

II. 分 担 研 究 報 告

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 iPS 分化細胞を利用した医薬品のヒト特異的有害反応評価系の開発・標準化」
平成 25 年度分担研究報告

ヒト神経幹細胞由来神経細胞等の薬理学的プロファイルに関する研究

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 細胞由来神経細胞塊（neurosphere）および神経前駆細胞から分化誘導した神経細胞の機能解析を行う fura-2 Ca^{2+} イメージングプロトコルを整備した。アカデミア、ヒト iPS 細胞メーカーの多種ヒト iPS 細胞由来神経細胞を入手し、このプロトコルに従い各種標本の機能受容体について比較検討をおこなった。ヒト iPS 細胞から神経系への誘導法開発が進むにつれ、NMDA 受容体の発現効率が上昇してきていることを明らかとした。我々の機能解析プロトコルの有用性が実証された。この結果は、興奮毒性評価が可能な標本が登場したことを示している。しかし、シナプス形成の指標である自発発火の観察には至っていないため、シナプス形成を促進する因子の探索、デバイス開発などを急ぐ必要がある。

キーワード：ヒト iPS 細胞由来神経細胞、グルタミン酸受容体、シナプス

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本を用いてヒト特異的神経系有害反応評価を可能とするために標本が満たすべき基準、およびそれを確認する標準プロトコルを定めることである。中枢神経機能に対するヒト特異的な有害反応で、動物での予測がほぼ不可能なものとして、社会活動の基本となる高次中枢神経系機能（記憶や学習等）への影響があげられる。この高次中枢機能の基礎過程となっているのは、興奮性グルタミン酸（L-glutamate: L-Glu）神経シナプスにおける伝達効率の変化＝シナプス可塑性である。シナプス可塑性には NMDA 型 L-Glu 受容体が重要な役割

を果たしていることがすでに明らかとなっているが、この NMDA 受容体はカルシウム透過性が高いため、神経障害時に細胞外 L-Glu 濃度上昇が上昇すると神経細胞機能障害、細胞死をもたらす。このような毒性は興奮毒性と呼ばれ、神経系以外の臓器では起こらない。したがって、ヒト特異的神経系有害反応評価を可能とするためには、まず神経細胞特異的な有害反応を評価可能とする必要がある。そのためには標本に NMDA 受容体が発現していなければならない。国衛研は、このようなクライテリアを満たす標本の探索を開始しており、共同研究機関であるアカデミア、ヒト iPS 細胞メーカーから多種のヒト iPS 細胞由来

神経細胞を入手している。そこで、ヒト iPS 細胞由来神経細胞塊 (neurosphere) および神経前駆細胞から分化誘導した神経細胞の機能解析を行う fura-2 Ca^{2+} イメージングプロトコルを整備した。このプロトコルに従い、各種標本の機能受容体について比較検討をおこなった。また、シナプス結合、神経回路形成をあらゆる自発発火が起こるかどうかについても検討を行った。

B. 研究方法

各種ヒト iPS 細胞由来神経細胞培養

1. Osaka-EB

大阪医療センターが樹立、及び、神経系への分化誘導を行った neurosphere (Osaka-EB) が、大阪医療センターより供与された。Osaka-EB は、basic fibroblast growth factor (bFGF) (peprotech)、epidermal growth factor (EGF) (peprotech)、human leukemia inhibitory factor (hLIF) (millipore) を添加した neurosphere 培地を用いて 12 日間浮遊培養後、TripLE Select (invitrogen) により single cell にした後、 1.5×10^5 cells/cm² の割合でポリオルニチン/フィブロネクチンコートした 8 well スライドチャンバー (nunc) に播種し、B27 supplement (invitrogen) を含む分化誘導培地に切り替えた。

2. 201B7-EB

3. 253G1-EB

京都大学が樹立した 201B7 及び 253G1 ヒト iPS 細胞株から、慶応大学において神経系への分化誘導を行った neurosphere 2 株 (201B7-EB, 253G1-EB) が、慶応大学より供与された。201B7-EB 及び 253G1-EB は、bFGF、

EGF、hLIF を添加した neurosphere 培地を用いて 12 日間浮遊培養後、TripLE Select を用いて single cell にした後、 1.5×10^5 cells/cm² の割合でポリオルニチン/フィブロネクチンコートした 8 well スライドチャンバーに播種し、B27 supplement を含む分化誘導培地に切り替えた。

4. iNeuron (CDI)

Cellular Dynamics International (CDI) から購入したヒト iPS 細胞由来神経細胞 (iCell® Neurons: iNeuron) を、 7.5×10^4 cells/cm² の割合で、ポリ-d-リジン/ラミンコートした 8 well スライドチャンバーに播種し、iNeuron 培地 supplement (CDI) を添加した iNeuron maintenance 培地 (CDI) を用いて培養を継続した。

5. Repro-DA

ReproCELL (Repro) から購入したヒト iPS 細胞由来神経細胞 (Repro-DA) を、 7.5×10^4 cells/cm² の割合で、ポリ-d-リジン/ラミンコートした 8 well スライドチャンバーに播種し、Aditive A (Repro) を添加した Maturation 培地 (Repro) を用いて分化誘導を行った。

6. 201B7-Dorso

京都大学が樹立した 201B7 ヒト iPS 細胞株を用い、SMAD 阻害剤 (dorsomorphin: Dorso) を用いて神経系への分化誘導を行った neurosphere (201B7-Dorso) が、大阪医療センターより供与された。201B7-Dorso は、bFGF、EGF、hLIF を添加した neurosphere 培地を用いて 12 日間浮遊培養後、accutase (sigma) により single cell にした後、 7.5×10^4 cells/cm² の割合でポリオルニチン/フィブロネクチンコートした 8

well スライドチャンバーに播種し、B27 supplement を含む分化誘導培地に切り替えた。

Fura-2 Ca²⁺ イメージング

細胞は、ポリオルニチンフィブロネクチンコートした 8 ウェルスライドチャンバーに播種し、経日的に分化誘導した後、Ca²⁺ 応答実験に用いた。Ca²⁺ プローブ Fura2-AM 10 μM を室温、45 分間処置し細胞内に取り込ませた。Ca²⁺ 解析装置 AQUACOSMOS (浜松ホトニクス) を用いて、励起波長 340nm/380nm 蛍光波長 510nm により得られた Fura2 蛍光像より蛍光強度の比を算出した。

Fura-2 Ca²⁺ イメージング系を用いた薬理実験

各種薬理実験は、Buffer saline solution (BSS) 中、灌流システムを用いて (2.0 ml / min) 行った。機能受容体の発現について検討可能な fura-2 Ca²⁺ イメージングプロトコルを整備した (図 1)。Osaka-EB, 201B7-EB, 253G1-EB はプロトコル①、iNeuron, Ripro-DA, 201B7-Dorso はプロトコル②→⑤ の手順で薬理的な解析を行った。

C. 研究結果

1. Osaka-EB (図 2)

Osaka-EB は、分化誘導 20 日目において、約半数の細胞が ATP に反応性を示した。わずかに NMDA に反応する細胞が存在した。30 日目には、これらに加え、L-Glu, picrotoxin, highK⁺ に反応する細胞が現れた。しかし、30 日目以降は細胞がはがれてしまい、測定不可能となった。また、Osaka-EB の neurosphere は増幅できず、一世代の

みで標本が失われた。

2. 201B7-EB (図 3)

201B7-EB は分化誘導 30 日目に ATP、highK⁺ に反応する細胞が現れた。40 日目には ATP に反応する細胞の割合が減少し、L-Glu に反応する細胞が現れた。40 日目以降は細胞がはがれ、測定不可能となった。201B7-EB は非常にばらつきが大きい標本で、1 well 内の細胞の Ca²⁺ 反応トレースは細胞ごとに大きく異なり、さらに同じチャンバー内でも well ごとに反応性が著しく異なっていた。また、neurosphere がフラスコに接着しやすく、安定的に neurosphere ストックを作成するのが困難であった。

3. 253G1-EB (図 4)

253G1-EB は分化誘導 10 日目ですでに L-Glu、highK⁺ に反応する細胞が現れた。40 日目までその他のリガンドに対する反応は現れず、40 日目に ATP に反応する細胞があらわれた。253G1-EB はばらつきが小さく、細胞レベル、well レベルで常にそろった反応を記録することができた。また、253G1-EB は neurosphere の増殖性が高く、安定的に neurosphere ストックを作成することができた。

4. iNeuron (CDI)

iNeuron はほぼ 100% の細胞が播種 1 日目から L-Glu、highK⁺ に反応を示した。また、GABA によっても細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇が起こった (図 5)。この反応プロファイルは培養日数をあげてもほとんど変化しなかった。培養 21 日目に、L-Glu 受容体サブタイプに特異的な阻害剤を用いて薬理的な検討を行ったところ、AP5 (NMDA 型

L-Glu 受容体阻害薬) によって L-Glu の反応が有意に阻害されない場合 (図 6A)、阻害される場合 (図 6B) とが見受けられた。同ロットでもチューブが異なる標本では AP-5 への反応性が異なった。AP-5 が作用を発揮しない場合も発揮した場合も、DNQX (AMPA/KA 型 L-Glu 受容体阻害薬) は有意に L-Glu の反応を阻害した。

5. Repro-DA

Ripro-DA は播種 1 日目において ATP、L-Glu へ反応する細胞が見受けられた (図 7)。7 日目には L-Glu への反応が現れ、一方、ATP に反応する細胞は経日的に減少した。GABA に反応する細胞は 7-14 日をピークに減少した。L-Glu に反応する細胞は 14 日目にはほぼ 100% に達し、それ以降は変化がなかった。培養 28 日目に、L-Glu 受容体サブタイプに特異的な阻害剤を用いて薬理的な検討を行ったところ、ほぼ全ての細胞において AP5 は L-Glu への反応を有意に阻害した (図 8)。DNQX をさらに加えると、L-Glu の反応をさらに強力に阻害した。

6. 201B7-Dorso

201B7-Dorso は分化誘導 7 日目において ATP、L-Glu へ反応する細胞が見受けられた (図 9)。以降、ATP、L-Glu に反応する細胞の比率は増加し、14 日目で L-Glu に反応する細胞は 100% に達した。14 日目には GABA に反応する細胞が現れたが、28 日目をピークに減少した。分化誘導 28、35 日目に、L-Glu 受容体サブタイプに特異的な阻害剤を用いて薬理的な検討を行ったところ、28 日目、35 日目ともに、ほぼ全ての細胞において、AP5 によって

L-Glu への反応が有意に阻害された (図 10)。DNQX をさらに加えると、L-Glu の反応をさらに強力に阻害した。

D. 考察

Neurosphere は凍結、解凍、増幅、という過程を繰り返し行えるという、他臓器にはない利便性があるが、その点においても標本間の相違が明らかとなった。Osaka-EB は十分増幅せず、201B7-EB は増幅が困難かつ、細胞・実験間のばらつきが非常に大きかった。この点で、これら 2 種の標本は実用には適さないと判断された。

我々がまず最初に到達すべき目標は、神経細胞特異的な有害反応である興奮毒性を評価可能な標本を見いだす事である。興奮毒性を再現するためには Ca^{2+} 透過性の高い NMDA 型 L-Glu 受容体の発現が必要となる。253G1-EB は増幅しやすく、標本間のばらつきが非常に小さいため、使いやすさという点では先の 2 標本よりも優れていたが、培養 40 日目まで NMDA 受容体を介した反応を示さなかった。CDI 社より販売されている iNeuron は神経前駆細胞であるため、播種 1 日目にほぼ 100% の細胞が L-Glu に反応する。しかし、薬理的な検討により L-Glu の反応に NMDA 受容体を介した成分が含まれている場合と含まれていない場合があり、しかも、同一ロットでもこの点がそろっていないという問題を明らかとした。GABA に対して 70% 以上の細胞が興奮性の反応を示しており、この比率は培養期間中変化しない。GABA 受容体は Cl^- チャンネルであるが、未熟な神経細胞では細胞内 Cl^- をくみ出

すポンプの発現量が低く、細胞内 Cl^- 濃度が成熟細胞より高い (Physiol Rev. 2007 87:1215-84)。したがって、GABA 受容体に GABA が結合すると、 Cl^- の流出が起こり細胞が興奮する。これは、未熟な神経細胞の指標として広く用いられている反応である。以上のことより、iNeuron は分化誘導条件で培養しつづけても、細胞が成熟しないことがわかった。Ripro-DA も神経前駆細胞として販売されている細胞であるが、播種 1 日目は ATP, GABA, highK^+ に反応し、L-Glu には反応しなかった。7 日目に L-Glu への反応が現れ、反応細胞数が培養日数とともに増加した。また 28 日目にはほぼ 100% の細胞に NMDA 受容体成分が現れることも明らかとした。それまでには、ATP, GABA への興奮性を示す細胞数もほぼ 0 となっており、神経細胞が成熟していることが示唆される。201B7-Dorso も分化誘導 7 日目に L-Glu への反応が現れ、14 日目にはほぼ 100% の細胞が反応するようになる。また 28、35 日目にはほぼ 100% の細胞に NMDA 受容体成分が現れることも明らかとした。GABA への興奮性を示す細胞数は 28 日目をピークに減少した。一方、ATP に対する反応は 28-35 日目の間に大きく増加した。35 日目の標本では、GFAP(+) $\text{S100}\beta$ (+)も現れており、この ATP へ反応した細胞はグリア細胞であることが強く示唆される。

興味深いことに、201B7-EB, 201B7-Dorso は同じ 201B7 株から誘導した neurosphere である。しかし、分化誘導法によって terminal differentiation の様相が大きく異なる

ことが判明した。

Ripro-DA, 201B7-Dorso はほぼ 100% の細胞が機能的な NMDA 受容体を持つことが示されたが、どちらもまだ duplicate のデータであるため、さらに例数を重ねてデータの信頼性をあげる必要がある。

これまでの結果を俯瞰すると、ヒト iPS 細胞から神経系への誘導法開発が進むにつれ、NMDA 受容体の発現効率が上昇してきている、という傾向をみるができる。これは、神経細胞特異的な有害反応である興奮毒性の評価が可能になったことを示している。しかし、我々のこれまでの実験ではシナプス形成の指標である自発発火の観察には至っていない。今後、さらに高次の中枢機能への影響評価を達成するためには、シナプス形成を促進する因子(グリア細胞との相互作用など)の探索、デバイス開発などを急ぐ必要がある。

E. 結論

我々が整備したプロトコルに従って、多種のヒト iPS 細胞由来神経細胞標本の特性データを蓄積した結果、ヒト iPS 細胞から神経系への誘導法開発が進むにつれ、NMDA 受容体の発現効率が上昇してきていることを明らかとした。我々の機能解析プロトコルの有用性が実証された。また、この結果は、興奮毒性評価が可能な標本が登場したことを示している。しかし、シナプス形成の指標である自発発火の観察には至っていないため、シナプス形成を促進する因子(グリア細胞との相互作用など)の探索、デバイス開発などを急ぐ必要がある。

F. 研究発表

論文

1. Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J.E., Sekino, Y. and Sato, K. (2014) Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 34(5): 2231-2243.
2. Takahashi, K., Ishii-Nozawa, R., Takeuchi, K., Nakazawa, K., Sekino, Y. and Sato, K. (2013) Niflumic acid activates additional currents of the human glial L-glutamate transporter EAAT1 in a substrate-dependent manner. *Biol Pharm Bull* 36(12): 1996-2004.
3. Oguchi-Katayama, A., Monma, A., Sekino, Y., Moriguchi, T. and Sato, K. (2013) Comparative gene expression analysis of the amygdalae of juvenile rats exposed to valproic acid at prenatal and postnatal stages. *J Toxicol Sci* 38(3): 381-402.
4. Kinoshita, M., Nasu-Tada, K., Fujishita, K., Sato, K. and Koizumi, S. (2013) Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of Tonic P2Y14-receptor-mediated signal(s). *Cell Mol Neurobiol* 33 (1): 47-58.

学会発表

国内学会

1. 佐藤 薫、関野祐子：化学物質が生後初期神経・グリア新生に及ぼす影響を簡便に検討するための in vitro 評価系の開発、日本薬学会 第 134 年会 (2014, 3, 熊本)
2. 高橋華奈子、最上(重本)由香里、大津香苗、岡田洋平、岡野栄之、関野祐子、佐藤 薫：ヒト iPS 細胞由来神経細胞標本を用いた神経毒性評価系の構築、日本薬学会 第 134 年会 (2014, 3, 熊本)
3. 片山敦子、門馬彰彦、秋友孝文、虞末 愛、星 裕姫乃、守口 徹、関野祐子、佐藤 薫：胎生期および新生期の化学物質暴露の情緒社会性への影響を予測する、遺伝子発現解析に基づく新規評価手法の開発、日本薬学会 第 134 年会 (2014, 3, 熊本)
4. 最上 (重本) 由香里、干川 和枝、関野 祐子、佐藤 薫：ミクログリアによる血液脳関門の機能制御機構の解明、日本薬学会 第 134 年会 (2014, 3, 熊本)
5. 笠原由香、三浦真理恵、最上 (重本) 由香里、関野祐子、佐藤 薫、鈴木岳之：抗うつ薬と P2X4 受容体の相互作用の比較検討、日本薬学会 第 134 年会 (2014, 3, 熊本)
6. 佐藤 薫：ミクログリアの病理的新機能と生理的新機能一極性からみた神経疾患治療の可能性、第 87 回日本薬理学会年会シンポジウム「ニューロン・グリア連関から紐解く神経疾患」(2014, 3, 仙台)
7. 大原由貴、山崎博幸、大津真生、佐藤 薫、関野祐子、白尾智明：

- ヒト iPS 細胞由来神経細胞の発達に関する研究、第 91 回 日本生理学会大会 (2014, 3, 鹿児島)
8. 佐藤 薫: ヒト iPS 細胞由来神経細胞に期待すること、4 社共催: ヒト iPS 細胞由来神経ワークショップ (講演) (2014, 3, 横浜)
 9. 佐藤 薫: hiPSC-ニューロンで神経特異的有害反応は予測可能か、公開シンポジウム ヒト iPS 細胞の創薬プロセスへの応用～国際情勢を見据えた新規試験法開発を目指して～ (2014, 2, 東京)
 10. Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H., Sekino, Y. and Sato K.: An attempt to establish the neurotoxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons, the 7th Takeda science foundation symposium on pharmasciences 'iPS Cells in drug discovery and development' (2014, 1, 大阪)
 11. 佐藤 薫、高橋 華奈子、重本一最上 由香里、大津 香苗、岡田洋平、岡野 栄之、関野 祐子: ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた神経毒性評価系確立の試み、第 22 回日本バイオイメーキング学会 (2013, 9, 東京)
 12. Sato, K., Fujimori, K., Takaki, J., Suzuki, T. and Sekino, Y.: P2X4 receptor-mediated acceleration of microglial activation is important for the L-glutamate release from activated microglia in the early stage of inflammation, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
 13. Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Miura, M., Sekino, Y. and Sato, K.: Development of in vitro blood-brain barrier model reflecting the function of neurovascular unit, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
 14. Takahashi, K., Irie, T., Sekino, Y. and Sato, K.: The function of glial excitatory amino-acid transporter EAAT2 is enhanced by docosahexanoic acid, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
 15. Ohtsu, K., Takahashi, K., Shigemoto-Mogami, Y., Okada, Y., Okano, H., Sato, K. and Sekino, Y.: An Attempt to develop a neurotoxicity evaluation system using human induced pluripotent stem cell-derived neurons vulnerable to excitotoxicity, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
 16. Hoshikawa, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohno, Y., Goldman, J.E., Sekino, Y. and Sato, K.: Activated microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis via inflammatory cytokines, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
 17. Katayama, A., Monma, A., Akitomo, K., Hirose, M., Hoshi, Y., Moriguchi, T., Sekino, Y. and Sato, K.: Search for genetic markers for the risk of the postnatal exposure to chemical compounds in emotion and social behavior after maturation, Neuro2013 (2013, 6, 京都)
 18. 関野祐子、大原由香、佐藤 薫、

高橋華奈子、山崎博幸、白尾智明:
iPS 細胞由来分化細胞の生理機能
を確認するための実験プロトコ
ール作成の試み、第6回上肢の神
経機能回復セミナー (2013, 6, 秋
田)

国際学会

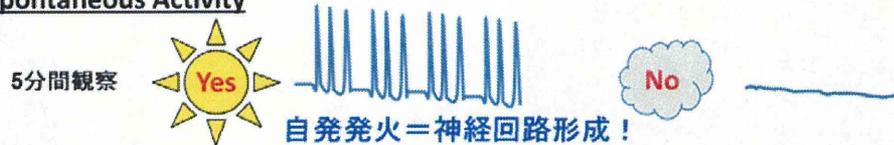
19. Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Goldman, J.E. and Sekino, Y.: The role of microglia in neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. SfN2013 (2013, 11, San Diego, USA)
20. Ohara, Y., Yamazaki, H., Sato, K., Shirao, T. and Sekino, Y.: Morphological development and expression of synaptic proteins of human iPSC-derived neurons. SfN2013 (2013, 11, San Diego, USA)
21. Sato, K., Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T. and Sekino, Y.: L-Glutamate released from activated microglia down regulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. ISN-ASN 2013 (2013, 4, Cancun, Mexico)
22. Sato, K., Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T. and Sekino, Y.: L-Glutamate released from activated microglia down regulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation. ISN-ASN 2013 satellite meeting (2013, 4, Merida, Mexico)
23. Sekino, Y., Takahashi, K., Mogami-Shigemoto, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H. and Sato, K.: Calcium signalling of human iPSC-derived neurons responding to ATP and L-glutamate stimulation. ISN-ASN 2013 (2013, 4, Cancun, Mexico)
24. Sekino, Y., Takahashi, K., Mogami-Shigemoto, Y., Ohtsu, K., Okada, Y., Okano, H. and Sato, K.: Calcium imaging of responses to ATP and L-glutamate stimulation of human iPSC-derived neurons. ISN-ASN 2013 satellite meeting (2013, 4, Playa del Carmen, Mexico)

G. 知的所有権の取得状況

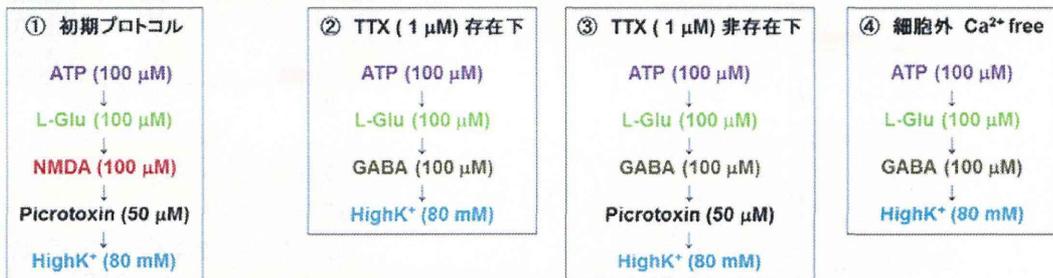
なし

hiPSC ニューロンの神経細胞機能を判定する基本プロトコル Fura-2 Ca²⁺ イメージング

1. Spontaneous Activity



2. 機能受容体を検討する Agonist 実験



3. L-Glu 受容体サブタイプを同定する Antagonist 実験

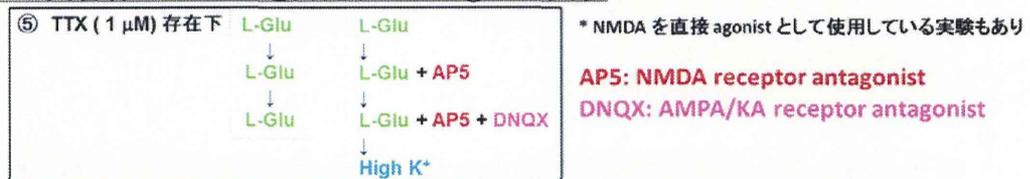
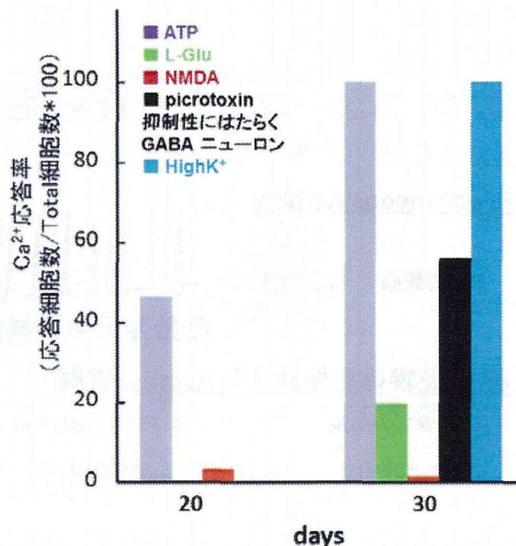
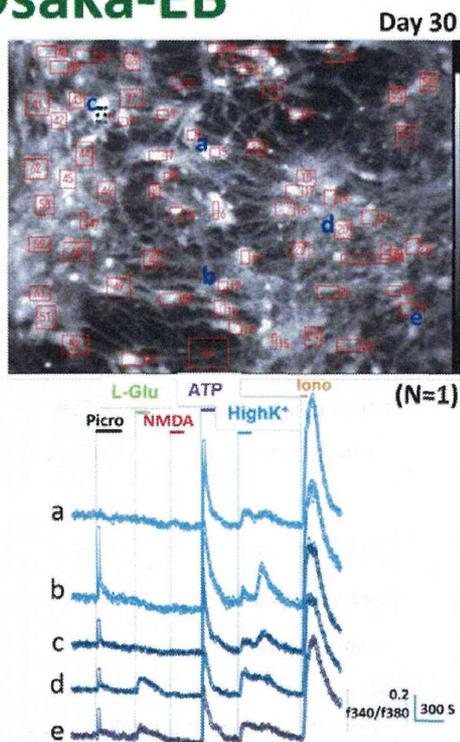


図 1. ヒト iPS 細胞由来神経細胞の機能受容体、特性解析のために整備したプロトコル

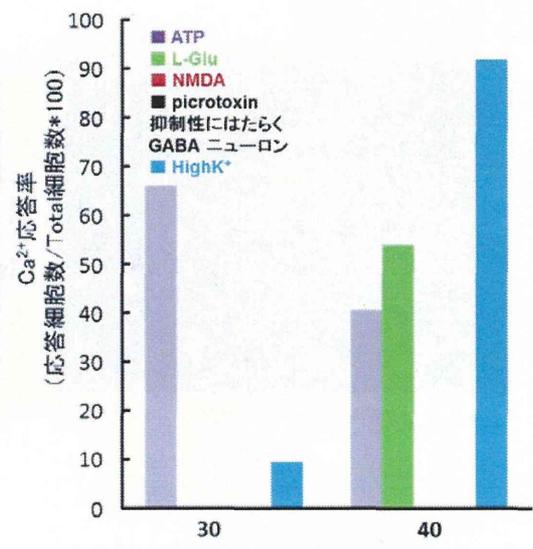
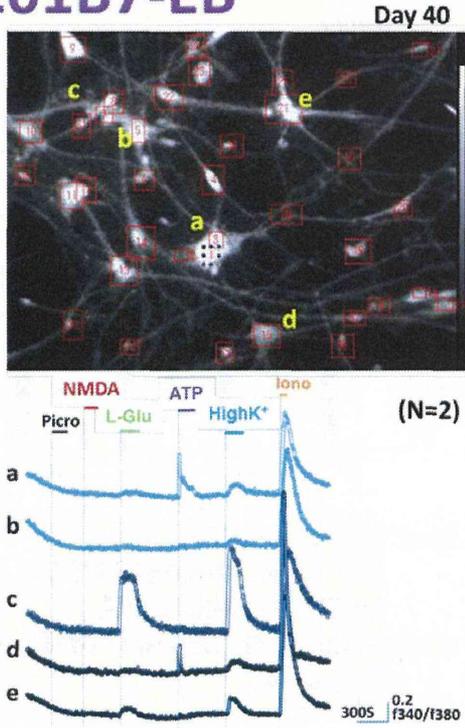
Osaka-EB



Pros: ほぼニューロン。
 ATP→L-Glu
 NMDA, GABA 受容体発現
 Cons: neurosphereの増幅できず
 →1代で失われた

図 2. Osaka-EB の機能受容体発現の fura-2 Ca²⁺ イメージングを用いた解析結果
 Osaka-EB は、分化誘導 20 日目において、約半数の細胞が ATP に反応性を示した。ごくわずかの細胞が NMDA に反応した。30 日目には、これらに加え、L-Glu, picrotoxin, highK+ に反応する細胞が現れた。30 日目以降は細胞がはがれてしまい、測定不可能となった。

201B7-EB

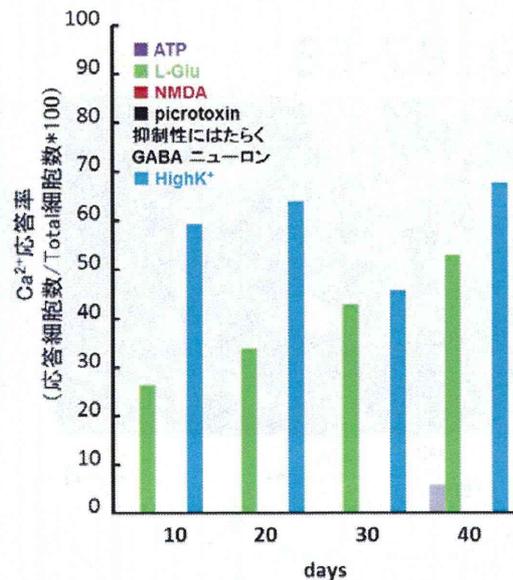
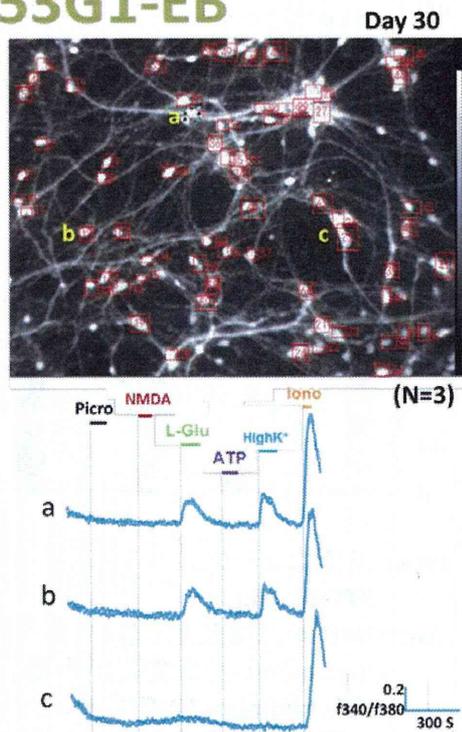


Pros: ほぼニューロン^{days}。
ATP→L-Glu

Cons: NMDA には反応しない。
neurosphere の増幅が困難。
同じ chamber 内でばらつき。
→再現性のあるデータは困難

図 3. 201B7-EB の機能受容体発現の fura-2 Ca²⁺ イメージングを用いた解析結果
201B7-EB は分化誘導 30 日目に ATP、highK⁺ に反応する細胞が現れた。40 日目には ATP に反応する細胞の割合が減少し、L-Glu に反応する細胞が現れた。40 日目以降は細胞がはがれ、測定不可能となった。201B7-EB は非常にばらつきが大きい標本であった。

253G1-EB



Pros: ほぼニューロン。
neurosphereの増幅しやすい。
10日目でL-Gluに反応。
Cons: mGluRを介したL-Gluへの弱い反応のみ。

図 4. 253G1-EB の機能受容体発現の fura-2 Ca²⁺ イメージングを用いた解析結果
253G1-EB は分化誘導 10 日目ですでに L-Glu、highK⁺ に反応する細胞が現れた。40 日目までその他のリガンドに対する反応は現れず、40 日目に ATP に反応する細胞があらわれた。253G1-EB はばらつきが小さく、細胞レベル、well レベルで常にそろった反応を記録することができた。

iNeuron

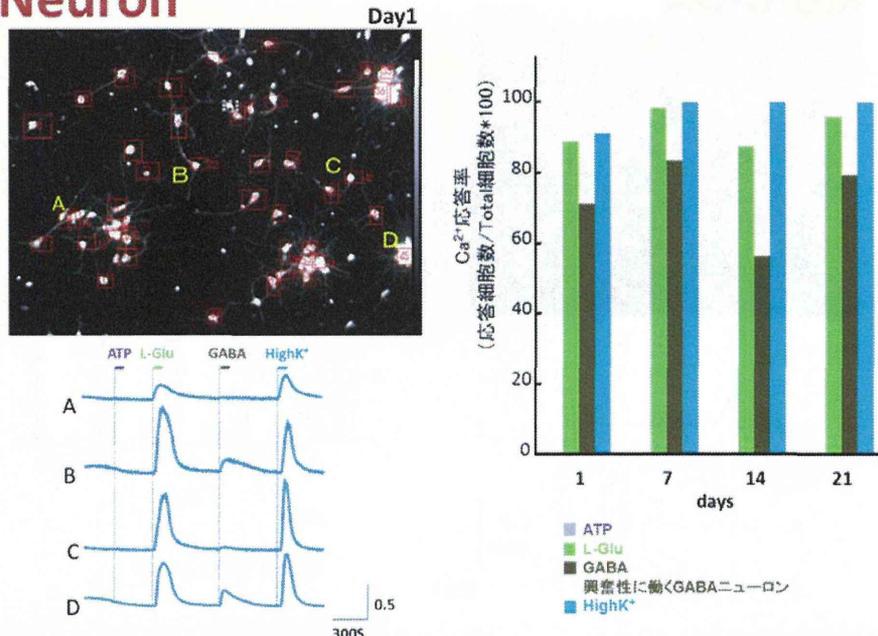


図 5. iNeuron の機能受容体発現の fura-2 Ca²⁺ イメージングを用いた解析結果

iNeuron はほぼ 100% の細胞が播種 1 日目から L-Glu、highK⁺ に反応を示した。また、GABA によっても細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇が起こった。この反応プロファイルは培養日数をあげてもほとんど変化しなかった。

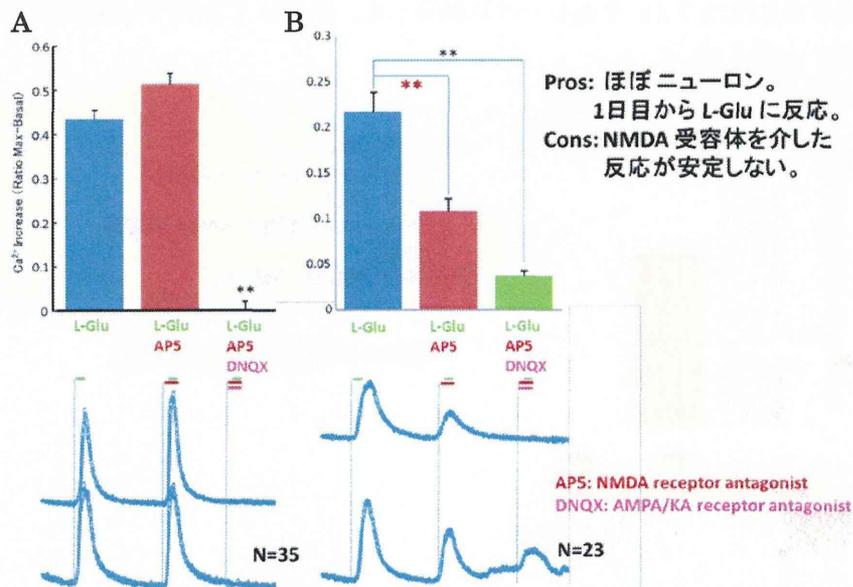


図 6. iNeuron の L-Glu 受容体サブタイプに関する薬理的解析

培養 21 日目に、L-Glu 受容体サブタイプに特異的な阻害剤を用いて薬理的な検討を行った。AP5 によって L-Glu の反応が有意に阻害されない場合 (A)、阻害される場合 (B) とが見受けられた。AP-5 の作用に関わらず、DNQX は有意に L-Glu の反応を阻害した。

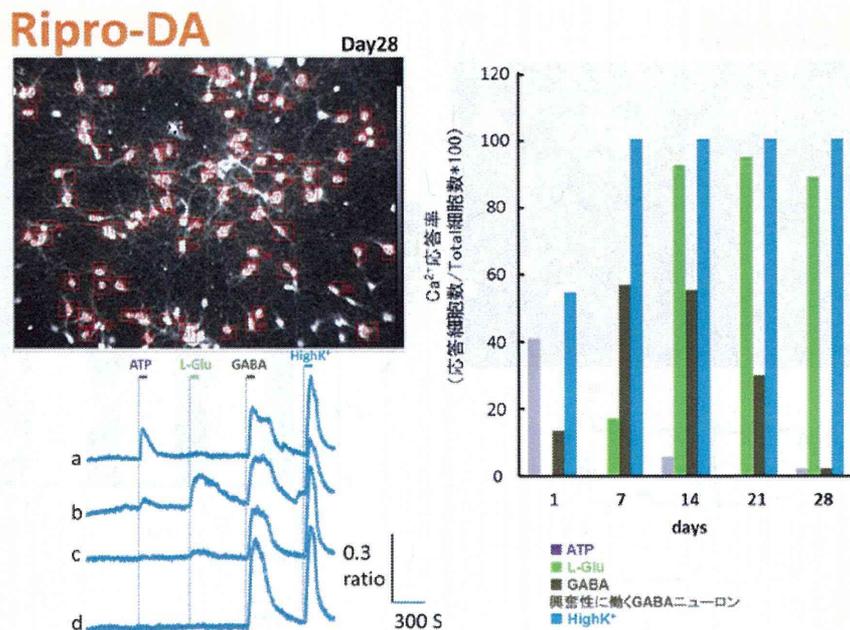
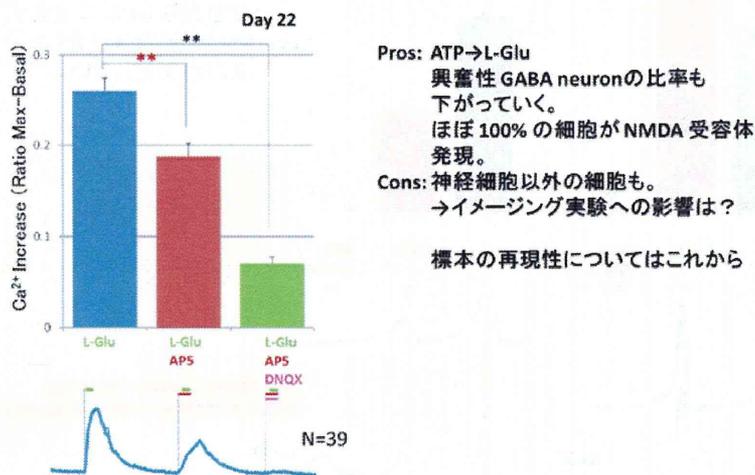


図 7. Ripro-DA の機能受容体発現の fura-2 Ca²⁺ イメージングを用いた解析結果
 Ripro-DA は播種 1 日目において ATP、L-Glu へ反応する細胞が見受けられた。7 日目には L-Glu に反応する細胞が現れ、一方、ATP に反応する細胞は経日的に減少した。GABA に反応する細胞は 7-14 日をピークに減少した。L-Glu に反応する細胞は 14 日目にはほぼ 100% に達した。



Pros: ATP→L-Glu
 興奮性 GABA neuron の比率も下がっていく。
 ほぼ 100% の細胞が NMDA 受容体発現。
Cons: 神経細胞以外の細胞も。
 →イメージング実験への影響は？
 標本の再現性についてはこれから

図 8. Ripro-DA の L-Glu 受容体サブタイプに関する薬理的解析
 培養 28 日目に、L-Glu 受容体サブタイプに特異的な阻害剤を用いて薬理的な検討を行った。ほぼ全ての細胞において AP5 は L-Glu への反応を有意に阻害した。DNQX をさらに加えると、L-Glu の反応をさらに強力に阻害した。

201B7-Dorso

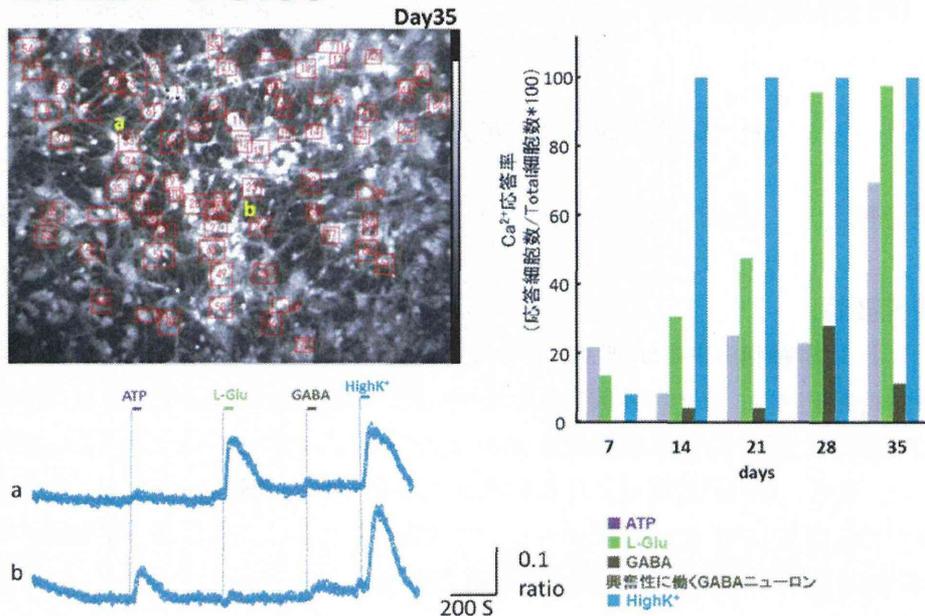


図 9. 201B7-Dorso の機能受容体発現の fura-2 Ca²⁺ イメージングを用いた解析結果
201B7-Dorso は分化誘導 7 日目において ATP、L-Glu へ反応する細胞が見受けられた。以降、ATP、L-Glu に反応する細胞の比率は増加し、14 日目で L-Glu に反応する細胞は 100 % に達した。14 日目には GABA に反応する細胞が現れたが、28 日目をピークに減少した。

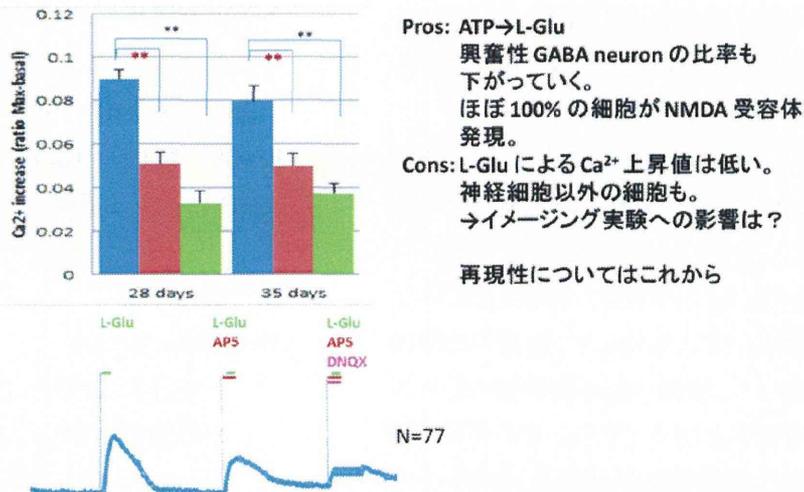


図 10. 201B7-Dorso の L-Glu 受容体サブタイプに関する薬理的解析
分化誘導 28、35 日目に、L-Glu 受容体サブタイプに特異的な阻害剤を用いて薬理的な検討を行ったところ、28 日目、35 日目ともに、ほぼ全ての細胞において、AP5 によって L-Glu への反応が有意に阻害された。DNQX をさらに加えると、L-Glu の反応をさらに強力に阻害した。

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 iPS 分化細胞を利用した医薬品のヒト特異的有害反応評価系の開発・標準化」
平成 25 年度分担研究報告

ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞の品質評価

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：

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた医薬品による催不整脈作用を検出する標準プロトコルを用いて、日本で作製させた分化心筋細胞を用いて評価を行った。その結果、陽性対照物質として IKr 阻害剤 E-4031 を用いて QT 延長を評価できることを明らかにした。また、培地の検討により EAD/TA も評価できる可能性を示した。今後は、他の多くの医薬品を用いてバリデーションを実施することにより分化心筋細胞を用いた薬理試験の再現性・信頼性を検証する予定である。

キーワード：ヒト iPS 細胞 TdP QT 延長 EAD TA

A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた薬理試験を提案するために日本産の分化心筋細胞の整備を行い、ガイダンス作成のための基盤整備を行うことである。

分化心筋細胞を用いた医薬品評価法開発には、多くの製薬関連企業が期待している。しかしながら、分化誘導条件、分化状態、標本の状態、薬理実験方法などが標準化されておらず、結果の比較検討は難しく、評価手法の標準化の遅れが大きな障害となっている。さらには、海外の分化心筋細胞は市販品が日本国内においても流通しており、遅れをとっている。

そこで、海外産だけではなく国産の分化心筋細胞を用いた薬理試験法の構築が求められている。医薬品のヒト特異的

有害反応評価系の開発・標準化のために国産の分化心筋細胞を整備して、標準プロトコルを用いて試験法を確立することが重要である。今回この目的を達成するために、京都大学 CiRA で作製された分化心筋細胞を用いて hERG 阻害剤 E-4031 および IKs 阻害剤 Chromanol 293B に対する薬理作用を検討した。

B. 研究方法

1) 分化心筋細胞

京都大学 CiRA で作成された分化心筋細胞を用いた。細胞は B27 培地あるいは alpha MEM 培地を用いた。

2) 多点電極システムによる細胞外電位の測定

MEA システムとして MED64 (アルファメッドサイエンティフィック社) を用いて、分化心筋細胞の電気活動を記

録した。各被験物質は蓄積的に添加し、10 分間記録し、最後の1分間の結果を解析した。催不整脈作用の指標として、QT 間隔に相当する Field Potential Duration (FPD) および EAD/TA の発生率を解析した。

3) 波形解析

波形は、FlexPro8 (Weisang (GmbH)) を使用して解析した。具体的には、データを CSV 形式変換し、FlexPro ソフトウェアに読み取らせ、波形データを可視化した。得られた波形から所定のピークを認識させ、認識ずれや認識漏れがないかを確認し、必要に応じて修正した。ピークを認識した情報と共にエクセル(マイクロソフト)に転送し、FPD などの各値を算出した。さらに、Fredericia 式により補正した。

C. 研究結果

分化心筋細胞を薬理実験に利用するためには、品質がそろった心筋細胞が大量に必要であるため、我々は国内のヒト iPS/ES 細胞由来の分化心筋細胞の調査を行い、CiRA 山下研究室の分化心筋細胞の純度が非常に高く安定していると考えられたことから、モデル細胞として用いることとした。

我々は昨年度までの研究により、CDI 社の iCell 心筋細胞を用いて細胞外電位システムを用いた薬理試験プロトコルを整備してきた (J Pharmacol Sci. 2014;124:494-501)。このプロトコルのもと、CiRA の分化心筋細胞の評価を行った。まず、薬剤を投与する前の性質に対する培地の影響を検討した。培地は、alpha MEM 及び B27 の 2 種類を比較した。そ

の結果、分化心筋細胞の Beat per Minute (BPM)、Interspike interval (ISI)、Field potential Duration (FPD) は両培地によって多少の差は認められたが、Fridericia 式で補正した cFPD はほぼ同じであった(図 1)。この条件のもとで、陽性対象物質である hERG 阻害剤 E-4031 の影響を両培地に対して比較検討した。図 2 に示すように、alpha MEM 培地においては BPM、ISI は E-4031 の添加によりほとんど影響を受けなかった。一方、B27 培地においては、E-4031 の 30nM 以上では BPM の減少と ISI の延長が観察された。さらに、E-4031 によって FPD の延長を調べたところ、両方の培地において延長が認められた(図 3)。E-4031 10nM に処理により、cFPD 延長は 10nM 処理により 36.55% (alpha MEM)、29.48% (B27) であり、同程度の感度であった。

さらに、E-4031 による EAD/TA の発生も観察された。図 4 に示すように、alpha MEM 培地においては 30nM から観察されたのに対して、B27 培地では 100nM においてようやく観察された。従って、EAD の発生率培地によってコントロールできる可能性が考えられた。

IKs 阻害剤の影響を調べたところ、特に延長が認められなかった(図 5)。従って、IKs チャンネルの機能は不十分であると考えられた。

D. 考察

本研究において、日本で作製されたヒト iPS 細胞由来の分化心筋細胞が医薬品による催不整脈作用を検出できるのか検討を行った。その結果、E-4031 による FPD の延長および EAD の発生が

観察された。特に、EAD は QT 延長とは異なる催不整脈作用を評価できることが明らかになった。

分化心筋細胞は、元の iPS 細胞株や分化誘導法、培養期間などによって性質が異なると考えられており、薬理作用の標準プロトコルの作成が遅れている状況であった。今回、市販の iCell 心筋で同一の条件下で国産の分化心筋細胞の性質を比較した。その結果、陽性対照物質 E-4031 による FPD 延長及び EAD 発生を確認することができた。従って、元の iPS 細胞株にかかわらず、薬理試験の評価が行える可能性が明らかになった。iCell との検出感度は、FPD 延長は CiRA 心筋の方が高感度であった。EAD 発生は iCell、CiRA 心筋 (alpha MEM) どちらも 100nM においてすべてのプローブで認められたことから、ほぼ同じであった。CiRA 心筋は、EAD の発生率が alpha MEM と B27 で異なることから、培地によってコントロールできる事が考えられ、非常に興味深い。分化心筋細胞は各イオンチャネルを発現しているためマルチチャネルによる評価が可能とされているが、EAD 発生率を指標とすることにより QT 延長とは異なる催不整脈作用を評価できる可能性が考えられる。今後、EAD や TA の判断基準を設定することにより、新規の薬理試験法に発展することが期待される。

CiRA 心筋は Chromanol293 による FPD 延長は観察されなかった。従って、分化が不十分であると考えられる。一般に、長期間培養することによって成熟化が進むことが知られているので、今後詳細なタイムコースを検討する必要がある。

本研究により、CiRA の分化心筋においても iCell 心筋同様に、E-4031 による FPD 延長および EAD 発生が認められた。今後は、分化のタイムコースを検証して最適化した後、バリデーションを実施して、分化心筋細胞を用いた薬理試験法の再現性・信頼性の検証が期待される。

E. 結論

市販のヒト iPS 細胞由来分化心筋細胞を用いて多施設バリデーションを行い、どの施設においても E-4031 の薬理作用を検出できることを明らかにした。また、EAD/TA の発生率を指標とすることにより、QT 延長とは異なる催不整脈作用を評価できることが明らかになった。

F. 研究発表

論文

1. 関野祐子、佐藤薫、諫田泰成、石田誠一：ヒト iPS 分化細胞を利用した医薬品のヒト特異的有害反応評価系の開発・標準化、国立医薬品食品衛生研究所報告、131: 25-34. (2013)
2. 諫田泰成、ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導法、日本薬理学雑誌、141: 32-36 (2013).

学会発表

国内学会

1. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全性薬理試験の開発、第 40 回日本毒性学会シンポジウム (2013,6,東京)
2. 黒川洵子、李敏、諫田泰成、関野

- 祐子、古川哲史：ヒト iPS 由来心筋を用いた心臓毒性評価系の構築、第 30 回心電学会（2013,11,青森）
3. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞由来分化細胞の標準化と創薬への応用細胞アッセイ研究会(2013,11,東京)
 4. 黒川洵子、李敏、諫田泰成、芦原貴司、関野祐子、古川哲史：ヒト iPS 由来心筋を用いた薬剤誘発性不整脈の研究、生理研研究会（2013,11,岡崎）
 5. 黒川洵子、諫田泰成、古川哲史：iPS 心筋を用いた心機能評価、第 23 回日本循環薬理学会（2013,12,福岡）
 6. 諫田泰成：Development of an in vitro cardiac safety testing using human iPS-cell derived mature cardiomyocytes、第 1 回心臓安全性に関するシンクタンクミーティング 2014 in 霧島（2014,1,霧島）
 7. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた安全性評価法の現状と今後の展望、厚生労働省公開シンポジウム（2014,2,東京）
 8. 高橋和也、早川智広、國弘威、辰田寛和、松居恵理子、矢田博昭、諫田泰成、黒川洵子、古川哲史：イメージングによる培養心筋細胞の拍動伝播評価、第 5 回日本安全性薬理研究会（2014,2,東京）
 9. 中村裕二、松尾純子、宮本憲優、小島敦子、安東賢太郎、諫田泰成、澤田光平、杉山篤、関野祐子：Assessment of testing methods of the drug-induced repolarization delay and arrhythmias in an iPS-derived cardiomyocytes sheet: Multi-site validation study、第 5 回日本安全性薬理研究会（2014,2,東京）
 10. 諫田泰成：ヒューマンサイエンス振興財団一開発振興/規制基準合同委員会、ヒト iPS 細胞を用いた心臓毒性評価の現状と課題（2014,2,東京）
 11. 李敏、諫田泰成、芦原貴司、笹野哲郎、関野祐子、古川哲史、黒川洵子：ヒト iPS 由来心筋を用いた薬物誘発性 QT 延長に対する新規 in vitro 評価系、第 87 回日本薬理学会（2014,3,仙台）
 12. 藤塚美紀、黒川洵子、鳥野初萌、中井雄二、永森収志、金井好克、諫田泰成、松居恵理子、古川哲史：ヒト iPS 由来心筋細胞の収縮に対する基質硬度の影響、第 87 回日本薬理学会（2014,3,仙台）
 13. 中村裕二、松尾純子、宮本憲優、小島敦子、安東賢太郎、諫田泰成、澤田光平、杉山篤、関野祐子：iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた薬物性再分極遅延評価法の分析：多施設間バリデーション、第 87 回日本薬理学会（2014,3,仙台）
 14. 諫田泰成：第 87 回日本薬理学会、ヒト iPS 細胞由来の成熟心筋細胞の開発—実用化に向けて（2014,3,仙台）
- 国際学会**
1. Li Min, Yasunari Kanda, Yuko Sekino, Tetsushi Furukawa, Junko Kurokawa. Functional optimization of commercially available human