

令和元年6月21日現在

機関番号：31303

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K20111

研究課題名(和文)睡眠覚醒リズムを惹起したヒトiPS細胞由来中枢神経ネットワークの薬効評価系の構築

研究課題名(英文)Development of drug evaluation system in cultured human iPSC derived neuronal network which evoked sleep-awake rhythm

研究代表者

鈴木 郁郎 (SUZUKI, IKURO)

東北工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90516311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞由来ドーパミンニューロンへの24時間周期のセロトニン投与で、同期バースト発火頻度が24時間周期で変動する自発活動リズムを惹起できることがわかった。ヒトiPS細胞由来グルタミン酸ニューロン(GABAニューロンも含む)への1Hzの電気刺激(LFS)で、電気刺激後にネットワークの結合強度が減衰するLTD様の現象が誘発されることがわかった。Neuromodulatorや電気刺激によって、ヒトiPS細胞由来ニューロンに睡眠・覚醒状態を惹起させる方法は、睡眠中の徐波のメカニズム研究や生体現象を模倣した睡眠覚醒状態依存的なin vitro薬効評価に応用できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Neuromodulatorや電気刺激によって、ヒトiPS細胞由来ニューロンに睡眠・覚醒状態を惹起させる本研究成果は、睡眠中の徐波のメカニズム研究や生体現象を模倣した睡眠覚醒状態依存的なin vitro薬効評価に応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The cross-regional neurons in the brainstem, hypothalamus, and thalamus regulate the central nervous system, including the cerebral cortex, in a sleep-wake cycle-dependent manner. A characteristic brain wave, called slow wave, of about 1 Hz is observed during non-REM sleep, and the sleep homeostasis hypothesis proposes that the synaptic connection of a neural network is weakened during sleep. In the present study, we found that sleep-wake states can be mimicked by cyclic neuromodulator administration and show that LTD-like phenomena can be induced by 1 Hz low-frequency stimulation (LFS) in in vitro human iPSC-derived neurons. These results could be applied in studies on the mechanism of slow waves during sleep or in an in vitro drug efficacy evaluation depending on sleep-wake state.

研究分野：iPS細胞の非臨床創薬応用

キーワード：iPS 睡眠 覚醒 アミン・コリン 徐波 LTD 睡眠恒常性仮説 MEA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト **iPS** 細胞由来ニューロンを用いた創薬開発への応用が期待されているが、ヒト **iPS** 細胞由来ニューロンは培養細胞であり、必ずしも生体脳現象を再現しているとは言えない。この問題の解決策として、近年では、**Organoid** に代表される「3次元の組織構造」を **in vitro** で再現する技術開発により、より生体に近い評価モデルを構築しようとする研究が着目されている。構造と機能は切り離せない関係にあるが、生体現象を2次元培養下で一部再現することができれば、必ずしも3次元構造を再現する必要は無く、細胞へのアプローチが厳密にできる2次元培養の利点を生かして、生体を模倣した精度の高い薬効評価が可能となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、構造の再現から始めるのではなく、生体脳で見られる『電気生理学的現象』を再現することに重きを置き、「液性因子刺激」および「電気刺激」を用いて、生体概日リズムを電気生理学的に惹起したヒト **iPS** 細胞由来神経ネットワークの構築を目的とした。生体脳の中核である大脳皮質では、睡眠・覚醒状態に依存して特徴的な電気活動が現れる。大脳皮質内のアミンやコリン濃度が睡眠・覚醒リズム毎に変動することにより電気活動状態が規定されており、ノンレム睡眠時には「徐波」と呼ばれる **1Hz** 程度の周期的な電気活動が見られる。睡眠恒常性仮説では、ノンレム睡眠中に観察される特徴的な脳波である徐波がニューラルネットワークのシナプス結合を弱めることが示唆されている。そこで、本研究は、**in vitro** ヒト **iPS** 細胞由来ドーパミンニューロンを用いて睡眠・覚醒リズムで変動する各種アミン・コリンに対する応答性を調べ、液性因子刺激によって睡眠・覚醒リズムが惹起できるか、および大脳皮質ネットワークを用いて、徐波を模倣した **1Hz** の電気刺激によって **LTD** 様の現象が見られるのかを調べた。

3. 研究の方法

3-1 細胞培養

ヒト **iPS** 細胞由来 **Dopaminergic neuron (iCell DopaNeurons, DNC-301-030-001 ; Cellular Dynamics International)** おとび **Glutamatergic neuron(iCell GlutaNeurons, R1061 ; Cellular Dynamics International)** を **4well MEA Plate(MED-P5NF30 ; Alpha Med Scientific Inc.)** 及び **24well Plate (MED-Q2430M, Alpha Med Scientific Inc.)** に播種した。**MEA** 計測は **MED64-Allegro(Alpha Med Scientific Inc.)** 及び **MED64 Presto(Alpha Med Scientific Inc.)**、**Maestro Edge(Axion BioSystems)** を用いた。いずれのサンプルも計測中は **37**、**CO₂ 5%** 存在下で行った。計測データは **Mobius software (Alpha Med Scientific)**、**MEA Symphony (Alpha Med Scientific)**、**AxIS software(Axion BioSystems)** 及び **MATLAB** を用いてデータの解析を行った。

3-2 神経伝達物質の濃度依存性特性

DA neuron の睡眠-覚醒リズムに関与する神経伝達物質に対する濃度依存性を評価する為に、培養 **11** 週から **14** 週に **5-Hydroxytryptamine Hydrochloride (Serotonin, 321-42341, Wako)**、**Acetylcholine Chloride(Acetylcholine, 011-00592, Wako)**、**Histamine(084-00643, Wako)**、**DL-Norepinephrine hydrochloride crystalline (Noradrenaline, A7256-1G, sigma)**、**Orexin A(Orexin, 159.03161, Wako)** をそれぞれ **0.1 nM** から **1000 nM** まで累積投与し、投与前後 **15** 分間の自発活動計測を行った。

3-3 Serotonin による覚醒様状態の惹起

ヒト **iPS** 細胞由来神経ネットワークに睡眠-覚醒リズムを惹起させるために、培養 **6** 週目の **DA neuron** に **serotonin** の長期暴露試験を行った。培地のみと **100 nM** の **serotonin** を加えた培地の **2** つの条件を **12** 時間周期で **3** 回ずつ交互に繰り返し、合計 **72** 時間の自発活動の計測を行い、**2** つの条件での発火数と **SBF** 数を比較した。

3-4 徐波刺激による睡眠様状態の惹起

ノンレム睡眠時に見られる徐波を模倣した電気刺激をヒト **iPS** 細胞由来神経ネットワークに入力することで睡眠様の状態を惹起できるか検討した。培養 **10** 週目の **Gluta neuron** ネットワークに徐波刺激を入力し、刺激前後の神経ネットワーク活動の変化を調べた。電気刺激は、 $\pm 20 \mu\text{A}$ 、最大電圧 $\pm 1.2 \text{ V}$ 、duration が **0.2 ms** の矩形波を **1 Hz** を全電極(**16 ch/well**)に印加した。

4. 研究成果

4-1 神経伝達物質投与による神経ネットワーク活動の増強

培養した **DA neuronal network** へ睡眠-覚醒リズム形成に関与することが知られている **5** 種類の神経伝達物質(**Serotonin, Acetylcholine, Histamine, Noradrenaline, Orexine**) を累積投与し、同期バースト発火数 (**SBF** 数) の容量依存性を調べた (**n=4**)。最も **SBF** 数が増加した **Serotonin** 投与時の神経ネットワーク活動のヒストグラムを **Figure 1A** に示す。**Serotonin** 投与では、**100 nM** 時に **SBF** が **243 ± 29.7%** に顕著に増加した (**p=0.001**,

Figure 1B(a). Acetylcholine では、1000 nM 投与で $142 \pm 8.94\%$ に増加した ($p=0.0001$, **Figure 1B(b).** Histamine では、100 nM 投与時に $118 \pm 3.71\%$ に増加した ($p=0.00218$, **Figure 1B(c).** Noradrenaline 投与では、100 nM 投与時には $134 \pm 6.22\%$ に顕著に増加した ($p=0.001$, **Figure 1B(d).** Orexin では、10 nM 投与時に $183 \pm 16.9\%$ ($p=0.001$, **Figure 1B(e)**) に顕著に増加した。以上から、本研究で培養したヒト iPS 細胞由来神経ネットワークには各神経伝達物質の受容体が存在しており、神経伝達物質の濃度が上昇するとネットワークの同期活動が増強することがわかった。

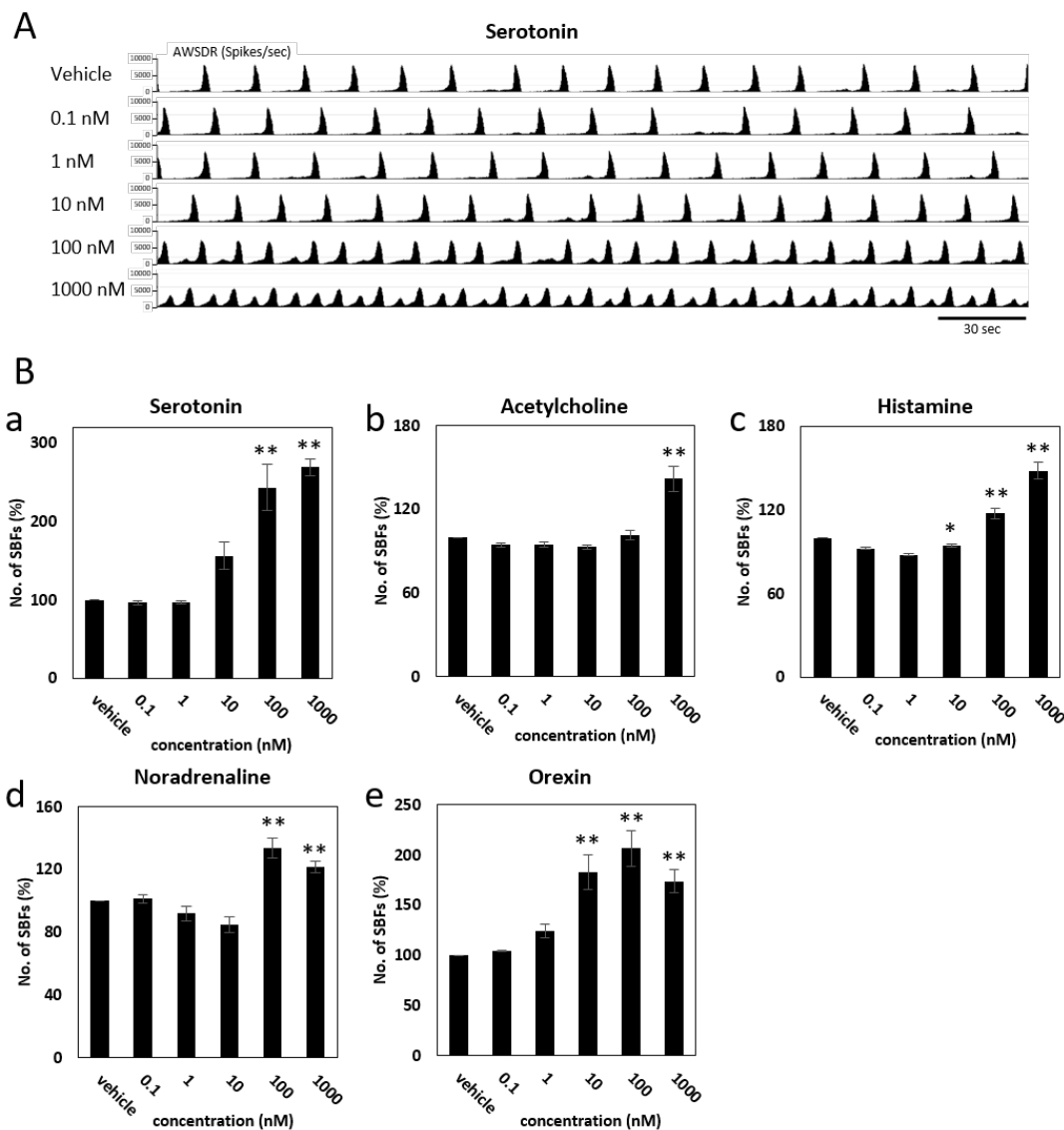


Figure 1. ドーパミン作動性ニューロンへの神経伝達物質投与
(A) Serotonin 前後の5分間の発火数のヒストグラム。Scale bars=30 sec.
(B) 神経伝達物質投与前後15分間の synchronized burst fringes (SBFs) の数 ($n=4$). Vehicle を100%とした。(one way ANOVA 及び Dunnett's test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. Vehicle).
(a) Serotonin. (b) Acetylcholine. (c) Histamine. (d) Noradrenaline. (e) Orexin.

4-2 神経伝達物質の周期的投与による覚醒様リズムの惹起

神経伝達物質が生体脳と同様にヒト iPS 細胞由来神経ネットワーク活動を増強する現象を用いて、培養神経ネットワークに覚醒様状態のリズム形成を試みた。**Figure 2A** のように、培地のみと 100 nM の serotonin を加えた培地の2つの条件を12時間周期で3回ずつ交互に繰り返し、合計72時間の自発活動の計測を行い、2つの条件での発火数と SBF 数を比較した。発火数、SBF 数は1時間ごとに算出し、最初のセロトニン投与直前の1時間を100%として serotonin 投与時と比較した(one way ANOVA、及び Dunnett 検定、**Figure 3B, black : Medium, red : Medium + Serotonin**)。発火数は、2つの条件で顕著な差が見られなかった(**Figure 2B(a)**, $p > 0.05$, $n = 3$)。しかしながら、Serotonin 投与後5時間は SBF 数が顕著に増加し(**Figure 2B(b)**, $p < 0.05$, $n = 3$)、時間ともに減少する現象がみられた。このような SBF 数の24時間周期の増減のリズムが serotonin 投与によって繰り返しみられた。以上から、serotonin の投与により神経ネットワークに覚醒状態を模倣

する 24 時間周期のリズムを形成できることが示唆された。

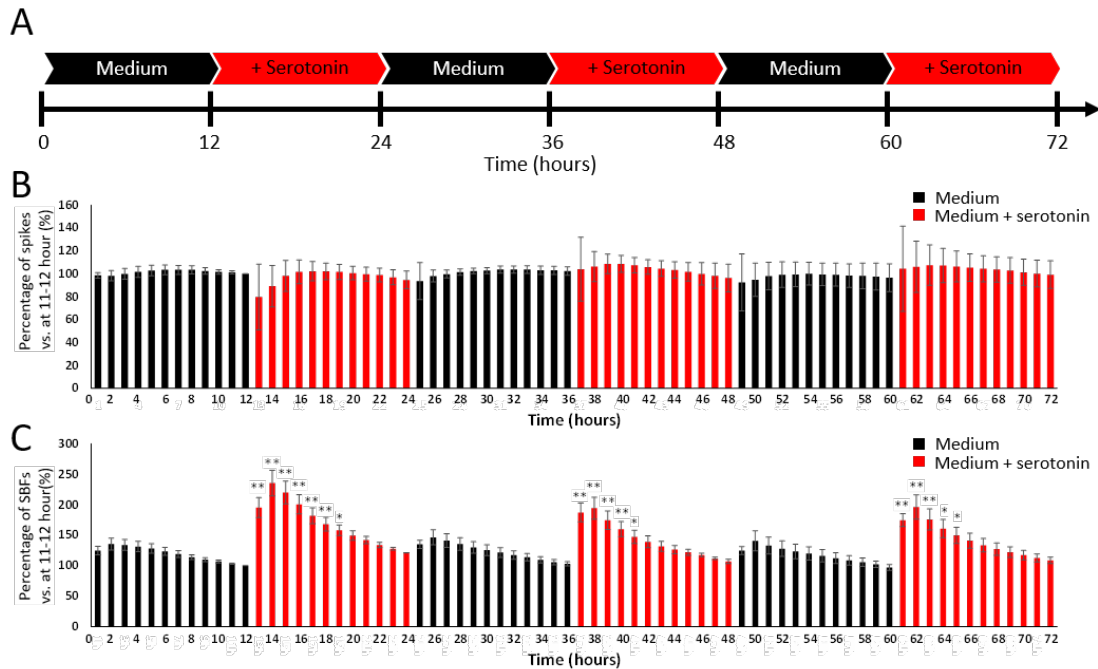


Figure 2. Serotonin による覚醒様状態の惹起

(A) 実験概念図。

(B) 発火数の経時変化(n=3)。

(C) SBFs の経時変化(n=3, one way ANOVA 及び Dunnett's test, * p<0.05, ** p<0.01 vs. 11-12 hour).Medium(black), Medium + serotonin(red).一回目の serotonin 投与直前の1時間(11-12 hour)を 100%とした。

4-3 睡眠時の徐波を模倣した Low frequency stimulation による自発活動変化

睡眠時に脳波でみられる徐波を模倣した 1 Hz の電気刺激を外部から入力することで、培養したヒト神経ネットワークに睡眠状態が惹起できるか検証した。まず、電気刺激入力前に 3 時間の自発活動計測を行った(blue : Before)。その後、90 分を 1 セットとした刺激セットを 4 回入力した(red : Stim1-4)。90 分の刺激セットの最初の 15 分間は 1 Hz の電気刺激が入力され、残りの 75 分は自発活動計測を行った。刺激セットを 4 回行った後、3 時間の自発計測を行った(green : After)。まず、培養したヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの 1Hz 電気刺激に対する誘発応答を観察した(Figure 3A(b))。神経ネットワークは 1 Hz の電気刺激に追従する形で誘発応答を示すことが確認された。4 回目の電気刺激においても電気刺激に対して追従した誘発応答が確認された。次に、電気刺激前後の発火数と SBF 数の比較を行った。計測した活動データの電気刺激入力中の 15 分間のデータを除去し、刺激前後の自発活動データを 15 分ごとに解析した。15 分間の総発火数の変動を Figure 3B(a)に示す(n = 8)。総発火数は、刺激前の 165-180 分のデータを 100%として算出し、赤は電気刺激直後の 15 分間のデータを示している。赤で示した電気刺激直後の 15 分間の発火数は、stim 1 の直後から順に、 $85.7 \pm 2.74\%$ (195-210 min)、 $82.1 \pm 2.06\%$ (285-300 min)、 $80.3 \pm 2.52\%$ (375-390 min)、 $78.4 \pm 2.77\%$ (465-480 min)に減少した(p<0.01, one way ANOVA 及び Dunnett 検定)。また、stim 4 の電気刺激後 4 時間(After, 690-705 min)で刺激直前(Before, 165-180 min)の状態まで回復した($93.3 \pm 3.23\%$, p = 0.0756, t test)。次に、15 分間の SBF 数の変動を Figure 3B(b)に示す。総発火数と同様に刺激前の 165-180 分のデータを 100%として算出し、赤は電気刺激直後の 15 分間のデータを示している。赤で示した電気刺激直後 15 分の SBF 数は、stim 1 の直後から順に、 $84.5 \pm 5.05\%$ (195-210 min)、 $81.6 \pm 4.86\%$ (285-300 min)、 $80.1 \pm 4.81\%$ (375-390 min)、 $78.5 \pm 3.47\%$ (465-480 min)に減少した(p<0.05, one way ANOVA 及び Dunnett 検定)。また、stim 4 の電気刺激後 30 分(After, 480-495 min)で刺激前の状態(Before, 165-180 min)に回復した($101 \pm 4.37\%$, p = 0.899, t test)。以上から、睡眠時の徐波を模倣した Low frequency stimulation (LFS)に、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークが追従して誘発応答を示すことがわかった。また、15 分間の LFS により、自発活動頻度が減少し、時間と共に回復する現象を繰り返し再現することに成功した。

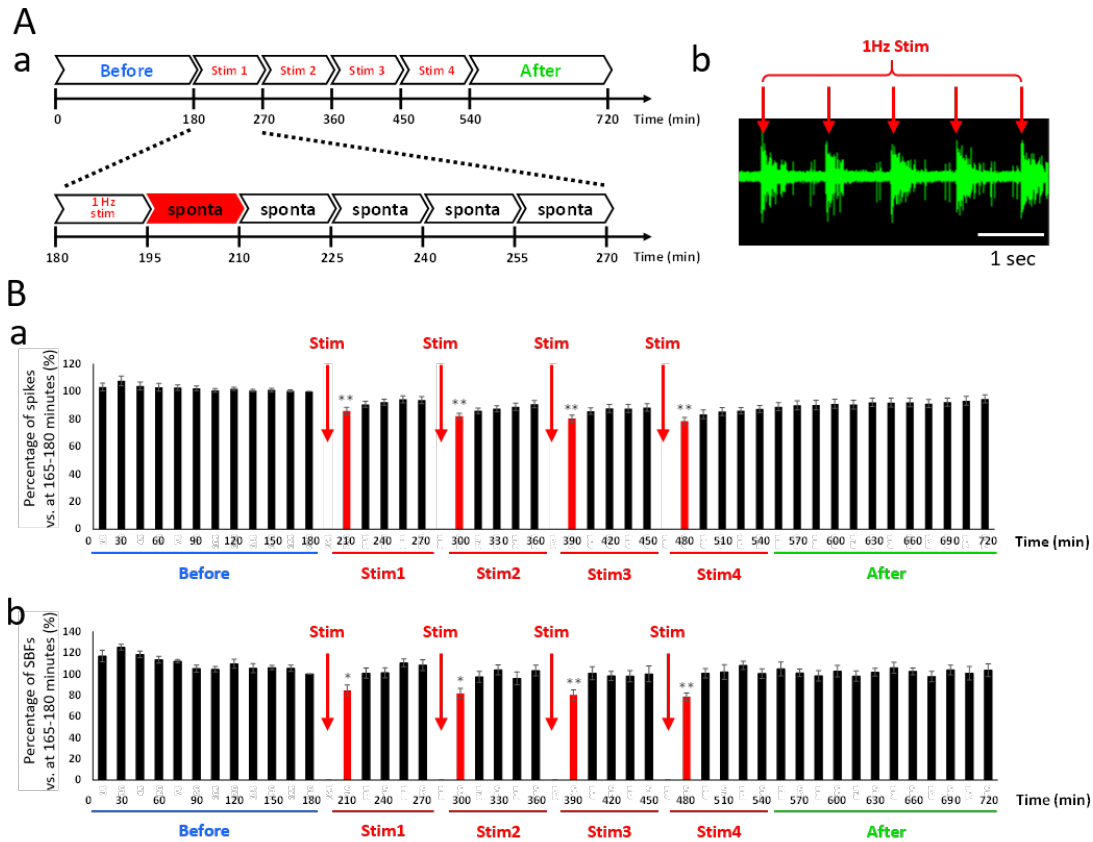


Figure 3. 徐波刺激による睡眠状態の惹起

(A) 実験概要。90周期で1 Hzの電気刺激を入力した。

(a) 実験概念図。(b) 電気刺激に対する神経ネットワークの誘発応答の典型例。

(B) 徐波刺激に対する神経ネットワークの応答(n=8)。一回目の電気刺激の直前の15分間(165-180 minutes)を100%とした。(a) スパイク数の経時変化。(b) バースト発火の経時変化。(one way ANOVA 及び Dunnett's test, * p<0.05, ** p<0.01 vs. 165-180 minutes).

4-4 LFS によるネットワーク結合強度の減少

LFS による細胞間のシナプス結合強度の変化を2つの電極間の電気活動の同期性で評価した。Z スコアを用いた解析により、刺激前の結合強度が強いシナプス連絡ほど、刺激後に弱まることが分かった。ノンレム睡眠時にみられる徐波を模倣したLFSは神経ネットワーク内の結合強度を弱める、つまり、ネットワークの興奮性を弱める傾向が認められた。本結果は、培養ヒトiPS細胞由来ニューロンにおいてもLFSによってLTD様の現象が誘発されたことを示している。

睡眠・覚醒時に関与するNeuromodulator刺激や1 Hzの電気刺激によって、ヒトiPS細胞由来ニューロンに睡眠・覚醒状態を惹起させる方法は、睡眠中の徐波のメカニズム研究や睡眠覚醒状態依存的なin vitro薬効評価に応用できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Remi Yokoi, Miho Okabe, Naoki Matsuda, Aoi Odawara, Akihiro Karashima, Ikuro Suzuki, Impact of sleep-wake-associated neuromodulators and repetitive low-frequency stimulation on human iPS-derived neurons, Front. Neurosci. 13:554. 1-15, 2019

〔学会発表〕(計 2件)

横井れみ, 松田直毅, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, in vitroヒトiPS細胞由来神経ネットワークへ睡眠・覚醒リズムを惹起させる為の基礎検討, 第18回日本再生医療学会, 2019, 兵庫
横井れみ, 松田直毅, 辛島彰洋, 鈴木郁郎, 神経伝達物質および電気刺激は培養ヒトiPS細胞由来神経ネットワークに睡眠・覚醒様リズムを惹起する, 日本安全性薬理研究会 第10回学術年会, 2019, 東京

〔図書〕(計 1件)

鈴木郁郎, シーエムシー・リサーチ, “ヒトiPS細胞由来神経細胞の機能評価と創薬応用”, 創

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：辛島 彰洋

ローマ字氏名：**Akihiro Karashima**

所属研究機関名：東北工業大学

部局名：大学院工学研究科

職名：准教授

研究者番号（**8**桁）：**90516311**

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。