

補助事業番号 2024M-363

補助事業名 2024年度 培養神経細胞のCaイメージングによるハイスループット神経毒性評価法の開発 補助事業

補助事業者名 東北工業大学工学部電気電子工学科鈴木研究室 助教 石橋勇人

1 研究の概要

中枢神経毒性の評価系として、現状では培養した神経細胞の活動を384ウェルでハイスループットに計測できるCaイメージング法が期待されているが、化合物による神経活動の変化を観察できる程度に留まっており、具体的な神経毒性の指標は構築されていない。また、複雑な神経ネットワークの電気活動を計測可能な平面微小電極アレイ(MEA)を用いた細胞外電位計測による神経毒性評価も期待されており、解析手法の発展により神経毒性の指標や作用推定の研究が進んでいるが、48ウェルのスループットに留まり、製薬企業の「効率よく選別する」ためのニーズを満たすハイスループット性を有していない。

本研究では、Caイメージング法によるハイスループット計測とMEA計測で培った解析手法を組み合わせることで、中枢神経毒性を高い精度でハイスループットに検出できるCaイメージングによる神経毒性評価法を構築することを目的とした。また、培養細胞による評価系では生体を反映した評価が求められるため、生体での毒性発現と比較検証を実施することで、生体を反映した精度の高い神経毒性評価法として製薬企業の現場で実応用可能な評価法の提案を目指す。

具体的には以下を実施した。

- ①384ウェルプレートに神経細胞を培養し、既に生体での毒性発現が調査済みである約20化合物をそれぞれ投与した際の神経活動をCaイメージングによるハイスループット計測で取得。
- ②取得したCaイメージングデータから算出された神経活動の特徴を反映する各種パラメータを主成分分析することで既知の神経毒性化合物による神経活動変化を検出可能な評価指標を構築。
- ③構築した神経毒性の評価指標から、既に調査済みである生体での毒性発現・化合物濃度と一致する毒性評価が可能な評価指標を同定し、構築した評価法による神経毒性評価の精度を検証。

2 研究の目的と背景

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。中枢神経毒性は新薬開発の中止の主要な原因の一つであり、中枢神経毒性を高い精度でハイスループットに検出できる評価系の構築が求められている。現状では培養した神経細胞の活動を384ウェルでハイスループットに計測できるCaイメージング法が期待されているが、化合物による神経活動の変化を観察できる程度に留まっており、具体的な神経毒性の指標は構築されていない。また、培養細胞による試験でどれだけ生体を反映した結果が得られるかが課題となっている。

Caイメージング法によるハイスループット計測と我々がこれまで培ってきた平面微小電極アレイ

計測における解析手法を組み合わせることで、中枢神経毒性を高い精度でハイスループットに検出できるCaイメージングによる神経毒性評価法を構築することを目的とした。また、培養細胞による評価系では生体を反映した評価結果が求められるため、生体での毒性発現・化合物濃度と比較・検証を実施することで、生体を反映した精度の高い神経毒性評価法として製薬企業の現場で実応用可能な評価法の提案を目指した。

3 研究内容

(1) 培養神経細胞のCaイメージング計測

神経細胞を384wellプレートに培養し、計測装置 FDSS/ μ CELL(浜松ホトニクス)を使用してCaイメージング計測を実施した。化合物の神経毒性評価を検討するために既知の神経毒性化合物を16種類、陰性化合物を4種類の計20化合物(表1)を用意し、それぞれ5濃度で神経細胞に暴露した際のCaイメージングデータを取得した。

表1 化合物一覧

神経毒性化合物		陰性化合物
4-AP	Aminophylline	Acetaminophen
Amoxapine	Bupropion	Amoxicillin
Diphenhydramine	Fluvoxamine	Aspirin
Kainic acid	Linopirdine	DMSO (溶媒)
Paroxetine	PTZ	
Picrotoxin	Pilocarpine	
Strychnine	Tramadol	
Venlafaxine	Veratridine	

(2) 多変量解析による神経毒性評価指標の構築

項目①で取得したCaイメージングデータから神経細胞が活動した際に生じるCaオシレーションを指標とした10種類の解析パラメータ(表2)を算出した。

続いて、算出した解析パラメータを使用して主成分分析(PCA)を実施し、神経毒性の検出が可能となる評価指標の構築を検討した。毒性検出はPCAで算出された第一主成分と第二主成分による2次元平面上において、溶媒であるDMSO暴露による神経活動の変化(平均値 $\pm$ 標準偏差 $\times$ 2)を基準として、基準を逸脱する変化を毒性と定義した。PCAの結果を図1に示す。神経毒性化合物16種類のうち、Linopirdineを除く15化合物の毒性を検出することができた。また、陰性化合物については、いずれも毒性が検出されずに正しく陰性判定された。

以上の結果より、構築した神経毒性評価法の検出精度は94.7%であり、目標である検出精度80%を達成することが示された。

表2 解析パラメーター一覧

解析パラメータ名	説明
Peak number	Caオシレーションの回数
P rate (BPM)	Caオシレーションの頻度
P-P time	Caオシレーションの間隔
Ratio	Caオシレーションのピーク強度
AMP	Caオシレーションの振幅
RMP	Caオシレーションの基底値
Rising slope	基底からピークに到達するまでの傾き
Falling slope	ピークから基底に到達するまでの傾き
AUC	Caオシレーション中の積算輝度値
AUC CV	AUCの変動係数

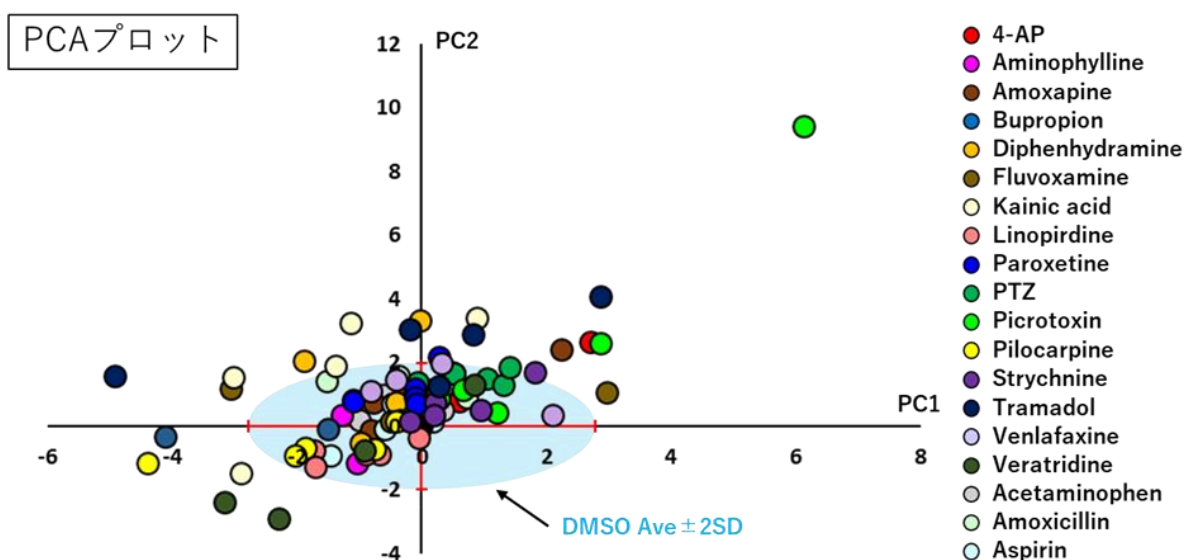


図1 CaイメージングデータのPCAプロット

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

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り、中枢神経毒性を高い精度でハイスループットに検出できる評価系の構築が求められている。本研究で開発を実施した培養神経細胞のCaイメージングによるハイスループット神経毒性評価法では、高い毒性検出精度が認められた。今後さらに、生体での毒性発現および化合物濃度と比較・検証を実施し、生体を反映した精度の高い神経毒性評価法として製薬企業の現場で実応用可能な評価法になっていくことが期待される。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

これまでも化合物が神経機能に及ぼす影響を評価するための研究を実施してきたが、神経ネットワークの電気活動を計測可能な平面微小電極アレイ(MEA)を用いた細胞外電位計測をメインとしてきた。MEAを用いた化合物の評価では、毒性、依存性、有効性、作用機序など、幅広い評価を実現してきたが、48ウェルのスループットに留まり、製薬企業の「効率よく選別する」ためのニーズを満たすハイスループット性に課題があった。一方で、今回実施したCaイメージングを用いた研究は培養した神経細胞の活動を384ウェルでハイスループットに計測できるが、化合物による神経活動の変化を観察できる程度に留まっており、具体的な神経毒性の指標は構築されていないことが課題であった。

今回実施した研究は、MEA計測における評価法のメリットとCaイメージングにおけるハイスループット性のメリットを掛け合わせることで、双方のデメリットを打ち消すという着想から始まった。本研究の成果から、高い毒性検出精度とハイスループット性を兼ね備えた毒性評価法を実現することができた。今後はMEA計測における評価法と同様に、毒性にとどまらず、依存性、有効性、作用機序をハイスループットに評価できる試験系として発展していくことに期待できる。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

該当なし

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

該当なし

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当なし

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 東北工業大学 工学部(トウホクコウギョウダイガク コウガクブ)

住 所： 〒982-8577

宮城県仙台市太白区八木山香澄町35-1

担 当 者： 助教 石橋勇人(イシバシユウト)

担 当 部 署： 鈴木研究室(スズキケンキュウシツ)

E - m a i l: yishibashi@tohtech.ac.jp

U R L: <https://www.tohtech.ac.jp/>