

令和元年6月7日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15577

研究課題名（和文）薬剤性痙攣を予測可能するヒトiPS細胞由来ニューロンの薬毒性評価系の構築

研究課題名（英文）Development of a toxicological assay for prediction of drug-induced seizure in human iPS cell-derived neurons

研究代表者

小田原 あおい (Odawara, Aoi)

東北大学・材料科学高等研究所・JSPS特別研究員(PD)

研究者番号：80795287

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞由来ニューロンの微小電極アレイ（MEA）計測法を用いた薬剤性痙攣予測法は、ヒト細胞に対する薬剤性痙攣毒性を予測できる可能性を有していることから期待されている評価系の一つである。本研究では、評価系構築に向けた基礎検討を行い、ヒトiPS細胞由来ニューロンの種類、細胞密度、培地条件、アストロサイト共培養条件による自発活動特性と痙攣陽性化合物に対する応答を調べた。培養条件によって応答性が異なること、1つのパラメータでは痙攣様毒性の検出が困難であることがわかった。また、非線形時系列解析法、周波数解析法、AIを用いた同期バースト発火検出法が解析法として有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞由来ニューロンの微小電極アレイ（MEA）計測法を用いた薬剤性痙攣予測法は、国内外で製薬会社も含めた取り組みが行われており、本研究成果は、実用化を推進する成果であり、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Functional evaluation assays using human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons are expected to predict the convulsion toxicity of new drugs. However, culture protocol on the micro-electrode array (MEA) in hiPSC-derived neurons and an evaluation index of MEA data are not well known. In this study, we investigated the difference of spontaneous firings and drug responses depending on the type of human iPS cell-derived neurons, cell density, medium conditions, and astrocyte co-culture conditions. It was found that the responsiveness differs depending on the culture conditions, and that one parameter is difficult to detect seizure-like toxicity. We also show that the synchronized burst firings (SBFs) detection method using AI, nonlinear time series analysis method, and frequency analysis method are effective as analysis method.

研究分野：神経科学

キーワード：ヒトiPS細胞由来ニューロン 平面微小電極アレイ 同期バースト発火 薬効評価 人工知能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞の大量培養法と各細胞への分化技術が発展し、この 10 年間で様々な組織の正常ヒト細胞および疾患細胞の作製が行われてきた。これら作製したヒト細胞の展開は、再生医療のみならず、ヒト疾患メカニズムの解明および創薬スクリーニングや毒性・安全性試験への展開が期待されている。ヒト iPS 細胞から分化させた神経系においても、その需要は非常に高く、国内外でヒト iPS 細胞から作製された各種ニューロンの機能評価が行われている。このような背景の下、申請者は、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした薬効評価系の構築を目指し、2012 年から現在まで研究を遂行してきた。これまでの研究成果を踏まえて、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた薬毒性評価法の構築を更に推し進める。

2. 研究の目的

本研究は、薬剤性突然死の原因の一つである痙攣発火を予測可能とするヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた薬毒性評価系の構築を目的とし、評価系構築に向けた基礎検討を行う。具体的には、痙攣誘発評価に最適な培養・計測条件と既知の痙攣誘発剤に対するヒト iPS 細胞由来ニューロンの応答性を明らかにする。次に、薬剤性痙攣様活動の特性を見出す為に、人工知能解析および発火タイミングの規則性を定量化する非線形時系列データ解析法を検討する。研究項目は、(1) 痙攣誘発評価に最適なヒト iPS 細胞由来ニューロンの培養・計測条件の検討、(2) 既知の痙攣誘発剤に対する濃度依存的なヒト iPS 細胞由来ニューロンの応答検出、(3) 人工知能を用いた同期バースト検出法の開発の検討、(4) 痙攣発火前後の周波数特性解析と発火タイミングの規則性を定量化する非線形時系列解析を実施し、得られたデータを基に、薬剤性痙攣評価に適した培養・計測プロトコルを同定し、痙攣誘発検出に有効な解析法を見出すことを目指した。

3. 研究の方法

(1) 痙攣誘発評価に最適なヒト iPS 細胞由来ニューロンの培養・計測条件の検討

痙攣誘発の評価系を構築する上で基盤となる、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの培養条件に依存した電気活動特性を明らかにする。具体的には、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを平面微小電極アレイに培養し、ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの種類、基板コーティング条件、細胞播種密度、培地条件、グリア細胞との共培養の有無の違いによる自発活動特性を調べる。培養 2 週目から毎週自発活動を記録し、培養日数に依存した発火数の推移、シナプス伝達の指標となる同期バースト発火の発生時期、培養日数に依存した同期バースト発火頻度の推移を調べる。また、計測時の溶液条件として、() 培地、() 人工脳脊髄液 (ACSF) を用いて、培地と ACSF での自発発火特性の違い、ACSF の Mg^{2+} 濃度の違いによる発火特性を明らかにする。次に、上記培養条件において、各種イオンチャネルの応答が検出されるかを調べる。グルタミン酸、GABA 受容体等に関するアンタゴニストおよびアゴニストを投与し、各受容体の機能の有無を評価する。特に、興奮性伝播を担うグルタミン酸受容体である AMPA、NMDA 受容体の明確な応答がそれぞれ検出できるかを確認する。上記の実験により、各種イオンチャネルの応答が検出でき、同期バースト発火が観察される、痙攣評価に最適なヒト iPS 細胞由来ニューロンの培養・計測条件を確立する。

(2) 既知の痙攣誘発剤に対する濃度依存的なヒト iPS 細胞由来ニューロンの応答検出

痙攣誘発が知られている薬剤を作用機序別に投与し、ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおける濃度依存的な応答性を検証する。具体的には、各受容体の拮抗作用を示す薬剤 (GABA 受容体: Pentylentetrazole (PTZ)、Picrotoxin、グリシン受容体: Strychnine、ドパミン D2 受容体: Chlorpromazine、 K^{+} チャネル: 4-Aminopyridine (4-AP)) 等について調べる。企業で開発される薬剤の中には難溶性のものも多く、一般的に DMSO に溶かして薬効を調べる。全ての薬剤は DMSO に溶解すると共に、ネガティブコントロールとして 0.1-0.5%DMSO のみを投与して計測する。各痙攣誘発剤に対して、容量依存的な全発火数の変化、および同期バースト発火頻度を指標として、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの痙攣誘発薬剤に対する応答性を明らかにする。

(3) 人工知能を用いた同期バースト検出法の開発と痙攣誘発前後の波形特性の抽出

ノイズ幅を基とした閾値設定で波形を検出し、同期バースト検出アルゴリズムを構築してきたが、閾値設定の波形検出では正確な同期バースト発火の検出に限界があった。ここでは、人工知能を用いて、正確な同期バースト発火の検出法を検討する。学習時間や正解データの提示法などを繰り返し検討し、正確にバースト発火が検出できる人工知能アルゴリズムを構築する。

(4) 痙攣発火前後の周波数特性解析と発火タイミングの規則性を定量化する非線形時系列解析

痙攣発火前後の同期バースト発火の特徴を検出する為に、同期バーストの周波数解析を行う。FFT とウェーブレット変換等を用いて、周波数成分の強度および時間変化の特性を検出する。次に、全スパイクの発火間隔 (ISI) および同期バースト発火間隔 (IBI: interBurst Interval) の時系列データに内在する規則性を定量的に評価できる Detrended Fluctuation analysis (DFA) 法を用いて、痙攣発火前後の自発活動リズムに内在する規則性を定量化する。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞由来ニューロンを平面微小電極アレイ上に培養し、ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの種類、基板コーティング条件、細胞播種密度、培地条件、グリウ細胞との共培養の有無の違いによる自発活動特性を調べた。培養 2 週目から毎週自発活動を記録し、培養日数に依存した発火数の推移、機能的成熟化の指標となるシナプス伝達による同期バースト発火の発生時期、培養日数に依存した同期バースト発火頻度の推移を調べた結果、1. ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの種類（ベンダー間の違い）によって発火数、同期バースト発生時期、同期バースト発火の頻度が異なること、2. 細胞密度の違いによって発火数や同期バースト発生時期が異なり、 5.0×10^5 cells/cm² 以上の細胞密度が機能的成熟化の促進に必要であること、3. 培地の種類によって同期バースト発生時期が著しく異なること、4. アストロサイト共培養により発火頻度が上昇すること、および同期バースト発火の発生時期が早まること、5. ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの種類によって最適な基板コーティング条件が異なること等を明らかにした。また、同期バースト発火時に、AMPA 受容体と NMDA 受容体の両受容体が働いていること、また GABA 受容体も機能していることを薬理的に確かめた。次に、代表的な痙攣誘発薬剤 10 種類以上を用いて、用量依存的な自発活動の変化を検出した。ネガコンである DMSO と陽性対照化合物の応答は分離されたが、ヒト iPS 細胞由来皮質ニューロンの種類によって、活動状態の変化は異なり、同一の解析パラメータで痙攣誘発の有無を同定することが困難であること、ニューロンの種類によって、痙攣毒性の検出に適した解析パラメータがあることがわかった。また、代謝が関与するような薬剤は、痙攣様の発火が見られない可能性も示唆された。

次に、代表的な痙攣陽性化合物の用量依存的な自発活動データを取得し、解析法を検討とした。発火数や同期バースト発火の特性などの一般的な解析パラメータに加え、株価の変動などの解析に使用されている非線形時系列解析法を神経ネットワークワーク活動の発火タイミングに応用し、自発活動データを定量化した。発火数の増減では検出することのできない、薬剤応答の差異を検出できることがわかった。発火タイミングに着目した定量化指標を従来の解析パラメータに追加することで、薬効評価の精度が向上する可能性が示唆された。また、ウェーブレット変換による周波数解析により、スパイク成分以外の低周波数成分の強度が痙攣陽性化合物の用量依存的に強まる応答や作用機序の異なる薬剤で強度の増強の仕方が異なることがわかった。次に、薬剤応答の解析で最も重要となる同期バースト発火について、同期バースト発火の個数と長さを正確に検出できる人工知能を用いた検出法を検討した。発火状態を AI に学習させるアルゴリズムを構築し、学習させた AI を用いて未学習データの同期バースト発火を検出させたところ、90% 以上の確率で同期バースト発火を検出できた。AI により検出した結果が従来法により検出した教師データよりも正確である可能性がある為、評価手法の検討も必要であることがわかった。改善する必要はあるが AI を用いた同期バースト発火検出法や上記の発火タイミングの規則性を定量化する解析法は、得られたビックデータの迅速な解析および薬効評価精度の向上につながるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Odawara A, Matsuda N, Ishibashi Y, Yokoi R, Suzuki I. Toxicological evaluation of convulsant and anticonvulsant drugs in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks using an MEA system. *Sci Rep*. 2018 Jul 10;8(1):10416. 査読有 DOI : 10.1038/s41598-018-28835-7

Matsuda N, Odawara A, Katoh H, Okuyama N, Yokoi R, Suzuki I, Detection of synchronized burst firing in cultured human induced pluripotent stem cell-derived neurons using a 4-step method. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Mar 4;497(2):612-618. 査読有 DOI : 10.1016/j.bbrc.2018.02.117

Kayama T, Suzuki I, Odawara A, Sasaki T, Ikegaya Y. Temporally coordinated spiking activity of human induced pluripotent stem cell-derived neurons co-cultured with astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495(1):1028-1033. 査読有 DOI : 10.1016/j.bbrc.2017.11.115.

〔学会発表〕(計 3 件)

松田 直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎. ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークを用いた痙攣毒性の AI 予測. 第 18 回 日本再生医療学会総会. 2019 年 3 月 21~23 日. 神戸.

松田 直毅, 小田原あおい, 鈴木郁郎. Assessment of seizure liability in human iPSC-derived neurons using AI. 第 92 回 日本薬理学会年会. 2019 年 3 月 14~16 日. 大阪.

Aoi Odawara, Naoki Matsuda, Ikuro Suzuki. Toxicological evaluation of convulsant and anticonvulsant drugs in human induced pluripotent stem cell derived cortical neuronal

networks using an MEA system. ISSCR 2018. 20-23 June, 2018. Melbourne, Australia.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。