

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

- 疾患脳オルガノイドにおける禁忌薬の応答を微小電極アレイ（MEA）にて評価する。
 - ①ドラベ症候群、レット症候群オルガノイドに対する禁忌薬を含めた応答を評価する。
- 神経伝達物質グルタミン酸および H_2O_2 と細胞外電位の同時計測法を確立する。
 - ①グルタミン酸と H_2O_2 の用量依存的な電気化学応答および阻害物質の作用を明らかにする。
 - 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、グルタミン酸と細胞外電位のリアルタイム計測を検証する。

3. 研究の成果

(1) 疾患脳オルガノイドにおける禁忌薬の応答評価

自発活動において、オシレーションの長さにドラベ症候群と健常者脳オルガノイドで差が認められた。低周波解析により、特定の周波数強度が健常者脳オルガノイドとドラベ症候群脳オルガノイドで異なっていた（論文執筆中）。禁忌薬剤投与により、健常者脳オルガノイドはすべての周波数帯で強度が減少したが、ドラベ症候群オルガノイドでは、特定の周波数帯で強度が増加した。他の禁忌薬剤において、健常者オルガノイドでは、オシレーション頻度が用量依存的に減少したが、ドラベ症候群では、用量依存的に増加した。上記、自発活動における周波数特性および禁忌薬応答は、ドラベ症候群患者脳の特徴を反映した応答であることが示唆された。

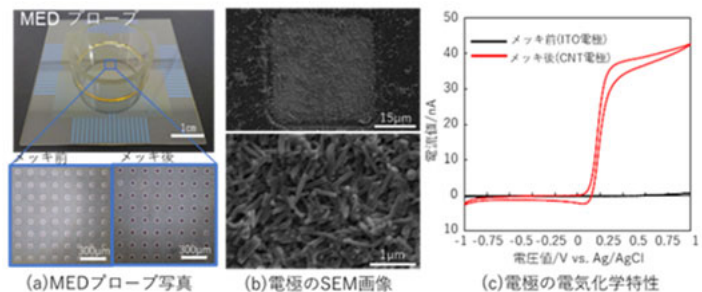
レット症候群脳オルガノイドにおいては、カルママゼピン投与により、健常者オルガノイドと異なり、同期バースト発火数の増加が認められた。また、用量依存的なスパイク数の変化も健常者オルガノイドと有意差が認められた。レット症候群患者の化合物応答の特徴を反映した応答であることが示唆された（論文執筆中）。

本研究結果から、ドラベ症候群およびレット症候群患者由来 iPS 細胞から作製した脳オルガノイドの本解析手法は、創薬開発において、有効な評価法となることが期待される。

(2) 神経伝達物質と細胞外電位同時計測法の開発

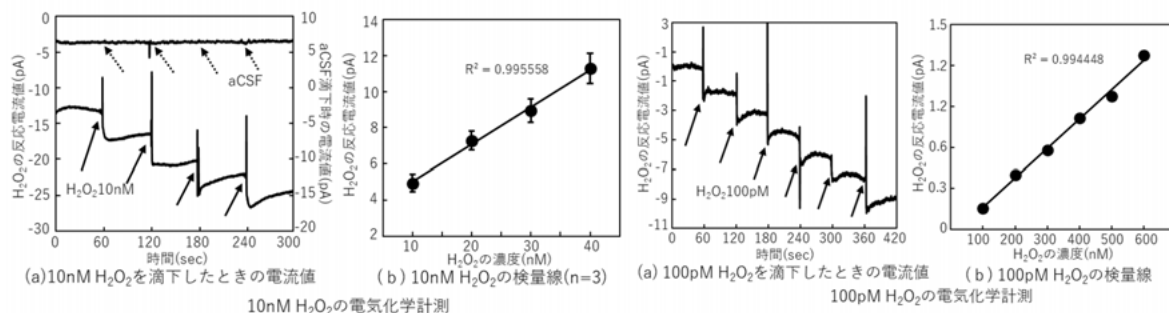
2.1 電極作製と電気化学特性

グルタミン酸を電気化学的に高感度測定可能な電極にするために CNT をメッキした MEA (CNT-MEA) を作製した。走査型電子顕微鏡観察により、メッキした CNT は、管状の形状を保持していることが確認された。次に、PBS 溶液中の 10mM フェロシアン化カリウムを使用して、ITO 電極と CNT 電極の電気化学的応答を比較した。CNT-MEA の CV 特性は、微小電極の特徴であるシグモイド型を示した（右図）。また、電流密度は、 $1.5 \mu A/cm^2$ であり、高い電気化学反応特性が確認された。



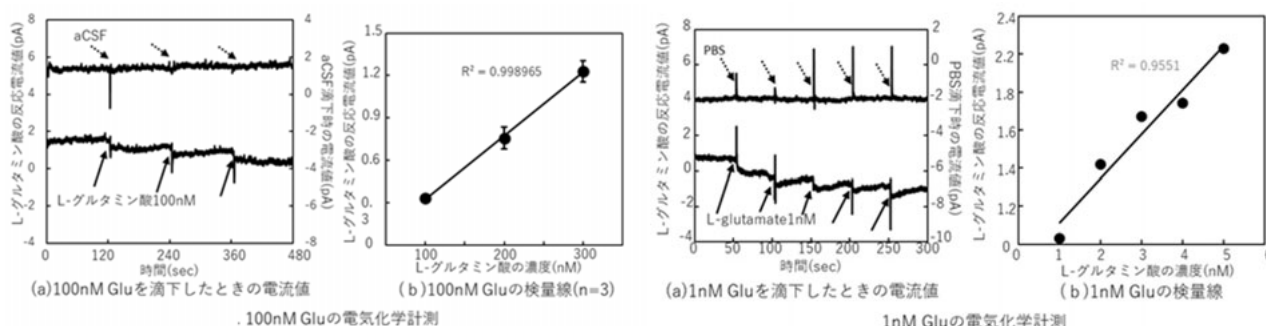
2.2 酵素修飾 CNT-MEA の過酸化水素 (H₂O₂) 反応電流値の濃度依存性

10 nM 過酸化水素を 60 sec ごとに滴下し、過酸化水素の反応電流値を測定した結果、過酸化水素の濃度に依存した電流値の増大が認められた。また、100 pM 過酸化水素を 60 sec ごとに滴下した試験においても用量相関が得られた。検出限界は、100 pM 以下であった。10 nM H₂O₂ の反応電流値と 100 pM H₂O₂ の反応電流値に大きな差が認められなかった原因は、作製電極毎の反応性の差であると考えられる。



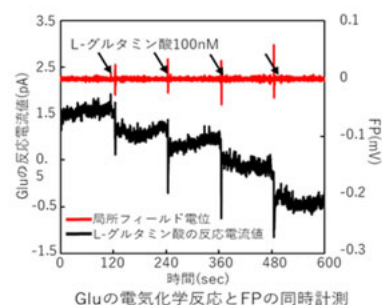
2.3 酵素修飾 CNT-MEA のグルタミン酸反応電流値の濃度依存性

100 nM グルタミン酸を 120 sec ごとに滴下し、グルタミン酸の反応電流値を測定した結果、グルタミン酸の濃度に依存した電流値の増大が認められた。また、1 nM グルタミン酸を 50 sec ごとに滴下した試験においても用量相関が得られた。検出限界は、1 nM 以下であった。100 nM Glu の反応電流値と 1 nM Glu の反応電流値に大きな差が認められなかった原因は、作製電極毎の反応性の差であると考えられる。



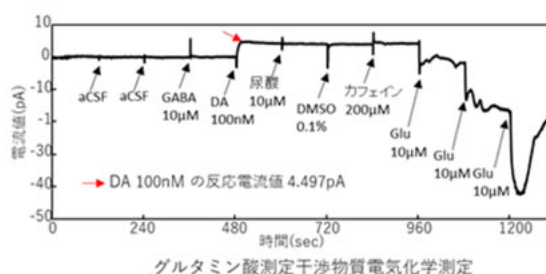
2.4 グルタミン酸の電気化学反応と細胞外電位 (FP) の同時計測

グルタミン酸の電気化学計測が FP 計測に影響を及ぼさないことを確認するために、同時計測状態で、グルタミン酸 100 nM を累積投与した。右図が示すように、グルタミン酸の電気化学反応による FP (局所フィールド電位) への影響は確認されなかった。



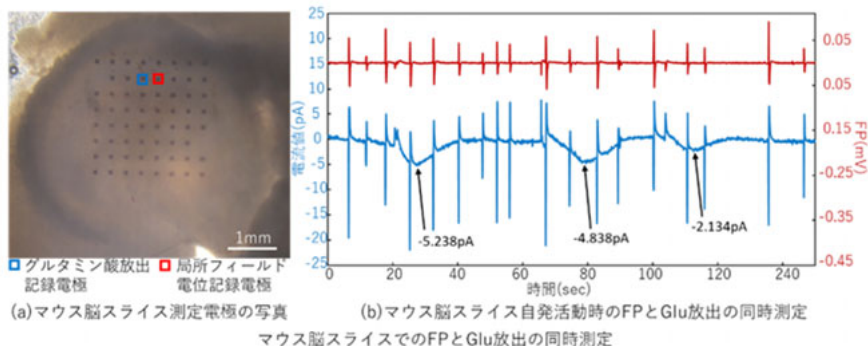
2.5 グルタミン酸測定干渉物質の電気化学測定

グルタミン酸測定において干渉物質の影響を考慮する必要がある。干渉物質として 10 μM γ-アミノ酸 (GABA)、100 nM ドーパミン (DA)、10 μM 尿酸、ジメチルスルホキシド (DMSO) 0.1%、200 μM カフェイン (caffeine) を順次滴下し、その後、10 μM グルタミン酸 (Glu) を 60 sec ごとに滴下した。10 μM GABA、10 μM 尿酸、0.1% DMSO、および 200 μM カフェインでは反応はみられなかった。100 nM ドーパミン (DA) はグルタミン酸とは逆のプラス電流値で反応を検出した。これらの干渉物質の存在下においても、グルタミン酸の応答が検出できることが示された。



2.6 酵素修飾 CNT 微小電極による急性マウス海馬スライスの活動電位とグルタミン酸放出の同時測定

酵素修飾 CNT-MEA にマウス脳組織(海馬)を乗せ、aCSF に酸素 95%、二酸化炭素 5%を含んだ空気を通気し灌流させた。対極に Pt 電極、参照極に CNT 電極を用いて作用極に 0.0 V vs. CNT を印加、保持し、還元電流値を測定した。下図に細胞外電位記録とグルタミン酸の同時計測の結果を示す。CA 2 領域の隣接する電極で細胞外電位計測(赤)と電気化学計測(青)を実施した。細胞外電位計測により、集合電位が観察され、電気化学計測によりグルタミン酸の放出電流値が観察された。しかしながら、全ての活動において、グルタミン酸放出電流値は検出されなかった。海馬組織のどのニューロン群による活動であるかで、電極表面に流れ出るグルタミン酸量が異なることなどが要因であると考えている。現在、要因解明の為の実験を進めている。



4. 研究の反省・考察

(1) 疾患脳オルガノイドにおける禁忌薬の応答評価

ドラベ症候群およびレット症候群患者由来iPS細胞から作製した脳オルガノイドの周波数特性や禁忌薬の応答は、疾患の特徴を反映した成果であり、創薬開発において、有効な評価法となることが期待される。

(2) 神経伝達物質と細胞外電位同時計測法の開発

本実験で酵素修飾型 CNT-MEAを開発した結果、グルタミン酸や H_2O_2 (データ割愛) の放出と細胞外電位の同時計測に成功した。脳オルガノイドのデータ解析まで至らなかった点が反省点であるが、今後解析を進めてゆく。これらの結果を基に、神経伝達物質の放出と細胞外電位の両指標を用いた化合物の薬効および毒性評価法を構築してゆく予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

1. Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Mikako Shibata, Ikuro Suzuki, Development of the Prediction Method of Peripheral Neuropathy Based on Firing Pattern of Each Single Neuron, Safety Pharmacology Society 2022, 2022/9/11-14
2. Yuto Ishibashi, Nami Nagafuku, Ikuro Suzuki, Toxicity risk assessment method for compounds using human iPS cell-derived neurons, Neuroscience2022, 2022/11/12-16
3. Naoki Matsuda, Mikako Shibata, Ikuro Suzuki, Detection of spontaneous firing patterns and drug responses in brain organoids with each single neuron resolution, Neuroscience2022, 2022/11/12-16
4. Xiaobo Han, Naoki Matsuda, Makoto Yamanaka, Ikuro Suzuki, Development of a microfluidic culture device for in vitro neural toxicity assessment with AI image analysis, Neuroscience 2022, 2022/11/12-16
5. 石橋勇人, 木村新伍, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンの電気活動を用いた依存症評価法の検証, 第 49 回毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2
6. 永福菜美, 柴田実可子, 松田直毅, 鈴木郁郎, MEA 計測による脳オルガノイドの電気活動評価, 第 49 回日本毒性学会, 2022/6/30-7/2
7. 黒田妙子, 松田直毅, 石橋勇人, 鈴木郁郎, MEA 計測法を用いたアストロサイトの痙攣陽性化合物に対する応答評価, 第 49 回毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2

8. 長谷川あい子, 松田直毅, 鈴木郁郎, 細胞外電位と神経伝達物質放出のリアルタイム同時計測を可能とする微小電極アレイ(MEA)の開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2
9. 松田直毅, 柴田実可子, 韓笑波, 鈴木郁郎, 1細胞単位の DRG ニューロンの発火に基づく化合物の痛みおよび作用機序の予測手法の開発, 第 49 回毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2
10. 韓笑波, 山中誠, 永福菜美, 松田直毅, 鈴木郁郎, In vitro 末梢神経培養デバイスおよび AI 画像解析を用いた毒性評価の検討, 第 49 回日本毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2
11. 岡村愛, 松原孝宜, 植田依子, 白川誉史, 宮本憲優, 小田原あおい, 小島敦子, 小山隆志, 柏崎広美, 佐藤薫, 高橋華奈子, パブラック晶子, 浅野雄哉, 腰塚慎之介, 加賀悠樹, 仲山智明, 石橋勇人, 鈴木郁郎, in vitro 痙攣リスク検出を目的とした Microelectrode array (MEA) データ解析法簡便化の基礎検討, 第 49 回毒性学会学術年会, 2022/6/30-7/2
12. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来ニューロンの電気活動を指標とした化合物の毒性リスク評価法の検討, 第 13 回スクリーニング学研究会, 2022/11/25,
13. 松田直毅, 韓笑波, 柴田実可子, 永福菜美, 石橋勇人, 鈴木郁郎, 長時間分解能を有する電機イメージングによる化合物の神経応答, 第 13 回スクリーニング学研究会, 2022/11/25
14. 石橋勇人, 永福菜美, 鈴木郁郎, ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンの電気活動に基づく依存症誘発薬の評価, 第 96 回日本薬理学会学術年会, 2022/11/30-12/3,
15. 松田直毅, 韓笑波, 鈴木郁郎, 236,880 電極 CMOS-MEA を用いたヒト iPS 細胞由来ニューラルネットワークの電気活動のシングル細胞解析, 第 96 回日本薬理学会学術年会, 2022/11/30-12/3
16. 韓笑波, 柴田未可子, 松田直毅, 鈴木郁郎, In vitro assessment of drug-induced peripheral pain in DRG neurons at single cell level using CMOS-MEA, 第 96 回日本薬理学会年会, 2022/11/30-12/3
17. 石橋勇人, 黒田妙子, 松田直毅, 鈴木郁郎, MEA 計測によるアストロサイトのオシレーション検出と痙攣化合物への応答解析, 第 14 回日本安全性薬理研究会学術年会, 2023/2/17-18
18. 長谷川あい子, 松田直毅, 鈴木郁郎, Responses of compounds by simultaneous measurement of neurotransmitters and field potentials using MEA, 第 14 回日本安全性薬理研究会学術年会, 2023/2/17-18
19. 松田直毅, 柴田実可子, 韓笑波, 鈴木郁郎, DRG ニューロンの1細胞発火解析に基づく化合物の末梢神経障害評価法の開発, 第 14 回日本安全性薬理研究会学術年会, 2023/2/17-18
20. 永福菜美, 石橋勇人, 松田直毅, 鈴木郁郎, MEA 計測による疾患脳オルガノイドの電気活動特性の解析, 第 14 回日本安全性薬理研究会, 2023/2/17-18
21. 韓笑波, 松田直毅, 松田和毅, 山中誠, 鈴木郁郎, マイクロ流路培養デバイスおよび AI 画像解析を用いた In vitro 末梢神経毒性評価の検討, 日本安全性薬理研究会第 14 回学術年会, 2023/2/17-18

(2) 口頭発表

1. 鈴木郁郎, in vitro 神経活動に基づいた医薬品評価, シンポジウム「次世代 ICT と未来医療を支える 神経科学・神経工学・脳型コンピューティング」第 83 回応用物理学会, 2022/9/20-23
2. 鈴木郁郎, ヒト iPS 神経の MEA 計測による化合物の毒性リスク予測, 情報計算化学生物学会(CBI 学会) 2022 年大会 2022/10/25-27,
3. 鈴木郁郎, in vitro 神経活動に基づいた化学物質の神経毒性評価, シンポジウム「発達神経毒性の現状と今後の課題」第 35 回日本動物実験代替法学会 2022/11/18-20
4. 鈴木郁郎, Ca-transients を神経活動指標とした化合物の毒性リスク予測, スクリーニング研究会 2022/11/25

(3) 出版物

1. I. Suzuki*, N. Matsuda, X. Han, S. Noji, M. Shibata, N. Nagafuku, Y. Ishibashi, Large-area

field potential imaging having single neuron resolution using 236,880 electrodes CMOS-MEA technology, *Advanced Science*, 2023, 1-23 表紙に採択

2. T. Kuroda, N. Matsuda, Y. Ishibashi, I Suzuki*, Assessment of astrocytic electrophysiological responses to seizurogenic compounds using planner microelectrode array, *Frontiers in Neuroscience*. 16:1050150, 2022, doi: 10.3389/fnins.2022.1050150
3. X Han, N Matsuda, Y Ishibashi, A Odawara; S Takahashi; N Tooi, K Kinoshita, I Suzuki*, “A functional neuron maturation device provides convenient application on microelectrode array for neural network measurement” *Biomaterials Research*, 26, 84, 1-17,2022
4. X Han, N Matsuda, K Matsuda, M Yamanaka, I Suzuki*, “An in vitro microfluidic culture device for peripheral neurotoxicity prediction at low concentrations based on deep learning” *Fundam. Toxicol Sci.*, Vol. 9 No. 7 pp. 203-209, 2022
5. Y. Ishibashi, S. Kimura, I Suzuki*, Responses to antibiotics in human iPSC-derived neurons based on the clinical antibiotic associated encephalopathy classification, 2022, 47(10), p429-437. *The Journal of Toxicological Sciences*.
6. A Odawara, M Shibata, Y Ishibashi, N Nagafukum N matsuda, I Suzuki* *In Vitro* Pain Assay Using Human iPSC-Derived Sensory Neurons and Microelectrode Array. *Toxicological Sciences*. 2022 188(1):131-141. doi: 10.1093/toxsci/kfac045
7. 鈴木郁郎 「ヒト iPS 神経の電気活動に基づいた化合物の毒性及び作用機序予測」 谷本学校 毒性質問箱 第 24 号, 2022, 20-31
8. 鈴木郁郎 『ペランパネルによるてんかん治療のストラテジー:第 2 版』Part 1. 分子病態から探るてんかん原性メカニズム “脳オルガノイドを用いたてんかん原性研究” 2022 年 9 月発行