



FACT SHEETS

Human Cells and Tissue in Pre-clinical Studies: Induced Pluripotent Stem Cells

前臨床試験におけるヒト細胞と組織： 人工多能性幹細胞(iPS細胞)

2022 痛みの知識を実践に生かす

GLOBAL YEAR

痛みは差し迫った危険を警告するものではあるが、慢性的な痛みは不適応状態であり、世界的に未解決な医療課題であり続けている。侵害受容器は、侵害刺激(組織の損傷を引き起こす可能性のある刺激)の検出に特化した感覚ニューロンである。それらは通常では興奮するには高い閾値が必要であるが、神経損傷、組織の炎症または遺伝的障害により侵害受容器の感作を引き起こし、慢性的な痛みを引き起こす可能性がある。これらのニューロンの興奮性の分子基盤と、それらが病気や傷害にどのように反応するかを理解することは、新しいより効果的な鎮痛薬の開発にとって重要である。同様に重要なことは、これらの標的の特性に種特異的な違いが存在する可能性があるため、ヒトの神経細胞との相同性がある新規治療法の分子標的に関する前臨床試験が不可欠である。

痛みを研究するための現在の実験的アプローチ

痛みの新しい治療法の開発の成功は、基礎的な前臨床の知見とその臨床への応用（橋渡し）との間のギャップを埋めるために対処しなければならない複数の要因によって妨げられてきた。動物実験は、侵害刺激の伝達と、伝達における特定の分子と回路の役割を解明するため、および前臨床の *in vivo* 薬理学研究[27]にとって非常に貴重だが、疼痛試験の方法論が、臨床的に有用な薬の[36]開発を成功させるにあたっての 1 つの障害として認識されている。動物の痛みの行動をテストするための新しい方法論は、より臨床への橋渡し研究に関連した結果のために開発された[31; 40]。

もう 1 つの障害は、新しい開発薬のいくつかの標的の分子レベルおよび機能レベルでの種特異的な違いである[5; 11-13; 16; 29; 33; 41]。したがって、ヒトの細胞モデルにおける開発薬の試験は、ヒトへの応用への「架け橋」である[28]。

人工多能性幹細胞(iPS 細胞)に由来する感覚ニューロン

開発薬の前臨床研究で後根神経節神経細胞を含むヒト細胞を使用することには、生来の細胞環境での開発薬の標的の関与と有効性を評価する利点がある。細胞についての分析でヒト後根神経節神経細胞を使用することへの関心と実践への期待が高まっているが、前臨床研究で広く使用するために生理的な後根神経節神経細胞を大規模に取得することは依然として困難である[28]。後根神経節神経細胞は有糸分裂後の細胞であることから、大規模なゲノム工学や増殖に適していない。感覚神経細胞を人工多能性幹細胞 iPSC (iPSC-SN) から区別するアプローチの開発[2]により、神経損傷と過興奮のメカニズムを含む疾患の病態生理学の理解、開発費が大きい臨床試験に着手する前に新薬をスクリーニングおよび検証するための細胞を基盤とした解析の開発、およびバイオマーカーの同定と検証、または iPSC-SN が 疾患自体のバイオマーカー[22; 32]として機能する技術プラットフォームが実現した。

病気のメカニズムを研究するための iPSC-SN

iPS 細胞は、個人の遺伝的背景と生来の転写機構を保持している[14; 30; 39]。したがって、遺伝子を過剰発現させた動物または遺伝子改変動物研究から生じる可能性のある潜在的なアーティファクトの影響を受けない疾患のメカニズム解明

研究を可能にする。患者固有の iPSC-SN は、痛みの“疾患最小単位の実験モデル”となり、Nav1.7 に関連する遺伝性肢端紅痛症(IEM)と先天性無痛症(CIP)がその最たる例である[1; 19; 21; 23; 38]。Nav1.7 で機能獲得型変異を有する患者固有の iPSC-SN は、対照被験者の細胞よりも興奮性が高いことが示されており[1; 21; 23]、これらの突然変異の保因者が経験する痛みの増幅と一致している。対照的に、Nav1.7 関連 CIP 患者の iPSC-SN は、対照株よりも興奮性が低かった。CRISPR-Cas9 ゲノム編集を使用して変異の 1 つを修正すると、興奮性が正常化されたことは重要である[19]。痛みのメカニズムを研究するために使用される患者固有の iPSC-SN の他の例には、片頭痛[26]や、小径線維末梢神経障害(SFN)やファブリー病[15]などのさまざまなタイプの神経障害が含まれる。

小径線維末梢神経障害(SFN)は、皮膚の表皮内神経線維の数の減少の成人発症、および灼熱感を伴う慢性疼痛の臨床症状としばしば関連している。電位依存性ナトリウムチャンネルの変異と関連しており[9]、iPSC-SN は、神経細胞の興奮性に対するこれらの変異の影響を研究し[25]、細胞機能と神経線維の解剖学的喪失との関連を研究するための有用なモデルである。遺伝性感覚ニューロパチー1 型(HSN-1)は、SPTLC1 遺伝子のヘテロ接合変異に起因する、特に小径神経線維に影響を与える有痛性のニューロパチーである。これにより、スフィンゴ脂質の代謝が変化し、有毒なデオキシスフィンゴバース(DSB)が生成される。上昇した DSB は、HSN1 患者のヒト iPSCd-SN で検出可能であり、複数のガングリオシドの産生の低下、軸索変性、および過興奮性を伴う。次に、これらを使用して DSB 産生を減少させる疾患修飾療法を検証したり、DSB の産生を減少させるセリンの投与によりこれらの変化の多くを防止することができた[3]。

個別化医療のための iPSC-SN

患者固有の iPSC-SN の開発は、特定の薬物治療に対するこれらの神経細胞の反応性を検証する機会となる。シャーレ中の患者固有の iPSC-SN の特定の薬剤に対する興奮性の減衰は、in vivo での薬剤が標的とする分子の関与に加え、そのような薬剤が患者においても治療効果を示す可能性があるとの期待を示唆する。その一方で、in vitro での神経細胞の薬剤反応性が悪い場合には、この薬剤を服用しても患者の痛みには効果がない可能性があることを示唆する。これが個別化医

療の本質であり、治療選択において試行錯誤する必要性を減らす。患者固有の iPSC-SN を使用して、この個別化医療アプローチを行っている症例は少数である [1; 25]。このアプローチは小規模な臨床研究で役立つ可能性があるが、iPSC-SN の生成と保守は集中的な作業と費用がかかるため、一般診療に普及して役立つためには、個別化医療アプローチをスケールアップして自動化する必要がある。

iPSC-SN: 医薬品開発の新しい標的を特定するための遺伝子基質

先天性無痛症(CIP)の場合を除いて、侵害刺激に対する痛み反応は普遍的であるが、個人レベルでのその経験は様々に異なる。同じ侵害刺激に対しても個人毎に反応が異なることは、遺伝的および非遺伝的要因に関連している [4; 6; 17; 24; 42]。患者固有の iPSC-SN における痛みと神経の過興奮性との類似点は、個々の痛みの経験に寄与する修飾遺伝子を発見する機会となる可能性がある。最近の研究では、Nav1.7 の機能獲得型変異 S241T または F1449V による遺伝性肢端紅痛症(IEM)の家系の中でも、痛みについて明らかに異なる特徴をもつ表現型の発現が顕著な者を対象とすることが行われている [10; 20; 38]。このような研究により、これらの研究対象者の痛みの臨床症状の個人差に寄与すると考えられる神経興奮性の個人差を引き起こす修飾遺伝子を探索する“痛みとその回復”に関する最小単位の基礎研究が開始されており、そのような基礎研究モデルを確立し妥当性が検証されることが目的となっている [23; 38]。偏りのない全エクソームスクリーニングと *in silico* 分析により、回復力のある被験者から Kv7.2 と Kv7.3 の変異が特定され、これらの変異はその機能テストから iPSC-SNs の興奮性を調節する役割があることが明らかになった。このことは、痛みの回復における末梢成分の存在を支持するとともに Kv7 チャンネルを標的とすることにより効果的な鎮痛薬開発に繋がる可能性を示唆する。Kv7 チャンネルは疼痛研究領域において確立された標的であり、Kv7.2 / Kv7.3 チャンネルオープナーは疼痛の動物モデルにおける侵害受容行動を弱める [7; 35]。さらに、これに加えて、これらの被験者で示される痛み刺激に対する総合的な反応には追加の修飾遺伝子が間違いなく関与している。このような細胞-自律アプローチは、追加の修飾遺伝子の同定につながる可能性があり、このような研究により薬剤開発の新しい標的につながる可能性がある。

結語

患者固有の iPSC-SN は、神経細胞の興奮性を患者の痛みの表現型に関連付けることができ、薬剤または他の治療法の反応性を分析するための強力な細胞-自律型実験系を提供し、治験薬開発における前臨床データの価値を強化することに繋がる。ただし、成人の後根神経節神経細胞に観察される転写産物の 80%は共通であるという報告にもかかわらず[37]、iPSC-SN はヒト後根神経節神経細胞の不均一性を完全には説明できていない [8; 22]。さらに、現在の分化プロトコルは、生理的な神経細胞に存在するエレクトロジェノソーム成分の完全な補体を再現性よく生成することに成功していない[8]。これらの限界にもかかわらず、iPSC-SN およびヒト後根神経節神経細胞(利用可能な場合)を用いた *in vitro* 研究は、痛みの病態生理学の細胞基盤の理解をすでに進化させており、開発薬に関する前臨床データから臨床使用への橋渡しの成功確率を高めることに貢献している。これらの限界に対処し、前臨床試験における iPSC の有用性を改善するための有望なアプローチが既にある。iPSC-SN と iPSC 由来の皮膚組織の共培養によって、「シャーレ内臓器」実験系が作成されている。その他の重要な進歩には、*in vivo* での齧歯類後根神経節へのヒト iPSC を移植[34]したり、後根神経節オルガノイドを成長させる方法[18]があり、いずれもより生理的な環境でヒト感覚神経細胞を分化させるのに優位な微少環境を提供する利点がある。したがって、被験者固有の iPSC の使用は、この分野での重要な進歩を示し、前臨床知識と効果的な鎮痛薬の開発との間の橋渡しのギャップを埋めるのに役立つと予測できる。

REFERENCES

[1] Cao L, McDonnell A, Nitzsche A, Alexandrou A, Saintot PP, Loucif AJ, Brown AR, Young G, Mis M, Randall A, Waxman SG, Stanley P, Kirby S, Tarabar S, Gutteridge A, Butt R, McKernan RM, Whiting P, Ali Z, Bilslund J, Stevens EB. Pharmacological reversal of a pain phenotype in iPSC-derived sensory neurons and patients with inherited erythromelalgia. *Sci Transl Med* 2016;8(335):335ra356.

[2] Chambers SM, Qi Y, Mica Y, Lee G, Zhang XJ, Niu L, Bilslund J, Cao L, Stevens E, Whiting P, Shi SH, Studer L. Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. *Nat Biotechnol* 2012;30(7):715-720.

[3] Clark AJ, Kugathasan U, Baskozos G, Priestman DA, Fugger N, Lone MA, Othman A, Chu KH, Blesneac I, Wilson ER, Laura M, Kalmar B, Greensmith L, Hornemann T, Platt FM, Reilly MM, Bennett DL. An iPSC model of hereditary sensory neuropathy-1 reveals L-serine-responsive deficits in neuronal ganglioside composition and axoglial interactions. *Cell Rep Med* 2021;2(7):100345.

[4] Denk F, McMahon SB, Tracey I. Pain vulnerability: a neurobiological perspective. *Nat Neurosci* 2014;17(2):192-200.

[5] Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Cummins TR, Black JA, Wood PM, Waxman SG. Two tetrodotoxin-resistant sodium channels in human dorsal root ganglion neurons. *FEBS Lett* 1999;462(1-2):117-120.

[6] Dib-Hajj SD, Waxman SG. Translational pain research: Lessons from genetics and genomics. *Sci Transl Med* 2014;6(249):249sr244.

[7] Du X, Gao H, Jaffe D, Zhang H, Gamper N. M-type K(+) channels in peripheral nociceptive pathways. *Br J Pharmacol* 2018;175(12):2158-2172.

[8] Eberhardt E, Havlicek S, Schmidt D, Link AS, Neacsu C, Kohl Z, Hampl M, Kist AM, Klinger A, Nau C, Schuttler J, Alzheimer C, Winkler J, Namer B, Winner B, Lampert A. Pattern of Functional TTX-Resistant Sodium Channels Reveals a Developmental Stage of Human iPSC- and ESC-Derived Nociceptors. *Stem Cell Reports* 2015;5(3):305-313.

[9] Eijkenboom I, Sopacua M, Hoeijmakers JGJ, de Greef BTA, Lindsey P, Almomani R, Marchi M, Vanoevelen J, Smeets HJM, Waxman SG, Lauria G, Merkies ISJ, Faber CG, Gerrits MM. Yield of peripheral sodium channels gene screening in pure small fibre neuropathy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2019;90(3):342-352.

[10] Geha P, Yang Y, Estacion M, Schulman BR, Tokuno H, Apkarian AV, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Pharmacotherapy for Pain in a Family With Inherited Erythromelalgia Guided by Genomic Analysis and Functional Profiling. *JAMA Neurol* 2016;73(6):659-667.

[11] Giblin JP, Etayo I, Castellanos A, Andres-Bilbe A, Gasull X. Anionic Phospholipids Bind to and Modulate the Activity of Human TRESK Background K(+) Channel. *Mol Neurobiol* 2019;56(4):2524-2541.

[12] Han C, Estacion M, Huang J, Vasylyev DV, Zhao P, Dib-Hajj S, Waxman SG. Human Nav1.8: enhanced persistent and ramp currents contribute to distinct firing properties of human DRG neurons. *J Neurophysiol* 2015;113(9):3172-3185.

[13] Hartung JE, Moy JK, Loeza-Alcocer E, Nagarajan V, Jostock R, Christoph T, Schroeder W, Gold MS. Voltage gated calcium channels in human dorsal root ganglion neurons. *Pain* 2021(doi: 10.1097/j.pain.0000000000002465.).

[14] Inoue S, Murata K, Tanaka A, Kakuta E, Tanemura S, Hatakeyama S, Nakamura A, Yamamoto C, Kosakai K, Yoshino M. Ionic channel mechanisms mediating the intrinsic excitability of Kenyon cells in the mushroom body of the cricket brain. *J Insect Physiol* 2014.

[15] Klein T, Gunther K, Sommer CL, Edenhofer F, Uceyler N. Generation of patient-derived sensory neurons using iPSCs & smNPCs obtained from patients with Fabry disease. <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/4376/presentation/19713> 2017.

[16] Liu C, Au JD, Zou HL, Cotten JF, Yost CS. Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth Analg* 2004;99(6):1715-1722.

[17] Lotsch J, Doehring A, Mogil JS, Arndt T, Geisslinger G, Ultsch A. Functional genomics of pain in analgesic drug development and therapy. *Pharmacol Ther* 2013;139(1):60-70.

[18] Mazzara PG, Muggeo S, Luoni M, Massimino L, Zaghi M, Valverde PT, Brusco S, Marzi MJ, Palma C, Colasante G, Iannielli

A, Paulis M, Cordiglieri C, Giannelli SG, Podini P, Gellera C, Taroni F, Nicassio F, Rasponi M, Broccoli V. Frataxin gene editing rescues Friedreich's ataxia pathology in dorsal root ganglia organoid-derived sensory neurons. *Nat Commun* 2020;11(1):4178.

[19] McDermott LA, Weir GA, Themistocleous AC, Segerdahl AR, Blesneac I, Baskozos G, Clark AJ, Millar V, Peck LJ, Ebner D, Tracey I, Serra J, Bennett DL. Defining the Functional Role of Nav1.7 in Human Nociception. *Neuron* 2019;101(5):905-919

[20] McDonnell A, Schulman B, Ali Z, Dib-Hajj SD, Brock F, Cobain S, Mainka T, Vollert J, Tarabar S, Waxman SG. Inherited erythromelalgia due to mutations in SCN9A: natural history, clinical phenotype and somatosensory profile. *Brain* 2016;139((Pt 4)):1052-1065.

[21] Meents JE, Bressan E, Sontag S, Foerster A, Hautvast P, Rosseler C, Hampl M, Schuler H, Goetzke R, Chi Le TK, Kleggetveit IP, Le Cann K, Kerth C, Rush AM, Rogers M, Kohl Z, Schmelz M, Wagner W, Jorum E, Namer B, Winner B, Zenke M, Lampert A. The role of Nav1.7 in human nociceptors: insights from human iPS cell-derived sensory neurons of erythromelalgia patients. *Pain* 2019.

[22] Middleton SJ, Barry AM, Comini M, Li Y, Ray PR, Shiers S, Themistocleous AC, Uhelski ML, Yang X, Dougherty PM, Price TJ, Bennett DL. Studying human nociceptors: from fundamentals to clinic. *Brain* 2021;144(5):1312-1335.

[23] Mis MA, Yang Y, Tanaka BS, Gomis-Perez C, Liu S, Dib-Hajj F, Adi T, Garcia-Milian R, Schulman BR, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Resilience to Pain: A Peripheral Component Identified Using

Induced Pluripotent Stem Cells and Dynamic Clamp. *J Neurosci* 2019;39(3):382-392.

[24] Mogil JS. Sources of Individual Differences in Pain. *Annu Rev Neurosci* 2021;44:1-25.

[25] Namer B, Schmidt D, Eberhardt E, Maroni M, Dorfmeister E, Kleggetveit IP, Kaluza L, Meents J, Gerlach A, Lin Z, Winterpacht A, Dragicevic E, Kohl Z, Schuttler J, Kurth I, Warncke T, Jorum E, Winner B, Lampert A. Pain relief in a neuropathy patient by lacosamide: Proof of principle of clinical translation from patient-specific iPS cell-derived nociceptors. *EBioMedicine* 2019;39:401-408.

[26] Pettingill P, Weir GA, Wei T, Wu Y, Flower G, Lalic T, Handel A, Duggal G, Chintawar S, Cheung J, Arunasalam K, Couper E, Haupt LM, Griffiths LR, Bassett A, Cowley SA, Cader MZ. A causal role for TRESK loss of function in migraine mechanisms. *Brain* 2019;142(12):3852-3867.

[27] Price TJ, Basbaum AI, Bresnahan J, Chambers JF, De Koninck Y, Edwards RR, Ji RR, Katz J, Kavelaars A, Levine JD, Porter L, Schechter N, Sluka KA, Terman GW, Wager TD, Yaksh TL, Dworkin RH. Transition to chronic pain: opportunities for novel therapeutics. *Nat Rev Neurosci* 2018;19(7):383-384.

[28] Renthal W, Chamesian A, Curatolo M, Davidson S, Burton M, Dib-Hajj S, Dougherty PM, Ebert AD, Gereau RWt, Ghetti A, Gold MS, Hoben G, Menichella DM, Mercier P, Ray WZ, Salvemini D, Seal RP, Waxman S, Woolf CJ, Stucky CL, Price TJ. Human cells and networks of pain: Transforming pain target identification and therapeutic development. *Neuron* 2021;109(9):1426-1429.

[29] Serrano A, Mo G, Grant R, Pare M, O'Donnell D, Yu XH, Tomaszewski MJ, Perkins MN, Seguela P, Cao CQ. Differential expression and pharmacology of native P2X receptors in rat and primate sensory neurons. *J Neurosci* 2012;32(34):11890-11896.

[30] Soliman MA, Aboharb F, Zeltner N, Studer L. Pluripotent stem cells in neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 2017;22(9):1241-1249.

[31] Tappe-Theodor A, King T, Morgan MM. Pros and Cons of Clinically Relevant Methods to Assess Pain in Rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2019;100:335-343.

[32] Tracey I, Woolf CJ, Andrews NA. Composite Pain Biomarker Signatures for Objective Assessment and Effective Treatment. *Neuron* 2019;101(5):783-800.

[33] Valeyev AY, Hackman JC, Wood PM, Davidoff RA. Pharmacologically novel GABA receptor in human dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 1996;76(5):3555-3558.

[34] Viventi S, Frausin S, Howden SE, Lim SY, Finol-Urdaneta RK, McArthur JR, Abu-Bonsrah KD, Ng W, Ivanusic J, Thompson L, Dottori M. In vivo survival and differentiation of Friedreich ataxia iPSC-derived sensory neurons transplanted in the adult dorsal root ganglia. *Stem Cells Transl Med* 2021;10(8):1157-1169.

[35] Wu Z, Li L, Xie F, Du J, Zuo Y, Frost JA, Carlton SM, Walters ET, Yang Q. Activation of KCNQ Channels Suppresses Spontaneous Activity in Dorsal Root Ganglion Neurons and Reduces Chronic Pain after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* 2017;34(6):1260-1270.

[36] Yezierski RP, Hansson P. Inflammatory and Neuropathic Pain From Bench to Bedside: What Went Wrong? *J Pain* 2018;19(6):571-588.

[37] Young GT, Gutteridge A, Fox HD, Wilbrey AL, Cao L, Cho LT, Brown AR, Benn CL, Kammonen LR, Friedman JH, Bictash M, Whiting P, Bilsland JG, Stevens EB. Characterizing Human Stem Cell-derived Sensory Neurons at the Single-cell Level Reveals Their Ion Channel Expression and Utility in Pain Research. *Mol Ther* 2014;22(8):1530-1543.

[38] Yuan JH, Estacion M, Mis MA, Tanaka BS, Schulman BR, Chen L, Liu S, Dib-Hajj FB, Dib-Hajj SD, Waxman SG. KCNQ variants and pain modulation: a missense variant in Kv7.3 contributes to pain resilience. *Brain Commun* 2021;3(3):fcab212.

[39] Zeltner N, Studer L. Pluripotent stem cell-based disease modeling: current hurdles and future promise. *Curr Opin Cell Biol* 2015;37:102-110.

[40] Zhang H, Lecker I, Collymore C, Dokova A, Pham MC, Rosen SF, Crawhall-Duk H, Zain M, Valencia M, Filippini HF, Li J, D' Souza AJ, Cho C, Michailidis V, Whissell PD, Patel I, Steenland HW, Virginia Lee WJ, Moayed M, Sterley TL, Bains JS, Stratton JA, Matyas JR, Biernaskie J, Dubins D, Vukobradovic I, Bezginov A, Flenniken AM, Martin LJ, Mogil JS, Bonin RP. Cage-lid hanging behavior as a translationally relevant measure of pain in mice. *Pain* 2021;162(5):1416-1425.

[41] Zhang X, Priest BT, Belfer I, Gold MS. Voltage-gated Na⁺ currents in human dorsal root ganglion neurons. *Elife* 2017;6.



[42] Zorina-Lichtenwalter K, Meloto CB, Khoury S, Diatchenko L. Genetic predictors of human chronic pain conditions. *Neuroscience* 2016;338:36-62.

AUTHORS

Angelika Lampert, David L. Bennett, Nurcan Üçeyler, and Sulayman D. Dib-Hajj

Translation

Mizuho Sumitani, MD

Department of Pain and Palliative Medicine, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

Masahiko Sumitani, MD, PhD

Department of Pain and Palliative Medicine, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

Department of Pain and Palliative Medical Sciences, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan