

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：ヒト iPS 細胞由来神経細胞等を用いた新規 *in vitro* 医薬品安全性評価法の開発
2. 研究開発代表者：氏名 佐藤 薫（国立医薬品食品衛生研究所薬理部）
3. 研究開発の成果

本研究は新薬開発過程において臨床試験の中枢神経系安全性を向上し、開発後期での撤退を回避するために、ヒト iPS 細胞由来神経細胞 (hiPSC-neuron) を用いて予測性の高い *in vitro* 医薬品安全性評価系を開発することを目的とする。

### 認知機能障害リスクの数値化指標確立と *in vitro* 定量的薬理評価法の開発

機能シナプスにクラスタリングするドレブリンをマーカーとして機能シナプスを定量評価する薬理評価法を確立しハイスループット化を進めた。齧歯類培養神経細胞におけるアロプレグナノロンの正の影響を検出した。医薬品を含む陽性、陰性対照テストコンパウンドを用いて予測性を検証した。

### 神経異常活動リスクの数値化指標確立と *in vitro* 定量的薬理評価法の開発

多点電極記録システム (MEA) を用いて、神経異常活動を示す電気信号の数値化と予測性の高いパラメーター評価を行った。医薬品を含む陽性、陰性対照テストコンパウンドの神経異常活動誘発効果を検討したところ、化合物の系統に特徴的な *in vitro* ならではの同期発火パターンが確認できたため、クラスタリングを遂行できた。この評価系で抗てんかん薬の臨床効果も鋭敏に予測できることもわかった。MEA 自動データ解析に応用するためのアプリケーション開発も進んだ。

### 評価に必要な脳機能メカニズムを備えた hiPSC-neuron 等の選抜と機能促進条件の検討

現在入手可能な hiPSC-neuron の中から NMDA 型グルタミン酸受容体が安定発現する hiPSC-neuron を見いだしたが、細胞プロバイダーのプロトコルでは神経回路形成は進まなかった。しかし、齧歯類アストロサイトとの共培養、アストロサイト初代培養上清 (ACM) の共存により自発性興奮応答がバーストスパイクとして同期するようになることを MEA によって見いだした。アストロサイト由来因子を同定するため、マウス ACM を作用させた hiPSC-neuron のマイクロアレイ解析、上流候補因子のリスト化を行った。hiPSC-neuron に GFP を導入し、マウス海馬スライス上に播種して培養することに成功した (スライスオーバーレイ法)。hiPSC-neuron は、海馬中の神経細胞に類似した樹状突起構造を有する細胞へと分化した。分散培養系では脳内の細胞形状を反映する分化は困難であるため、形態パラメーター取得が期待できる。アストロサイト由来因子 X が hiPSC-neuron の突起伸展を促進すること、アストロサイト由来因子 Y が NMDA 型グルタミン酸受容体機能を亢進することを見いだした。

### hiPSC-neuron 等を用いた神経異常活動リスク予測評価法プロトコルの整備

ACM を応用した hiPSC-neuron において、Gabazine (GABA<sub>A</sub> 受容体阻害薬) がてんかん様の同期バースト発火を濃度依存的に誘導することを確認した。すなわち、hiPSC-neuron 等を用いた神経異常活動リスク予測評価法プロトコル提案の可能性が高くなったため、ヒト iPS 細胞応用安全性コンソーシアム (CSAHi) およびその協賛企業と協働し、医薬品を含む陽性対照、陰性対照テストコンパウンドリストを拡充した。現在、プロトコル整備、一般化プロセスに入っている。補強データとして ACM 存在下で培養した hiPSC-neuron のシナプス構造を免疫組織化学的に確認した。評価タイミング判定のための回路成熟マーカー候補も見いだした。

【まとめ】ACM を適用することで、hiPSC-neuron のシナプス成熟、神経回路形成、てんかん誘発剤によるてんかん様同期バースト記録 (MEA) に成功した。hiPSC-neuron を用いた神経異常活動予測リスク評価法プロトコル整備、一般化プロセス開始に至った。グリア由来機能促進因子を同定した。