



# ヒト脳オルガノイドの多機能同時計測法の開発と薬効評価

## 1. 研究の目的

ヒト脳オルガノイドの電気活動と神経伝達物質放出（グルタミン酸・GABA）の同時計測技術を確立し、ヒト脳オルガノイドのオシレーションを指標とした薬効評価系の構築を目的とする。

## 2. 研究の計画

(1) 疾患 iPSC 由来脳オルガノイドの作製法の確立と脳オルガノイドのオシレーション特性の評価を行う。

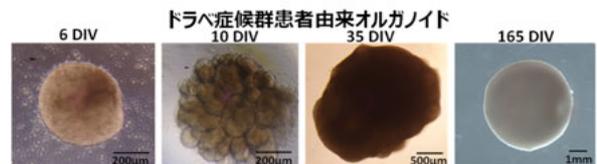
健常者 iPSC でこれまで実施してきた大脳皮質オルガノイドのプロトコルを用いて、疾患 iPSC から疾患脳オルガノイド作製プロトコルを検討する。作製した脳オルガノイドを平面微小電極アレイ（MEA）上にマウントし、電気活動の周波数特性を明らかにする。ウェーブレット変換、FFT等の解析手法で、各周波数成分の強度を定量し、健常者と各疾患脳オルガノイドの周波数特性の差異を明らかにする。

(2) 細胞外電位と同時に主要な神経伝達物質であるグルタミン酸・GABA 放出量を計測可能な酵素電極を開発する。

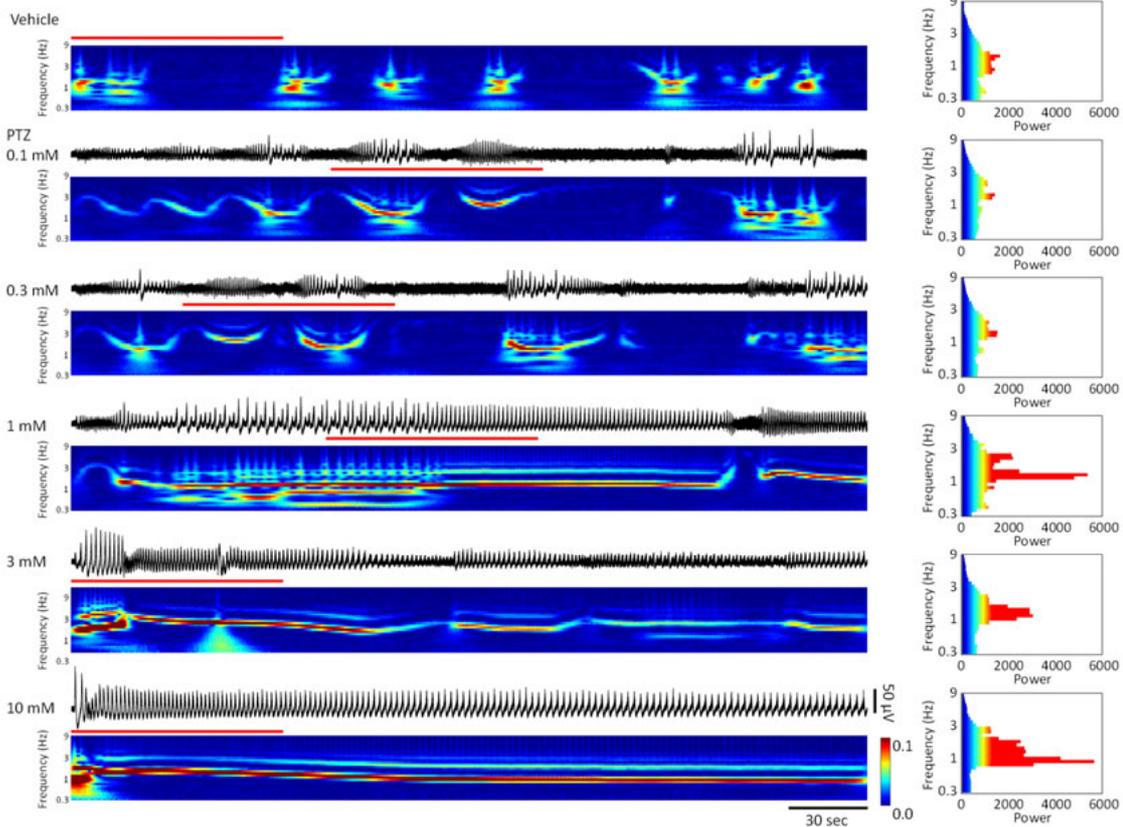
グルタミン酸、GABA を電気化学的に検出する為に、酵素電極を作製する。Glutamate oxidase (GOx) 及び GABA 酵素の電極への塗布法を検討し、グルタミン酸及び GABA の検出感度を明らかにする。検出限界濃度 100nM 以下、線形検出範囲 0.1-10 $\mu$ M を達成目標とする。

## 3. 研究の成果

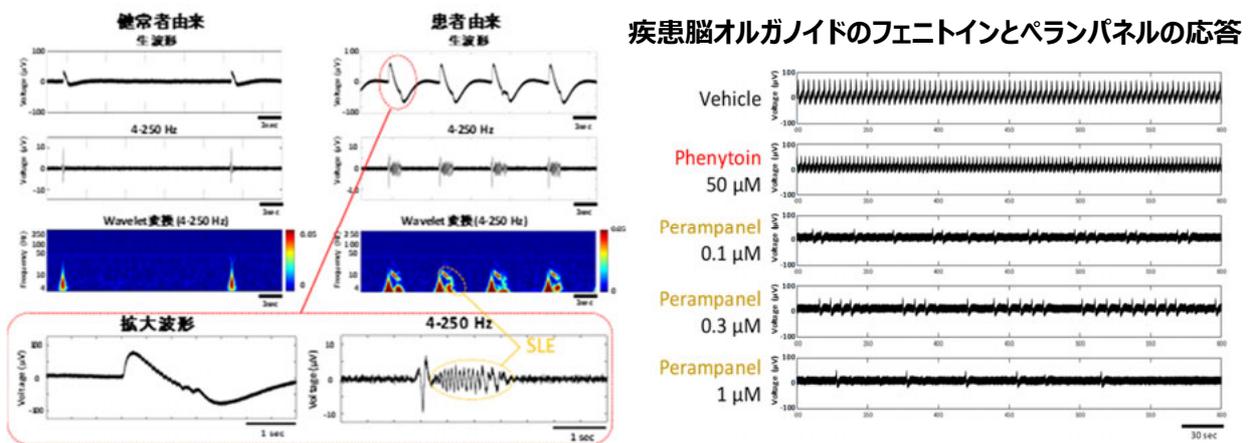
(1) 疾患ヒト iPSC 株、健常者株を用いて、脳オルガノイドの作製を行った。本年度は、初めに脳オルガノイド作製の成功率向上の鍵となる iPSC 細胞の純化プロトコルを検討した。プレートコーティングを Vitronectin XF™、培地を mTeSR Plus、細胞剥離剤を ReLeSR™ に変更し、細胞剥離時にスクレーパーを使用しないプロトコルを確立したことで、オルガノイド作製効率が上昇した。但し、株間でオルガノイド作製効率が異なった為、各疾患株から最も成功率の高い株を選定し、優先的に作製することとした。オルガノイド作製過程において、(1) Embryoid Body formation 形成後（24 時間後）、形態が丸くなめらかなエッジであること、(2) Induction（Day5-7）時に外周が半透明かつなめらかなエッジであること、(3) Expansion（Day7-10）時に表面から出芽が観察されることの 3 つの評価指標を設けた。作製した脳オルガノイドは、大脳皮質関連マーカーである CTIP2,  $\beta$ -tubulinIII, SOX2, PAX6 の発現が免疫染色により確認された。



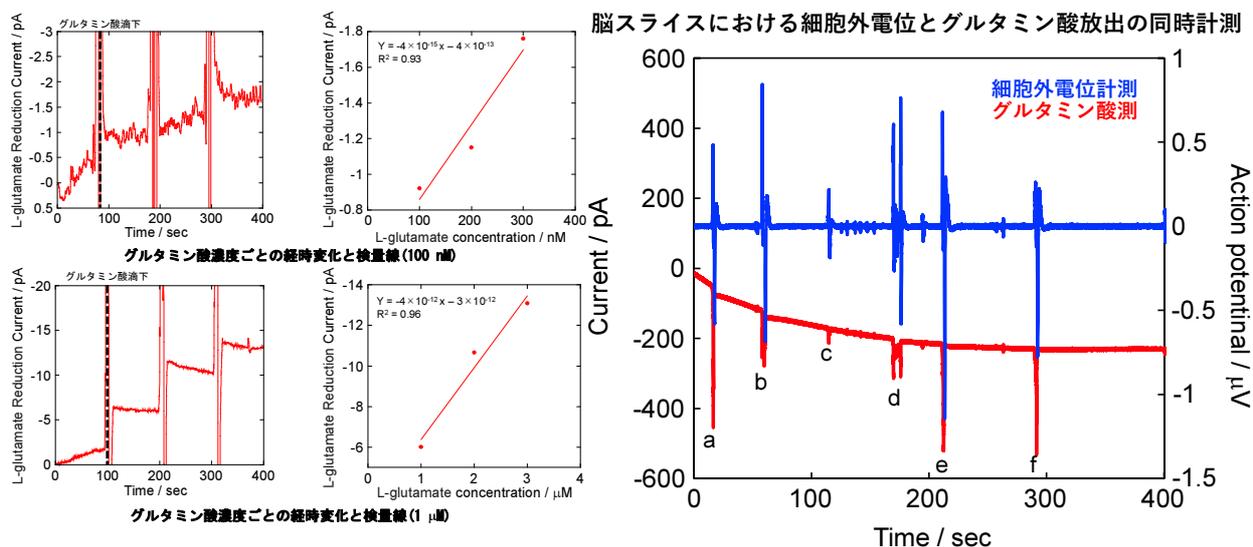
脳オルガノイドの電気活動における周波数解析法を検討した。健常者脳オルガノイドに痙攣陽性化合物であるペンチレンテトラゾール（PTZ）を投与したところ、培養細胞とは異なり、強い同期バースト発火が急激に現れ、持続する *in vivo* に近い応答が検出された。周波数特性の評価として、同期バースト発火のオシレーション特性を低周波数に着目して解析した結果、下図に示すように、1~3Hz のオシレーションが用量依存的に持続し、規則性が高くなる傾向が見られた。下図は、強い同期バースト発火が見られた直後のウェーブレット変換画像である。また、各同期バースト発火における 10Hz~250Hz の強度を解析したところ、用量依存的な強度の上昇が認められた。すなわち、同期バースト発火の発生パターンと同期バースト内の発火強度が変化していることがわかった。更に、周波数解析の結果から、一見ノイズのように見られる波形にも低周波成分に電気活動情報が内在していることがわかった。脳オルガノイドの MEA 計測法を行う上で重要な知見を得られた。これらの成果は、現在、論文投稿中である。



また、疾患脳オルガノイドの電気活動において、250Hz 以下の成分が同期的活動後に持続的に活動する Seizure-like event (SLE) が観察された (下図)。疾患患者由来の特徴の一つとして着目している。疾患脳オルガノイドにおける抗てんかん薬の応答を評価した。Na<sup>+</sup>チャンネルの阻害剤である旧世代の抗てんかん薬フェニトイン投与で、同期的活動が上昇し悪化する現象が観察され、新世代の抗てんかん薬であるペランパネルで同期活動頻度の減少が認められた (下図)。



(2) シナプス機能である神経伝達物質の放出を細胞外電位 (活動電位情報) と同時に計測する為に、カーボンナノチューブ (CNT) を電極材料とした CNT 電極を開発した。本年度は、主要な神経伝達物質であるグルタミン酸を計測する為に、酵素を塗布した CNT 電極を開発した。Glutamate oxidase (GOx) によりグルタミン酸を選択的に酸化し、発生した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を用いて高感度に検出する方法である。GOx や HRP を CNT 電極にコーティングする方法を検討した結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の検出において、1nM の検出感度と 50nM までの線形性 (R=0.99) を確認できた。50×50µm の微小電極において最も優れた感度特性を有している成果が得られた。また、グルタミン酸の検出限界 100nM 以下、線形性検出範囲 0.1-10µM を達成した (下図)。作製したグルタミン酸計測用 CNT 電極を用いて、脳スライスの海馬領域を計測したところ、グルタミン酸の放出と活動電位の同時計測にも成功した (下図)。



#### 4. 研究の反省・考察

(1) 疾患脳オルガノイドの作製および電気活動特性を検出できた点は、研究が順調に進んでいると言える。作製プロトコルの検討により、作製効率は向上したが、さらに向上させるためには、作製プロトコルの改良は必要である。健常者脳オルガノイドへのPTZ投与で、培養細胞には見られない、強い同期バースト発火の急激な出現、および持続する活動が検出された点は *in vivo* の応答に近く、*in vivo* への外挿性を検討していく上で有効な現象であると考えている。しかしながら、全てのオルガノイドサンプルで同様の現象が見られるとは限らない。脳オルガノイドの作製状態と活動状態の関係性を見出して行くことが信頼性の高い評価系を構築する上で重要であると考えられる。今後の課題としたい。疾患患者由来脳オルガノイドにおいて、抗てんかん薬であるフェニトインは適さず、ペランパネルは効果があることを示す結果が得られた。難治性てんかんでは、薬剤の選択は、医師の経験に頼るところが大きく、薬剤によっては症状を悪化させる為、至適抗てんかん薬を選定する方法が強く求められている。本研究成果は、疾患脳オルガノイドのMEA計測が、至適抗てんかん薬の選定法として有効である可能性を示唆している。同じ疾患の複数のiPS細胞株から作製した脳オルガノイドで共通する特徴が得られるかが今後の課題である。

(2) GOx と HRP の CNT 電極表面への塗布条件を明らかにしたことで、グルタミン酸の検出感度 100nM 以下、線形検出範囲 0.1-10 $\mu$ M を実現し、脳スライスからの活動電位とグルタミン酸の同時計測に成功した。脳オルガノイドからのグルタミン酸放出計測へ移行できることが示唆された。しかし、脳スライスの実験から、電極毒性を考慮する必要性も明らかとなり、今後脳オルガノイド計測における条件を検討する予定である。GABA の検出には、GABA 特異的な酵素を使用した。グルタミン酸との明確な選択性が得られなかった。酵素の種類および検出法を再検討する必要がある。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

- ① R Roberts, S Authier, D Mellon, M Morton, I Suzuki, RB Tjalkens, JP Valentin, JB Pierson, Can We Panelize Seizure?, Toxicological Sciences, 179, 3-13, 2021  
doi:10.1093/toxsci /kfaa167.
- ② Yuan X, Schröter M, Obien MEJ, Fiscella M1, Gong W, Kikuchi T, Odawara A, Noji S, Suzuki I, Takahashi J, Hierlemann A, Frey U, Versatile live-cell activity analysis platform for characterization of neuronal dynamics at single-cell and network level, Nature communication, 11, 4854, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18620-4.
- ③ 鈴木郁郎, ヒト iPS 神経の機能を指標とした医薬品の神経毒性予測および薬効評価への取り組み, 日本薬理学会誌, 155, 5, 2020, p289-294

- ④白川誉史, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた痙攣評価系の検討, 日本薬理学会誌, 155, 5, 2020, p284-288
- ⑤鈴木郁郎, 木村剛 第Ⅲ編 第9章 脱細胞化脳, “脱細胞化組織の作製法と医療・バイオ応用” シーエムシー出版

(2) 口頭発表

- ①鈴木郁郎, “iPS 神経の電気活動に基づく創薬支援”, New ノーマル ～iPS 細胞由来神経細胞の夢を語る～ニコン・エリクサジェン サイエントیفイック社ジョイントセミナー、パネルディスカッション 2020/11/19
- ②鈴木郁郎, “in vitro ヒト神経機能を指標とした創薬利活用”, 第 58 回日本人工臓器学会、特別企画 1 [日本から世界へ発信する人工臓器学] 2020/11/12-14
- ③鈴木郁郎, “神経機能を指標としたインビトロ毒性評価試験と AI”, 第 47 回日本毒性学会学術年, 日本薬理学会合同シンポジウム: 化学物質の神経毒性評価の現状と課題, 2020/6/29～7/1
- ④Shuhei Noji, Yuri Kato, Naoki Matsuda, Tadayuki Taura, Yusuke Oike Ikuro Suzuki . Evoked Responses to Electrical Stimulation in Acute Brain Slice Using a High-Density and Large-Scale CMOS-MEA System. SAFETY PHARMACOLOGY SOCIETY VIRTUAL MEETING, Dynamic presentation, September 14-17, 2020, Virtual. 口頭発表セッション
- ⑤横井 れみ, 石橋 勇人, 松田 直毅, 永福 菜美, 鈴木 郁郎, ”脳オルガノイドの MEA 計測”, 第 94 回日本薬理学会年会, 一般演題(口頭), 2021 年 3 月 8-10 日.

(3) 出版物

なし