

ヒト iPS 細胞を用いた中枢神経系の安全性評価

常本 和伸, 山田 茂, 諫田 泰成

中枢神経系の副作用は、新薬の開発中止や上市した医薬品の市場撤退につながるため、適切に予測することが重要である。これまでに主に動物を用いた方法が検討されてきたが、いまだにヒトの中枢性副作用に対する予測性は高くなく、また、動物実験は多大な労力とコストを要するため、スクリーニング性の問題なども挙げられる。これらの問題を解決するため、*in vitro* 評価法の開発が進んでおり、新しい科学技術 (new approach methodology : NAM) の利用が検討されている。特に、ヒト iPS 細胞はヒトのデータや情報が得られるために期待が大きく、すでに心毒性評価への応用が先行しているが、神経毒性に関しても、これまでに蓄積された基礎研究および動物データを基にして、新たな毒性予測法が開発されつつある。また、化学物質の発達期における神経毒性評価に対してもヒト iPS 細胞や *in silico* などの利用が進められており、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development : OECD) ではガイダンスの作成が進行中である。そこで本総説ではこれらの国際動向も踏まえて、中枢神経系の安全性評価法の潮流を概説したい。

キーワード：ヒト iPS 細胞、痙攣リスク、多点電極アレイシステム、発達神経毒性

1. 中枢神経系の評価法

医薬品の非臨床試験は、ヒトに初めて投与する前に候補化合物のプロファイルを明確にし、リスクとベネフィットを確認して、承認申請に利用するデータを収集することを目的としている。これまで医薬品の ICH ガイドラインでは *in vitro* 試験法と動物を用いて安全性評価を行っているが、近年の科学の進歩により様々な新しい科学技術 (new approach methodology : NAM) が登場しており、さらにヒトにおける予測性の高い試験法への展開が期待されている¹⁾。

中枢神経系に対する評価に関しては、医薬品候補化合物が臨床試験に入る前に、安全性薬理試験として動物を用いて化合物を評価している。多くの場合、1群5~6匹程度の実験動物に対して臨床適用の経路で単回投与を行い、機能観察総合評価法 (functional observational battery : FOB) や Irwin 変法、もしくは他の適切な試験より幅広く中枢神経機能を調べて、必要に応じて、運動、感覚、高次機能などを調べる。例えば、一般症状および行動観察において痙攣が観察された場合には、詳細にその機序などを検討して、ヒトでのリスクおよびそのマネージメントを考察する。しかしながら、認知機能障害、自殺、聴覚障害に関する動物モデルはないため、FOB 試験では、第 I 相試験で観察されるような副作用、例えば臨床の一般的な5つの有害事象

(頭痛・吐き気・めまい・痛み・疲労) などを検出することは難しい。また、種差などにより動物での評価とヒトにおける中枢性副作用の乖離があるため、臨床試験に進んだ際に重大な副作用が顕在化する可能性がある。従って、現在の非臨床安全性薬理試験ではその予測性に限界があり、ヒトに対して予測性がさらに高い試験法を開発する必要がある。

NAM を活用して新たな *in vitro* 試験法を開発するのは非常にチャレンジングな試みである。特に、中枢神経系の複雑な行動薬理を *in vitro* で再現することは難しいことから、実際には特定の毒性を簡便にスクリーニングする戦略で進められている。NAM としては、ヒト iPS 細胞から作製した脳オルガノイドや臓器チップなどの利用が探索から非臨床試験まで期待されている^{2,3)}。また、ゼブラフィッシュを用いた方法も検討されており、行動、痙攣、記憶、依存などに用いられる可能性がある⁴⁾。そのほか、バイオイメーキングの利用⁵⁾や動物の脳波なども応用されている⁶⁾。

2. ヒト iPS 細胞技術を用いた痙攣リスクの評価

医薬品の副作用の原因は企業や規制当局などにより詳細に分析されており、ある製薬会社の低分子化合物研究開発プロジェクト (2005 年から 2010 年) においては、非臨



床試験で安全性の問題のため開発中止となった医薬品候補化合物の副作用発現臓器は、心血管が17%と最も多く、中枢神経系は7%、逆に、臨床では中枢神経が最も高く34%にも上ることが報告された⁷⁾。筆者がプログラム委員を務める国際安全性薬理学会のアンケートでも、中枢で生じた痙攣の問題は約2/3の人が非臨床における安全性薬理試験にて経験があると報告されており、その重要性が示唆される⁸⁾。

これまで痙攣リスクの評価は、非臨床試験において動物の一般症状観察、行動観察時の痙攣の発症の有無、脳波などをもとに評価されてきた。しかし、スループット性も低く、近年、3Rs原則のため動物実験が制限されつつあること、ヒトにおける予測性も十分であるとは言えないことなどから、簡便なin vitro評価法が期待されている。そこで、ヒト細胞という利点を有するヒトiPS神経細胞は有用なツールとなる可能性が考えられる。また、神経のネットワーク活動を評価する方法として、iPS心筋細胞を用いた心毒性評価で利用されている多点電極アレイ(multi-electrode array: MEA)技術が挙げられる⁹⁾。これは微小電極をアレイとしてグリッド状に並べたディッシュで細胞を培養しその細胞外電位を測定する方法で、in vivoとin vitroの橋渡し、臨床への予測が可能になることが期待される。現在、in vitro神経毒性評価法の確立を目指して、国内外で盛んにMEAを利用した取り組みが進められており¹⁰⁻¹²⁾、米国のヒトの健康と環境に係わる世界規模の問題の顕在化と解決を目標とする産官学コンソーシアムのHealth and Environmental Sciences Institute (HESI)や欧州NC3RsのCrack-ITでは痙攣リスク評価の検証が実施されている。しかしながら、今のところ、痙攣リスク評価の目的に適った標準的な方法、モデル、パラメーターなどは得られていない。一般に、創薬に関して新たな試験法を開発するためには、製薬企業が承認申請のために実施できることを考えると、国内外の複数の研究機関で同一標本、同一化合物を用いて、試験結果のばらつきの範囲、評価できる安全性の範囲を明確にする必要がある。従って、ヒトiPS神経細胞を用いる試験系を確立して国際標準化を達成するためには、多施設間の検証試験を実施し、評価法の再現性、有用性、適用範囲などを明らかにすべきである。

HESIでは、2016年にTranslational Biomarkers of Neurotoxicity (NeuTox)委員会の中にMEA技術を用いた痙攣予測法の開発を目指すNeuTox MEA Subteamが発足した。同一の12化合物(非コード化)を用いて検証試験が実施され、筆者もiPS心毒性で国際検証を行ってきた関係でお誘いをうけてNeuToxにも参加してデータを提出し、現在、議論しているので、現状を報告したい。

MEA Subteamでは、検証する化合物は、陰性対照物質(アセトアミノフェン)を含めて12種類選定されている(図1)。iPS心毒性の時のように、トレーニングセットとバリデーションセットの2段階で実施しておらず、作用点が明確なものを選ぶこととなった。細胞は、ラット胎児由来の初代培養神経細胞(皮質と海馬の2種類)およびヒト

化合物	溶媒	濃度 (μM)
Pentylentetrazole	DMSO	10, 31.6, 100, 316, 1000
Picrotoxin	DMSO	0.1, 0.316, 1, 3.16, 19
Strychnine	DMSO	0.316, 1, 3.16, 10, 31.6
Pilocarpine	DMSO	0.316, 1, 3.16, 10, 31.6
Chlorpromazine	DMSO	0.1, 0.316, 1, 3.16, 10
Amoxapine	DMSO	0.316, 1, 3.16, 10, 31.6
Enoxacin	DMSO	10, 31.6, 100, 316, 1000
Phenytoin	DMSO	1, 3.16, 10, 31.6, 100
Linopirdine	DMSO	1, 3.16, 10, 31.6, 100
4-Aminopiridine	DMSO	0.316, 1, 3.16, 10, 31.6
Amoxicillin	DMSO	1, 3.16, 10, 31.6, 100
Acetaminophen	DMSO	1, 3.16, 10, 31.6, 100

図1 HESIで用いた化合物リスト

検証試験は、試薬のメーカーと濃度、溶媒(DMSO)をそろえて実施した。なお、コード化は行っていない。

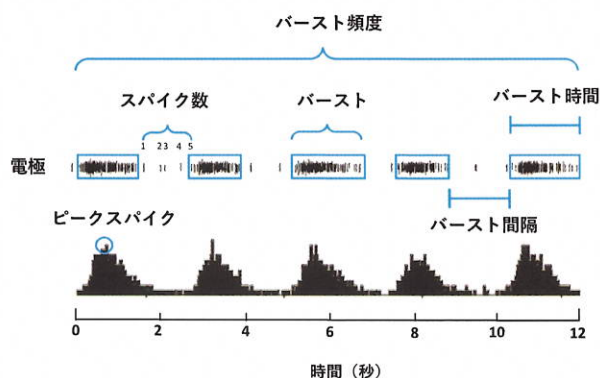


図2 MEAのデータによるエンドポイント

神経毒性におけるMEAデータの解析には、様々なパラメーターが挙げられる。その一例を示す。

iPS神経細胞(CDI社, NeuCyte社, N Cardia社, X Cell社の4種類)を用いて、種差も考慮しながら進められている。MEAでは、ラット神経細胞では培養開始後5~7日後、ヒトiPS神経細胞では培養開始数週間後から活動電位に由来するスパイクが観察される。さらに、神経ネットワーク形成が進むと、1つの神経細胞に複数の活動電位刺激が入力するバーストが観察されるようになる。これらのスパイクやバーストは1つの電極での変化あるいは複数電極での変化など様々な形で数値化することが可能であり、医薬品の薬理作用を評価できると考えられる。

図2に、MEAデータの解析パラメーターの一例を示す。MEAデータは、スパイク数、バーストの数や頻度、持続時間、バースト間隔など多岐に渡る。痙攣リスクには、心筋のQT間隔延長のような臨床バイオマーカーが存在しないため、ヒトiPS神経細胞を用いたリスク評価系を構築するには適切なエンドポイントを選ぶ必要がある。ヒトiPS神経細胞は、種差の問題を解決できる可能性を秘めている一方で、上述のようにスパイクが観察され始める培養期間がラット神経細胞に比べて、非常に長い。さらに、同期した神経活動が観察される培養期間もラット神経細胞では培養

1～2 週目で観察されるのに対して、ヒト iPS 神経細胞では 8 週間以上かかるものもあることから、プロトコルなどの標準化を視野に入れて検証試験を実施した。

その結果、各施設間の評価に用いた陽性対照物質である GABA 受容体遮断薬ピクロトキシンの反応性に、大きな施設間差が認められ、データが様々であることが明らかとなった。現在、参加施設により毎月電話会議を行っているが、MEA のエンドポイントなどは合意に至っておらず、解析法に苦戦している。具体的には、ラット神経細胞に関しては、ピクロトキシンによりスパイク数やバースト数が濃度依存的に増えているのに対して、ヒト iPS 神経細胞はピクロトキシンによりスパイク数が減少し、バースト数は増加することなどがあげられる（2018 年 9 月に国際安全性薬理学会でポスター発表）。筆者らは、改めてヒト iPS 神経細胞を長期間培養して調べたところ、ピクロトキシンによってスパイク数およびバースト数が濃度依存的に増えていたことから、basal 波形の基準設定、培養日数の問題が示唆された（図 3）。iPS 心毒性の時には綿密に波形の基準や

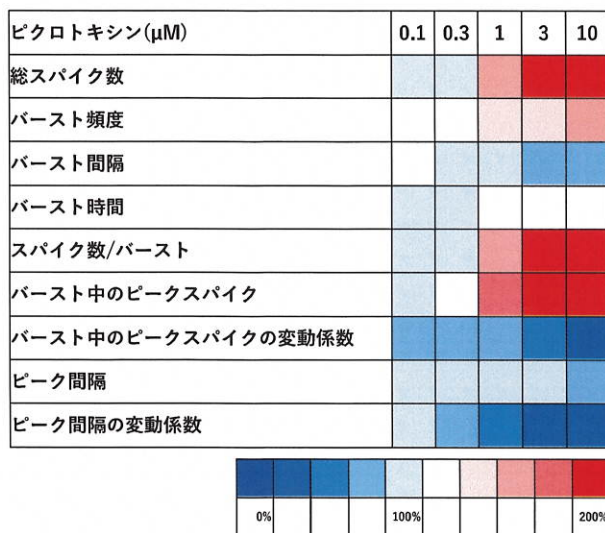


図 3 ヒト iPS 神経細胞に対するピクロトキシンの影響
iPS 神経細胞をピクロトキシンで曝露した時の MEA のパラメーター変化を示す。

培養日数などを検討したが、今回、トレーニングセットでプロトコルを固めるところをスキップしてしまったことが今になって影響していると考えられる。また、今回の検証試験にはいくつかのベンダーのヒト iPS 神経細胞が使用されており、培養期間や培地、興奮性・抑制性神経細胞の割合等が大きく異なる¹³⁾（図 4）。神経細胞の興奮性・抑制性バランス（EI バランス）が重要なのか、ベンダーごとのヒト iPS 神経細胞の特性が重要なのかは未解決である。また、アストロサイトとの共培養あるいはアストロサイトの培養上清を用いて培養することによりネットワーク形成が促進され成熟に要する培養期間が短縮することが報告されているが¹⁴⁾、今回のデータでもアストロサイトの有無によってバラツキが生じている可能性も考えられる。

現在、MEA のエンドポイントの問題を解決するために、国内外で機械学習などのアプローチが用いられているが、まずは信頼性の高いデータセットを用いることが重要である。細胞の種類や培養日数などにより薬剤応答性が異なることが想定されるため、その点を克服する必要がある。次に、再現性の高いプロトコルを設定し、痙攣リスク評価の適切なエンドポイントを明らかにすることにより、ようやくインプットするデータがそろって、応用への道が開けると考えられる。また、臨床における痙攣リスクのカテゴリーは重要であり、in vitro のデータを照らし合わせる動物のデータ、ヒトのデータに基づいた解析が必須である。iPS 心毒性評価法の開発において、iPS データと臨床の TdP に関するデータベースと比較を行ったように¹⁵⁾、ヒト iPS 神経細胞を用いた神経毒性評価においても照合が必要があり、国内だけではなく国際的なグループで議論する必要がある。近年、試験法は複数の手法を組み合わせる流れが加速しており、MEA だけで適切な指標が得られるのかは課題であり、さらなる検討が望まれる。

3. ヒト iPS 細胞を用いた発達期の神経毒性評価

上記以外の神経毒性として、医薬品も含めた化学物質の発達期における神経毒性は最近注目を集めていることから、あわせてご紹介したい。

近年、自閉症など発達障害が急速に増加し、社会問題となっている。その原因の一つは発達期における化学物質の

iPS 神経細胞株	細胞タイプ	興奮性/抑制性の割合	播種細胞数	曝露までの日数
iCell グルタミン酸作動性神経細胞 iCell グルタミン酸アストロサイト 共培養	神経細胞 (85%; グルタミン酸作動性神経細胞 70% + GABA 作動性神経細胞 30%) / アストロサイト (15%)	2.3:1	14 万	14 日
CNS.4U 共培養	グルタミン酸作動性神経細胞 (40%) / GABA 作動性神経細胞 (40%) / ドーパミン作動性神経細胞 (10%) / アストロサイト (10%)	1:1	3 万 6 千	23 日
SynFire iNs 共培養	グルタミン酸作動性神経細胞 (52%) / GABA 作動性神経細胞 (22%) / アストロサイト (26%)	2.3:1	27 万	28 日
ラット大脳皮質神経細胞	神経細胞 (55%; グルタミン酸作動性神経細胞 70-80% + GABA 作動性神経細胞 20-30%) / アストロサイト (45%)	3:1	10 万	9-11 日

図 4 ヒト iPS 神経細胞の株間差

4 社のヒト iPS 神経細胞の特性の比較。細胞の特性に株間差が認められており、医薬品の応答に対する影響が考えられる。

曝露と想定され、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¹⁶⁾。現在、妊娠ラットを用いる発達神経毒性試験ガイドラインがOECDおよび米国環境保護庁（Environmental Protection Agency : EPA）によって制定されている（OECD TG426 および EPA OPPTS870.6300）。OECD ガイドライン TG426 では、妊娠ラットおよびその腹から生まれた児ラットを用いて、試験方法が複雑で、試験期間は1年以上、動物数は720にも及び経費も膨大である。そのため、これまでわずかな化合物しか評価できていないのが現状である。また、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る。そこで、OECDにおいて新たなin vitro 評価法の議論が進行中であり、ガイダンスの作製が進行中である。動物実験代替法の観点から、定量的構造活性相関（quantitative structure-activity relationship : QSAR）や非哺乳動物モデルの応用、ヒト iPS 細胞由来分化細胞等の幹細胞を用いた発達神経毒性評価法の提案がなされている¹⁷⁾。以下にそれらの中からヒト iPS 細胞および iPS 神経細胞を用いた化学物質の神経毒性評価法について述べる。

発達期の評価方法の考え方として、神経系の構造と機能に分けてin vivoの評価方法をin vitroに落とし込むことが議論された（図5）。構造的な毒性は、ヒト iPS 細胞から神経細胞への分化過程がヒトにおける神経細胞への発生過程を模倣していると考えられることから、増殖やアポトーシス、細胞遊走等の評価に用いられている¹⁸⁾。一方、機能的な毒性に関しては上述のMEAシステムによる神経毒性評価が検討中であり、ネットワーク形成に対する慢性曝露の影響や、形成後の急性曝露の評価が検討されている¹⁹⁾。

我々はこれまでヒト iPS 細胞の good cell culture practice（細胞培養の優良規範）の作成に関わるとともに²⁰⁾、ヒト iPS 細胞の増殖・分化による評価法の開発を進めてきた。2種類のSMAD阻害薬（LDN193189とSB431542）を用いて分化誘導を行うDual Smad法によりヒト iPS 細胞から神経幹細胞へ分化誘導し²¹⁾、神経分化を制御している転写制御因子PAX6および神経マーカーのMAP2の発現が誘導さ

れ、未分化マーカーのOct3/4などの発現が低下することを確認した（図6B）。神経分化に対する有機スズ化合物、有機リン系農薬クロルピリホスおよび抗がん薬5-フルオロウラシルなどの影響を評価したところ²²⁻²⁵⁾、PAX6およびMAP2の遺伝子発現が低下し、細胞内ATP量も減少することを見出した。細胞内ATPは主にミトコンドリアにおいて産生されるため、ミトコンドリアを蛍光標識して観察したところ、ミトコンドリアの断片化とミトコンドリア融合タンパク質Mfnの分解促進が誘導され、Mfnのノックダウン実験によって分化誘導が阻害されることを明らかにした。さらに、Mundyらの詳細な発達神経毒性の総説を基にして²⁶⁾、発達期の毒性を有する化学物質35種類を選定して、分化能などにより評価した。図6Cには代表的な化合物として、ピレスロイド系農薬デルタメトリン、ミトコンドリア呼吸鎖阻害薬ロテノン、抗てんかん薬バルプロ酸を示しているが、ヒト iPS 細胞の分化能により発達神経毒性を評価できることを明らかにしている²⁷⁾。このように我々の評価系は化学物質による脳発達早期の神経毒性評価に有用であることが示唆された。

また、MEAに関しては、Timothy Shafer 博士（EPA）らによりラット神経細胞を用いて詳細に検討されており、86化合物により一定の予測性を有することが報告された²⁸⁾。さらに、ヒト iPS 神経細胞の応用可能性がEPAとデュッセルドルフ大学のグループにより検討されて、最近、詳細が報告された²⁹⁾。ピレスロイド系農薬・デルタメトリンは、スパイクなどに対するIC50がラット神経細胞とヒト iPS 神経細胞で似た値を示していることから信頼性があることが考えられており、さらに発達神経毒性が懸念される化学物質を用いて検証が必要である。今回は紙面の都合で割愛するが、構造をもとにしたin silicoによる評価、in vitro評価法では体内動態が評価できないことからin vitroとヒトを橋渡しする目的でゼブラフィッシュなどのアプローチも検討されている。重要な点は、動物実験を必要最小限にするために、in vitroやin silicoをいつどのように使うのか？ということである。単一の方法では化学物質のハザード評価あるいはリスク評価の予測性を確保できなかったため、現在、図7に示すような段階的な発達神経毒性評価法のスキーム（案）が提案されている²⁹⁾。これはあくまで案の段階であり、引き続き、議論を行う必要があるが、有害性発現経路（adverse outcome pathway : AOP）を基にしてin silico, in vitro, in vivoの情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する統合的アプローチ（integrated approaches to testing and assessment : IATA）により新たな発達神経毒性ガイドラインが整備されと考えられる。

今後は、発達神経毒性に限らず、動物実験への依存度を軽減しながら、IATAに基づいて化学物質のヒト健康リスクの評価戦略の動きが加速すると考えられる。また、化学物質により再現性、有用性が示された試験法は、将来的に医薬品に対する応用が検討される可能性も高く、さらなる進展が期待される。

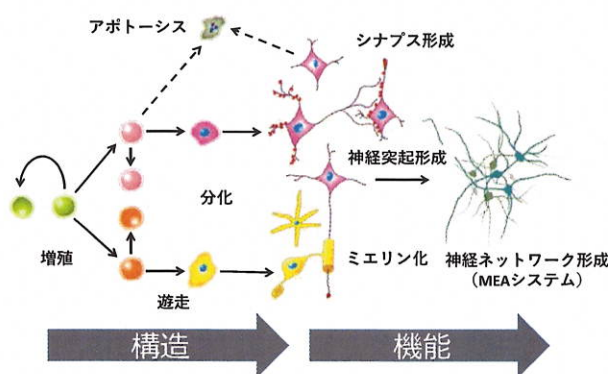


図5 発達期における神経毒性のスキーム
神経系の発達過程を基に、構造と機能の観点から試験法の開発が進められている。





図7 段階的な in vitro 発達神経毒性評価法
現在, OECD で議論されている段階的な発達神経毒性評価法, 今後, 修正される可能性があるが, 例として示した。

引き続き, ヒト iPS 細胞技術や AI などの NAM を利用し, 有効な医薬品の薬効評価, より精度の高い安全性評価法を構築し, 安全・安心な医薬品を患者さんに届けられるように今後も取り組みたい。

謝辞: 本稿の執筆の機会を与えてくださいました関係者の皆様に深く御礼申し上げます。本研究は, 厚生労働省科学研究費・化学物質リスク研究事業「化学物質のインビトロ神経毒性評価法の開発」(#19KD1003 to YK), 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の医薬品等規制調和・評価研究事業委託研究「ヒト iPS 分化細胞技術を活用した医薬品の次世代毒性・安全性評価試験系の開発と国際標準化に関する研究」(#17mk0104027 to YK), 文部科学省

科学研究費補助金・基盤研究 (C)「ヒト iPS 細胞のミトコンドリア制御因子による新しい化学物質の神経毒性評価法の開発」(#17K00576 to SY) のサポートにより実施されました。また, 日本安全性薬理研究会, 製薬協コンソーシアム, HESI NeuTox 委員会, OECD DNT 専門委員の先生方との議論も大変参考になりました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

著者の利益相反: 開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Avila AM, et al. Regul Toxicol Pharmacol. 2020;14:104662.
- 2) Sakaguchi H, et al. Stem Cell Reports. 2019;13:458-473.
- 3) Low LA, et al. Nat Rev Drug Discov. 2020 Sep 10. doi: 10.1038/s41573-020-0079-3.
- 4) Ibzhazehiebo K, et al. Neuropharmacology. 2020;167:107988.
- 5) Carmichael O, et al. Drug Discov Today. 2018;23:333-348.
- 6) Authier S, et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2019;99:106611.
- 7) Cook D, et al. Nat Rev Drug Discov. 2014;13:419-431.
- 8) Authier S, et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2016;81:37-46.
- 9) Johnstone AFM, et al. Neurotoxicology. 2010;31:331-350.
- 10) Odawara A, et al. Sci Rep. 2016;6:26181.
- 11) Paavilainen T, et al. Stem Cell Res. 2018;27:151-161.
- 12) Tukker AM, et al. ALTEX. 2016;33:261-271.
- 13) Tukker AM, et al. ALTEX. 2020;37:121-135.
- 14) Odawara A, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2014;443:1176-1181.
- 15) Ando H, et al. J Pharmacol Toxicol Methods. 2017.
- 16) Landrigan PJ, et al. Environ Health Perspect. 2014;120:a258-a260.
- 17) Bal-Price A, et al. Tox App Pharm. 2018;354:7-18.
- 18) Fritsche E, et al. Methods Mol Biol. 2011;758:99-114.
- 19) Nimtz L, et al. Stem Cell Res. 2020;45:101761.
- 20) Pamies D, et al. ALTEX. 2017;34:95-132.
- 21) Chambers SM, et al. Nat Biotechnol. 2009;27:275-280.
- 22) Yamada S, et al. Toxicol In Vitro. 2016;34:257-263.
- 23) Yamada S, et al. Sci Rep. 2017;7:40925.
- 24) Yamada S, et al. Sci Rep. 2018;8:12155.
- 25) Yamada S, et al. J Toxicol Sci. 2018;43:727-734.
- 26) Mundy W, et al. Neurotoxicol Teratol. 2015;52:25-35.
- 27) Kamata S, et al. Toxicol In Vitro. 2020;69:104999.
- 28) Frank C, et al. Tox Sci. 2017;160:121-135.
- 29) Masjosthusmann S, et al. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1938.

Current challenges and future perspectives of iPSC-based neurotoxicity testing

Kazunobu Tsunemoto, Shigeru Yamada, Yasunari Kanda

Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences (NIHS)

Abstract. Predicting drug-induced side effects in central nervous system is important because they can lead to the discontinuation of new drugs/candidates or the withdrawal of marketed drugs. Although many efforts are made, evaluation system using animals have not been highly predictive in humans. In addition, animal experiments are time-consuming and costly. To address these issues, in vitro evaluation methods, such as the use of New Approach Methodologies (NAM) have been explored. Human IPS cell technology has already been applied to assess drug-induced cardiotoxicity. In addition, the use of human IPS cell technology and in silico has been promoted for neurotoxicity assessment during the developmental neurotoxicity in terms of chemical safety issues. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidance regarding developmental neurotoxicity is under preparation. In this review, we will review the current trends in safety assessment methods for the central nervous system in light of these international trends.
