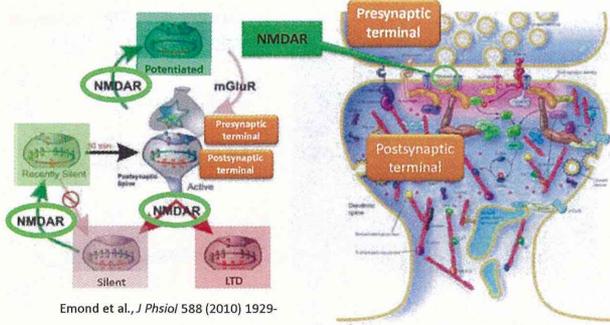


## 神経細胞機能 = シナプス機能



Emond et al., *J Physiol* 588 (2010) 1929-

シナプス機能 = シナプス可塑性  
(伝達効率の可塑的变化)

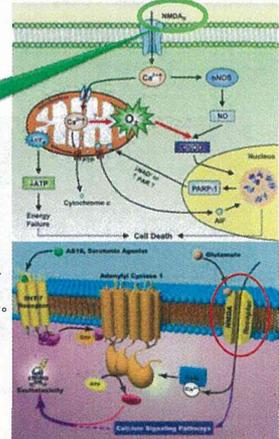
シナプス機能を担うタンパク質分子群

## 神経細胞特有の細胞死 = 興奮毒性

### NMDA 型 グルタミン酸受容体

グルタミン酸の細胞間隙濃度上昇によって引き起こされる長期脱分極と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇が原因。NMDA 型グルタミン酸受容体は  $Ca^{2+}$  透過性が高い。

神経特異的細胞死の多くが異常興奮によって引き起こされる。  
e.g., 虚血、低血糖、てんかん、神経変性疾患



## hiPSC-ニューロンで 神経特異的有害反応 in vitro 予測評価系を確立するための 達成目標

★NMDA 型グルタミン酸受容体の発現  
→ 神経細胞特有の興奮毒性評価  
(細胞レベル)

★シナプス機能の再現  
→ より高次の神経細胞機能障害評価  
(神経回路レベル)

## hiPSC-ニューロンで 神経特異的有害反応 in vitro 予測評価系を確立するための 達成目標

★NMDA 型グルタミン酸受容体の発現  
→ 神経細胞特有の細胞死評価  
(細胞レベル)

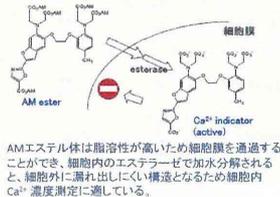
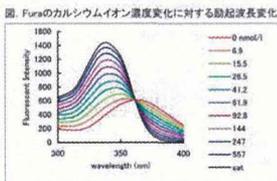
★シナプス機能の機能受容体の検討  
→ より高次の神経細胞機能障害評価  
(神経回路レベル)

## Fura2 $Ca^{2+}$ イメージング法

### Fura2

- R. Y. Tsien らにより開発された蛍光プローブ。
- $1 \mu\text{mol/l}$  付近までの  $Ca^{2+}$  濃度を計測可能。
- $Ca^{2+}$  結合により励起波長のピークが顕著にブルーシフト (362 nm  $\rightarrow$  335 nm) する。  
335 nm 付近  $\rightarrow Ca^{2+}$  濃度の上昇に伴い蛍光強度が増大する。  
370  $\sim$  380 nm 付近  $\rightarrow Ca^{2+}$  濃度の上昇に伴い蛍光強度が減少する。

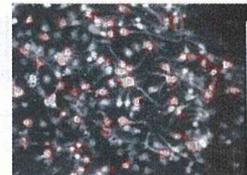
340 nm と 380 nm の二波長で励起し、蛍光強度の ratio をとると  $Ca^{2+}$  濃度と対応づけられる。



## Fura2 $Ca^{2+}$ イメージング法



Aquacosmos ratio imaging system  
励起波長を自動的に切り替えて蛍光強度を測定し ratio を算出するシステム



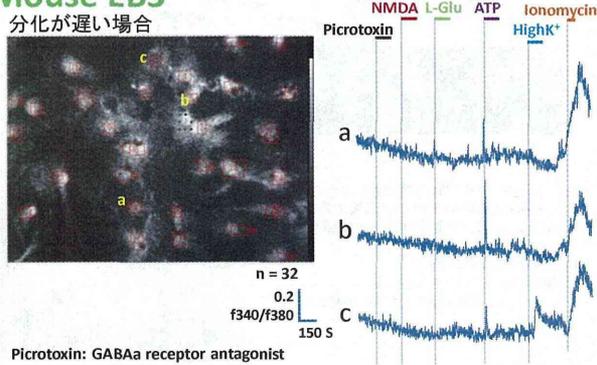
Fura-2 がロードされ、蛍光を発する細胞

<手順>  
細胞に Fura2-AM をロード  
→ 各種薬物への反応性を検討

- 一回の実験で  $N=50-100$  の細胞を検討できる。
- プロトコルが簡便。
- 一度に多種の薬物について検討可能。

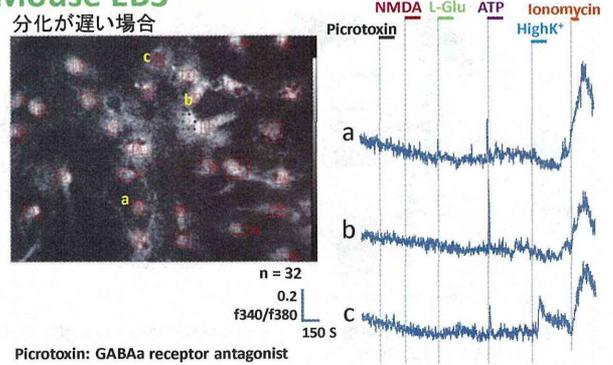
Mouse ES 細胞では

Mouse EB3  
分化が遅い場合



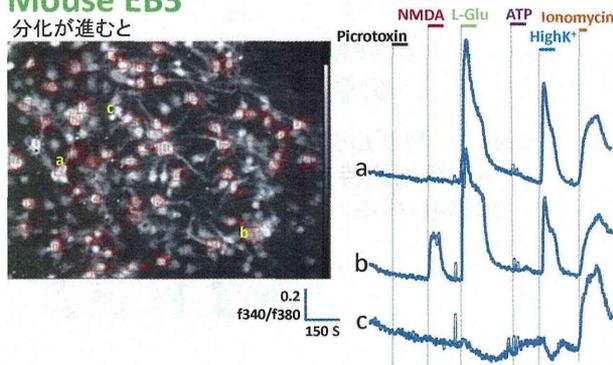
Mouse ES 細胞では

Mouse EB3  
分化が遅い場合



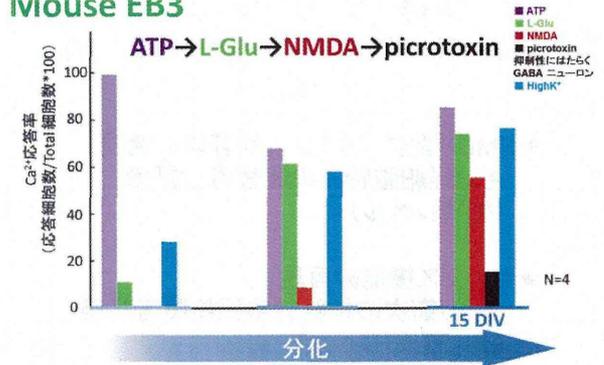
Mouse ES 細胞では

Mouse EB3  
分化が進むと



Mouse ES 細胞では

Mouse EB3

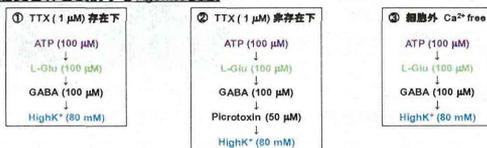


hiPSC ニューロンの神経細胞機能を判定する基本プロトコル  
Fura-2 Ca<sup>2+</sup> イメージング

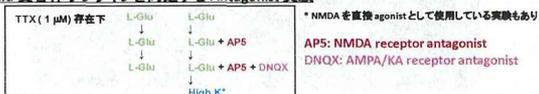
1. Spontaneous Activity



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

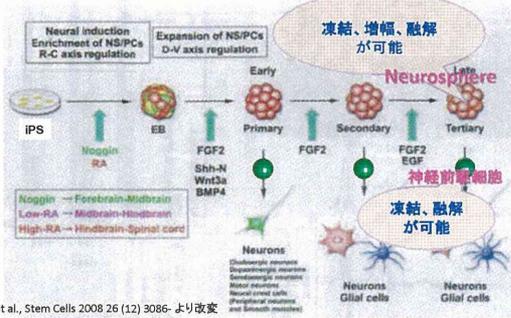


これまでに検討を行った hiPSC-ニューロン

クローン名	導入遺伝子	由来	神経系分化法	供与時の状態	供与元
Osaka-EB	Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc	ヒト成人 線維芽細胞	EB 法	neurosphere	大阪医療センター
201B7-EB	Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc	ヒト成人 線維芽細胞	EB 法	neurosphere	慶応大学
253G1-EB	Oct3/4, Klf4, Sox2	ヒト成人 線維芽細胞	EB 法	neurosphere	慶応大学
iNeuron		ヒト末梢血		Single cell ヒト iPS 細胞由来 神経前駆細胞	Cellular Dynamics Int.
Ripro DA		ヒト成人 線維芽細胞		Single cell ヒト iPS 細胞由来 神経前駆細胞	Ripro Cell
201B7-Dorso	Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc	ヒト成人 線維芽細胞	201B7 由来 Dorsomorphin 分化誘導法	neurosphere	大阪医療センター

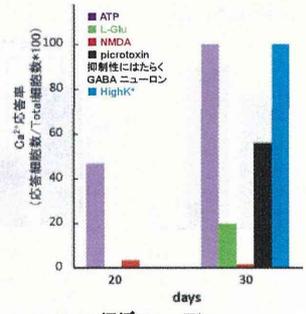
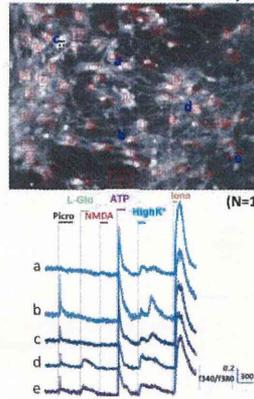
# 神経系の advantage

溶かして分化誘導をかけるだけ、の凍結ストックとして配布可能



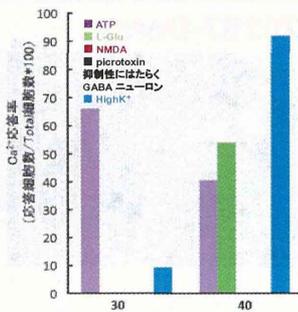
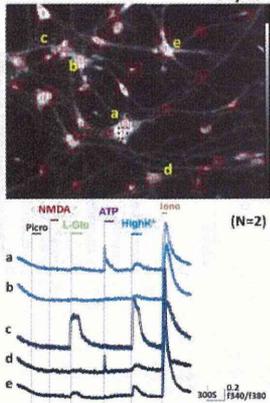
Okada et al., Stem Cells 2008 26 (12) 3086- より改変

## Osaka-EB



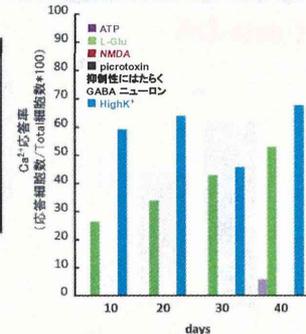
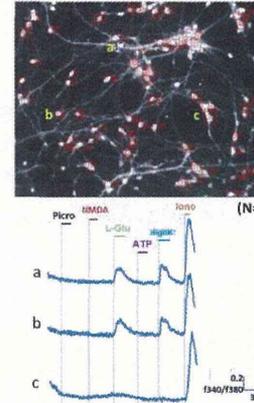
Pros: ほぼニューロン。  
ATP→L-Glu  
NMDA, GABA 受容体発現  
Cons: neurosphere の増幅できず  
→1代で失われた

## 201B7-EB



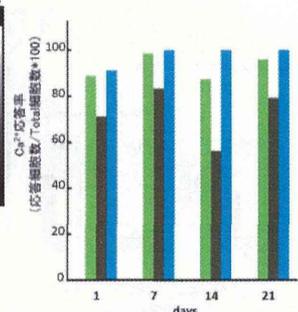
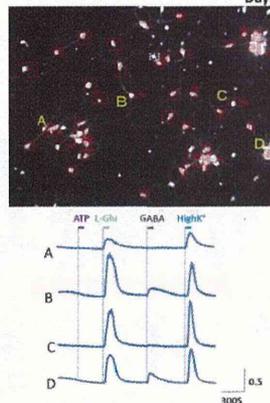
Pros: ほぼニューロンの。  
ATP→L-Glu  
Cons: NMDA には反応しない。  
neurosphere の増幅が困難。  
同じ chamber 内でばらつき。  
→再現性のあるデータは困難

## 253G1-EB

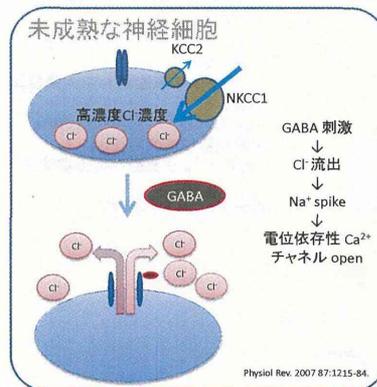


Pros: ほぼニューロン。  
neurosphere の増幅しやすい。  
10 日目で L-Glu に反応。  
Cons: mGluR を介した L-Glu への弱い  
反応のみ。

## iNeuron

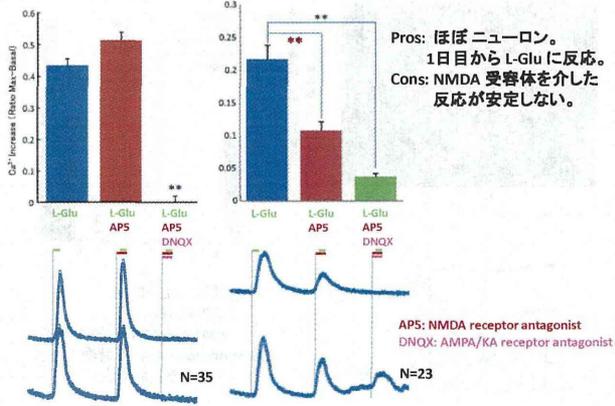


## 未熟な神経細胞における興奮性GABA応答

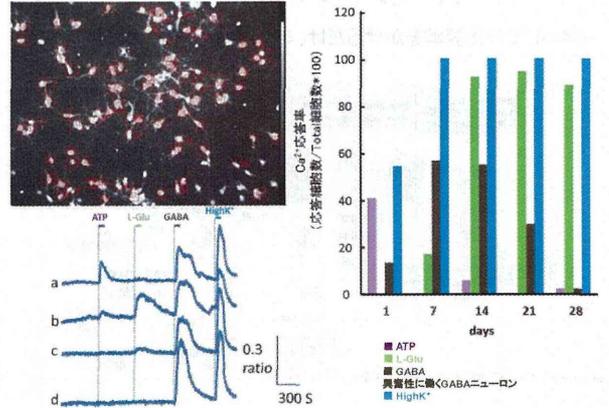


GABA による Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇が  
観察された。(day 1~21)  
↓  
未成熟な神経細胞である  
証拠の一つ

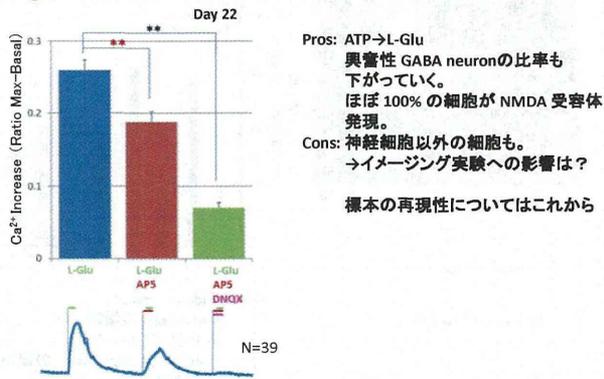
### iNeuron



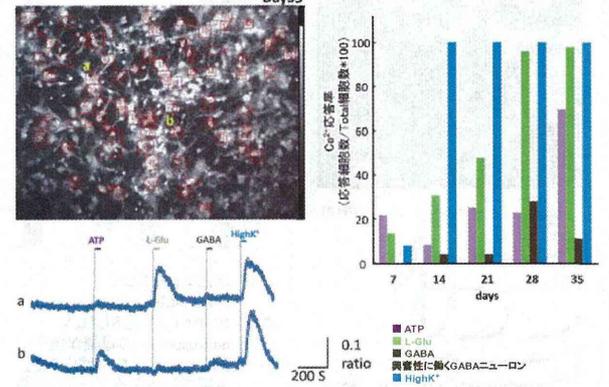
### Ripro-DA



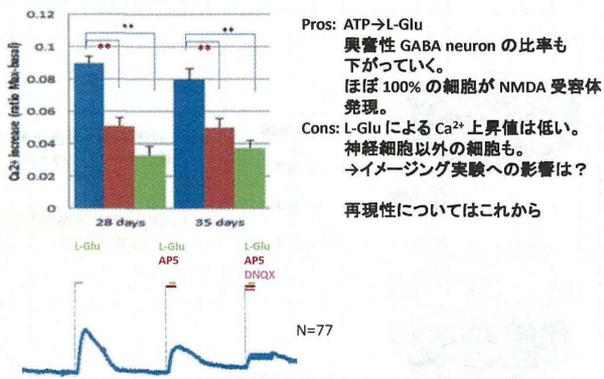
### Ripro-DA



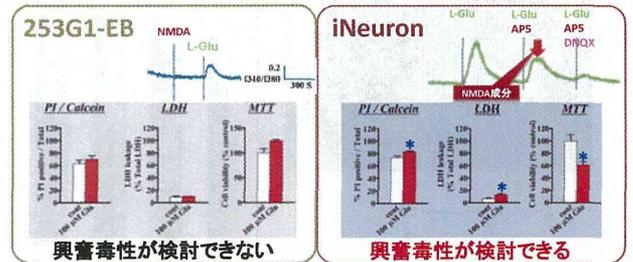
### 201B7-Dorso



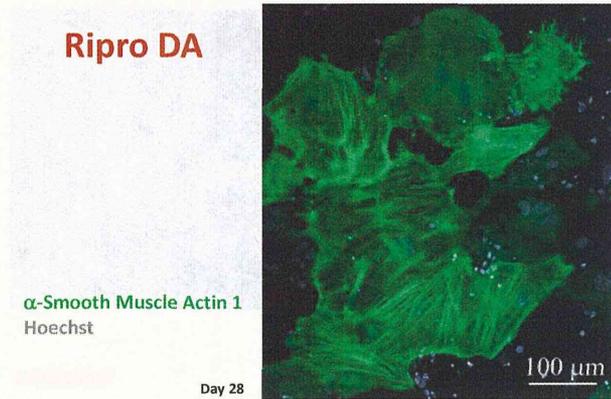
### 201B7-Dorso



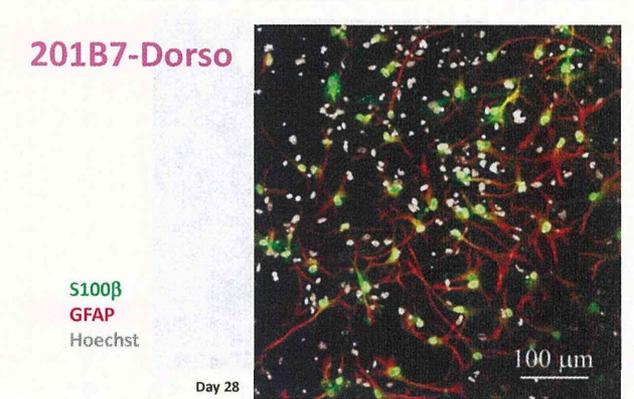
興奮毒性を検討するためには NMDA 受容体を発現している細胞が必要



ニューロン以外の細胞が受容体発現のバリエーションに影響する？

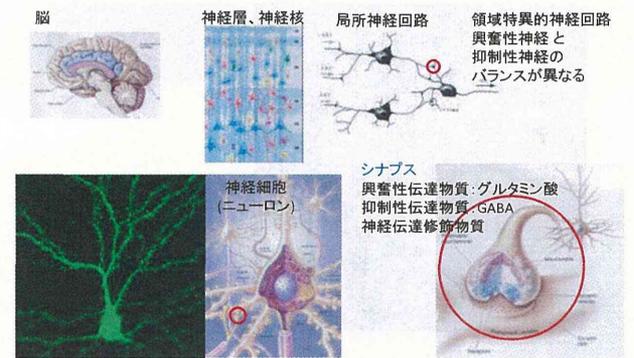


ニューロン以外の細胞が受容体発現のバリエーションに影響する？

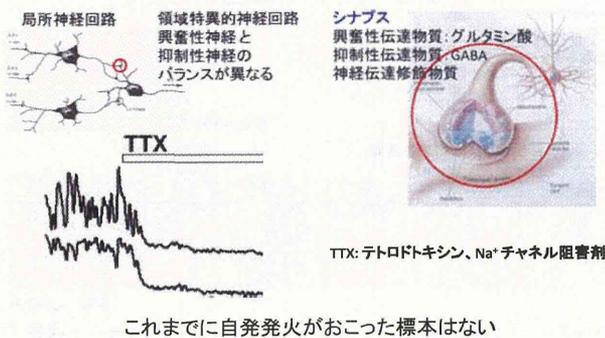


## さらなる課題

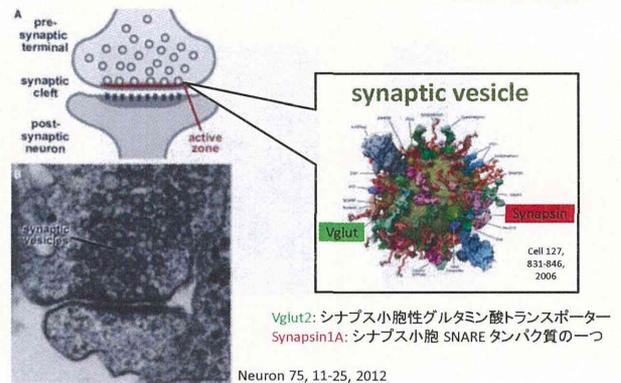
## 中枢神経系の階層構造



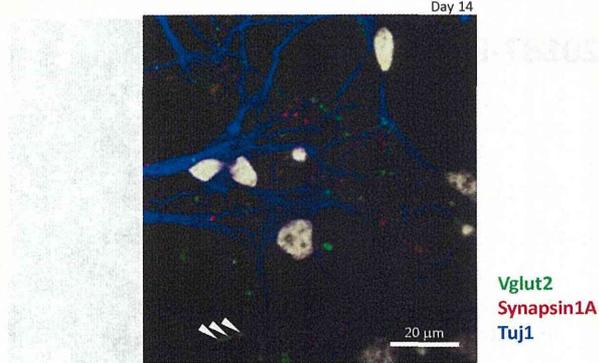
興奮性ニューロンと抑制性ニューロンからなる  
神経回路を実現できるか



## Presynaptic site の成熟

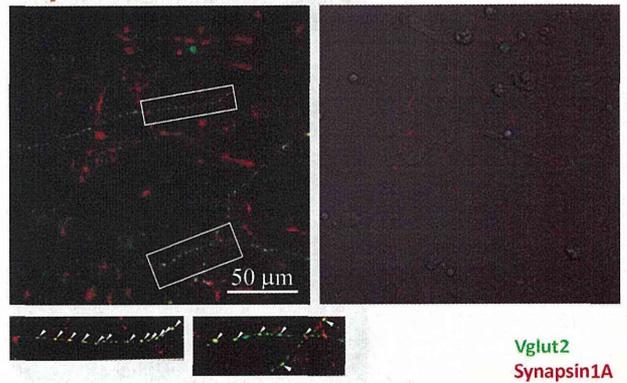


### iNeuron

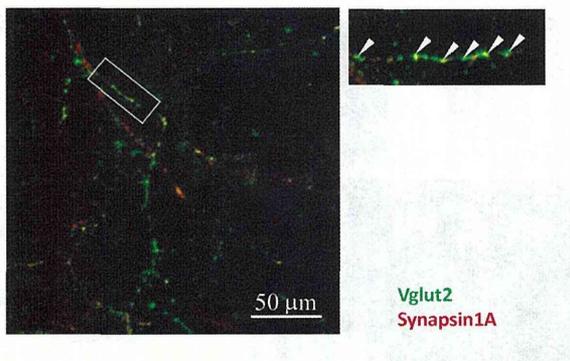


興奮性の presynapse 構造ができていない。ごくまれに共局在。

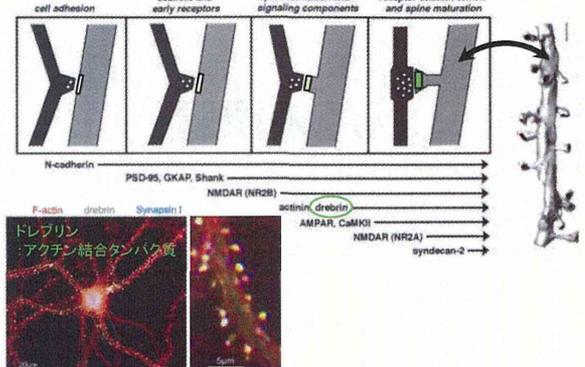
### Ripro-DA Day 14



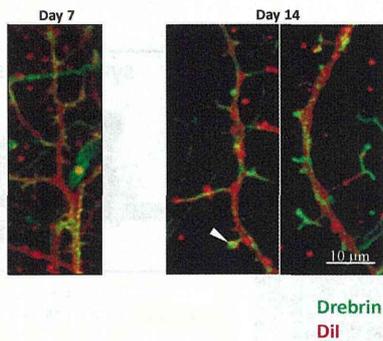
### 201B7-Dorso



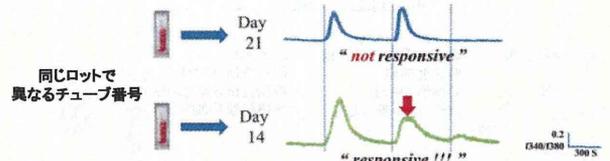
### Postsynaptic site の成熟



### Ripro-DA



### 品質をどう担保するか



スタウロsporinの毒性評価 (staurosporin 10 μM)

Tube No	1	2	3
DIV	9	8	15
PI	+	+	+
LDH	+	-	-
MTT	+	+	+

興奮毒性評価 (L-Glu 100 μM)

Tube No	1	2	3
DIV	9	8	15
PI	+	-	-
LDH	+	-	-
MTT	+	-	-

+: 有意な毒性あり

バリデーション研究の必要性。品質保証のための初期マーカー探索？

## まとめ

- ★神経特異的細胞死である興奮毒性を評価するためには NMDA 型グルタミン酸受容体を発現した hiPSC ニューロンが必要である。  
→分化誘導法改良による解決の可能性が示された。
- ★シナプス機能、神経回路機能の再現により、より高次の神経細胞機能障害を評価できる可能性が高い。しかし on dish でシナプス機能を再現性よく検討可能な標本はまだない。  
→基礎検討とさらなる標本の探索が必要。
- ★実用にたる品質＝標本としての取り扱いやすさ、再現性の確保。  
→求める機能・薬剤反応性に関してバリデーション研究が必要。  
品質項目＝分化後の神経機能、という難しさ。機能獲得を保証する初期マーカー探索が必要か。

## セッション 2. 創薬プロセスにおける分化細胞の応用可能性と課題

座長 諫田 泰成

### hiPSC-肝細胞とインシリコのデータ融合による安全性予測／ メカニズム解析に向けた考察

湯田 浩太郎 (株)インシリコデータ 石田 誠一 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部

化合物毒性が及ぼす重篤な影響は生体毒性のみならず環境毒性も含まれる。この結果、医農薬および機能性化合物等のヒトや生物が関与する殆ど総ての化合物が毒性スクリーニングの対象となる。さらに、動物愛護の観点による3Rsを目指す動物実験代替法においても化合物毒性スクリーニングの重要性は急速に増大している。

現在の毒性スクリーニングは適用分野の広がりのみならず、スクリーニングコストの高騰やスクリーニング対象化合物数の急激な増大という問題に直面している。また化粧品等の分野では、EU圏内では動物を用いた実験データが規制当局への申請には使えなくなっている。さらには、実験動物やin vitroの実験データを用いた解析結果の人への外挿という、人間への投与が最終目的である限り、避けて通れない極めて困難な問題も存在する。

本考察は、現在の毒性スクリーニングが抱える上記の二つの大きな問題を同時に解決し、さらにはインシリコによるメカニズム解析の実施を目指す。すなわち、毒性スクリーニングにインシリコ(コンピュータ)技術を適用することで、第一の問題である、コストや大量化合物処理問題を解決し、同時にインシリコによるバーチャル(仮想)実験により、動物実験における3Rsをより理想に近いものとする。また、第二の問題に関しては、hiPSC-肝細胞を用いた実験より得られるデータを用いた解析により、従来手法では解決が極めて困難と考えられてきた実験動物からヒトへの外挿性に関する問題の解決が可能となる。さらにインシリコによるデータ解析の適用により、種々の生体反応をメカニズムレベルで議論することが可能となる。

現在までに展開されてきた毒性スクリーニング技術としてインシリコ主体の技術(ドライ実験)と実験動物等を用いて毒性評価を行う技術(ウエット実験)の二つがある。これらドライとウエットの基礎研究内容が大きく異なることから、これらは互に独立して展開されてきた。しかしながら、現在の毒性スクリーニングに求められる要求内容は、従来と比較して極めて高度で様々な要因が深く関与し複雑になっている。このような問題解決のためにも、今後展開される毒性スクリーニング技術はドライ実験側とウエット実験側との高度な連携が必須である。本講演では、基礎研究分野の異なるドライおよびウエット研究者が分野の枠を超えて問題解決するための連携手法や項目／内容等についても考察する予定である。

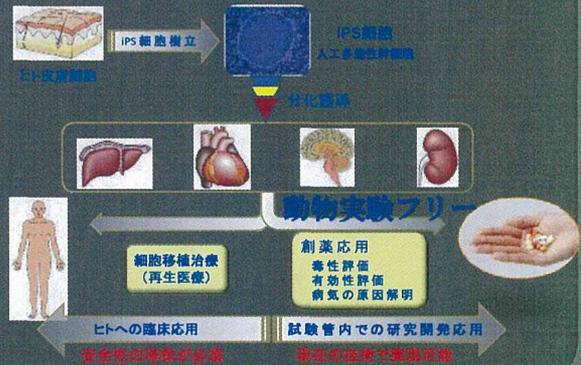
インシリコ毒性スクリーニングを取り巻く環境は大きく変化している。また、hiPSC-肝細胞の利用により、動物実験やin vitro実験結果のヒトへの外挿問題の解決への糸口が見えてきている。hiPSC-肝細胞データを用いたインシリコ毒性スクリーニングが創薬等の研究現場に及ぼす効果は極めて大と考え、我々が行っている市販hiPSC-肝細胞の評価結果の報告とも併せて考察を試みる。

「hiPSC-肝細胞とインシリコのデータ融合による  
安全性予測／メカニズム解析に向けた考察」

(株) インシリコデータ 湯田 浩太郎  
国立医薬品食品衛生研究所薬理部 石田 誠一

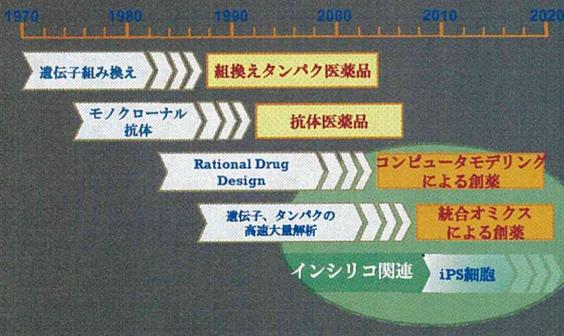
2014. 2. 13

iPSC細胞の医療応用への可能性



生命科学の医薬品開発への貢献

医薬品開発研究所「サイバーバーナー」シリーズ Vol.27 (2005)より改変



化合物スクリーニング上での大きな流れと変化

様々な分野で、安全性評価に対する要求が高まりつつある

- 薬／薬理分析：特性評価の種類や内容が高度なものとなっている
  - ・薬理活性のみならずADMEや安全性（毒性）の同時評価が必要
  - ・創薬過程において評価すべき項目が多種／多数の内容となっている（薬理活性、ADME、安全性（毒性））
- 代替法等の公算：動物実験代替法の必要性
  - ・EUでは実験動物を用いた試験データを用いての登録は出来ない
  - ・今後は動物を用いないin vitroでの実験のみが実施可能となる
- 毒性及び一酸化化合物分析：安全性や環境の観点での規制が強化
  - ・EUではREACH規則等が既に実施されており、安全性（毒性）の登録が義務付けられている

WET実験での安全性（毒性）スクリーニングの現状

- 多種多様な評価法が開発されている
  - ・それぞれの手法には長所／短所がある
  - ・予測精度等の向上には、予測特性の異なる実験法を複数組み合わせる
  - ・実験手法が増えると組み合わせる手法の数が増え、費用や時間がかかる
- In vitro 実験例：複数の実験を実施して、予測精度の向上と総合評価を下す種々遺伝毒性、HERGバッチクラッシュ、BSEP/MRP2阻害、HCA、その他
- WETでの試験法では仮想（バーチャル）化合物等が扱えない
  - ・WETでは実験を伴うので、存在しない化合物は実験できない
  - ・WETは実験が必要なので、スループットが低く、コストも高い
  - ・実験しないと評価出来ないため、化合物合成順の決定が困難
  - ・合成が困難であっても、優先合成するべきか否かという判断が出来ない
- WETでの試験法では評価のみで、要因解析やデザイン等ができない
  - ・WETの実験はスクリーニング目的であり、メカニズム等の要因解析や新たな化合物デザインのための指針等を生み出すことは出来ない。

インシリコ技術（DRY実験）導入により  
可能となる機能や付加価値

- 高濃度群の実現：
  - ・極めて多数の化合物群のスクリーニング実施
  - ・複数項目（薬理活性／ADME／安全性（毒性）／物性）の同時評価
  - ・これにより化合物特性の総合評価が可能となる
  - ・スクリーニング等の低コスト化実現
- 化合物デザインが可能となる
  - ・目的特性を実現するための方向性や修正方法等が見えてくる
  - ・実在しない仮想（バーチャル）化合物も扱える
  - ・合成する前に総ての特性を評価出来、成功確率の高い化合物に絞れる
- 要因解析等が可能となる
  - ・薬理活性／ADME／安全性（毒性）／物性をコントロールするための情報を取り出すことが可能となる
  - ・インシリコによるメカニズム解明等により、更なる次元の異なるレベルの化合物に導ける可能性が出る
- 情報の共有が可能となる
  - ・地域や国境、研究機関のレベルを超えての情報共有が可能となる

## WETとDRY研究融合の重要性

WET研究の多くの限界をDRY研究で補うことが可能である。

DRY研究の基本は、WET研究から導き出される多くのデータである  
特性の異なる二つのアプローチの高度な融合が更なる効果を引き出す



## hiPSCへのインシリコ技術導入による期待効果

### hiPSCデータとインシリコへの融合に関する期待

- hiPSC技術とインシリコ技術の融合により、hiPSCの更なる展開が可能
- インシリコによる高速スクリーニング、要因解析、ドラッグデザイン等により、創薬全体のレベルアップが期待できる

### hiPSCに関連するメカニズム解析等の発展が可能となる

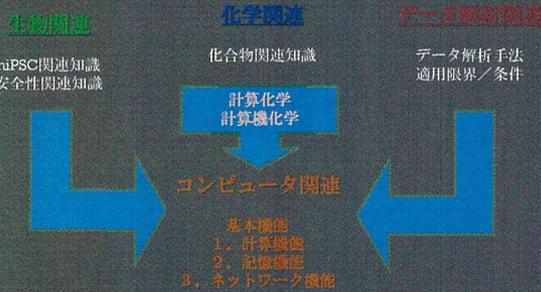
- hiPSCは始まったばかりの技術で、多くのメカニズム的な解明が必要となる
- インシリコ技術によるメカニズム解析は、WET実験によるメカニズム解析と相補関係にあり、相互に協調することで効果的なメカニズム解明が可能となる
- hiPSCデータに基づくインシリコによるドラッグデザイン等の機能は、従来の動物等を用いた間接的なドラッグデザインよりも効率が高いと期待できる

### hiPSCを用いた創薬は完全な動物実験フリーのアプローチとなる

- 創薬において、動物実験は必須であった。このために、動物実験結果の人への外挿問題が常に発生し、この問題は解決困難な創薬上での大きなネックであった
- 動物愛護の問題から、E.U.では既に化粧品分野では動物実験が禁止されている
- 創薬分野では動物実験が禁止されていないが、動物実験を減らすことは時代の要求である。この要求に答えられるのがhiPSCの更なる展開である

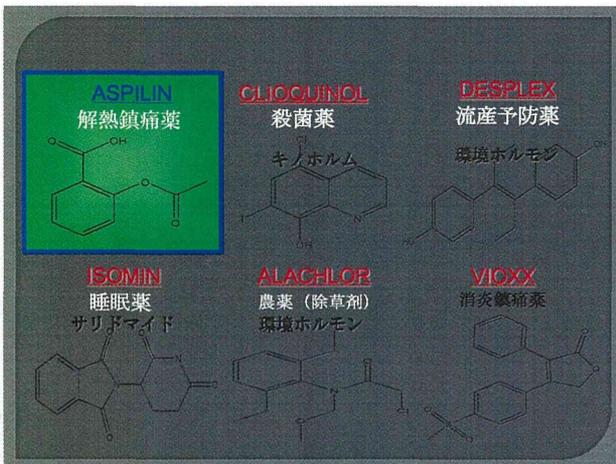
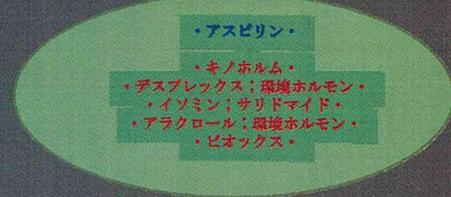
## hiPSCを用いたインシリコによる薬物スクリーニングおよびメカニズム解析実施関連研究

現在・今後の研究における基礎研究/技術分野の広がり



## 化合物の種々特性のインシリコによる特性比較

### 優良医薬品と問題のある医薬品



ADMEWORKS Predictor Worksheet - Microsoft Internet Explorer

副作用性化合物はCYP3A4特性が良くない

Worksheet: monk

Selected n: 6

Page: 2/3

View:  Ames TEST (TA98 & TA100)

ID	Name	3A4 Inhibitor	Carcinogenicity FN	Carcinogenicity FP	AMES TA98	AMES TA100
<input checked="" type="checkbox"/>	28 ASPILIN	-	-	-	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	29 CLOQUINOL	++	-	-	++	++
<input checked="" type="checkbox"/>	30 DESPLEX	-	-	-	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	31 ISOMIN	++	-	-	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	32 ALACHLOR	++	-	-	-	-
<input checked="" type="checkbox"/>	33 VIOXX	++	-	-	-	-