

# *In vitro* 神経機能を指標とした化合物評価法の開発 ( Development of compound assessment method using *in vitro* neuronal function)

石橋 勇人 (Yuto Ishibashi)

Methodical screening of safe and efficient drug candidate compounds is critical for any drug development program. A high throughput and accurate compound evaluation method targeting the central nervous system can be achieved using *in vitro* neural network function. In particular, an evaluation system based on a human-derived neural network that can act as an alternative to animal experiments is desirable in terms of species difference. Microelectrode array (MEA) is one such evaluation system that can measure *in vitro* neural activity; however, studies on compound evaluation criteria and *in vitro* to *in vivo* extrapolation are lacking. In this study, we identified parameters that can remove the effects of solvents from neural activity data obtained using MEA and help in accurate compound evaluation. In addition, we resolved the issue of compound evaluation criteria during MEA assessment using principal component analysis by setting standard deviation of the solvent as an indicator of seizure liability. The assessment of 10 seizurogenic compounds and four negative controls was done using MEA-based co-cultured human induced pluripotent stem cell-derived neurons and astrocytes. In addition, we determined the rat cerebrospinal fluid (CSF) concentration during tremor and convulsion in response to test compound exposure. We verified the *in vitro* to *in vivo* extrapolation viewpoint and the species differences by comparing the concentrations at which seizure liability was detected using the MEA system and the concentration observed in the rat CSF.

## 1. はじめに

医薬品開発では安全性の高い医薬品候補化合物を効率よく選別することが重要である。安全性評価では動物実験により生体内での毒性や副作用が評価されている。中でも中枢神経毒性は、新薬開発の遅れや中止の主要な原因のひとつであり、その主な要因の1つは痙攣毒性である。これらは動物実験と臨床試験における、動物とヒトとの種差が原因のひとつであると考えられる。痙攣発作の評価のために実施された実験では、ラット、ミニブタ、イヌ、霊長類で痙攣薬に対する感度に種差があることが報告されている。種差の観点から動物実験に代替するヒト由来神経ネットワークを用いた *in vitro* 神経機能を指標とした化合物評価法の構築が求められている。*In vitro* 神経機能を計測可能な評価系の中でも MEA は神経ネットワークの電気生理学的活動を非侵襲、長時間分解能、多点同時計測でき、化合物投与による神経ネットワークの活

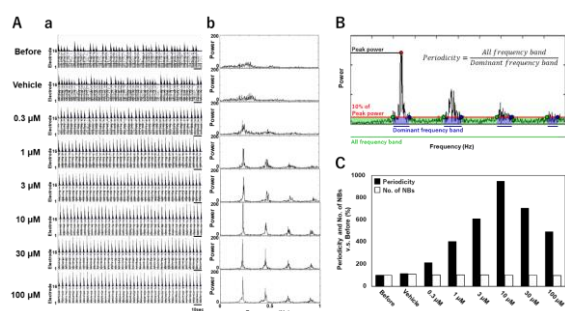
動変化を精度高く、ハイスループットに評価可能である為、動物実験に代替する *in vitro* 神経機能を指標とした化合物評価法として期待されている。これまでの研究により、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測において自発活動や、痙攣薬への応答などの神経ネットワークの評価が報告されている。さらに、MEA を用いた研究は近年さかんに行われており、脳オルガノイドの活動計測の報告や、高密度電極である CMOS-MEA による高解像度計測法が登場し、MEA への期待度は非常に高く、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの MEA 計測法による医薬品の痙攣毒性予測法の構築に向けた取り組みが国内外で動いている。しかしながら、データの取得は可能となったものの、毒性予測の為の解析法が未確立であり、国内外で課題となっている。

そこで本研究では、医薬品開発における安全性評価で動物実験の代替法になり得るような *in*

*in vitro* 神経機能の評価系構築を目的とした。具体的には、*in vitro* MEA データを用いた精度の高い医薬品の痙攣毒性評価をはじめとする化合物評価を実現することを目指し、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物の痙攣リスク評価法を開発し、その評価結果と *in vivo* の評価結果を比較することで *in vitro* to *in vivo* extrapolation (IVIVE) の観点で検証した。また、開発した化合物評価法の医薬品以外への応用性と痙攣リスク以外の有害事象への応用性を検証するために、農薬関連化合物および抗菌薬関連脳症の評価を実施した。

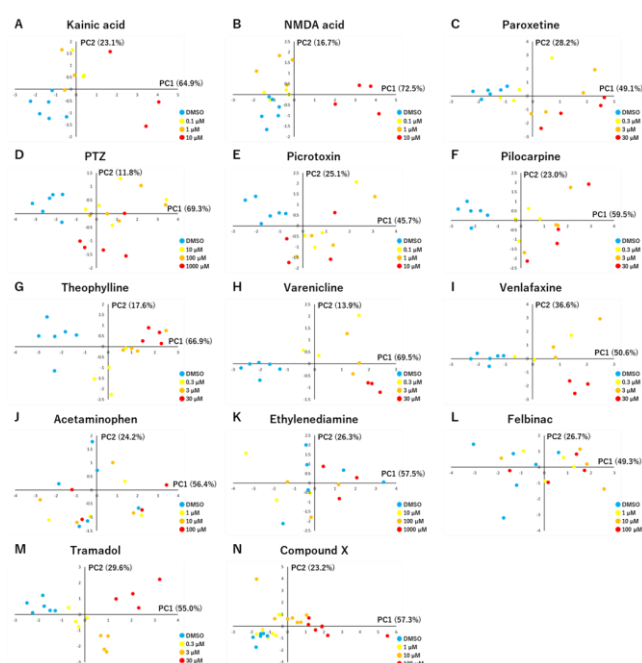
## 2. 主成分分析を用いた医薬品の毒性検出法の開発

MEA システムで計測された神経活動は主に神経ネットワークの同期的な活動である同期バースト発火が評価指標とされ、同期バースト発火の頻度や長さなど、様々な解析パラメータが構築されてきた。しかし、中枢神経毒性を有することが既知であるが、既存の解析パラメータではその毒性を検出できない化合物が存在する問題がある。本研究では、まず MEA システムで計測された神経ネットワークの電気活動における新規解析パラメータとして Network Burst (NB) の周期性を指標とした Periodicity を構築した。臨床で痙攣毒性を有することが既知である Pilocarpine は、既存の解析パラメータではその応答を検出することが困難であったが、新規解析パラメータとして Periodicity を構築することによって用量依存的な応答を評価することが可能となった (Fig. 1)。



**Figure 1 Periodic analysis of network bursts (NBs).** (A) Periodicity of NB in administration of pilocarpine, (a) Raster plots and histograms of detected spikes in administration of pilocarpine, (b) Power spectrum of histograms, (B) Calculation method of periodicity, (C) No. of NBs and periodicity in administration of pilocarpine.

また、どの解析パラメータを評価に用いるかは研究者によって異なっており、毒性評価・作用機序予測に有効とされる統一的な解析パラメータは未だ確立されていないことから、現状では単一の解析パラメータを使用するだけでは作用機序の異なる化合物の毒性を検出することが困難である。本研究では、任意の条件を達成するパラメータセットを探索する多変量解析法を構築することで、Total Spikes、MF、IMFI、CV of IMFI、Periodicity で構成されるパラメータセットが作用機序の異なる痙攣陽性化合物の痙攣毒性を統一的に検出可能であることを見出した。さらに、検証用に用意した既知の痙攣陽性化合物と陰性化合物について、構築した多変量解析法を用いることで、痙攣陽性化合物の毒性検出が可能であることを確認した (Fig. 2)。

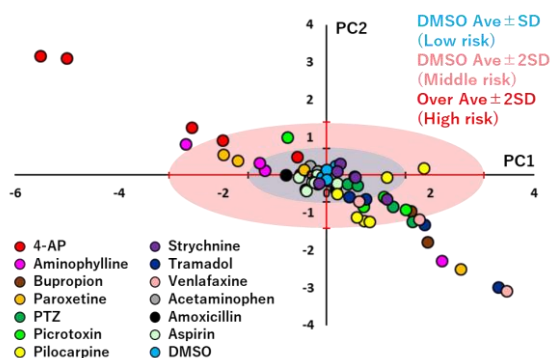


**Figure 2 Scatter plots of principal component analysis (PCA) using effective parameter set for detecting seizure liability.** DMSO (blue), low concentration (yellow), middle concentration (orange), high concentration (red).

本研究で開発した解析法は分野を問わず、様々な解析値に応用可能であり、*in vitro* MEA データのみならず、脳スライスや *in vivo* 脳の電気活動データ、Ca<sup>2+</sup>指示薬や膜電位感受性色素を用いた光イメージング法で取得されたデータにも適用可能である。神経科学領域において、幅広い汎用性を有し、様々な分野の基礎研究および応用研究へと展開できるものである。

### 3. 医薬品の痙攣リスク評価法の開発と IVIVE の検証

生体での毒性発現濃度を予測するためには、MEA 計測における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における CSF 濃度の相関を明らかにする必要がある。本研究の主題である *in vitro* MEA データによる医薬品の痙攣毒性予測と、生体における痙攣発現時の CSF 濃度を比較することによる IVIVE の観点における検証を実施した。これまで MEA と神経細胞を用いた様々な化合物評価が研究されてきたが、MEA 計測における化合物の評価方法は個別の解析パラメータに頼っている。どの解析パラメータに変化が認められたら毒性なのか、どの程度の数値から毒性なのか具体的に定められていないことが課題である。また、神経細胞の MEA 計測では細胞の種類により溶媒の影響を受ける場合があり、化合物を正確に評価するには溶媒の影響を取り除くような解析手法が必要である。本研究では、MEA 計測によって得られた神経活動データから溶媒の影響を除外可能なパラメータセットを導出し、主成分分析において、溶媒の標準偏差を指標とした痙攣リスクの基準を設定することで、MEA 計測における化合物の評価基準および溶媒の影響に対する課題を解決した (Fig. 3)。



**Figure 3 Scatter plots of principal component analysis (PCA) using effective parameter set for remove the effects of DMSO.** By comparing each testing compounds with the standard deviation (SD) of DMSO, we predicted seizure liability in quantitatively scale. Low risk for lower than SD range (blue), medium risk for 2xSD (red), and high risk for over 2xSD. Centroid plots of PC1 and PC2 each concentrations of compounds.

また、MEA と神経細胞を用いた化合物評価では、生体における毒性濃度を特定できないこ

とが重要な課題である。MEA によって検出された神経細胞の活動変化が生体における毒性発現を反映しているかは不明である。より生体での毒性発現濃度を反映させるためには、MEA 計測における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における脳室内濃度の相関を明らかにし、IVIVE の観点を検証する必要がある。本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物の痙攣リスク評価 (Fig. 4) と、動物実験によるラットで振戦および痙攣発作が観察されたときの CSF 内濃度の調査を実施し、MEA 計測で痙攣リスクが検出された濃度と CSF 内濃度を比較することで IVIVE の観点を検証した結果、*in vitro* の毒性評価で *in vivo* と相関のある痙攣リスク評価が可能であることが示唆された (Table 1, Fig. 5)。

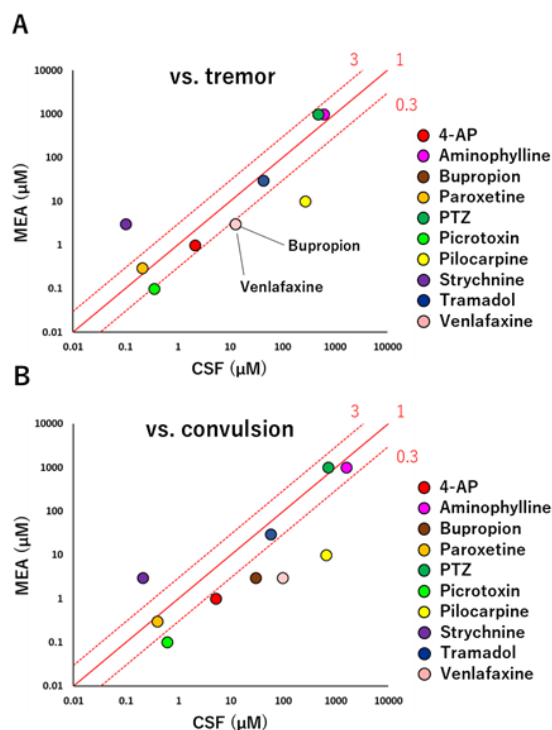
	Concentration					
	I	II	III	IV	V	VI
4-AP	Low risk	Middle risk	High risk	High risk	High risk	High risk
Aminophylline	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Bupropion	Low risk	High risk	High risk	High risk	High risk	High risk
Paroxetine	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
PTZ	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Picrotoxin	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Pilocarpine	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Strychnine	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Tramadol	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Venlafaxine	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Acetaminophen	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Amoxicillin	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
Aspirin	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk
DMSO	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk	Low risk

**Figure 4 Seizure liability risk assessment with the SD of DMSO.** Results of seizure liability risk assessment by PCA. Low risk (blue), middle risk (pink), high risk (red). 4-AP (I: 0.3 μM, II: 1 μM, III: 3 μM, IV: 10 μM, V: 30 μM), aminophylline (I: 100 μM, II: 300 μM, III: 1000 μM, IV: 3000 μM), bupropion (I: 3 μM, II: 10 μM, III: 30 μM), paroxetine (I: 0.1 μM, II: 0.3 μM, III: 1 μM, IV: 3 μM, V: 10 μM), PTZ (I: 30 μM, II: 100 μM, III: 300 μM, IV: 1000 μM, V: 3000 μM), picrotoxin (I: 0.1 μM, II: 0.3 μM, III: 1 μM, IV: 3 μM, V: 10 μM), pilocarpine (I: 3 μM, II: 10 μM, III: 30 μM, IV: 100 μM, V: 300 μM, VI: 1000 μM), strychnine (I: 0.03 μM, II: 0.1 μM, III: 0.3 μM, IV: 1 μM, V: 3 μM), tramadol (I: 3 μM, II: 10 μM, III: 30 μM, IV: 100 μM, V: 300 μM), venlafaxine (I: 3 μM, II: 10 μM, III: 30 μM, IV: 100 μM), acetaminophen (I: 1 μM,

II: 3  $\mu\text{M}$ , III: 10  $\mu\text{M}$ , IV: 30  $\mu\text{M}$ , V: 100  $\mu\text{M}$ , VI: 300  $\mu\text{M}$ ), amoxicillin (I: 1  $\mu\text{M}$ , II: 3  $\mu\text{M}$ , III: 10  $\mu\text{M}$ , IV: 30  $\mu\text{M}$ , V: 100  $\mu\text{M}$ , VI: 300  $\mu\text{M}$ ), aspirin (I: 1  $\mu\text{M}$ , II: 3  $\mu\text{M}$ , III: 10  $\mu\text{M}$ , IV: 30  $\mu\text{M}$ , V: 100  $\mu\text{M}$ , VI: 300  $\mu\text{M}$ ), DMSO (I: 0.2%, II: 0.3%, III: 0.4%, IV: 0.5%, V: 0.6%, VI: 0.7%).

**Table 1 Comparison of *in vivo* rat cerebrospinal fluid concentrations and *in vitro* seizure liability risk-detected concentrations.**

Drugs	Tremor		Convulsion		MEA ( $\mu\text{M}$ )
	CSF	( $\mu\text{M}$ )	CSF	( $\mu\text{M}$ )	
4-AP	2.12		5.13		1
Aminophylline	605.02		1570.83		1000
Bupropion	12.41		29.84		3
Paroxetine	0.21		0.39		0.3
PTZ	468.26		705.65		1000
Picrotoxin	0.35		0.61		0.1
Pilocarpine	266		656		10, 1000
Strychnine	0.10		0.21		3
Tramadol	42.14		56.95		30
Venlafaxine	12.58		95.46		3



**Figure 5 Verification of extrapolation from *in vitro* to *in vivo*.** Correlation between seizure liability risk-detected concentrations in MEA experiments and CSF concentrations. The red line indicates the concentration ratio. At 0.3–3, MEA and CSF are at

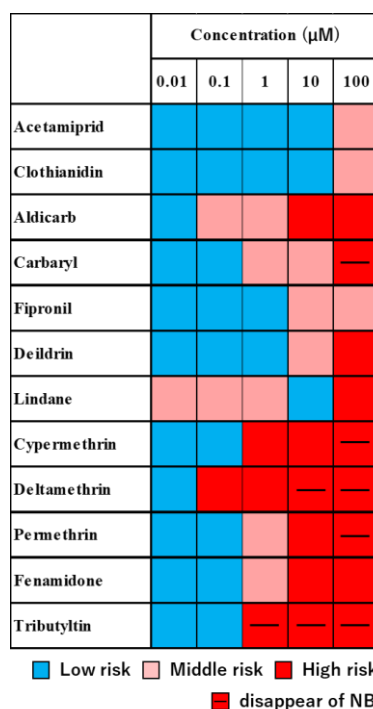
same level concentration.

(A) Correlation between seizure liability risk-detected concentrations in MEA experiments and rat CSF concentrations during tremor.

(B) Correlation between seizure liability risk-detected concentrations in MEA experiments and rat CSF concentrations during convulsion.

#### 4. 農薬関連化合物の毒性リスク評価

本研究で開発した化合物評価法の医薬品以外への応用性を検証するために、農薬関連化合物をターゲットとして毒性リスク評価を実施した。具体的には、毒性リスク評価を行う解析法の検証として痙攣陽性化合物 5 種類を用いて毒性リスク推定の妥当性を検証し、新たに被験物質として農薬関連化合物のデータを取得し、毒性リスク推定を実施することで医薬品以外の化合物の評価法としての有効性を確かめた。開発した化合物評価法を適用することで、農薬関連化合物の濃度依存的な毒性リスクを検出することが可能であり (Fig. 6)、さらにその作用機序推定が可能である結果が得られた。本成果は、これまで医薬品をターゲットとして開発してきた化合物評価法が医薬品以外の化合物にも有効であることを示す成果であり、評価対象となる化合物の範囲拡大に期待できる。

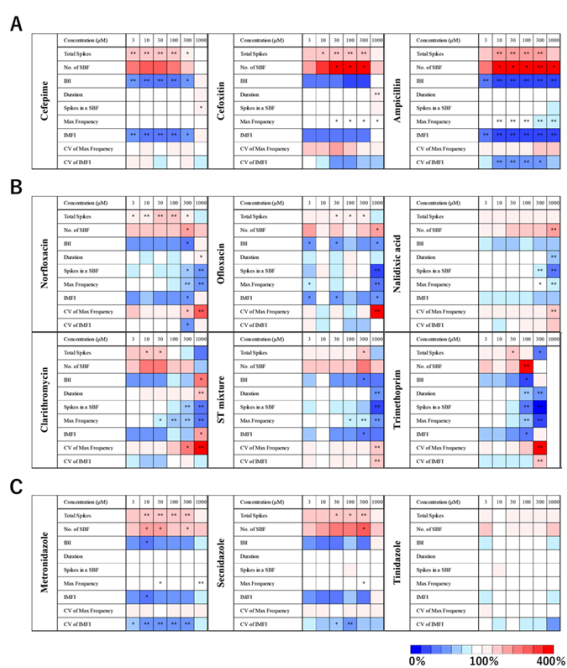


**Figure 6 Toxicity risk assessment with the SD of DMSO.** Low risk (blue), middle risk (pink), high risk (red).



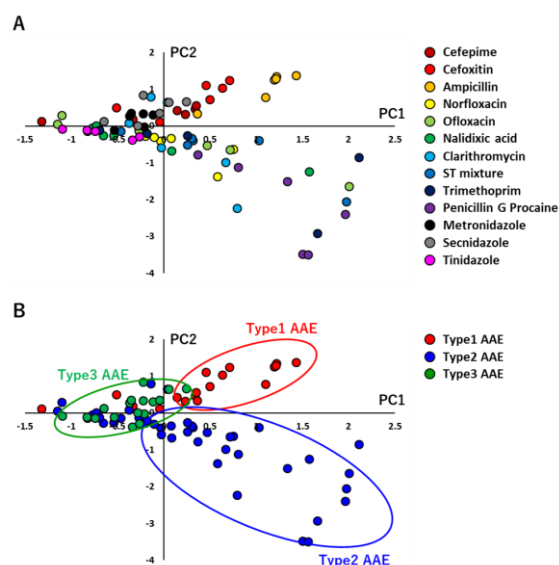
#### 4. 抗菌薬関連脳症のタイプ分類

本研究で開発した化合物評価法の痙攣以外の有害事象への応用性を検証するために、抗菌薬関連脳症 (Antibiotic Associated Encephalopathy ; AAE) をターゲットとして、抗菌薬の評価を実施した。AAE は抗菌薬投与によって引き起こされる中枢神経障害である。ICU においてせん妄や脳症が見られる症例は 80% に及ぶことが知られており、薬剤が原因と考えられる割合は 12~39% 程度である。AAE は、敗血症性脳症などの原疾患との鑑別、他の原因による脳症との鑑別が困難な場合が多いだけでなく、重篤な経過を辿る場合があるため、その特徴を同定し、原因の解明と予防につなげることが重要である。また、抗菌薬の開発においても、開発品の AAE リスクや引き起こされる AAE の症状を把握することは重要な課題である。各抗生物質の臨床的特徴や脳波変化、画像所見をまとめたシステムティックレビューの結果から、AAE は 3 つのタイプに分類されている。タイプ 1 は、ミオクローヌス発作、てんかん波が生じ、頭部 MRI は正常であるが、脳波異常が認められることが知られている。該当する抗生物質はペニシリン、セファロsporin系抗菌薬である。タイプ 2 にはキノロン系、マクロライド系、S/T 合剤であり、投与開始後数日以内に幻覚や妄想等の精神症状を発症することが特徴である。タイプ 3 は 5-ニトロイミダゾール誘導体であるメトロニダゾールであり、小脳失調が主体である。



**Figure 7 Dose dependence of each parameter of the antibiotics analysis.** (A) Heat map of Type 1 AAE (cephalosporins and penicillins). (B) Heat map of Type 2 AAE (quinolone, macrolide, S/T mixture). (C) Heat map of Type 3 AAE (nitroimidazoles). Heat maps were created for cefepime (n = 5), cefoxitin (n = 6), ampicillin (n = 6), ofloxacin (n = 6), norfloxacin (n = 5), nalidixic acid (n = 7), clarithromycin (n = 6), ST mixture (n = 4), trimethoprim (n = 5), penicillin G procaine (n = 6), metronidazole (n = 8), secnidazole (n = 6), tinidazole (n = 6). Heat map with DMSO as 100% (one-way ANOVA and Dunnett's test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. DMSO).

本研究では、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの MEA 計測により取得した電気活動から、既知の抗菌薬について臨床に基づく抗菌薬の AAE タイプを評価可能とすることで、抗菌薬開発における AAE 評価の課題解決を目的とした。ヒト iPS 細胞由来神経細胞に抗菌薬を投与することで、各抗菌薬の異なる神経活動の変化が検出された (Fig. 6)。また、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける電気生理学的応答を指標とした主成分分析による抗菌薬のタイプ分類を実施した結果、臨床における AAE の特徴による抗菌薬の分類と一致する結果が得られた (Fig. 7)。



**Figure 8 Classification of antibiotic agents in human iPS nerves using PCA.** (A) Plots of PC1 and PC2 in the PCA using the effective parameter set for detecting AAE (No. of SBF, Spikes in a SBF). (B) Plots of PC1 and PC2 in a PCA classified each antibiotic as Type 1, Type 2, or Type 3.

本研究で用いた神経ネットワークの電気生理学的応答と多変量解析法を組み合わせることで、これまで実施してきた痙攣リスク評価だけでなく、AAE リスクの評価系として応用可能であると考えられる。さらに、臨床で見られる現象を反映する結果が *in vitro* 評価系で得られたことから、本研究で開発した化合物評価法のさらなる評価対象の拡大に期待できる。

## 5. おわりに

本研究では、*in vitro* MEA データを用いた精度の高い医薬品の痙攣毒性評価をはじめとする化合物評価を実現することを目的とし、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物評価法の開発を目的とした。

はじめに、既知の痙攣陽性化合物と開発中に痙攣が発現しドロップアウトした化合物を用いて、化合物の痙攣毒性検出法の構築と検証を実施した。ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの MEA 計測における痙攣毒性の検出を可能とする解析手法の構築を目的に、まず、中枢神経毒性を有することが既知である化合物だが、既存の解析パラメータではその毒性を検出できない化合物が存在する問題を解決するために、神経ネットワーク活動の周期性に着目した新規解析パラメータを構築した。また、化合物の毒性を検出するのに最適な解析パラメータの組み合わせが不明である問題を解決するために、任意の条件を達成する最適な解析パラメータの組み合わせを選定して実施する多変量解析法を構築した。検証用に用意した既知の痙攣陽性化合物と陰性化合物について、構築した多変量解析法を用いることで、痙攣陽性化合物の毒性検出が可能であることを確認した。本研究で開発した解析法は分野を問わず、様々な解析値に応用可能であり、*in vitro* MEA データのみならず、脳スライスや *in vivo* 脳の電気活動データ、Ca<sup>2+</sup>指示薬や膜電位感受性色素を用いた光イメージング法で取得されたデータなど幅広く適用可能である。

次に、生体での毒性発現濃度を予測するためには、MEA 計測における神経ネットワークへの暴露濃度と *in vivo* における CSF 濃度の相関を明らかにする必要があることから、IVIVE の観点での検証を実施した。また、神経細胞の MEA 計測では細胞の種類により溶媒の影響を受ける場合があり、化合物を正確に評価するには溶媒の影響を取り除くような解析手法が必要である。本研究では、MEA 計測によって得られた神経活動データから溶媒の影響を除外可能なパラメ

ータセットを導出し、主成分分析において、溶媒の標準偏差を指標とした痙攣リスクの基準を設定することで、MEA 計測における化合物の評価基準および溶媒の影響に対する課題を解決した。また、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いた MEA 計測による化合物の痙攣リスク評価と、動物実験によるラットで振戦および痙攣発作が観察されたときの CSF 内濃度の調査を実施し、MEA 計測で痙攣リスクが検出された濃度と CSF 内濃度を比較することで、*in vitro* の毒性評価で *in vivo* と相関のある痙攣リスク評価が可能であることを示した。*In vitro* MEA assessment における精度の高い、生体での毒性発現濃度を予測する化合物の痙攣リスク評価法として今後の展開が期待できる。

最後に、開発した化合物評価法の医薬品以外への応用性および痙攣以外の有害事象への応用性を、農薬関連化合物および抗菌薬関連脳症をターゲットとして評価を実施した。農薬関連化合物の評価では、開発した化合物評価法を適用することで濃度依存的な毒性リスクを検出することが可能であり、さらにその作用機序推定が可能である結果が得られた。抗菌薬の評価では各抗菌薬の異なる神経活動の変化が検出された。また、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークにおける電気生理学的応答を指標とした主成分分析による抗菌薬のタイプ分類を実施した結果、臨床における AAE の特徴による抗菌薬の分類と一致する結果が得られた。本研究で用いた神経ネットワークの電気生理学的応答と多変量解析法を組み合わせることで、これまで実施してきた医薬品の痙攣リスク評価だけでなく、農薬関連化合物の評価系および AAE リスクの評価系として応用可能であると考えられる。さらに、臨床で見られる現象を反映する結果が *in vitro* 評価系で得られたことから、本研究で開発した化合物評価法のさらなる評価対象の拡大に期待できる。

本研究は、*in vitro* MEA データを用いた精度の高い医薬品の痙攣毒性評価をはじめとする化合物評価を実現することを目的に、任意の条件を達成するパラメータセットを探索して実行する主成分分析法を構築し、化合物評価法として開発した。本研究開発により、前臨床試験における医薬品の痙攣毒性検出の精度が高くなると期待できる。また、医薬品以外の化合物、および痙攣以外の有害事象の評価への有効性も示されたことから、本研究で開発した化合物評価法は、あらゆる分野の化合物評価を進展させる技術開発であるとも言える。