

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04437

研究課題名(和文)興奮/抑制バランスを制御した培養神経回路によるてんかん発作発生機構の解明

研究課題名(英文)Epileptic activity through excitatory/inhibitory imbalance observed in neuronal networks cultured on micro-electrode arrays

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん発作の発生における“final common path”と考えられている興奮性/抑制性(Excitatory/Inhibitory; E/I)の不均衡に焦点を当て、iPS細胞を神経系に分化誘導する際の操作により興奮性/抑制性細胞の比率を制御した培養神経回路を調整、電極アレイ基板を利用して自発活動を観測した。同期バースト活動の特性がE/I比率によって異なり、培養日数の経過と共にその差異が小さくなる方向に変化する、GABAA受容体に対するantagonistであるbicuculline投与による抑制性シナプス結合阻害の効果が時間経過と共に減弱する等、恒常的可塑性の関与を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EIバランスと神経回路活動の関係は、興奮性/抑制性シナプス結合の数とその強度によって制御されるが、電気刺激等人工的な手法で誘起されるシナプス活動と本来の感覚入力に対して活性化されるシナプスは異なる、興奮性シナプス、抑制性シナプス、そのサブタイプそれぞれにおいて可塑性のメカニズムが異なるなど関係する要素は多岐にわたる。本研究では恒常性を維持する可塑性の関与を示唆する結果が得られた。今後は、シナプス-ニューロン-神経回路という階層構造各段階における制御機構、その背景となる可塑性の作用を統合した研究の遂行により、てんかん発作を生じるメカニズム解明に向けた知見が得られることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the excitatory/inhibitory (E/I) balance of neuronal circuits, which is considered to be the “final common path” in the process of epileptic seizure generation, we constructed cultured neuronal networks with artificially controlled E/I balance and recorded electrical activity using micro-electrode array (MEA) substrates. Pharmacological manipulation (administration of agonists and antagonists to the SHH pathway) during the differentiation of mouse iPS cells into cortical cells enabled control of the ratio of excitatory cells in the range of 50-80%, and E/I balance-dependent changes in synchronized burst activity characteristics were observed. The experimental results suggest that activity-dependent plasticity as well as homeostatic plasticity may be involved in the regulation of synaptic strength, which affects the network-activity properties.

研究分野：神経工学

キーワード：脳神経 細胞・組織 神経工学 微小電極アレイ

1. 研究開始当初の背景

生涯に一度はてんかん発作を発症する割合は世界人口の1%、そのうち1/3が難治性に移行するとされる。これに対し、現行の抗てんかん薬開発は、発生した発作の抑制を目指しており、最初の発作が発生することを防ぐ視点からの研究はほとんど行われていない。発作を生じる原因は素因性、構造的/代謝性、原因不明に分けられるが、いずれにおいても「最終的には興奮性/抑制性 (Excitatory/Inhibitory; EI) の不均衡 -EI バランスの興奮側へのシフト- が生じることがてんかん発作を生じる本質」と考えられており“final common path”と表現されている。

EI バランスは (1) 神経回路を構成する興奮性/抑制性ニューロンの比率、(2) (有効に機能する)興奮性/抑制性シナプス数、(3) シナプス強度、の組み合わせによって決まると考えられる。外傷性のてんかん発作発生過程では興奮性ニューロンの発芽 (sprouting) やシナプス形成の増加、抑制性介在ニューロンの変化による GABA 作動性シナプス伝達の減少等が見られることが報告されている。繰り返し電気刺激を印加しててんかん発作を誘導する kindling の動物実験においてはシナプスの可塑性が重要な役割を果たすと考えられているが、海馬 CA1 錐体ニューロンに対するシナプスにおいて、同じ繰り返し刺激が興奮性シナプスには増強 (Long-Term Potentiation; LTP)、抑制性シナプスには抑制 (Long-Term Depression; LTD) の効果を生じることとも報告されている。LTP によるシナプス増強に対して神経回路全体としての活動のバランスをとる恒常的可塑性 (homeostatic plasticity)、さらには伝達物質の転換 (自律神経系における分化転換 -trans-differentiation- はよく知られているが、成熟ラット海馬においても kindling 刺激に対応して glutamate/GABA の転換が起こる例があるという報告がある)も含めて脳神経回路には恒常性を維持する多様なメカニズムが備わっており、その全てを逸脱した結果生じるのがてんかん発作であると考えられる。本研究では、興奮性/抑制性ニューロンの比率を人為的に制御した iPS 細胞由来培養神経回路を構成し、電気・薬理刺激等の手法でてんかん発作様の活動を誘導、てんかん発作発生に至る過程とそこに関与する本質的な要素を明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

神経回路における EI バランスの不均衡がてんかん発作につながる条件を明らかにし、発作の発生に関与する本質的な要因を解明することが本研究の目的である。EI バランスを調整した神経回路形成手法、*in vitro* 系でてんかん発作に対応する活動を誘導する手法、長期的な神経回路活動観測手法が鍵となる要素技術である。申請者のグループでは、集積化電極アレイ (Micro-Electrode Array; MEA) を用いた計測系の構築に実績を有し、本研究ではこれを利用して培養神経回路に対する長期計測を行なう。てんかん発作を生じるメカニズムの解明により、対症療法としての抗てんかん薬開発だけでなく、発作の予防に向けた医療への道が拓かれることが期待できる。EI バランスの不均衡は、てんかん発作に限らず記憶・注意・情動の制御とそれに関連した疾患への関与が指摘されており、その制御は様々な精神・神経疾患の診断・治療手法研究のプラットフォームとしての応用が想定される。

3. 研究の方法

(1) EI バランスを制御した培養神経回路の形成

終脳の発生過程において、脳室帯に存在する神経幹細胞が最初に背側でグルタミン酸作動性の興奮性ニューロンに分化し、遅れて腹側で GABA 作動性の抑制性ニューロンが発生するとされ、マウス胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell; ES 細胞) を利用した研究により、この過程を SHH 経路の活性化/不活性化により制御できることが示されている (Danjo et al., 2011)。本研究では同様の手法を iPS 細胞に適用し、興奮性/抑制性分化過程の制御を試みる。具体的には、マウス iPS 細胞 (iPS-Stm-FB/gfp-99-1) の分化誘導過程で SHH 経路のアンタゴニストである Cyclopamine、アゴニストである Smoothed Agonist (SAG) を一定期間作用させることにより、興奮性強調/抑制性強調細胞群を調整する。培養した神経回路における興奮性/抑制性細胞の比率を免疫組織化学染色によって定量評価する。ニューロンのマーカーとして III tubulin (B3T) 抗体、興奮性、抑制性細胞のマーカーとして glutamate、GABA 抗体を用い、B3T 陽性細胞のうち glutamate、GABA それぞれに陽性を示す細胞の比率を算出する。

(2) 神経回路活動多点長期計測

MEA として 64 個のマイクロ電極を集積化した細胞培養皿を製作する。表面にシリコンゴム (Poly-Dimethylsiloxane; PDMS) 製のマイクロ構造を設けることにより、計測電極が存在する領域に細胞培養区画を設定する。さらに、より空間分解能の高い計測を目指して高密度電極アレイ (High-Density MEA; HD-MEA) を導入する。HD-MEA (Maxwell Biosystems) は 3.85 × 2.1 mm の領域に 24,600 個の電極を 17.5 μm 間隔で配置した基板であり、1024 点を選択して電気活動計測を行なうことができる。

(3) でんかん発作様活動の誘導

主要な抑制性シナプス受容体である GABA_A に対する antagonist である bicuculline を投与することによりでんかん発作様の同期活動を誘導, その経時変化を観測する. さらにシナプス結合強度の推定により, 恒常的可塑性が関与する可能性についても調べる.

4. 研究成果

(1) EI バランスを制御した培養神経回路の形成

マウス iPS 細胞 (iPS-Stm-FB/gfp-99-1) は理化学研究所バイオリソース研究センターより提供を受けたものを使用した. 96 ウェルプレートに播種した iPS 細胞を 3 日目に 60 mm ディッシュに移し, 興奮性細胞への分化を促進する誘導因子として 5 mM cyclopamine, 抑制性細胞への分化を促進する誘導因子として 3 nM SAG を 6 日目まで添加した条件で神経系への分化誘導を行った. 2 つの細胞集団を 2:1, 1:2 で混合したものを合わせて系を構成する興奮性/抑制性ニューロンの比率が異なる 4 種類の細胞集団を調整した. B3T 陽性細胞のうち glutamate, GABA それぞれに陽性を示す細胞の比率を算出した結果, 興奮性細胞の割合が 78 % (A), 75 % (B), 67 % (C), 56 % (D) の細胞集団が得られたことがわかった (図 1).

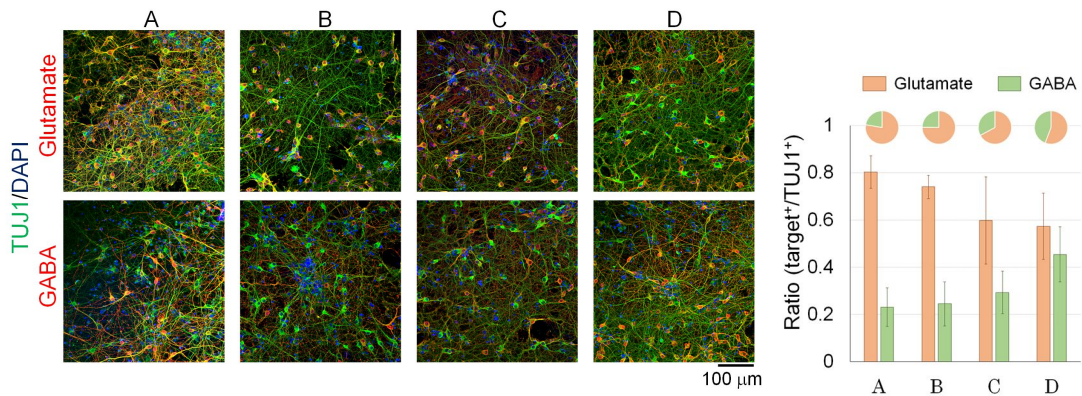


図 1 EI バランスを制御した培養神経回路の作製. 免疫組織化学染色により, 興奮性ニューロン, 抑制性ニューロンの比率を定量化した.

(2) 神経回路活動多点長期計測

興奮性/抑制性ニューロンの比率が異なる 4 種類の細胞集団を MEA 基板上で培養し, その自発活動を計測した. 大脳皮質培養神経回路は特徴的な同期発火パターンを示すことが知られているが, 抑制性細胞の割合が最も高い試料 (D) については, 時折高頻度の発火が見られるという程度で, 他の 3 試料 (A, B, C) のような顕著な同期活動は認められなかった (図 2). 発達段階

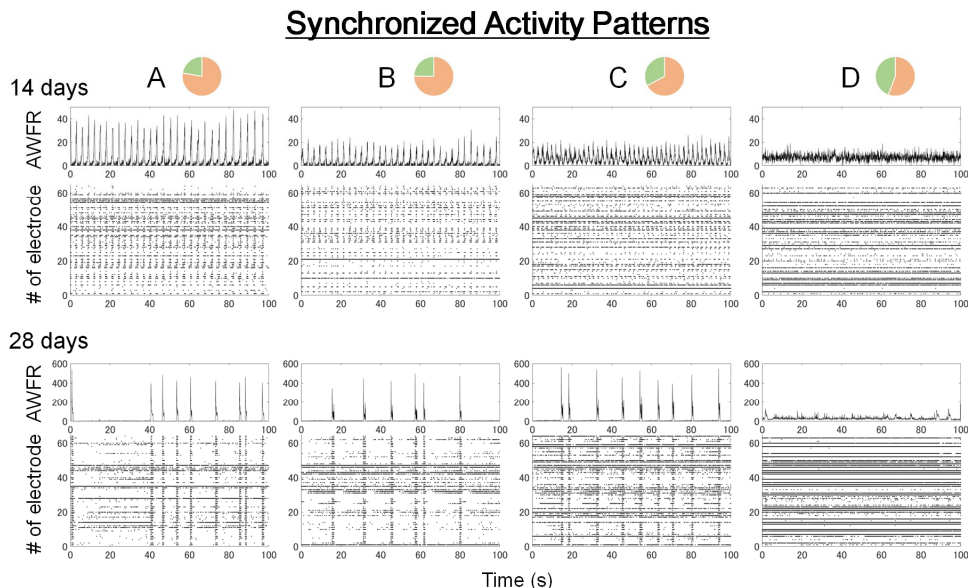


図 2 EI バランスを制御した培養神経回路 (興奮性細胞の割合が 78 % (A), 75 % (B), 67 % (C), 56 % (D)) から培養開始後 2 週間, 4 週間の時点で観測された自発活動パターン. 抑制性ニューロンの比率が高い神経回路(D)では顕著な同期発火は見られない.

を追った活動パターンの変化について調べたところ、(A,B,C) 3 試料については培養開始後 2 週目から顕著な同期発火が認められるのに対して、抑制性細胞の割合が最も高い試料 (D) で弱い同期発火が見られるのは 3 週目以降、この試料に bicuculline を添加して抑制性結合を阻害すると顕著な同期バーストを示すことから、興奮性結合は十分に形成されており、強い抑制性結合によって全体の同期が抑えられていることが示唆される結果となった。同期活動についてその発生間隔、個々の活動の持続時間を特徴量として比較した結果、興奮性細胞の割合が一定以上の 3 試料 (A,B,C) で認められる活動特性の差異が培養日数の経過と共に減少、4 週目では比較的類似した活動パターンを示すことが明らかになった。分化誘導段階での操作により EI バランスの異なる系を調整することを目指したが、培養日数が経過し成熟する過程で恒常性を維持する機構が作用した可能性があることを示唆する結果となった。

(3) でんかん発作様活動の誘導

HD-MEA 基板上で培養したラット大脳皮質神経回路を用いてその自発活動を計測した。初期状態での計測に引き続いて bicuculline $1 \mu\text{M}$ (final 濃度) 環境で 4 時間経過した時点、24 時間経過した時点でそれぞれ 2 時間の計測を行ない、結果を比較した。bicuculline 添加により神経回路の発火率は観測領域全体で増加、その傾向は 24 時間後も継続した。GABA_A 受容体経由の抑制性入力の阻害が神経回路活動の変化を生じた原因と考えられることから、抑制性シナプスの結合強度推定を試みた。検出されたスパイク時系列にスパイクソーティングを適用して単一ニューロンごとの時系列を求め、その相互相関ヒストグラムを作成、これにシナプス効果をモデル化した曲線をフィッティングすることにより (Kobayashi et al., 2019) 結合強度を求めた。図 3 に示すとおり、ニューロン 1 から 2 への抑制性結合が検出され、bicuculline 添加により初期状態 (3.00) と比較して 4 時間後には著しく減弱 (0.59) したシナプス結合強度が 24 時間後にはやや回復する傾向を示している (0.90) という結果になった。恒常性を維持する可塑性が作用している可能性があると考えられる。

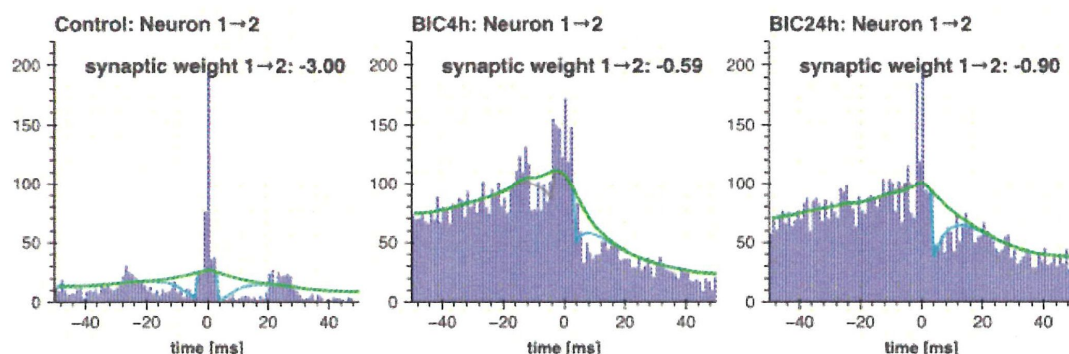


図 3 相互相関により推定したシナプス結合強度の経時変化。抑制性結合と判定されたシナプスの強度が bicuculline 添加後 4 時間時点の著しい減弱から 24 時間後には回復傾向を示していることがわかる。

EI バランスの維持が生体としての健康状態を維持するために、また情報処理機能を最大化する視点からも重要ということは広く認識されているが、その実態は現時点においても未解明の要素が多い (He H-Y. and Cline H. 2019, Ghatak S. et al. 2021)。本研究では培養神経回路を構成する興奮性 / 抑制性ニューロンの数を人為的に制御するという手法で EI バランスと神経回路活動の関係を調べたが、実際の神経活動は興奮性 / 抑制性シナプス結合の数とその強度によって制御され、また、電気刺激など人工的な手法で誘起されるシナプス活動と本来の感覚入力に対して活性化されるシナプスは異なる可能性がある、興奮性シナプス、抑制性シナプス、さらにはそのサブタイプそれぞれにおいて可塑性のメカニズムが異なるなど、関係する要素は多岐にわたることが指摘されている。今回の研究で、活動依存性の可塑的变化に加えて恒常性維持の可塑性も関与することを示唆する実験結果が得られたことも勘案し、今後はシナプス - ニューロン - 神経回路という階層構造のそれぞれの段階で起こる現象とその制御機構を統合した研究が必要と考えられる。

<引用文献>

Danjo T. et al., Subregional Specification of Embryonic Stem Cell-Derived Ventral Telencephalic Tissues by Timed and Combinatory Treatment with Extrinsic Signals, *J. Neurosci.* 31, pp. 1919-1933, 2011

Ghatak S. et al., Novel Therapeutic Approach for Excitatory/Inhibitory Imbalance in Neurodevelopmental and Neurodegenerative Diseases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 61, pp. 701-721, 2021

He H-Y. and Cline H., What is Excitation/Inhibition and How is it Regulated, *J. Exp. Neurosci.* 13, pp. 1-3, 2019

Kobayashi R. et al., Reconstructing neuronal circuitry from parallel spike trains, *Nat. Com.* 10, 4468, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asahina T., Shimba K., Kotani K., Jimbo Y.	4. 巻 69
2. 論文標題 Observing Cell Assemblies From Spike Train Recordings Based on the Biological Basis of Synaptic Connectivity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEE Trans. BME	6. 最初と最後の頁 1524-1532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/TBME.2021.3123958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 古川, 張, 朝比奈, 榛葉, 小谷, 神保
2. 発表標題 高密度電極アレイを用いた培養神経回路網における時間符号化メカニズムの検討
3. 学会等名 電気学会医用・生体工学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chang C. H., Shimba K., Asahina T., Kotani K., Jimbo Y.
2. 発表標題 Development and time interval learning of hippocampal-cortical co-culture model in vitro
3. 学会等名 Neuroscience 2021, SfN 50th Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川, 榛葉, 朝比奈, 小谷, 神保
2. 発表標題 高密度電極アレイによる恒常的可塑性評価の試み
3. 学会等名 2021年 電気学会 電子・情報・システム部門大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chen S., Shimba K., Chang C. H., Kotani K., Jimbo Y.
2. 発表標題 Spontaneous Network Activity differs by Excitation-Inhibition Ratio Using Induced Pluripotent Stem Cells Derived Cortical Neurons
3. 学会等名 電気学会 医用・生体工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川, 榛葉, 朝比奈, 小谷, 神保
2. 発表標題 培養神経回路網における発火の共起性に基づく神経細胞のクラスタリング
3. 学会等名 電気学会 医用・生体工学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森谷, 榛葉, 小谷, 神保
2. 発表標題 神経幹細胞追加播種による成熟神経回路網の電気活動変化の解析
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Moriya F., Shimba K., Kotani K., Jimbo Y.
2. 発表標題 Disrupted Pattern Separation of Neuronal Network by Increasing the Number of Newborn Neurons Excessively
3. 学会等名 EMBC2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Moriya F., Shimba K., Kotani K., Jimbo Y.
2. 発表標題 Change in Evoked Response of Mature Neuronal Network to Spatial Pattern Stimulation by Immature Neurons
3. 学会等名 EMBC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榛葉, 朝比奈, 酒井, 小谷, 神保
2. 発表標題 微小電極アレイを用いた軸索伝導計測による神経細胞の機能評価
3. 学会等名 電気学会電子情報システム部門大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森谷, 榛葉, 小谷, 神保
2. 発表標題 未熟神経細胞の海馬培養神経回路網への介入が電気刺激による訓練効果に与える変化
3. 学会等名 電気学会電子情報システム部門大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榛葉, 酒井, 小谷, 神保
2. 発表標題 マイクロデバイスによる神経細胞の軸索に発現したNaチャンネルの機能評価
3. 学会等名 第58回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	榊 健太 (Shimba Kenta) (80792655)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------