

AI支援型MPSを用いたヒトiPS由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

研究代表者：安彦 行人 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長

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、ヒトに対する予測性や外挿性に課題がある。動物試験に関する 3Rs の観点からも、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験、カテゴリーアプローチ等を用いた *in silico* 予測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。また DNT-IVB の段階的なアプローチにおいて Tier0 に computational approach が記載されているが、具体的な *in silico* 手法の検証が必要不可欠である。ヒトに対する予測性向上には、化学構造と *in vitro* 神経毒性を統合的に評価する必要がある。

今年度は、キネティクスを反映できる *in vitro* 神経毒性評価に生体模倣システム (MPS) を活用することを目指し、まず血液脳関門 (BBB) とヒト iPS 細胞由来神経細胞の共培養系の研究を進めた。また、MEA データと細胞画像データの同時取得を行い、非侵襲に神経ネットワーク活動を予測できる AI システム開発に取り組んだ。さらに、神経毒性の *in silico* 予測に有用な化学構造情報の検討を進めた。これらのデータと照合するために、毒性データが不足する物質について *in vivo* 試験を実施した。

以上のように、統合的に発達神経毒性を評価可能なシステム開発を進めている。今後、OECD 発達神経毒性ガイダンスや国内外の関連団体との連携のもと、新規試験法として国際発信を目指す。

研究分担者：諫田 泰成

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 部長

研究分担者：松永 民秀

名古屋市立大学医薬学総合研究院 (薬学) 教授

研究分担者：鈴木 郁郎

東北工業大学 大学院工学研究科 電気工学専攻・教授

研究分担者：加藤 竜司

名古屋大学大学院 創薬科学研究科 准教授

研究分担者：渋谷 淳

国立大学法人東京農工大学 大学院・農学研究院・教授

研究分担者：吉成 浩一

静岡県立大学 薬学部 教授

研究分担者：小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 特別研究員

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 *in vitro* 評価系や、コンピューターを活用した *in silico* 予測手法の開発が望まれる。

OECD の発達神経毒性 *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。また DNT-IVB の段階的アプローチにおいて Tier 0 に computational approach が記載されているが、具体的な *in silico* 手法の検証が必要不可欠である。ヒトに対する予測性向上には、化学構造に基づく *in silico* 予測と *in vitro* 神経毒性を統合的に評価する必要がある。

本研究は、ヒト iPS 細胞由来の細胞を用いた精度の高い *in vitro* 評価法の開発、及び *in vitro* と *in silico* 手法の統合による *in vivo* 発達神経毒性予測の精度向上を目的とする。

この目的のため本年度は、*in vitro* 評価系の開発として、MEA システムへの血液脳関門 (BBB) の統合、

細胞画像のAI解析によるin vitro系の品質評価法の開発を進めた。またin silico手法の開発としてMEAデータの機械学習による解析手法の開発、構造記述子による化学物質のグルーピング及びリードアクロスによる神経毒性予測手法の開発を行った。in vivo発達神経毒性の予測性向上のため、発達神経毒性情報の不足する物質のin vivo毒性評価、及びin silico予測とin vitro評価の比較に基づくin vivo毒性情報の収集を実施した。

さらに、研究成果を国際ガイダンスとして確立することを目指し、試験法の行政利用に向けた国際動向調査を進めた。

B. 研究方法

① ヒトiPS細胞由来神経細胞及びBBBを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

ヒトiPS細胞由来神経細胞のネットワーク活動をMEAにより再現性良く測定するための、培養の品質管理手法を検討した。具体的には、米国Neucyte社の市販細胞培養キット、米国Axion社のMEAシステムを使用し、ヒトiPS細胞由来神経細胞を培養して神経ネットワーク活動を測定した。培養期間中にヒトiPS細胞由来神経細胞の写真撮影を行い、得られた画像を深層学習モデルU-netによる学習に供して、コンフルエント状態の細胞画像から特徴量を抽出するアルゴリズムを開発した。

また分担研究者の松永らが樹立したヒトiPS細胞由来BBBの分与を受け、国衛研にて培養及び経内皮電気抵抗 (TEER) 測定による機能確認を行った。

ヒトiPS細胞由来神経細胞のネットワーク活動の化学物質に対する反応をMEAにより測定し、得られたデータを用いた機械学習による毒性予測を行った。化学物質として5つの痙攣陽性化合物と3つの陰性化合物を使用し、MEAにより得られる神経ネットワーク活動のパラメータのうち、スパイク数、バースト数に関するパラメータを用いて機械学習モデルを構築した。

② 化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

化学構造式から発達神経毒性を予測する手法として、発達神経毒性に関する総説 (Mundy et al., Neurotoxicol Teratol, 52:25-35, 2015) に記載された361の化学物質を、351の構造記述子によりクラスタリングした。同じ化学物質と構造記述子のセットを用いて化学物質相互の構造類似度を計算し、リードアクロスによる毒性予測手法を開発した。類似度の計算に用いる構造記述子の選択や、構造類似度を判定する閾値、比較する物質数、陽性判定基準の設定を検討した。

③ in vitroとin silico手法の統合によるin vivo発達神経毒性の予測性の向上

発達神経毒性のメカニズムが明らかでない化学物質としてフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドに着目してラット発達期ばく露を行い、児動物脳の海馬歯状回における神経新生について組織及び遺伝子発現を解析した。

またin vitroとin silico手法の統合的アプローチとして、構造情報による分類(in silico)とMEAシステムによるin vitroデータから発達神経毒性が陽性と推測した物質について、既報のin vivoデータの検索を行った。

④ 試験法の行政利用に向けた国際動向調査

JacVAM資料編纂委員会の協力のもとOECD in vitro DNTガイダンスに対する意見募集に対応 (意見集約と提出) を行った。

(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ていない。また動物実験については、実験を実施した国立大学法人東京農工大学の動物実験等に関する規定ならびに動物実験指針に従った。投与方法は飲水投与を主体として動物の苦痛を最小限に留め、動物はすべてCO₂/O₂深麻酔下での灌流固定ならびに放血により屠殺し動物に与える苦痛を最小限に留めた。

C. 研究結果

① ヒトiPS細胞由来神経細胞及びBBBを用いたin vitro発達神経毒性評価法の開発

ヒトiPS細胞由来BBBの輸送安定性やバリア機能に関するプレバリデーションを行い、良好なバリア機能を得られる培養のプロトコルを確立した。これにより今後、BBBのキネティクスを反映したin vitro評価系の樹立に繋がると期待される。

MEAプレート上で培養された細胞の画像から、AIによる細胞培養の品質評価を行うための特徴量の抽出手法を開発した。これによりin vitro評価系の再現性向上に資することが期待される。

またMEAデータの機械学習により構築したモデルは、未知の (学習に用いられていない) 陽性物質データから陽性判定を下すことができた。

② 化学構造の類似性に基づくin silico発達神経毒性予測

構造記述子により化学構造や物性の類似した物質をグループ化できるクラスタリング手法を開発した。その結果、発達神経毒性陽性の物質や類似した構造を

持つ物質が集積したクラスターが得られ、開発したクラスターリング手法が適切であることが示唆された。リードアクロスにおいて、比較する物質数や類似度に適切な閾値を設けることで、神経毒性予測性を向上させられることが示唆された。

③ in vitroとin silico手法の統合によるin vivo発達神経毒性の予測性の向上

発達神経毒性のメカニズムが明らかでない化学物質としてフッ化ナトリウム、過塩素酸アンモニウム、イミダクロプリドに着目し、in vivo発達神経毒性評価を実施した結果、海馬歯状回において神経幹細胞の増殖抑制や神経炎症が生じていることを見出した。

また発達神経毒性に関する総説(Mundy et al., *Neurotoxicol Teratol*, 52:25-35, 2015)に発達神経毒性陽性の記載がなかった物質のうち、化学構造によるin silico予測とMEAデータから発達神経毒性陽性の可能性が示唆されたフィプロニルについて文献検索を実施し、海外評価機関における発達神経毒性陽性の試験報告を見出した。このことから、in silico及びin vitroの統合的アプローチにより、in vivo発達神経毒性の予測精度が向上することが示唆された。

④ 試験法の行政利用に向けた国際動向調査

OECDにて策定中のin vitro DNTガイドランスの意見募集に対し、神経細胞分化や神経突起伸長といったエンドポイントの生物学的な意味づけ、またin vivoでの行動異常との対応づけについてのコメントを提出した。また国内外の学会に出席し関連情報の収集、意見交換を実施した。

D. 考察

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データと紐づけてデータを取得した。今後、MEAのスパイクやバーストと関連するような特徴量の抽出を進める。

また、使用するヒトiPS細胞由来神経細胞の株間差も重要な課題である。本研究においては国際バリデーションが進められているNeucyteを利用したが、株間差、ラットとヒトの種差はExcitatory neuronとInhibitory neuronの比率(E/Iバランス)の違いだけでは説明できていないことから、株間差を克服できる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。また、今回は限られた化学物質を用いて機械学習の検討を進めたが、さらに化学物質を増やしてモデルの妥当性などを検証する必要があると考えられる。

OECDのDNT-IVBガイドランス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6版(富士フィルムCDI, Emulate)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.)。その結果、2施設(名市大と国立衛研)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る。今後、MEAシステムとBBBの統合へ向け、BBB共存によりMEAデータが受ける影響、また化学物質がBBBのバリア機能に与える影響を検証する。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ことから、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、ミクログリアといった細胞をセルカルチャーインサート上で培養する系を構築し、神経毒性を総合的に評価できる系の確立を目指す。

化学物質の構造情報の活用によって、in vivo発達神経毒性の予測性の向上が期待されることから、OECDにおける発達神経毒性評価の段階的アプローチでも、Tier 0としてin silico手法の活用が議論されている。しかし具体的なアプローチの検討は未だなされていないことから、本研究では分子記述子を用いたクラスターリング及びリードアクロス手法を開発した。類似性評価及び毒性判定に関する条件検討を行い、予測精度を向上する条件を見出したが、用いたデータセットの発達神経毒性情報の不確実性を改善する必要があることが示唆された。引き続き、in vivoのデータを収集しながら、検討する必要がある。

イミダクロプリドは発達神経毒性の陽性対照化合物であるが、DNT-IVBでは毒性を検出できていない。今回、イミダクロプリドの作用点として海馬歯状回の神経新生、神経炎症が示されたことから、ヒト神経幹細胞の増殖やミクログリアなどを用いて毒性を検討することにより、DNT-IVBに貢献することが期待される。

化学構造によるin silico予測とMEAデータから発達神経毒性陽性の可能性が示唆された物質について文献検索を実施したところ、海外評価機関における発達神経毒性陽性の試験報告を見出した。in silico及び

in vitroの統合的アプローチにより、in vivo発達神経毒性の予測精度が向上することが示唆された。

以上のように、研究班全体で連携して神経毒性評価法の開発を進めており、順調に進展している。

E. 結論

本研究において、MEAを用いた神経ネットワーク解析法のAIによる予測モデルを構築した。これにより、in vitro神経毒性評価の予測性向上が期待される。今後、BBBとMEAを連結した生体模倣システムの開発を進め、キネティクスを反映した新たなin vitro試験法を構築する。さらに、化学構造に基づくin silico予測とin vitroデータを統合的に活用することにより、in vivo発達神経毒性の予測性が向上することが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究班全体として、以下の通り積極的に研究発表を行った。

1. 論文発表

7件

2. 学会発表

国内学会 18 件、国際学会 3 件

H. 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