

## ヒト iPS 細胞由来大脳皮質ニューロンの機能的成熟化に要する培養日数の同定

## Identification of the culture days with human iPSC-derived cortical neurons functionally matured

○ 小田原 あおい (東北大学 大学院医工学研究科, 東北工業大学, 日本学術振興会)

松田 直毅, 鈴木 郁郎 (東北工業大学 大学院工学研究科)

Aoi ODAWARA, Tohoku University, Tohoku Institute of Technology, JSPS Research Fellow

Naoki MATSUDA, Ikuro SUZUKI, Tohoku Institute of Technology

**Abstract:** The functional network of human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons is a potentially powerful in vitro model for evaluating disease mechanisms and drug responses. However, the culture time required for the full functional maturation of individual neurons and networks is uncertain. We investigated the development of spontaneous electrophysiological activity and pharmacological responses for over 1 year in culture using multi-electrode arrays (MEAs). The complete maturation of spontaneous firing, evoked responses, and modulation of activity by glutamatergic and GABAergic receptor antagonists/agonists required 20–30 weeks. At this stage, neural networks also demonstrated epileptic form synchronized burst firing (SBF) in response to pro-convulsants and SBF suppression using clinical anti-epilepsy drugs. Our results reveal the feasibility of long-term MEA measurements from hiPSC-derived neuronal networks in vitro for mechanistic analyses and drug screening. However, developmental changes in electrophysiological and pharmacological properties indicate the necessity for the international standardization of culture and evaluation procedures.

**Key Words:** hiPSC-derived cortical neuron, Planner multi-electrode array, Pharmacological response, Epilepsy

## 1. はじめに

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能評価は、神経疾患メカニズムの解明や薬効評価において重要であるが、培養したヒト iPS 細胞由来ニューロンが未成熟であること、および機能に着目した評価系が未確立である点が課題である。我々は、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを成熟化させるためのアストロサイト共培養法と培養神経ネットワークの電気活動を長期間、常時モニタリング可能な平面微小電極アレイ法を用いてヒト iPS 細胞由来ニューロンからの電気活動の取得に成功してきた。本研究では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンとアストロサイトを共培養し、長時間にわたる自発活動の特性を調べ、培養時期と成熟化の関係性を見出すことを目的に研究を行った。

## 2. 方法

## 2.1 細胞培養

ヒト iPS 細胞由来大脳皮質ニューロンは Axol Bioscience 社(英)の hCCNs (Human Cerebral Cortical Neuron)を使用した。細胞密度  $1.0 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> となるようヒト iPS 細胞由来ニューロンを播種後、 $1.0 \times 10^3$  cells のアストロサイトを追加し共培養系を構築した。

## 2.2 平面微小電極アレイによる長期活動計測

ヒト iPS 細胞由来大脳皮質ニューロンの機能的成熟化を評価するために、神経ネットワークの電気活動を非侵襲・長期間計測可能な平面微小電極アレイ (Alpha MED Scientific) を用いた。電気活動の取得は、サンプリングレート 20kHz で自発活動計測および電気刺激誘発応答計測を行った。電気刺激は、特定の電極に  $\pm 20 \mu$  A、0.1ms の双極性パルスを 0.2Hz で与えた。得られた波形データの解析は、Mobius software (Alpha MED Scientific) を用いた。スパイクの検出はノイズの平均 (Ave.) と標準偏差 (S.D) を算出し、 $Ave. \pm 5 \times S.D$  を閾値とし、閾値を超えた波形をスパイクとして検出した。

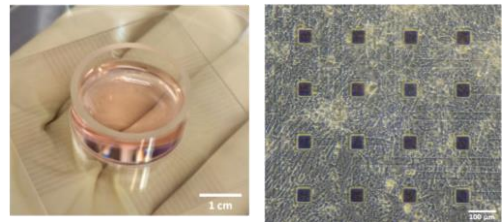


Fig.1 hiPSC-derived cortical neurons cultured on an MEA chip (a) Overview of a MEA. (b) Phase contrast image of hiPSC-derived neurons on a MEA chip at 294 DIV.

## 2.3 薬理応答試験

ヒト iPS 細胞由来ニューロンのシナプス機能の成熟化の評価および平面微小電極アレイを用いた薬効評価の有効性を調べるために、シナプス関連薬剤を用いた薬剤応答の検出を行った。興奮性シナプスの作用薬には、NMDA 型受容体のアンタゴニストである D-AP5、AMPA 型受容体のアンタゴニストである CNQX (6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)、Kainate 型受容体のアゴニストである Kainic acid を用い、抑制性シナプスの作用薬には、GABA-A 受容体のアンタゴニストである Bicuculline を用いた。

ヒト脳神経疾患現象の誘発とそれに対する薬剤応答の検出を目的とし、てんかん現象の誘発と抗てんかん薬作用の検出を試みた。てんかん発作を引き起こす薬剤として知られている PTZ と抗てんかん薬である Phenytoin と VPA を用いた。

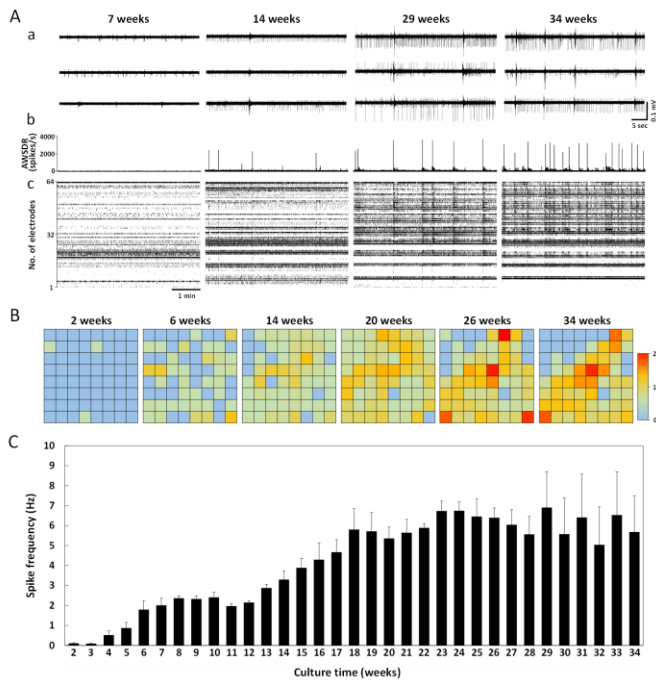
## 3. 結果

## 3.1 長期培養における自発活動の特性評価

Fig.2 は培養 34 week までの自発活動の周波数に着目して解析を行った結果である (n=3 dishes)。培養日数の増加とともに発火頻度が増加し、培養 20-30 週目まで顕著な増加を示していた。神経ネットワークがシナプス伝播により同時期に活動する同期バースト発火に着目して解析したとこ

ろ、培養 10 週目以降で見られ、その後培養 20 週目にかけて増加していた。同期バースト発火は、in vivo でも見られる現象であり、機能的成熟化の指標の 1 つとなりうる。このような同期バースト発火は Rat の神経細胞を用いた場合は培養 1 週間ほどで観察されるが、培養 10 週目以降で初

また、33-36 週目の自発活動の同期バースト発火および電気刺激誘発応答において、AMPA 受容体および NMDA 受容体が共に働いていることがわかった。



めて見られたことから、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能的な成熟化には時間を有することがわかった。

Fig.2 Development of spontaneous firings during long-term culture

(A) Changes in spontaneous firing pattern in the same long-term culture at 7, 14, 29, and 34 weeks in vitro (WIV). (a) Typical spontaneous firing patterns. (b) Rasters of the array-wide spike detection rate (AWSDR, spikes/s). Bin size is 1 ms. (c) Corresponding raster plots for all 64 electrodes over 5 min. (B) Electrode grids colored-coded to indicate mean spontaneous firing frequency from same culture at 2, 6, 14, 20, 26, and 34 WIV. Red indicates electrodes with higher firing frequencies. Scale bar in Hz (maximum: 28 Hz). (C) Time course of the average firing frequency per channel from 2 to 34 WIV. Firing frequency ( $\pm$  standard deviation) was calculated as the average of all 64 electrodes from each of the three MEA dishes.

### 3-2 シナプス関連薬剤を用いた薬剤応答の検出

興奮性・抑制性シナプスが機能しているかを確認するために、シナプス関連薬剤を用いた薬剤応答の検出を行った。興奮性シナプスの作用薬には、AP5、CNQX、Kainic acid (KA) を用い、抑制性シナプスの作用薬には、Bicuculline (BIC) を用いた。BIC および KA 投与では、発火頻度が上昇し、AP5 および CNQX 投与では発火頻度が顕著に減少した。同様の実験を培養 10-15 週目および培養 33-36 週目で行ったところ、33-36 週目の方が 10-15 週目に比べて顕著な薬剤投与による変化が見られた (Fig.2A, B)。BIC および KA 共に培養 10-15 週目と 33-36 週目で発火頻度の上昇率に有意差は無かったが、AP5 および CNQX 投与においては、33-36 週目の発火頻度は 10-15 週目に比べ有意に減少していた。また、33-36 週目の電気刺激実験により、10-15 週目では見られなかった AMPA 受容体の応答と NMDA 受容体の応答が明確に区分された。これらのことから、NMDA 受容体、AMPA 受容体の機能を評価する為には、20-30 週以上の培養期間が必要であることが示唆された。

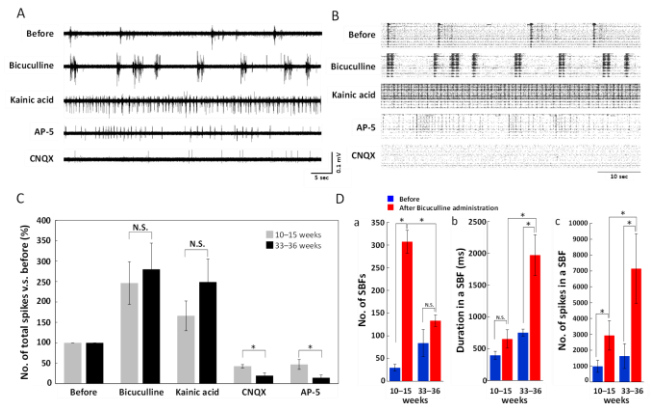


Fig.3 Pharmacological properties of spontaneous firing activity (A) Typical spontaneous firing at the same electrode in 33-36 WIV cultures before (top) and after administration of the indicated neurotransmitter receptor antagonist or agonists (10  $\mu$ M bicuculline, 5  $\mu$ M kainic acid, 50  $\mu$ M AP-5, 50  $\mu$ M CNQX). (B) Raster plots of spontaneous firing for 1 min from all 64 electrodes before and after drug administration. (C) Total number of spikes from all 64 electrodes before (100%, baseline) and after drug administration at 10-15 and 33-36 WIV. Comparisons between 10-15 (gray) and 33-36 WIV (black) were obtained using the same cultures. Although absolute numbers of spikes at 10-15 and 33-36 WIV were different, the proportional changes did not differ between ages for bicuculline and kainic acid. In contrast, the decrease in total spikes induced by CNQX and NMDA administration differed by WIV, with greater proportional effects of both agents at 33-36 WIV. ( $n = 3$  MEA dishes,  $*p < 0.05$ ). (D) Changes in synchronized burst firing (SBF) due to bicuculline administration at 10-15 and 33-36 WIV. ( $n = 3$  MEA dishes,  $*p < 0.05$ ). (a) Number of SBFs over the 30 min before (blue) and after (red) bicuculline administration at 10-15 and 33-36 WIV. (b) SBF duration and (c) number of spikes per SBF at 10-15 and 33-36 WIV before and after bicuculline administration,  $*p < 0.05$ ).

### 3-3 てんかん現象の誘発および抗てんかん薬の効果

ヒト脳神経疾患現象の誘発とそれに対する薬剤応答の検出を目的とし、てんかん現象の誘発と抗てんかん薬作用の検出を試みた。てんかん発作を引き起こす薬剤として知られている PTZ と抗てんかん薬である Phenytoin と VPA を用いた。Fig.3A は PTZ 1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、100  $\mu$ M、1mM を投与後、Phenytoin を 1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、100  $\mu$ M の順に投与した結果であり、Fig.3B は PTZ 投与後、VPA 1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、100  $\mu$ M、1mM の順に投与した時のそれぞれ 5 分間の自発活動をラスタ表示したものである。PTZ 100  $\mu$ M および 1mM 投与時に高頻度で同期バースト発火を起こすてんかん現象の誘発が観察された。その後の Phenytoin 10  $\mu$ M 投与で同期バースト発火の頻度および発火数は投与前と同等となり、Phenytoin 100  $\mu$ M においては投与前よりも自発活動の頻度が減少した。VPA 投与においても同様に抗てんかん薬の作用が観察された。これらの結果より、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いたてんかん現象の誘発と抗てんかん薬の効果平面微小電極アレイ計測法で検出できることがわかった。

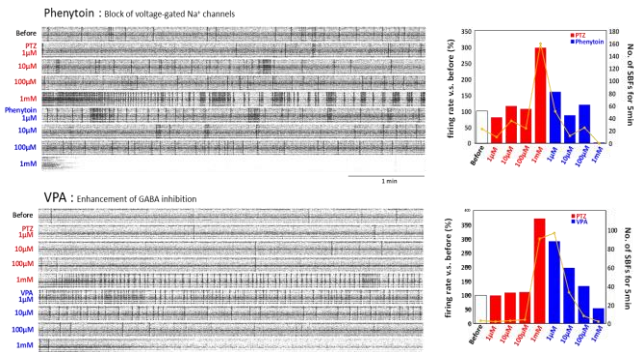


Fig.4 Induction of epileptiform activity and anticonvulsant effects of anti-epilepsy drugs (AEDs).

(A) Induction of epileptiform activity using pentylentetrazole (PTZ) and the suppressive effect of phenytoin. PTZ was added at increasing concentrations (1 μM, 10 μM, 100 μM, and 1 mM). Phenytoin was then added (1 μM, 10 μM, 100 μM, and 1 mM). (a) The raster plots at WIV (89 DIV). (b) Changes in firing rate versus before (%) and number of SBFs (Yellow). (B) Effect of sodium valproate (VPA) (1 μM, 10 μM, 100 μM, 1 mM, and 2 mM). (a) The raster plots at 15 WIV (99 DIV). (b) Changes in firing rate and number of SBFs at 15 WIV. (c) The raster plots at 46 WIV (317 DIV). (d) Changes in firing rate and number of SBFs at 46 WIV.

#### 4. 結論

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの 600 日以上 of 長期培養を実現し、培養日数に依存した自発活動特性と興奮性・抑制性シナプス関連の薬剤投与による応答からシナプス機能の成熟化を確認し、機能的な成熟化には少なくとも 20-30 週以上の培養期間が必要であることを明らかにした。更に、てんかん現象の誘発と抗てんかん薬の作用を見出し、アストロサイト共培養法を用いたヒト iPS 細胞由来ニューロンの平面微小電極アレイ活動電位計測法はヒト神経疾患における薬効評価系として有効であることが示唆された。これらの結果をもとに、ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いて厚さ 50 μm 以上の 3 次元組織モデルを構築することに成功したが、3 次元培養によって機能的成熟化が促進されるかなどは今後の課題となっている。

#### 謝辞

本研究は科研費 26560247, 14J11194 によって行われました。

#### 参考文献

- (1) A. Odawara, H. Katoh, N. Matsuda, I. Suzuki, "Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture.", Scientific Report, 2016, 26181.