

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03162

研究課題名(和文) 共培養細胞チップを利用した即効性抗うつ薬理活性物質の探索

研究課題名(英文) Search for rapid-acting antidepressant using MEA-based co-culture systems

研究代表者

神保 泰彦 (Jimbo, Yasuhiko)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：20372401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：集積化電極アレイを利用した培養神経回路の電気活動計測により、即効性抗うつ効果を有する薬理活性物質の探索を行なった。有効であるが副作用ゆえ使用が制限されるケタミンに加え、NMDA受容体にケタミンと同様開孔性アンタゴニストとして作用するメマンチン(抗うつ作用、副作用とも示さない)、ラニセミン(弱い抗うつ作用を有する)投与に対する神経活動変化を比較した結果、バースト発火を生じるニューロン群が特異的な薬理応答を示すことが明らかになった。ニューロン種、受容体のサブユニット構成を明らかにすることにより、抗うつ効果を発揮するメカニズムの理解、新規薬理活性物質の探索が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在一般に用いられている抗うつ薬は効果が現われるまでに数週間を要するという課題があり、即効性抗うつ効果を有するが副作用ゆえに使用が制限されているケタミンに代わる薬理活性物質が求められている。本研究では培養系に維持した神経細胞群を利用して、ケタミンを含む3種類の薬物の作用を調べた。大脳皮質に含まれる多様な細胞の中で特定のグループが特殊な薬理応答を示すという結果が得られた。この細胞群を特定し、関与する受容体のサブユニット構成などを調べることにより、抗うつ効果を発揮するメカニズムの理解が進み、新たな薬理活性物質の探索が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Rapid-acting antidepressant was searched using MicroElectrode-Array (MEA)-based neuronal ensemble recording system. In addition to ketamine, which has clear antidepressant effect but with limited use due to its side effects, memantine (no antidepressant effect, no side effect), lanicemine (weak antidepressant effect) were applied. The bursting neurons in cortical cells showed a specific pharmacological response, which might underlie rapid antidepressant mechanisms. The next step will be to identify the subunit composition of the NMDA receptors on these neurons.

研究分野：神経工学

キーワード：脳神経疾患 細胞・組織 シグナル伝達 ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

うつ病／大うつ性障害 (Major Depressive Disorder; MDD) に対する現在の標準的な治療は薬物投与であり、選択的セロトニン再取込阻害薬 (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor; SSRI) 等が広く用いられているが、「緩解率が低い、薬理効果が発現するまで数週間を要する」という課題は解決されていない。これに対し、2000年に ketamine 静注が即効性を有することが報告された (Berman et al., Biol. Psychiat., 2000)。しかしながら、その副作用 (精神異常作用誘起と乱用の危険性) ゆえに一般的な治療にはなっておらず「即効性抗うつ効果を発現しかつ副作用が少ない薬理活性物質」を見出すことが喫緊の課題となっている。

ketamine の抗うつ効果は基本的には NMDA 受容体に対する非競合拮抗薬としての作用からスタートすると考えられるが、標的となる脳部位、作用機構とも、その詳細は明らかになっていない。グルタミン酸神経伝達に関与するゆえの即効性という考え方が主流であるが、SSRI の標的であるセロトニン調節系に関わるとする報告もある。解離性麻酔薬という特異な性質に対応して大脳皮質と皮質下の組織で作用が異なる可能性もある。抑制性ニューロンに発現する NMDA 受容体の選択的阻害による脱抑制という仮説が提案されたが、遺伝子改変動物を利用した実験による否定的な結果も報告されている。現時点では「自発シナプス伝達が担う恒常性維持機構の阻害により誘起されるポストシナプス過程の活性化、結果として生じる BDNF 産生の増強」が作用メカニズムの有力な候補と考えられているが、作用メカニズム理解に基づく薬理活性物質の探索には至っていない。

2. 研究の目的

ketamine の抗うつ作用と副作用が発現する時間経過が異なる、ketamine が解離性麻酔薬という特殊な性質を有することを利用して、ketamine 投与が誘起する神経回路活動の変化を可視化、標的となる脳部位、作用機構に関する知見を得る、さらに即効性抗鬱効果を発揮し副作用を最小限に抑える薬理活性物質の探索を行なうことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

微小電極アレイ (MicroElectrode-Array; MEA) 基板上で実験動物 (Wistar rat) から採取した脳神経細胞を培養し、薬理活性物質を添加した際の応答を記録した。MEA は細胞培養皿の底面に 64 個のマイクロ電極を集積化したもので、神経回路を構成する多数のニューロン群の活動を細胞外信号として同時記録することができ、その非侵襲性ゆえに長時間の計測が可能であることが特徴である。

図 1 に実験と解析の概要を示す。64 個の電極で記録された電気信号から閾値処理によって神経スパイクを検出し、ラスタープロットを作成する。大脳皮質ニューロン群の特徴的な活動とされる同期バーストについて、活動の強度 (検出されたスパイク数) と持続時間を指標に評価する。以下の 3 項目に分けて薬理応答計測を実施した。

- (1) ketamine 投与に対する大脳皮質と海馬ニューロン群の応答の比較
- (2) NMDA 受容体に対する 3 種類の開孔性アンタゴニスト (ketamine, memantine, lanicemine) 投与に対する大脳皮質神経回路の応答 (バースト活動の特性変化)
- (3) 大脳皮質培養神経回路に含まれる個々のニューロンの薬理応答時間経過

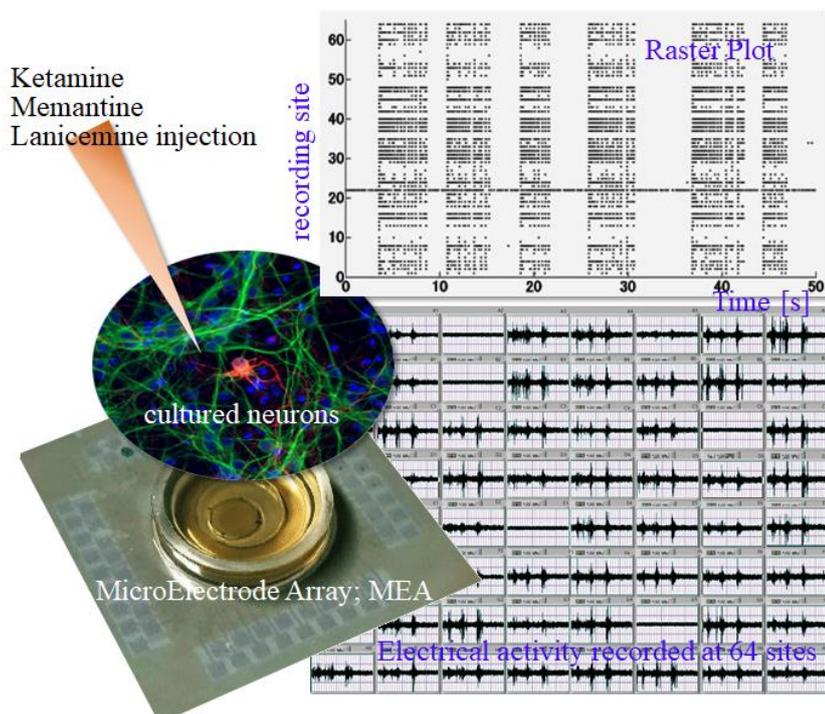


図 1 微小電極アレイ基板上の培養神経回路を用いた薬理応答計測

4. 研究成果

(1) 大脳皮質と海馬ニューロン群に対する薬理効果の違い

解離性麻酔薬という **ketamine** の特殊な性質が皮質と皮質下の組織に対する作用の違いによる可能性を考慮し、大脳皮質と海馬について **ketamine 50 μ M** の条件下で起こる自発活動の変化とその時間経過を調べた。

図2に結果を示す。作成したラスタプロットから一定の基準でバースト活動区間を検出し、1つのバースト活動に含まれるスパイク数を指標に活動強度を定量化、1回のバースト活動が持続する時間（いずれも平均値、薬物投与前の値で正規化したものを表示）と合わせて評価した。**ketamine** 投与により活動強度、持続時間も減少したが、その程度は大脳皮質の方が顕著であり、また大脳皮質では活動が抑制された状態が1時間継続したのに対し、海馬では明らかな回復傾向が認められるという結果になった。

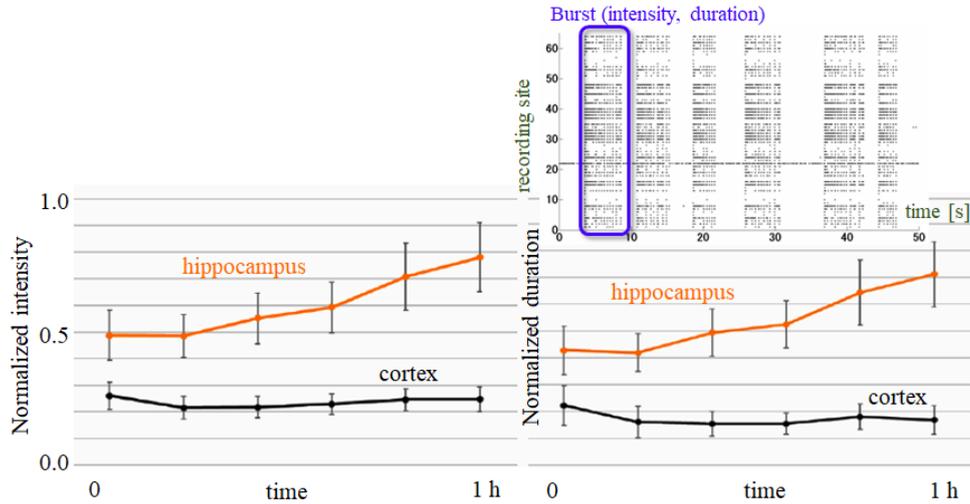


図2 ketamine 投与に対する海馬、大脳皮質神経回路応答の時間経過

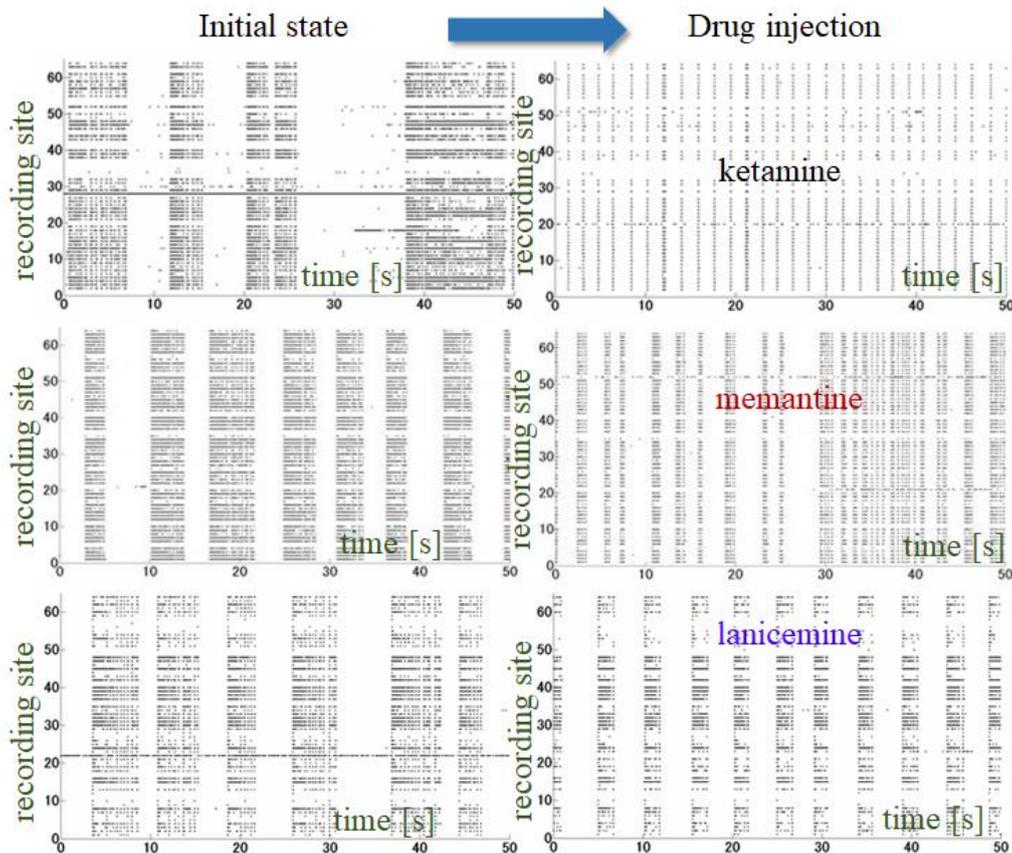


図3 3種類の開孔性アンタゴニストに対する大脳皮質培養神経回路の自発活動変化

(2) 大脳皮質細胞群の ketamine, memantine, lanicemine 投与に対する応答

ketamine は基本的には NMDA 受容体に対するアンタゴニストとして作用すると考えられている。ただし、作用部位がイオンチャネルの内部にあるため、伝達物質が結合して開孔した受容体を選択的に作用する（開孔性アンタゴニスト）という特性がある。類似の結合部位に作用する memantine は抗うつ効果も副作用も発現しない、lanicemine は ketamine と比較すると弱く、持続時間も短い抗うつ効果を有することが報告されていることを勘案し、この 3 種類の薬物を投与した際の大脳皮質細胞群の自発活動を調べた。

図 3 に結果を示す。前項と同様、バーストを検出して活動強度、持続時間を比較した。3 種類の薬物全てに共通して活動強度は減弱、持続時間は短縮する傾向が見られた。ketamine の作用が最も顕著であり、活動強度、持続時間も初期状態の約 20% の値を示した。memantine も基本的な変化は同じであるが、バースト持続時間及びその発生間隔が一定にならないという傾向が見られた。lanicemine の作用は他の 2 つと比べると明らかに弱い。定量的には活動強度、持続時間も初期状態の約 70% という結果になった。また、ketamine, memantine の作用が投与直後から現われ 10 分後に安定するのにに対し、lanicemine の効果は投与後 10-30 分の間に徐々に現われてくるという違いがあった。

(3) 個々のニューロンの発火パターン別薬理応答特性

開孔性アンタゴニストであるゆえに、その作用は個々のニューロンの活動頻度や発火パターンに依存することが予想される。そこで、細胞外記録信号にスパイクソーティング処理を適用し、個々のニューロンごとの発火時系列を求めた。さらにこの発火時系列から Inter-Spike Interval (ISI) を算出し、ヒストグラムを作成した。抑制性ニューロンと考えられている Fast-Spiking (FS) cell は短い ISI の区間にピークを生じ、バースト発火を生じるニューロンはバースト内の短い発火間隔とバースト間の長い発火間隔が共存する 2 相性のヒストグラム形状を示すことが想定される。作成したヒストグラムの形状から 7 種類（パターン 1: 7%, パターン 2: 7%, パターン 3: 23%, パターン 4: 18%, パターン 5: 8%, パターン 6: 20%, パターン 7: 17%）に分類し、薬物投与後の 1 時間に発火頻度がどのように推移したかを調べた結果を図 4 に示す。

パターン 6（ヒストグラムが明確な 2 相性の形状を示しており、バーストを生じるニューロンと考えられる）のニューロン群が特徴的な応答を示したことがわかる。memantine 投与に対する応答は弱く、時間変化も少ないのに対し、ketamine, lanicemine に対しては、投与直後に活動が低下した後、回復する傾向が認められた。これらの応答と抗うつ作用・副作用との対応、このグループに属するニューロン種の同定、受容体とそれを構成するサブユニットにつき調べることが次のステップである。

個々のニューロンの発火頻度と薬理効果にも相関が認められた。発火頻度が大きいほど薬物投与時のスパイク数減少が顕著な傾向（パターン 1, 5）があり、開孔性アンタゴニストとしての作用が表れていると同時に、平均的に発火頻度が高いと考えられている FS 細胞により強く影響を与える可能性を示唆している。

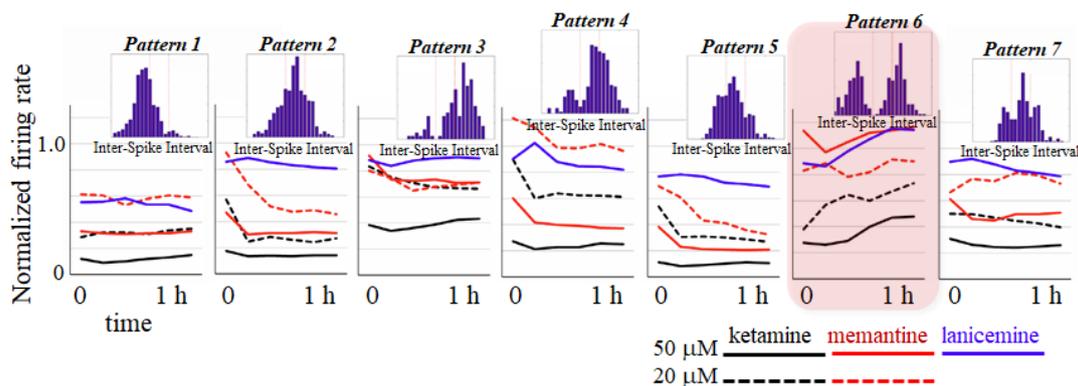


図 4 ニューロンの発火パターン別薬理応答特性

上記の実験結果は、薬物投与に対する応答がニューロン毎に異なる可能性を示唆するものであり、集積化電極アレイを利用した ensemble recording とスパイクソーティングの適用が有効であることがわかる。パターン 6 に属するニューロン種の同定、関与する受容体とそれを構成するサブユニットにつき調べ、抗うつ作用、副作用との対応関係を明らかにする必要がある。NMDA 受容体には様々な活性部位があり、グリシン結合部位にアンタゴニストとして作用する GLYX-13, 7-CTKA, GluN2B サブユニットに選択性を有するアンタゴニスト CP-101,606, MK-0657 などについても同様の計測、解析を適用し、即効性抗うつ作用を發揮しかつ副作用を最小限に抑える薬理活性物質を同定することが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① 榛葉, 浦田, 小谷, 神保, アミロイドβオリゴマーによる培養神経回路網の自発活動変化, 電気学会論文誌 C (査読有), 139, pp. 638-639, 2019, DOI: 10.1541/ieej.iss.139.638

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① 加藤, 榛葉, 朝比奈, 張, 小谷, 神保, ケタミンの神経回路網における薬理効果と神経細胞の活動パターンとの関係, 電気学会医用・生体工学研究会, 2019
- ② Shimba K., Sakai K., Kotani K., Jimbo Y., Microtunnel-based recording for evaluating axon conduction change after chemical treatment, BMEiCON, 2018
- ③ Shimba K., Sakai K., Kotani K., Yagi T., Jimbo Y., Microdevice for recording and pharmacological treatment to neural axons elongating into microtunnels, Int. Conf. BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, 2017
- ④ 榛葉, 酒井, 小谷, 神保, マイクロトンネル内の軸索に対する選択的薬理刺激法の開発, 電気学会電子情報システム部門大会, 2017
- ⑤ Shimba K., Sakai K., Kotani K., Yagi T., Jimbo Y., Microtunnel-electrode device for elucidating axon features: toward pharmacological manipulation of individual axons, 8th Int. IEEE EMBS Conf. Neural Engineering, 2017
- ⑥ 味岡, 酒井, 小谷, 神保, ケタミンの抗うつ作用の解明に向けた微小電極アレイ上への海馬-大脳皮質共培養系の構築, 電気学会医用・生体工学研究会, 2017

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。