

ヒト iPS 細胞由来中枢神経モデルを用いた 医薬品候補化合物の痙攣毒性評価系の構築 (Development of a seizure assessment system for drug candidate compounds using a human iPS cell-derived central nervous system model)

横井 れみ (Remi Yokoi)

The purpose of this study was to develop a seizure assessment system of drug candidate compounds through micro electrode array (MEA) measurements using a human induced pluripotent stem cell (hiPSC) model of the central nervous system. We evaluated the response of seizurogenic compounds depending on the balance of excitatory/inhibitory neurons (E/I balance) in hiPSC-derived neural networks, constructed an MEA measurement method for human cerebral organoids, and evaluated the response of Dravet syndrome (DS) cerebral organoids to contraindicated drugs. In planar culture, we showed that the E/I balance closest to the biological balance was the most suitable for detection of concentration-dependent changes and classification of the Mechanism of Action of seizurogenic compounds. In MEA measurements of human cerebral organoids, we revealed that frequency analysis below 500 Hz is effective in assessing seizure toxicity. DS organoids administered with the contraindicated drugs exhibited a response similar to contraindicated drugs, with an increase in oscillation frequency while maintaining oscillation intensity. The frequency characteristics of spontaneous firings and AEDs responsiveness in DS organoids demonstrated partial correlation with typical electroencephalography patterns observed in vivo. In this study, we identified the optimal planar culture conditions for human iPSC-derived neural networks and assessed the effectiveness of a low-frequency analysis method for cerebral organoids. Furthermore, we developed a seizure assessment system for drug candidate compounds using DS cerebral organoids.

1. はじめに

脳神経細胞は、主に興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの2種類に分類される。我々の脳神経ネットワーク活動は、興奮性と抑制性ニューロンの入力バランス (E/I バランス) により制御されている。医薬品における深刻な副作用である痙攣毒性や、神経疾患で見られるてんかん発作は、脳内の E/I バランスの乱れが原因の一つであると考えられている。

医薬品候補化合物の痙攣毒性を高精度に予測可能な *in vitro* 評価系の構築が求められている。従来の痙攣毒性評価は、動物に化合物を投与する大掛かりな実験で行われていた。しかしながら、スループット性が低く、膨大な時間とコストが掛かかる、痙攣前兆の用量同定が難しい、ヒト外挿性や、疾患患者に対する毒性評価も困難であるなどの問題があった。近年、近代化法

2.0 の制定をはじめとする動物実験代替の世界的な潮流とヒトへの外挿性への期待から、医薬品開発の前臨床試験においてもヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSC) の利用が期待されている。

ヒト iPSC 由来ニューロンを用いた電気生理学的機能計測では、パッチクランプ法や、カルシウムイメージング法、平面微小電極アレイ (micro electrode array; MEA) による細胞外記録法などの手法が用いられている。MEA 法は、基板上に培養した細胞の電気活動を非侵襲に計測することができる手法である。非侵襲計測であるため、長期間の電気活動計測が可能となる。さらに、時間分解能が高く、多点同時計測により、神経ネットワーク活動の評価が可能である。我々は、この MEA 計測法で、iPS 神経ネットワークの痙攣陽性化合物の応答の検出や、抗てん

かん薬の副作用の検出を行ってきた。

痙攣現象は、大脳皮質の E/I バランスの乱れにより生じる為、化合物の毒性評価を行う際には、評価サンプルの E/I バランスが大変重要であるが、痙攣毒性を検出するために最適な E/I バランスは同定されていない。より精度の高い痙攣毒性評価系の構築には、痙攣毒性検出に最適なサンプル条件の同定が必要である。

痙攣毒性評価において、*in vitro* の知見から *in vivo* の現象を再現、予測する *in vitro to in vivo extrapolation* が重要なアプローチとなっている。その一つとして、三次元脳オルガノイドの応用が期待されている。ヒト脳オルガノイドは、初期の胚及び胎児の脳の発達を反映し、ヒト神経疾患を再現可能な高度な *in vitro* モデルである。現在、形態評価や遺伝子発現といったオルガノイド作製自体の評価が主であり、脳オルガノイドの電気活動特性を見出す有効な評価法は確立していない。

また、疾患患者を対象とした化合物の痙攣毒性評価も重要な課題となっている。難治性てんかん患者においては、抗てんかん薬投与によって痙攣を誘発することが知られており、禁忌薬の評価が *in vitro* で可能になれば、疾患患者に対する化合物の毒性予測が可能となる。

このような背景の元、本博士論文では、ヒト iPSC 由来中枢神経モデルを用いた医薬品候補化合物の痙攣毒性評価系の構築を目的として、はじめに、二次元培養におけるヒト iPS 神経ネットワークの痙攣毒性評価に最適な E/I バランスについて論じる。次に、*in vivo* 外挿性へのアプローチとして、ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築を論じる。最後に、ドラバ症候群患者由来 iPSC から作製した疾患脳オルガノイドの禁忌薬に対する応答について論じる。

2. ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンのバランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

二次元培養におけるヒト iPS 神経ネットワークの痙攣毒性評価に最適な E/I バランスを調べるために、グルタミン酸作動性ニューロンと GABA 作動性ニューロンの比率が、100 : 0、75 : 25、50 : 50、25 : 75、0 : 100 の 5 つの神経ネットワークを MEA 上に構築した。培養 4 か月の免疫化学染色画像から培養サンプルの実際の E/I バランスを算出したところ、100 : 0 は、88:12 (GABA12)、75 : 25 は 84:16 (GABA16)、50:50 は 74:26 (GABA26)、25:75 は 58:42 (GABA42)、0:100 は 48:52 (GABA52) であった (Fig. 2-1B)。

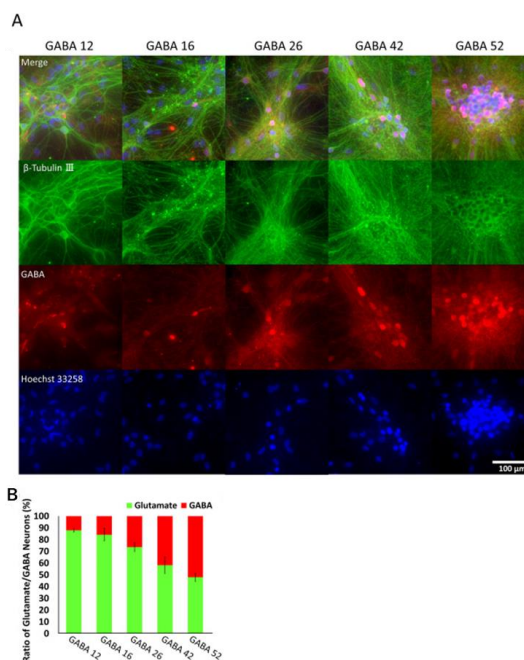


Figure 2-1. ヒト iPSC 由来大脳皮質ニューロンの E/I バランス.

(A) E/I バランスが異なる 5 種類のヒト iPSC 由来神経ネットワーク. β -tubulin III (緑), GABA (赤), Hoechst 33258 (青). Scale bars=100 μ m. (B) 各神経ネットワークにおけるグルタミン酸作動性ニューロンと GABA 作動性ニューロンの比率.

作用機序の異なる 6 種の代表的な痙攣陽性化合物 (picrotoxin, CGP 35348, chlorpromazine, strychnine, 4-Aminopyridine, pilocarpine) に対する応答を、6 つの解析パラメータ用いて評価した。抑制性ニューロンの割合が最も高い GABA52 のサンプルが全ての化合物に対して高い応答性を示した。また、有意差を示した解析パラメータは E/I バランスに依存していたことから、化合物の有効性を評価するためには、それぞれの E/I バランスに適した解析パラメータを選出する必要があることが示された。作用機序 (mechanism of action; MoA) により化合物応答を分類するためにクラスタリング分析を行った。生体脳の E/I バランスに最も近い GABA16 は、全ての痙攣陽性化合物がそれぞれ別のクラスターに分類された。さらに、GABA 受容体に作用する picrotoxin, CGP 35348, chlorpromazine のクラスターは互いに隣接していた。一方で、痙攣陽性化合物に対する応答性が最も高かった GABA52 では、chlorpromazine と strychnine のみが MoA によって分類された (Fig. 2-3B)。痙攣陽性化合物に対する高い化合物応答性が MoA による分類を妨げたと考えられる。本研究結果は、生体脳の E/I バランスに

最も近いGABA16が痙攣陽性化合物のMoAの分離において最も優れていることを示した。さらに、GABA16は、他のE/I バランスと異なり、低用量の応答が単一のクラスターに分類された。この結果は、毒性用量を検出できる可能性を示しており、GABA16が化合物の痙攣傾向の強さを決定できる比率であることが示唆された。以上から、生体脳のバランスに最も近い GABA16 のサンプルが、痙攣毒性検出及び作用機序予測に最適であることが分かった。

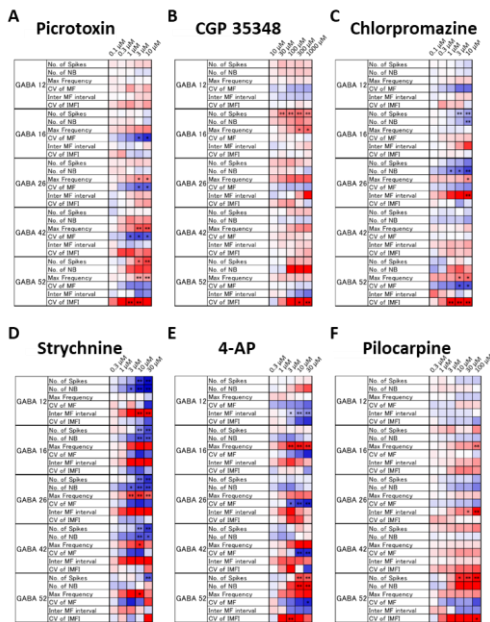


Figure 2-2. E/I バランスに依存した化合物応答.

(A) Picrotoxin. (B) CGP 35348. (C) Chlorpromazine. (D) Strychnine. (E) 4-AP. (F) Pilocarpine.

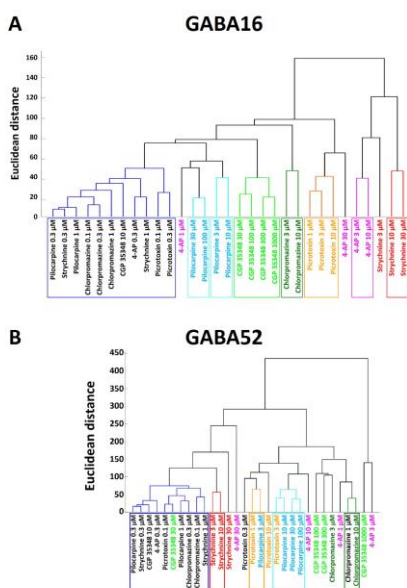


Figure 2-3. クラスタリング解析結果. (A) GABA16. (B) GABA52. Picrotoxin: オレン

ジ, CGP 35348: 黄, 4-AP: ピンク, Pilocarpine; 水色, Chlorpromazine: 緑, Strychnine: 赤.

3. ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

理化学研究所から取得した健常者由来ヒト iPS 細胞 (201B7) から大脳皮質オルガノイドを作製した。培養 4 か月のサンプルの免疫化学染色の結果、ニューロンマーカーである β -Tubulin III および大脳皮質のマーカーである CTIP2 の発現が確認された (Fig. 3-A1)。

培養 4 か月の脳オルガノイドを MEA 上にマウントし、GABA_A 受容体阻害を主作用に持つ Pentylentetrazol (PTZ) の投与試験を行った。PTZ の用量が増加するにつれて、突如発火した活動が持続する現象が一部のオルガノイドでみられた [Fig. 3-1B(a)]。これは、二次元培養系では見られない特徴的な応答である。二次元培養系で行われているスパイク解析を行うと、PTZ による用量依存的な活動の増加が見られた [Fig. 3-1B(b)] が、振幅の変化や、発火が連続する脳オルガノイド特異的な応答は検出できなかった。

オルガノイド特異的な応答を検出するため、500 Hz 以下の低周波解析を行った。まず、0.3 Hz から 9Hz 帯のウェーブレット変換を行った。Vehicle や低用量では、強い周波数成分が離散的であったが、1 mM 以上で 1 Hz 近傍に強い周波数成分が持続的に観察された [Fig. 3-2A]。個々のオシレーション波形の周波数強度分析 (4 Hz-250 Hz) では、60Hz から、250Hz 帯の強度が 1mM を境に上昇している様子が観察された [Fig. 3-2B(b)]。これらの結果から、脳オルガノイドの MEA 計測および痙攣毒性評価において、低周波解析が有効であることを見出した。

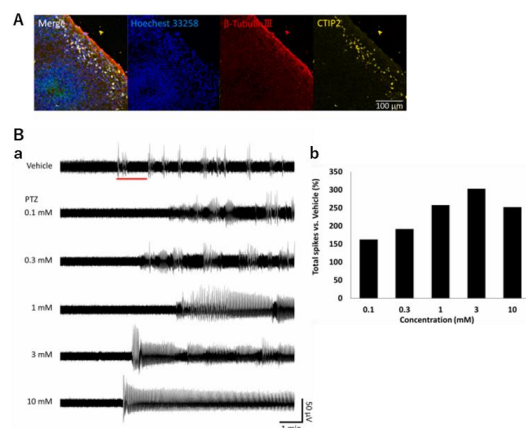


Figure 3-1. 培養 4 か月目の脳オルガノイドにおける PTZ 投与時の MEA 計測.

(A)培養4か月のヒトiPSC由来脳オルガノイドの免疫化学染色画像. Hoechst 33258(青), β -tubulin III(赤), CTIP2(黄). (B)PTZに対する応答. (a)PTZ投与後10分間の自発活動. (b)スパイク数の変化.

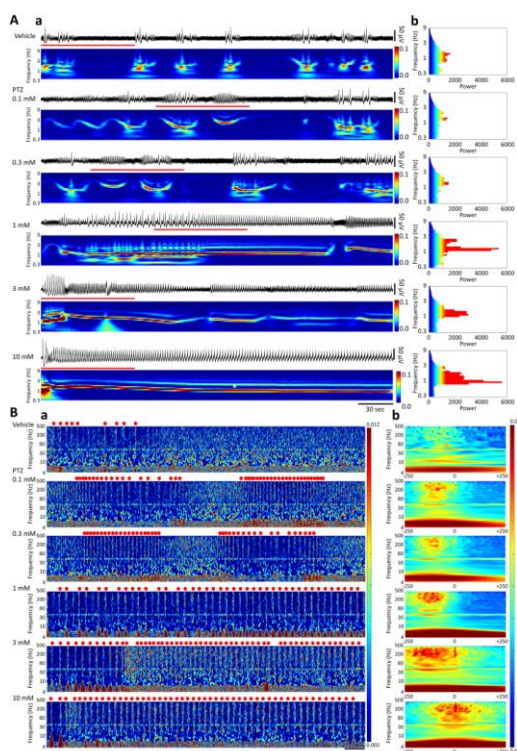


Figure 3-2. PTZ 投与時の 500 Hz 未満の周波数成分.

(A)投与後5分間の周波数分析. (a)5分間の自発活動生波形と0.3~9 Hzのスカログラム. (b)0.3~9 Hzの周波数パワーのヒストグラム. (B)(a)Fig. 3-2A(a)赤線部分の80秒間のスカログラム. 赤い点はオシレーションを示す. (b)検出したオシレーションごとの周波数パワーの平均値. オシレーションのピーク検出時間の ± 250 msのスカログラム.

4. 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした医薬品の痙攣毒性評価

疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした医薬品の痙攣毒性評価の可能性を示すことを目的とした。ドラベ症候群(DS)は、乳幼児期に発生する難治性てんかんであり、患者の約70%でSCN1Aの遺伝子発現異常によりGABA作動性ニューロンのNav1.1の発現が減少し、発作が引き起こされることが報告されている。ドラベ症候群は、 Na^+ チャネルをブロックするcarbamazepine(CBZ)やphenytoin(PHT)は発作が悪化する可能性があるため、禁忌薬とされている。DSの治療では、GABA作動性ニューロンの活動の増強、 Ca^{2+} チャネルのブロックを主作用

に持つsodium valproate(VPA)やclobazamが第一選択薬として使用されている。本研究では、DS脳オルガノイドの禁忌薬に対する応答評価を行った。

培養8か月のDS脳オルガノイドの免疫化学染色を行ったところ、ニューロンマーカーである β -Tubulin IIIの発現および大脳皮質のマーカーであるCTIP2のマーカーが確認された(Fig. 4-1A)。作製した脳オルガノイドにCBZ、PHT、VPAを投与し、MEA計測で得られた電気活動波形からオシレーションの頻度とピーク電圧値を解析した。CBZ投与では、100 μM 投与時に、オシレーション頻度が健常(control)では減少したが、DSでは増加した。また、DSでは、振幅を維持したままオシレーション頻度が上昇した(Fig. 4-1A)。PHT 300 μM 時、controlでは、オシレーション頻度の上昇と共にピーク電圧が顕著に減少したが、DSでは振幅を維持したままオシレーション頻度が上昇した(Fig. 4-1B)。治療薬であるVPA投与では、controlとDSの応答に有意な差は見られなかった(Fig. 4-1C)。禁忌薬であるCBZとPHTでは、オシレーション強度を維持したまま頻度が上昇するという禁忌薬の応答を示した。一方、治療薬であるVPAでは、controlとDSは同じ傾向の応答を示した。

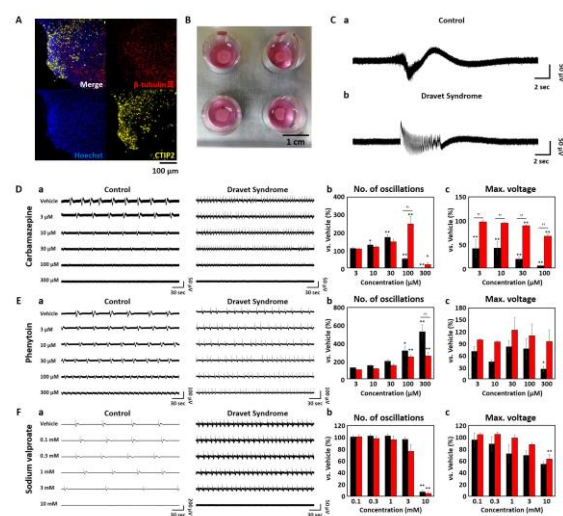


Figure 4-1. DS と control オルガノイドの抗てんかん薬に対する応答.

(A)培養8か月の脳オルガノイドの免疫化学染色画像. β -tubulin III(赤), CTIP2(黄), Hoechst 33258(青). Scale bar=100 μm . (B)MEA上にマウントされたDS脳オルガノイド. (C)典型的なオシレーション波形. (a)Control. (b)DS. 抗てんかん薬投与後5分間の活動波形とオシレーション頻度とMax. voltageの変化. 検定はone-way ANOVAとHolm-Bonferroni法を用いて行われた. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle,

†† $p < 0.01$). Control(黒).DS(赤).
 (D) Carbamazepine. (E) Phenytoin.
 (F) Sodium valproate.

より詳細な CBZ の応答を調べるために CMOS-MEA を用いて計測を行った。CMOS-MEA は、通常の MEA と比べて非常に高い空間分解能を持ち、計測可能範囲が通常の MEA の約 36 倍であるため、脳オルガノイド全体の詳細な活動を解析可能である。CBZ 投与により、アクティブ電極数が増加した[Fig. 4-2B(a)]し、オシレーションに参加していない電極数の割合も増加した[Fig. 4-2B(b)]。CBZ による活動の上昇は、オシレーション以外の活動の増強であると考えられる。DS のマウスモデルの ECoG では、CBZ により、発作時以外でスパイク数の増加が報告されている。本研究で見られたオシレーション以外の活動の増加は、生体マウスモデルで見られた現象を反映している可能性がある。

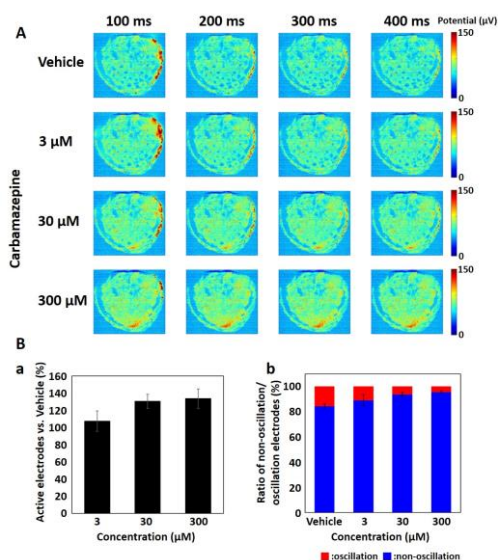


Figure 4-2 CMOS MEA を用いた DS 脳オルガノイドの carbamazepine に対する応答。
 (A) 用量依存的な電圧ヒートマップ。(B) (a) アクティブ電極数。(b) アクティブ電極数中のオシレーション電極と非オシレーション電極の割合。
 Oscillation(赤). Non-oscillation(青)。

次に、DS 脳オルガノイド周波数特性を調べた。delta 波 (0.5-3Hz)、theta 波 (4-7 Hz)、alpha 波 (8-11 Hz)、beta 波 (12-29 Hz)、gamma 波 (30-100 Hz)、high-gamma 波 (100-150 Hz) の周波数解析を行った。DS は、control と比較して theta 波、alpha 波、beta 波のパワーが強く、delta 波、gamma 波、High-gamma 波帯のパワーが弱かった (Fig. 4-3)。DS 患者の発作外の脳波

は、健常者と比較して theta 波が強く、alpha 波が弱いことが報告されており、脳オルガノイドで見られた強い theta 波成分の結果と一部一致していた。また、パターン刺激により発作が誘発された患者で theta 波と beta 波の混合波がみられるという報告がある。DS オルガノイドで見られた強い theta 波と beta 波成分は、発作と関連している可能性がある。DS 患者は、音刺激で誘発される gamma 波帯の活動が健常者と比較して弱いことが報告されている。オルガノイドでは、外部刺激はなかったものの、gamma 波帯の成分が弱かったことから、生体での gamma 波成分の生成能力が弱いことを反映している可能性が考えられる。以上から、DS 脳オルガノイドの自発活動の周波数特性は、生体脳波での特徴を一部反映している可能性が示唆された。

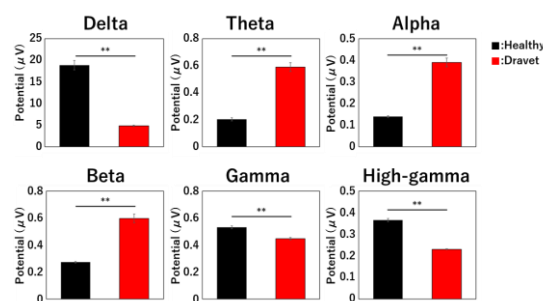


Figure 4-3 脳オルガノイドの自発活動の周波数特性。

Control と DS の各周波数帯のポテンシャルに対し、one-way ANOVA と Holm-Bonferroni 法にて検定を行った (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。Control (黒)。DS (赤)。

抗てんかん薬に対する周波数特性の変化を調べた (Fig. 4-4)。CBZ 投与により、健常者、てんかん患者の両方で alpha 波帯の減少が報告されている。本研究で用いた脳オルガノイドでも alpha 波帯の減少がみられた (Fig. 4-4、左)。てんかん患者への PHT 投与では、delta 波と theta 波帯の増強が報告されている。DS 脳オルガノイドでは、有意差は見られなかったが、delta 波が 30、100 μM で、theta 波が 10~100 μM で上昇した (Fig. 4-4、中央)。この活動の増強は、てんかん患者特有の応答を示している可能性が考えられる。VPA 投与では、健常はすべての周波数帯で、ドラベ症候群では delta から beta 波帯で減少がみられた (Fig. 4-4、右)。てんかん患者への VPA 投与では、主に delta~gamma 波帯の減少が報告されている。DS 群脳オルガノイドでは、gamma 波帯の減少は見られなかったものの、臨床で見られる低周波帯の減少

がみられた。以上から、脳オルガノイドの抗てんかん薬に対する応答は、生体脳で見られる応答を一部反映している可能性が示唆された。

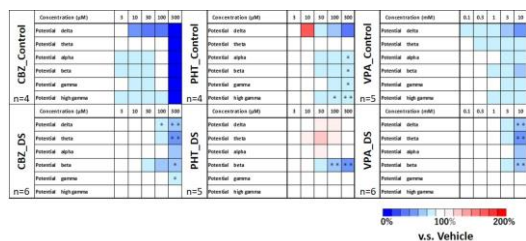


Figure 4-4. 抗てんかん薬に対する周波数ポテンシャルの変化。Control(上段). DS(下段). CBZ:Control n=4, DS n=6, PHT : Control n=4, DS n=5, VPA : Control n=5, DS n=6. 検定は one-way ANOVA と Holm-Bonferroni 法を用いて行われた. (*p < 0.05, **p < 0.01 vs. Vehicle).

DS 脳オルガノイドの MEA 計測により、禁忌薬に対する応答を検出した。また、DS 脳オルガノイドの自発活動では、生体脳波の周波数特性を一部反映していることが示唆された。本研究の結果から、DS 脳オルガノイドの MEA 計測法および周波数解析法は、ドラベ症候群患者に対する医薬品の痙攣毒性評価および創薬開発に有効であることが示唆された。

5. おわりに

本研究では、ヒト iPS 細胞中枢神経モデルを用いた医薬品候補化合物の痙攣毒性評価系の構築を目的として、二次元ヒト iP 神経ネットワークの E/I バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価、三次元ヒト脳オルガノイドの MEA 計測法の構築、ドラベ症候群脳オルガノイドの禁忌薬に対する応答評価を行った。

ヒト iPS 神経ネットワークの E/I バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価では、5 種の E/I バランスの神経ネットワークを構築し、痙攣毒性評価に最適な E/I バランスを検討し、生体の E/I バランスに最も近い GABA16 のサンプルが痙攣毒性予測および作用機序予測に最適であることを見出した。

ヒト脳オルガノイドの MEA 計測において、Pentylentetrazol の応答が、約 1 Hz の周波数成分の持続や、60Hz から 250Hz 帯の周波数成分の増強という低周波帯で検出された。本結果から、脳オルガノイドの MEA 計測および痙攣毒性評価において、低周波解析が有効であることを見出した。

ドラベ症候群 (DS) 脳オルガノイドの禁忌薬に対する評価を行った結果、CBZ と PHT では、オシレーションの振幅を維持したまま頻度が増加する健常とは異なる応答が見られた。CBZ では、生体マウスモデルでの現象を一部反映した応答を検出した。また、DS 脳オルガノイドの自発活動ならびに抗てんかん薬に対する周波数強度特性は、*in vivo* 脳波所見と一部一致していた。DS 脳オルガノイドの MEA 計測により、禁忌薬に対する応答を見出し、生体脳波の周波数特性を一部反映している可能性を見出した。

本研究成果は、前臨床試験における医薬品の痙攣毒性検出の精度向上、疾患患者を対象とした医薬品の安全性評価、至適抗てんかん薬の選定を可能とする個別化医療への応用が期待される。