

厚生労働科学研究委託費

医薬品等規制調和・評価研究事業

ヒト iPS 細胞由来神経細胞等を用いた  
新規 *in vitro* 医薬品安全性評価法の開発

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 佐藤 薫

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の医薬品等  
規制調和・評価研究委託事業による  
委託業務として、佐藤 薫が実施し  
た平成 26 年度「ヒト iPS 細胞由来  
神経細胞等を用いた新規 in vitro  
医薬品安全性評価法の開発」の成果  
を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

医薬品等規制調和・評価 研究事業

ヒト iPS 細胞由来神経細胞等を用いた  
新規 *in vitro* 医薬品安全性評価法の開発

平成 26 年度 総括・分担研究報告書  
業務主任者 佐藤 薫

平成 27 (2015) 年 3 月

# 目 次

## I. 委託業務成果報告（総括）

ヒト iPS 細胞由来神経細胞等を用いた新規 <i>in vitro</i> 医薬品安全性評価法の開発-----1	
佐藤 薫	
（資料）図表	

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. ヒト iPS 細胞由来神経細胞等のシナプス機能の定量的評価法の開発と医薬品安全性評価への応用---60	
白尾 智明	
（資料）図表	
2. 脳疾患を再現した <i>in vitro</i> 実験系におけるヒト iPS 細胞由来神経細胞等の構造・機能の解析-----79	
池谷 裕二	
（資料）図表	
3. グリア細胞を利用した神経回路形成及び多点平面電極システムによる安全性評価試験法の確立----92	
宮本 憲優	
（資料）図表	
4. 脳神経機能を再現したヒト iPS 細胞由来神経細胞等およびそれを用いた薬理評価系の開発-----104	
佐藤 薫	
（資料）図表	

III. 学会等発表実績-----	123
-------------------	-----

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

## V. 班会議プログラム

# 平成 26 年度厚生労働科学研究委託費

## 医薬品等規制調和・評価研究事業

### I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（医薬品等規制調和・評価研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

ヒト iPS 細胞由来神経細胞等を用いた新規 in vitro 医薬品安全性評価法の開発

業務主任者 佐藤 薫

国立医薬品食品衛生研究所 薬理部第一室長

研究要旨

本研究事業全体計画では、認知機能障害、神経異常活動を in vitro で数値化する指標を確立し、これを用いてヒト iPS 細胞由来神経細胞（以下、hiPSC-neuron）等を用いた医薬品の in vitro 安全性評価法を開発することを目的とする。さらに、多施設間バリデーションを実施し安全性薬理試験としての再現性を確認する。平成 26 年度は認知機能障害、神経異常活動の数値化指標の確立、in vitro 定量的薬理試験法の開発のうち、認知機能障害について白尾班が、神経異常活動について池谷班が検討した。また、評価に必要な脳機能メカニズムを備えた hiPSC-neuron 等の選抜、機能促進条件について佐藤班、白尾班、宮本班が検討した。白尾班は培養神経細胞を用いた Drebrin-imaging-based evaluation of synapse function (DIBES 法)は医薬品安全性、特に認知機能への影響評価へ応用できることが示唆された。現状の hiPSC-neuron を医薬品安全性評価へ応用するためには、より成熟度を増すための方法を開発することが必須であることを明らかとした。池谷班は機能的多ニューロンカルシウムイメージングを用いて、回路の活動を大規模かつ高解像度で観察することにより神経回路の自発活動は興奮・抑制のバランスが保たれることで恒常的に維持されることを見いだした。さらに、一度バランスが崩れると、回路の活動が容易に変化することを見出した。本研究で明らかとなった現象は、てんかん等神経異常活動の数値化に応用できるばかりでなく、新たな作用機序のてんかん治療薬である非 NMDA 受容体拮抗薬の作用機序解明の足がかりとなることが期待される。宮本班は hiPSC-neuron 等の自発性興奮に基づく回路形成成熟度の MEA を用いた数値化に成功し、hiPSC-neuron 等を選抜するための条件が整備できた。また、グリア細胞を用いた hiPSC-neuron 等の機能発現を促進するための基本条件が決定できた。佐藤班は前脳にむけて分化が進んだ新規市販標本の安全性薬理試験への適性について選抜評価を行ったが、L-Glu への反応が現れるまでに長期間の培養が必要であり、L-Glu 反応性細胞の含有率が低く培養条件の再検討やグリア細胞の活用により神経機能発現の促進を行う必要があることがわかった。さらに hiPSC-neuron の機能的 NMDA 受容体発現を亢進するグリア細胞由来因子 X を見いだした。

白尾智明

群馬大学大学院医学系研究科教授

佐藤 薫

国立医薬品食品衛生研究所薬理部第一室長

池谷裕二

東京大学・大学院薬学系研究科教授

宮本憲優

エーザイ株式会社筑波研究所主幹研究員

## A. 研究目的

本研究事業全体計画では、認知機能障害、神経異常活動を *in vitro* で数値化する指標を確立し、これを用いてヒト iPS 細胞由来神経細胞（以下、hiPSC-neuron）等を用いた医薬品の *in vitro* 安全性評価法を開発することを目的とする。さらに、多施設間バリデーションを実施し安全性薬理試験としての再現性を確認する。

中枢神経系の副作用は予測困難なものが多く、新規医薬品候補化合物のうち臨床試験後期や市場から脱落する数は心毒性に続いて多いため、医薬品開発の障害となっている。医薬品の安全性薬理試験のコアバッテリー（ICH S7）には、医薬品候補化合物の中枢神経系への影響を実験動物の全身症状と行動観察により評価することが定められているが、行動観察による評価法は客観性やヒト予測精度に限界がある。しかし、神経科学技術の進歩とともに、脳機能基盤である認知機能のシナプス分子メカニズム、神経活動—神経形態—電気活動パターン連関が *in vitro* 実験により明らかとなり、医薬品による認知機能や神経活動への有害事象が *in vitro* 実験で可視化・数値化できるようになった。一方、ヒト iPS 細胞由来分化細胞は、*in vitro* での非臨床試験においてヒト特異的有害反応の予測に応用が期待される。

そこで、シナプス機能タンパク質マーカーを元に認知機能障害を、神経形態・電気信号パターンを元にけいれん等の神経異常活動を数値化する指標を確立し、認知機能障害、神経異常活動を予測する *in vitro*

薬理試験法を開発する。hiPSC-neuron 等の中から、評価に必要な脳機能メカニズムを備えたものを、これまでに整備した共通プロトコル（受容体機能、シナプス形成、神経回路形成）に基づいて選抜するための条件を提示し、細胞供給企業の細胞開発を促す。また共通プロトコルを用いて、グリア細胞等を活用した神経特有の機能発現促進条件を検討する。以上の検討を統合し、hiPSC-neuron 等を用いた *in vitro* 医薬品安全性評価法として提案する。医薬品を含む陽性対照化合物と陰性対照化合物を用いてプロトコル最適化を行う。さらに、多施設間での再現性について検証する。

平成 26 年度は認知機能障害、神経異常活動の数値化指標の確立、*in vitro* 定量的薬理試験法の開発のうち、認知機能障害について白尾班が、神経異常活動について池谷班が検討した。また、評価に必要な脳機能メカニズムを備えた hiPSC-neuron 等の選抜、機能促進条件について佐藤班、白尾班、宮本班が検討した。

## B. 研究方法

ヒト iPS 細胞由来神経細胞等を用いた新規 *in vitro* 医薬品安全性評価法の開発（白尾）

### グリア細胞培養

生後 1 日の新生ラット大脳皮質を単離し、0.25 %トリプシン、0.1 % DNase I を含んだ Hank's

s balanced salt solution (HBSS) で、37 °C で 15 分間インキュベート後、パスツールピペットで適度に組織を分散させ、Fetal bovine serum (FBS) を加えた。その後、細胞溶液をレンズペーパーでろ過し、10 % FBS を含んだ Minimum essential medium (MEM) 培養液を用いて、75 ml 培養フラスコ (PRIMARIA ;

FALCON, Franklin Lakes, NJ)で 37 °C、0.5 % CO<sub>2</sub> で培養した。細胞密度がコンフルエントな状態になるまで 10 % FBS を含んだ MEM で、1 週間に 2 度培地交換をし培養した。その後、HBSS で 1 度洗浄し、トリプシン処理を行い細胞を回収し、FBS を加え遠心分離機にかけた後、上澄みを取り除き、培養液で懸濁した。あらかじめ凍結用培養液が 500 μl 入ったセラムチューブ(住友ベークライト, Tokyo)に、細胞懸濁液を 500 μl 加えて、凍結した。ヒト iPS 由来神経細胞の培養 2 週間前に、前述の凍結大脳皮質グリア細胞を解凍し、60 mm 細胞培養ディッシュ(PRIMARIA ; FALCON)に蒔き直し、細胞の密度が 60~70%の状態になるまでで培養した。このグリアシートをマウス海馬神経細胞およびヒト iPS 神経細胞との共培養に使用した。

#### マウス海馬神経細胞初代培養法

胎生 16 日のマウス脳から海馬を取り出し、0.25%トリプシンを含んだ 5 ml の HBSS で 37 度、10 分間インキュベートする。トリプシン処理後、上清を除去し、HBSS 5ml を加えて 37 度、5 分間インキュベートする (2 回繰り返す)。HBSS による 2 回のインキュベーション後、上清を除去し、HBSS を 5 ml 加える。組織の分散は以下の 2 種類のパスツールピペットを用いて行う (A: ガスバーナーによる若干の熱処理により先端部の角を丸くしたパスツールピペット, B: ガスバーナーで先端を細くした分散用パスツールピペット)。まず、A で組織をピペッティングにより分散し (10 回)、続いて B でピペッティングし (5 回)、細胞懸濁液とする。培養前日に 9 cm ペトリディッシュにあらかじめ 1 mg/ml Poly-L-lysine でコートしたカバースリップ (18 mm 丸型 ; MATSUNAMI, Osaka) を 16 枚置き、10%

FBS 入り MEM (Plating MEM) を入れておいたものに細胞密度 10,000 個/cm<sup>2</sup>になるように細胞懸濁液を添加する。3 時間後、細胞が付着しているカバースリップを取り出し、グリアのフィーダー層の上に、神経細胞が対面するようにセットし 35.8 度で共培養を開始した。細胞維持用培養液は B27 supplement (Life Technologies)を含んだ無血清 MEM を使用した (6 ml)。培養 7 日目、14 日目に 1/3 量の培地交換を行った。

#### iCell Neurons 培養

本研究ではヒト iPS 神経細胞として iCell Neurons (Cellular Dynamics International Inc., Madison, WI)を用いた。iCell Neurons は、CDI 社のプロトコールに従い、iCell Neurons Maintenance Medium (Cellular Dynamics International Inc., WI)を用いて解凍した。その後、あらかじめ 1 mg/ml Poly-L-lysine をコートしたカバースリップ (15 mm 丸型 ; MATSUNAMI, Osaka)上に細胞密度 7000 個/cm<sup>2</sup>で播種した。3 時間後、細胞が付着しているカバースリップを取り出し、グリアのフィーダー層の上に、神経細胞が対面するようにセットし共培養を開始した。細胞維持用培養液は B27 supplement を含んだ MEM を使用した。

#### アミロイドβオリゴマー (ADDL) の作成

ヒトアミロイドβプロテイン (Peptide Institute, Inc., Osaka) 0.5 mg を室温に 30 分置く (平衡化)。ドラフト内で、氷で冷やした HFIP (1, 1, 1, 3, 3, 3-Hexafluoro-2-Propanol)で 1 mM にし、ボルテックスにより懸濁する。テフロンプラグのガラスシリンジでタンパク質低吸着 1.5 ml チューブに移し、パラフィルムで封をし、アミロイドβ/HFIP 溶液を 2 時間室温でインキュベートする (モノマー化)。チューブの蓋を開け、バキューム遠心 (800g、室



温) でチューブの底に透明のフィルム状のアミロイドβタンパク質が見えるまで遠心する。フィルム状のアミロイドβに DMSO (Dimethyl sulfoxide)を添加し、5 mM のアミロイドβ溶液とし、10 分間の超音波処理で再懸濁する。0.1 M リン酸緩衝液を加えて 100 μM 溶液とし、4 度で 24 時間インキュベートする (オリゴマー化)。遠心で不溶化物を取り除き、アミロイドβオリゴマー (ADDL) とした。

#### cDNA のトランスフェクション法

cDNA のトランスフェクションは培養 7 日目に行った。カバースリップ 5 枚にトランスフェクションする場合、MEM 100 μl に Lipofectamin 2000 (Life technologies) 溶液を 4 μl 添加、同じく MEM に pEGFP-C1 vector (Clontech, Palo, CA, USA) を 3 μg 分添加し、5 分室温インキュベートした後に混合し、20 分間室温インキュベートする。グリアとの共培養から神経細胞が播種してあるカバースリップを取り出し、カバースリップの細胞播種面を上にし、培養 7 日目の培地交換時に採取した培地を 460 μl のせる。そこに上記 Lipofectamine 2000 混合液を 40 μl 添加し、1 時間 35.8 度でインキュベートした後、グリアとの共培養を再開した。

#### ウェスタンブロット法 (アセチル化の測定を含む)

500 μl の TBS (Tris-buffered saline, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, プロテアーゼインヒビターカクテルを含む) を用いて一つの実験群につき 10 枚のカバースリップから細胞を 1.5 ml チューブへ回収した。遠心により、細胞を沈殿させ、上清を除去した後、100 μl の細胞溶解バッファー (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% SDS, 20 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, プロテアーゼインヒビターカクテル含む) を加え、超音波処理によりタンパ

ク質を可溶化した。タンパク質濃度は DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) により決定した。次に、サンプルを等量 (10-20 μg) 使用し、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。電気泳動後のゲルを Immobilon-P polyvinylidene difluoride membranes (Merck Millipore) にトランスブロットセル (Bio-Rad Laboratories) を用いて転写し、10% BSA/TBS (0.05% tween-20 含む) でブロッキング後、適切な一次抗体、二次抗体とインキュベーションし、化学発光にてシグナルの検出を行った (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Merck Milipore)。ADDL の確認においてはオリゴマー化後のサンプルを SDS-PAGE にかき、上記と同様に転写し、ウェスタンブロットングを行った。

#### 一次抗体

抗アセチルヒストン H3 抗体 Lys9/14 (Cell Signaling Technoloty, Inc., Danvers, MA, USA)、抗ヒストン H3 抗体 (Cell Signaling Technoloty)、抗βアクチン抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、抗アミロイドβタンパク質 1-16 (クローン 6E10, Covance Inc., Princeton, NJ, USA)

#### 二次抗体

HRP (horseradish peroxidase)-conjugated sheep anti-mouse IgG 抗体 (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG 抗体 (GE Healthcare UK Ltd.)

#### 免疫細胞化学

神経細胞を 4 % Paraformaldehyde、0.1 % Glutaraldehyde (0.1 M リン酸緩衝液) で、15 分間固定した。生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄した後、0.1 % Triton X-100 を含む PBS で 5 分間処理し、さらに PBS で 2 回洗浄した。

次に 3 % Bovine serum albumin を含む PBS (PBSA) で 1 時間ブロッキング処理を行い、PBSA で希釈した一次抗体を 4 °C で一晩反応させた。その後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体を室温で 2 時間反応させた。PBS で 2 回洗浄後、水溶性封入剤(PermaFluor ; Thermo, CA) で封入した。

#### 画像取得・解析法

細胞の画像は蛍光顕微鏡(Axio Imager 2, Zeiss, Jena, Germany)を用いて、Meta Morph software (Meta Imaging software Version 7.7; Universal Imaging, West Chester, PA)により取得し、同 software を使って解析を行った。ドレブリンのクラスターを測定するために、培養神経細胞を抗ドレブリン抗体、および細胞体・樹状突起が観察できる Rhodamine-Phalloidine (F-actin) で染色する。F-actin 染色画像を開き、以下の条件を満たす樹状突起を選ぶ。

1. Multi-Line を用いて細胞体から 10  $\mu\text{m}$  以上離れた部位から長さ 40  $\mu\text{m}$  以上の範囲を計測できる。
2. 途中で大きな分枝がない。
3. 他の樹状突起と交わらない。

選択した樹状突起を Trace region で囲み Region > Save Region で任意の場所に任意の名前で保存する (例: region-a)。Edit > Duplicate > Image を選択すると region で指定された樹状突起画像ができる。Multi-Line で樹状突起線を引き、2 回コピー&ペーストをし、最初の Multi-Line から等間隔にずらし、樹状突起内に 3 本の線が引かれている状態にする。これを再び、Region > Save Region で任意の場所に保存する (例: region-b)。ドレブリン染色画像を開き、Region > Load Region から保存した region-a を指定する。Edit > Duplicate > Image を選択すると、region で指定された樹状突起が表

示される。Region > Load Region から保存した region-b を指定すると、先ほど引いた 3 本線がドレブリン染色画像の樹状突起内に表示される。Measure > Region Measurements を選択すると、3 本線の長さおよび輝度が表示される。Region Measurements > Open Log を選択し、Dynamic Data Exchange にチェックを入れる。Export Log Data > Sheet Name に任意の名前にし (dendrite)、OK を選択する。Excel が起動し、Region Measurements 内の Open Log が F9: Log Data になっているので、選択すると Excel 内に情報がエクスポートされる。Excel 内で 3 本線の輝度 (Average Intensity) から、3 本の平均輝度を算出する (この数値を解析する dendrite の平均輝度とする)。この数値の 2 倍の値を算出する (この値がクラスターを算出する閾値となる)。

Measure > Threshold Image > Low に算出した上記の閾値を入れ、Inclusive を選択することで、閾値以上の輝度のエリアが選択される。Delete All Region で樹状突起上の 3 本線を削除し、Integrated Morphology Analysis の Measure を押すと、クラスターがカウントされる。Integrated Morphology Analysis > Open Log > DDE にチェックを入れ、OK を選択する。Sheet Name を任意の名前にし (例: cluster)、F9: Log Data を選択すると、データがエクスポートされる。Object # がクラスターの数である。Excel ファイルには dendrite、cluster の 2 つのシートがあるので、dendrite シートの樹状突起の長さ (Distance)、cluster シートのクラスター数 (Object #) から 100  $\mu\text{m}$  あたりのクラスター数を算出した。

#### ELISA 法

本研究では、サンドイッチ ELISA 法を行った。プレートは ELISA 用プレート S

(Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Tokyo) または Nunc イムノプレート・マキシソープ (Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama) を使用した。固相抗体希釈バッファーは PBS (pH 7.4) または、0.05 M Carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)、洗浄バッファーは 0.05% Tween-20 in PBS (PBS-T)、ブロッキングバッファーは 5% BSA in PBS-T、抗体希釈バッファーは 0.1% BSA in PBS-T を使用した。固相抗体は抗ドレブリンマウスモノクローナル抗体 (クローン M2F6、以下 M2F6) を用い、検出抗体は全ドレブリン (アイソフォーム E および A) を検出する際には抗ドレブリンラビットポリクローナル抗体 (RDE1、以下 RDE1) を用い、ドレブリン A 特異的に検出する際には抗ドレブリン A 特異的ラビットポリクローナル抗体 (DAS2, Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., Fujioka, 以下 DAS2) を使用した。まず、固相抗体として M2F6 を固相抗体希釈バッファーにて、0.4  $\mu\text{g/ml}$  に希釈し、96 ウェルプレートに 100  $\mu\text{l}$  ずつ添加して 4 度で一晩インキュベートした。インキュベーション後、洗浄バッファーにてウェルを 4 回洗浄し、検量線作製のスタンダードとして精製ドレブリン E、および精製ドレブリン A を 1、10、100、200、1000  $\text{ng/ml}$  に PBS にて希釈したもの、およびドレブリン E と A の混合溶液を 100  $\mu\text{l}$  ずつウェルに添加した。また、マウス (野生型マウス、ドレブリン A 特異的ノックアウトマウス、ドレブリンノックアウトマウス) 脳組織抽出液 (1  $\text{mg/ml}$ ) 100  $\mu\text{l}$  もウェルに添加し、室温 2 時間でインキュベーションした。インキュベーション後、洗浄バッファーにて 4 回洗浄し、検出抗体として 5000 倍希釈した RDE1 もしくは、0.8  $\mu\text{g/ml}$  DAS2 を 100  $\mu\text{l}$  ずつ添加し、室温 2 時間インキュ

ベーションした。インキュベーション後、洗浄バッファーにて 4 回洗浄し、二次抗体として 1,000 倍希釈した HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG 抗体 (GE Healthcare UK Ltd.) を 100  $\mu\text{l}$  ずつ添加して、室温 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、洗浄バッファーにて 4 回洗浄し、基質である TMB-Super Sensitive One Component HRP Microwell Substrate (SurModics, Ind., MN, USA, 以下 TMBS) を 100  $\mu\text{l}$  添加し、室温 10–15 分インキュベート後、反応停止液として 1 N HCl を 100  $\mu\text{l}$  添加した。反応停止後、96 ウェルプレートをプレートリーダー (iMark Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories) にセットし、450 nm の吸光度を測定し、検量線を作製した。その検量線を元にマウス脳組織のドレブリン量を計算した。また、固相抗体として DAS2、検出抗体として M2F6 を用いる場合、それぞれの濃度は 0.4  $\mu\text{g/ml}$  とした。この場合二次抗体は HRP-conjugated sheep anti-mouse IgG 抗体 (GE Healthcare UK Ltd.) を用いた。

#### 統計処理

一元配置分散分析を行い、各実験において適切な Post-hoc 比較 (Dunnett 検定、Bonferroni 検定、Tukey-Kramer 検定) により危険率 0.05 を有意水準とした。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立大学法人群馬大学が保持する動物実験の適正な実施に関する規程、「国立大学法人群馬大学動物実験安全管理規程」に従った。

#### 脳疾患を再現した *in vitro* 実験系におけるヒト iPS 細胞由来神経細胞等の構造・機能の解析 (池谷)

##### 海馬培養スライス標本の作製

生後 7 日齢の Wistar/ST ラットを氷冷

麻酔した後に、断頭し全脳を摘出した。ヴィブラトームを用いて、GBSS (Gey's balanced salt solution) 中で厚さ 300  $\mu\text{m}$  の水平断切片を作製した。GBSS の組成は以下の通りである、120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.57 mM MgSO<sub>4</sub>, 27 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 36 mM D-glucose。また実験中は 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> ガスで GBSS を常に通気した。次に、この切片より海馬体切片 (海馬、歯状回、嗅内皮質を含む) を実顕微鏡下で切り出した (以下では、単に「海馬切片」と記す)。切り出された海馬切片を直径 30 mm の多孔質メンブレン上に配置し、それを 6 穴プレートに収めた。6 穴プレートの各ウェルには、1 ml の培地 (50% minimal essential medium, 25% horse serum, and 25% HBSS) を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターの中で培養した。培地は 3.5 日毎に交換した。実験には、6-12 日間培養した切片を使用した。

#### 機能的多ニューロンカルシウム画像法 (functional Multineuron Calcium Imaging; fMCI)

メンブレンを保持した培養切片を直径 30 mm のシャーレに移し、染色液 2 ml を加えて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 45 min カルシウム蛍光指示薬を負荷した。染色液は 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> ガスで飽和した ACSF (artificial cerebrospinal fluid: 127 mM NaCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 3.3 mM KCl, 1.24 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 mM MgSO<sub>4</sub>, 2.0-2.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose) 中に、0.0005% Oregon green 488 BAPTA-1 (OGB-1) AM, 0.01% Pluronic F-127, 0.005% Cremophor EL, 0.7% DMSO を含む。インキュベーション後、海馬切片を ACSF が還流される記録用チャンバー内に移した。還流液は 35-37°C に温め、0.8 ml/min の速度で流した。イメージングの対

象は海馬 CA3 野とし、同領野での神経細胞集団の自発活動をカルシウム蛍光シグナルとして記録した。本実験でのイメージングシステムとして、ニポウ板型共焦点レーザーキャナ、冷却 CCD カメラが配備された正立顕微鏡を使用した。16 $\times$ 、0.8 NA の水浸対物レンズを採用した。共焦点像は 488 nm 波長のレーザーで励起し、507 nm-ハイパスフィルタを通してカルシウム蛍光を観察した。画像は 512 $\times$ 512 ピクセルの 16 ビット強度で、10 Hz のフレーム速度で撮影した。

#### パッチクランプ記録

記録用のガラス電極は、外径 1.5 mm の芯入りガラスキャピラリーを用いて、電極作製用プレーにより作製した。電極抵抗は 3-7 M $\Omega$  に調整した。細胞内液の組成は K<sup>+</sup> ベース (in mM: 120 potassium gluconate, 10 KCl, 10 HEPES, 10 creatine phosphate, 4 Mg-ATP, 0.3 Na<sub>2</sub>-GTP, and 0.2 EGTA) または Cs<sup>+</sup> ベース (in mM: 130 CsMeSO<sub>4</sub>, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 creatine phosphate, 4 Mg-ATP, and 0.3 Na<sub>2</sub>-GTP) を用いた。細胞内液は使用直前にミリポアフィルタ (孔径 0.45  $\mu\text{m}$ ) を通じてガラス電極に充填した。陽圧 (50 - 100 hPa) をかけながら電極を細胞体に近づけ、陽圧を解除した後ギガセルを形成した。容量性電流を補正した後、陰圧をかけることで細胞膜を貫通しホールセルモードに移行した。膜電位の記録にはホールセル記録の電流固定法 ( $I = 0$  に固定)、シナプス伝達およびシナプス入力 of 記録には電位固定法 ( $V = -70$  または  $0$  mV に固定) を用いた。刺激には 1 M $\Omega$  程度の電極を海馬 CA3 野放線状層に置き、20  $\mu\text{s}$  の時間幅で 30 - 80  $\mu\text{A}$  の矩形波状の電流を注入した。データは 2 kHz のローパスフィルタを通じて 20 kHz でサンプリングした。

## シャノン指数の定義

回路の活動の分布について検討するため、時間軸に沿った標準化シャノン指数 ( $NSI_{time}$ )、細胞番号軸に沿った標準化シャノン指数 ( $NSI_{cell}$ ) を用いた。

シャノン指数はヒストグラム中の要素の分布のばらつきを定量化するパラメータである。シャノン指数 ( $SI$ ) は下の式で定義される。

$$SI = -\sum_i (k_i / K) \log_2 (k_i / K)$$

$K$  は要素の総数、 $k_i$  は  $i$  番目の区間中の要素の数である。このばらつきの定義はシャノンのエントロピーと概念的に同等である。シャノン指数は  $K$  の値と区間幅に非常に敏感であるため、集団間を比較するために、最大値または他の基準値で標準化されて用いられることがある。

本研究では、 $SI$  を最大値 ( $SI_{max}$ ) と最小値 ( $SI_{min}$ ) を基準として標準化を行った。 $SI_{max}$  と  $SI_{min}$  は  $K$  と区間幅を保ったまま、データをシャッフルすることで算出した。 $SI_{max}$  は要素が最大限に均等に再分配された場合に与えられ、 $SI_{min}$  は要素が最大限に偏って再分配された場合に与えられる。

ここで標準化シャノン指数 ( $NSI$ ) は下の式で定義される。

$$NSI = (SI - SI_{min}) / (SI_{max} - SI_{min})$$

$NSI$  は 0 から 1 の間の値をとり、要素の分布がよりばらついているほど、大きな値をとる。特に断りのない限り、 $NSI$  は多ニューロンカルシウム画像法のスパイク時系列中の活動のばらつきを定量化するのに用いた。本研究において、神経細胞の活動のばらつきは二つの観点から評価した。すなわち、ラスタプロットの垂直方向のばらつき (空間的ばらつき;  $NSI_{cell}$ ) と水平方向のばらつき (時間的ばらつき;  $NSI_{time}$ ) である。

(倫理面への配慮)

動物実験においては東京大学が保持する動物実験の適正な実施に関する規程「東京大学動物実験実施規則」に従った。

## グリア細胞を利用した神経回路形成及び多点平面電極システムによる

### 安全性評価試験法の確立 (宮本)

### ラット大脳皮質由来初代培養ニューロンの調整及び維持培養

妊娠 18 日目の Wistar strain ラット (Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan) 胎児から初代培養大脳皮質ニューロンを調整した。大脳皮質をトリプシン処理後、70 nm nylon mesh を通過させることにより細胞を分散させ、 $2 \times 10^5$  個の細胞を MED-P210A プローブディッシュ (Alpha Med Scientific, Osaka, Japan) に播種した。プローブディッシュは、事前に 0.1% polyethyleneimine 溶液を室温で一晩、その後 3.3 mg/mL の laminin (Sigma-Aldrich, MO, USA) を 37°C で 1 時間コートした。細胞は、Neurobasal/B-27/GLUTAMAX (Life Technologies, Inc., MD, USA) で維持培養した。

### マウス由来初代培養アストロサイト調整及びアストロサイト調整培地作製

生後 1 日から 2 日目の C57BL/6J マウス (Charles River Laboratories Japan, Inc., Yokohama, Japan) から大脳皮質由来初代培養アストロサイトを調整した。新生児の大脳皮質をトリプシン処理後、70 nm nylon mesh を通過させることにより細胞を分散させ、未コートの 75 cm<sup>2</sup> フラスコで培養した。培養は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose (Life Technologies, Inc., MD, USA) に非動化した

10% ウシ胎児血清 (Life Technologies, Inc., MD, USA) を添加した培地を用い、5% CO<sub>2</sub> 環境下、37°Cで行った。細胞がコンフルエントに達した後、一晩振とう培養することによりマイクログリア等の非アストロサイト細胞を除去した。アストロサイトは、抗 glial fibrillary acidic protein 抗体を用いた免疫染色により 95% 以上の純度であることを確認した。アストロサイト調整培地は、週 2 回の培地交換ごとに回収し、使用するまで -80°C に凍結保存した。

### hiPSC-neuron の維持培養

iCell Neurons (Cellular Dynamics International, WI, USA) は解凍後、ラット大脳皮質由来初代培養ニューロンと同様の方法で MED-P210A プローブディッシュに播種し、iCell neuron 維持培地 (Cellular Dynamics International, WI, USA)、または iCell neuron 維持培地にマウス初代培養大脳皮質アストロサイト調整培地を 4:1 の比率で加えた培地で培養した。培養は、37°C で 5% CO<sub>2</sub> 環境下で行い、培地交換は週 2 回半量交換で行った。ReproNeuro Glu (ReproCELL, Yokohama, Japan) 及び ADhNPC (Axol, Cambridge, UK) も各細胞用に添付された維持培地を用いる以外は同様に MED-P210A プローブディッシュに播種し、維持した。

### 細胞外電位記録

MED-P210A プローブ内の 64 チャンネル上の細胞の自発性興奮による発火の同時記録は、MED64-Quad II システム (Alpha Med Scientific Inc., Osaka Japan) を用いて行った。発火解析は m、Mobius ソフトウェア及び Mobius Offline Tool Kit (Alpha Med Scientific Inc., Osaka, Japan) を用いて行った。スパイク閾値は、各試験後の細胞に 100 nM

tetrodotoxin (TTX) 処置した後のベースラインに対する RSM 値を 550 に設定して決定した。

(倫理面への配慮)

動物実験においてはエーザイ株式会社筑波研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する指針及び規程、エーザイ動物実験指針、エーザイ動物実験委員会規定、及びエーザイ動物実験承認規定に従った。

### 脳神経機能を再現したヒト iPS 細胞由来神経細胞等およびそれを用いた薬理評価系の開発 (佐藤)

#### hiPSC-neuron の培養

##### • Repro-Glu(ReproCELL)

ReproCELL (Repro) から購入したヒト iPS 細胞由来神経細胞 (Repro-Glu) を、 $7.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の割合で、ポリ-d-リジン/ラミニンコートした 8 well スライドチャンバーに播種し、Aditive A (Repro) を添加した Maturation 培地 (Repro) を用いて分化誘導を行った。

##### • iCell Neuron (iNeuron) (CDI)

Cellular Dynamics International (CDI) から購入したヒト iPS 細胞由来神経細胞 (iCell® Neurons: iNeuron) を、 $7.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の割合で、ポリ-d-リジン/ラミニンコートした 8 well スライドチャンバーに播種し、iNeuron 培地 supplement (CDI) を添加した iNeuron maintenance 培地 (CDI) を用いて培養を継続した。実験に応じて、播種 4 日目からグリア由来因子 X を 5 日間添加して培養した。

#### Fura-2 Ca<sup>2+</sup> イメージング

細胞は、ポリオルニチンフィブロネクチンコートした 8 ウェルスライドチャンバーに播種し、経日的に分化誘導した後、Ca<sup>2+</sup> 応答実験に用いた。Ca<sup>2+</sup> プローブ

Fura2-AM 10  $\mu\text{M}$  を室温、45 分間処置し細胞内に取り込ませた。Ca<sup>2+</sup> 解析装置 AQUACOSMOS (浜松ホトニクス) を用いて、励起波長 340nm/380nm 蛍光波長 510nm により得られた Fura2 蛍光像より蛍光強度の比を算出した。

### Fura-2 Ca<sup>2+</sup> イメージング系を用いた薬理実験

各種薬理実験は、Buffer saline solution (BSS) 中、灌流システムを用いて (2.0 ml / min) 行った。薬理実験は以下の手順で行った。①自発発火が起こっているか、それが同期しているかどうかを確かめ、神経回路形成を確認する、②ATP (100  $\mu\text{M}$ ), L-Glu (100  $\mu\text{M}$ ), GABA (100  $\mu\text{M}$ ), HighK<sup>+</sup> (80 mM) を適用し、これらの機能受容体の発現について確認する、③ AP-5 (NMDA receptor antagonist) 単独あるいは AP-5 と DNQX (AMPA/KA receptor antagonist) のカクテルが L-Glu への反応に影響を与える可動化を検討することにより、L-Glu 受容体サブタイプを同定する、の3段階の実験である。薬物流入後、流入前に比較して 5% 以上の Ca<sup>2+</sup> 流入の変化が認められた場合に影響有り、と判断した。

### 免疫組織化学的検討

培養 1-28 日目の標本について細胞組成を確認するため、免疫組織化学的に  $\beta 3$  tubulin, Nestin, GFAP の発現を確認した。平滑筋細胞があるかどうかについて  $\alpha$  smooth muscle actin 1 ( $\alpha\text{SM1}$ ) の発現を確認した。GABA 作働性神経細胞の含有率を確認するため、Tuj1, GABA を共染色した。シナプス成熟マーカーの発現およびその分布についても検討を行った。前シナプス部の成熟を検討するため Vglut2, Synapsin 1、後シナプス部の成熟を検討するために MAP2、drebrin について検討した。必要に応じて視

野中細胞数を確認するため Hoechst33342 を用いて核染色を行った。観察画像はすべて Nikon 共焦点レーザー顕微鏡システム A1 により取得した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所が保持する動物実験の適正な実施に関する規程に従った。Neurosphere に関しては、分化済み細胞塊であるため、国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会より平成 23 年 1 月 31 日に倫理審査非該当と判定された。ストックバイアルは施錠可能な国立医薬品食品衛生研究所薬理部第一室にて有人監視のもと液体窒素中保管している。実験に使用した細胞は実験終了後全てオートクレーブし廃棄した。

## C. 研究結果

### ヒト iPS 細胞由来神経細胞等を用いた新規 in vitro 医薬品安全性評価法の開発 (白尾)

#### 1. アミロイド $\beta$ オリゴマー (ADDL) 投与によるシナプス機能変化の実験

##### 1-1) ADDL の作成

まず始めにアミロイド  $\beta$  オリゴマーを作成し、オリゴマー化はウェスタンブロッティングにより確認した (Fig. 1)。

##### 1-2) ADDL 投与によるドレブリンクラスター数の変化

100 nM の ADDL を 21DIV の海馬初代培養細胞に投与し、6 時間後、24 時間後のドレブリンクラスター数を測定したところ、経過時間依存的にドレブリンクラスター数が減少した (Fig. 2)。

##### 1-3) SAHA 処理によるヒストンアセチル化の変化

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (SAHA) を投与後 1 時間および 24 時間後

で、ウェスタンブロットによりヒストンのアセチル化を検討したところ、両経過時間において、SAHA の用量依存的にアセチル化ヒストンの量が増加していた (Fig. 3)。

1-4) SAHA 処理によるドレブリンクラスターの変化

21DIV の海馬初代培養細胞に SAHA を投与した 1 時間後に 100 nM の ADDL を投与後ドレブリンクラスター数を DIBES 法で測定した。その結果、SAHA は ADDL の効果を阻害することがわかった (Fig. 4)。

## 2. アロプログナロン投与によるシナプス機能変化の実験

種々の濃度のアロプレグナロン ( $5\alpha$ -pregnan- $3\alpha$ -ol-20-one) を培養 21 日の神経細胞に投与し、24 時間後にドレブリンクラスター数を測定した (Fig. 5)。0.1  $\mu$ M では有意な変化は検出できなかったが、0.3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M では有意にドレブリンクラスター数が増加した。このことから、アロプレグナロンの活性を用量依存的に検出できた可能性を示している。

## 3. ELISA によるドレブリンアイソフォームの特異的定量

種々の抗体の組み合わせによりドレブリンの検出の感度を上げる方法を試みた。

3-1) 固相抗体にドレブリンに対するマウスのモノクローナル抗体 (クローン M2F6、0.4  $\mu$ g/ml) を用い、検出抗体にドレブリンラビットポリクローナル抗体 (RDE1、5000 倍希釈) を用いて、サンプル中のドレブリン全量を検出した (Fig. 6)。この系ではドレブリン E および A の全量を検出することから、精製ドレブリン E を添加したレーン (青グラフ)、精製ドレブリン A を添加したレーン (赤グラフ) およびドレブリン E と A の混合液 (黄色グラフ) でドレブリンの濃度にしたがって吸光度が上昇した。DE +

DA の測定結果から標準曲線を書いて、マウス大脳皮質サンプルのドレブリン濃度を算出した。野生型マウス (WT) およびドレブリン A 特異的ノックアウトマウス (DAKO) のサンプルでドレブリンが測定できるのに対して、ドレブリンノックアウトマウス (DXKO) のサンプルではドレブリンが測定できないことから、マウス脳組織サンプル中のドレブリン E、A の量を測定することできたと考えられる。

3-2) 固相抗体にドレブリンに対するマウスのモノクローナル抗体 (クローン M2F6、0.4  $\mu$ g/ml) を用い、検出抗体にドレブリン A 特異的ラビットポリクローナル抗体 (DAS2、0.8  $\mu$ g/ml) を用いて、サンプル中のドレブリン A 量を検出した (Fig. 7)。この系ではドレブリン A のみを検出することから、精製ドレブリン E を添加したレーン (青グラフ) では吸光度は上昇せず、ドレブリン A を添加したレーン (赤グラフ) およびドレブリン E と A の混合液 (黄色グラフ) でドレブリンの濃度にしたがって吸光度が上昇した。DA の測定結果から標準曲線を書いて、マウス大脳皮質サンプルのドレブリン濃度を算出した。野生型マウス (WT) のサンプルでドレブリン A が測定できるのに対して、ドレブリン A 特異的ノックアウトマウス (DAKO) およびドレブリンノックアウトマウス (DXKO) のサンプルではドレブリンが測定できないことから、ドレブリン A の量を測定することできたと考えられる (DXKO はドレブリン E、A とともに欠損のマウスなので今回の値は実験誤差であると考えられる)。

3-3) ドレブリン A を特異的に測定するために固相抗体に 0.4  $\mu$ g/ml DAS2 を用い、検出抗体に 0.4  $\mu$ g/ml M2F6 を用いた検出法を行った。この系においても理論的には手法



3-2 と同様にドレブリン A を特異的に検出できると考えられた (Fig. 8)。しかしながら、本手法ではドレブリン A を検出することができなかった。

#### 4. ヒト iPS 細胞由来神経細胞の抗ドレブリン抗体染色

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を抗ドレブリン抗体で染色した。

ラット初代培養神経細胞を *in vitro* で 3 週間ほど維持すると、多くのドレブリンクラスターが確認される (Fig. 9A)。しかしながら、hiPSC-neuron (iNeuron 及び Ripro DA) ではそのようなドレブリンクラスター密度の増加は起こらなかった (Fig. 9B、C)。このことから、この時期の hiPSC-neuron は十分に成熟しているとは言えず、成熟したシナプスもまだ存在していないか、あっても少数にとどまっていると考えられる。

#### 脳疾患を再現した *in vitro* 実験系における ヒト iPS 細胞由来神経細胞等の構造・機能の解析 (池谷)

##### 1. 非 NMDA 受容体拮抗薬はシナプス伝達強度を減弱させる

神経細胞の駆動力は、グルタミン酸を介した興奮性シナプス入力であり、GABA を介した抑制性シナプス入力に抑止力となる。グルタミン酸受容体には AMPA 受容体と NMDA 受容体・カイニン酸受容体が存在する。NMDA 受容体は通常不活性であることから興奮性シナプス入力の大部分が AMPA 受容体・カイニン酸受容体を介したものであるとされている。そこで、興奮性シナプス伝達強度の操作に非 NMDA 受容体拮抗薬の一種である CNQX を用いた。

はじめに、CNQX がシナプス伝達強度に与える影響を調べるため、海馬 CA3 野錐体細胞に投射する線維を刺激した際の応答を、パッチクランプ法により記録した。刺

激には海馬 CA3 野の放線状層に刺激電極を置き、20  $\mu$ s の時間幅で 30 - 80  $\mu$ A の矩形波状の電流を注入する方法を用いた。刺激直後に、海馬 CA3 野の錐体細胞から興奮性のシナプス伝達が記録された。CNQX 処置 10 分後にも同様の実験を行ったところ、シナプス伝達量が大きく減弱する様子が観察された。定量した結果、興奮性シナプス伝達はコントロール時の  $16.3 \pm 15.2\%$  まで減弱した (control:  $580 \pm 192.9$  pA, CNQX:  $100.9 \pm 192.9$  pA,  $*P = 0.012$ ,  $t_3 = 5.4$ , paired *t*-test, mean  $\pm$  SD of 4 cells)。

##### 2. 神経回路の自発活動はシナプス伝達強度が減弱しても強固に保たれる

上記で示した興奮性シナプス伝達強度の減弱が海馬の神経回路に与える影響を検証するために、fMCI によって個々の細胞の発火活動を記録した。記録した各ムービーからおよそ  $96.9 \pm 7.2$  細胞 (mean  $\pm$  SD of 11 videos from 11 slices) の活動を再構築した。セルアタッチ記録と fMCI の同時記録の結果から、個々のカルシウム蛍光強度変化が神経細胞の発火活動を反映していることが確認された。また、CNQX (50  $\mu$ M) 処置下においても、すべてのスライスで発火活動を反映したカルシウム蛍光強度変化が観察された (Fig. 10)。コントロール時の個々の細胞の活動頻度は  $1.62 \pm 0.55$  events/cell/min であった (mean  $\pm$  SD of 11 slices)。

自発的に活動するスライスに CNQX (50  $\mu$ M) を処置し、その後の活動を fMCI により記録した。その結果、意外なことに、CNQX 処置 10 分後においても自発活動が維持されることを見出した ( $n = 4$  slices)。別の非 NMDA 受容体拮抗薬である DNQX を用いても自発活動は維持された ( $n = 3$  slices)。そのため、以降、CNQX 処置時のデータと DNQX 処置時のデータは統合し

て解析を行った。非 NMDA 受容体拮抗薬処置後の活動頻度は  $1.86 \pm 1.19$  events/cell/min (mean  $\pm$  SD of 7 slices) であり、コントロール時と比較して有意な差は認められなかった ( $P = 0.64$ ,  $t_8 = 0.49$ , Welch's  $t$  test versus control)。この結果に加え、CNQX 処置時もカルシウム蛍光強度変化が活動電位を反映していること、ナトリウムチャンネル拮抗薬であるテトロドトキシン ( $2 \mu\text{M}$ ) 処置よりカルシウム活動が消失したことから ( $0.11 \pm 0.08$  events/cell/min, mean  $\pm$  SD of 4 slices,  $P = 4.1 \times 10^{-5}$ ,  $t_4 = 19.5$ , Welch's  $t$  test versus control)、非 NMDA 受容体拮抗薬は自発活動の活動頻度を変化させないと結論づけた。

さらに、他の受容体の関与について検証するため、CNQX に加え、NMDA 受容体拮抗薬である AP5 や GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬であるピクロトキシンを処置した際の回路の活動を fMCI により記録した。CNQX に加え、AP5 ( $50 \mu\text{M}$ ) を処置した際の回路の活動量は、 $1.48 \pm 0.80$  events/cell/min であり、コントロール時の活動量と同程度であった ( $P = 0.67$ ,  $t_6 = 0.47$ , Welch's  $t$  test versus control, mean  $\pm$  SD of 4 slices)。さらに、CNQX、AP5 に加えピクロトキシン ( $50 \mu\text{M}$ ) を処置すると活動量は  $0.26 \pm 0.17$  events/cell/min まで減少した ( $P = 1.1 \times 10^{-4}$ ,  $t_6 = 8.9$ , Welch's  $t$  test versus control, mean  $\pm$  SD of 4 slices)。これらの結果から、グルタミン酸を介した興奮性シナプス伝達と GABA を介した抑制性シナプス伝達の両者を減弱させると回路の活動量は減少するものの、興奮性シナプス伝達のみを抑制しても回路の活動量が維持されることが示された。

### 3. 非 NMDA 受容体拮抗薬は興奮性シナプス入力だけでなく抑制性シナプス入力も減少させる

興奮性シナプス伝達強度の減弱に対する、自発活動の安定性のメカニズムに迫るため、興奮性シナプス後電流 (sEPSC)、抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を海馬 CA3 野の錐体細胞からパッチクランプ法で記録した (Fig. 11)。

sEPSC はホールセル記録で膜電位を  $-70$  mV に固定して記録した。CNQX を処置すると、sEPSC が大きく減弱する様子が観察された。sEPSC のトレースから各イベントの強度と頻度を定量すると、電気刺激に対する応答と同様に、CNQX 処置下で sEPSC の強度が減弱することが明らかになった (Control  $38.2 \pm 13.9$  pA, CNQX  $20.5 \pm 12.1$  pA,  $P = 0.016$ ,  $W = 21$ , Wilcoxon signed-rank test, mean  $\pm$  SD of 6 cells)。一方で、頻度に関しては有意な差は認められなかった (Control  $28.9 \pm 22.2$  Hz, CNQX  $25.6 \pm 16.2$  Hz,  $P = 0.46$ ,  $W = 10$ , mean  $\pm$  SD of 6 cells)。同様に、ホールセル記録を用いて sIPSC を記録した。この際、膜電位は  $0$  mV に固定した。その結果、意外なことに、sIPSC は直接 AMPA 受容体を介さないにも関わらず、CNQX 処置により大きく減弱する様子が観察された。定量すると、sEPSC と同様に強度が減弱し、頻度に有意な差は認められなかった (強度: Control  $95.7 \pm 61.1$  pA, CNQX  $44.5 \pm 17.5$  pA,  $P = 0.016$ ,  $W = 21$ ; 頻度: Control  $47.9 \pm 32.5$  Hz, CNQX  $52.8 \pm 36.2$  Hz,  $P = 0.093$ ,  $W = 19$ , Wilcoxon signed-rank test, mean  $\pm$  SD of 6 cells)。

CNQX 処置による sEPSC と sIPSC の減弱が同程度の割合であったことから、CNQX 処置前後の興奮・抑制バランスが保たれていることが推察された。そこで、その可能性を検証するため、興奮性シナプス入力量と抑制性シナプス入力量から興奮・抑制バランスを算出し、CNQX 処置前後で比較した。興奮性シナプス入力量・抑制性

シナプス入力 of 計算には、各イベントの面積を算出し、その和を用いた。その結果、CNQX 処置前後で興奮・抑制バランスに有意な差は認められなかった (Control  $0.24 \pm 0.44$ , CNQX  $0.18 \pm 0.073$ ,  $P = 0.12$ ,  $t_7 = 1.7$ , Welch's  $t$  test, mean  $\pm$  SD of 6 cells)。

このように興奮・抑制のバランスが保たれたままシナプス入力量が減少したことが、回路の自発活動が恒常的に保たれる理由の一つであると考えられる。

#### 4. 非 NMDA 受容体拮抗薬は神経細胞の膜抵抗を上昇させる

興奮性シナプス入力、抑制性シナプス入力の相互作用は膜電位や膜抵抗を変化させることにより、細胞の活動を制御することが知られている。そこで、CNQX が海馬 CA3 野の錐体細胞の膜特性に与える影響をパッチクランプ法のホールセル記録により調べた。

はじめに、電位固定法 ( $I = 0$  に固定) により膜電位を記録した。得られたトレースから静止膜電位と閾値下の膜電位のゆらぎ (SD) を算出した。静止膜電位はトレースから発火活動の膜電位変化を除いた部分の平均により算出した。その結果、CNQX 適用前後において、静止膜電位、膜電位のゆらぎともに有意な変化は認められなかった (静止膜電位: Control  $-62.2 \pm 3.36$  mV, CNQX  $-61.6 \pm 3.47$  mV,  $P = 0.33$ ,  $t_7 = 1.0$ , paired  $t$ -test, mean  $\pm$  SD of 8 cells, 膜電位のゆらぎ: Control  $1.48 \pm 0.72$  mV, CNQX  $1.34 \pm 1.11$  mV,  $P = 0.71$ ,  $t_8 = 0.39$ , paired  $t$ -test, mean  $\pm$  SD of 9 cells)。

次に、矩形波状の脱分極電流を注入した際の膜電位の応答から膜抵抗と膜容量という 2 つのパラメータを算出した。膜抵抗は入力に対する細胞の応答性を表し、大きな値を取るほど特定の強度の入力に対し大きな膜電位変動を示す。膜容量は細胞膜の大

きさの指標となり、シナプス小胞の形質膜融合により細胞膜の面積が増大すると膜容量も上昇する。定量した結果、CNQX 処置により膜抵抗が有意に増大することが明らかになった (Control  $116.7 \pm 18.8$  M $\Omega$ , CNQX  $179.2 \pm 69.6$  M $\Omega$ ,  $P = 0.041$ ,  $t_6 = 2.6$ , paired  $t$ -test, mean  $\pm$  SD of 7 cells)。一方で、膜容量は有意な変化が認められなかった (Control  $177.1 \pm 23.2$  pF, CNQX  $167.2 \pm 44.7$  pF,  $P = 0.31$ ,  $t_6 = 1.1$ , paired  $t$ -test, mean  $\pm$  SD of 7 cells)。

つまり、CNQX 処置により細胞の膜抵抗が上昇し、入力に対する応答性が上昇したことが明らかになった。これにより、シナプス入力量が減弱しても回路の活動量が保たれたと考えられる。

#### 5. 非 NMDA 受容体拮抗薬は温度上昇による過剰な同期活動を抑制する

興奮性シナプス入力が過剰に亢進すると、過剰に同期した活動が見られる。こうした同期活動はけいれん等の発作時に見られることが知られている。

これまでの結果から、非 NMDA 受容体拮抗薬は正常な状態の神経回路の自発活動を変化させないことが明らかになった。また、非 NMDA 受容体拮抗薬は、近年、新たな作用機序の抗てんかん薬として注目を集めている。特に、非 NMDA 受容体拮抗薬の特徴として、大きな副作用が少ないことが挙げられている。そこで、CNQX は通常な状態の回路の活動は変えることなく、けいれん発作時に見られるような同期的な活動を抑制するのではないかという仮説を立てた。

この仮説を検証するため、過剰に同期した回路の活動に CNQX が与える影響を fMCI を用いて記録した。過剰な同期活動は記録用チャンバーを  $35^{\circ}\text{C}$  から  $40.5^{\circ}\text{C}$  に上げることにより誘導した。こうした熱

による同期活動は *in vitro* 標本における熱性けいれんモデルとして用いられる。同期した活動の誘導後に、CNQX を処置すると異常な同期活動は消失した。なお、CNQX 処置時の細胞外液の温度は 40.5°C に保った。神経回路の活動量を定量したところ、チャンバーの温度を上げることで増加し、CNQX の処置により減少することが明らかになった (control: 1.79 ± 1.15 events/cell/min, heated: 6.56 ± 4.48 events/cell/min, CNQX: 0.67 ± 0.21 events/cell/min, control versus heated;  $P = 0.048$ ,  $t_4 = 2.8$ , heated versus CNQX;  $P = 0.034$ ,  $t_4 = 3.2$ , paired *t*-test, mean ± SD of 5 slices)。コントロール時と CNQX 処置時の活動量に有意な差は認められなかった (control versus heated;  $P = 0.066$ ,  $t_4 = 2.5$ , paired *t*-test)。

活動量だけでなく、回路の同期性や活動の偏りについても評価するため、 $NSI_{time}$  と  $NSI_{cell}$  を算出した。その結果、細胞外液温度の上昇により低下した  $NSI_{time}$  は CNQX の処置により上昇した (control:  $0.87 \pm 6.0 \times 10^{-3}$ , heated:  $0.40 \pm 0.08$ , CNQX:  $0.98 \pm 5.0 \times 10^{-4}$ , control versus heated;  $P = 8.4 \times 10^{-3}$ ,  $t_4 = 4.8$ , heated versus CNQX;  $P = 0.034$ ,  $t_4 = 3.2$ , paired *t*-test, mean ± SD of 5 slices)。一方で、細胞外液の上昇により  $NSI_{cell}$  は低下し、CNQX の処置により上昇した (control:  $0.70 \pm 0.07$ , heated:  $0.93 \pm 0.10$ , CNQX:  $0.53 \pm 0.11$ , control versus heated;  $P = 0.011$ ,  $t_4 = 4.5$ , heated versus CNQX;  $P = 0.011$ ,  $t_4 = 4.5$ , paired *t*-test, mean ± SD of 5 slices)。

つまり、非 NMDA 受容体拮抗薬は過剰に同期した回路の活動を抑制することが明らかになった。

### グリア細胞を利用した神経回路形成及び多点平面電極システムによる安全性評価試験法の確立 (宮本)

## 1. 評価に必要な脳機能メカニズムを備えた hiPSC-neuron 等の選抜、機能促進条件の検討

Cellular Dynamics International (CDI) 社の iPS 細胞由来神経細胞 (iCell Neurons) MEA 上に播種し、アルファメッドサイエンティフィック社の MED64 システムを用い細胞外電位変化を測定することにより神経細胞の自発性興奮を測定した。iCell Neurons 単独では自発性興奮が観察されなかったが、マウス由来のアストログリア細胞調整培地を 2 ヶ月間作用させることにより、自発性興奮を数値として検出することに成功した (Fig. 12)。得られた応答は、複数電極間で同調し周期性を持った (Fig. 13)。iCell Neurons の自発性興奮は、ラットの初代培養大脳皮質ニューロンと同様に GABA 受容体の阻害剤である GABA<sub>A</sub>により用量依存的に増強された (Fig. 14)。GABA<sub>A</sub>による iCell Neurons の興奮増強作用は、複数電極間で同調し周期性を持った部分のみに観察された (Fig. 15)。この同調した自発性興奮は、神経伝達物質放出阻害薬である ω-agatoxin IVA (ATX) 及び ω-conotoxin GVIA (CTX) により阻害された (Fig. 16)。iCell Neurons 以外の hiPSC-neuron である ReproNeuro Glu 及び ADhNPC を用いて同様の実験を試みているが、現在のところ iCell Neurons 以外では自発性興奮を誘導することには成功していない (Data not shown)。

グリア細胞の可溶化因子による hiPSC-neuron 等の自発性興奮誘導の機能発現を促進する条件について調べたところ、iCell Neurons の自発性興奮を観察できるようにするためには、少なくとも 7 週間アストロサイト調整培地を共存させる必要があることがわかった (Fig. 17)。刺激に用いる