

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04511

研究課題名(和文) 神経活動リズムを形成する過分極応答解析のためのイメージングデバイス開発

研究課題名(英文) Imaging device development for hyperpolarization response analysis forming neural activity rhythm

研究代表者

関野 祐子 (Sekino, Yuko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任教授

研究者番号：70138866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳リズム形成のメカニズム研究用デバイス開発を目指して、げっ歯類およびヒトiPS細胞由来神経細胞の高密度培養を使って、同期的神経活動電位と膜電位変化または細胞内カルシウムイメージングの同時記録を行った。多点電極プローブによる細胞外電位記録で、同期的神経活動を確認した。細胞外電位記録システムとイメージングシステムを同期化して、同期的周期的な神経活動には持続的な脱分極が伴うことを示した。また、GABA_A受容体阻害薬によって脱分極の発生速度が亢進し、神経活動リズム周期が乱れて緩慢になることを観察した。この技術は、同期的な神経活動電位の発生メカニズムの解明に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した、培養神経細胞を用いた細胞外電位記録と膜電位イメージングの同時記録法は、細胞外電位記録のスパイク解析では解析できない受容体メカニズムやイオンメカニズムの解明を可能にする。現在製薬企業では、多点電極プローブを用いて記録した自発発火を対象としてスパイク数やネットワークバースト数などを数値化して、医薬品の催痙攣作用をスクリーニングしているが、数値化には苦労している。膜電位変化は、スパイクとは異なり数値化が容易であため、薬物の毒性並びに薬理試験に有用な解析法である。認知症など睡眠覚醒のリズムの乱れのある脳疾患治療薬をスクリーニングするための重要なインビトロ実験法である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a device for investigating the mechanisms of brainwave rhythm formation. We successfully achieved simultaneous recording of extracellular field potentials and membrane potential changes during synchronized neural activity in cultured neurons of rodent hippocampus and human-iPS cell-derived neurons. After we confirmed the formation of synchronized neural activity mediated by synapses using a multi-electrode probe, simultaneous recording of membrane potential imaging using membrane potential-sensitive dyes was performed, indicating that synchronized activity potentials exhibit sustained depolarization responses. Additionally, we observed an increase in the propagation speed of the activity potentials and changes in rhythm period with the administration of a GABA_A receptor inhibitor, Sacrofen. This technology contributes to the elucidation of the mechanisms underlying the generation of synchronized neural activity related to the brainwave rhythm.

研究分野：Neuroscience

キーワード：培養神経細胞 細胞外電位記録 膜電位感受性色素 ラット胎仔由来凍結神経細胞 ヒトiPS由来神経細胞 カルシウムイメージング マイクロ流体デバイス GABA_A受容体

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

アルツハイマー型認知症における脳波異常と GABA 神経活動

脳波計測では脳の活動状態に応じた周波数の波形が記録され、てんかん、脳腫瘍、神経変性などでは診断に用いられている。近年、アルツハイマー型認知症患者において、覚醒安静閉眼時にデルタ波やシータ波が混在することが報告され、認知症との関係が着目されている¹⁾。

シータ波は覚醒時の記憶情報の取り込みに、デルタ波は徐波睡眠に関係している。徐波睡眠時には、視床の周囲を広範囲に取り囲む視床網様核の抑制性ニューロンの神経活動により視床神経活動が抑制され、外界からの情報は脳皮質にリレーされない。視床神経活動抑制には、GABA_A 受容体と GABA_B 受容体が関与し、GABA_B 受容体は特にデルタ波形成に関与している。

GABA_B 受容体の活性を調べる創薬ツールの必要性

認知症の治療薬開発は喫緊の課題であり、新たな創薬ターゲットが求められている。GABA_B 受容体機能の異常は種々の中枢神経疾患と強く関係していることから、古くから GABA_B 受容体に結合活性のある化合物には多くの期待が寄せられてきた。現行の創薬プロセスでは、化合物の中枢神経系作用は動物実験により確認されるが、動物の行動解析や脳波測定などは手法が難しいうえに、行動変化や脳波変化があっても動物実験では作用機序を明らかにできない。そこで化合物の神経細胞に対する直接的作用は、パッチクランプ法というイオンチャンネル電流を調べる電気生理学的手法で調べることとなる。ところが、GABA_B 受容体による抑制性のカリウムイオンチャンネル電流は、振幅が小さくて持続時間が長い。このため通常電気生理学的手法で記録すること自体が難しい。そこで、神経細胞の集合で膜電位変化を測定する膜電位イメージング法はこの手法的な困難さを克服すると考えた。関野らは、扁桃体スライス標本において GABA_B 受容体活性化による過分極応答を可視化した²⁾。脳スライス標本はスループットが低いので、本研究では創薬応用を見据えて培養神経細胞の実験系を構築する。

神経細胞の活動リズムと膜電位変化の関係を解析するためには、細胞外電位と同時に膜電位を測定する必要があるが、培養神経細胞でこれらを組み合わせた研究報告はまだない。

2. 研究の目的

本研究の将来的な目的は、アルツハイマー型認知症の脳波を正常化するための創薬ターゲットを探索する新しい創薬デバイスの開発である。そのために本研究課題においては、同期的自発的なリズムを持つ神経活動を再現する神経細胞培養技術の確立と、化合物の作用メカニズムを解明するための神経活動測定システム開発を行う。神経細胞を高密度で培養すると同期的自発的なネットワークバーストが発生することが知られているので、実験モデルとしてラット胎仔由来海馬神経細胞あるいはヒト iPS 細胞由来神経細胞の高密度神経細胞培養を使用する。細胞外記録による活動電位を計測する多点電極アレーシステムと、神経活動リズムを作る細胞内電位変動を可視化するイメージングシステムを同期させるインターフェースを作成する。神経細胞を多点電極プローブ上に播種し培養中の神経活動をモニターし、周期性のある神経活動を再現性良く記録するための培養プロトコルを確定する。多点電極を使って培養細胞集団の神経活動を同期させる刺激部位を同定し、電気刺激に応答する神経活動について定量的な指標を決定する。GABA_B 受容体阻害薬を用いて薬効を定量的に評価する解析パラメーターを決定する。将来的な創薬デバイス開発のためにマイクロ流体デバイスによる外液交換システムを考案する。

3. 研究の方法

多点電極アレー (multi electrode array; MEA) プローブ上での高密度神経細胞培養実験系の確立

げっ歯類神経細胞を用いた高密度培養

ラット胎仔 (E16) 海馬を摘出して酵素処理で細胞を分散後に凍結保存された神経細胞 (SKY ニューロン; AlzMed, Inc., Japan) を使用した。凍結神経細胞を多点電極アレーに播種し、同期的神経活動が記録される条件を確立した。MEA プローブ (MED-P515A; Alpha MED Scientific, Inc., Japan) は 0.05% Polyethylenimine でコートした。播種培地 (Neurobasal Medium 500 mL に 2% B-27 Supplement, 0.25% GlutaMax, 1% Penicillin-Streptomycin) で 2 µg/mL Laminin (500 µL) を作成した。SKY ニューロンの解凍は Koganezawa らの方法³⁾で行った。解凍した神経細胞を 15 mL チューブで遠心 (200xg, 5 min) し、上清を取り除き、Laminin 入り培地で懸濁し、5 万細胞をプローブの電極上に播種し、乾燥を防ぎ 2 時間インキュベーター内に静置した後、37 °C の播種培養液 500 µL をゆっくり添加した。培養液は半量ずつ 1 週間に 1 回の頻度で交換した。数日おきに細胞外電位を測定し、培養 3 週間目以降に膜電位イメージングならびにカルシウムイメージングを行った。単一神経細胞のカルシウム濃度変化測定を行う目的で、35 mm のガラスベースディッシュ (AGC TECHNO GLASS Iwaki, ガラス部直径 12 mm) にプローブへ神経細胞の播種と同じ細胞数と播種面積で播種した (培養液量 1.5 mL)。3 週間東京大学で培養したのち、慈恵大学 (分担研究者・山澤博士) に運搬して実験を行った。

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた高密度培養

分担研究者・鈴木博士が、製薬企業等の薬理・毒性の担当者が集るコンソーシアム (the Consortium for Safety Assessment using Human iPS Cells; CSAHi)⁴⁾に提供しているヒト iPS 細胞由来神経細胞を使った実験プロトコル⁵⁾を導入した。CSAHi コンソーシアムのメンバーに提供された Quick-Neuron™ Plate - MEA 48 (Elixergen Scientific Japan, Inc., Japan) を用いて、薬理実験を行った。本試料は MEA プレート (CytoView MEA48; Axion BioSystem, Inc., US) 上でヒト

iPS 細胞由来神経細胞とヒトアストロサイトを共培養したもので、Elixergen 社において 6 週間培養し、東京大学に輸送し Maestro (Axion BioSystem, Inc., US)にて細胞外電位記録を行った。

膜電位感受性色素と細胞内カルシウム指示薬によるイメージング

多点電極プローブに播種した神経細胞に同期的自発的神経活動が記録され、さらに電気刺激で活動電位が誘発されることを確認したのち、膜電位イメージングと細胞内カルシウムイメージングを行った。細胞外液を Earl's balanced salts で洗浄して、膜電位感受性色素である FluoVolt™ (Molecular Probes™ FluoVolt™ Membrane Potential Kit; ThermoFisher Scientific Inc., Japan) を x1000 に希釈して 37°C で 1 時間染色した。細胞内カルシウム指示薬としては Cal-520™AM (AAT BioQuest, Inc., US) を用い、4 μM で 40 分染色した。

多点電極アレー(MEA)による細胞外電位測定

細胞を播種した多点電極プローブ (MED-P515A) を MEA システム MED-64 Basic (Alpha MED Scientific, Inc., Japan) のヘッドステージにセットし、自発的な神経活動電位を記録する。培養 3 週以降で膜電位イメージングまたはカルシウムイメージングを行う標本を選択するために、電気刺激による神経活動電位の誘発を確認した。64 個の電極により自発性活動電位を記録したのちに特定の電極を選んで電気刺激を行った。電気刺激は、二相性の +/- 0.5 V (持続時間 1 msec) を用いた。記録された細胞外電位波形は、Mobius Win7 にて解析した。

膜電位変化および細胞内カルシウム変化のイメージング

MED64 により細胞外電位で同期的な自発性の神経活動電位 (bursting discharge) が記録されることを確認したのち、膜電位感受性色素または細胞内カルシウム指示薬により細胞標本を染色して、細胞外電位記録と同時に膜電位変化または細胞内カルシウムを測定した。薬理実験結果を定量的に解析するために、電気刺激に応答する神経活動を細胞外電極測定装置とイメージング装置を同期させて記録した。膜電位イメージングには MiCAM05-C351R (BrainVision Inc., Japan) を使用して 636×360 画素で 3.6 ミリ秒 / フレームで 1391 フレーム を連続的に撮像した。このときの光学装置には倒立型マクロ蛍光顕微鏡 (BrainVision Inc., Japan) を用い、対物レンズは 5x (10447243, Leica Microsystems, Germany)、結像レンズは 135 mm/2.0 (SAMYANGOPTICS, Korea) のカメラレンズを用いて視野サイズを約 1.2 mm 角に調整した。励起光には LED 光源 LEX2-LZ4-B (BrainVision Inc., Japan) を用い、光量設定は 100% とした。励起フィルターおよび蛍光フィルターはそれぞれ 466nm/40nm、531nm/40nm (Semrock Inc., US)、ダイクロイックミラーは 500nm (BrainVision Inc., Japan) を用いた。膜電位イメージングは、電気刺激前の神経活動がない画像を参照画像とし、刺激後の画像との光量の差分を増幅することにより膜電位変化を検出するシステムである。細胞内カルシウム変化の観察実験に関しても同様の撮像条件となる。細胞内カルシウム測定については実験の一部を、慈恵大学 (山澤博士) にてモノクロ高感度カメラ (ORCA-Flash; Hamamatsu Photonics K.K., Japan) を搭載した倒立顕微鏡 (x20) を用いて、0.5 秒 / フレームで 100 枚撮像した。

マイクロ流体デバイス開発

MEA システム MED64 とイメージングシステムとの接続

MEA システムと Analog-interface unit (SR JB0006, 64channel output, Alpha MED Scientific, Inc., Japan) を用いる。Analog-interface unit には MED64 で観測される 64 チャネル分の活動電位が出力される。そのうち 4 チャネル分を MiCAM05 のアナログ入力端子に接続し、MiCAM05 側で電位感受性色素の蛍光変化と同時に活動電位を同時記録した。このシステムは、MED64 からアナログ信号をインターフェースにより MiCAM05 に接続して細胞外電位と膜電位記録を同期させたものである (図 1)。BV-Workbench (BrainVision, Inc., Japan) により膜電位変化または細胞内カルシウム濃度変化を画像と波形に変換して観察し、任意の電極部位の電気信号とイメージング信号を同時に観察することができる。

マイクロ流体デバイスによる迅速な灌流液交換チェンバー開発のための予備実験

化合物の伝達物質とイオンチャネルメカニズム研究を光学的な方法で行うには、光学システムを反応に同期させる必要があり、本研究では MED64 の記録電極を刺激電極として使うことでこの課題を解決した。次の課題は、化合物が作用する受容体などを明らかにするために細胞外液を交換して、その効果を確認する必要がある。そのためには外液の交換のタイミングと光学測定を同期させる必要があるため、秒単位で外液が交換されるシステムを開発する必要があるため、まずポリジメチルシロキサン (PDMS) で作製したプレート内での細胞の生存状態を確認することとした。スライドガラスの大きさに合わせて PDMS で作製した厚さ 1 cm の板に直径 7 mm (96 穴プレートのウエル直径) のホールを 5 つ等間隔にあげたものを、東海大学 (分担研究者・木村博士) に作製依頼した。培養神経細胞の場合形態観察だけでは神経活動の有無が判断できないことから、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を播種して、心筋細胞の拍動数を指標に細胞の状態を確認した。

4. 研究成果

高密度神経細胞培養実験系の確立

播種後 4 週間まで経時的に MEA 記録を行い、自発的活動の時間経過の観察を行った。図 2 に、培養後 12 日、18 日、27 日の MEA 記録を示した。図 2A に、64 個の電極の配置と実際のリアルタイムトレースの一部を示した。培養後 7 日から 10 日目に培養神経細胞 (SKY ニュー

ロン)の自発的な神経活動が観察されたが、神経活動の同期性は高くなく、ネットワークは形成されていないと考えられた。その後12~14日目、同期した神経活動と同期しない神経活動が混在するようになり(図2 B-a)、18日目では同期した神経活動が優位となった(図2 B-b)。これは培養神経細胞内でネットワークが形成されていることを示している。さらに培養期間が延びると、同期信号が観察される電極の範囲が広がり(図2 A右側)、図2 B-cに示すように、同期信号の振幅が大きくなり、一方でその発生頻度は下がることが分かった。この同期的神経活動が繰り返されたのちに、さらに振幅が大きく持続時間の長いてんかん波様の神経活動が観察された。てんかん波様の活動電位が発生した後は、数分間の間神経活動が休止した。外液に0.5~1 mM MgCl₂を添加し、てんかん波様神経活動の発生を抑えた。

細胞内カルシウム指示薬によるイメージング

図3に慈恵大学で行った細胞内カルシウムイメージング実験の一例を示した。高密度で神経細胞を培養すると、ディッシュ底面にたいする接着力よりも神経細胞同士の接着力が強く、低密度培養ではあまり形成されない凝集塊(クラスター)が複数できるのが特長である。培養3週間目に運搬したが神経細胞がはがれることはなかった。このことから、いわゆる細胞の調子が悪いという状態ではないことが分かった。しかし、運搬数時間後並びに翌日にCal-520AMをロードして観察したところ自発神経活動は観察なかった。その後1週間静置して観察したところ、電気刺激には応じ、頻度は低いが自発神経活動も見られたことから、培養神経細胞の状態は良好であった。図3 Aには、Cal-520AMをロードした培養神経細胞の様子とカルシウムシグナルを記録した3つのクラスターAreaとシングルセルの位置を示した。図3 Bには、それぞれのカルシウムシグナルを重ねてトレースした。Area 1, 2, 3のトレースは、クラスター位置が離れているにもかかわらず同期しており、互いにシナプス形成していることがわかった。シングルセルの信号である赤いトレースを見ると、自発発火によるカルシウム重要が10秒後近辺にみられているものの、それ以外は他のAreaトレースとほぼ重なっていることから、この細胞も他のAreaからの入力を受けて同期していることがわかる。

膜電位感受性色素によるイメージング

図4には、高密度培養したSKYニューロンをFluoVoltで染色して、64個の電極のうち電極25番を刺激電極として観察された膜電位変化を示した。図4は図5に対するコントロールとなる。図4 Aには、刺激後21.6 msの膜電位変化を疑似カラー画像で示した。光量変化は刺激前のreferenceに比べて明るくなっており脱分極を示しているが、光量変化分は2%に至っておらず、疑似カラー画像は緑から黄色である。図4 Bには、1391フレームで記録された膜電位変化の波形を示した。ベースラインの上に、周期性のある脱分極が繰り返し観察された。図4 Cは、A1電極の細胞外電位波形である。強い脱分極の最初の方で上向きから下向きに転ずる大きなスパイクがでたあと、ベースラインが下向き方向に動いてやがてベースラインが安定した。本研究により初めて、培養神経細胞の同期的周期的なスパイク応答が繰り返しの脱分極変化で引き起こされることを明らかにした。

図5には、30 μM Saclofen (GABA_B受容体阻害薬; Cayman Chemicals, US)の投与後20分の薬理実験結果を示した。刺激後21.6 msの疑似カラー画像で、培養細胞全体に2%以上の光量変化があることがわかる。図4との比較により、最大値の脱分極に到達する時間が早くなっていた。GABA_B受容体活性は、脱分極変化速度を遅らせていたことが分かった。図5 Bと図4 Bの比較を行うと、脱分極レベルが高く、繰り返しの神経活動の周期に乱れが生じてリズム周期が遅くなった。図5 Cの細胞外電位記録でもスパイク周期が遅くなっていることがわかった。

膜電位イメージングでは時間分解能が、1 msまで上げることができる。今回は光の照射時間を短くする目的で、1フレーム3.6 msに設定している。細胞外電位との同時測定により、膜電位イメージングはスパイク記録に追従しており、両者を比較することで、細胞外電位にともなる膜電位変化が明らかとなった。高密度神経細胞培養の細胞塊には抑制性ニューロンの数がすくないことから、扁桃体スライス実験で観察されたような同期する過分極応答は観察されなかったが、GABA_B阻害薬で脱分極速度が速くなり、脱分極の持続時間がのびたことから、GABA_B受容体は高密度神経細胞培養でも活性を持っていることが分かった。

今回の研究期間内での成果は定性的解析にとどまったが、今後統計的に処理ができるよう定量解析するためのパラメーターを定め、本システムを創薬プロセスに実装することをめざす。また、迅速な溶液交換システムはPDMS素材とスライドガラスの接着面で播種した細胞がはがれてしまう傾向があった。マイクロ流体デバイスを開発するためには、流路の素材の検討が必要となることが判明した。これらが今後の課題である。

参考文献

1. 高橋淳子 (2017) 医学検査 Vol.66 No. J-STAGE-2 p.55-61
2. Fujieda T, Koganezawa N, Ide Y, Shirao T, Sekino Y. (2015). *Neurosci Lett.*, 590: 126-31.
3. Koganezawa N, Roppongi RT, Sekino Y, Tsutsui I, Higa A, Shirao T. (2023) *J Vis Exp.*, Jan 27 (191).
4. Shirakawa N, Suzuki I. (2020) *Curr Pharm Biotechnol.*, 21(9): 780-78
5. Odawara, A., Matsuda, N., Ishibashi, Y., Yokoi, R., & Suzuki, I. (2018) *Sci.repo.*, 8(1): 10416.

図1

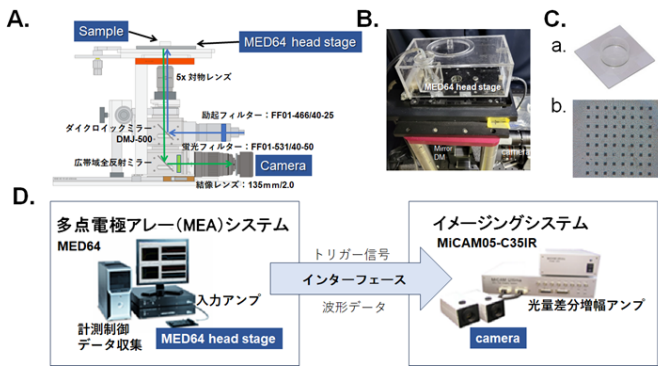


図1:細胞外電位とイメージングの同時計測のために統合したシステム
 A:MEAシステムのヘッドステージとイメージングシステムを搭載した神経活動計測装置
 B:MEAプローブ上の神経細胞の保温と5%CO₂+95%O₂混合ガス供給のためのチャンパー
 C:a)神経細胞を播種したMEAプローブ b)64個の記録電極上に解凍海馬細胞を播種
 D:MEAシステムとイメージングシステムの統合の概念図

図2

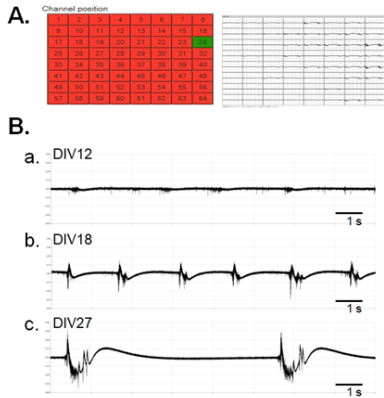


図2:培養神経細胞 (SKYニューロン) 細胞外電位記録の培養後の自発発火の経過
 A:播種後27日目のMEAプローブから記録された細胞外電位記録 (64チャンネル全体)
 左 64電極の配置
 右 各電極のリアルタイムトレース
 B: 24番電極の細胞外電位記録 自発発火
 a) 培養12日目 同期していないバラバラの細胞外電位と少し同期している活動電位の両方が記録されている。
 b) 培養18日目 2秒に1回程度の同期シグナルが観察された
 c) 培養27日目振幅が大きくなり、さらに持続時間が長く、間隔が長くなった。

図3

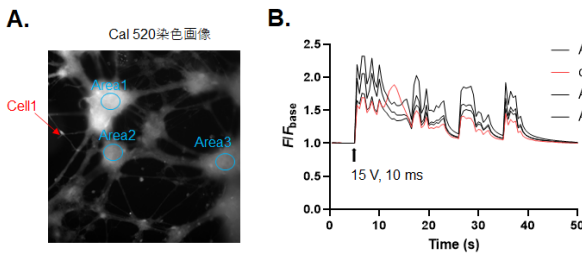


図3:ガラススペースディッシュに播種した培養神経細胞 (SKYニューロン) 細胞
 A:高密度培養では培養日数を経るにしたがって、ところどころで細胞が凝集するが、ディッシュ底面に接着している。
 Area 1~3は細胞集団であり、Cell 1はシングルセルである。
 B: カルシウム指示薬の蛍光強度の変化のトレースを重ねた。赤いトレースで10秒付近に独自のシグナルがあるが、他の部分は重なっている。
 Area 1, 2, 3は離れていてもトレースが重なっており、シナプス結合ができていることがわかる。

図4

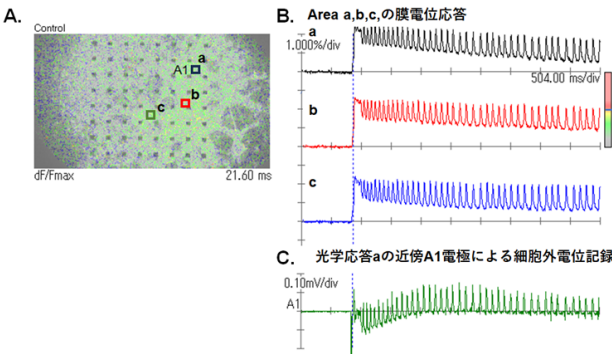


図4:MEAプローブに播種したSKYニューロン高密度培養の刺激誘発による膜電位変化と細胞外電位の同時記録 (コントロール実験)
 A:刺激から21.6 ms後の膜電位変化を疑似カラーで示した。脱分極光量変化の% (スケールバー参照) が赤くないことから、まだ膜電位変化はピークに到達しておらず、2%以下である (図6と比較)。
 B:Aに示したフレーム画像のa (黒), b (赤), c (青)の四角枠Areaの膜電位変化波形を示した。膜電位は脱分極であり、過分極応答は認められなかった。a, b, c,すべてでほぼ同じ波形を示しており、広範囲に同期した神経活動を示している。
 C:A1電極の細胞外電位記録、大きなベースラインの変動の上に、集合活動電位がみられる。同期しながらリズム周期のある群発性の活動電位が発生していることがわかる。

図5

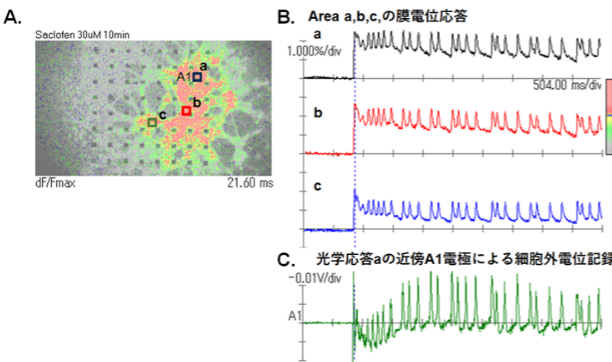


図5:MEAプローブに播種したSKYニューロン高密度培養の刺激誘発による膜電位変化と細胞外電位の同時記録 (30 μM Saclofen; GABA_A受容体阻害薬の投与後20分)
 A:刺激から21.6 ms後の膜電位変化を疑似カラーで示した。図5とは異なり、広範囲に2%以上となっていて膜電位変化はすでにピーク近くに達している。
 B: Aに示したフレーム画像のa (黒), b (赤), c (青)のAreaの膜電位変化波形を示した。これらはほぼ同じ波形を示しており、同期していることがわかる。図5と比較して、ベースライン変化の上に観察される周期的な神経活動の周期が遅くなっていることがわかる。aでは特に再分極が遅くなっていることがわかる。
 C:A1電極の細胞外電位記録、大きなベースラインの変動の上に、集合活動電位がみられる。同期しながらリズム周期のある群発性の活動電位の周期が遅くなっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kobayashi Yuki, Tomoshige Sakura, Imakado Kosuke, Sekino Yuko, Koganezawa Noriko, Shirao Tomoaki, Diniz Giovanna B., Miyamoto Tatsuo, Saito Yumiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Ciliary GPCR based transcriptome as a key regulator of cilia length control	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 744 ~ 767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fba.2021-00029	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 Kobayashi Yuki, Okada Tomoya, Miki Daisuke, Sekino Yuko, Koganezawa Noriko, Shirao Tomoaki, Diniz Giovanna B., Saito Yumiko	4. 巻 142
2. 論文標題 Properties of primary cilia in melanin-concentrating hormone receptor 1-bearing hippocampal neurons in vivo and in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104902 ~ 104902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104902	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 -
1. 著者名 Koganezawa Noriko, Sekino Yuko, Kawakami Hitomi, Fuchino Hiroyuki, Kawahara Nobuo, Shirao Tomoaki	4. 巻 53
2. 論文標題 NMDA receptor dependent and independent effects of natural compounds and crude drugs on synaptic states as revealed by drebrin imaging analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3548 ~ 3560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.15231	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 Okada Masayasu, Kawagoe Yosuke, Sato Yuta, Nozumi Motohiro, Ishikawa Yuya, Tamada Atsushi, Yamazaki Hiroyuki, Sekino Yuko, Kanemura Yonehiro, Shinmyo Yohei, Kawasaki Hiroshi, Kaneko Naoko, Sawamoto Kazunobu, Fujii Yukihiko, Igarashi Michihiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Phosphorylation of GAP-43 T172 is a molecular marker of growing axons in a wide range of mammals including primates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 66-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00755-0	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 Togo Kazuyuki, Fukusumi Hayato, Shofuda Tomoko, Ohnishi Hiroshi, Yamazaki Hiroyuki, Hayashi Mariko Kato, Kawasaki Nana, Takei Nobuyuki, Nakazawa Takanobu, Saito Yumiko, Baba Kousuke, Hashimoto Hitoshi, Sekino Yuko, Shirao Tomoaki, Mochizuki Hideki, Kanemura Yonehiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Postsynaptic structure formation of human iPS cell-derived neurons takes longer than presynaptic formation during neural differentiation in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 149-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00851-1	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 Kobayashi Yuki, Okada Tomoya, Miki Daisuke, Sekino Yuko, Koganezawa Noriko, Shirao Tomoaki, Diniz Giovanna B., Saito Yumiko	4. 巻 142
2. 論文標題 Properties of primary cilia in melanin-concentrating hormone receptor 1-bearing hippocampal neurons in vivo and in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104902 ~ 104902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2020.104902	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 Fukushima Hiroyuki, Yoshioka Miki, Kawatou Masahide, Lopez-Davila Victor, Takeda Masafumi, Kanda Yasunari, Sekino Yuko, Yoshida Yoshinori, Yamashita Jun K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Specific induction and long-term maintenance of high purity ventricular cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 241287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0241287	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 Yamazawa Toshiko, Ogawa Haruo, Murayama Takashi, Yamaguchi Maki, Oyamada Hideto, Suzuki Junji, Kurebayashi Nagomi, Kanemaru Kazunori, Oguchi Katsuji, Sakurai Takashi, Iino Masamitsu	4. 巻 152
2. 論文標題 Insights into channel modulation mechanism of RYR1 mutants using Ca ²⁺ imaging and molecular dynamics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 e201812235-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1085/jgp.201812235	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 Yamazawa T, Kobayashi T, Kurebayashi N, Konishi M, Noguchi S, Inoue T, Inoue Y U., Nishino I, Mori S, Iinuma H, Manaka N, Kagechika H, Uryash A, Adams J, Lopez J R., Liu X, Diggle C, Allen PD., Kakizawa S, Ikeda K, Lin B, Ikemi Y, Nunomura K, Nakagawa S, Sakurai T, Murayama T	4. 巻 12
2. 論文標題 A novel RyR1-selective inhibitor prevents and rescues sudden death in mouse models of malignant hyperthermia and heat stroke	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4293-
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-24644-1	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 Otomo Asako, Ono Suzuka, Sato Kai, Mitsui Shun, Shimakura Kento, Kimura Hiroshi, Hadano Shinji	4. 巻 174
2. 論文標題 High-throughput quantitative analysis of axonal transport in cultured neurons from SOD1H46R ALS mice by using a microfluidic device	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 46 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.07.005	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 Kawamura Masahito, Sekino Yuko	4. 巻 -
2. 論文標題 Adenosine A1 receptor antagonist-induced facilitation of postsynaptic AMPA currents in pyramidal neurons of the rat hippocampal CA2 area	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Purinergic Signalling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11302-022-09897-9	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 -

〔学会発表〕 計45件 (うち招待講演 28件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 S Mase, T Mitsuoka, N Koganezawa, T Shirao, Y Sekino.
2. 発表標題 Drebrin cluster analysis using cultured hippocampal neurons. 11 th International Society of Radiation Neurobiology
3. 学会等名 11 th International Society of Radiation Neurobiology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 W Lin, S Yamada, H Watanabe, Y Kawashima, Y Sekino
2. 発表標題 Neuronal and synaptic maturation in long-term cultures of human iPSC-derived neurons generated by transcription factor-based rapid differentiation
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S Mase, T Mitsuoka, N Koganezawa, H Yamazaki, Y Kato, I Tsutsui, T Shirao, H Kawabe, Y Sekino
2. 発表標題 Effects of a synthetic cannabinoid, CP55940, on synaptogenesis of cultured hippocampal neurons: imaging analysis of drebrin immunocytochemistry
3. 学会等名 第64回 日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S Mase, T Mitsuoka, N Koganezawa, H Yamazaki, Y Kato, I Tsutsui, T Shirao, H Kawabe, Y Sekino.
2. 発表標題 Upregulation of drebrin in dendritic spines and neuronal death induced by a synthetic cannabinoid, CP55940, in cultured rat hippocampal neurons.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S Mase, I Tsutsui, T Mitsuoka, N Koganezawa, H Yamazaki, Y Kato, H Kawabe, T Shirao, Y Sekino
2. 発表標題 Developmental neurotoxicity assessment of glutamate receptor binding agonists that cause learning and memory impairment: analysis of drebrin immunoreactivity in rat hippocampal cultured neuron.
3. 学会等名 第48回 日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小金澤紀子、関野祐子、白尾智明.
2. 発表標題 認知症に効く漢方薬スクリーニング：オウバクとオンジの有効可能性
3. 学会等名 第28回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Noriko Koganezawa, Hitomi Kawakami, Hiroyuki Fuchino, Yuko Sekino, Nobuo Kawahara, Tomoaki Shirao,
2. 発表標題 High-content imaging evaluation of crude drug effects on synaptic function
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Sekino
2. 発表標題 Introduction of the proposal from the addiction subcommittee, the science council of Japan, to promote understanding and overcoming addiction in Symposium "Academic trends towards understanding and overcoming addiction.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会,
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 間瀬省吾、関野祐子、白尾智明、光岡俊成
2. 発表標題 Optimization of algorithms to quantify changes in drebrin distribution induced by glutamate stimulation of cultured neurons for a confocal quantitative image cytometer
3. 学会等名 第63回 日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saotome T, Baba A, Kato E, Joko S, Shimada N, Matsuzaki Y, Endo T, Ikegaya Y, Sekino Y, Sawada K
2. 発表標題 In Vitro Cardiac Safety Evaluation for Repurposed COVID-19 Drugs by Using Human iPS Cell-Derived-Cardiomyocyte with Gelatin Fiber Scaffold
3. 学会等名 Safety Pharmacology Society Virtual Meeting
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関野祐子
2. 発表標題 国際ルール組成におけるインサイドアウト in 新規医療評価技術の普及に向けたルール・オブ・ルールの考え方
3. 学会等名 第17回DIA日本年会2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光岡俊成, 間瀬省吾, 小金澤紀子, 加藤祐一, 白尾智明, 関野祐子
2. 発表標題 Assessment of CB agonist CP55940 in maturity for rat hippocampal neurons using a high-throughput immunocytochemical assay and image digital analysis
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山澤徳志子
2. 発表標題 分子動力学計算と生理実験によるリアノジン受容体のカルシウム放出機構の解析
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshiko Yamazawa
2. 発表標題 Therapeutic effects of novel type1 ryanodine receptor inhibitor on malignant hyperthermia
3. 学会等名 Calcium signaling and excitation-contraction coupling in cardiac, skeletal and smooth muscle; Journal of General Physiology (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山澤徳志子
2. 発表標題 新規1型リアノジン受容体阻害薬の筋疾患に対する治療効果
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山澤徳志子
2. 発表標題 Dysfunctional muscle thermal signaling
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山澤徳志子
2. 発表標題 骨格筋における熱によるカルシウム放出
3. 学会等名 JPW2022 第96回日本薬理学会年会/第43回日本臨床薬理学会学術総会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山澤徳志子
2. 発表標題 Functional analysis of type 1 ryanodine receptor in skeletal muscle using a novel animal model
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 堀内新一郎，幸田奈々重，山崎大樹
2. 発表標題 安全性薬理試験に向けた三次元組織化された2種類のヒトiPS細胞由来心筋細胞における収縮特性の比較．
3. 学会等名 日本安全性薬理研究会第14回学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎大樹
2. 発表標題 ヒトiPS心筋細胞から作製した三次元心筋組織による収縮評価系の構築
3. 学会等名 第28回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎大樹
2. 発表標題 人工心臓による収縮評価法の開発
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木郁郎
2. 発表標題 次世代ICTと未来医療を支える神経科学・神経工学・脳型コンピューティング
3. 学会等名 第83回応用物理学会 in vitro神経活動に基づいた医薬品評価,シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木郁郎
2. 発表標題 ヒトiPS神経のMEA計測による化合物の毒性リスク予測
3. 学会等名 情報計算化学生物学会(CBI学会) 2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木郁郎
2. 発表標題 発達神経毒性の現状と今後の課題
3. 学会等名 第35回日本動物実験代替法学会 in vitro 神経活動に基づいた化学物質の神経毒性評価,シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 医工連携で構築するマイクロ流体デバイス技術を活用した臓器モデル
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Microphysiological System (MPS) Based on Microfluidic Technology for Safety
3. 学会等名 第3回PSTC Japan Safety Biomarker Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 マイクロ・ナノ工学が切り開く医療・創薬の未来：ヒト生体模倣システムの実用化
3. 学会等名 第10回JMACシンポジウム, web開催 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 Microphysiological system の創薬研究での実用化に向けた取り組み, 新適塾「未来創薬への誘い」
3. 学会等名 千里ライフサイエンス振興財団, web開催 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 マイクロ・ナノ工学を技術基盤とする臓器チップと毒性評価試験への応用
3. 学会等名 東海大学総合医学研究所 / マイクロ・ナノ研究開発センター共同開催 第18回研修会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 Microphysiological system (MPS)の実用化に向けた取り組み
3. 学会等名 JPW2022 第96回日本薬理学会年会/第43回日本臨床薬理学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Microphysiological System (MPS) Platforms with High Operability for Commercialization
3. 学会等名 4th International Symposium on BA/BE of Oral Drug Products, 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 マイクロ流体デバイス技術を活用したMPSとその実用化に向けた取り組み
3. 学会等名 第39回医用高分子研究会講座 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Microphysiological System (MPS) Based on Microfluidic Technology for Pharmaceutical Science
3. 学会等名 APSTJ Global Education Seminar 2022-1st, web開催 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Microphysiological Systems (MPS) Based-on Microfluidic Devices for Commercialization
3. 学会等名 IEEE-NEMS 2022, web開催 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 マイクロ流体デバイス技術を基盤とする生体模倣システム (MPS) の実用化検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会, web開催 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスと生物を融合させたMicrophysiological Systemの創成
3. 学会等名 電気化学会第89回大会, web開催 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを技術基盤とするMicrophysiological Systemの実用化に向けた検討
3. 学会等名 日本薬物動態学会第14回ショートコース, web開催 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Microphysiological systems based on microfluidics for cell-based assays
3. 学会等名 ISUPEN2021, web開催(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを基盤とする培養システムとイメージング技術との融合
3. 学会等名 第9回 Chem-Bio Joint Seminar 2021, web開催(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 Microphysiological system (MPS) の基礎から最新研究動向
3. 学会等名 情報機構(株), web開催(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 創薬応用に向けたMicrophysiological Systems
3. 学会等名 令和2年度AMED 再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発 交流会2日目, web開催(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Microphysiological systems based on microfluidics for cell-based assays
3. 学会等名 2020 IEEE NANOMED, web開催(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村啓志, 大友麻子
2. 発表標題 Organ-on-a-chipの概要とALS疾患モデルへの応用
3. 学会等名 第16回総合医学研究所研修会, 東海大学伊勢原校舎「松前記念講堂 1階」&Web(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 医薬理工連携によって創成されるOrgan-on-a-chip
3. 学会等名 第29回日本コンピュータ外科学会(日本医ものづくりコモンズ), web開催(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村啓志
2. 発表標題 機能集積型Organ-on-a-chipの研究事例
3. 学会等名 創剤研究コンソーシアム2020年度第1回研究会, web開催(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞培養基材、細胞培養用樹脂薄膜、および細胞培養方法	発明者 木村啓志、福田篤、 岡村陽介、喜多理王、 大友麻子、張宏	権利者 学校法人東海大 学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-206366	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	山澤 徳志子 (Yamazawa Toshiko) (00282616)	東京慈恵会医科大学・医学部・准教授 (32651)	
研究分担者	山崎 大樹 (Yamazaki Daiju) (40467428)	国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長 (82601)	
研究分担者	木村 啓志 (Kimura Hiroshi) (40533625)	東海大学・マイクロ・ナノ研究開発センター・教授 (32644)	
研究分担者	鈴木 郁郎 (Suzuki Ikurou) (90516311)	東北工業大学・大学院工学研究科・教授 (31303)	

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