

## MEA と BBB を統合した *in vitro* 試験系の開発

分担研究者：諫田 泰成 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部長

### 研究要旨

化学物質の神経毒性はげっ歯類を用いた *in vivo* 試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や 3Rs の観点から、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験の活用が期待される。OECD の *in vitro* testing battery (DNT-IVB) ガイダンスにヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる神経毒性評価法が記載されているが、実験の再現性やキネティクスの反映が課題である。そこで本分担研究では、MEA による *in vitro* 神経毒性評価にキネティクスを反映させた解析が可能な生体模倣システム (MPS) の開発を目指す。

まず GABA 受容体拮抗薬であるピクロトキシンを用いて、抑制性神経細胞の細胞機能を調べたところ、用量依存的に神経活動の指標となるスパイクやバーストの亢進が認められた。また発達神経毒性の陽性対照物質ビスフェノール A を用いたところ、用量依存的にスパイクやバーストの亢進が認められた。しかし、一定期間培養してもスパイクが十分に解析できないウェルがありウェル間差が認められたことから、細胞画像から神経ネットワーク活動を予測できる方法の開発に取り組んだ。

次に、血液脳関門 (BBB) とヒト iPS 細胞由来神経細胞の共培養法を検討した。MPS のプロトタイプとして、MEA 測定プレートにヒト iPS 細胞由来 BBB を播種したインサートを載せる方法の開発を行った。MEA の測定プレートに適したインサートを用いてヒト iPS 細胞由来 BBB を培養し、経内皮電気抵抗値 (TEER) によりバリア機能が保たれていることを確認した。

さらにヒト iPS 細胞由来 BBB については、微小流路デバイスを用いた長期培養の検討もを行い、二週間以上に渡り良好なバリア機能を有する条件を見出した。

以上の結果から、MEA と BBB を用いた MPS の開発の基盤を構築した。今後、さらに発達神経毒性の評価法の開発を行う予定である。

### A. 研究目的

現在、化学物質の発達神経毒性は主にげっ歯類を用いた行動試験により評価されているが、ヒトへの外挿性や予測性に課題がある。動物試験における 3Rs の観点からも、ヒト生体環境に近い細胞や組織を活用した *in vitro* 評価系の開発が望まれる。本研究は、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた新たな *in vitro* 発達神経毒性評価法の開発を目的とする。

化学物質による発達神経毒性の *in vitro* 評価系として、現在、OECD の *in vitro* testing battery (DNT-IVB) ガイダンスにヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多点電極アレイ (MEA) システムによる神経毒性評価法が記載されているが、施設間・実験間の再現性や、キネティクスの反映、細胞の株間差等が課題である。

本研究では、MEA による *in vitro* 神経毒性評価にキネティクスを解析可能な生体模倣システム (MPS) の開発を目指す。

本年度は、ヒト iPS 由来神経細胞のネットワーク活動を MEA システムにより記録して、GABA 受容体拮抗薬であるピクロトキシン、発達神経毒性の陽性対照物質ビスフェノール A を評価し、細胞間差などを検討した。また、MEA システム上の培養細胞の状態を非侵襲的に評価し管理することを目指し、細胞画像から神経ネットワーク活動を予測できる方法の開発に取り組んだ。

次に、血液脳関門 (BBB) とヒト iPS 細胞由来神経細胞の共培養法を検討した。ヒト iPS 細胞由来 BBB は 2 施設でプレバリデーションを実施した。微小流路デバイスを用いた MPS における BBB の長期培養についても検討を行った。

### B. 研究方法

#### ①ヒト iPS 細胞由来神経細胞の培養

ヒト iPS 細胞由来神経細胞として、OECD の *in vitro* 神経毒性評価系の国際的なバリデーションに用いられている市販細胞培養キット（米国 Neucyte 社、

SynFire® MEA kit) を用いた。本キットはヒトiPS細胞から分化誘導された Glutamatergic neuron、GABAergic neuronおよびAstrocyteからなり、メーカープロトコルに従い14:6:7の数比で混合培養した。細胞の解凍、播種、培地交換についてもメーカープロトコルに従い行った。Neucyte社細胞はMEAシステムMAESTRO (米国Axion社) の測定プレート上で培養した。

また株間差の検討のため、米国Xcell社のヒトiPS細胞由来神経細胞XCL-1も使用した。Xcell社細胞はMEAシステムPresto (アルファメッドサイエンティフィック) の測定プレート上で培養した。

## ②MEAデータの取得と解析

Neucyte社細胞のMEAデータはMAESTROを使用して取得した。神経活動データの取得は15分間実施し、AxISソフトウェアでスパイクを抽出後、Neural Metric toolsソフトウェアを使用してネットワークバースト等、各種ネットワーク活動パラメータを取得した。Xcell社細胞のMEAデータ取得にはPrestoシステムを使用した。

化学物質の投与は、スパイク及びネットワークバーストの上昇が止まり、神経細胞ネットワークが成熟したと考えられる時期に達した後に実施した。Neucyte社細胞については細胞播種後28日目以降、Xcell社細胞は60日目以降に投与した。投与は蓄積的に5段階に分けて行い、最終濃度はピクロトキシン、ビスフェノールAとも100 $\mu$ Mとした。

## ③神経細胞画像の取得

細胞画像の取得にはBioRevo BZ9000オールインワン顕微鏡 (Keyence) を使用し、ソフトウェアBZ-IIにより画像の撮影および合成を行った。細胞画像の撮影は週に1回実施した。MEAデータと紐づけた細胞画像の撮影にあたっては、MEAデータに影響を与えないよう、画像撮影はMEA測定後に実施した。

## ④ヒトiPS細胞由来BBBの培養

ヒトiPS細胞由来BBBは、分担研究者の松永らが樹立したものを、液体窒素温度で国立医薬品食品衛生研究所に輸送し、液体窒素中に保存した (Yamashita et al. Fluids Barriers CNS (2020) 17:36) 。

24ウェルプレートのウェルに、セルカルチャーインサート (Merck, PIHP01250) をセットし、Fibronectin及びCellmatrix Type IV (それぞれ100 $\mu$ g/ml及び400 $\mu$ g/ml) により4 $^{\circ}$ C、一晩コーティングした。コーティング溶液を除去した後、セルカルチャーインサートをセットしたウェル内に600 $\mu$ l、セ

ルカルチャーインサート内に200 $\mu$ lの播種培地を注入し、37 $^{\circ}$ Cで保温した。培地の組成は前掲のYamashitaらの文献に従った。

凍結BBB細胞を液体窒素から取り出し、バイアル内に37 $^{\circ}$ Cに温めた播種培地1mlを加え、10回程度ピペッティングして解凍した。得られた細胞懸濁液を8mlの播種培地に加え、100 x g、5分、室温にて遠心した。細胞ペレットを1mlの播種培地に懸濁してトリパンブルー染色の上で細胞数をカウントし、細胞の生存率が80%以上であることを確認した。細胞懸濁液の細胞密度を2.7 x 10<sup>6</sup>cells/mlに調整し、セルカルチャーインサートあたり200 $\mu$ l (5.4 x 10<sup>5</sup>cells) を添加した。各セルカルチャーインサート内の液を、400 $\mu$ lにセットしたピペッターで1回ピペッティングして均一化し、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>にて静置培養した。

経内皮電気抵抗 (TEER) は、測定器EVOM (World Precision Instruments)にカップ型電極EndOhm 6G (World Precision Instruments)を接続し、電極カップ内にセルカルチャーインサートをセットして測定した。

## ⑤微小流路デバイスを用いたBBBの培養

米国Emulate社の微小流路デバイスChip-S1を使用した。Top channelに④に示した方法で解凍したヒトiPS細胞由来BBB細胞2.5 x 10<sup>5</sup>cellsを播種して、メーカープロトコルに従い灌流下で培養を行った。BBBのバリア機能の確認は、蛍光物質Lucifer yellow (LY, Invitrogen) の透過率測定により行った。BBBを通過し蛍光測定により定量が可能な対照物質として、4-methyl-umbelliferone (4MU, SIGMA) を使用した。LY (300 $\mu$ M)あるいは4MU (100 $\mu$ M)をTop channelのinlet側に添加し、細胞播種面を通過してBottom channel outletに回収されたLY及び4MUを、ARVO X (Perkin Elmer)により定量した。

(倫理面の配慮)

本研究で用いたヒトiPS細胞由来神経細胞は、細胞バンクに集積された匿名化ドナー由来細胞から作製されており、個人情報の取扱いは生じない。

## C. 研究結果

MEA測定プレート上で培養したヒトiPS細胞由来神経細胞について、経時的に神経活動の測定を行った。その結果、総スパイク数、ネットワークバースト数ともウェル間差が観察され、神経活動が十分に上昇しないウェルが生じていた。

神経活動を細胞画像から予測する技術の開発を目指し、細胞画像の機械学習に適切な撮影条件を検討し

た。その結果、1視野で3 x 3のタイリング撮影を行い、それぞれZ軸方向に3.5 $\mu$ m間隔で積層的に撮影してベストフォーカス合成を行うこととした(図1)。この方法で経時的に細胞画像を取得し、機械学習による画像特徴量の抽出に供した(分担研究・加藤の項目を参照)。

ヒトiPS神経細胞のネットワーク活動をMEAにより記録し、株間差を検討した。抑制性神経細胞の評価のためにピクロトキシン、神経毒性が既知の化合物としてビスフェノールAを用いたところ、今回使用したNeucyte社細胞においても、Xcell社細胞で得られたものと類似した傾向の用量反応が観察された(図2, 3)。

BBBとヒトiPS細胞由来神経細胞の共培養系の開発のために、名市大と衛研でプレバリデーションを行い、両施設で同程度のTEER値(良好なバリア機能の目安となる1000 $\Omega$ /cm<sup>2</sup>を超える値)が得られることを明らかにした(図4)。

また微小流路デバイスを用いて培養したBBBは、少なくとも培養19日で高いバリア機能を保つことを明らかにした。一方、培養インサートによる培養では13日程度でLucifer yellowに対するバリア機能は失われた(図5)。

#### D. 考察

化学物質の発達神経毒性評価に関して、2023年4月にOECDのin vitro testing battery (DNT-IVB) ガイドラインがWNTで承認されて、国際的な議論が進められている。その中でMEAによる神経ネットワーク活動の評価法が記載されているが、同一のiPS神経を用いたMEA評価で化学物質の投与前の神経ネットワーク活動にばらつきが認められることから、標準化のネックとなっている(ALTEX, 37:121-135, 2020)。そこでAI画像解析による細胞状態のモニタリングに着手し、今年度は機械学習に供するZ-stack画像をMEAデータと紐づけて取得した。今後、機械学習を用いてMEAプレート上における神経ネットワーク形成と関連する画像特徴量の抽出等の研究を進める。

DNT-IVBガイドラインでも指摘されているように、化学物質の中枢神経作用を評価するうえでBBBの影響は重要であり、3Rsの観点からヒト細胞を用いた試験系の樹立が望まれる。ラットBBBは市販されているが、ヒトiPS由来BBBはまだ8版(富士フィルムCDI、Emulateなど)の販売に留まっており、本研究では独自のヒトiPS由来BBBを利用した。本研究で用いたBBBも市販のBBBも、同じプロトコルをベースに分化誘導している(Lippmann et al, Nat. Biotechnol. 2012; 30: 783-791)。プロトコルや輸送などを検証した結果、2施設で同様のTEER値が得られ、プレバ

リデーションに成功したと考えられる。今後、MEAとBBBを連結したMPSを開発し、キネティクスを考慮した評価方法に取り組む。

一般に、神経機能の異常にはBBBの破たんやミクログリアによる炎症なども関与すると考えられる。本研究ではBBBに脳血管内皮細胞のみを使用した、脳血管ユニットを構成する他のメンバーであるペリサイト、アストロサイト、ミクログリアなどの細胞を含むBBBを構築し、その予測性を検証する必要がある。また、微小流路を用いた灌流培養においてBBBのバリア機能が静置培養に比べ安定して維持されたことから、MEAとの統合に適した微小流路デバイスについても開発を進める予定である。

ヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。本研究においてはNeucyte社、Xcell社の2種のヒトiPS細胞由来神経細胞を用いて、ピクロトキシン及びビスフェノールAの影響を解析した。2つの細胞株に対して、両化学物質は類似した用量反応関係を示したが、ピクロトキシンについてはスパイク数の増加が、NeucyteよりもXcellで顕著であった。これはピクロトキシンにより阻害を受ける抑制性ニューロンの比率が、NeucyteにおいてXcellよりも低いことによる可能性があるため、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの比率(E/Iバランス)を調べる必要がある。またラットとヒトの種差の要因はE/Iバランス以外にも様々な原因が報告されていることから(ALTEX, 37:121-135, 2020)、株間差を克服できるMEA評価指標の選定が必要と考えられる。まずはNeucyteのデータの活用を進めているが、今後、AIを活用するためには株ごとにMEAデータセットを取得する必要がある。

#### E. 結論

本研究において、ヒトiPS細胞由来神経細胞とヒトiPS細胞由来BBBを使用し、細胞画像やMEAデータ、培養条件の最適化など基盤となる技術を構築した。今後、キネティクスを考慮したin vitro神経毒性評価系の構築を目指す。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. 諫田泰成、安彦行人：化学物質のインビトロ発達神経毒性評価—甲状腺ホルモンの影響評価の取り組み、第49回日本毒性学会学術年会、北海道、2022年7月2日、口頭、国内。

2. Shigeru Yamada, Yukuto Yasuhiko, Yasunari Kanda : Tributyltin inhibits neural induction via mitochondrial dysfunction in human iPS cells、第 8 回国際メタロミクス学会、石川、2022 年 7 月 12 日、ポスター、国内。
3. 安彦行人、山田茂、諫田泰成 : 多点電極アレイシステム (MEA) を用いたヒト iPS 由来神経細胞によるピレスロイド発達神経毒性の評価、第 62 回日本先天異常学会学術集会、石川、2022 年 7 月 29 日、口頭、国内。
4. 諫田泰成、安彦行人 : インビトロ神経毒性評価法の現状と課題、日本動物実験代替法学会第 35 回大会、静岡、2022 年 11 月 19 日、口頭、国内。
5. Yukuto Yasuhiko, Shigeru Yamada, Yasunari Kanda : ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた多

点電極アレイシステムによるピレスロイド系農薬の神経毒性評価、第 96 回日本薬理学会年会、神奈川、2022 年 11 月 30 日、ポスター、国内。

6. 安彦行人、山田茂、花尻瑠理、諫田泰成 : ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた解離性麻醉剤の神経毒性評価、第 143 回日本薬学会年会、北海道、2023 年 3 月 27 日、ポスター、国内

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

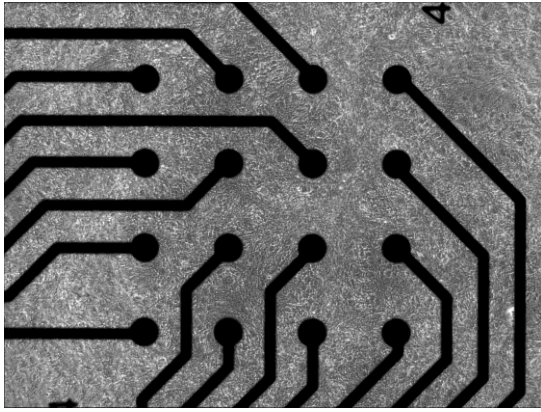


図1. MEA 測定プレート上で培養したヒト iPS 細胞由来神経細胞の画像

1 視野で 3 x 3 のタイリング撮影を行った。それぞれ Z 軸方向に 3.5 $\mu$ m 間隔で積層的に撮影し、BX-II ソフトウェアのベストフォーカス機能で合成した。

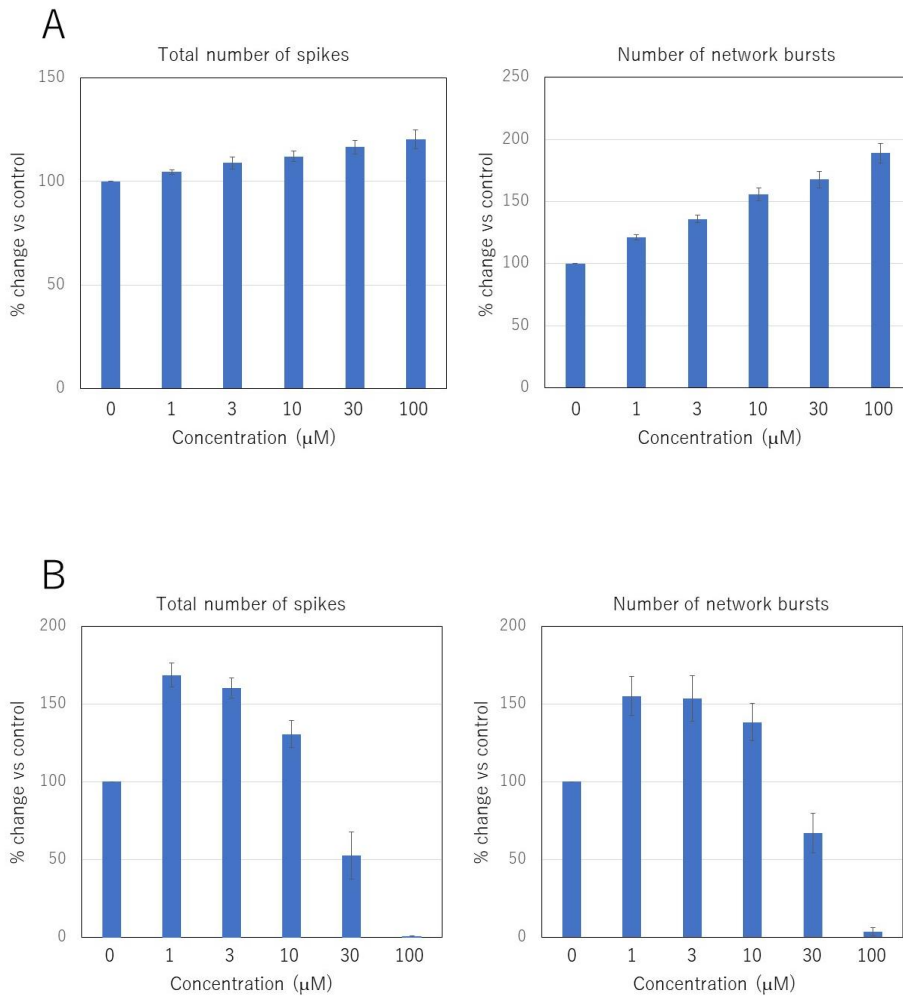


図 2. ヒト iPS 細胞由来神経細胞 (Neucyte) のネットワーク活動に対する化学物質の作用

Neucyte 社製ヒト iPS 細胞由来神経細胞に化学物質を投与し、MEA により神経ネットワーク活動を測定した。A. ピクロトキシン投与 (N=5、平均値±標準偏差)。B. ビスフェノール A 投与 (N=4、平均値±標準偏差)。左：総スパイク数、右：ネットワークバースト数。いずれも投与濃度 0 における値を 100%とした相対値で示した。

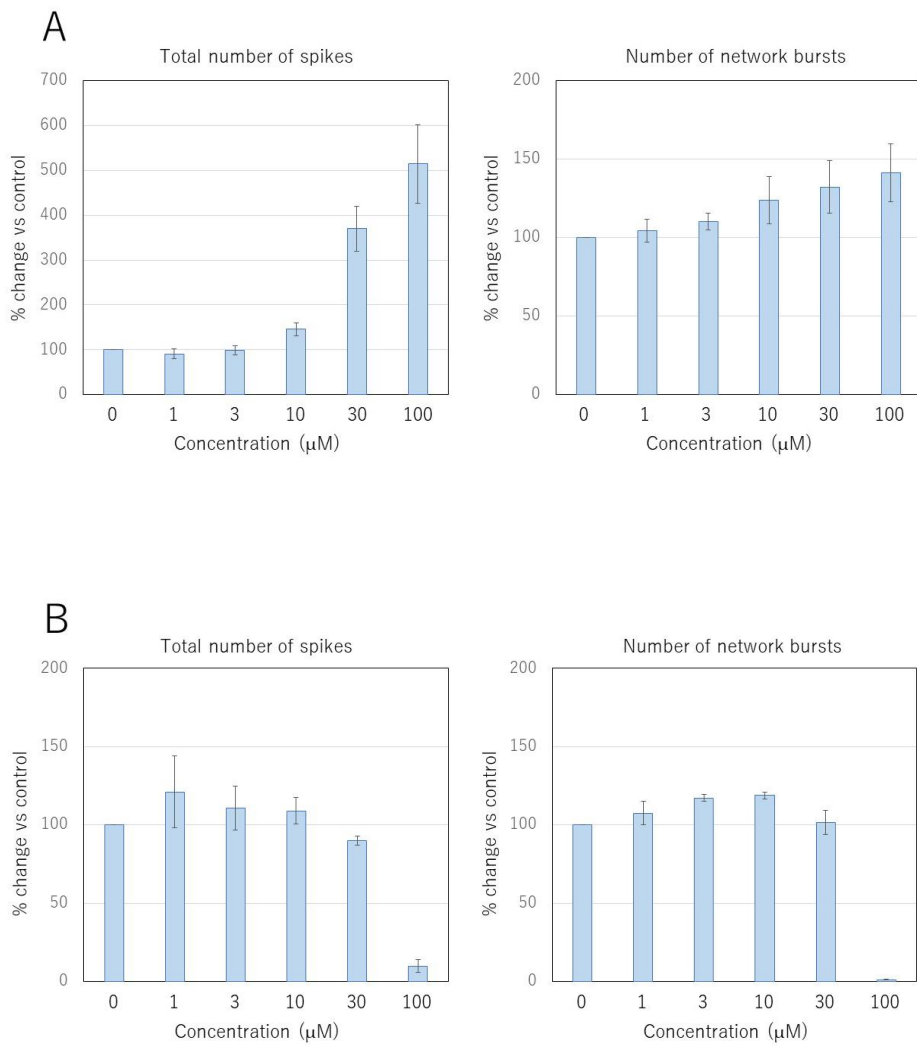


図3. ヒト iPS 細胞由来神経細胞 (Xcell) のネットワーク活動に対する化学物質の作用

Xcell 社製ヒト iPS 細胞由来神経細胞に化学物質を投与し、MEA により神経ネットワーク活動を測定した。A. ピクロトキシン投与 (N=8、平均値±標準偏差)。B. ビスフェノール A 投与 (N=4、平均値±標準偏差)。左：総スパイク数、右：ネットワークバースト数。いずれも投与濃度 0 における値を 100% とした相対値で示した。

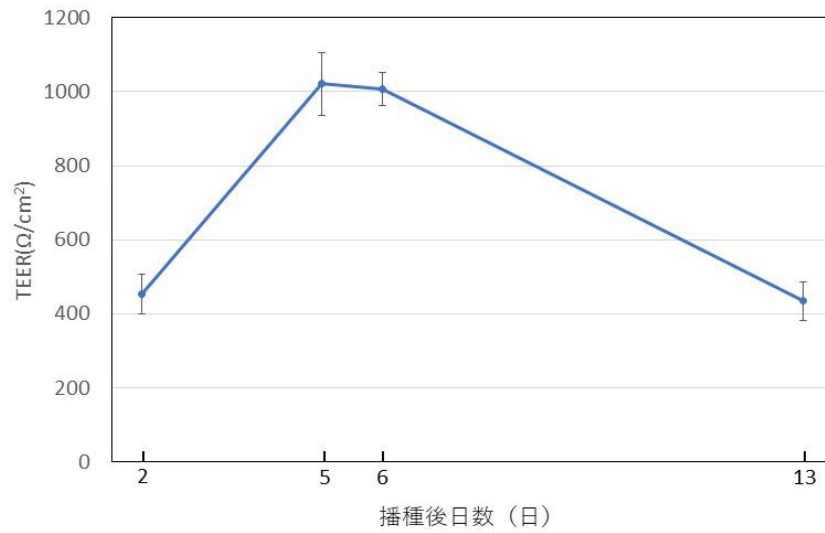


図4. 静置培養されたヒト iPS 細胞由来 BBB の TEER 値の経時変化  
 セルカルチャーインサートに播種後 5 日、6 日目に 1000 Ω/cm<sup>2</sup> を超える良好な TEER 値が得られた。(N=4, 平均値±標準偏差)



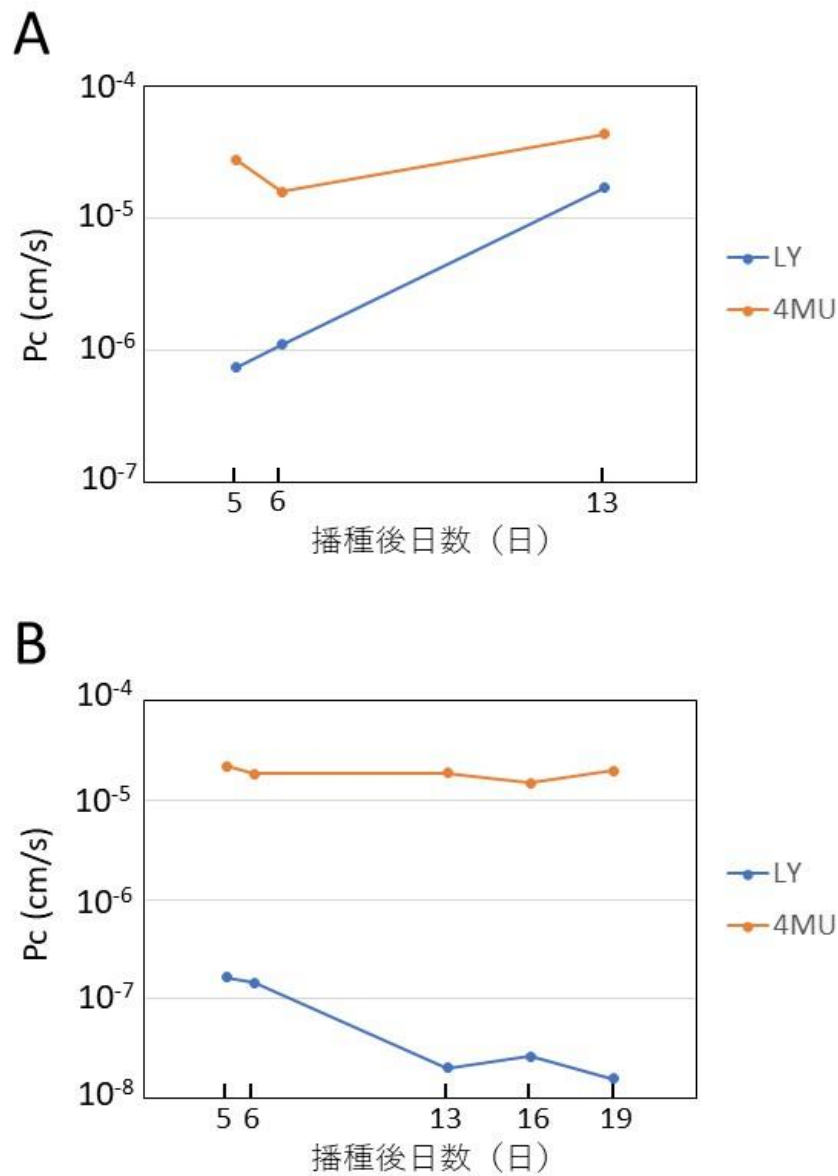


図5. 静置培養と灌流培養におけるヒト iPS 細胞由来 BBB の透過率の経時変化

透過率  $P_c$  (Permeability coefficient) は細胞培養面を透過した蛍光物質の濃度より計算した。BBB を透過しない蛍光物質として Lucifer Yellow (LY)、BBB を透過する蛍光物質として 4-methylumbelliferone (4MU) を使用した。A. セルカルチャーインサートによる静置培養 (N=1)。播種後 13 日目には、LY の透過率が 4MU と同等まで上昇した (BBB のバリア機能が低下した)。B. 微小流路を用いた灌流培養 (N=2, 平均値)。播種後 19 日目まで BBB の高いバリア機能が保たれた。