

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K20734

研究課題名（和文）Photoswitchを応用した人工感覚器の有効性および安全性の検証

研究課題名（英文）Validity and safety assessment of optical nerve stimulation using photoswitchable molecules

研究代表者

野村 修平（Nomura, Shuhei）

帝京大学・公私立大学の部局等・講師

研究者番号：00825432

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：失われた感覚機能の再建を目指した神経刺激法の研究が盛んに取り組みられている。Photoswitchは光応答性化合物（photoactive molecule）を介して神経細胞に光応答性を付与する技術であり、高密度神経刺激法として有望視されている。本研究では、photoswitchの有効性および安全性を検証するための基盤となる（1）photoactive moleculeを安定的に合成可能な有機合成プロセスと（2）光刺激と細胞活動記録を同時に実施可能なin vitro評価系の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電気的神経刺激法は人工内耳や人工網膜として既に実用化されている。しかし、刺激電極の微細化における物理化学的な限界により、安全に高密度の神経刺激を行うことは原理的に困難である。それに対し、photoswitchは細胞1つ1つに光応答性を付与し、時空間的な制御が容易な光刺激で細胞興奮を誘発するため、理想的な高密度の神経刺激が期待できる。本研究で確立した基盤技術によりphotoswitchの有用性の検証が可能となった。高密度神経刺激法の実現は、感覚機能の喪失によって日常生活が困難となった患者の飛躍的なQOL向上につながる。

研究成果の概要（英文）：Neural stimulation for restoring lost sensory functions have been studied with great interest. "Photoswitch" is a promising technology for achieving high-density neural stimulation by making neurons light-responsive using photoactive molecules. To make this technology practical, its usefulness needs to be verified in detail. In this study, to verify the efficacy and safety of the photoswitch, we developed (1) a process that enables the stable synthesis of photoactive molecules and (2) an in vitro evaluation system that enables the simultaneous stimulation and recording of light-responsive cell activity.

研究分野：生体医工学

キーワード：人工視覚 人工感覚器 神経刺激 Neural stimulation Photopharmacology Photoswitch Brain-machine Interface Neuromodulation

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

失われた感覚機能の再建・治療を目指した神経刺激技術に関する研究が盛んに取り組まれている。最も実績のある神経刺激技術は電気的神経刺激法である。既に実用化されている人工内耳や人工網膜では、体内に埋植した金属製微小電極を介して神経を電気刺激する。しかし、電極の微細化には物理化学的な限界があるため、電気的神経刺激法では高密度の神経刺激は原理的に困難である。この解決策として光薬理的神経刺激法 (photoswitch) が提唱されている。これは、細胞膜イオンチャンネルに結合する特殊な光応答性化合物 (photoactive molecule) を介して、遺伝子改竄することなく神経細胞に光応答性を付与する手法である。細胞 1 つ 1 つに光応答性を付与できるため、理想的な高密度神経刺激法として期待できる。しかし、現時点では光応答性や photoactive molecule の毒性など、医療応用に向けた詳細な検証はなされていない。そのため、photoswitch 技術の実用化に向けて有効性や安全性を検証していく必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では photoswitch の有用性の検証に必要な基盤技術の構築を目的に、種々の photoactive molecule を安定的に合成できる有機合成プロセスの構築と、光刺激および細胞活動記録を同時に行える *in vitro* 評価系の開発を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 光応答性化合物 (photoactive molecule) の合成

2つの photoactive molecule (BENAQ、DENAQ) の合成法は多段階の反応ステップからなる (Fig. 1)。原料 [*p*-nitroaniline および *N*-benzyl-*N*-ethylaniline (または *N,N*-diethylaniline)] のアゾカップリング反応によりアゾベンゼン誘導体 (中間化合物[1]) を合成後、 $\text{Na}_2\text{S}$  により中間化合物[2]に還元した。Ethyl chloroacetate および Triethylamine を反応させた後、加水分解により中間化合物[3]を得た。これを Oxalyl chloride で活性化し (中間化合物[4])、中間化合物[2]とカップリングさせることで目的化合物[5]を合成した。

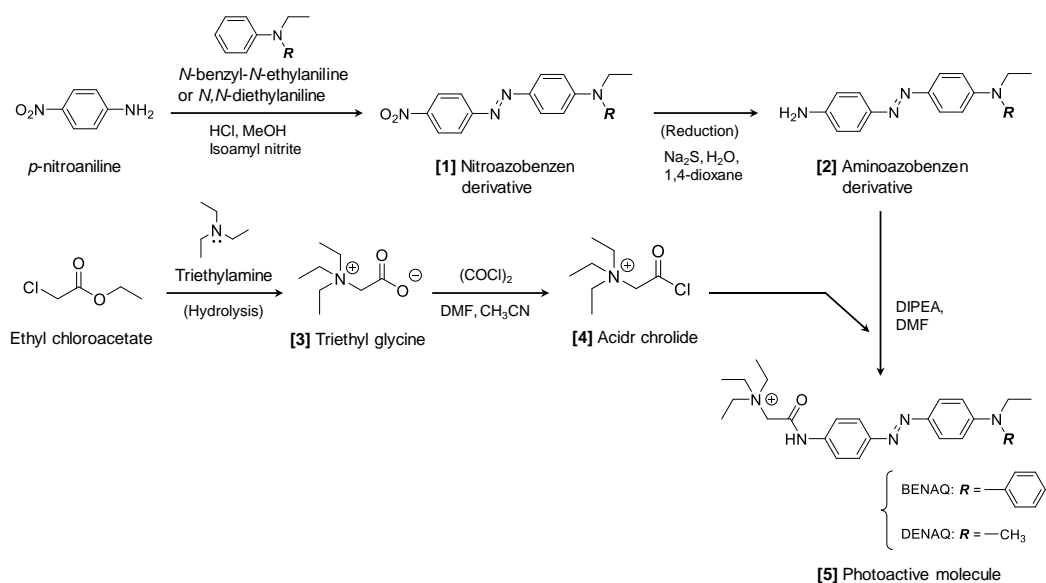


Fig. 1 Photoactive molecule の合成スキーム

## (2) 微小電極アレイ (MEA) による細胞活動の *in vitro* 評価

微小電極アレイ (Microelectrode array: MEA) (60MEA200/30iR-Ti-gr, multichannel systems) を搭載した培養ディッシュ上に神経系細胞株 NG108-15 (マウス神経芽細胞腫 N18TG-2 とラットグリオーマ細胞 C6Bu-1 のハイブリッド細胞) を播種し、細胞外活動電位を計測した。その後、photoactive molecule (BENAQ、終濃度 30  $\mu\text{mol/L}$ ) を細胞に作用させた後、青色 LED による光刺激 (ピーク波長 470 nm、波長域 430–490 nm、パワー密度 0.193  $\text{mW}/\text{mm}^2$ 、15 秒間隔 10 サイクルの On/Off) を行いながら細胞外活動電位を計測した (Fig. 2)。

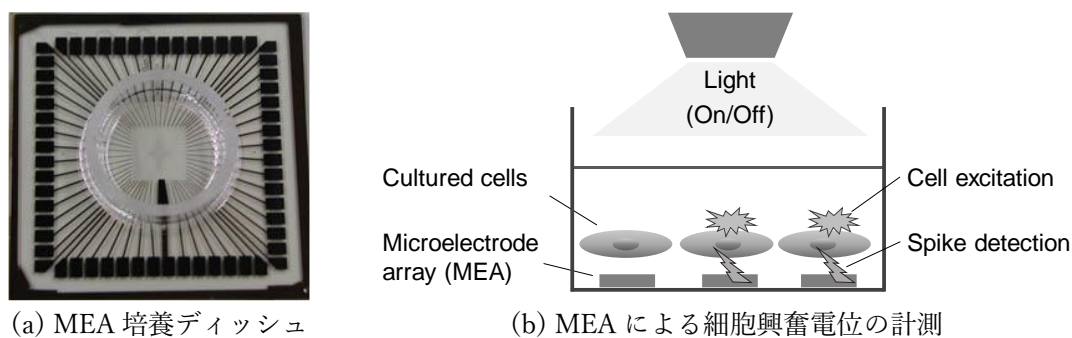


Fig. 2 MEA による細胞興奮の記録

## 4. 研究成果

### (1) 光応答性化合物 (photoactive molecule) の合成プロセス構築

Photoactive molecule の合成プロセスの構築に成功した。BENAQ および DENAQ は多段階の複雑な反応ステップからなる。特に中間生成物[4]は化学的に不安定なため、大気中の水分や酸素により容易に分解してしまう点が課題であった。この課題に対し、禁水・脱酸素環境下で合成可能な反応プロセスを構築することで目的化合物[5]の安定的な合成が可能となった。合成した化合物は核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) スペクトル分析 (Fig. 3、Fig. 4)、質量分析、紫外/可視 (UV/Vis) 吸光スペクトル分析 (Fig. 5) で同定した。BENAQ の極大吸収波長は約 470 nm であった (Fig. 5)。

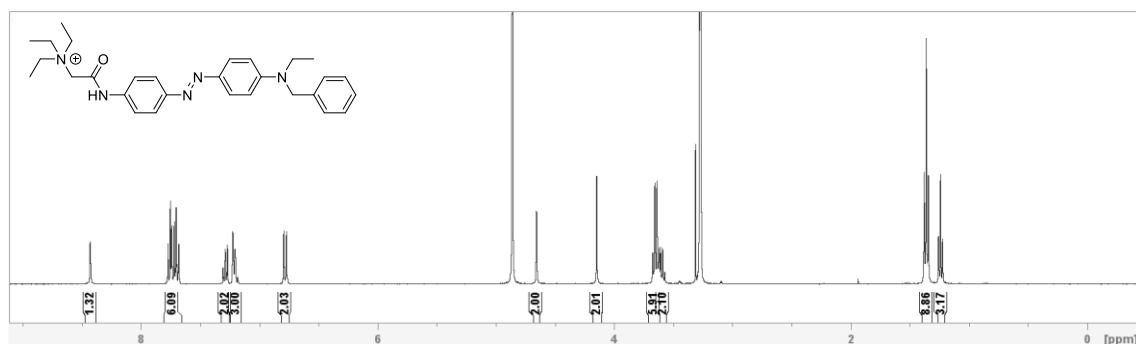


Fig. 3 BENAQ の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz):  $\delta$  = 8.43 (s, 1H), 7.77–7.68 (m, 6H), 7.30–7.27 (m, 2H), 7.22–7.18 (m, 3H), 6.80–6.76 (m, 2H), 4.65 (s, 2H), 4.14 (s, 2H), 3.62 (q,  $^3J$  = 7.3 Hz, 6H), 3.56 (q,  $^3J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.36 (t,  $^3J$  = 7.3 Hz, 9H), 1.24 ppm (t,  $^3J$  = 7.1 Hz, 3H).

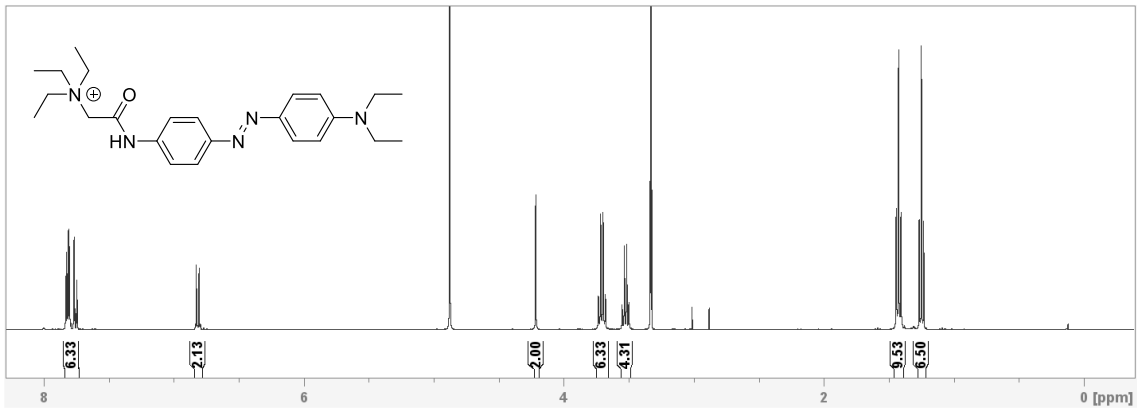


Fig. 4 DENAQ の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトル

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz):  $\delta = 7.84\text{--}7.74$  (m, 6H),  $6.83\text{--}6.79$  (m, 2H),  $4.21$  (s, 2H),  $3.73\text{--}3.68$  (m, 6H),  $3.55\text{--}3.50$  (m, 4H),  $1.44\text{--}1.40$  (m, 9H),  $1.27\text{--}1.23$  ppm (m, 6H).

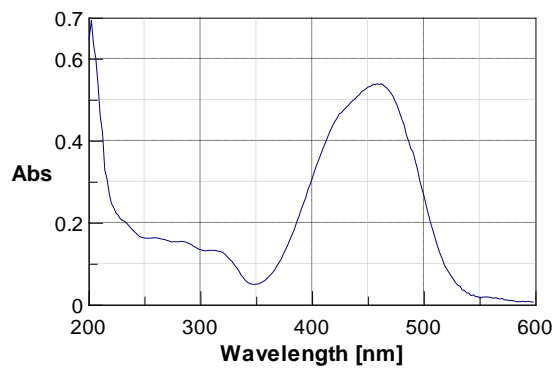
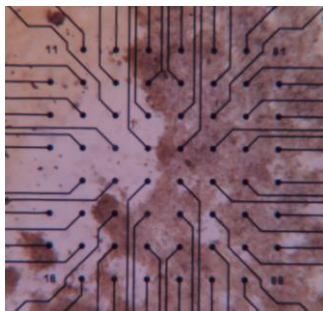


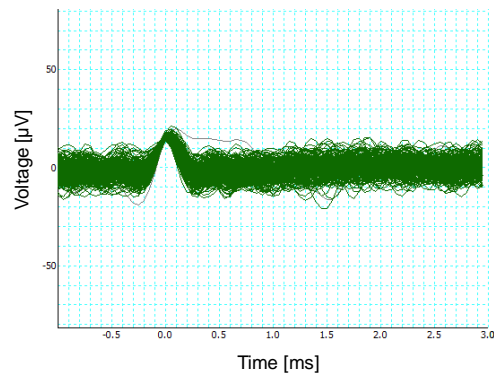
Fig. 5 BENAQ の UV/Vis スペクトル  
(Acetonitrile/ $\text{H}_2\text{O}$  0.5% Formic acid)

## (2) 微小電極アレイ (MEA) による細胞活動の *in vitro* 評価系構築

光照射装置と MEA を搭載した培養評価システムの構築に成功した。MEA 培養ディッシュ上に播種した神経系培養細胞株 NG108-15 の自発スパイクを記録した (Fig. 6)。その後、NG108-15 細胞に BENAQ (終濃度  $30\ \mu\text{mol/L}$ ) を作用させ、青色 LED による光刺激を行いながらスパイク発火数を MEA で記録した。15 秒区間ごとのスパイク発火数は 200–250 の間で不規則に変動し、規則性は認められなかった (Fig. 7)。

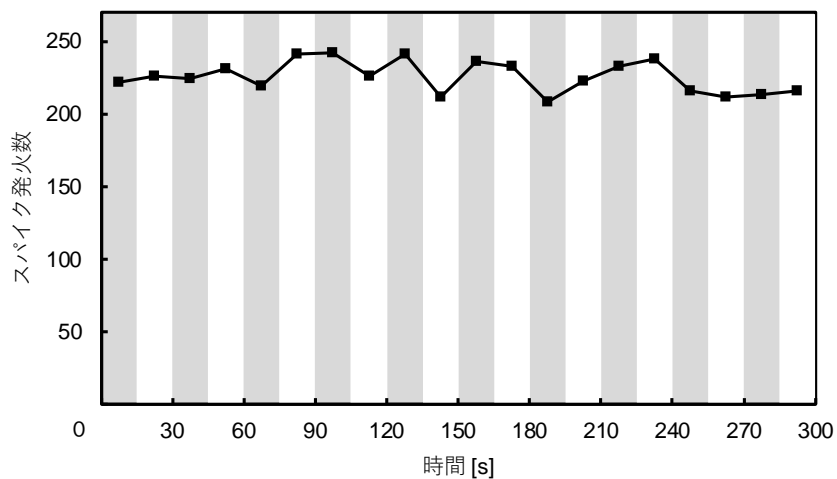


(a) NG108-15 細胞を播種した  
MEA 培養ディッシュ



(b) 自発スパイクの記録

Fig. 6 MEA を用いた NG108-15 細胞の自発スパイク記録



**Fig. 7** スパイク発火数の経時変化（灰色部：Light Off、白色部：Light On）

本研究では、photoactive molecule の安定的な合成プロセスと、光照射装置を搭載した MEA による細胞活動評価システムを構築した。今後、これらの要素技術を基盤に有望な photoactive molecule の探索と生理活性の評価を進め、photoswitch の有用性を検証していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nomura Shuhei, Tashiro Hiroyuki, Terasawa Yasuo, Nakano Yukari, Haruta Makito, Sasagawa Kiyotaka, Takehara Hironari, Morimoto Takeshi, Fujikado Takashi, Ohta Jun	4. 巻 35
2. 論文標題 Effects of Long-Term In vivo Stimulation on the Electrochemical Properties of a Porous Stimulation Electrode for a Suprachoroidal-Transretinal Stimulation (STS) Retinal Prosthesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 3567 ~ 3587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18494/sam4619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shuhei Nomura, Hiroyuki Tashiro, Yasuo Terasawa, Yukari, Nakano, Makito Haruta, Kiyotaka Sasagawa, Hironari Takehara, Jun Ohta	4. 巻 141
2. 論文標題 Randles Circuit Model for Characterizing a Porous Stimulating Electrode of the Retinal Prosthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 134 ~ 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ecj.12324	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 野村 修平, 田代 洋行, 寺澤 靖雄, 中野 由香梨, 春田 牧人, 笹川 清隆, 竹原 浩成, 太田 淳	4. 巻 141
2. 論文標題 人工視覚システム用多孔性刺激電極界面特性解析のためのRandles型回路モデルの提案	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 電気学会論文誌E（センサ・マイクロマシン部門誌）	6. 最初と最後の頁 134-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1541/ieejsmas.141.134	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shuhei Nomura, Hiroyuki Tashiro, Yukari Nakano, Yasuo Terasawa, Hironari Takehara, Makito Haruta, Kiyotaka Sasagawa, Jun Ohta
2. 発表標題 Comparison of electrochemical circuit models with/without diffusion element for laser-induced porous electrodes of retinal prostheses
3. 学会等名 45th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE EMBS)（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村修平, 田代洋行, 寺澤靖雄, 中野由香梨, 太田淳
2. 発表標題 金属製埋植電極に必要な諸特性 人工感覚器への応用を中心に
3. 学会等名 日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木海史, 野村修平, 田代洋行
2. 発表標題 神経細胞に光応答性を付与するPhotoactive molecule ( BENAQ ) の精製純度の検討
3. 学会等名 日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野村修平
2. 発表標題 電気化学インピーダンススペクトル法による人工視覚システム用多孔性刺激電極界面特性解析のためのRandles型回路モデルの提案
3. 学会等名 電気学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村修平
2. 発表標題 失われた視覚機能の再建を目指した光による網膜神経刺激法
3. 学会等名 日本生体医工学会九州支部学術講演会
4. 発表年 2019年～2020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
研究協力者	田代 洋行 (Tashiro Hiroyuki)  (70380384)	九州大学・医学研究院・講師   (17102)	

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
---------	---------