



# 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

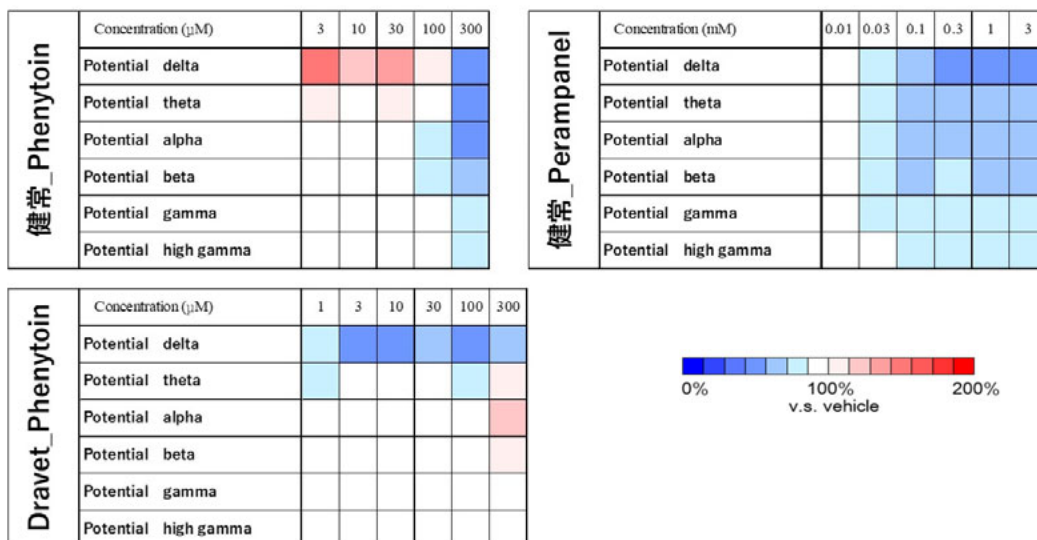
ヒト脳オルガノイドの電気活動（細胞外電位）と神経伝達物質放出（グルタミン酸・GABA）の同時計測技術を確立し、ヒト脳オルガノイドのオシレーションを指標とした薬効評価系の構築を目的とする

## 2. 研究の計画

- (1) 健常者・各種てんかん患者由来脳オルガノイドを用いて既存薬に対する応答を評価する。
  - ①各疾患オルガノイドの自発活動特性を明らかにする。
  - ②既存薬に対する各疾患オルガノイドの周波数特性の変化を明らかにする。
- (2) 分散培養（2D）と脳オルガノイド（3D）の薬剤応答性の違いを明らかにする。
- (3) 脳オルガノイドからのグルタミン酸・GABA 放出の同時計測法を確立する。
  - ①GABAの検出限界を明らかにし、グルタミン酸とGABAの同時計測系を構築する。
  - ②マウス急性脳スライスを用いて、細胞外記録と電気化学計測を同時に行い、グルタミン酸とGABAの検出感度を評価する。グルタミン酸やGABAの放出を促す薬剤を投与することによって、グルタミン酸、GABA放出の変化を算出する計測系を確立する。
  - ③各疾患脳オルガノイドからグルタミン酸、GABAの放出を記録し、疾患別のグルタミン酸とGABAの放出比率および薬剤変化を検出する。

## 3. 研究の成果

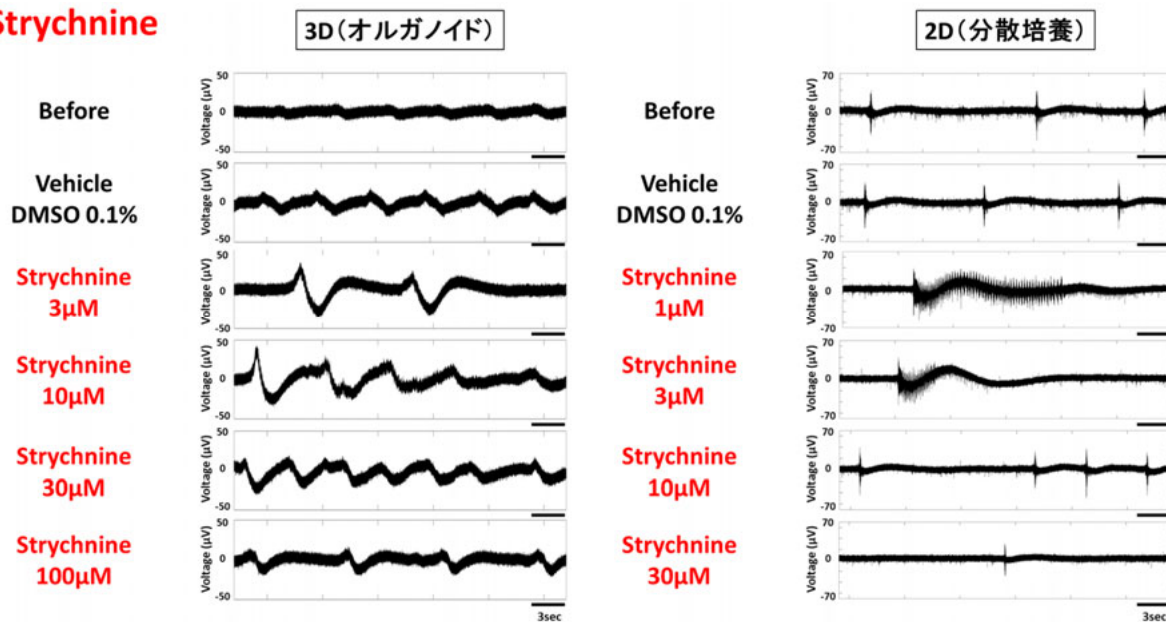
(1) 患脳オルガノイドにおける抗てんかん薬の応答と健常者脳オルガノイドの応答を比較した。下図は健常者脳オルガノイドおよびドラベ症候群の脳オルガノイドに抗てんかん薬を用量依存的に投与した際の周波数強度変化を示している。δ波（1-3 Hz）、θ波（4-8 Hz）、α波（8-14 Hz）、β波（15-30 Hz）、γ波（35-50 Hz）、High-γ波（80-150 Hz）、150-500Hz帯の波形を抽出し、周波数強度を解析した。健常者脳オルガノイドにおいて、フェニトイン 100 μM 投与によりα波、β波の周波数強度の減少が見られ、300μM 投与より全周波数帯で周波数強度が減少した。一方、ペランパネル投与においては、用量依存的にδ波からHigh-γ波の周波数強度の減少が認められた。AMPA 受容体阻害が用量依存的に現れた結果だと考えられ、脳オルガノイドにおいても、抗てんかん薬の種類に依存して応答が異なることがわかってきた。ドラベ症候群脳オルガノイドにおいては、フェニトイン 300μM 投与でδ波は減少したものの、健常オルガノイドと比べ各周波数帯強度の減少は観察されなかった。ドラベ症候群の禁忌薬剤であるフェニトインの応答を示している結果であると考えられる。



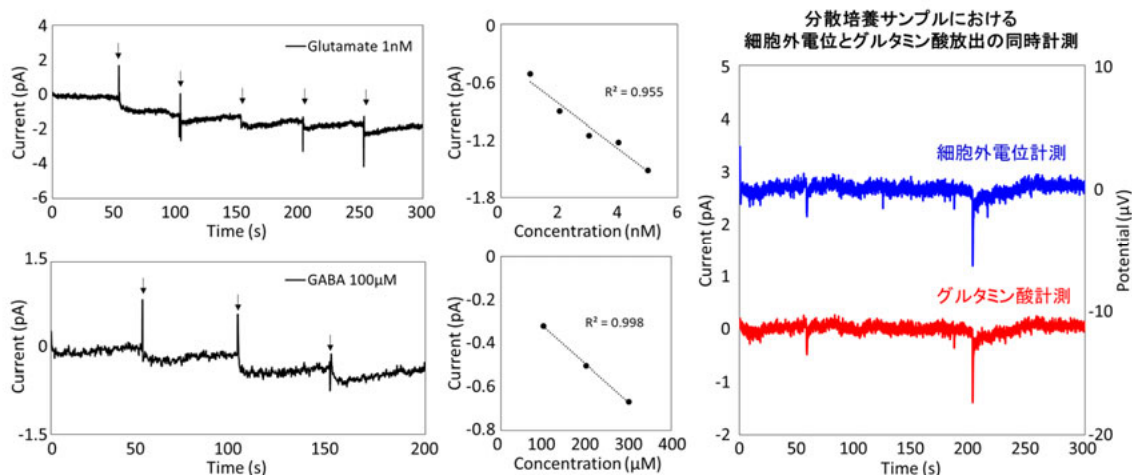
(2) 健常者株から分化した神経ネットワークをMEA上に分散培養した2Dサンプルと健常者株脳オルガノイド（3D）に痙攣誘発化合物であるStrychnineを投与した際の薬剤応答を比較し

た。下図はそれぞれの活動電位波形を示している。オルガノイドは Strychnine の投与でオシレーションの振幅・頻度が増加し、高濃度では減少したのに対し、分散培養は Strychnine の投与で同期バースト発火の Duration が増加・頻度が減少し、高濃度では Duration が減少した。着目する現象は異なるがオルガノイド・分散培養ともに Strychnine に対する濃度依存的な反応は一致していた。2D 分散培養と 3D オルガノイドの薬剤応答を比較するデータを複数薬剤にて取得し、現在データ解析を行っている。

## Strychnine



(3) 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 GABA を計測する為に、塗布する酵素を検討し GABA を計測可能な CNT 電極を開発した。塗布する酵素に GABASE を追加することにより GABA をグルタミン酸へと選択的に変換し、次いで Glutamate oxidase (GOx) によりグルタミン酸を選択的に酸化する。グルタミン酸酸化時に発生した  $\text{H}_2\text{O}_2$  を西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）を用いて検出する方法である。GABASE を追加することにより GABA 100  $\mu\text{M}$  の検出に成功し、線形性 ( $R=0.998$ ) を確認した。また酵素を CNT 電極にコーティングする方法を検討した結果、グルタミン酸の検出限界 1nM 以下、線形性検出範囲 1nM-10  $\mu\text{M}$  を達成し電極の高感度化に成功した（下図）。高感度化したグルタミン酸計測用 CNT 電極を用いて、Rat 皮質ニューロンの分散培養サンプルを計測し、1 細胞レベルでのグルタミン酸の放出と活動電位の同時計測に成功した（下図）。



## 4. 研究の反省・考察

(1) 疾患脳オルガノイドと健常者オルガノイドの活動特性において、低周波成分の解析が有

効であることがわかり、差異が検出できることがわかった。オルガノイド研究の性質上、均一なオルガノイド作製が難しいことが挙げられる。iPS 細胞の状態を管理維持し、サンプル数を増やす必要がある。また、各疾患において、複数ドナーの iPS 細胞および株を用意する必要性が出てきた。疾患間差を明らかにしたいが、ドナー間差なのか、株間差なのかを未だ不明な点がある為である。今年度は、同一疾患において複数の iPS 株を用いて検証することとした。本年度の成果として、疾患の禁忌薬剤に対する応答性が認められたことは今後の発展が期待できる。

(2) 2D 分散培養と 3D オルガノイドにおける薬剤応答データを取得した。オルガノイドは低周波解析が有効であり、2D はスパイク解析が主となるため、それぞれの解析法で得られたパラメータ値の比較、毒性用量の比較を今後進めて行く予定である。また、2D 分散培養においても低周波解析を行うことで、同一パラメータでの比較も実施して行く予定である。薬剤応答を比較する上で、組織化学的に、3D オルガノイドと 2D 分散培養において、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの割合を比較する必要もある。今年度の課題とすることとした。

(3) 酵素 GABASE を用いることで、GABA の用量依存的な応答を検出できることがわかった。しかしながら、細胞から放出される GABA をリアルタイムに計測する為には、感度が足りないこと、およびグルタミン酸も GABASE 電極で反応する為、グルタミン酸と GABA の分離が難しいことがわかった。今後は、グルタミン酸、ドーパミンに焦点をあて、細胞から放出される神経伝達物質のリアルタイム計測を実施することとした。我々の独自技術である細胞外記録(活動電位)と神経伝達物質のリアルタイム同時計測において、培養細胞においてもグルタミン酸のリアルタイム計測に成功した点は今後の発展が期待できる成果である。今年度は、脳オルガノイドを用いて、疾患と健常の差異、薬剤応答について、解析を進める予定である。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ①N Matsuda, A Odawara, Y Ishibashi, K Kinoshita, A Okamura, T Shirakawa, I Suzuki. Raster plots machine learning to predict the seizure liability of drugs and to identify drugs. *Sci Rep.* 2022 12(1):2281. doi: 10.1038/s41598-022-05697-8
- ②R Yokoi, T Kuroda, N Matsuda, A Odawara, I Suzuki. Electrophysiological responses to seizurogenic compounds dependent on E/I balance in human iPSC-derived cortical neuronal networks. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2022 148(2):267-278. doi: 10.1016/j.jphs.2021.12.006
- ③Yokoi R, Shibata M, Odawara A, Ishibashi Y, Nagafuku N, Matsuda N, Suzuki I. Analysis of signal components < 500 Hz in brain organoids coupled to microelectrode arrays: a reliable test-bed for preclinical seizure liability assessment of drugs and screening of antiepileptic drugs. *Biochem and Biophys Res.* 2021 28:101148. Doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101148
- ④N. Matsuda, Kenichi Kinoshita, Ai Okamura, Takafumi Shirakawa, and I Suzuki. Histograms of Frequency-Intensity Distribution Deep Learning to Predict the Seizure Liability of Drugs in Electroencephalography. *Toxicological Sciences.* 2021 182(2):229-242. doi: 10.1093/toxsci/kfab061
- ⑤Y Ishibashi, A Odawara, K Kinoshita, A Okamura, T Shirakawa, I Suzuki. Principal Component Analysis to Distinguish Seizure Liability of Drugs in Human iPSC Cell-Derived Neurons. *Toxicological Sciences.* 2021 184(2):265-275 doi: 10.1093/toxsci/kfab116

### (2) 口頭発表

- ①鈴木郁郎, “Evaluation of drug toxicity and efficacy based on human iPSC-derived neuronal activities”, シンポジウム, 「New Frontiers in the Treatment of Epilepsy 2020」第62回 日本神経学会学術大会 2021/5/19-22
- ②鈴木郁郎, “In vitro, ex vivo, in vivoにおける神経活動を指標とした薬剤性痙攣リスク評価”, シンポジウム, 第48回日本毒性学会学術年会 2021/7/7~7/9
- ③鈴木郁郎, “ヒトiPS細胞由来ニューロンおよび脳オルガノイドを用いた医薬品の毒性評価”, ランチョンセミナー ベリタス, 第48回日本毒性学会学術年会 2021/7/7~7/9

- ④鈴木郁郎, “ヒトiPS細胞由来神経細胞の電気活動に基づいた毒性および薬効評価”, ランチョンセミナー アズワン, 第48回日本毒性学会学術年会 2021/7/7~7/9
- ⑤鈴木郁郎, “iPSニューロンの機能を指標とした中枢および末梢神経毒性評価”, 安全性評価研究会 第29回 夏の教育フォーラム これでわかる! 非臨床試験その2ー中枢神経毒性・腎毒性ー 2021/9/10
- ⑥Mikako Shibata, Remi Yokoi, Aoi Odawara, Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Naoki Matsuda, Ikurou Suzuki, “MEA measurement of human cerebral organoid”, 2021 Safety Pharmacology Society”, 2021/10/4-8
- ⑦鈴木郁郎, “ヒト iPS 神経の電気活動に基づいた医薬品候補化合物の評価”, 安全性評価研究会 令和3年度AMED 再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発交流会 2021/9/8
- ⑧鈴木郁郎, “MEAを用いた化合物の神経毒性評価法の開発”, 電気化学会第89回大会, 2022/3/15-17
- ⑨永福菜美, 横井れみ, 柴田実可子, 石橋勇人, 松田直毅, 鈴木郁郎, “MEAを使用した脳オルガノイド計測における低周波解析の有効性”, 第13回日本安全性薬理研究会学術年会, 2022/2/4-2/5

(3) 出版物

なし