
iPS細胞由来神経細胞を用いた薬剤評価系の開発

Development of Drug Assay System Based on iPS Cell-Derived Neurons

鮫島 達哉*

Tatsuya SAMESHIMA

林 和花*

Waka LIN

田中 理恵子*

Rieko TANAKA

邊見 奈津子*

Natsuko HEMMI

細谷 俊彦*

Toshihiko HOSOYA

要 旨

神経系疾患の多くは、依然として有効な治療法が限られている。iPS細胞から分化させた神経細胞は、疾患メカニズムの解析や治療薬候補の探索への応用が期待されている。リコーのバイオメディカル事業では、独自の分化技術によりiPS細胞由来の神経系細胞を用いた薬物評価技術を開発・整備してきた。本稿では、これらの技術のうち、電極による神経活動の測定、神経細胞の成熟化、アルツハイマー病患者由来細胞の解析について紹介する。

ABSTRACT

The effectiveness of therapeutic treatments for many neurological diseases remains extremely limited. Neurons generated from iPS cells are expected to contribute to the analysis of disease mechanisms and the development of therapeutic drug candidates. As part of Ricoh's biomedical business, we have developed technologies for drug evaluation using neuronal cells differentiated from iPS cells using unique differentiation techniques. Among these technologies, we describe recent progress in neuronal activity measurement with multi-electrodes, maturation of neurons, and analysis of neurons derived from Alzheimer's patients.

* リコーRFS バイオメディカル事業センター
Biomedical Business Center, Ricoh RFS

1. 背景

神経系の疾患には治療の有効性が極めて限られているものが多く残っている。神経系疾患の治療法開発が難しい理由の一つに、疾患の特徴を再現するヒト神経細胞を得ることが困難であったことがある。iPS細胞は神経細胞を含め様々な種類の細胞に分化することができるため、遺伝性の神経疾患を持つ患者からiPS細胞を作成することや、疾患を誘発する遺伝子操作を加えることなどにより、疾患を構成する症状を示す神経細胞を作成できる。そのような細胞を用いれば、疾患のメカニズム解析や、治療薬候補の評価が行えると期待される。

Ricoh Biosciences社はiPS細胞から各種細胞を迅速に分化させる技術を持ち、中でも神経系の細胞に強みがある。リコーのバイオメディカル事業では、この強みを生かし、iPS細胞から分化させた神経系細胞を用いて、製薬企業が薬の試験をするために使える技術を開発・整備してきた。本論文では、このような技術の中から、電極による神経活動測定、神経細胞の成熟化、アルツハイマー病患者由来細胞の解析などを紹介する。

2. MEAプレートを用いた神経活動評価

2-1 MEAを用いた神経活動測定

MEA (Microelectrode Array, 微小電極アレイ) プレートは、神経細胞や心筋細胞などの電氣的活動を非侵襲的に計測するための培養器である。培養面上に数十～数千の微小電極が格子状に配置された構造を持つ。神経細胞の膨大な細胞外電位データを一括で記録・取得し、その電気生理学的機能を定量的かつ高感度に検出・評価することが可能である。しかしながら、電極上で神経細胞を安定して培養することが難しい、培養期間が長く評価の負荷が大きいなどの課題がある。

近年、このMEAプレートを用いたヒトiPS細胞由来神経細胞の電気生理学的評価に応用する試みが進められ

ている。ヒトiPS細胞由来神経細胞を用いたMEAプレート評価系の確立により、疾患患者由来の神経細胞を用いた病態再現モデルの構築や、創薬開発における薬効・毒性評価の臨床試験前の動物実験代替法としての応用が期待される。しかしながら、神経細胞をMEAプレート上に播種した際、電極上での細胞接着や長期培養が安定せず²⁾、神経活動による細胞外電位を安定して測定可能な系を実現することは難しい。グリア細胞の一種であるアストロサイトと共培養することで神経細胞の培養状態が安定することが報告されているが、共培養に用いられるアストロサイトの多くはヒト胎児由来であり、倫理的な制約に加えて、ロット間で細胞の特性や品質にばらつきが見られるという課題もある。

2-2 ヒトiPS神経細胞の活動測定

リコーのバイオメディカル事業では、ヒトiPS細胞から分化させた神経細胞 (Ricoh Biosciences社製、興奮性/抑制性神経細胞など) を用いたMEAプレートアッセイ系の実現を目指し、細胞播種前のコーティング条件および播種・培養条件の最適化を進めた。さらに、同一のヒトiPS細胞由来アストロサイトとの共培養を組み合わせることで、MEA電極上での安定した細胞接着と長期培養 (6~8週) を実現し、神経活動を安定して測定できる評価系を確立した (特許出願済、審査中)。以降、この測定系を神経細胞MEAと呼ぶ。神経細胞MEAの例として、AXION社製マルチウェルMEAプレート (CytoView MEA 48, Axion BioSystems, Inc) を用いて、培養面上にヒトiPS細胞から分化させた興奮性神経細胞とアストロサイトを共培養して神経活動測定を行った。CytoView MEA 48は、1つのプレートが48個の微小培養器 (ウェル) を持ち、それぞれのウェルの底に16個の微小電極が配置されている (Fig. 1上)。測定では、全48ウェルにおいて神経突起の活発な伸展とネットワーク形成が確認され、神経細胞群が神経ネットワークを形成して、安定した神経発火およびネットワークバーストを伴う旺盛な活動を示すことが認められた (Fig. 1下)。

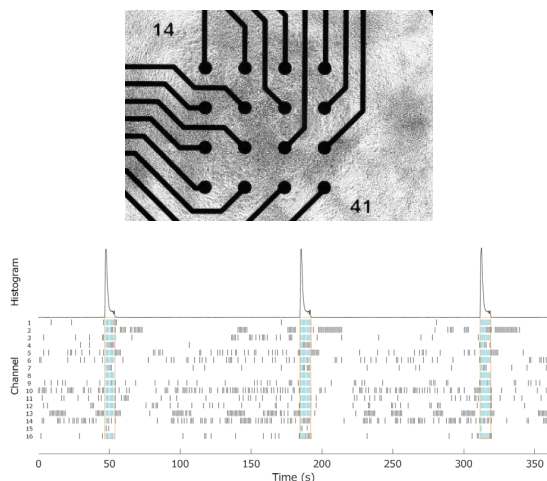


Fig.1 Co-culture of excitatory neurons and iPSC-derived astrocytes on MEA. Top: phase contrast image of neurons and astrocytes cultured in a well of a MEA plate. The 16 electrodes are visible. Bottom: Raster plot. The horizontal axis represents time. Each row shows firings recorded with an electrode. Green lines indicate synchronized firings. The continuous curve represents the rate of firing.

2-3 神経細胞MEAを用いた薬剤応答評価

神経細胞MEAの機能評価の一環として既知の薬剤添加による神経活動の変化を評価した。Table 1に、使用した薬剤種を示す。MEAプレート上に興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を別々にアストロサイトと共培養し、培養6週目に各薬剤への応答評価を3水準の濃度で評価した。薬剤は各ウェル1種で3水準の濃度を累積で投与し、各濃度投与後にMEA電位測定をそれぞれ実施した。この結果、コントロールであるジメチルスルホキシド (DMSO, 薬剤の溶媒として使用) と比較して、興奮性神経細胞では、NMDA型グルタミン酸受容体のアンタゴニストD-AP5投与により神経発火が減少し、GABA受容体のアンタゴニストPicrotoxinには応答しなかった (Fig. 2)。一方、抑制性神経細胞ではD-AP5に反応せず、Picrotoxin投与により神経発火が増大した (Fig. 3)。DMSO単体では発火状態は大きく変化しないこと、イオンチャネルブロッカーには共通した応答を示すことなども確認されている (Fig. 4)。これらの結果は、神経細胞MEAアッセイを用いて、興奮性神経細胞

Table 1 Compounds for drug response evaluation.

Compound	Receptor/ Ion channel	Mode	Concentration [μ M]	Neurons*
NMDA	NMDA receptors	Agonist	10, 100, 1000	EX
Glutamate	AMPA/ NMDA receptors	Agonist	0.3, 3, 30	GA
D-AP5	NMDA receptors	Antagonist	1, 10, 100	EX GA
GABA	GABA receptors	Agonist	0.1, 1, 10	EX GA
Picrotoxin	GABA receptors	Antagonist	0.1, 1, 10	EX GA
4-AP	Potassium Channel	Blocker	0.3, 3, 30	EX
CNQX	AMPA/ Kainate receptors	Antagonist	0.5, 5, 50	EX
Pentylenetetrazol (PTZ)	GABA receptors	Antagonist	10, 100, 1000	GA
Carbamazepine (CBZ)	Sodium Channel	Blocker	1, 10, 100	GA
Kainic acid	Kainate receptors	Agonist	0.1, 1, 10	EX GA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	-	Negative control	0.2%, 0.3%, 0.4%	EX GA

*EX: excitatory neurons, GA: GABAergic neurons

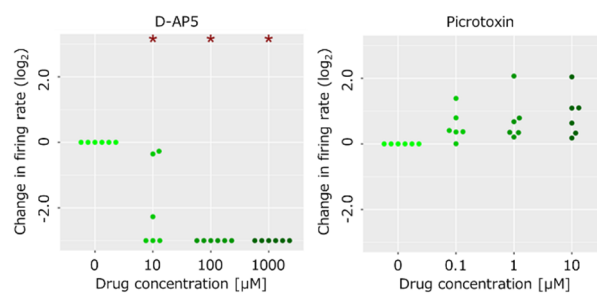


Fig. 2 Pharmacological responses of excitatory neurons co-cultured with iPSC-derived astrocytes. Each dot represents a well sample. Two-sided Wilcoxon rank-sum tests were performed to compare the effects of the drugs at each concentration with those at 0 μ M. *: $p < 0.01$.

胞および抑制性神経細胞の神経活動と各神経細胞種特有の薬剤応答を明瞭に評価可能であることを示唆している。また、複数の細胞ロットにわたり同様の傾向が確認され、ヒト胎児由来アストロサイトを使

用した場合と同等の結果が得られており、ヒトiPS細胞由来の神経細胞およびアストロサイトをを用いたMEAが実験室環境下での中枢神経系細胞の薬物応答評価および毒性評価等に適用可能であることを示唆している。

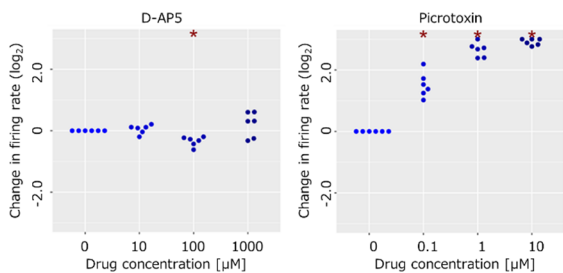


Fig. 3 Pharmacological responses of GABAergic neurons co-culturing with iPSC-derived astrocytes. Each dot represents a well sample. Two-sided Wilcoxon rank-sum tests were performed to compare the effects of the drugs at each concentration with those at 0 μM . *: $p < 0.01$.

Excitatory neurons		
Drug	Conc. Range	Relative # of firings (\log_2)
NMDA	10, 100, 1000 μM	* *
D-AP5	1, 10, 100 μM	* * *
GABA	0.1, 1, 10 μM	* * *
Picrotoxin	0.1, 1, 10 μM	
Kainic acid	0.1, 1, 10 μM	
CNQX	0.5, 50, 500 μM	* *
4-AP	0.3, 3, 30 μM	* * *
DMSO	0.2, 0.3, 0.4%	

GABAergic neurons		
Drug	Conc. Range	Relative # of firings (\log_2)
Glutamate	0.3, 3, 30 μM	*
D-AP5	1, 10, 100 μM	*
GABA	0.1, 1, 10 μM	* * *
Picrotoxin	0.1, 1, 10 μM	* * *
PTZ	10, 100, 1000 μM	* * *
CBZ	1, 10, 100 μM	* *
Kainic acid	0.1, 1, 10 μM	* * *
DMSO	0.2, 0.3, 0.4%	

Fig. 4 Summary of pharmacological responses of Excitatory/GABAergic neurons co-cultured with iPSC-derived astrocytes. Firing number is shown as color-coded \log_2 fold change relative to the drug-free condition. Two-sided Wilcoxon rank-sum tests were performed to compare the effects of each drug with that of DMSO. *: $p < 0.01$.

2-4 今後

本研究では、ヒトiPS細胞由来の神経細胞およびアストロサイトのみを用い、同一細胞株由来の複数神経細胞種における神経活動および薬剤応答を評価可能なMEAアッセイ系を構築した。これまでにラット細胞やヒトiPS細胞由来神経細胞を用いた薬剤応答評価の報告はあるが³⁾、すべての構成細胞を同一ヒトiPS細胞株由来とした安定した評価系を実現した点に本研究の独自性がある。ヒトを対象とした創薬開発における薬効・毒性評価プロセスにおいて臨床試験前の動物実験の代替評価系としての利用、疾患患者由来のiPS細胞を用いた疾患表現型モデルへの応用など、種々の応用先への展開が期待される。

3. ヒト成熟神経細胞

3-1 ヒトiPSC由来神経細胞の成熟化

ヒトiPSC由来神経細胞は、認知症や精神疾患といった中枢神経系疾患の研究に役立つことが期待されている。脳の神経ネットワークでは、細胞同士が電気信号をやり取りする接続部位である「シナプス」が記憶・認知メカニズムの中心的な役割を担っており、その構造や機能を再現することは脳の仕組みや病態を理解するうえで非常に重要であると考えられる。薬剤評価においては、シナプスの数や状態変化を的確に評価できる手法の確立が求められている。そのような評価技術の進展により、シナプス機能に作用する新薬の開発が期待されている。

しかし、これまでヒトiPSC由来神経細胞はシナプス形成に時間がかかり、特に興奮性シナプス後部の棘構造（スパイン）形成が困難とされていた。ヒトの神経細胞は、他の動物種（げっ歯類や他の霊長類）の細胞より成熟化が遅延する特徴を持つことが知られている⁴⁾。ヒトiPSCから分化誘導した神経細胞は、これまで主に神経発生の初期段階までの成熟しか確認されていなかった⁵⁾。一方で、スパイン形成を伴う後期の成熟過程を再現するには、数十〜数

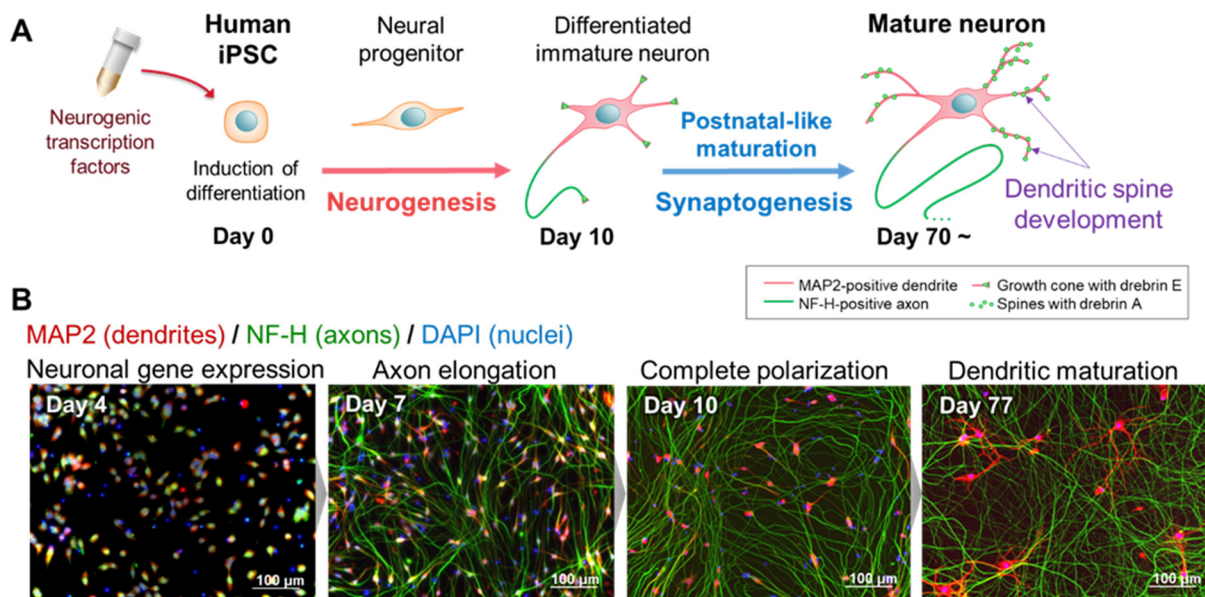


Fig. 5 Advanced maturation of human iPSC-derived neurons.
 A: Schematic representation of the stages of neuronal development in iPSC-derived neurons generated with the Quick-Neuron™ technology (Ricoh Biosciences, Inc.).
 B: Time-course characterization of neuronal development in cultured iPSC-derived neurons with immunofluorescence staining of the axon-specific marker NF-H (green) and the dendritic marker MAP2 (red). Scale bar: 100 μm.
 iPSC: induced pluripotent stem cell; NF-H: neurofilament heavy chain; MAP2: microtubule-associated protein 2; and DAPI: 40,6-diamidino-2-phenylindole.

百日にわたる長期培養を必要とする3次元脳オルガノイドなどの複雑な手法が用いられてきた^{6,7)}。

近年では、様々な種類の神経細胞を効率よく作製する技術の開発も進められている。我々はこうした流れを踏まえ、Ricoh Biosciences社の高速分化誘導技術によって神経発生を加速し、さらに培養条件を最適化することで、3次元オルガノイドを用いずにヒトiPSC由来神経細胞の後期成熟過程を再現することに成功した⁸⁾ (Fig. 5A)。この手法では、約3ヶ月の培養でスパイン形成およびシナプス機能の成熟化が高効率に観察された。転写因子を用いてQuick-Neuron™ Excitatory - Human iPSC-derived Neurons (興奮性神経細胞)の分化誘導を行うと、短時間で神経突起が伸長した (Fig. 5B)。培養10日目で神経細胞の分化が完了し、極性化により電気信号を伝導・出力する軸索と、信号を受ける側の樹状突起が形成されていることを、それぞれの特異的因子の染色で識別できる。この段階ではiPSC由来神経細胞はまだ

未成熟であり、後の培養で樹状突起がさらに伸長・分岐し、シナプス形成が行われる。培養70日から3ヶ月程度で、複雑に発達した樹状突起上に多くのスパイン形成が観察できる (Fig. 6)。

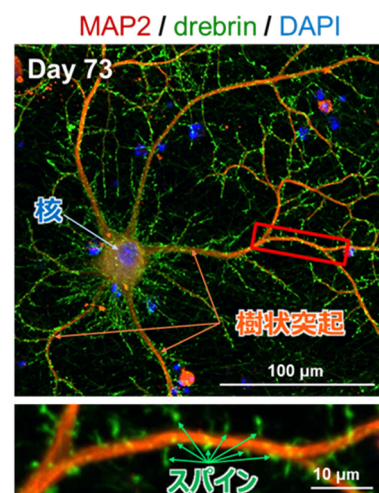


Fig. 6 Dendritic maturation and spine formation in iPSC-derived neurons.
 Drebrin clusters (green) accumulate in spine heads along the MAP2- positive dendrites (red).

3-2 神経成熟化の遺伝子発現プログラム

成熟過程の遺伝子発現プログラムを分析するために、ヒトiPSC由来神経細胞を最大3ヶ月間培養し、経時的にデータを収集し、RNAシーケンス (RNA-seq) を用いたトランスクリプトーム解析を行った⁸⁾。その結果、これらの細胞は培養10日で未分化性を失い多くの神経細胞特異的遺伝子を発現するが、胎児様の幼若なヒト神経細胞に近く、その後2~3ヶ月の培養を経てヒトの脳皮質神経細胞の遺伝子発現パターンに近づくことが明らかになった。ヒトの脳発達データと比較した結果 (Fig. 7)、特に培養57日以降で胎児様の脳の遺伝子発現パターンとの相関性は減少し、一方で出生後・成人の脳との相関性が上がることを確認した。

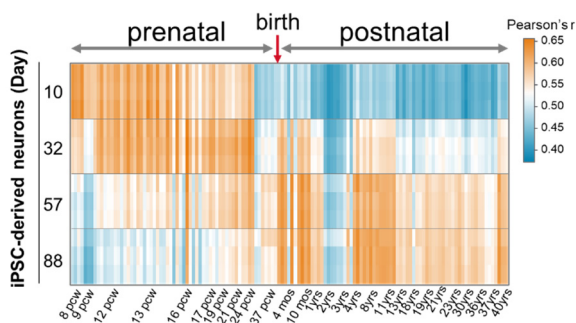


Fig. 7 Correlations of the gene expression in iPSC-derived neurons with the developing human brain transcriptome (BrainSpan atlas⁹⁾). RNA-seq revealed the time-dependent transition from a prenatal (left, post-conception week 8-26) to a postnatal/adult-like profile (right, 4 months-40 years following birth).

また、培養の後半時期に発現が上昇する遺伝子群には、シナプス可塑性や記憶・学習機能などに関連付けられるものが多く含まれており⁸⁾、成熟した脳に特異的とされる遺伝子のアイソフォーム変換も確認された。例えば、これまで胎児様の未成熟な iPSC 神経細胞では困難とされていた Drebrin (drebrin) の脳型アイソフォーム A への変換¹⁰⁾ (Fig. 8A) や、タウ (tau) の 3R から 4R 型への変

換^{11,12)} (Fig. 8B) が、RNA-Seq および定量的リアルタイム RT-PCR で認められた。

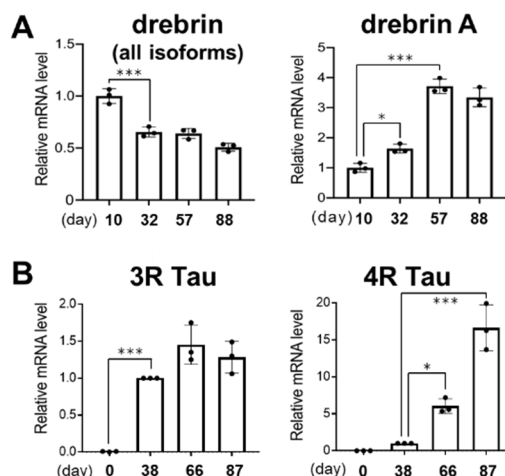


Fig. 8 Differential expression of neuronal maturation markers in iPSC-derived neurons.

A: Expression of drebrin (all isoforms and isoform A)

B: Expression of tau (isoforms 3R and 4R)

Mean and standard deviation of the relative levels of expression determined by RT-qPCR from $n = 3$ biological replicates at each time point.

*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ from Dunnett's multiple comparison test for one-way ANOVA.

3-3 AI画像解析によるシナプス定量アッセイ

げっ歯類などの神経細胞を用いて、シナプス数の変動を指標として薬剤評価を行うために、シナプス後部のスパインに集結する Drebrin のタンパク質の粒を検出する手法が知られている^{13,14)}。Drebrin は細胞骨格に関与するアクチン結合タンパク質であり、未成熟な神経細胞では主に突起先端部位の成長円錐に存在するが、成熟化が進むとシナプス形成部位に集結し、安定したスパインの形成と動態に重要な役割を持つ¹⁵⁾。

我々はヒト iPSC 由来成熟神経を用いて免疫染色を行い、共焦点定量イメージサイトメーターで画像観察を行った。その結果、神経細胞の樹状突起の成長に伴い、期待通りの Drebrin の局在変化が起こり、2~3ヶ月で樹状突起上にスパインを示す粒が無

数に形成されることを確認した (Fig. 9A). また、スパインの機能性を示すために、グルタミン酸刺激への応答性を評価した (Fig. 9B). 高濃度 (100 μM) のグルタミン酸に神経細胞を接触させると、数分でドレブリンが樹状突起内に移動し、スパインの粒が消失する現象 (drebrin exodus) を、世界で初めてヒトiPSC由来神経細胞で再現した (東京大学との共同研究⁸⁾). 本現象は、これまでげっ歯類の初代培養神経細胞を用いて、樹状突起スパインの形態的可塑性のメカニズムとして報告されてきた^{15,16)}. 今回、ヒトiPSC由来神経細胞でも同様の現象を再現できたことにより、シナプスが分子機能レベルで成熟していることを明らかにした.

さらに、効率よく樹状突起上のドレブリン陽性粒子を自動検出し、多くの画像サンプルを用いた薬剤評価を可能にするために、独自の人工知能 (AI) を用いた解析技術を開発した (リコーデジタルサービスBU AIサービス事業本部 デジタル技術開発センターとの共同開発). 一般的な画像解析では、高解像度の画像を用いて熟練者が詳細に確認しない限り、スパインに局在するドレブリン陽性粒子とノイズとの区別が困難であった. 本開発では畳み込みニューラルネットワークによる深層学習を用いたAIを導入することにより、数十~数百条件の画像から、ドレブリン陽性の粒子の密度を高精度かつ高速に定量することが可能となった. 例えば、96ウェルプレートに培養したヒトiPSC由来成熟神経細胞を、20 \times 対物レンズで1サンプル当たり16視野ずつ撮影することで、グルタミン酸刺激による濃度依存的な用量反応曲線を描くことができるようになった (Fig. 9C). 今後このようなハイスループット画像解析を用いることにより、シナプス機能の薬剤評価アッセイの開発が発展することが期待される.

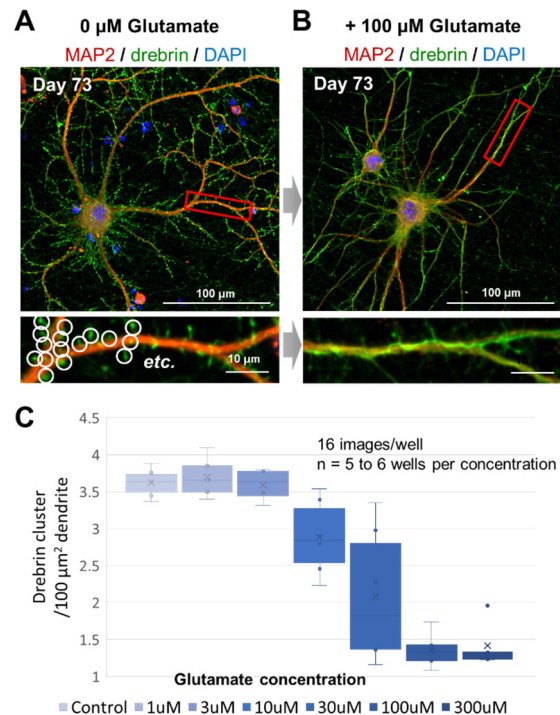


Fig. 9 AI-based imaging assay of the effect of glutamate on mature iPSC-derived neurons.

A: Non-treated control sample. White circles indicate examples of drebrin clusters identified by AI.

B: Cells treated with 100 μM glutamate for 10 min before immunostaining.

C: Dose-dependent response curve to glutamate.

3-4 成熟神経細胞における神経伝達機能評価

ヒトiPSC由来成熟神経細胞のシナプスを介した伝達機能を評価するために、細胞外活動電位を経時的にラベルフリーで測定できる高密度微小電極アレイ (High-density microelectrode array, HD-MEA^{17,18)}) を用いて、長期培養における電気生理活動の変化を1週間おきに観測した (Fig. 10). CMOSセンサー上に培養したヒトiPSC由来成熟神経細胞から、培養2週目で自発発火が検出され、その後時間と共に神経活動が見られる電極数と発火頻度の上昇が観察された (Fig. 10A, D). また、神経細胞の集団が一時的に同期して高頻度で発火することにより、集団間の接続性の発達を示すネットワークバーストが、培養6週目あたりから出現し、シナプスが形成されてい

ることが示唆された (Fig. 10B, C). ネットワークバーストの頻度は培養48日目で最大値を迎えるが、その後頻度はより低い一定間隔に落ち着く一方で、バースト内発火頻度が高く上昇する状態に、長期間安定することが判明した (Fig. 10E, F). このバースト頻度が安定し始める時期が、発達したシナプス後部のスパイン形成を免疫染色で観察できる時期と概ね一致しているため (培養70日目以降)、後期の成熟化による変化であることが示唆された。

安定した時期のネットワークバーストを用いて、シナプス伝達に影響する薬剤への応答性を示すことができる。例えば、シナプス受容体の阻害剤を加えることで、ネットワークバーストの濃度依存的な消失が確認できた (Fig. 11). ネットワークバーストが安定している時期であれば長期間の経時観測も可

能であるため、効力が現れるまでに時間がかかる薬剤の評価にも役立つと考えられる。

さらにHD-MEAは、電極上の個々の神経細胞の電気信号を分離して活動パターンを抽出することで、細胞ごとの活動電位の発生を特定し、軸索伸長を追跡することが可能である (Axon Tracking). 電極表面全体の高振幅活動電位の空間分布をマッピングした結果、成熟化と共に軸索伸長と回路の複雑性が増すことが観察された (Fig. 12A). ネットワークバースト頻度が安定した後も、1細胞当たりの総軸索長は上昇し続けることが示された (Fig. 12E). 一方、伝播速度はほぼ一定に保たれており (Fig. 12F), 代表的な無髄神経線維の速度と同程度であった (0.6 m/s).

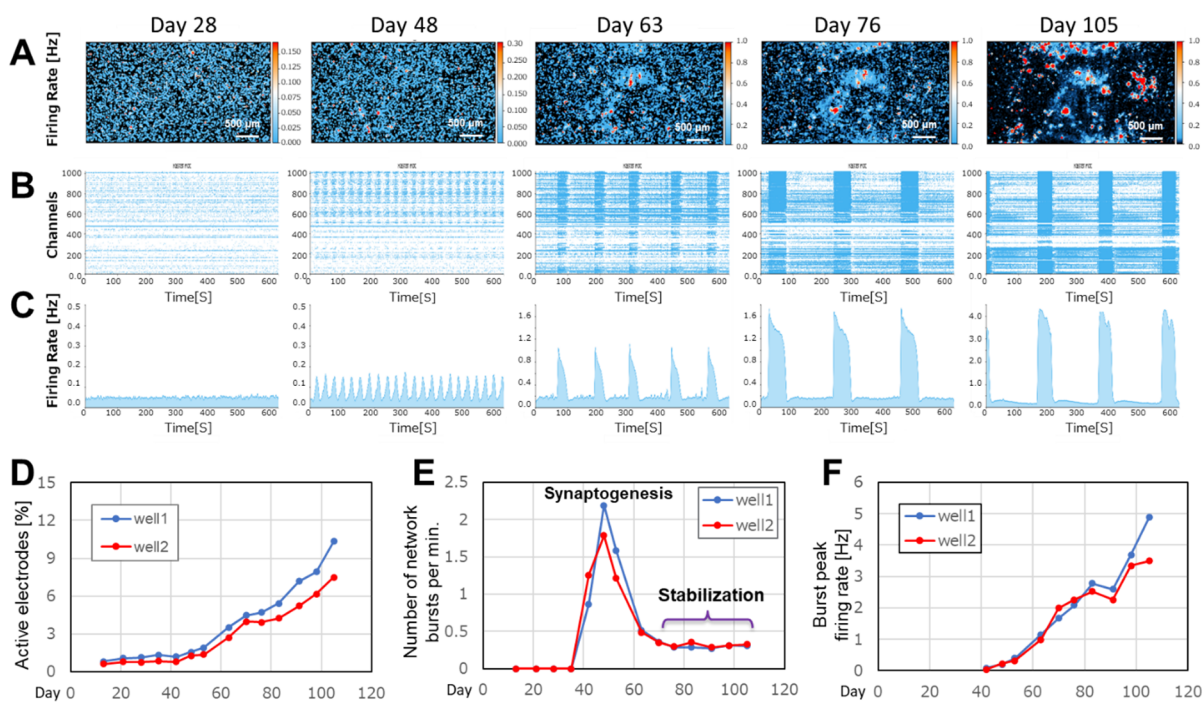


Fig. 10 Spontaneous firing activity of excitatory iPSC-derived neurons measured by HD-MEA.

A: Firing rate distribution map across the electrode area over the indicated time course above. Scale bars: 500 μm .

B: Raster plots displaying detected spikes (dots) in 1,020 recording channels (y-axis) over 600 s (x-axis).

C: Network Assay results, showing the evolution of spontaneous network burst profiles over time.

D: Percentage of active electrodes across the culture area.

E: Number of network bursts per minute of recording.

F: Burst peak firing rate (average maximal firing rate during a network burst).

(n = 2 biological replicates)

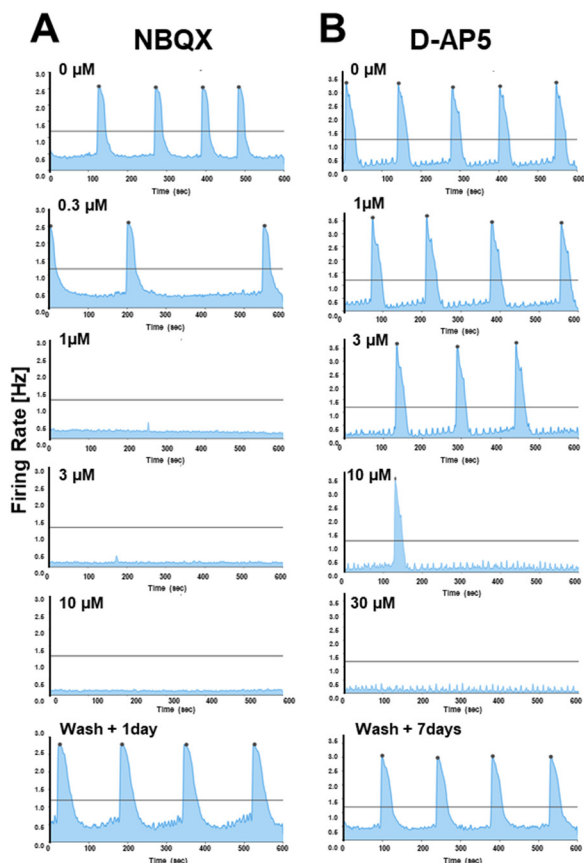


Fig. 11 Dose-dependent response to synaptic blockers.
 A: AMPA/Kainate receptor antagonist NBQX.
 B: NMDA receptor antagonist D-AP5.

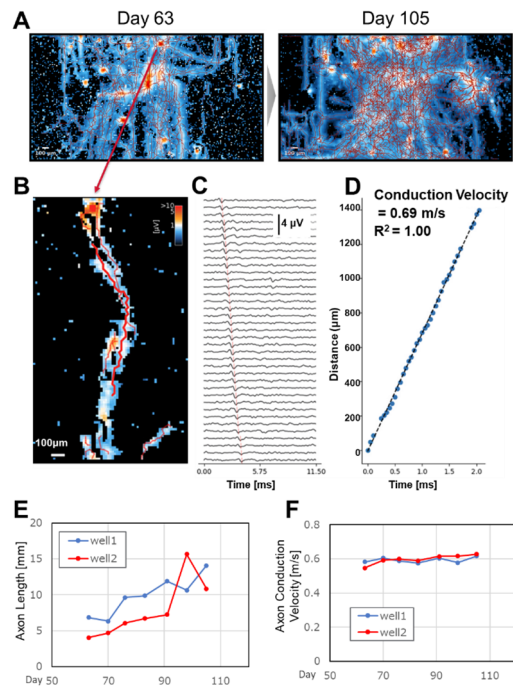


Fig. 12 Axon tracking assay.

- A: Maps of the spatial distribution of action potential amplitude and the reconstructed axonal propagation paths across the electrode area. Scale bars: 100 μm .
- B: Representative analysis of a single neuron.
- C: Action potential propagation after alignment of the signal traces along an axonal branch (red line in B).
- D: Linear regression interpolation to compute the conduction velocity.
- E: Average total axon length of single neurons.
- F: Average conduction velocity of axon branches.

3-5 神経疾患モデル開発への展望

これらの結果により、ヒトiPSC由来神経細胞をより生体の脳に近い機能を持つように成熟化させることが可能であり、安定したシナプスと、高度なネットワーク接続性を示す神経伝達活動を評価できることが示唆された。シナプスの消失や機能変化をターゲットとした創薬は、認知症を含む神経変性疾患¹⁹⁾、統合失調症などの精神疾患²⁰⁾、ストレス耐性やうつ病²¹⁾など、非常に多くの中枢神経系疾患の予防・治療に期待されている。神経細胞の成熟化は、患者由来iPSCや変異を持つiPSCを用いた疾患モデルにも応用することが可能であり、今後、病態解明

や神経細胞作用薬の研究開発，また，認知機能障害などを含む医薬品の安全性予試験などへの展開を通じて，創薬およびiPS細胞産業の活性化に貢献することが期待される。

4. アルツハイマー病患者のiPS細胞由来分化細胞を用いた疾患モデリング

4-1 アルツハイマー病の創薬標的

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は進行性の神経変性疾患であり，全認知症例の約60%を占めている。記憶障害を初発症状とし，認知機能の低下，行動異常，人格変化などを呈することから，患者本人のQOLを低下させるのみならず家族や介護者への心理的・経済的負担も極めて大きい。ADの病態としてアミロイドβ (Aβ) 斑の沈着やタウタンパク質の蓄積による神経原線維変化が広く知られており，これらの異常が神経活動の異常や神経細胞死を引き起こすと考えられている²²⁻²⁴⁾。さらに近年は中枢神経系における慢性炎症等も病態形成に関与することが示唆されており，ADの発症および進行には多因子的かつ複雑な分子機構が関与していることが明らかとなってきた²⁵⁾。2020年代以降，アミロイドβを標的とする抗体医薬 (レカネマブ，ドナネマブなど) の相次ぐ承認は，ADを標的とした創薬研究に大きなインパクトを与え，製薬企業はこれを契機としてさらに疾患修飾薬の開発を加速させてきた。現在はタウ，神経炎症，ミトコンドリア機能，神経保護など様々な機序を標的とした候補薬が臨床試験に進んでおり，開発パイプラインも多角化の傾向を示している。

AD患者のうち原因遺伝子が同定されている家族性ADは1%未満であり，大部分のADは家族歴のない孤発性である。孤発性ADにおいては，アポリポ蛋白質E (APOE) の多型であるε4対立遺伝子 (以下，APOE4) がリスク因子であることが知られている²⁶⁾。一方でε2対立遺伝子 (APOE2) はAD発症に対して保護的に作用するとされており，ε4と対照

的に疾患リスクを低減する因子として注目されている。APOE4キャリアAD患者由来のiPSC分化細胞を利用した細胞アッセイは，病態再現，薬剤応答性の評価，患者層別化の観点から創薬研究における極めて有用なツールである。本項ではAPOE4キャリアのAD患者由来iPSC細胞より分化誘導した神経細胞を用いた表現型解析の例を紹介する。特に，ADに特徴的なタウの病理を再現した例について述べる。

4-2 アルツハイマー病におけるタウの病理

ADの代表的な病態の一つであるタウの蓄積と構造変化は，神経細胞内での神経原線維変化を引き起こし，シナプス機能障害や神経細胞死の引き金となることから重要な創薬標的として位置付けられている。本来タウは主に軸索に局在する親水性タンパク質であり，微小管結合領域を介して微小管に結合することでその安定化に寄与している。タウはGSK-3β (glycogen synthase kinase-3β) やMAPK (mitogen-activated protein kinase) などのリン酸化酵素によってリン酸化を受けることが知られており，タウのリン酸化状態は細胞周期やシグナル伝達，シナプス可塑性など多様な生理機能調節に関与している。タウのリン酸化は通常可逆的であるが，アルツハイマー病のようにタウの異常を伴う神経変性疾患においてはこのバランスが崩壊し，過剰リン酸化状態に陥る (Fig. 13)。過剰にリン酸化されたタウは微小管に対する親和性が低く，微小管と結合しない可溶性モノマー状態を呈する。この可溶性タウは二量体およびオリゴマーへと重合し，さらに線維状構造を形成する凝集体へと進展することで神経原線維変性を引き起こす^{27,28)}。

リン酸化制御因子およびオリゴマー形成の初期段階に対する標的療法の開発は，タウの異常が関与する疾患に対する治療戦略の中核を成すものである。これらの分子機構に着目した複数の創薬アプローチがすでに臨床段階に進展しており，抗タウ抗体薬やリン酸化阻害剤，凝集体形成を阻害する低分子化合物などが次々と臨床試験へ進んでいる。これらの治療候補は疾患の進行抑制あるいは神経変性の修飾を

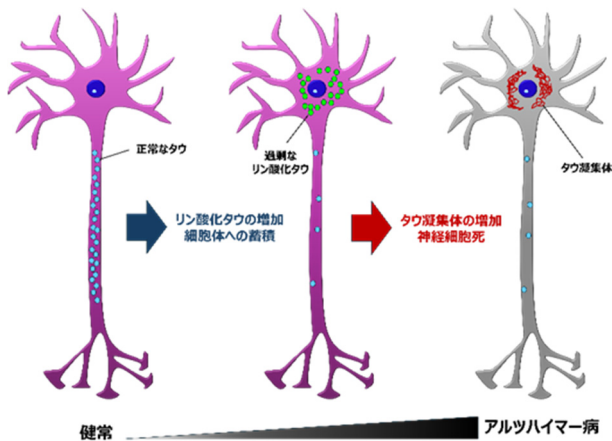


Fig. 13 Pathology of Tau in Alzheimer's disease.

目的として設計されており、病態の根本的改善を目指すものとして期待されている。しかしながら、これまでにいずれのタウ標的薬も主要規制当局による承認には至っていないのが現状であり、特に抗タウ抗体を中心とするパッシブ免疫療法に関しては臨床試験で有効性が示されずに脱落する例が相次いでいる。

前臨床試験において病態の本質を反映した再現性の高いモデルの確立は依然として困難であり、特にヒト特異的な遺伝背景と病態を模すモデルの不在は創薬開発上の大きな障壁となっている。このような背景から、近年では患者由来のiPS細胞から分化誘導した神経細胞を用いた*in vitro*病態モデルの構築が注目されている。本研究では、APOE4遺伝子多型を有するAD患者由来iPS細胞から分化誘導した神経細胞が、ADで見られるタウの病理を再現するかを検討した。

4-3 アルツハイマー病患者iPS細胞由来神経細胞におけるタウ蓄積の再現

本研究ではTable 2に示すAD患者iPS細胞由来の神経細胞を用い、タウの細胞内蓄積が*in vitro*において再現可能であるかを検討した。

iPS由来神経細胞を1週間から8週間培養し、セラライセートを回収して酵素免疫測定法（ELISA）によりタウの発現量を定量した。AD株iPS細胞由来の神経細胞においては、培養4週以降にタウの有意な

蓄積が認められた（Fig. 14）。さらに神経細胞内に蓄積したリン酸化タウ（p-Tau）を蛍光免疫染色した結果、AD株iPS細胞由来の神経細胞では細胞体におけるp-Tau染色が顕著に増強した（Fig. 15）。

Table 2 Neurons used in the study.

Donor ID	APOE genotype	Age	Onset year	Sex
CW50065 (Healthy)	2/4	74	—	F
CW50114 (AD)	3/4	72	65	F

The two iPS cell-derived excitatory neurons were Quick-Neuron™ Excitatory, Ricoh Biosciences, Inc.

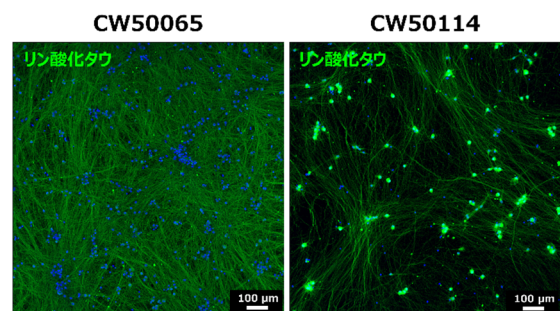


Fig. 14 Accumulation of Tau in AD neurons.

iPSC-derived neurons at 1 to 8 weeks of culture were collected and the amount of Tau in the cell lysates was measured using the ELISA method. After 4 weeks of culture, the amount of Tau in AD neurons (CW50114) was higher than that of the healthy control (CW50065). $N = 7$, Error bar: SD. Student t-test ($*p < 0.001$).

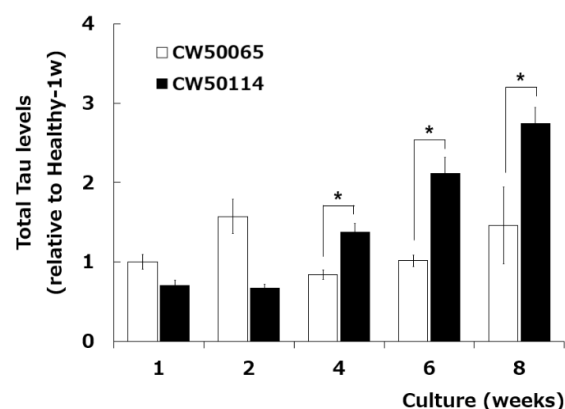


Fig. 15 Accumulation of phosphorylated Tau in the cell body of AD neurons.

Neurons were stained for phosphorylated Tau (p-Tau, green) using fluorescence immunostaining. Blue Hoechst staining shows the nucleus of the cells. In AD (CW50114) neurons, p-Tau was accumulated in the cell body.

本研究の結果から、疾患株iPS細胞由来の神経細胞を用いた2次元培養系において、細胞体におけるリン酸化タウの蓄積が再現可能であることが示された。今後はタウを標的とした創薬スクリーニングへの応用が期待される。

4-4 今後の展望

2D培養系において細胞内リン酸化タウの蓄積を再現するためには、分化誘導方法や培養条件、解析手法の最適化など様々な課題が存在する。これらの課題を克服し、リン酸化タウの蓄積を再現できたことは意義深い成果である。本項で紹介した神経細胞におけるタウの蓄積は有用な創薬プラットフォームとなることが期待され、現在は製薬企業向けの受託アッセイサービスとしても展開している。今後はさらにタウの凝集状態評価やシナプス機能の評価、神経細胞死の評価など多角的な表現型解析を行い、疾患状態に伴う変化を統合的に捉えるアッセイシステムの確立を目指す。

5. 終わりに

以上、リコーのバイオメディカル事業におけるiPS細胞由来神経細胞関連の開発・整備状況を紹介した。これらの技術が創薬に貢献することを期待する。

参考文献

- 1) Y. Shi et al.: Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress, *Nat Rev Drug Discov*, Vol. 16, pp. 115–130 (2017).
- 2) M. Yang et al.: Polyethyleneimine facilitates the growth and electrophysiological characterization of iPSC-derived motor neurons, *Sci Rep*, Vol. 14 (1), 26106 (2024).
- 3) Y. Ishibashi et al.: Verification of the seizure liability of compounds based on their in vitro functional activity in cultured rat cortical neurons and co-cultured human iPSC-derived neurons with astrocytes and in vivo extrapolation to cerebrospinal fluid concentration, *Toxicol Appl Pharmacol*, Vol. 476, 116675 (2023).
- 4) J. L. Wallace, A. A. Pollen: Human neuronal maturation comes of age: cellular mechanisms and species differences, *Nat. Rev. Neurosci*, Vol. 25, pp. 7–29 (2024).
- 5) Y. Ohara et al.: Early-stage development of human induced pluripotent stem cell-derived neurons, *Journal of Neuroscience Research*, Vol. 93, pp. 1804–1813 (2015).
- 6) G. Quadrato et al.: Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids, *Nature*, Vol. 545, pp. 48–53 (2017).
- 7) A. Gordon et al.: Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions, *Nature neuroscience*, Vol. 24, pp. 331–342 (2021).
- 8) W. Lin et al.: Dendritic spine formation and synapse maturation in transcription factor-induced human iPSC-derived neurons, *iScience*, Vol. 26, 106285 (2023).
- 9) M. Li et al.: Integrative functional genomic analysis of human brain development and neuropsychiatric risks, *Science*, Vol. 362, pp. 139–148 (2018).
- 10) K. Togo et al.: Postsynaptic structure formation of human iPSC cell-derived neurons takes longer than presynaptic formation during neural differentiation in vitro, *Molecular brain*, Vol. 14, 149 (2021).
- 11) L. Miguel et al.: Detection of all adult Tau isoforms in a 3D culture model of iPSC-derived neurons, *Stem Cell Research* 40, 101541 (2019).

- 12) L.S. Capano et al.: Recapitulation of endogenous 4R tau expression and formation of insoluble tau in directly reprogrammed human neurons, *Cell Stem Cell* 29, pp. 918–932.e8 (2022).
- 13) K. Hanamura et al.: High-content imaging analysis for detecting the loss of drebrin clusters along dendrites in cultured hippocampal neurons, *Journal of pharmacological and toxicological methods* 99, 106607 (2019).
- 14) K. M. LaBarbera et al.: Modeling the mature CNS: A predictive screening platform for neurodegenerative disease drug discovery, *Journal of neuroscience methods* 358, 109180 (2021).
- 15) T. Shirao et al.: The role of drebrin in neurons, *Journal of Neurochemistry*, Vol. 141, pp. 819–834 (2017).
- 16) Y. Sekino et al.: Activation of N-methyl-d-aspartate receptor induces a shift of drebrin distribution: Disappearance from dendritic spines and appearance in dendritic shafts, *Molecular and Cellular Neuroscience*, Vol. 31, pp. 493–504 (2006).
- 17) J. Müller et al.: High-resolution CMOS MEA platform to study neurons at subcellular, cellular, and network levels, *Lab on a Chip* 15, pp. 2767–2780 (2015).
- 18) S. Ronchi et al.: Hierlemann: Electrophysiological Phenotype Characterization of Human iPSC-Derived Neuronal Cell Lines by Means of High-Density Microelectrode Arrays, *Advanced Biology* 5, pp. 1–16 (2021).
- 19) B. Dejanovic, M. Sheng, J. E. Hanson: Targeting synapse function and loss for treatment of neurodegenerative diseases, *Nat Rev Drug Discov* 23, pp. 23–42 (2024).
- 20) O. D. Howes, E. C. Onwordi: The synaptic hypothesis of schizophrenia version III: a master mechanism, *Mol Psychiatry* 28, pp. 1843–1856 (2023).
- 21) H. Krasner et al.: From Stress to Synapse: The Neuronal Atrophy Pathway to Mood Dysregulation, *IJMS* 26, p. 3219 (2025).
- 22) C. F. Lippa et al.: A β -42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease, *Lancet*, Vol. 352(9134), pp. 1117–1118 (1998).
- 23) J. Hardy, D. J. Selkoe: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, Vol. 297(5580) pp. 353–356 (2002).
- 24) J. G. Wood et al.: Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau), *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 83(11), pp. 4040–4043 (1986).
- 25) M. T. Heneka et al.: Neuroinflammation in Alzheimer disease, *Nat Rev Immunol*, Vol. 25(5), pp. 321–352 (2025).
- 26) E. H. Corder et al.: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science*, Vol. 261(5123), pp. 921–923 (1993).
- 27) J. Avila et al.: Role of tau protein in both physiological and pathological conditions, *Physiol Rev*, Vol. 84(2), pp. 361–384 (2004).
- 28) C. Despres et al.: Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 114(34), pp. 9080–9085 (2017).