

毒性・安全性評価法および創薬スクリーニング法への応用を目指して

東北工業大学 大学院工学研究科 電子工学専攻 准教授
鈴木 郁郎

はじめに

ヒト iPS 細胞由来ニューロンは、ヒト iPS 細胞の大量培養法や各種細胞への分化技術の発展により、再生医療への展開のみならず、ヒト細胞を用いた疾患メカニズムの解明や創薬開発への応用が期待されている。ヒト iPS 細胞から分化させた神経系においても、各種正常ニューロンやグリア細胞、およびアルツハイマー病、パーキンソン病、てんかんなどの患者由来の疾患神経細胞の作製が進み、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを販売する企業も増え、クオリティの高い細胞を供給する競争が激化している。創薬分野におけるヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた毒性・安全性評価法および創薬スクリーニング法は、従来の動物実験の代替のみならず、ヒトと実験動物の種差による問題を解決できる可能性があること、疾患細胞種に対してアプローチが可能であることなどから、その確立が期待されている。ヒト iPS 細胞由来ニューロンの毒性・安全性評価法への展開において重要な点は、培養した神経ネットワークが目的とするイオンチャンネル等を発現し、シナプス結合を介した電気活動において発現したイオンチャンネル

が機能的に働いている状態をつくり出すことである。また、実用化へ展開する上では、短い培養期間で、機能的な神経ネットワークを培養できることも重要となる¹⁾。上記の観点を満たす、XCell Neuron の電気活動特性について記載する。

方法および材料

細胞は、XCell Neuron (XCS-XN-001-1V, XCell Science) および XCell Mature Astrocyte (XCS-AR-001-1V, XCell Science) を用いた。培養した神経ネットワークの電気活動を計測する為に、細胞外電位計測法である平面微小電極アレイ (MEA) を用いた。平面微小電極アレイは、数 10 μm の微小電極がアレイ化された基板上に神経細胞を培養して、神経細胞が行う電気活動を細胞外で取得する仕組みである。非侵襲計測である故に長期間の細胞活動のモニタリングが可能であり、多点計測である故に細胞ネットワークの活動解析が可能である特徴を持つ。平面微小電極アレイ (MED-P515A、MED-P5NF30、Alpha Med Scientific) 上に、XCell Neuron を 3.0×10^5 cells/cm² の細胞密度で播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO₂ イ

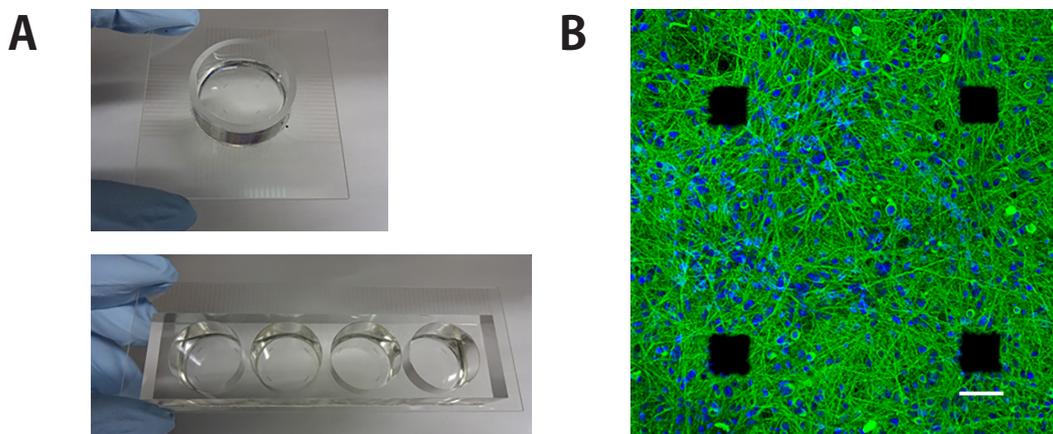


図 1 平面微小電極アレイ上での XCell Neuron の培養 (BrainPhys)

(A) 平面微小電極アレイチップ。

(B) 培養 35 日目 (培養 8 日目以降は BrainPhys で培養) の免疫染色画像。細胞接着良好、クラumping無し。

緑 : β -Tubulin III。青 : Hoechst 33258。Scale bar: 50 μm

ンキュベータ下で培養した。培養 8 日目に培地 (XCS-NM-001-M250, XCell Science) から神経活動をより良くサポートする BrainPhys (ST-05792, STEMCELL Technologies)²⁾ に全量交換した。また、アストロサイトとの共培養による効果³⁾ を調べる為に、XCell Mature Astrocyte を 1.0×10^5 cells/well の密度で追加播種したサンプルも準備し、培養 2 週目から平面微小電極アレイ計測システム (MED64-Basic, Alpha Med Scientific) を用いて自発活動を記録した。イオンチャンネルの機能的な働きを調べる為に、各種疾患に関連する NMDA 型グルタミン酸受容体に着目し、人工脳脊髄液 (ACSF) に置換後、 Mg^{2+} の濃度を変化させて自発活動を記録した。薬剤応答の一例として、活動電位の頻度を調整する K^+ チャンネルの阻害剤である 4-Aminopyridine (4-AP) を容量依存的に加え、活動頻度の変化を記録した。

結果

1. 自発活動の経時変化

図 1 は、MEA 上で培養した 35 日目の免疫染色画像である。ニューロンが突起を伸長させ、密にネットワークを形成している様子が認められた。ニューロンのみ、アストロサイトとの共培養条件下で自発活動を計測したところ、共に、培養 2 週間目から自発活動が観察され、培養日数と共に発火頻度が上昇する様子が観察された。図 2 は、培養 6 週目のニューロンのみ、アストロサイト共培養サンプルにおける自発活動の

ラスタープロット (64 電極、15 分間) の一例である。ニューロンのみ、アストロサイト共培養共に、シナプス伝播による同期バースト発火が検出された。アストロサイト共培養は培養 5 週目、ニューロンのみは培養 6 週目から同期バースト発火が観察された。同期バースト発火の出現は、形成したシナプスの成熟化指標の一つである為、比較的早期に機能的な神経ネットワークが形成されていると言える。また、ラスタープロットから見て取れるように、発火数、同期バーストの頻度およびバースト内の発火数は、ニューロンの方に比べて、アストロサイト共培養の方が高く、電気活動が活性化されていることがわかった。

2. NMDA 型グルタミン酸受容体の機能確認

NMDA 型グルタミン酸受容体の応答が検出できるかは、神経ネットワークの成熟化の指標となると共に、中枢神経系の薬理試験を行う上で極めて重要である。NMDA 型グルタミン酸受容体の応答を電気活動として検出できるかを調べる為に、ACSF Mg^{2+} free 条件下で自発活動を記録し、その後、阻害剤である AP-5 $25 \mu M$ を投与した。図 3 が示すように、ACSF Mg^{2+} free 条件下で、ニューロンのみ、アストロサイト共培養共に顕著な同期バースト発火が観察され、AP-5 $25 \mu M$ 投与において、同期バースト発火は消失した。このことから、同期バースト発火は NMDA 型グルタミン酸受容体の活動によって発生していること、および培養 6 週目において NMDA 型グルタミン酸受容体の応答を検出できることがわかった。

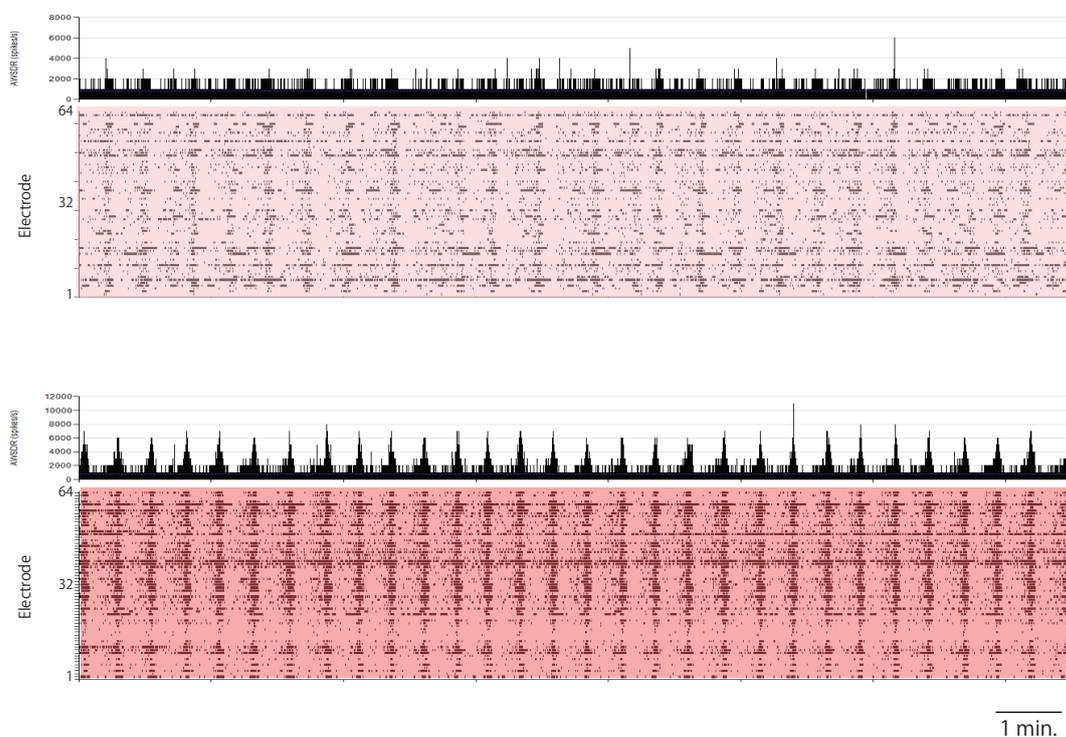


図 2 培養 6 週目の自発活動のラスタープロット ※ BrainPhys 培養 34 日目
(A) ニューロンのみ。(B) アストロサイト共培養。

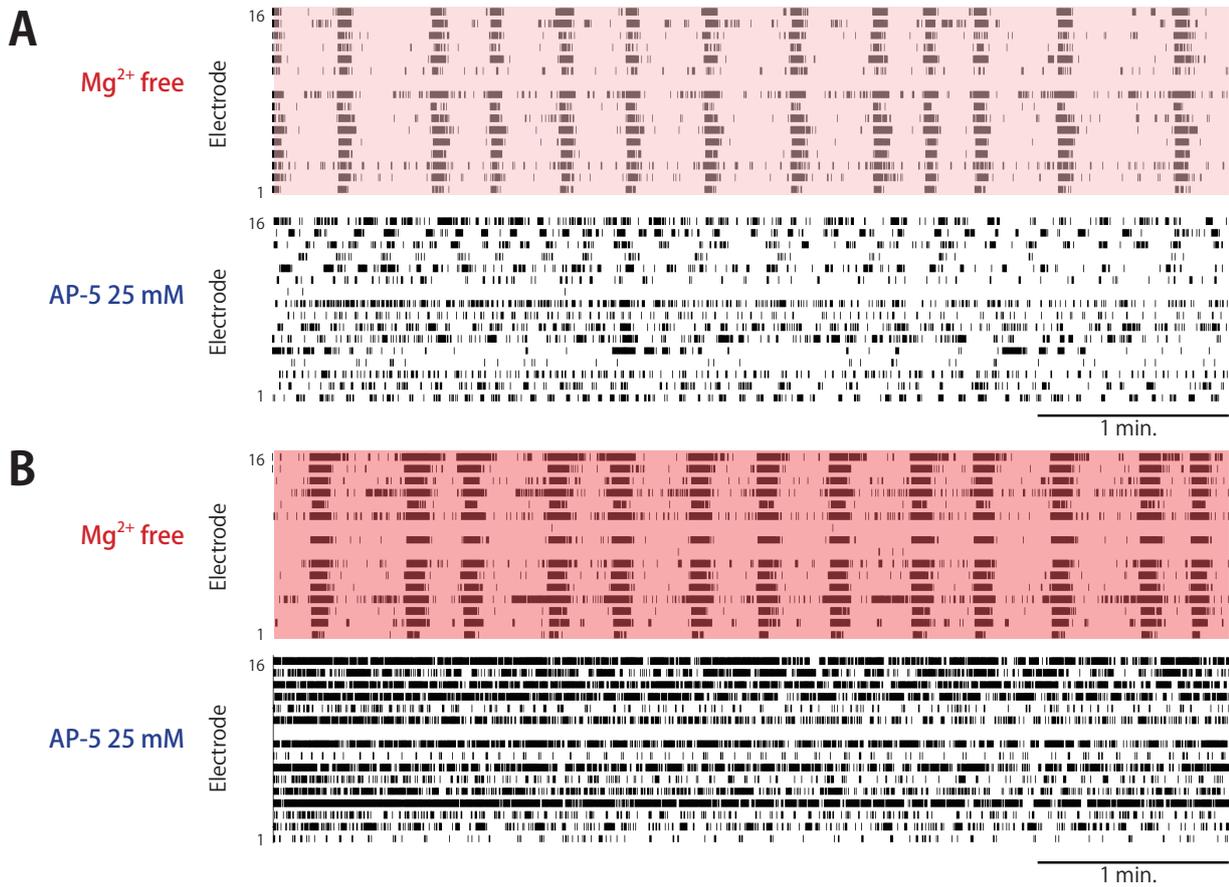


図3 NMDA型グルタミン酸受容体の応答 ※ BrainPhys 培養 34 日目

- (A) ニューロンだけのサンプル (培養 6 週目) における ACSF Mg²⁺ free 時 (上段) と AP-5 25 μM 投与時 (下段) の自発活動のラスタプロット
- (B) アストロサイト共培養サンプル (培養 6 週目) における ACSF Mg²⁺ free 時 (上段) と AP-5 25 μM 投与時 (下段) の自発活動のラスタプロット

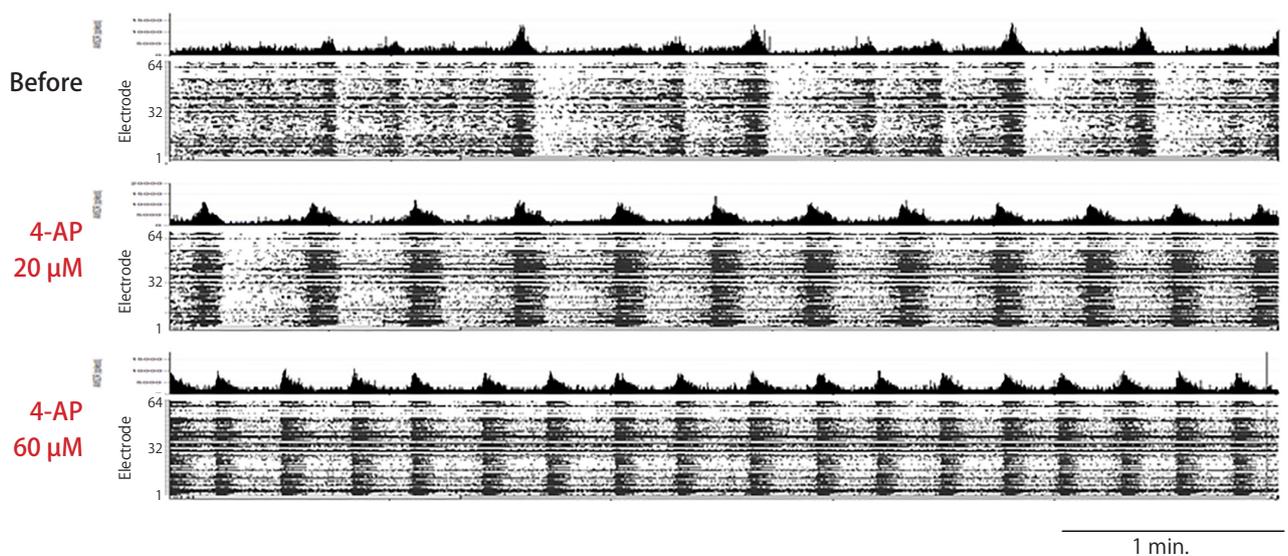


図4 4-AP 投与による応答 ※ BrainPhys 培養 34 日目

投与前、4-AP 20 μM、60 μM 投与時における自発活動 5 分間のラスタプロット



3. 4-AP 投与に対する応答

薬剤の応答性を見る為に、K⁺チャンネルの阻害剤である4-APを20 μM、60 μM投与し、自発活動の変化を検出した。図4は、投与前、4-AP 20 μM、60 μM投与時の5分間のラスタプロットを示している。4-APの容量依存的に、同期バーストの発生頻度の上昇が観察され、痙攣誘発物質として知られている4-APの効果が検出された。その他、GABA-A受容体、カイニン酸型グルタミン受容体等に対する薬効も顕著に検出されており、XCell Neuronを用いて薬効評価できることが示唆された。

結論

XCell Neuronは、培養6週目で機能的なシナプス形成がされ、各種イオンチャンネルに対する薬剤応答が検出できる為、ヒトiPS細胞由来ニューロンの毒性・安全性試験および創薬スクリーニング等に適していると言える。

参考文献

1. Odawara, A., Katoh, H., Matsuda N. and Suzuki, I.. Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture. *Scientific Reports*, 6: 26181: 1-14, 2016.
2. Bardy C, *et al.* Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proc Natl Acad Sci*. 112 (20): E2725-34, 2015.
3. Odawara, A., Saitoh, Y., Alhebshi, AH., Gotoh, M. and Suzuki, I.. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response in human induced pluripotent stem cell derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 24; 443(4): 1176-81, 2014.

製品のご案内：

XCell Science 社 ヒト iPS 細胞由来神経細胞



細胞

商品コード	商品名	梱包単位
XCS-XN-001-1V	Neurons	1 vial*
XCS-AR-001-1V	Astrocytes (Mature)	1 vial*

* 細胞数：1 × 10⁶ cells/vial 以上

専用培地

商品コード	商品名	梱包単位
XCS-NM-001-M250	Neuron Maturation Medium 250mL kit	1 kit (250 mL)
XCS-AM-001-M250	ASTRO Maturation Medium 250mL kit	1 kit (250 mL)

STEMCELL Technologies 社 神経生理学用 無血清培地 「BrainPhys」



商品コード	商品名	梱包単位
ST-05792	BrainPhys Neuronal Medium and SM1 kit	1 kit
ST-05791	BrainPhys Without Phenol Red	500 mL

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14
住友東新橋ビル3号館5階
TEL.03-5776-0078(代) FAX.03-5776-0076
E-mail: veritas@veritastk.co.jp
<http://www.veritastk.co.jp/>