

研究要旨

現在、試験データのない膨大な数の化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。特に神経毒性に関してはメカニズムが不明で適切な評価方法が活用されていないため、新たな神経毒性評価法が喫緊の課題であり、OECDなどで国際的な議論が進行中である。

本研究では、OECDと共有している化学物質リストをもとに、インビトロで構造と機能の両側面から神経毒性を検討した。神経系の構造に対する毒性に関しては、ロテノンによりヒトiPS細胞の分化能が抑制されることから、ミトコンドリア毒性を有する化合物を評価した。その結果、多くのDNT化合物は分化を抑制することを明らかにした。次に、機能面として、iPS由来神経細胞のネットワーク評価を行ったところ、ピレスロイド系農薬などの毒性を検出可能であることを明らかにした。

得られた細胞毒性データはOECDで進行中のバリデーションのデータと比較するとともに、動物実験によるin vivoデータと検証する。特に、インシリコにおいて定量的構造活性相関(QSAR)やカテゴリーアプローチ等の手法を用いて、統合な神経毒性評価法の構築を目指す。

最終的に、OECDや米国EPAを中心とする国際グループとの協調のもと、従来の神経毒性試験(TG424)や発達神経毒性試験(TG426)を代替して国際的な化学物質管理の取組みに貢献できる試験法として確立する。

A. 研究目的

神経毒性評価は、新規化合物の安全性評価において必要不可欠である。神経毒性試験において、子供の薬剤応答は大人とは大きく異なるというのが基本的な考え方である。現行の神経毒性ガイドライン(OECD TG424及びTG426)は多くの動物と費用を必要とするため、より正確で予測可能な評価法を確立する必要がある。ヒト脳の発達や成熟は複雑なプロセスを経ることから、我々は、ヒトiPS細胞を用いた化合物評価を構造と機能に分けてエンドポイントの探索を試みた。本研究では、OECDと共有している化学物質のリストをもとに、インビトロと動物実験による神経毒性評価を行う。特に、ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の活用、iPSニューロンの評価を行い、ヒトにおける予測性等を検証することにより新たな神経毒性評価法を開発する。

B. 研究方法

1. ヒトiPS細胞株の培養

ヒトiPS細胞株201B7は、TeSR-E8培地(Stem Cell Technologies)にてフィーダーフリー条件で培養した。コーティング剤にはES細胞用のマトリゲル(BD Biosciences)を用いた。

2. ヒトiPS細胞から神経細胞への分化

神経分化法には、文献(Chambers et al., Nat Biotechnol 2009)に基づいてDual smad阻害法を用

いた。BMPシグナル阻害剤LDN193189(Wako)及びActivinシグナル阻害剤SB431542(Wako)によりiPS細胞を神経外胚葉から神経前駆細胞、さらに神経細胞へと分化させた。

3. 分化細胞における遺伝子発現の評価

TRIzol試薬(Thermo Fisher)を用いて分化細胞よりRNAを抽出した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit(Qiagen)を用いて反応液を調製し、ABI PRISM 7900HTを用いてqPCRを行った。神経分化マーカーPax6などの発現量により評価を行った。

4. MEAシステムによる神経活動の評価

ヒトiPS細胞由来神経細胞は市販のX Cell Science社の細胞を、多点電極アレイ(MEA)システムとしてMED64-PRESTO(アルファメッドサイエンティフィック社)を用いて、神経ネットワーク機能を評価した。計測までの細胞播種・細胞培養は会社から提供されたプロトコールに従った。

初めに、細胞播種前日にMED64-PRESTO用24ウェルプレートを0.005%ポリエチレンイミン(PEI)/ホウ酸緩衝液(0.005% PEI / 0.1M Boric acid buffer solution (pH 8.5))で1時間コーティングし、滅菌蒸留水で4回洗浄後、15時間クリーンベンチ内で無菌的に乾燥させた。播種2.5時間前に、成熟培地(Neuronal medium)(Xcell science社)に

iMatrix-511(ニッピ社)を 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加え、各ウェルに 200 μL 添加後、室温で 2.5 時間、クリーンベンチ内でインキュベートした。細胞を解凍する直前に iMatrix-511 でコーティングした 24 ウェルプレートを CO_2 インキュベーター内に 30 分間静置した。その後直ちに CellSpotter (アルファメッドサイエンティフィック社)およびクローニングリング RING-5 ($\phi 5\text{mm}$)(AGC)をセットした。細胞を解凍後、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ラミニンを含む播種培地 (30 μL) にて 30,000 細胞/ウェルでクローニングリング内の電極上に播種、 CO_2 インキュベーター内に静置した。播種 1 時間後に、クローニングリングおよび CellSpotter をゆっくり取り除いた。播種 2 時間後に 600 μL の成熟培地をゆっくり添加した。培養 2, 4, 6 日目は成熟培地で半量交換した。培養 8 日目に成熟培地を完全に取り除き、神経生理学用無血清維持培地 (BrainPhys + SM1 Supplement)(STEMCELL Technologies 社)に交換した。培養は 60 あるいは 61 日目まで行い、定期的 (3~4 日おき)に維持培地の半量交換および多点電極システムによる測定を行った。化学物質暴露は神経ネットワークが成熟した播種 60 日以降に実施した。培養 60 日以降に、化合物を各 5 濃度ずつ累積添加し、その投与前後での神経活動データを取得した。投与前後の記録時間は 10 分間、化合物曝露時間は 10 分間とした。なお、活性化電極 (1 分間に 5 スパイク以上観察された電極) が半数の 8 個以上存在するウェルに化合物を累積添加した。計測データは Spike Extract for PRESTO, Burst Analysis for Advanced (いずれもアルファメッドサイエンティフィック社)を用いて解析した。

初年度は OECD と共有している化学物質のうちピレスロイド系農薬 5 種類(シフルトリン, シペルメトリン, デルタメトリン, λ -シハロトリン, τ -フルバリネート)に着目し検討を行った。暴露濃度は 1~100 μM とした。なお、MEA 陽性対照化合物としてピクロトキシン (0.1~10 μM) を、毒性陽性対照化合物として iPS 細胞の分化能抑制の検討に使用したロテノン (1~100 μM) を用いた。

C . 研究結果

1. ヒト iPS 細胞および iPS 前駆細胞の分化能への影響の評価

OECD で議論されているリストから化学物質を選定し、京大 CiRA で樹立されたヒト iPS 細胞株 201B7 を用いて化学物質の神経毒性評価を行った。ミトコンドリアの電子伝達系を阻害するロテノンによりヒト iPS 細胞の分化能が抑制された。これをもとに、OECD で追加されたミトコンドリア毒性を有する農薬などの評価を行ったところ、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞よりもヒト iPS 細胞の方が高感度で、多くの農薬の毒性を検出できる可能性が示唆さ

れた(図 1)。

2. MEA システムによるヒト iPS 細胞由来神経細胞の神経活動の評価

ヒト iPS 細胞由来神経細胞に関しても、神経活動を MEA システムで記録して機能面での神経毒性の評価を行った。特に、OECD のグループは農薬を用いて慢性毒性評価を行なっているため、我々は急性毒性の発火データを取得した (図 2)。

次に、得られた発火データより、MEA 陽性対照化合物であるピクロトキシンを用いて、文献(Odawara et al., J Pharmacol Toxicol Methods 2019)を参考に神経ネットワーク機能の評価に必要なエンドポイントを検討した結果、以下に示す 9 つのエンドポイントを決定した(図 3)。

1. 総発火数
2. ネットワークバースト発火数
3. ネットワークバースト発火間隔
4. ネットワークバースト発火の持続時間
5. ネットワークバースト発火中の発火数
6. ネットワークバースト発火のピーク
7. 6 のばらつき
8. ネットワークバースト発火のピーク間隔
9. 8 のばらつき

次に毒性陽性対照化合物のロテノンでエンドポイントを検討した。その結果、暴露前と比較して暴露最小濃度 (1 μM)より自発発火が急激に減少することに伴い、ネットワークバースト発火などのパラメータは検出されなかった (図 4)。このことからロテノンは低用量でも神経ネットワークを阻害することで神経毒性を有することが認められた。以上のことから、機能面では 9 種類のエンドポイントが化合物を評価するのに有効性であることを確認した。

上記結果を踏まえ、5 種類のピレスロイド系農薬(シフルトリン, シペルメトリン, デルタメトリン, λ -シハロトリン, τ -フルバリネート)で MEA データを取得し検討した。その結果、5 種類のピレスロイド系農薬はすべて容量依存的に総発火数 (図 5)、ネットワークバースト発火数 (図 6)などが減少することが確認された。次いで急性神経毒性のフェノタイプを調べるため、9 種の MEA エンドポイントからヒートマップを作製した (図 7)。その結果、ロテノンに類似したフェノタイプが確認され、in vitro 試験結果ではあるがピレスロイド系農薬も急性神経毒性を示すことが明らかになった。また急性神経毒性はデルタメトリン > シフルトリン, λ -シハロトリン >

τ-フルバリネート > シペルメトリンの順に急性神経毒性が強いことが示唆された。

以上の結果よりピレスロイド系農薬は、iPS 細胞由来神経細胞を用いた MEA システムにより、急性神経毒性を検出可能であることを明らかにした。

D . 考察

本研究では、OECD と共有している化学物質のリストから、特に農薬を中心に評価した。単独の手法では毒性予測に限界があることから、いくつかの手法を組み合わせる必要があると考えられる。ヒト脳の発達や成熟は複雑なプロセスを経ることから、我々は化学物質の毒性をインピトロで構造と機能に分けて検証した。

神経系の構造に対する毒性に関しては、化学物質を暴露したヒト iPS 細胞を用い、分化誘導した神経前駆細胞の分化能を検証することで神経毒性評価の可能性を示唆した。また用いた化合物はミトコンドリア毒性も有しており、ミトコンドリアが神経毒性評価において有効な指標になる可能性が考えられる。さらにヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞よりもヒト iPS 細胞の方が高感度であったことから、未成熟な細胞ほど化学物質に対する感度が高いと考えられる。この観点から鑑みて、胎生期モデルであり、未分化能状態にあるヒト iPS 細胞は神経毒性評価において最も有効な細胞である。ヒト iPS 細胞は初期化される細胞由来や方法に応じてさまざまな株が存在する。今後は化学物質の神経毒性における株間差の検討を行い、iPS 細胞の有効性を検証する必要がある。

神経系の機能面としては、ヒト iPS 由来神経細胞の神経ネットワーク機能を電気生理学的に検出可能な MEA システムを用いることにより評価した。初年度検証したピレスロイド系農薬は、MEA システムで急性神経毒性を検出可能であったことから、OECD と共有しているその他の DNT 化合物も、それぞれの薬理作用などに応じたフェノタイプを明らかにすることにより、毒性評価が可能になると考えられた。また、OECD と共有している化学物質で神経細胞内での作用機序が不明な化合物に関しても、フェノタイプを比較することにより神経毒性の予測が可能であることが示唆された。

今後、カテゴリーアプローチなどの手法を基にしてインシリコとインピトロデータの統合化を図ることにより新たな神経毒性評価法を開発できることが期待される。

これらのデータは、2020 年 4 月の DNT ワークショップや OECD DNT 対面会議にて共有することにより、新たな神経毒性のガイダンスに貢献したい。

E . 結論

iPS 細胞の分化能および MEA システムによる iPS 細胞由来神経細胞の神経ネットワークにより、

OECD 化合物の評価を行い、一定の予測性が得られることが示唆された。

F . 研究発表

1 . 論文発表

なし

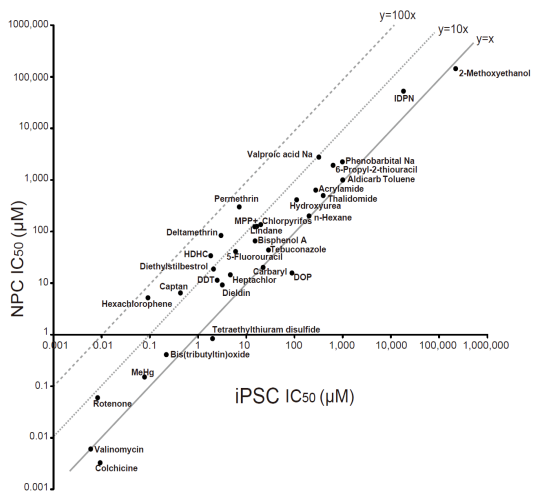
2 . 学会発表

1. 山田茂、常本和伸、諫田泰成：ヒト iPS 細胞技術を用いた統合的な発達神経毒性評価法の開発、第 5 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、北里大学、東京、2019 年 9 月 14 日、口頭、国内。
2. 諫田泰成：ヒト幹細胞を用いた新たな安全性評価法の開発と国際標準化、幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム第 2 回研究会、横浜薬科大学、神奈川、2019 年 10 月 1 日、口頭、国内。
3. 諫田泰成、常本和伸、山田茂：ヒト iPS 細胞を用いた新たな神経毒性評価法の開発、第 249 回生理学東京談話会、千葉大学、千葉、2019 年 11 月 30 日、口頭、国内。
4. 諫田泰成：ヒト iPS 細胞技術を用いた心血管系・中枢神経系の安全性評価に関する現状と今後の展望、第 93 回日本薬理学会、横浜、2020 年 3 月（誌上開催）、口頭、国内。
5. 常本和伸、山田茂、諫田泰成：ヒト iPS 細胞を用いた発達神経毒性評価、第 93 回日本薬理学会、横浜、2020 年 3 月（誌上開催）、口頭、国内。など。

G. 知的所有権の取得状況

なし

A)



B)

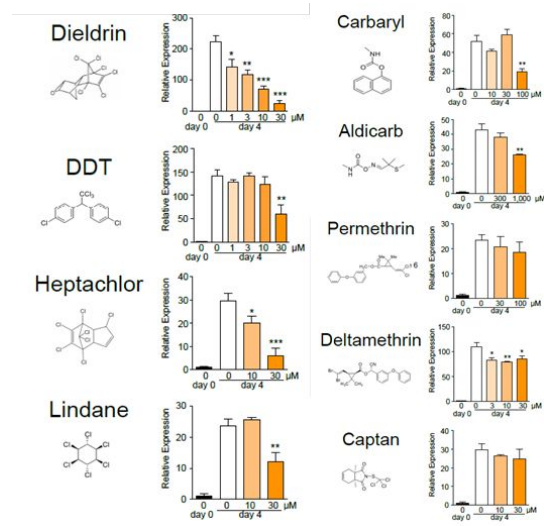
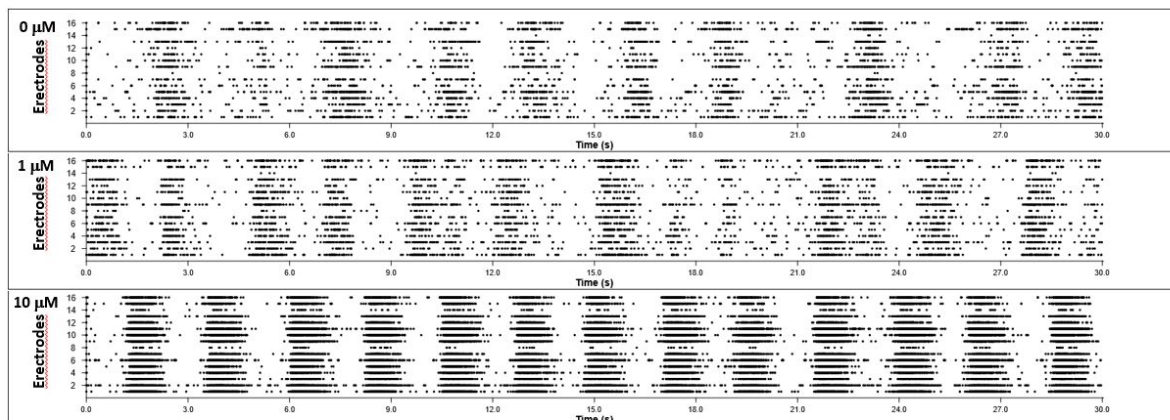


図1. ヒトiPS細胞の分化能による化学物質の評価

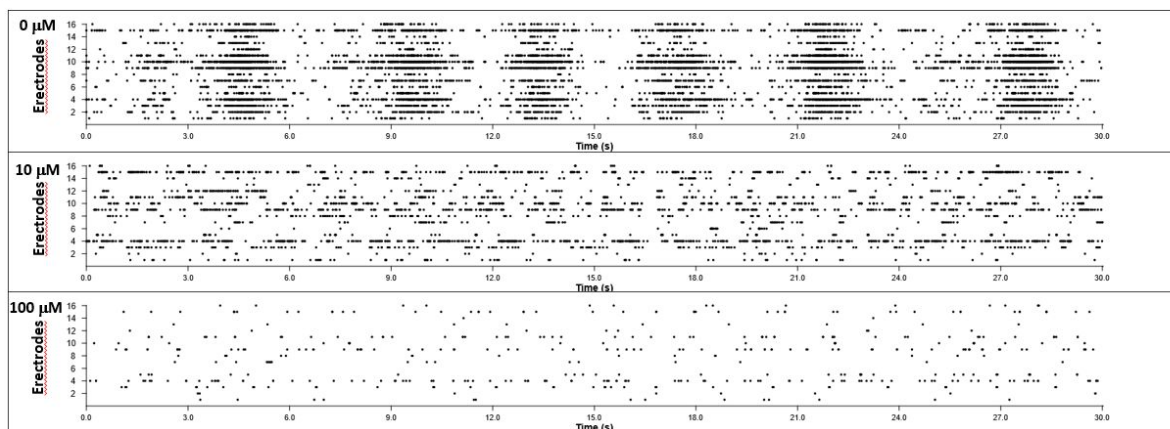
A) iPS細胞とiPS神経前駆細胞を用いて検出力の比較を行い、iPS細胞はiPS神経前駆より検出力が高いことを示した

B) DNTで検討されている農薬に関して、分化能に関するデータを取得した。

(A) ピクロトキシン



(B) ロテノン



(C) シハロトリン

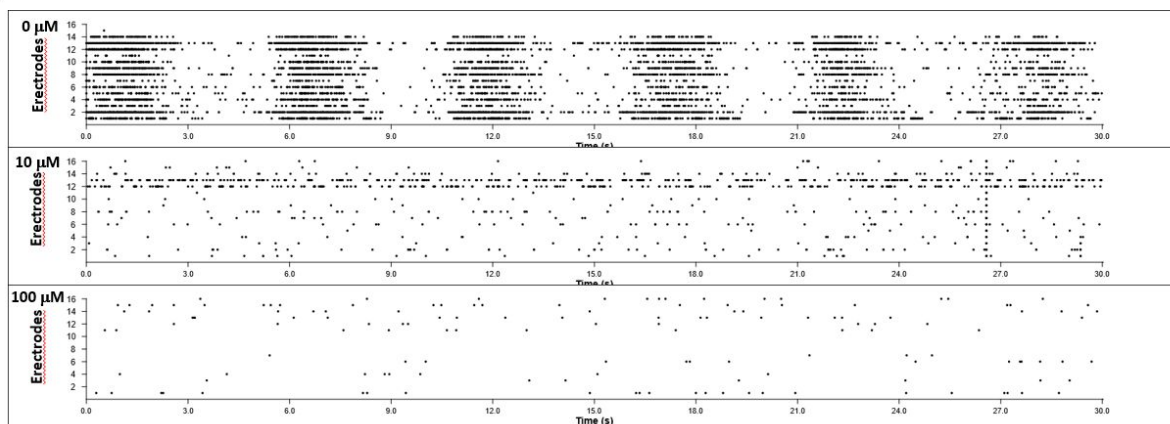
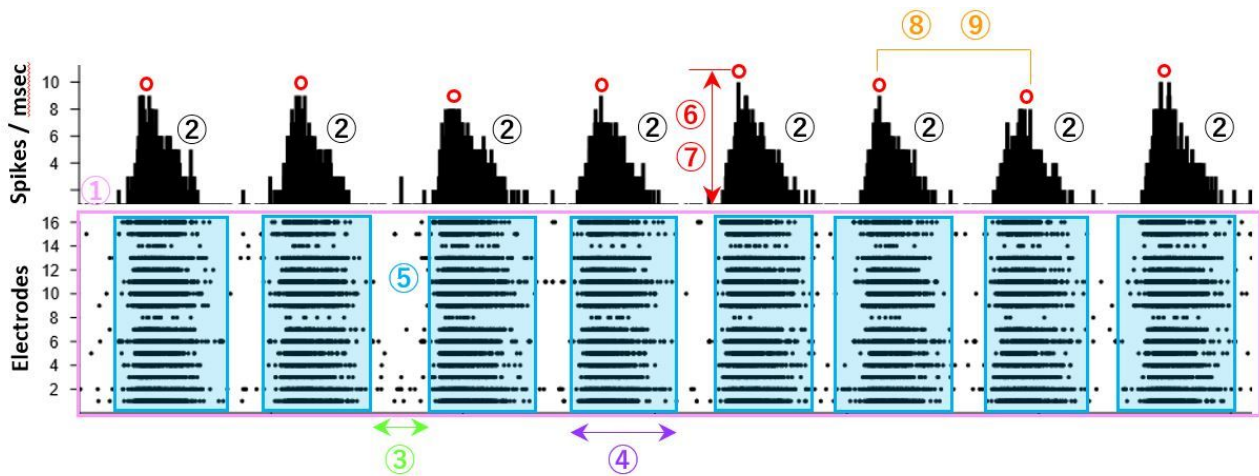


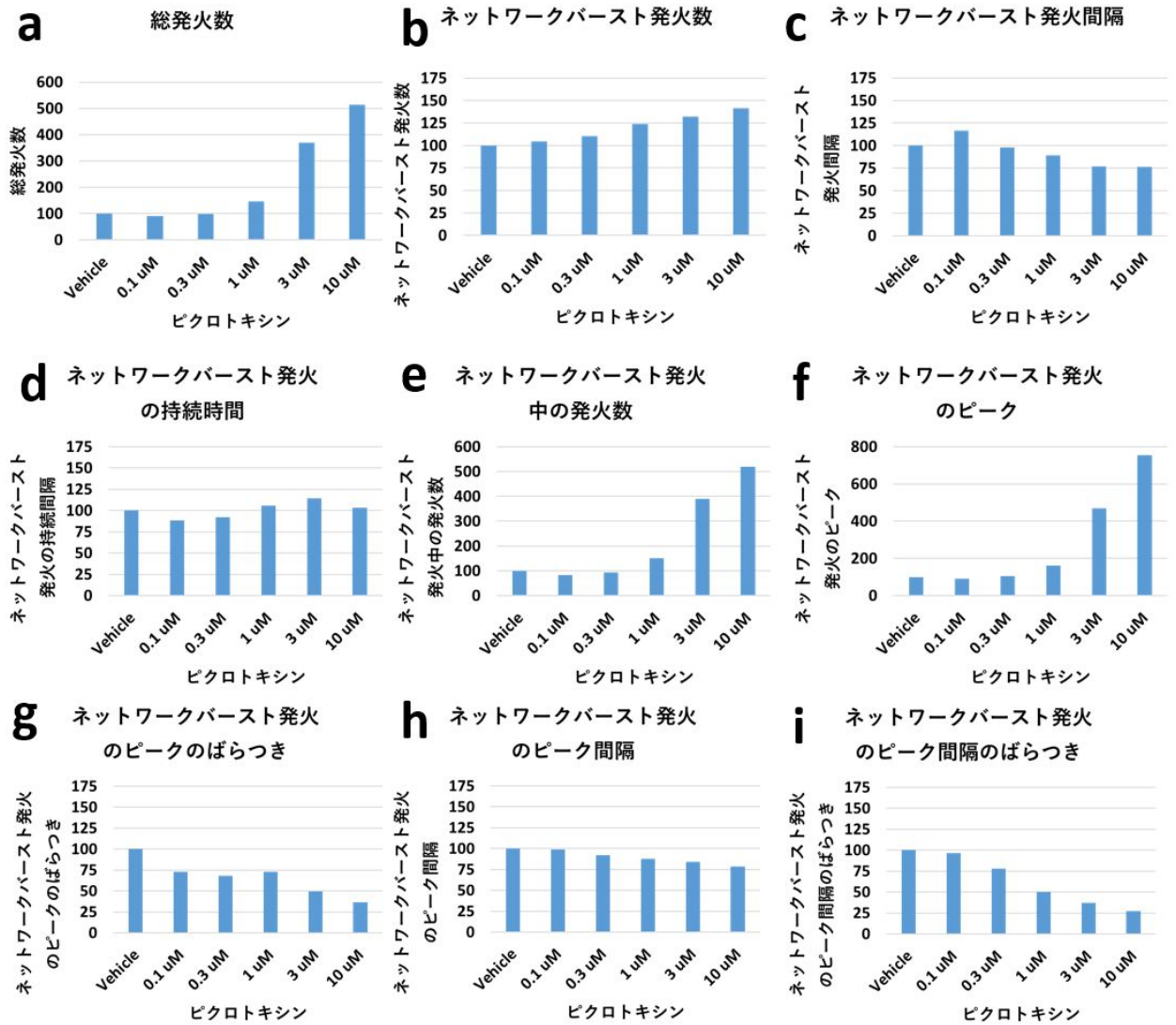
図2. MEAシステムから得られた発火のラスタブロット
(A) ピクロトキシン, (B) ロテノン, (C) シハロトリン。



- ① Total number of Spikes (総発火数)
- ② Number of Network Burst (ネットワークバースト発火数)
- ③ Network Inter Burst Interval (ネットワークバースト発火間隔)
- ④ Network Burst Duration (ネットワークバースト発火の持続時間)
- ⑤ Number of Spikes / Network Burst (ネットワークバースト発火中の発火数)
- ⑥ Peak Spikes (PS) in a Network Burst (ネットワークバースト発火のピーク)
- ⑦ Coefficient of Variation of PS in a Network Burst (⑥のばらつき)
- ⑧ Network Inter Peak Interval (IPI) (ネットワークバースト発火のピーク間隔)
- ⑨ CV of Network IPI (⑧のばらつき)

図3. MEAシステムから得られる発火のヒストグラム, ラスタプロット (10 μ Mピクロトキシン)および決定した解析エンドポイント
ヒトiPS由来神経細胞に化合物を10分間暴露して得られたスパイクデータをもとに解析した。

(A) ピクロトキシン



(B) ロテノン

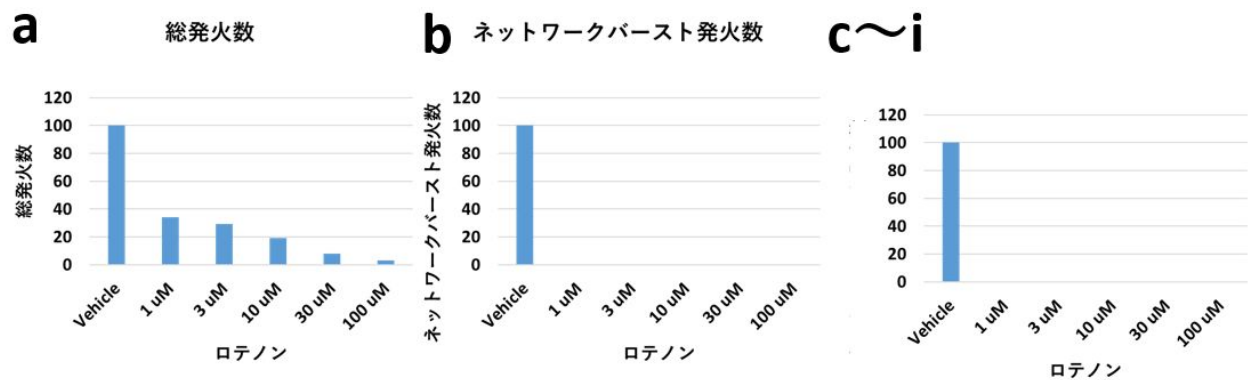


図4. 陽性対照化合物のMEAエンドポイント

(A) ピクロトキシン、(B) ロテノン、a 総発火数、b ネットワークバースト発火数、c ネットワークバースト発火間隔、d ネットワークバースト発火の持続時間、e ネットワークバースト発火中の発火数、f ネットワークバースト発火のピーク、g ネットワークバースト発火のピークのばらつき、h ネットワークバースト発火のピーク間隔、i ネットワークバースト発火のピーク間隔のばらつき

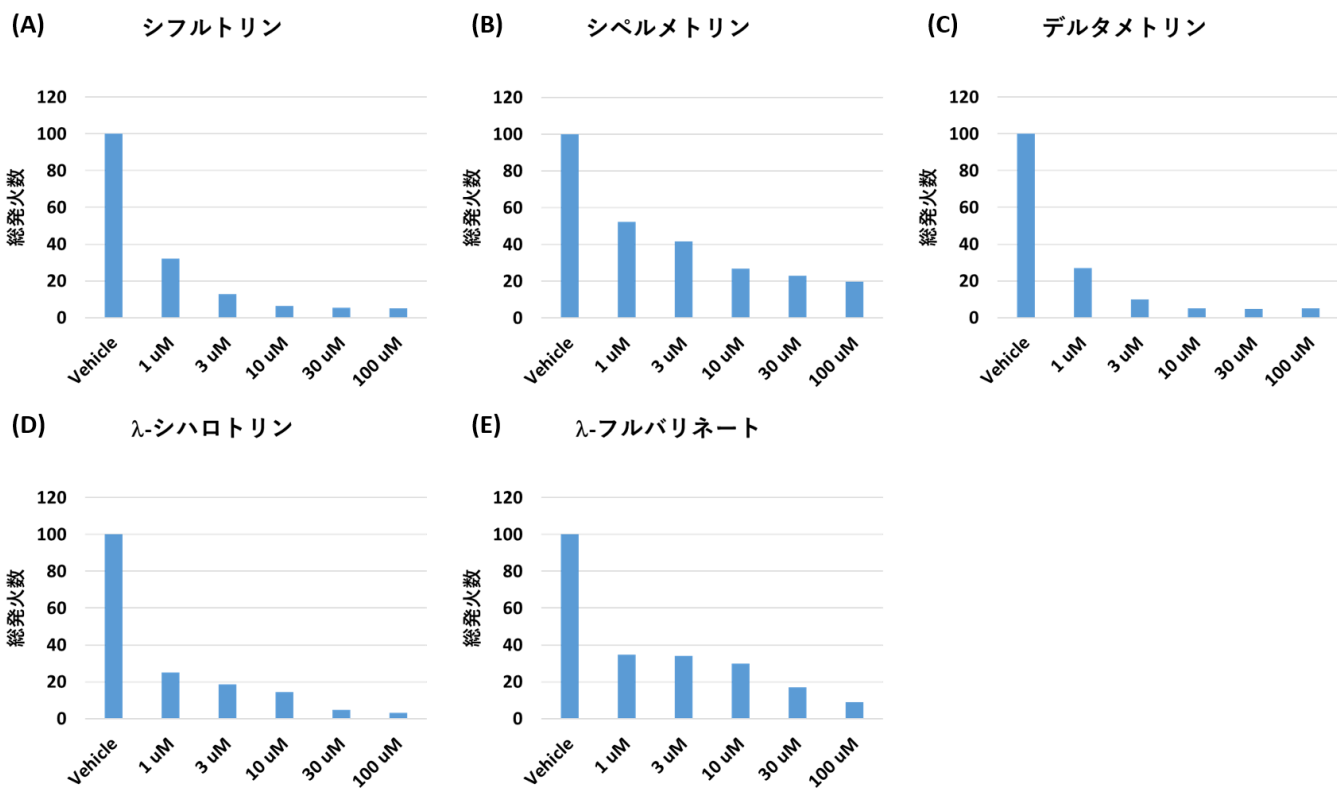


図5. ピレスロイド系農薬の総発火数

(A) シフルトリン、(B) シペルメトリン、(C) デルタメトリン、(D) λ-シハロトリン、(E) τ-フルバリネート

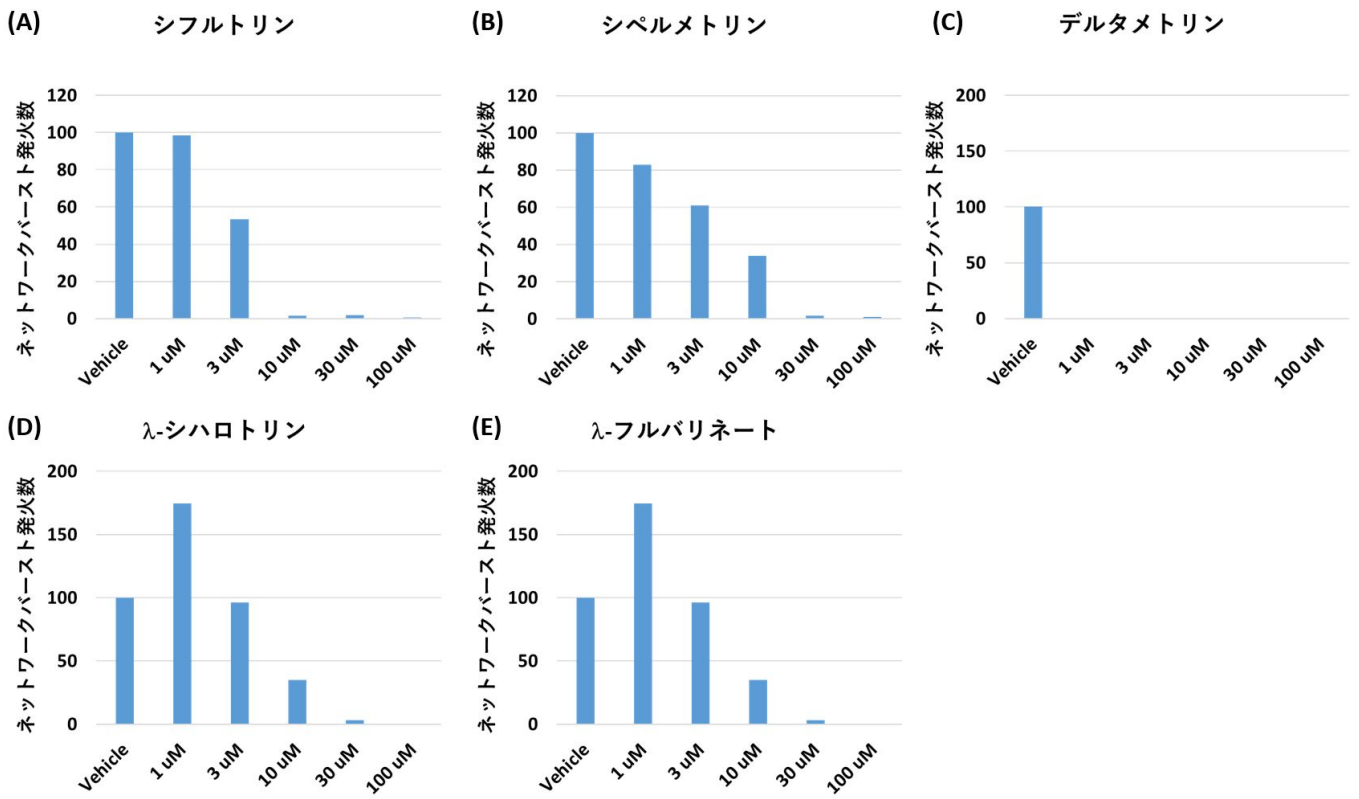
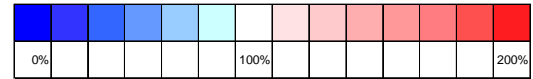


図6. プレスロイド系農薬のネットワークバースト発火数
 (A) シフルトリン、(B) シペルメトリン、(C) デルタメトリン、(D) λ -シハロトリン、(E) τ -フルバリネート

(A) 陽性対照化合物 (MEAおよび毒性)

化合物名		ピクロトキシン					ロテノン				
濃度 (μM)		0	0.3	1	3	10	1	3	10	30	##
MEAデータ	総発火数										
	ネットワークバースト発火数										
	ネットワークバースト発火間隔										
	ネットワークバースト発火の持続時間										
	ネットワークバースト発火中の発火数										
	ネットワークバースト発火のピーク										
	のばらつき										
	ネットワークバースト発火のピーク間隔										
	のばらつき										



(B) ピレスロイド系農薬 (OECD)

化合物名		シフルトリン					シベルメトリン					デルタメトリン					λ-シハロトリン					ε-フルバリネート					
濃度 (μM)		1	3	10	30	100	1	3	10	30	100	1	3	10	30	100	1	3	10	30	100	1	3	10	30	100	
MEAデータ	総発火数																										
	ネットワークバースト発火数																										
	ネットワークバースト発火間隔																										
	ネットワークバースト発火の持続時間																										
	ネットワークバースト発火中の発火数																										
	ネットワークバースト発火のピーク																										
	のばらつき																										
	ネットワークバースト発火のピーク間隔																										
	のばらつき																										

図7. MEAシステムから得られるスパイクの解析ヒートマップ

(A)ピクロトキシンおよびロテノン

(B) OECDリストに含まれるピレスロイド系農薬