

# ヒト iPSC 由来感覚神経細胞の特徴と DRG の代替モデルとしての可能性

## Characteristics of human iPSC-derived sensory neurons and their potential as an alternative model for DRG

○平沼南美<sup>1</sup>, 奥田雄一<sup>1</sup>, 渡邊朝久<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 株式会社リプロセル



### 背景

hiPSC由来神経細胞はヒト由来であり、大量製造が可能であるため、薬剤応答解析などに利用され始めている。リプロセルではhiPSC由来神経細胞のラインナップとしてhiPSC由来感覚神経細胞を新たに開発した。感覚神経は感覚器官に生じた刺激を電気信号として中枢に伝える求心性神経である。非侵害性・侵害性刺激により誘発される1次求心性神経細胞は脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion (以下、DRG)) に存在し、DRG感覚神経は侵害受容反応の*in vitro*モデルとして使用されている。しかしながら、利用されているマウス、ラット由来DRGは収量が低く、培養が難しいという問題点が存在する。そこで我々は、ヒト由来のiPS細胞から感覚神経細胞への誘導を試みた。hiPSCを利用することで種間の差や供給安定性の問題を解決できると考えられる。誘導されたhiPSC由来感覚神経は性状、機能確認のため、感覚神経関連遺伝子発現量解析、免疫蛍光染色を行った。また、Multi-Electrode Array (MEA) による薬剤応答解析を行い、DRGと同等な機能を有するか確かめた。

### StemRNA Sensory Neuron

#### [製品規格]

- ・凍結vial
- ・凍結解凍後細胞数： $>1.0 \times 10^6$  cells/vial
- ・感覚神経細胞数： $>1.5 \times 10^5$  cells/vial

#### [推奨培地]

- ・Sensory Neuron Culture Medium (RCDN103)

### 免疫蛍光染色

Fig.1

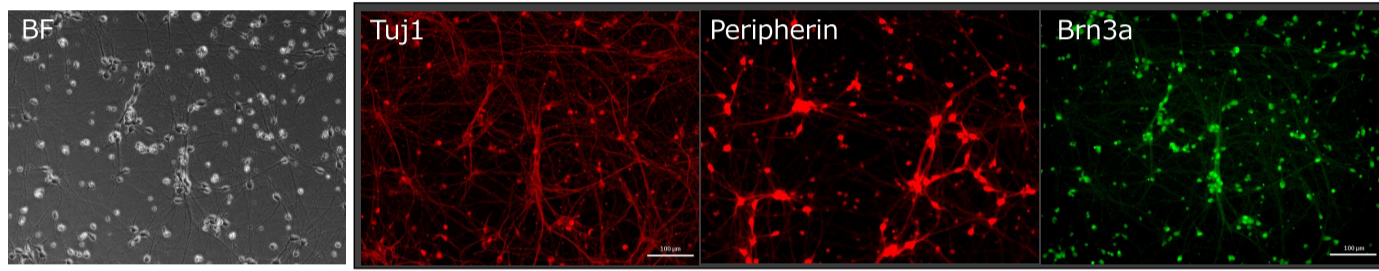
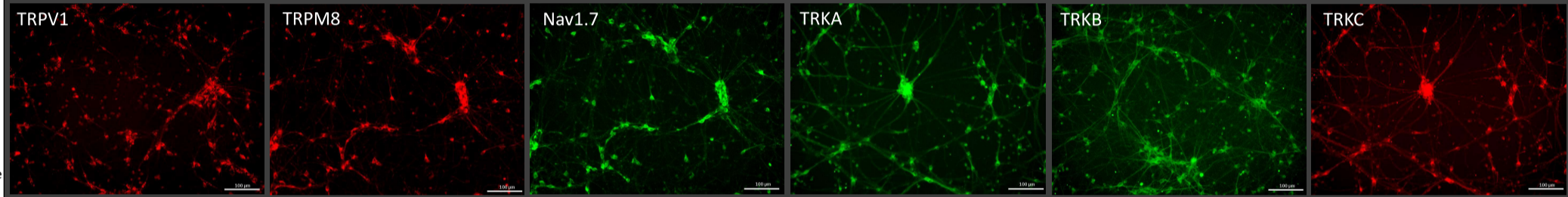


Fig.1 解凍播種後14日目の免疫蛍光染色画像  
1.5 × 10<sup>5</sup> cells/well (24 well plate) で播種し、Sensory Neuron Culture Mediumを用いて培養した



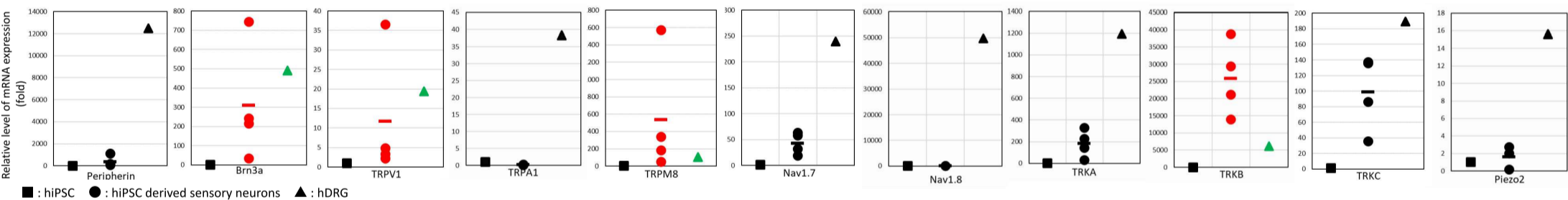
Tuj1: 成熟神経マーカー  
Peripherin: 末梢神経マーカー  
Brn3a: 感覚神経マーカー  
TRPV1: 受容体 (カプサイシン)  
TRPM8: 受容体 (メントール)  
Nav1.7: 電位依存性Naチャンネル  
TRKA: NGF (nerve growth factor)受容体  
TRKB: BDNF (brain-derived neurotrophic factor)受容体  
TRKC: NT-3 (neurotrophin-3)受容体

神経マーカーや末梢神経マーカー、各種感覚神経関連タンパク質が染色された

### 感覚神経関連遺伝子発現量

Fig.2 解凍播種後14日目のリアルタイムPCR解析  
hiPSCを1とした

Fig.2



Peripherin, Brn3a, TRPチャンネル、高親和性ニューロトロフィン受容体がhiPSCより顕著に増加した。Brn3a, TRPV1, TRPM8, TRKBはhDRGと同程度に発現した

### MEAによる薬剤応答解析

- ・解析機器: Maestro Edge (Axion)
- ・使用plate: CytoView MEA 24-White
- ・播種細胞数:  $1.5 \times 10^5$  cells/well/1.1 mm<sup>2</sup>

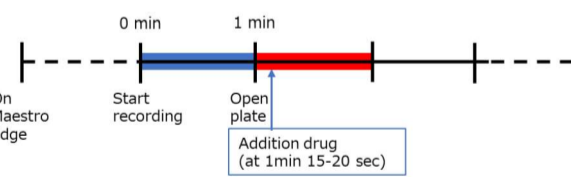


Fig.3 100 nM capsaicinによる感覚神経の電気生理学的応答

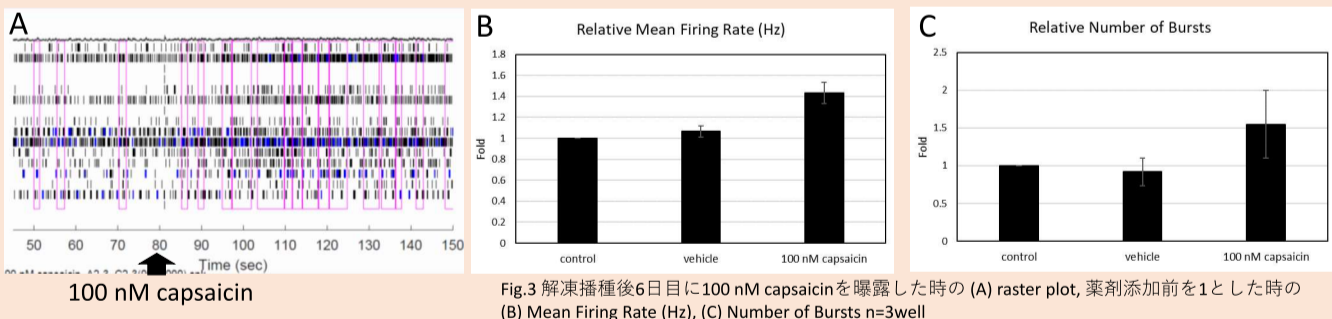


Fig.3 解凍播種後6日目に100 nM capsaicinを曝露した時の (A) raster plot, 薬剤添加前を1とした時の (B) Mean Firing Rate (Hz), (C) Number of Bursts n=3well

Fig.4 1 nM mentholによる感覚神経の電気生理学的応答

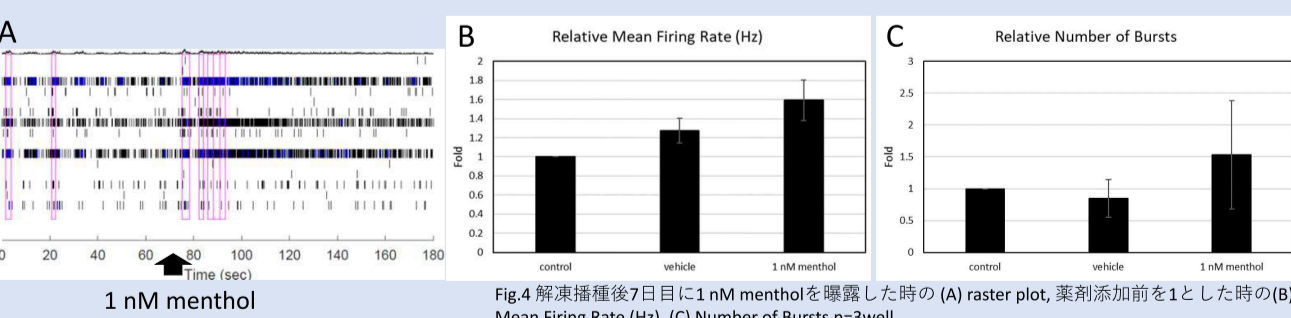


Fig.4 解凍播種後7日目に1 nM mentholを曝露した時の (A) raster plot, 薬剤添加前を1とした時の (B) Mean Firing Rate (Hz), (C) Number of Bursts n=3well

Fig.5 感覚神経の温度応答

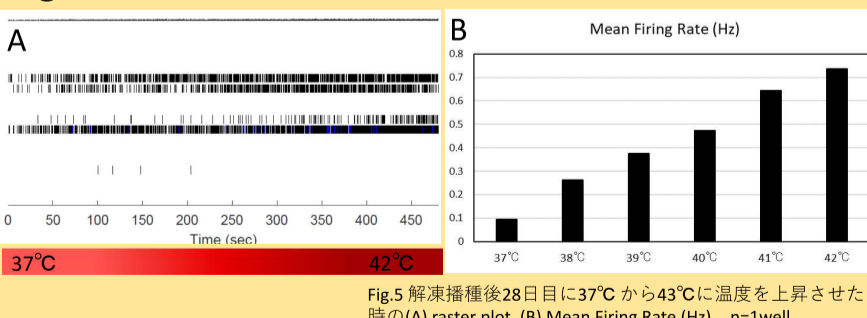


Fig.5 解凍播種後28日目に37°Cから43°Cに温度を上昇させた時の (A) raster plot, (B) Mean Firing Rate (Hz) n=1well

Fig.6 100 nM Bradykininによる感覚神経の電気生理学的応答

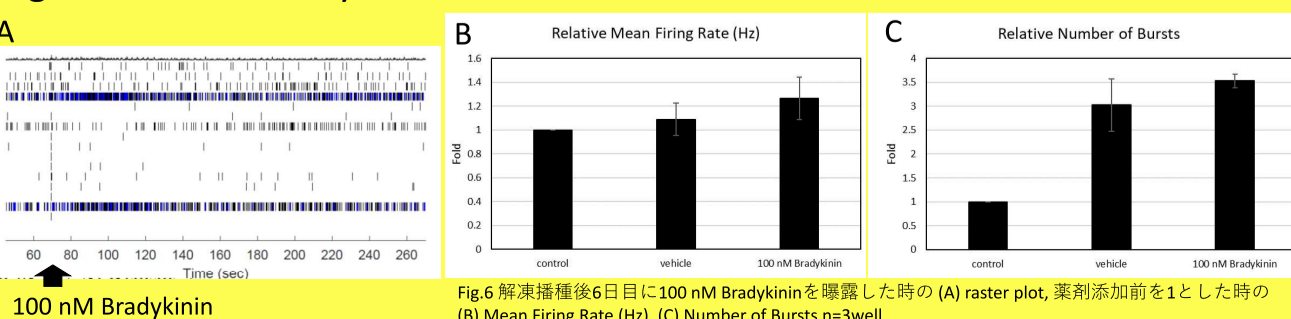


Fig.6 解凍播種後6日目に100 nM Bradykininを曝露した時の (A) raster plot, 薬剤添加前を1とした時の (B) Mean Firing Rate (Hz), (C) Number of Bursts n=3well

感覚神経はcapsaicin, menthol, 温度, Bradykininへの反応が見られた

### 結論

- 我々が今回開発した感覚神経は
  - ✓ 感覚神経関連タンパク質が発現した
  - ✓ 感覚神経関連遺伝子が発現した
  - ✓ capsaicin, menthol, 温度, Bradykininへの反応が見られた
- ➡ Primay DRGを代替できる細胞であることが示唆された