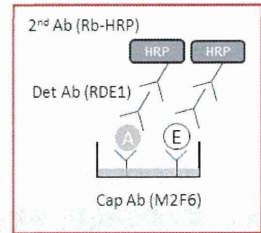
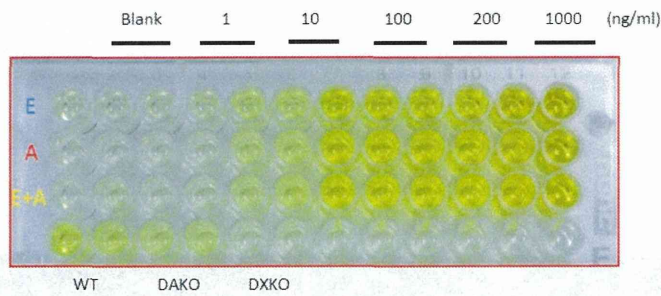


Figure 6

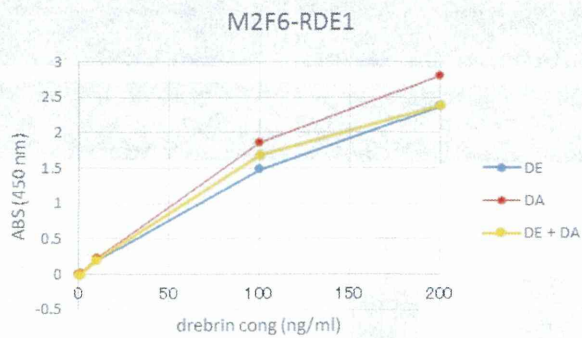
A

M2F6→DAS2

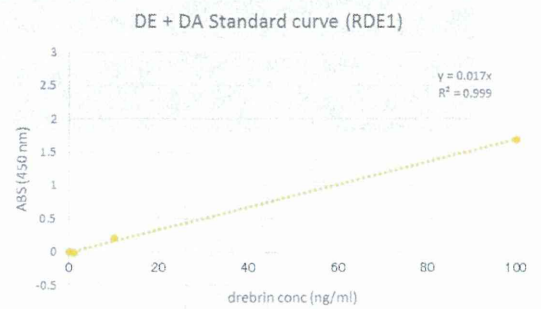
Cap Ab: M2F6 (0.4 ug/ml)
Det Ab: RDE1 (1/5,000)



B



C

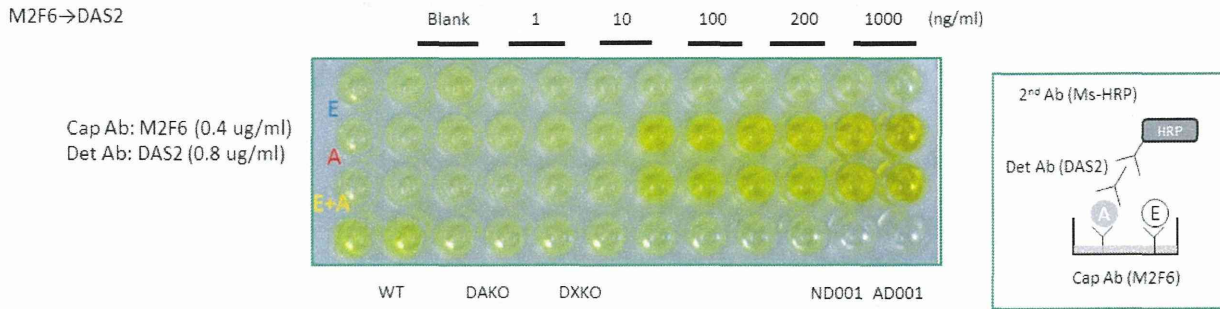


Sample	WT	DAKO	DXKO
ABS (450 nm)	0.548	0.358	0.139
Δblank (DE + DA, 0.1585)	0.3895	0.1995	-0.0195
Conc (ng/ml)	22.91	11.73	N.D.

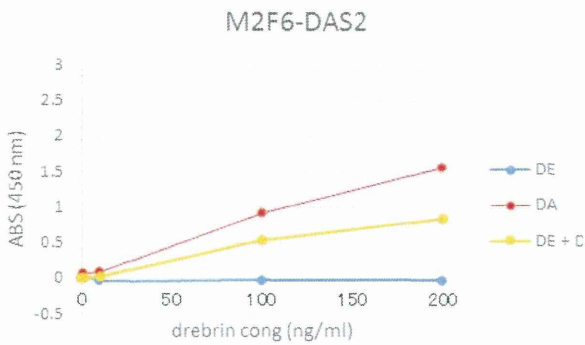
Fig. 6 ELISA for measuring the amount of drebrin E and A by using M2F6 (Capture Ab) and RDE1 (Detection Ab). The actual photo of ELISA plate result and the scheme of this reaction system (A). The absorbance of each drebrin concentration was plotted in graph B. An approximate formula was calculated by the absorbance of samples and drebrin concentration was calculated by the formula (C).

Figure 7

A



B



C

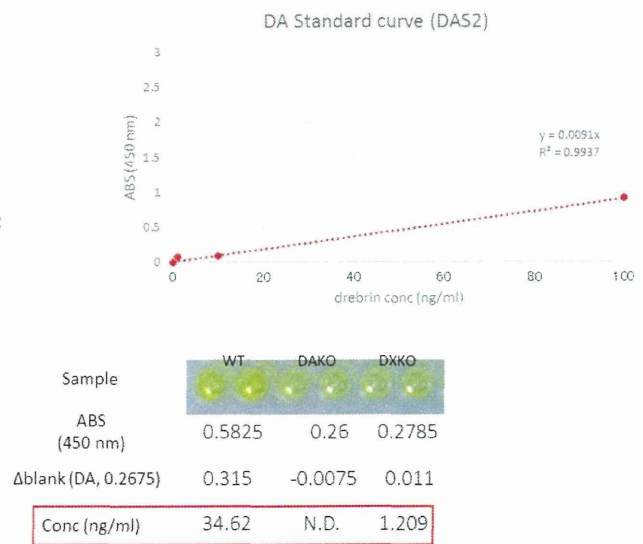


Fig. 7 ELISA for measuring the amount of drebrin A by using M2F6 (Capture Ab) and DAS2 (Detection Ab). The actual photo of ELISA plate result and the scheme of this reaction system (A). The absorbance of each drebrin concentration was plotted in graph B. An approximate formula was calculated by the absorbance of samples and drebrin concentration was calculated by the formula (C).

Figure 8

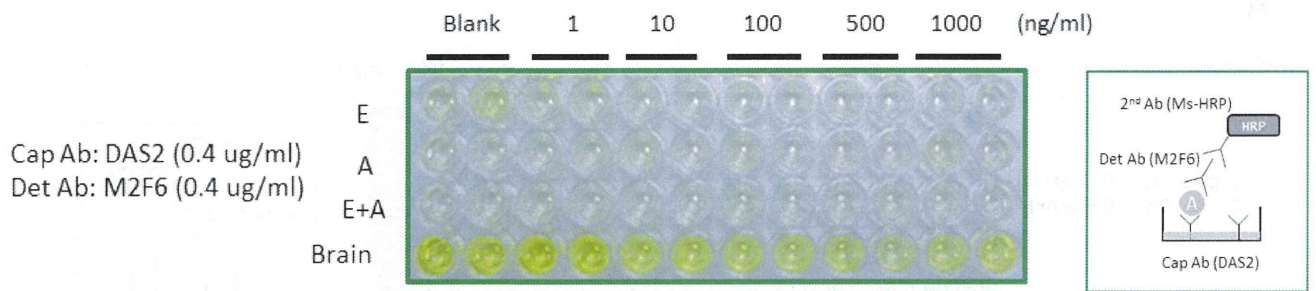


Fig. 8 ELISA for measuring the amount of drebrin A by using DAS2 (Capture Ab) and M2F6 (Detection Ab). The actual photo of ELISA plate result and the scheme of this reaction system.

Figure 9

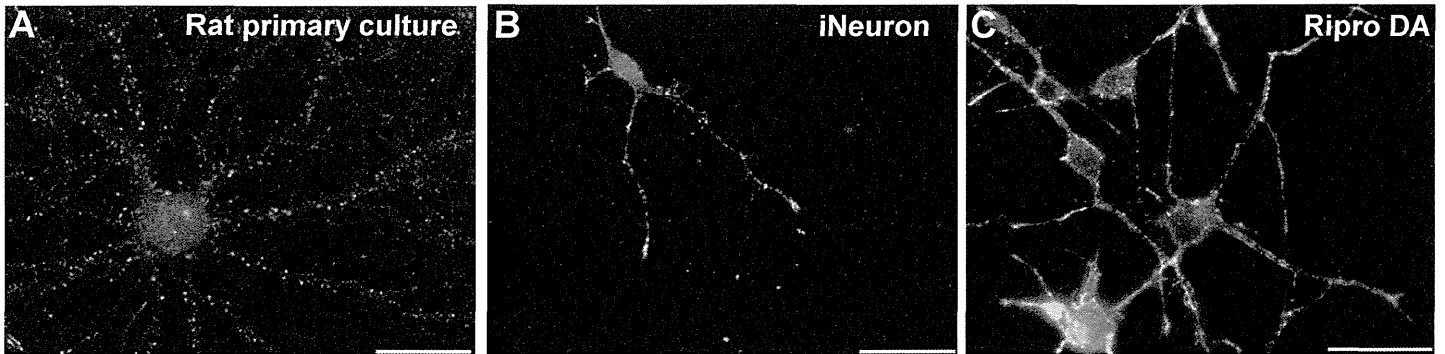


Fig. 9 Immunofluorescence labeling of drebrin in rat hippocampal neuron (A), iNeuron (B), and Ripro DA (C). Neurons were fixed at 21 DIV and immunolabeled with anti-drebrin antibody (M2F6). Scale bars, 30 μm .

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

担当責任者 池谷 裕二

東京大学・大学院薬学系研究科・薬品作用学教室

研究要旨

本研究では、神経異常活動の数値化指標を確立するために、脳内の自発活動が恒常的に保たれるメカニズムの解明を試みた。実験には機能的多ニューロンカルシウムイメージングを用いた。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、以下の点を明らかにした。

- (1) 全体のシナプス伝達量が減弱しても回路の活動量は安定して保たれる
- (2) シナプス伝達強度を減弱させても興奮・抑制のバランスは保たれる
- (3) シナプス伝達強度を減弱させると興奮性細胞の膜抵抗が上昇する
- (4) 細胞外温度を上昇させて興奮性シナプス伝達を過剰に亢進させると、回路の活動は過剰な同期活動を示す。この同期活動は非 NMDA 受容体拮抗薬により抑制される

本研究により、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が示唆された。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が、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。

抑制のバランスが自発活動の恒常性を保つ鍵であると考えられる。神経回路における

研究協力者

東京大学・大学院薬学系研究科・薬品作用学教室 准教授

小山 隆太

A. 研究目的

神経回路は外部刺激がない状況下でも恒常的に活動する。こうした自発的な活動は興奮性入力と抑制性入力により精密に制御されている。例えば、興奮性シナプス伝達が増強されると、てんかん発作などの異常な活動を引き起こすことから、興奮・

自発活動の挙動と興奮・抑制バランスの関係性を直接結びつける知見は、ほとんど存在しない。これは、神経回路の活動を単一細胞レベルで記録する手法や、自発活動を観察できるスライス標本が限られていたことに起因する。

本研究室では、機能的多ニューロンカルシウム画像法 (functional Multineuron Calcium Imaging, fMCI) を開発している。fMCI では、カルシウム蛍光指示薬を多数の細胞に負荷することで、活動電位依存的

な細胞内カルシウム濃度上昇を捉えることが可能となる。さらに、*in vitro* 標本において自発活動を観察するために、培養スライス標本の作製プロトコルを改良した。自発的な活動を研究する上で、培養スライス標本は非常に有用な手法である。代表的な *in vitro* 標本の急性スライス標本では、標本作製の際に神経線維が切れることで、自発活動量が著しく低下する。しかし、培養スライス標本では培養の過程で神経線維が伸長することで回路が再編成され、自発活動量は元のレベルまで戻る。実際、培養スライス標本で観察される自発活動が、生体下で観察される自発活動に類似した特性を持つ。

そこで、当該研究では、fMCI と培養スライス標本を組み合わせることで興奮・抑制バランスと神経回路の活動の関係性に迫った。はじめに、興奮性シナプス伝達強度を操作することにより、興奮・抑制バランスを操作した際の回路の活動を観察した。興奮性シナプス伝達、抑制性シナプス伝達の両者が精密に制御されることで、回路の活動が保たれると考えられていることから、興奮性シナプス伝達強度を減弱させると、回路の活動は減少すると予測される。それにも関わらず、回路の活動が非常に強固に維持されることを見出した。そこで、回路の興奮・抑制バランスや細胞の内因的特性を調べることにより、自発活動の頑強性を支える回路基盤に迫った。

B. 研究方法

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 μm 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 CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.57 mM MgSO₄, 27 mM NaHCO₃, 0.8 mM NaH₂PO₄, 0.22 mM KH₂PO₄, 36 mM D-glucose。また実験中は 95% O₂/ 5% CO₂ 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) を実体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% CO₂ 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% CO₂ 下で 45 min カルシウム蛍光指示薬を負荷した。染色液は 95% O₂/5% CO₂ ガスで飽和した ACSF (artificial cerebrospinal fluid: 127 mM NaCl, 26 mM NaHCO₃, 3.3 mM KCl, 1.24 mM KH₂PO₄, 1.0 mM MgSO₄, 2.0-2.4 mM CaCl₂, 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、同視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×、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 512×512 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 MΩ に調整した。細胞内液の組成は K⁺ ベース (in mM: 120 potassium gluconate, 10 KCl, 10 HEPES, 10 creatine phosphate, 4 Mg-ATP, 0.3 Na₂-GTP, and 0.2 EGTA) または Cs⁺ ベース (in mM: 130 CsMeSO₄, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 creatine phosphate, 4 Mg-ATP, and 0.3 Na₂-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 μm) 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シールを形成した。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 MΩ 程度の電極を海馬 CA3 野放線状層に置き、20 μs の時間幅で 30 - 80 μA 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。

C. 研究結果

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が抑止力となる。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 μ s の時間幅で 30 - 80 μ 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 ± 192.9 pA, CNQX: 100.9 ± 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 ± 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 μ 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 (Figure 1)。コントロール時の個々の細胞の活動頻度は 1.62 ± 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 μ 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 ± 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 μ M) 処置よりカルシウム活動が消失したことから (0.11 ± 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_A 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 μ M) を処置した際の回路の活動量は、 1.48 ± 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 μ M) を処置すると活動量は 0.26 ± 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 (Figure 2)。

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 ± 13.9 pA, CNQX 20.5 ± 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 ± 22.2 Hz, CNQX 25.6 ± 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 ± 61.1 pA, CNQX 44.5 ± 17.5 pA, $P = 0.016$, $W = 21$; 頻度: Control 47.9 ± 32.5 Hz, CNQX 52.8 ± 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の計算には、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 ± 0.44 , CNQX 0.18 ± 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 ± 3.36 mV, CNQX -61.6 ± 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 ± 0.72 mV, CNQX 1.34 ± 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 ± 18.8 M Ω , CNQX 179.2 ± 69.6 M Ω , $P = 0.041$, $t_6 = 2.6$, 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 ± 23.2 pF, CNQX 167.2 ± 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増進すると、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°C から 40.5°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 \pm 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 ± 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 \pm 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 ± 0.07 , heated: 0.93 ± 0.10 , CNQX: 0.53 ± 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 \pm 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。

D. 考察

CNQX 処置下において、海馬 CA3 野の錐体細胞から記録した興奮性シナプス入力の強度は有意に減弱した。CNQX は非 NMDA 受容体拮抗薬であることから、この結果は当然想定されるものであった。しかし、抑制性シナプス入力是非 NMDA 受容体を直接介さないにも関わらず、興奮性シナプス入力と同様に CNQX 処置により強度が減弱していた。これは一見すると、意外な結果であるが、興奮性細胞と抑制性細胞のどちらもグルタミン酸受容体を介した興奮性シナプス入力により駆動されることを考えると、妥当な結果といえる。CNQX 処置下では抑制性細胞への興奮性シナプス

入力も減弱している。そのため、抑制性細胞の活動が減少したと考えられる。抑制性細胞にはさまざまな種類の細胞が存在するが、抑制性入力を中心を担うのは、興奮性細胞の細胞体に投射する basket 細胞である。basket 細胞は高頻度で繰り返し発火 (バースト発火) する性質が知られており、個々のバースト発火に含まれる発火数が減少したために、興奮性細胞の受ける抑制性入力の強度が減弱したと推察される。

興奮性シナプス入力の減弱に対して、basket 細胞は活動量を減らし、それにより興奮性細胞が大半を占める回路全体の活動量は保たれたままであった。抑制性細胞と興奮性細胞の興奮性シナプス入力の減少に対する応答性の違いは、それぞれの細胞の樹状突起の形態と情報統合様式の違いによるものではないかと考えられる。basket 細胞の一部は、興奮性細胞や他の抑制性細胞と異なるチャネル分布や情報演算機構を持つことが知られている。また、情報伝達における NMDA 受容体の寄与が他の細胞に比べ低いことも示唆されている。こうした性質を持つため、basket 細胞は非 NMDA 受容体拮抗薬の影響を受けやすく、興奮性シナプス入力の減弱により活動量が減ったのではないかと考えられる。

過剰な興奮性神経伝達の亢進は過剰な同期活動を誘発し、てんかん発作を引き起こす。こうした背景から、近年、てんかん治療薬として非 NMDA 受容体拮抗薬が開発された。従来の抗けいれん薬は、チャネルや GABA 性の機能に焦点を当て、けいれんを抑制するものが主流であった。しかし、既存の治療薬では 30% ものてんかん発作がコントロールできていないとされており、新規作用機序を持つ治療薬開発の意義は大きい。特に、非 NMDA 受容体拮抗薬は顕著な副作用が少ないことから有用性が期

待されているが、その詳細な作用機序に関しては明らかになっていない。

本研究では、非 NMDA 受容体拮抗薬は正常な状態の自発活動に影響を与えることなく、過剰に亢進した同期活動のみを抑えることを示した。この結果から、興奮・抑制のバランスが保たれている場合、回路の活動は非常に安定して保たれるものの、一度バランスが崩れると非 NMDA 受容体拮抗薬により活動が容易に抑制されることが示唆された。しかし、どのようにして、過剰な同期活動のみを選択的に抑制するのかまでは明らかになっておらず、今後、詳細な検討が必要である。

E. 結論

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、以下の点を明らかにした。

- (1) 全体のシナプス伝達量が減弱しても回路の活動量は安定して保たれる
- (2) シナプス伝達強度を減弱させても興奮・抑制のバランスは保たれる
- (3) シナプス伝達強度を減弱させると興奮性細胞の膜抵抗が上昇する
- (4) 細胞外温度を上昇させて興奮性シナプス伝達を過剰に亢進させると、回路の活動は過剰な同期活動を示す。この同期活動は非 NMDA 受容体拮抗薬により抑制される

本研究により、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が示唆された。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

らかとなった現象が、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。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 高木夕貴, 杉山弘樹, 池谷裕二, 海馬における記憶再生のメカニズム, *Clin Neurosci*, 33(2), 225-225, (2015)
2. Nakayama D, Iwata H, Teshirogi C, Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H, Long-delayed expression of the immediate early gene Arc/Arg3.1 refines neuronal circuits to perpetuate fear memory. *J Neurosci*, 5, 819-830, (2015)
3. Nakayama D, Baraki Z, Onoue K, Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H, Frontal association cortex is engaged in stimulus integration during associative learning. *Curr Biol*, 25, 117-123, (2015)
4. Nakae K, Ikegaya Y, Ishikawa T, Oba S, Urakubo H, Koyama M, Ishii S, A statistical method of identifying interactions in neuron-glia systems based on functional multicell calcium imaging. *PLoS Comput Biol*, 10, e1003949, (2014)
5. Abe R, Sakaguchi T, Kitajo K, Ishikawa D, Matsumoto N, Matsuki N, Ikegaya Y, Sound-induced modulation of hippocampal θ oscillations. *Neuroreport*, 25, 1368-1374, (2014)
6. Okamoto K, Ishikawa T, Abe R, Ishikawa D, Kobayashi C, Mizunuma M, Norimoto H, Matsuki N, Ikegaya Y. Ex vivo cultured neuronal networks emit in vivo-like spontaneous activity. *J Physiol Sci*, 64, 421-431, (2014)
7. Miyawaki T, Norimoto H, Ishikawa T, Watanabe Y, Matsuki N, Ikegaya Y.

- Dopamine receptor activation reorganizes neuronal ensembles during hippocampal sharp waves in vitro. *PLoS One*, 9, e104438, (2014)
8. Nonaka A, Toyoda T, Miura Y, Hitora-Imamura N, Naka M, Eguchi M, Yamaguchi S, Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H, Synaptic plasticity associated with a memory engram in the basolateral amygdala. *J Neurosci*, 34, 9305-9309, (2014)
 9. Abe R, Sakaguchi T, Matsumoto N, Matsuki N, Ikegaya Y, Sound-induced hyperpolarization of hippocampal neurons. *Neuroreport*, 25, 1013-1017, (2014)
 10. Onoue K, Nakayama D, Ikegaya Y, Matsuki N, Nomura H, Fear extinction requires Arc/Arg3.1 expression in the basolateral amygdala. *Mol Brain*, 7, 30, (2014)
 11. Sasaki T, Ishikawa T, Abe R, Nakayama R, Asada A, Matsuki N, Ikegaya Y, Astrocyte calcium signaling orchestrates neuronal synchronization in organotypic hippocampal slices. *J Physiol*, 592, 2771-2783, (2014)
 12. Ishikawa D, Matsumoto N, Sakaguchi T, Matsuki N, Ikegaya Y, Operant conditioning of synaptic and spiking activity patterns in single hippocampal neurons. *J Neurosci*, 34, 5044-5053, (2014)
 13. Sasaki T, Matsuki N, Ikegaya Y, Interneuron firing precedes sequential activation of neuronal ensembles in hippocampal slices. *Eur J Neurosci*, 39, 2027-2036, (2014)
- 寛之、金子武嗣、山口瞬、長野哲雄、松木則夫、池谷裕二、興奮・抑制バランスの崩れが記憶再生をドライブする、第15回脳と心のメカニズム 冬のワークショップ (2015.1) (留寿都)
3. 原宏士朗、野村洋、池谷裕二、聴覚皮質の光遺伝学的抑制によって作られる連合記憶、第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会合同年会 (2014.11) (名古屋)
 4. 浅田晶子、松木則夫、池谷裕二、視覚刺激に対するアストロサイト微細突起のカルシウム応答、第131回日本薬理学会関東部会 (2014.10) (横浜)
 5. 岡本和樹、石川智愛、阿部麗実、石川大介、小林千晃、水沼未雅、乗本裕明、松木則夫、池谷裕二、培養スライスの神経回路は生体と類似した自発活動を示す、第131回日本薬理学会関東部会 (2014.10) (横浜)
 6. 柴田和輝、小山隆太、森下皓平、池谷裕二、自閉症モデルマウスにおける海馬苔状線維シナプス競合の不全、第23回海馬と高次脳機能学会 (2014.10) (金沢)
 7. 阿部麗実、坂口哲也、松本信圭、石川大介、北城圭一、松木則夫、池谷裕二、聴覚刺激に対する海馬神経細胞の抑制性応答とシータ波共鳴、第23回海馬と高次脳機能学会 (2014.10) (金沢)
 8. 岩寄諭嗣、坂口哲也、池谷裕二、事前経験による恐怖反応の増強、第23回海馬と高次脳機能学会 (2014.10) (金沢)
 9. 周至文、田中謙二、松永茂、伊関峰生、渡辺正勝、松木則夫、池谷裕二、小山隆太、cAMPによる軸索分枝と伸長の独立制御、第37回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 10. 松本信圭、乗本裕明、宮脇健行、松木則夫、池谷裕二、海馬鋭波に先行する海馬支脚の神経活動、第37回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)

2. 学会発表

<国内学会>

1. 坂口哲也、岡本和樹、阿部麗実、池谷裕二、経験に基づくマウス共感行動の促進、第15回脳と心のメカニズム 冬のワークショップ (2015.1) (留寿都)
2. 乗本裕明、水沼未雅、田尾賢太郎、江川堯寛、花岡健二郎、坂口哲也、日置

11. 坂口哲也、岡本和樹、阿部麗実、森下皓平、小山隆太、松木則夫、池谷裕二、恐怖観察系を用いたマウスの共感特性の検討、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 12. 尾上広祐、野村洋、中山大輔、松木則夫、池谷裕二、恐怖記憶の消失は扁桃基底外側核における Arc/Arg3.1 の発現を必要とする、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 13. 中山大輔、野村洋、岩田浩一、手代木知恵、松木則夫、池谷裕二、記憶の永続化における遅発的な Arc 発現依存的なスパイン除去、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 14. 乗本裕明、池谷裕二、新奇感覚を用いた視覚障がい神経補綴、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 15. 岡本和樹、石川智愛、阿部麗実、石川大介、小林千晃、水沼未雅、乗本裕明、松木則夫、池谷裕二、組織培養系における神経ネットワークの自発活動は生体の活動を反映する、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 16. 三浦友樹、野村洋、今村菜津子、手代木知恵、松木則夫、池谷裕二、恐怖の復元と下辺縁皮質におけるシナプス伝達との関係、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 17. 阿部麗実、坂口哲也、松本信圭、石川大介、北城圭一、松木則夫、池谷裕二、聴覚刺激に対する海馬神経細胞の過分極応答とシータ波誘導、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 18. 舟山健太、南澤玄樹、松本信圭、番浩志、松木則夫、池谷裕二、遅延性応答による視覚認知の新たな調節機構、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 19. 石川智愛、佐々木拓哉、小林千晃、岡本和樹、松木則夫、池谷裕二、AMPA 受容体を介したシナプス活動の減少に対する神経回路の活動の頑健性、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 20. 池谷裕二、脳と記憶の不思議、第 17 回日本老年行動科学会東京大会 (2014.9) (東京)
 21. 池谷裕二、記憶と海馬、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 22. 小山隆太、てんかん原生獲得における細胞移動の影響、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 23. 今村(人羅)菜津子、野村洋、三浦友樹、手代木知恵、松木則夫、池谷裕二、内側前頭前皮質のドパミンシグナルによる恐怖の復元の制御、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)、2014 年 9 月 11 日
 24. 原宏士朗、野村洋、池谷裕二、ニューロンの抑制による記憶の形成と想起、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 25. 小林千晃、松木則夫、池谷裕二、抑制性シナプス入力による興奮性シナプス入力の無効化、第 37 回日本神経科学大会 (2014.9) (横浜)
 26. 池谷裕二、小林千晃、高橋直矢、シナプス活動の時空パターン、電気学会電子・情報・システム部門大会 (2014.9) (松江)
 27. 阿部麗実、坂口哲也、松本信圭、石川大介、北城圭一、松木則夫、池谷裕二、聴覚刺激に対する海馬神経細胞の過分極応答とシータ波調節、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014 (2014.8) (大阪)
 28. 坂口哲也、岡本和樹、阿部麗実、池谷裕二、マウス恐怖観察系を用いた共感の調節機構の解明、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014 (2014.8) (大阪)、
- <国際学会>
1. Okamoto K, Ishikawa T, Abe R, Ishikawa, D, Kobayashi C, Mizunuma M, Norimoto, H, Matsuki Y, Ikegaya Y, Organotypically cultured hippocampal networks emit spontaneous neuronal

activity similar to in vivo ongoing activity, SfN2014 (2014.11) (Washington D.C., USA)

2. Ikegaya Y Sakaguchi T, Okamoto K, Abe, R, Morishita K, Koyama R, Matsuki N, Empathetic behavior in fear observation of mice, 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (Capetown, South Africa)
3. Ikegaya Y, Pathophysiology of neuro-glio-vascular dynamics. Symposium: New Approaches for Non-neuronal Brain Diseases, 17th World Congress of Basic and Clinical

Pharmacology (2014.7) (Capetown, South Africa)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 該当せず
2. 実用新案登録 該当せず
3. その他 該当せず

Figure 1

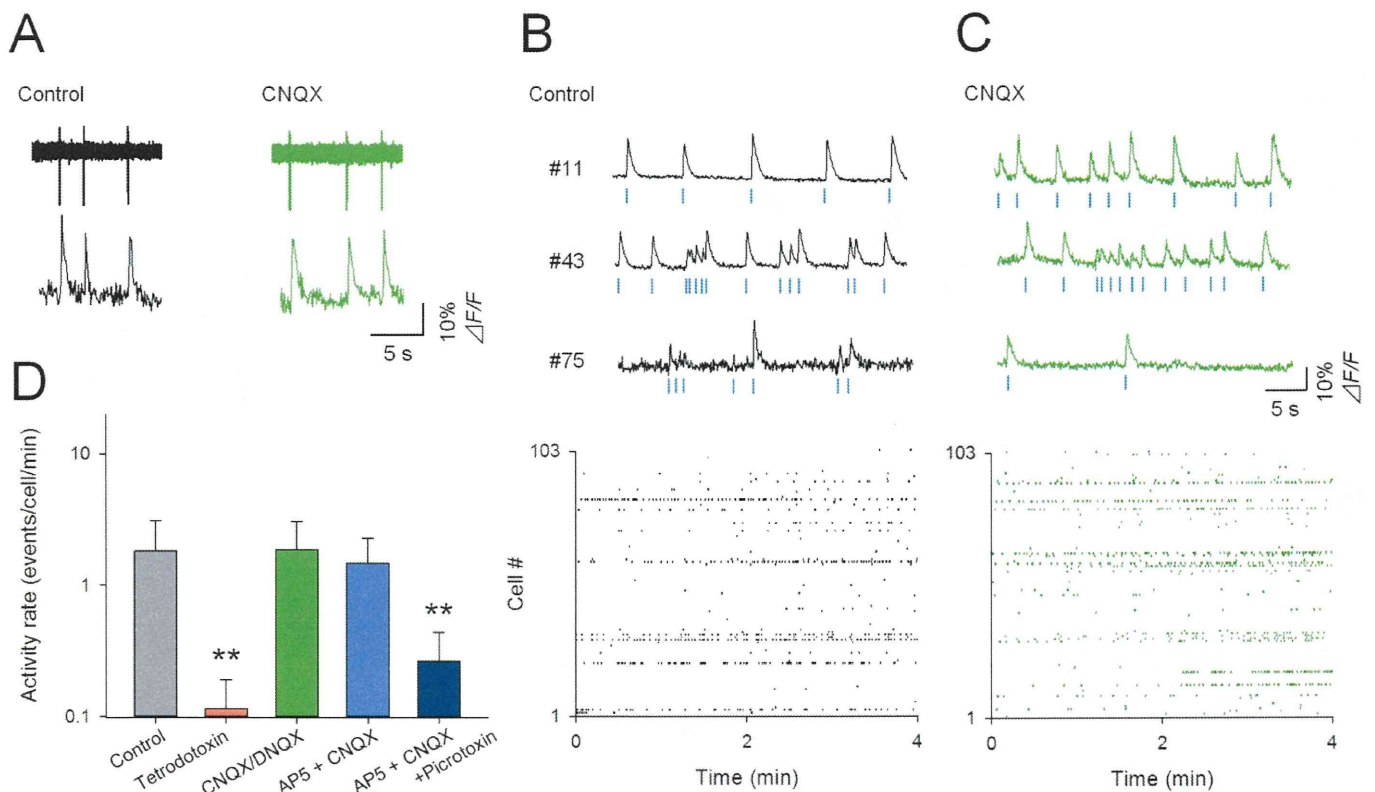


Fig. 1 Non-NMDA receptor antagonists do not affect spontaneous network activity level. (A) Simultaneous cell-attached recording and calcium imaging before (black) and 10 min after (green) perfusion with 50 μ M CNQX. Individual calcium transients reflected action potentials of the neuron. (B, C) Calcium traces recorded from 3 representative CA3 neurons (top) and raster plots of spontaneous activity of a total 103 neurons (bottom) before (B) and 10 min after CNQX application (C). Blue dots below the traces indicate the timings of detected spikes. (D) Mean \pm SD firing rates of CA3 neurons before (control; $n = 11$ slices) and after bath application of tetrodotoxin ($n = 4$ slices), CNQX/DNQX ($n = 7$ slices), CNQX/DNQX+AP5: ($n = 4$ slices), CNQX/DNQX+AP5+picrotoxin ($n = 4$ slices). ** $P < 0.01$, Welch's t test after one-way repeated-measure ANOVA ($P = 1.3 \times 10^{-3}$, $F_{4,25} = 6.1$).

Figure 2

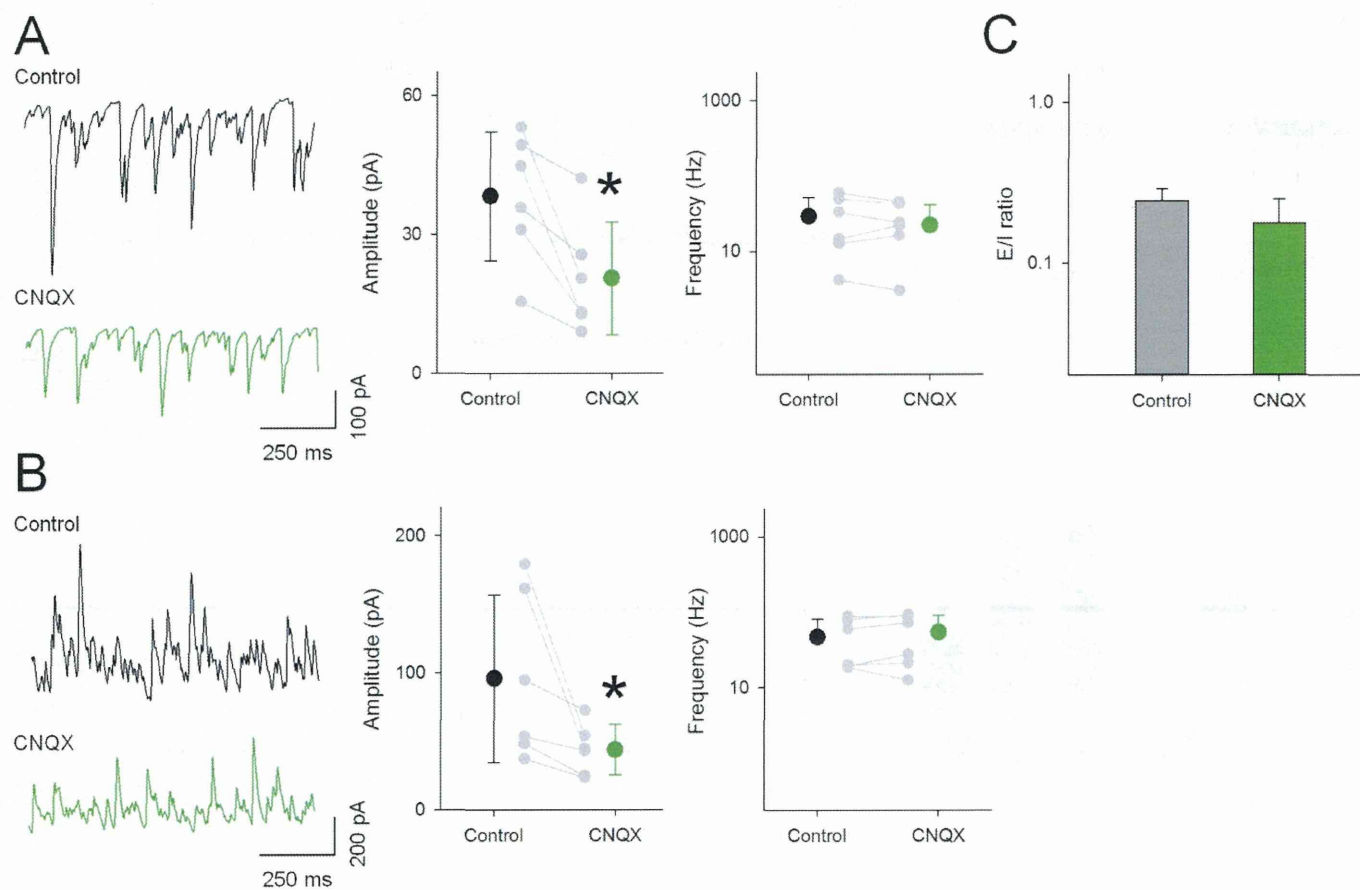


Fig. 2 CNQX reduces both sEPSC and sIPSC amplitudes to a similar level. (A) Representative sEPSC traces recorded from a CA3 pyramidal cell 5 min before and 10 min after CNQX treatment (left). The neuron was clamped at -70 mV. The amplitude (middle) and frequency (right) of sEPSCs were summarized as the means \pm SD of 6 neurons, $*P = 0.016$, $W = 21$, Wilcoxon signed-rank test. (B) Same as A, but for IPSCs recorded at 0 mV. $*P = 0.016$, $W = 21$. (C) Mean \pm SD E/I ratios of 6 neurons. $P = 0.12$, $t_7 = 1.7$, Welch's t test.

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

担当責任者 宮本 憲優
エーザイ株式会社筑波研究所 主幹研究員

研究要旨

本研究では、多点平面電極を用いて、動物由来標本やヒト iPS 細胞由来神経細胞等の自発性興奮に基づく回路形成成熟度を数値化し、評価に使用する hiPSC-neuron 等を選抜するための条件を整備し、神経細胞の機能発現に重要なグリア細胞を用いて hiPSC-neuron 等の機能発現を促進する条件についての基礎検討を行った。

H26 は以下のような研究結果を得た。iCell Neurons を用いて、マウス由来のアストログリア細胞調整培地を用いて自発性興奮を数値として検出することに成功した。また、グリア細胞による iCell Neurons の回路形成機能発現誘導までには、少なくとも7週間持続的な作用が必要であるという基本条件が決定した。

本条件下で観察可能となるヒト iPS 細胞由来神経細胞等の電気生理学的な神経機能は、周期的で神経ネットワークで同調した応答として示され、GABA_A 受容体拮抗薬等の痙攣誘発剤の副作用評価に応用できる可能性があることが示唆された。

作用が重要とされるため、グリア細胞を用いて hiPSC-neuron 等の機能発現を促進する条件についての基礎検討を行う。

研究協力者

なし

A. 研究目的

認知機能障害、神経異常活動を *in vitro* で評価するためには、実験に用いるヒト iPS 細胞由来神経細胞（以下、hiPSC-neuron）等が評価に必要な脳機能メカニズムを備えている必要がある。本研究では、多点平面電極（MEA）を用いて、動物由来標本や hiPSC-neuron 等の自発性興奮に基づく回路形成成熟度を数値化し、評価に使用する hiPSC-neuron 等を選抜するための条件を整備する。また、神経細胞の機能発現には周囲グリア細胞との相互

B. 研究方法

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、 2×10^5 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 cm² 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% CO₂ 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% CO₂ 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。

C. 研究結果

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 (Figure 1)。得られた応答は、複数電極間で同調し周期性を持った (Figure 2)。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_Azine により用量依存的に増強された (Figure 3)。GABA_Azine 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 (Figure 4)。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 (Figure 5)。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 (Figure 6)。刺激に用いるアストロサイトもヒト由来の細胞であることが好ましいため、CDI社製のヒト iPS 細胞由来アストロサイトである iCell Astrocytes を用いてマウス由来のアストロサイトと同様の実験を行ったところ、iCell

Astrocytes はマウス由来アストロサイトより軸索伸展に関しては強い伸張促進作用を有していたが (Figure 7)、2ヶ月間 iCell Neurons に作用させても自発性興奮作用を誘導できなかった (Figure 8)。

D. 考察

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が可能となり、このとき得られた応答は、複数電極間で同調し周期性を持つことから回路形成が成立している可能性が示唆された。iCell Neurons 及びラットの初代培養大脳皮質ニューロンの自発性興奮は、GABA 受容体の阻害剤である GABA_Azine により用量依存的に増強されるため、薬剤による痙攣誘発作用の良い数値化指標となる可能性が示された。また、この興奮増強作用は、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るため、特にこの同調した周期的自発応答が薬剤による GABA_A 受容体の阻害に関わる良いバイオマーカーになる可能性が考えられた。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 ATX 及び CTX により阻害されるため、本実験系ではシナプス伝達を誘導できている可能性が示された。神経回路形成成熟度の数値化に関しては、本研究での成果を元に次年度はより高度な回路分析のための新規アルゴリズム開発を目指す。

iCell Neurons のマウスアストロサイトによる自発性興奮誘導が非常に長期間必要なこと、及び iCell Neurons 以外の hiPSC-neuron である ReproNeuro Glu 及び ADhNPC の自発性興奮を誘導することには成功していないことから、グリア細胞の