の差

Miura らは 11 通りの方法で樹立した 36 種類のマウス iPS 細胞株から作製した二次ニューロスフェア (SNS) の奇形腫形成傾向を評価した。iPS 細胞に由来する SNS では、由来する組織によって奇形腫形成傾向が大きく変化し、奇形腫形成率は未分化細胞の残存率と相関していた。これは、由来する組織、プロトコルによって iPS 細胞から分化誘導した細胞の特性が大きく異なることを示す一例である。

Miura et al., Nat Biotech 27 (8) 743- (2009) より抜粋。

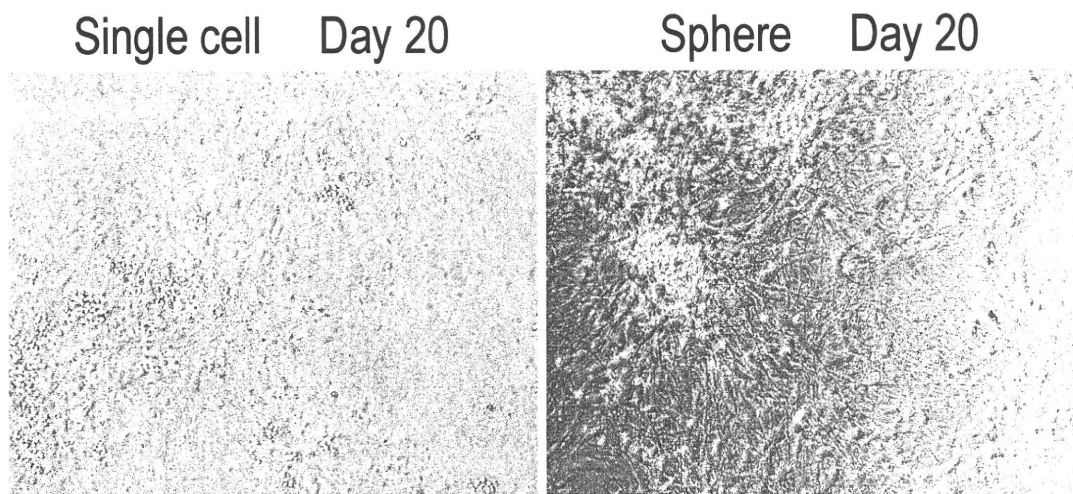


図 4. ヒト iPS 由来 neurosphere 分化誘導 20 日目の位相差顕微鏡像 Bar=100  $\mu$ m  
single cell 法と sphere 法の両標本とも分化誘導 20 日目にほぼ confluent となり、神経細胞の特徴的な形態 (細胞体、長い突起等) を持つ細胞が現れた。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業）  
「ヒト由来幹細胞の安全性薬理試験への応用可能性のための調査研究」  
平成 22 年度分担研究報告

— 中枢神経軸索輸送機能よる安全性薬理評価系の構築 —

研究分担者：五嶋 良郎（横浜市立大学 教授）

研究要旨：神経細胞において軸索輸送は基本的な細胞機能の1つであり、神経細胞の形成と維持に重要な役割を果たしている。軸索輸送の障害は様々な神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病等）と密接に関連している。従来、軸索輸送の解析は主に微分干涉顕微鏡（DIC）を用いて目視により行ってきた。しかし、軸索輸送の可視化、粒子の追跡は頻雑で有用な手段が皆無であった。

本研究では、脂質二重膜に親和性を持つ蛍光色素 CM-DiI で染色することにより軸索内粒子を可視化することに成功した。この CM-DiI で染色された粒子は、様々なオルガネラマーカ―や EGFP-タグを融合させた特定分子で二重染色することにより、マーカ―分子との局在関係からリソソーム小胞の輸送分子である可能性が示唆された。さらに、横浜国立大学の後藤研究室と共同で軸索輸送の自動追跡・解析システムを開発した。ソディウムアザイド、ノコダゾール、サイトカラシン B の作用解析によって CM-DiI で染色された粒子は ATP および微小管依存性の軸索輸送粒子であると考えられる。システムを用いて、抗腫瘍薬が軸索輸送に与える影響を解析した。パクリタキセル、ビンクリスチン、シスプラチン、オキサリプラチンは軸索輸送を抑制した。一方、5-フルオロウシル、メトトレキサートは輸送に対して無作用であった。パクリタキセル、ビンクリスチン、シスプラチン、オキサリプラチン等の薬物は副作用として末梢神経障害を頻発することから、この結果は、本軸索輸送解析系が、神経機能評価や薬物毒性試験の新たな評価系となりうることを示唆する。本研究において、我々は、従来にない新たな薬物評価系として軸索輸送自動解析系を確立した。本実験系は、Induced pluripotent stem cells (iPS 細胞) を利用した病態の解明、薬物スクリーニングに有用であると考えられる。

キーワード：軸索輸送、神経疾患、薬物スクリーニング

A. 研究目的

軸索輸送は、細胞の形態、機能、細胞極性の維持に重要であり、近年、軸索輸送の障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、運動ニューロン病、統合失調症のような神経変性疾患の病因の一因として注目されている。本研究において、軸索輸送を可視化し定量化を容易とする解析ソフトを解析し、数種薬物効果の軸索輸送に及ぼす効果を検討する。本研究の狙いは、iPS 細胞における機能評価ならびに薬効

評価系としての可能性を追究することにある。

B. 研究方法

胎生7日目のニワトリ胚から後根神経節 (dorsal root ganglion) DRG を取り出し、分散培養を行う。蛍光色素 CM-DiI (1 mg/ml) を培養 12—16 時間後の分散培養細胞に加え、30 分培養した。その後、CM-DiI を含まない溶液に切り替え、6 時間以上培養を行い、過剰に負荷された色素を除いた。CM-DiI により標識された

DRG 軸索内の移動粒子は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM 5 Pascal (Zeiss) を用い(励起 543 nm)、40 倍レンズで観察・撮影した。軸索が他の細胞と重なっておらず成長円錐が残っている神経細胞を探した後、蛍光像を確認し、粒子がよく見える神経細胞撮影に用いた。細胞体から成長円錐まで視野に入るように範囲を選択し、0.5 秒に 1 枚撮影の間隔で 2 分間撮影した。各薬物の添加後、一定時間、撮影を行い、薬物投与前後の移動粒子の数および速度を比較することにより、薬物効果を評価した。

### C. 研究結果

我々は蛍光色素 CM-DiI を用いた新たな軸索輸送の可視化を試み、さらに輸送粒子の動態を自動的に解析する実験系を確立することに成功した(図1、発表論文)。脂溶性蛍光色素 CM-Dii により、本実験条件下にラベルされる粒子の成分を検討するため、CM-DiI 染色と ER-Tracker, Mito-Tracker 色素の染色、および EGFP-Lamp1、EGFP-Rab5 の導入による小器官の可視化を行い、CM-DiI 標識粒子との局在性を比較した。その結果、CM-DiI によって標識される粒子は、主にリソソームであることが判明した。

本実験系を用い、数種の薬物効果を検討した。ATPase 阻害剤であるソディウムアザイド及び微小管重合阻害剤であるノダゾールは、いずれも両方向の輸送粒子数を著しく抑制した。一方、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン B は無作用であった。これらの結果は、CM-DiI 標識粒子が、ATP—および微小管依存性の軸索輸送粒子であることを示す。また順行性輸送における粒子の移動速度が二峰性を示すのに対し、逆行性輸送においては一峰性

を示している(図2)。このヒストグラムの結果は、従来の報告と一致する。これは、順行性輸送が複数のキネシンモータータンパク質による輸送を、逆行性輸送が、一種類のダイニンモータータンパク質によって担われることを反映すると考えられる。

一部の抗腫瘍薬は神経障害の副作用を高頻度で呈することが知られている。がん細胞は他の細胞と比較して非常に速い速度で細胞分裂を行っており、細胞分裂に必要な微小管を作用点として持つ抗腫瘍薬も多い。また、軸索の主要な構成成分である微小管に抗腫瘍薬が作用した結果、神経障害の副作用を呈すると考えられ、近年、副作用のメカニズムの一部に軸索輸送の関与が示唆されている。本システムを用いて、神経障害の副作用を高頻度で呈する抗腫瘍薬(パクリタキセル、ビンクリスチン、シスプラチン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、メトトレキセート)が軸索輸送に与える効果を検討した。パクリタキセル、ビンクリスチン、シスプラチン、オキサリプラチンは、各々細胞増殖抑制効果の IC<sub>50</sub> 値に相当する濃度において、いずれも軸索輸送を抑制した。一方、5-フルオロウラシル、メトトレキセートは、無作用であった(図3)。細胞の生存率を評価することにより、これらの抗腫瘍薬の軸索輸送の影響は、細胞毒性による二次的効果ではないことを確認した。

### D. 考察

iPS 細胞を用いた臨床応用の可能性の1つは、特定の疾患に罹患したヒトから由来する iPS 細胞を用いて、薬物の効果を評価することである。近年、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、統合失調症などの原因不明の難治の神経疾患の発症の比較的初期の変化として、軸索輸送の障

害が注目されつつある。しかし、このように重要な生理学および病態生理学的に重要と考えられる軸索輸送の機能評価は一般に煩雑であり、一度に大量のアッセイを短時間に行なうことが求められる薬物スクリーニングは軸索輸送について従来全く行なわれてこなかった。本実験系は、軸索輸送に対する比較的多数の薬物効果のスクリーニングを初めて可能とするものであり、iPS 細胞を用いた薬物スクリーニング系としての可能性を示唆する。

現在汎用されている輸送の可視化法は、GFP タグ付タンパク質の細胞への導入・発現である。この方法は、タグを付けることにより局在性が変化しないことが前提となるが、それが保証されれば、分子の輸送を評価できる点が優れている。しかし、この方法の欠点は粒子輝度が相対的に弱く、粒子を認識する上に必要なシグナル／ノイズ比が低い事である。本研究においても、複数の分子について EGFP タグ付きタンパク質の導入、可視化、解析を試みたが、解析に耐える画像を獲得することができなかった。一方、今回、輸送粒子の可視化に用いた蛍光色素 CM-DiI は、脂溶性色素であり、脂質膜から構成される細胞膜および細胞内小器官のほぼすべてを標識することが予想される。我々が検討した条件下では、CM-DiI によって移動粒子が可視化され、画像解析に耐えうる高いシグナル／ノイズ比を示した。他の蛍光色素による標識や EGFP タグ付きタンパク質導入等により、CM-DiI によって標識される小器官は主にリソソームであることが判明した。今後の課題としては、様々な小器官を識別することが可能な蛍光色素を開発・適用し、小器官に選択的な輸送の可視化を試みることである。

本法を用いて、抗腫瘍薬などの薬物の効果を検討した。抗腫瘍薬は、パクリタキセルやビンクリスチンなど、臨床的に用いられる用量において副作用として末梢神経障害が頻繁に認められる薬物である。一連の薬物を検討した結果、末梢神経障害を引き起こす薬物が、軸索輸送を抑制する効果を示すことが明らかとなった。この結果は、本軸索輸送解析系が、神経機能評価や薬物毒性試験の新たな評価系となりうることを示唆する。

## E. 結論

我々は、従来にない薬物評価系として軸索輸送自動解析系を確立した。本実験系は、iPS 細胞を利用した病態の解明、薬物スクリーニングに有用であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Goshima Y, Usui H, Shiozawa T, Hida T, Kuraoka S, Takeshita S, Yamashita N, Ichikawa Y, Kamiya Y, Gotoh T, Gotoh T. Computational analysis of the effects of antineoplastic agents on axonal transport. *J. Pharmacol. Sci.*, **114(2)**,168-179 (2010).

### 2. 学会発表

蔵岡聡, 肥田友伸, 臼井洋, 竹下紗由美, 塩澤孝仁, 後藤敏行, 五嶋良郎: 軸索輸送の自動解析系の確立と薬剤スクリーニングへの応用, 日本薬理学会部会第120部会, 東京 (2009, 7).

## G. 知的所有権の取得状況

特許出願番号 2007-247438 軸索内移動粒子の自動追跡システム