



# iPS 細胞由来オータプス培養標本によるシナプス機能評価法開発 ーシナプス対象の神経疾患治療薬創製法開発ー

## 1. 研究の目的

### (1) 目的

本研究の目的はシナプス機能の詳細な解析に適した培養標本であるオータプス培養標本をヒト iPS 細胞より調製し、ハイスループットでニューロンの電氣的活動を評価できる次世代微小電極アレイシステムを用いてシナプス機能のスクリーニング法を開発することにある。具体的には微小孔アレイデバイスを用いてオータプス培養標本を作製する技術を構築するとともに、デバイス上の微小電極アレイを用いてオータプス培養標本の電気活動を計測する技術を構築する。

### (2) 背景

アストロサイトがシナプス機能を制御することは既に分かっている。しかし、アストロサイトの密度が変化した場合のシナプス動態は、未知な部分が多い。例えば、1) ニューロンがシナプスを投射する場所(位置)は影響を受けるのか、2) 個々のシナプスにおける開口放出メカニズムの変化はどうなっているのか、3) その生理的意義は何か、などである。本研究で用いた培養標本は、従来の神経生理学研究で用いられる脳スライス標本や分散培養標本とも異なる、全く新しいコンセプトに基づいた再構築型単一ニューロン培養モデルである。この特徴を活かした解析的研究の成果を基に、共存するアストロサイトの密度環境とシナプス動態の相関関係を理論的にモデル化することによって、アストロサイトの密度依存的な環境変化を基軸として高次脳機能の獲得原理を理解することが必要であった。

## 2. 研究の計画

### (1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

半導体加工技術を利用して、窒化シリコン製の自立膜に微小孔をアレイ状に形成した培養膜を製作する。この培養膜の裏面にアストロサイトを、膜のオモテ面にニューロンを培養することで、微小孔アレイを通じたアストロサイトとニューロンの細胞間コミュニケーションを実現し、オータプス培養標本を作製し得る培養環境を構築する。次に、微小孔アレイを有する窒化シリコン製培養膜のオモテ面に微小電極アレイを形成する。培養膜の裏面にアストロサイトを、オモテ面の微小電極アレイ上にニューロンを播種して共培養を行いながら、微小電極アレイによりニューロンの細胞外電位を計測する技術を構築する。

### (2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

まず初めに自己にシナプスを投射する海馬オータプス初代培養標本の作製を行う。続いてこの海馬オータプス初代培養標本を用いてパッチクランプ法を用いたシナプス伝達の解析を行う。さらに、蛍光イメージング法によるシナプス数の解析を行うことで、シナプス数の解析を実施する。

## 3. 研究の成果

### (1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

直径  $3\mu\text{m}$  の多数の微小孔を形成した厚さ  $1\mu\text{m}$  の窒化シリコン製多孔膜と、直径  $300\mu\text{m}$  の円筒状貫通孔を  $8\times 8$  個のアレイ状に形成したシリコン樹脂シートを貼り合わせることで、底面に多孔膜を有するマイクロウェルアレイを製作した。このウェル内の膜表面に単一ニューロンを、膜裏面に多数のアストロサイトを共培養することで、オータプス培養標本を構築した。ニューロンとシナプスを免疫染色することで、神経突起に沿って多数のシナプスが形成されていることを確認した。次に、窒化シリコン膜表面の中央部に一辺  $50\mu\text{m}$  の微小電極を  $8\times 8$  個のアレイ状に形成するとともに、直径  $5\mu\text{m}$  の多数の微小孔を形成した。膜裏面にアストロサイトを、膜表面にニューロンをそれぞれ培養し、4週間以上に渡り安定してニューロンの細胞外電位を計測することに成功した。

### (2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

アストロサイトが高密度になるほど、単一ニューロンにおける興奮性シナプス伝達は大きくなった。形態学的に同定されたグルタミン酸作動性シナプスの数は両者で有意な差は認めな

ったが、伝達物質を放出できる興奮性シナプス（アクティブシナプス）の比率はアストロサイト高密度群では増加しており、逆にシナプス前サイレントシナプスの比率は低い結果であった。これらの結果を踏まえて、健常ヒト iPS 細胞由来のアストロサイトを樹立し、マウス海馬ニューロンと組み合わせた単一ニューロン培養標本を作製した。結果、従来のマウス由来のアストロサイトを用いた単一ニューロン培養標本に類似した興奮性シナプス伝達を確認できた (Uchino et al., iScience, 2022)。健常ヒト iPS 細胞由来のアストロサイトを除去するとシナプス伝達はほぼ皆無になったことから、健常ヒト iPS 細胞由来のアストロサイトは機能的にも重要な役割を果たしていることが分かった。しかし従来のマウスアストロサイトは2週間培養でシナプス伝達を構築できるが、iPS 細胞由来のアストロサイトでは4週間培養を有することも明らかとなった。

#### 4. 研究の反省・考察

(1) オータプス培養標本での次世代微小電極アレイシステムによる測定技術の確立

本研究の窒化シリコン多孔膜を用いることでオータプス培養標本を構築できることは確認したが、歩留まりが低いいため、それを改善するデバイス構成とニューロン播種方法の検討が必要である。また、微小電極によるオータプス培養標本の電位計測を実現するために、微小電極上でオータプス培養標本を構築する技術の確立が必要である。

(2) 単一ニューロン培養標本におけるシナプス伝達の解析

健常ヒト iPS 細胞由来のアストロサイトとマウス海馬ニューロンと組み合わせた単一ニューロン培養標本を作製することに成功したものの、ニューロンはヒト iPS 細胞由来ではない。今後はアストロサイトだけでなく、ニューロンも iPS 細胞由来にした単一ニューロン培養標本を開発する必要がある。ただし、アストロサイトとニューロンで培養期間が全く異なることから、培養時期のタイミングを上手にずらす工夫が必要である。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

【廣瀬伸一】

① Takeda K, Miyamoto Y, Yamamoto H, Ishii A, Hirose S, Yamamoto H.

Clinical features of early myoclonic encephalopathy caused by aCDKL5 mutation. *Brain & Development* 42 (2020) 73-76 doi:10.1016/j.braindev.2019.08.003

② Suzuki T, Suzuki T, Raveau M, Miyake N, Sudo G, Hirose S, et al.

A recurrent PJA1 variant in trigonocephaly and neurodevelopmental disorders. *Ann Clin Transl Neurol* 2020; 7(7): 1117-1131 doi: 10.1002/acn3.51093

③ Shibata A, Kasai M, Terashima H, Hoshino A, Miyagawa T, Kikuchi K, Ishii A, Matsumoto H, Kubota M, Hirose S, Oka A, Mizuguchi M. Case-control association study of rare nonsynonymous variants of *SCN1A* and *KCNQ2* in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *J Neurol Sci*, 414 (2020) 116808 doi: 10.1016/j.jns.2020.116808

④ Kobow K, Reid C, A, van Vliet E, A, Becker A, J, Carvill G, L, Goldman A, M, Hirose S, Lopes-Cendes I, Khiari H, M, Poduri A, Johnson M, R, Henshall D, C. Epigenetics explained: a topic "primer" for the epilepsy community by the ILAE Genetics/Epigenetics Task Force. *Epileptic Disord* Vol. 22, No. 2, 127-141 doi: 10.1684/epd.2020.1143

⑤ Kimura Y, Tanaka Y, Shirasu N, Yasunaga S, Higurashi N, Hirose S.

Establishment of human induced pluripotent stem cells derived from skin cells of a patient with Dravet syndrome. *Stem Cell Research* 47 (2020) 101857 doi: 10.1016/j.scr.2020.101857

⑥ Hirose S, Tanaka Y, Shibata M, Kimura Y, Ishikawa M, Higurashi N, Yamamoto T, Ichise E, Chiyonobu T. Application of induced pluripotent stem cells in epilepsy. *Mol Cell Neurosci* 108 (2020) 103535 doi: 10.1016/j.mcn.2020.103535

⑦ Shibata M, Ishii A, Goto A, Hirose S. Comparative characterization of PCDH19 missense and truncating variants in PCDH19-related epilepsy. *J Hum Genet*.

2021;66(6):569-78, doi: 10.1038/s10038-020-00880-z

⑧ Uchino K, Kawano H, Tanaka Y, Adaniya Y, Asahara A, Deshimaru M, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Hirose S. Inhibitory synaptic transmission is impaired at higher extracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations in Scn1a(+/-) mouse model of Dravet syndrome. *Sci Rep*. 2021;11(1):10634, doi :10.1038/s41598-021-90224-4

⑨ Uchino K, Ikezawa W, Tanaka Y, Deshimaru M, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Hirose S. Astrocyte Ca<sup>2+</sup> Signaling is Facilitated in an Scn1a+/- Mouse Model of Dravet Syndrome. *bioRxiv*. 2021;05(18):444602

⑩ Ichise E, Chiyonobu T, Ishikawa M, Tanaka Y, Shibata M, Tozawa T, Taura Y, Yamashita S, Yoshida M, Morimoto M, Higurashi N, Yamamoto T, Okano H, Hirose S. Impaired neuronal activity and differential gene expression in STXBP1 ncephalopathy patient iPSC-derived GABAergic neurons. *Hum Mol Genet*. 2021;30(14):1337-48., doi :10.1093/hmg/ddab113

⑪ Higurashi N, Broccoli V, Hirose S. Genetics and gene therapy in Dravet syndrome. *Epilepsy & Behavior Case Reports*. 2021:108043, doi :10.1016/j.yebeh.2021.108043

⑫ Yoshitomi S, Hamano SI, Hayashi M, Sakuma H, Hirose S, Ishii A, Honda R, Ikeda A, Imai K, Jin K, Kada A, Kakita A, Kato M, Kawai K, Kawakami T, Kobayashi K, Matsuishi T, Matsuo T, Nabatame S, Okamoto N, Ito S, Okumura A, Saito A, Shiraishi H, Shirozu H, Saito T, Sugano H, Takahashi Y, Yamamoto H, Fukuyama T, Kuki I, Inoue Y. Current medico-psycho-social conditions of patients with West syndrome in Japan. *Epileptic Disord*. 2021;23(4):579-89, doi:10.1684/epd.2021.1301

⑬ Epi25 Collaborative. Electronic address jcce, Epi C. Sub-genic intolerance, ClinVar, and the epilepsies: A whole-exome sequencing study of 29,165 individuals. *Am J Hum Genet*. 2021;108(10):2024, doi: 10.1016/j.ajhg.2021.08.008

#### 【桂林秀太郎】

① Uchino K, Ikezawa W, Tanaka Y, Deshimaru M, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Hirose S, Astrocyte Ca<sup>2+</sup> Signaling is Facilitated in an Scn1a<sup>+/-</sup> Mouse Model of Dravet Syndrome, **bioRxiv** preprint, DOI : 2021.05.18.444602, 2021

② Uchino K, Kawano H, Tanaka Y, Adaniya Y, Asahara A, Deshimaru M, Kubota K, Watanabe T, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Hirose S, Inhibitory synaptic transmission is impaired at higher extracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations in Scn1a<sup>+/-</sup> mouse model of Dravet syndrome, **SCIENTIFIC REPORTS**, 0634, 2021

#### 【安田隆】

① 吉田悟志, 安田隆, ニューロン細胞外電位の安定的計測を目的とするSiN多孔膜を介した階層型共培養, *電気学会論文誌E*, 141(7), 215-221, 2021.

② Yoshida S, Yasuda T. Microelectrode Array with Back-to-back Layered Co-culture of Neurons and Astrocytes, *Proceedings of the 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2021)*, 707-708, 2021.

③ Nakama A, Yasuda T. Co-culture Device for Single Neuron Analysis Using a Microporous SiN Membrane, *Proceedings of the 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2021)*, 587-588, 2021.

④ Iwai S, Yasuda T. Capture and Release of Single Cells Using Microholes for High Throughput Analysis of Single Neurons, *Proceedings of the 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2021)*, 263-264, 2021.

(2) 口頭発表

#### 【廣瀬伸一】

- ① Hirose S. Studies on the pathomechanisms of developmental and epileptic encephalopathy using induced pluripotent stem cells. —The 21st Annual Meeting of the Infantile Seizure Society International Symposium on the Pathophysiology of Developmental and Epileptic Encephalopathy (2020.6.19-21, Okayama Web)
- ② Goto A, Ishii A, shibata M, Ihara Y, Hirose S. Capability of different prediction algorithms to classify phenotype as benign neonatal epilepsy or developmental and epileptic encephalopathy. — The 21st Annual Meeting of the Infantile Seizure Society International Symposium on the Pathophysiology of Developmental and Epileptic Encephalopathy (2020.6.19-21, Okayama Web)
- ③ 木許恭宏、前田謙一、池田俊郎、石井敦士、廣瀬伸一、盛武浩、 遺伝子変異を持つ発達性てんかん性脳症の1例—第15回日本てんかん学会九州地方会(2020.7.11 web 配信)
- ④ Hirose S. Application of induced pluripotent stem cells in epilepsy: An overview. 5th Azalea Festival symposium in Pediatric Neurology (Taiwan 2021.3.27-28 ハイブリッド開催)
- ⑤ Hirose S. Drug discovery based on the etiologies of epilepsy using induced pluripotent stem cells— 5th Azalea Festival symposium in Pediatric Neurology (Taiwan 2021.3.27-28 ハイブリッド開催)
- ⑥ 廣瀬伸一、難治希少疾患からの脱皮—ファブリー病から学んだこと 全国ファブリー病患者と家族の会 ウェビナー2021@福岡(2021.3.21) (Web セミナー)
- ⑦ 廣瀬伸一、福岡大学医学部小児科でのてんかんの分子病態研究の歩み 第512回日本小児科学会福岡地方会 (2021.4.10) 福岡
- ⑧ 廣瀬伸一、臨床科でもここまでできた！～福岡大学小児科でのてんかん分子病態研究～ 第88回さが小児科地方会 第212回日本小児科学会長崎地方会合同地方会 (ハイブリッド開催) (2021.7.4.) 佐賀 (web)
- ⑨ 廣瀬伸一、福岡大学でのてんかんの分子病態研究-遺伝子から創薬への道 第44回 日本小児遺伝学会学術集会、第3回 日本ダウン症学会学術集会、第3回 日本ダウン症学会 (2021.11.12-14)
- ⑩ 廣瀬伸一、分子病態に基づくてんかんの根治を目指して 発達生涯研究所 公開セミナー (2021.12.10) 愛知 (Web 開催)

#### 【桂林秀太郎】

- ① 内野 鈺也、田中泰圭、渡辺拓也、窪田香織、桂林秀太郎、廣瀬伸一、岩崎克典、iP 胞由来アストロサイトを実装したオータプス培養標本の確立 第73回日本薬理学会西南部会、2020年11月オンライン
- ② 内野 鈺也、河野洋幸、田中泰圭、安谷屋友菜、朝原愛、弟子丸正伸、渡辺拓也、窪田香織、桂林秀太郎、廣瀬伸一、岩崎克典、Dravet症候群モデルマウスであるScn1a+/-マウスは細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度が増加するとシナプス伝達の興奮性と抑制性のバランスが崩壊する、日本薬学会第142年会、2022年3月オンライン

#### 【安田隆】

- ① 吉田悟志、安田隆、SiN多孔膜を介した階層型共培養によるニューロン細胞外電位の安定的計測 第37回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム 2020年10月27日 オンライン
- ② 安田隆 バイオMEMSの応用による細胞解析デバイスの創製 ～医薬・創薬分野への貢献を目指して～ 情報機構セミナー 2021年9月28日 オンライン
- ③ 安田隆 バイオMEMSを用いた細胞解析技術 R&D支援センターセミナー 2022年3月29日 オンライン

#### (3) 出版物

無