

Introduction

ヒトiPS細胞由来ニューロンは、実験動物の福祉に関する3R (Reduction, Refinement, Replacement) の観点から、医薬品や化学物質等の生体に及ぼす影響を検討するための有効なツールとして期待されている。我々はこれまでin vitro評価系の一つとして、平面微小電極アレイ(MEA)を用いて、神経ネットワークの電気活動を指標とした医薬品の神経毒性評価を行ってきた。一方で近年、食品成分の過剰摂取によるけいれん等の神経興奮毒性が問題視され、神経系に及ぼす食品毒性評価法の構築が期待されている。そこで本研究では、ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いて、神経毒性が報告されている食品成分がこのMEA技術によって評価可能かどうかを検証した。

Material & Methods

Human iPSC-derived neurons

- ヒトiPS細胞由来感覚ニューロン(Axol Bioscience)
- ヒトiPS細胞由来皮質ニューロン(Neucyte)

■方法

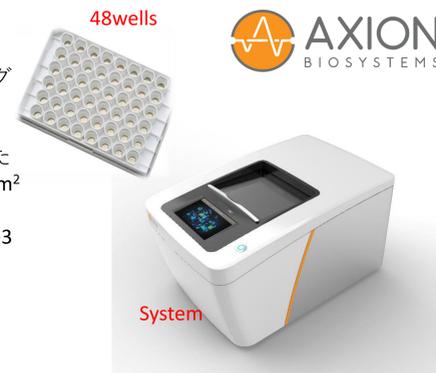
- Poly-D-Lysine & およびSureBond-XFをコーティングしたMEA上にhiPSC由来感覚ニューロンを 7×10^5 cells/cm²の密度で播種した。
- 0.1%PEI およびラミニン511をコーティングしたMEA上にhiPSC由来皮質ニューロンを 8×10^5 cells/cm²の密度で播種した。
- 37°C、CO₂5%インキュベーター内で培養し、培養3週以降に薬理試験を実施した。

■評価化合物

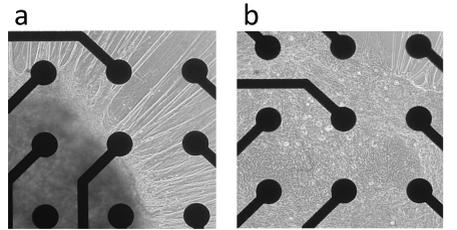
- 農薬成分: Methamidophos
- タバコ成分: Menthol, Nicotine

■使用機器/MEAシステム

Maestro PRO (AXION Biosystems社)



Human iPSC-derived neurons on the MEA



(a) ヒトiPS細胞由来感覚ニューロン培養3週目の様子。
(b) ヒトiPS細胞由来皮質ニューロン培養4カ月目の様子。

Results1 ヒトiPS細胞由来皮質ニューロンのメタミドホスに対する電気生理学的応答

■中枢神経毒性

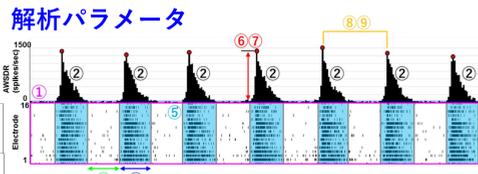
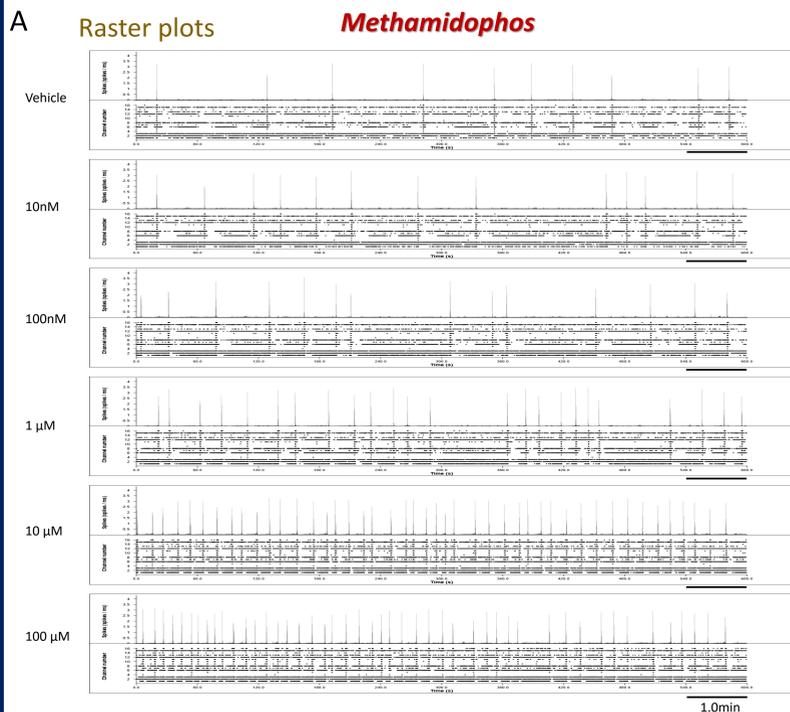
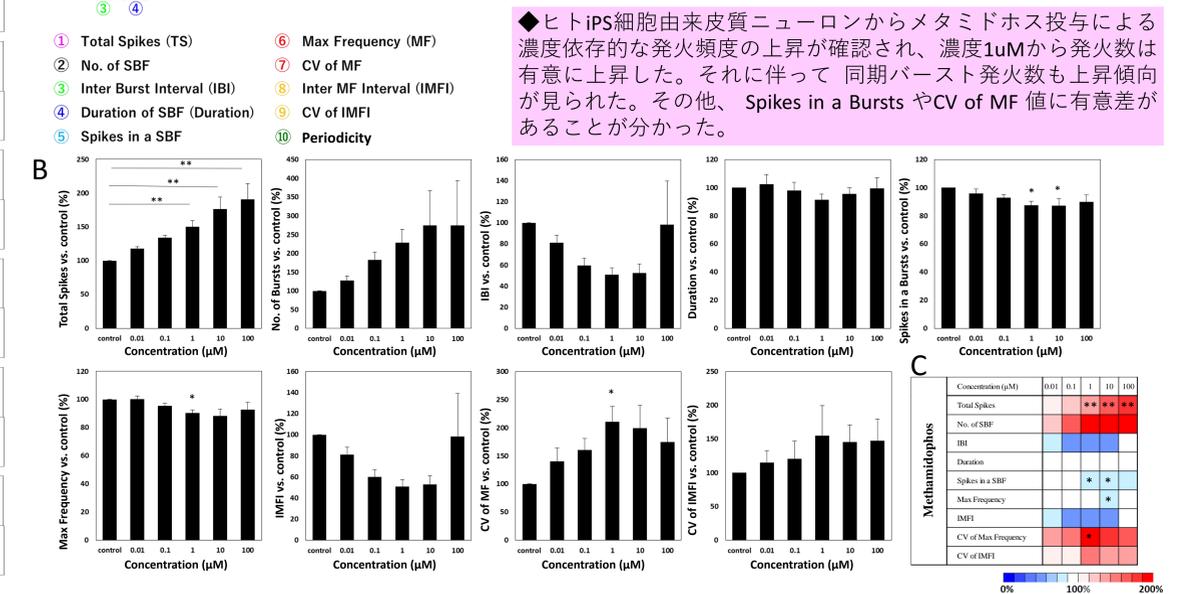


Fig.1 ヒトiPS細胞由来皮質ニューロンの農薬成分Methamidophos投与による誘発応答

(A) Vehicle, Methamidophos 10nM, 100nM, 1µM, 10µM, 100µM 投与後の電気活動頻度の変化。
(B) 各解析パラメータの定量グラフ。n=8, *p<0.01, **p<0.005
(C) Bの解析結果を基にしたヒートマップ。

◆ヒトiPS細胞由来皮質ニューロンからメタミドホス投与による濃度依存性の発火頻度の上昇が確認され、濃度1µMから発火数は有意に上昇した。それに伴って同期バースト発火数も上昇傾向が見られた。その他、Spikes in a BurstsやCV of MF値に有意差があることが分かった。



Results2 ヒトiPS細胞由来皮質ニューロンのニコチン、メンソールに対する電気生理学的応答

■中枢神経毒性

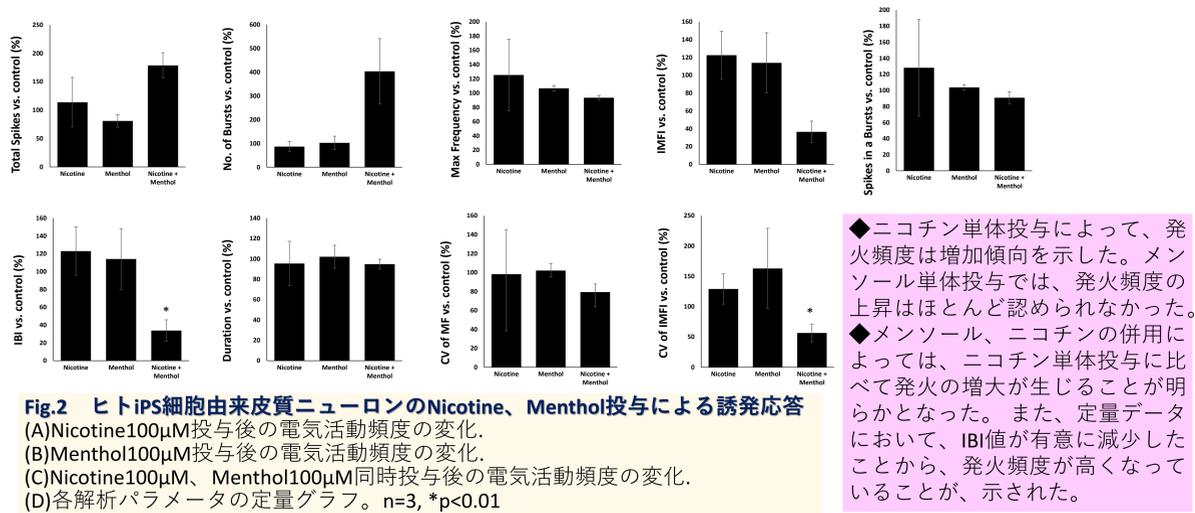
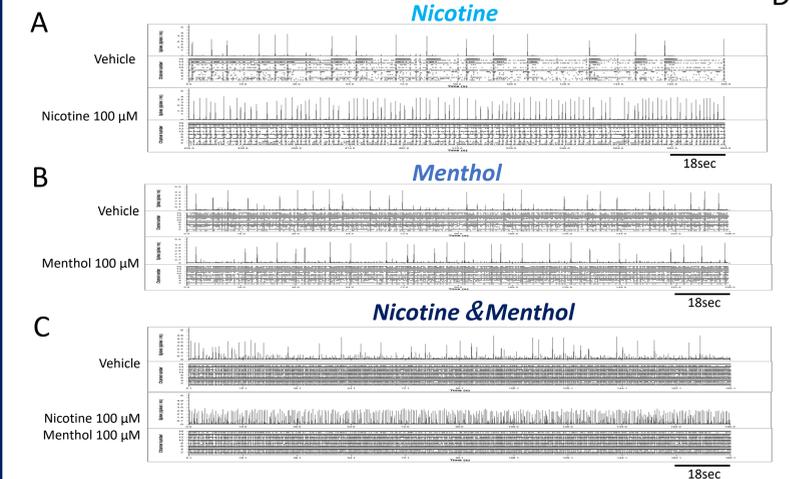


Fig.2 ヒトiPS細胞由来皮質ニューロンのNicotine、Menthol投与による誘発応答

(A) Nicotine 100µM 投与後の電気活動頻度の変化。
(B) Menthol 100µM 投与後の電気活動頻度の変化。
(C) Nicotine 100µM、Menthol 100µM 同時投与後の電気活動頻度の変化。
(D) 各解析パラメータの定量グラフ。n=3, *p<0.01

◆ニコチン単体投与によって、発火頻度は増加傾向を示した。メンソール単体投与では、発火頻度の上昇はほとんど認められなかった。
◆メンソール、ニコチンの併用によっては、ニコチン単体投与に比べて発火の増大が生じることが明らかとなった。また、定量データにおいて、IBI値が有意に減少したことから、発火頻度が高まっていることが示された。

Results3 ヒトiPS細胞由来感覚ニューロンのニコチンに対する電気生理学的応答

■末梢神経毒性

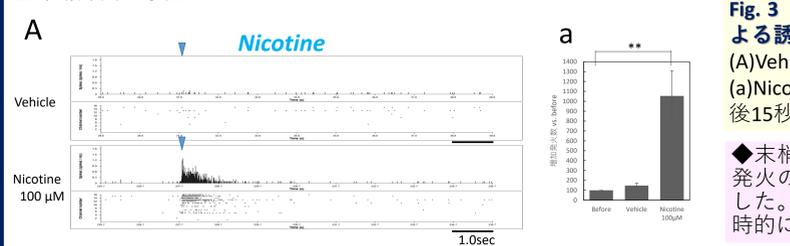


Fig. 3 ヒトiPS細胞由来感覚ニューロンのNicotine投与による誘発応答

(A) Vehicle, Nicotine 100µM 投与前後の電気活動頻度の変化。
(a) Nicotine 投与前の発火頻度を100%とした時の投与前後15秒間の発火数の比較。n=3, **p<0.005

◆末梢神経では、ニコチン100µM投与により一時的な発火の増大が確認され、中枢神経とは異なる応答を示した。これは、ニコチン性アセチルコリン受容体が一時的に活性化したことが考えられる。

Result 4 免疫化学蛍光染色

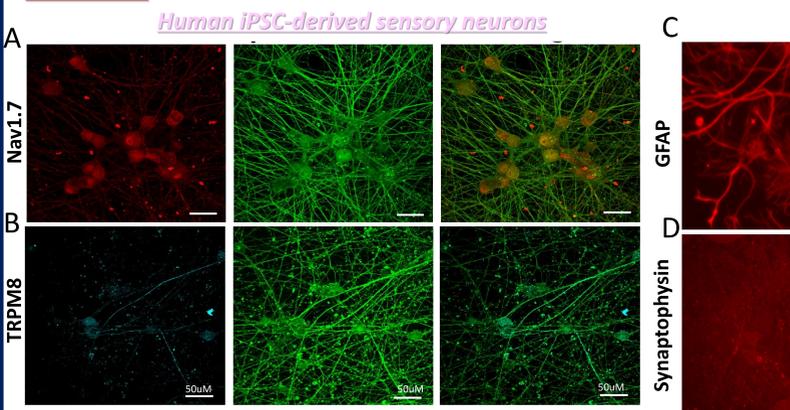


Fig.4 ヒトiPS細胞由来感覚および皮質ニューロンの免疫染色画像 (A) Nav1.7 (B) TRPM8. 培養8週目. (C) GFAP (D) Synaptophysin. 培養90日目.

◆ヒトiPS細胞由来感覚ニューロンにおいて電位依存性NaイオンチャンネルNav1.7およびMenthol受容体であるTRPM8が発現している様子が観察された。皮質ニューロンにおいては、脳内のアストロサイトマーカーであるGFAPおよびシナプス前終末に局在するsynaptophysinの発現を確認した。

Conclusion

■ヒトiPS細胞由来皮質ニューロンからメタミドホス、ニコチン、メンソールに対する電気活動の変化を検出した。メタミドホスの累積投与では、濃度依存性の発火頻度の上昇が確認され、濃度1µMから発火数は有意に上昇した。

■メンソール、ニコチンの併用によっては、ニコチン単体投与に比べて発火の増大が生じることが明らかとなった。メンソールはニコチンの中毒性を高めるとの報告があることから、メンソールはニコチンによる脳内神経興奮をより活発化しうることが再現された。

■ヒトiPS細胞由来感覚ニューロンではニコチン投与による急性的な発火応答を検出した。

■食品成分に対して、中枢、末梢神経共に顕著な神経活動の変化を捉えることができた。

ヒトiPS細胞由来ニューロンを用いた本評価系は、食品成分が及ぼす神経機能のMoA解析および食品毒性・安全性評価の検出手法として有効であることが示唆された。

既知成分だけでなく未知成分の毒性・安全性評価への応用が期待される