

目次

目次

第1章 緒言	4
1-1. 序論.....	4
1-2. 本博士論文の構成.....	7
第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンのバランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価	8
2-1. 序論.....	8
2-2. 実験方法.....	10
2-2-1. E/I バランスの異なるヒト iPSC 由来神経ネットワークの培養	10
2-2-2. 免疫化学染色	10
2-2-3. MEA 計測	10
2-2-4. 薬理試験	11
2-2-5. スパイク検出	11
2-2-6. 解析パラメータ	11
2-2-7. クラスタリング分析	12
2-3. 結果.....	13
2-3-1. 免疫化学染色による E/I バランスの同定	13
2-3-2. E/I バランスに依存した自発活動の継時変化.....	13
2-3-3. E/I バランスに依存した NB 波形の振幅.....	13
2-3-4. E/I バランスに依存した Glutamate receptor の機能	14
2-3-5. E/I バランスに依存した薬剤応答	14
2-3-6. E/I バランスに依存した作用機序の分離	15
2-4. 考察.....	17
第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築	31
3-1. 序論.....	31
3-2. 実験方法.....	33

目次

3-2-1. ヒト iPSC 由来脳オルガノイドの培養.....	33
3-2-2. 免疫化学染色	33
3-2-3. MEA 計測とスパイク検出.....	33
3-2-4. 薬理試験	34
3-2-5. 周波数分析.....	34
3-3. 結果.....	36
3-3-1. ヒト iPSC 由来脳オルガノイドの作製.....	36
3-3-2. 痙攣陽性化合物投与後の脳オルガノイドにおける電気活動の周波数解析	36
3-3-3. 脳オルガノイドの抗てんかん薬投与に対する応答	37
3-4. 考察.....	39
第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした医薬品の痙攣毒性評価...	45
4-1. 序論.....	45
4-2. 実験方法.....	47
4-2-1. ドラベ症候群患者及び健常者由来脳オルガノイドの培養	47
4-2-2. 免疫化学染色	47
4-2-3. MEA 計測	47
4-2-4. 薬理試験	48
4-2-5. CMOS MEA を用いた疾患脳オルガノイドの計測.....	48
4-2-6. オシレーションの検出	48
4-2-7. 波形のポテンシャル解析.....	48
4-2-8. 統計解析	49
4-3. 結果.....	50
4-3-1. ドラベ症候群患者由来脳オルガノイドの作製.....	50
4-3-2. ドラベ症候群患者由来脳オルガノイドにおける禁忌薬の応答評価.....	50
4-3-3. CMOS MEA を用いたドラベ症候群脳オルガノイドの禁忌薬に対する応答 評価	51

目次

4-3-4. ドラベ症候群脳オルガノイドの周波数特性	51
4-4. 考察.....	53
第5章 結言	59
参考文献.....	63
謝辞.....	80

第1章 緒言

第1章 緒言

1-1. 序論

創薬の分野において、臨床試験で副作用が検出され、候補化合物が脱落してしまう割合が最も高い臓器は中枢神経系であり[1]、その中でも高い頻度で検出される重篤な副作用は痙攣毒性である[2]。痙攣毒性が臨床試験において検出された化合物は即開発中止となってしまう、膨大な開発コストと時間の損失が生じる。そのため、前臨床の段階で医薬品候補化合物の痙攣毒性を検出できる評価法の構築が求められている。従来は、動物に化合物を投与する大掛かりな実験で行われていた。しかしながら、検出精度、スループット性が低い、膨大な時間とコストが掛かかる、痙攣前兆の用量同定が難しい、ヒト外挿性や、疾患患者に対する毒性評価も困難であるなどの問題があった。そのため、ヒトの痙攣毒性を高精度に予測可能な *in vitro* の評価系を開発する必要がある。この課題へのアプローチの一つとして、ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSC) の応用が期待されている。

ヒト iPSC の発見と分化誘導技術の発展により、様々な種類の神経細胞の作製が可能になった[3]。ドーパミン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロンなど、異なる機能をもつ細胞を作製することが可能となった[4-7]。さらに、海馬歯状回の顆粒細胞[8]や大脳皮質第 5 層の錐体ニューロン[9,10]など、特定の脳領域に由来する神経細胞の作製も可能となってきた。これらのヒト iPSC 由来ニューロンを使用して、細胞死、遺伝子発現、形態、電気生理学的機能などのパラメータに基づいて化合物の毒性評価が行われている[11-18]。

ヒト iPSC 由来ニューロンを用いた電気生理学的機能計測では、パッチクランプ法[9,19,20]や、カルシウムイメージング法[14,21]、平面微小電極アレイ (micro electrode array; MEA) による細胞外記録法[16-18,22-33]などの手法が用いられている。MEA 法は、直径数～数十 μm の微小電極が配置された基板上に培養した細胞の電気活動を、非侵襲に長期間計測することができる手法である。さらに、時間分解能が高く、多点同時計測であるため、神経ネットワーク活動の評価が可能である。MEA での最初の培養細胞計測は 1972 年に Thomas らによって報告され[34]、培養ニューロンからの記録は、1979 年と 1980 年にそれぞれ Pine と Gross らによって報告された[35,36]。ヒト iPSC 由来ニューロンの MEA 計測は、2014 年に小田原らによって報告され[16]、それ以来、ヒト iPSC 由来ニューロンの機能評価や化合物応答に関する報告がされてきた。我々は、MEA 計測法で、iPSC 由来ニューロンへの痙攣陽性化合物の応答の検出や、抗てんかん薬の副作用の検出を行ってきた[16,17,30,31]。

脳神経細胞は、主に興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの 2 種類に分類される。我々の脳神経ネットワーク活動は、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの入力バランス (E/I バランス) により制御されている。医薬品の深刻な副作用である痙攣毒性や、神経疾患で見

第1章 緒言

られるてんかん発作は、脳内の E/I バランスの乱れが原因の一つであると考えられている。例えば、レット症候群では、*MeCP2* 遺伝子の欠損により、皮質における GABA 作動性伝達が減少し、痙攣が起こることが報告されている[37]。ドラベ症候群では、 Na^+ チャネル Nav 1.1 をコードする *SCN1A* 遺伝子の欠損により、抑制性ニューロンの活動が減少し、痙攣が起こることが報告されている[38]。ラフォラ病では、大脳皮質の GABA 作動性ニューロンの発達障害により、ラフォラ体が細胞質に見られ、痙攣が認められている[39]。さらに、大脳皮質のアルブミン介在ニューロンの機能や発達障害により、ピラミダルニューロンの興奮性を制御できなくなることで、てんかんが発症することが報告されている[40,41]。また、ハンチントン病では、大脳皮質の5層や6層のニューロンの脱落による痙攣発作が報告されている[42]。このように、E/I バランスの乱れによるてんかん発作を伴う神経障害が数多く報告されていることから、化合物の毒性評価を行う際には、評価サンプルの E/I バランスが大変重要だと考えられる。しかし、MEA を用いた既存のヒト iPSC 由来ニューロンの毒性評価系では、神経ネットワークにおける E/I バランスは考慮されていない。さらに、ヒト iPSC 由来神経ネットワークで痙攣毒性を検出するための最適な E/I バランスは同定されていない。ヒト iPSC 由来神経ネットワークにおいて、痙攣陽性化合物である pentylenetetrazol (PTZ) に対する痙攣応答の検出用量や、PTZ で誘発された痙攣状態に対する抗てんかん薬である phenytoin 投与時の応答は培養サンプルにより異なっている。これらの結果は、分化誘導法の違いによって引き起こされる神経ネットワークのイオンチャネルの発現や、E/I バランスの違いによるものであると考えられる。より精度の高い痙攣毒性評価系の構築には、痙攣毒性検出に最適なサンプル条件の同定が必要である。

痙攣毒性評価において、*in vitro* の知見から *in vivo* の現象を再現、予測する *in vitro to in vivo extrapolation (IVIVE)* が重要なアプローチとなっている。その一つとして、三次元オルガノイドの応用が期待されている。オルガノイドは、*in vitro* での三次元細胞集合体であり、自己再生、自己組織化が可能かつ、臓器のような生体機能を示す[43]。オルガノイドは、ヒトの多機能幹細胞や単離された臓器の前駆細胞から作製される。生体の構造に近く、オルガノイドは、IVIVE が重要である生物医学や、個別化医療へ応用期待されている[44]。現在までに、ヒト脳、胃、網膜、食道、肺、肝臓、前立腺、卵巣、腸、腎臓、膵臓のオルガノイド作製法が確立されている[45,46]。ヒト脳オルガノイドは、初期の胚及び胎児の脳の発達を反映し、ヒト神経疾患の非常に高度な *in vitro* モデルである[47]。ヒト脳オルガノイドは、Lancaster らによって 2013 年に初めて報告された[48]。現在では、海馬[49]、中脳[50]、視床下部[51]、小脳[52]、脳下垂体前葉[53]などの様々な特徴を持つオルガノイドの作製法が開発されており、形態評価や遺伝子発現解析[54-62]といったオルガノイド作製自体の評価がほとんどであり、脳オルガノイドの電気活動特性を見出す有効な評価法は確立していない。

疾患患者を対象とした痙攣毒性評価において、疾患特異的な毒性の応答を検出可能かが重要な課題となっている。現在、様々な疾患患者由来の iPSC 株が作製され、動物モデルに

第1章 緒言

代わる新たなヒト由来疾患モデルとして使用されるようになってきた。神経疾患では、ドラベ症候群[63,64]やレット症候群[65,66]、アンジェルマン症候群[67,68]などの難治性てんかん患者由来の iPSC 株が作製されている。近年では、疾患 iPSC 由来脳オルガノイドの作製も報告されている。形態評価では、疾患により引き起こされる組織構造の欠損がオルガノイドでもみられることが報告されている[62]。遺伝子発現解析では、疾患を反映した遺伝子変異や同一疾患でも患者の重症度による差異が見られることが報告されている[69]。電気生理学的機能計測では、MEA 計測やパッチクランプ法による自発活動計測において、疾患を反映した活動の増減が報告されている[70,71]。このように、疾患脳オルガノイドは、新たな *in vitro* 疾患モデルとしての有効性が示されてきている。しかしながら、疾患特異的な痙攣毒性評価系としての有効性は、まだほとんど検証されていない。

このような背景の下、本博士論文では、ヒト iPSC 由来中枢神経モデルを用いた医薬品候補化合物の痙攣毒性評価系の構築を目的として、第2章で、ヒト iPSC から分化した大脳皮質の興奮性グルタミン酸作動性ニューロンと抑制性 GABA 作動性ニューロンの比率が異なる5種のサンプルを MEA プレート上に構築し、痙攣陽性化合物に対する応答性の違いと、痙攣毒性評価に最適な E/I バランスについて論じる。次に、*in vivo* 外挿性へのアプローチとして、ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築を第3章で論じる。最後に、疾患患者を対象とした医薬品の痙攣毒性評価法構築の可能性を明らかにするために、ドラベ症候群患者由来 iPSC から作製した疾患脳オルガノイドの禁忌薬に対する応答について第4章で論じる。

第1章 緒言

1-2. 本博士論文の構成

第1章では本研究の背景と目的、本論文の構成について記載した。

第2章では、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンのバランス(E/I バランス)に依存した痙攣陽性化合物の応答評価について記載し、痙攣毒性検出並びに作用機序予測に最適な二次元神経ネットワークのサンプル条件について論じた。

第3章では、健常ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築について記載し、痙攣陽性化合物や抗てんかん薬に対する 500 Hz 以下の低周波帯での応答について論じた。

第4章では、ドラベ症候群患者由来 iPS 細胞から作製した脳オルガノイドの禁忌薬に対する応答評価について記載し、疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした医薬品の痙攣毒性評価の可能性について論じた。

第5章では、各章のまとめと、総括として、開発した各技術の関連性を含めた本研究のまとめについて記載した。

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンのバランスに 依存した痙攣陽性化合物の応答評価

2-1. 序論

近年、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSC) の発見と分化誘導技術の発展により、様々な種類の神経細胞の作製が可能になった[3]。ドーパミン作動性ニューロン、グルタミン酸作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロンなど、異なる機能をもつ細胞を作製することが可能となった[4-7]。さらに、海馬の歯状回の顆粒細胞[8]や大脳皮質第5層の錐体ニューロン[9,10]などの、特定の脳領域に由来する神経細胞の作製も可能となってきた。このような細胞は、再生医療の分野だけではなく、新薬開発におけるリード化合物の初期段階でのスクリーニングや毒性評価への応用が期待されている[72-75]。ヒト iPSC 由来ニューロンを使用して、細胞死、遺伝子発現、形態、機能などのパラメータに基づいて化合物の毒性評価が行われている[11-18]。神経細胞の機能評価は、パッチクランプ法[9,19,20]、カルシウムイメージング法[14,21]、および平面微小電極アレイ (MEA) を用いた細胞外記録法[16-18,22-33]などの手法を使用して行われてきた。その中でも MEA を用いた評価は、神経ネットワークの電気生理学的活動を、高時間分解能で多点同時かつ非侵襲に計測できることから、近年注目が集まっている。

現在、MEA を用いた毒性評価系の開発が国内外で行われている。我々の研究室では、中枢神経系の深刻な毒性である痙攣毒性を指標として、ヒト iPSC 神経ネットワークを用いた評価系の構築を行ってきた。この評価系を用いて、痙攣陽性化合物への応答を検出や、抗てんかん薬の副作用の検出を行ってきた[16,17,30-32,76]。しかしながら、MEA を使用した *in vitro* 化合物評価系のサンプル条件は最適化できていない。痙攣陽性化合物の EC₅₀ は、ヒト海馬由来幹細胞から作成したヒトニューロンとラットの皮質ニューロンにおいて10倍以上異なるという報告がある[77,78]。さらに、ヒト iPSC 由来神経ネットワークにおいても、痙攣陽性化合物である pentylenetetrazol (PTZ) に対する痙攣陽応答の検出用量や、PTZ で誘発された痙攣状態に対する抗てんかん薬である phenytoin 投与時の応答が培養サンプルにより異なっている。これらの結果は、分化誘導法の違いによって引き起こされる神経ネットワークのイオンチャネルの発現や、興奮性/抑制性のニューロンの比率 (E/I バランス) の違いによるものであると考えられる。

脳神経ネットワーク活動は、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの入力バランスにより制御されている。脳神経の以上興奮である痙攣は、脳内の E/I バランスの乱れが原因の一つであると考えられている。レット症候群では、*MeCP2* 遺伝子の欠損により、皮質における GABA 作動性伝達が減少し、痙攣が起こることが報告されている[37]。ドラベ症候群では、ナトリウムチャネル Nav1.1 をコードする *SCN1A* 遺伝子の欠損により、抑制性ニューロンの活動が減少し、痙攣が起こることが報告されている[38]。ラフォラ病では、大脳皮質の GABA 作動性ニューロンの発達障害により、ラフォラ体が細胞質に見られ、痙攣が認め

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

られている[39]。さらに、大脳皮質のバルブアルブミン (PV) 介在ニューロンの機能や発達障害により、ピラミダルニューロンの興奮性を制御できなくなることで、てんかんが発症することが報告されている[40,41]。また、ハンチントン病では、大脳皮質の5層や6層のニューロンの脱落により、痙攣発作が引き起こされることが報告されている[42]。

このように、大脳皮質の E/I バランスの乱れによる痙攣を伴う神経障害が数多く報告されている。したがって、化合物の毒性評価を行う際には、評価サンプルの E/I バランスが大変重要である。しかし、MEA を用いた既存のヒト iPSC 由来ニューロンの毒性評価系では、神経ネットワークにおける E/I バランスは考慮されていない。さらに、ヒト iPSC 由来神経ネットワークで痙攣毒性を検出するための最適な E/I バランスは同定されていない。

そこで、本研究では、ヒト iPSC から分化した大脳皮質の興奮性グルタミン酸作動性ニューロンと抑制性 GABA 作動性ニューロンの比率が異なる5種のサンプルを MEA プレート上に構築し、各神経ネットワークの痙攣陽性化合物に対する応答性を調べた。

第2章 ヒト iPSC 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

2-2. 実験方法

2-2-1. E/I バランスの異なるヒト iPSC 由来神経ネットワークの培養

興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの比率がことなるニューロンネットワークを構築するために、ヒト iPSC から分化させた大脳皮質第5層グルタミン作動性ニューロン (BX-0350; BrainXell Inc.) とパルブアルブミン陽性 GABA 作動性ニューロン (BX-0451; BrainXell Inc.) を 100/0、75/25、50/50、25/75、0/100 (グルタミン作動性ニューロン/GABA 作動性ニューロン) の割合で播種した。細胞は Polyethyleneimine (Sigma) 及び Lminin-511 (Nippi) でコーティングした 24well-MEA プレート (Comfort、Eco、Alpha Med Scientific Inc.) に 8.0×10^5 cells/cm² で播種した。Seeding Medium を使用して細胞を播種し、培養1日目に Day 1 Medium に全量置換し、培養4日目に Day 4 Medium に全量置換した。培養7、11、14日目に Day 4 Medium を半量交換した。培養18日以降は SM1 Supplement (STEMCELL technologies) を含む BrainPhys で培養した。培地は4日おきに半量交換した。さらに、培養8日目に 3×10^4 cells/well のアストロサイト (AX0084; Axol Bioscience Inc.) を各 well に添加した。

2-2-2. 免疫化学染色

細胞を氷上 (4°C) で 4% paraformaldehyde を含む Phosphate buffered saline (PBS) 、-20 °C の methanol でそれぞれ 10 分間固定した。固定した細胞を 4°C で 0.2 % の Triton X-100 を含む PBS で 10 分間インキュベートし、次に preblock buffer (0.05% Triton X and 5% goat serum in FBS) 1 時間インキュベートした。その後、anti- β -Tubulin III (T8578; Sigma-Aldrich)、anti-GABA (A2052、Sigma-Aldrich) 抗体を 4°C で 12 時間インキュベートした。免疫標識は、anti-mouse 488 Alexa Fluor (ab150109、Abcam)、anti-rabbit 546 Alexa Fluor (A-11010、ThermoFisher Scientific) を preblock buffer で 1000 倍希釈して室温で 1 時間インキュベートした。また、1 μ g/mL の Hoechst 33258 (H341、DOJINDO) を室温で 1 時間インキュベートし、細胞核を染色した。染色した細胞は全て蛍光顕微鏡 (BZ-9000; KEYENCE) にて撮影し、取得した画像を ImageJ software (NIH) にて解析した。培養した各神経ネットワークにおける GABA 作動性ニューロンとグルタミン酸作動性ニューロンの比率を算出した。まず、Anti- β -Tubulin III と Hoechst 33258 で染色した蛍光画像から神経細胞体と非神経細胞体領域 (ベース) を検出した。次に、anti-GABA で染色した蛍光画像から各神経細胞体とベースの輝度の最頻値を算出した。Anti-GABA 抗体の染色画像における細胞体の輝度値がベースの輝度値の 2.6 倍より大きいものを GABA 作動性ニューロンとし、それ以外をグルタミン酸作動性ニューロンとした。

2-2-3. MEA 計測

培養した神経ネットワークの MEA 計測は、SM1 Supplement を含む BrainPhys にて行わ

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

れた。自発活動は 24well MEA システム (Presto; Alpha Med Scientific Inc.) を使用して、37°C、5% CO₂ 下で 20 kHz のサンプリングで計測した。自発活動の電気信号は 1 Hz のハイパスフィルタで処理した後に記録された。取得した信号を 100 Hz のハイパスフィルタで処理し、スパイクを検出した。

2-2-4. 薬理試験

培養した神経ネットワークのグルタミン酸受容体の機能を評価するために、培養 8 週目に NMDA 受容体のアンタゴニストである D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5; ab120003, Abcam) 及び AMPA 受容体のアンタゴニストの 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX; C239-5MG, Sigma-Aldrich) を投与した。また、痙攣陽性化合物に対する応答を評価するために、GABA_A 受容体のアンタゴニストである picrotoxin (P1675-1G, Sigma-Aldrich)、GABA_B 受容体のアンタゴニストである CGP 35348 (ab120167, Abcam)、K⁺ チャネルのアンタゴニストである 4-aminopyridine (4-AP; 275875-1G, Sigma-Aldrich)、ムスカリン受容体のアゴニストである pilocarpine (P6503-5G, Sigma-Aldrich)、D₂ 受容体のアンタゴニストである chlorpromazine (C8138-5G, Sigma-Aldrich)、グリシン受容体のアンタゴニストである strychnine (195-11151, Wako) を投与した。GABA 受容体の機能を評価するために、GABA_A 受容体のアゴニストである muscimol (M1523-5MG, Sigma-Aldrich)、GABA_B 受容体のアゴニストである baclofen (029-10261, Wako) を投与した。各化合物の各用量において、自発活動を 10 分間計測した。

2-2-5. スパイク検出

スパイクは、Presto (Alpha Med Scientific Inc.) 及び Mobius (Alpha Med Scientific Inc.) を使用して、20 kHz/channel のサンプリングレートで検出した。100 Hz の high-pass filter をかけた電位活動信号のシグナルが $\pm 5.3\sigma$ の閾値を超えたときにスパイクをカウントした。ここで、 σ は静止期間中のベースラインノイズの標準偏差である。10 分間の計測で 600 回以上のスパイクが検出された電極 (スパイク数 > 1 Hz) をアクティブ電極とした。ウェル全体の 1 秒当たりのスパイク数 (array-wide spike detection rate; AWSDR) は、アクティブ電極で検出されたスパイクの合計値とした。アクティブ電極当たりのスパイクの平均値は Spike frequency per active channel として定義した。Network burst (NB) は MED64 spikes analysis (Alpha Med Scientific Inc.) または、4-step method を用いて検出した[79]。全てのデータは、平均値 \pm 標準誤差として示した。

2-2-6. 解析パラメータ

化合物に対する薬理的応答を評価するために、6 つの解析パラメータを使用した。各パラメータは、10 分間のアクティブ電極でのスパイク数の総和 (total number of spikes)、10 分間の NB 数 (number of NB)、NB 内の最大スパイク数 (Maximum frequency in a NB);

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

MF)、MF の変動係数 (a coefficient of variation of MF; CV of MF)、MF の平均時間間隔 (inter MF interval; IMFI)、IMFM の変動係数 (CV of IMFI) を示す。MF の算出方法を以下に示す。まず、各 NB 内での bin サイズ (10 ms) 当たりのスパイク数の最大値を算出する。計測時間内の全ての NB 内の最大スパイク数の平均値を MF とした。MF は頻度で示すため、1 秒当たりのスパイク数に換算している。各解析パラメータは各ウェルの vehicle データを 100%として計算し、正規化した。

2-2-7. クラスタリング分析

MATLAB でクラスタリング分析を行い、作用機序 (mechanism of action; MoA) の分類と各比率における痙攣陽性化合物の用量依存性を評価した。クラスタリングは群平均法により行い、化合物の用量ごとに 6 つの解析パラメータ値を持つデータセットを使用した。6 種の痙攣陽性化合物の用量特異的クラスタリングを各比率で実行し、クラスター間のユークリッド距離を算出した。

2-3. 結果

2-3-1. 免疫化学染色による E/I バランスの同定

薬理試験後の 5 種の神経ネットワークの E/I バランスを同定するために、ニューロンマーカーである β -tubulin III、GABA 作動性ニューロンのマーカーである GABA 抗体を用いて免疫化学染色を行った [Fig. 2-1A (a)]。画像解析により、細胞播種時の E/I バランスが 100/0 のサンプルは 88/12、75/25、50/50、25/75、および 0/100 のサンプルは、それぞれ 84/16、74/26、58/42、および 48/52 の比率を示した [Fig. 2-1 (b)]。さらに、アストロサイトのマーカーである GFAP 抗体によりアストロサイト共培養であることが示された。シナプス形成は、シナプス前マーカーである synaptophysin 抗体によって確認された。

2-3-2. E/I バランスに依存した自発活動の継時変化

MEA プレート上に培養した神経ネットワークを Fig. 2-2A に示す。Fig. 2-2B (a) は、単一電極の自発活動の典型的な波形を示し、Fig. 2-2B (b)、2-2B (c) は、1 個のウェル内のアクティブ電極の AWSDR のヒストグラムとラスタプロットである。5 種類の神経ネットワークにおける自発活動の継時変化を培養 25、33、50、57、63、69、74、80 日目にそれぞれ 10 分間測定し、スパイク数と NB 数を比較した。NB は神経ネットワーク網全体がシナプス伝達を介して同期的に電気活動を行う際のスパイク群を示している。NB はスパイク数のヒストグラムにおける山のような部分 [Fig. 2-2B (b)]、ラスタプロットの垂直方向の帯状の黒い領域部分である [Fig. 2-2B (c)]。Fig. 2-2C は各培養期間におけるウェル全体の AWSDR を示している。培養 25 日目は、E/I バランスによるスパイク数の違いはなく、NB は全ての E/I バランスの神経ネットワークで見られなかった。NB は一部の条件で培養 33 日目に観察され、培養 50 日目に全ての条件で観察された。

培養 69 日以降は、興奮性ニューロンの割合が最も高い GABA12 のサンプル (E/I バランスが 88/12) が、GABA 作動性ニューロンの割合が高い GABA42、GABA52 と比較してスパイク数が有意に多かった [Fig. 2-2D (a)]。一方、NB 数は、GABA16 の神経ネットワークがほかの条件よりも有意に大きいことを示した [Fig. 2-2D (b)]。GABA 作動性ニューロンの割合が最も高い GABA52 は NB 数が最も低く、培養 33 日目から 80 日目の間に変化も見られなかった。このように、興奮性ニューロンの割合が高いサンプルではスパイク数が多く、GABA 作動性ニューロンの割合が最も高い GABA52 はスパイク数、NB 数ともに低い数値であった。

2-3-3. E/I バランスに依存した NB 波形の振幅

各 E/I バランスの神経ネットワークにおける NB 時の生波形の代表例を Fig. 2-3A に示す。これらの信号から、培養 50、63、80 日目における各 E/I バランスの NB 時の peak potential を算出した (Fig. 2-3B)。この時、各ウェル内で最も大きい振幅を示した電極を選出した。

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

各電極の peak potential は、NB 時の最大振幅の平均値である。GABA12 は、培養 50、63、80 日目の全てにおいて最も高い peak potential を示した。さらに、GABA12 と GABA26、GABA42、GABA52 のサンプル間の peak potential で有意差認められた。GABA16 と GABA42 のサンプル間でも有意差が見られた。以上の結果は、興奮性ニューロンの比率が高いサンプルは、より振幅の大きい NB と関連していることを示している。

2-3-4. E/I バランスに依存した Glutamate receptor の機能

NMDA 受容体のアンタゴニストである AP-5 (30 μ M) と AMPA 受容体のアンタゴニストである CNQX (30 μ M) を累積投与し、グルタミン酸受容体の機能を調べた。AP-5 は GABA12 のサンプルで NB の数を有意に減少させたが、GABA16、GABA26、GABA42 では中程度の減少を示した [Fig. 2-3 (a)]。GABA52 では NB の数に変化は見られなかった [Fig. 2-3 (a)]。一方で、全ての E/I バランスにおいてスパイク数は約 50%に減少した [Fig. 2-3 (b)]。以上の結果は、全ての E/I バランスにおいて NMDA 受容体が機能していることを示している (Fig. 2-2C)。また、CNQX 投与後は、全ての E/I バランスで NB が見られなくなった [Fig. 2-3 (a)]。これは、NB が AMPA 受容体を介して発生していることを示唆している。GABA12 を除く 4 つのサンプルにおいて、CNQX 投与後にスパイク数の有意な減少が見られた [Fig. 2-3 (b)]。GABA 作動性ニューロンの比率が多いサンプル程スパイク数の減少が大きく、GABA52 は最も大きいスパイク数の減少を示した [Fig. 2-3 (b)]。GABA12 において、AP-5 投与後のスパイク数の減少は他の E/I バランスと差が見られなかったが、NB 数は著しく減少した。CNQX 投与後では、GABA12 のスパイク数は有意な減少が見られなかった。これは、GABA12 の神経ネットワークではシナプス伝達を介さない活動が多かったことが原因であると考えられる。以上の結果から、AMPA 受容体と NMD 受容体の両方が全ての E/I バランスにおいて機能していることが確認された。さらに、GABA12 では NMDA 受容体が NB に大きく寄与していることが示された。GABA 作動性ニューロンの比率が増加するにつれて AMPA 受容体の阻害によるスパイク数の減少が顕著であることが示された。

2-3-5. E/I バランスに依存した薬剤応答

E/I バランスに依存した化合物に対する応答を評価するために、培養 7~11 週目に 8 つの化合物の累積投与試験を行った (Fig. 2-4)。Fig. 2-5 は代表的な 6 つの解析パラメータを使用し、E/I バランスごとに化合物応答を分析した結果を示している。各 E/I バランスにおいて Vehicle を 100%とした際の変化率と有意差を示した。GABA_A 受容体のアンタゴニストの picrotoxin[80-82]、GABA_B 受容体のアンタゴニストの CGP 35348[83]、GABA_A 受容体のアゴニストの muscimol[84-87]、GABA_B 受容体のアゴニストの baclofen[88]に対する E/I バランスに依存した応答を調べた。Picrotoxin 投与後、GABA12 のサンプルでは有意な変化は見られなかった (Fig. 2-5A)。一方で、GABA26、GABA42、および GABA52 では連

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

続した NB 群が見られた (Fig. 2-4A)。連続した NB の出現時間と静止時間がそれぞれ 0.5 分以上の場合に連続した NB を NB 群とした。例えば、GABA₂₆、GABA₄₂、および GABA₅₂ の picrotoxin 3 μ M 投与後の自発活動では、約 1 分間の連続した NB の出現と、0.5~1 分間の NB が出現しない休止期が交互に見られる。この時、連続して出現した NB を NB 群とした。GABA₁₆ では picrotoxin 投与後、CV of MF が顕著に減少した (Fig. 2-5A)。GABA₁₆ では、GABA₂₆、GABA₄₂、GABA₅₂ で見られた NB 群は見られなかった。CGP 35348 投与後、GABA₁₂ のサンプルでは顕著な変化は見られなかった (Fig. 2-5B)。NB 群は、GABA₄₂ と GABA₅₂ で見られた (Fig. 2-4B)。一方で、muscimol 1 μ M および baclofen 10 μ M 投与後、全ての E/I バランスのサンプルで NB が見られなくなった (Fig. 2-4C、D)。これらの結果から、全ての条件のサンプルにおいて GABA_A 受容体および GABA_B 受容体が発現し、機能していることが示された。さらに、GABA 作動性ニューロンの比率が高いサンプルでは、GABA 受容体のアゴニストの投与後に NB 群が発生する傾向が見られた。

次に異なる作用機序 (mechanism of action; MoA) をもつ痙攣陽性化合物である、4-AP、pilocarpine、chlorpromazine、strychnine に対する応答を調べた。K⁺ チャネルのブロッカーである 4-AP[89-95] 30 μ M を投与すると、全ての比率で高頻度の NB が一定間隔で出現する現象が観察された。GABA₂₆、GABA₄₂、GABA₅₂ では中用量投与時に NB 群が見られた。ムスカリン受容体のアゴニストである pilocarpine[96,97]の投与により、GABA₁₂ では顕著な応答は見られなかった (Fig. 2-5F)。一方で、GABA₄₂、GABA₅₂ では、中、高用量で NB 群が見られた (Fig. 2-4F)。D₂ 受容体のアンタゴニストである chlorpromazine[98,99]の投与では、GABA₁₂ が顕著な変化が見られなかった (Fig. 2-5G)。GABA₄₂ と GABA₅₂ では NB 群が見られた (Fig. 2-4G)。グリシン受容体のアンタゴニストである strychnine 投与により、全ての E/I バランスでスパイク数が用量依存的に減少した (Fig. 2-4H)。30 μ M 投与時に全ての用量で有意に減少した (Fig. 2-5H)。さらに、NB 数も用量依存的な減少傾向が見られた。GABA₁₂、GABA₁₆、GABA₂₆ および GABA₄₂ のサンプルで、10 μ M 投与後に NB の有意な減少が見られた。

興味深いことに、picrotoxin、CGP 35348、4-AP、pilocarpine、chlorpromazine、strychnine などの様々な痙攣陽性化合物に対する応答は、E/I バランスにより有意差が見られる解析パラメータが異なっていた (Fig. 2-5)。これらの結果は、痙攣陽性化合物の応答検出には、サンプルの E/I バランスに適した解析パラメータが必要であることを示唆している。さらに、同一の E/I バランスのサンプルであっても、異なる MoA をもつ痙攣陽性化合物の応答は、同一の解析パラメータで検出できなかった (Fig. 2-5)。以上から、MoA により、応答が検出できる解析パラメータが異なる可能性が示唆された。

2-3-6. E/I バランスに依存した作用機序の分離

E/I バランスに依存した MoA 分離能を評価するために、各 E/I バランスの 6 つの痙攣陽性化合物に対する 6 つの解析パラメータの応答のクラスターリング分析を行った。各 E/I バ

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

ランスの条件において、低用量の応答は同じクラスターにグループ化される傾向が見られた (Fig. 2-6)。各条件で6つの痙攣陽性化合物の最低用量の応答が1つのクラスターに分類されるユークリッド距離を基準とし、それ未満の距離ものを一つのクラスターとした。生体脳の E/I バランス[100,101]に最も近い GABA16 では、picrotoxin の 0.3 μ M 以下、CGP 35348 の 10 μ M 以下、4-AP の 0.3 μ M、pilocarpine の 1 μ M 以下、chlorpromazine の 1 μ M 以下、strychnine の 1 μ M 以下が低用量のクラスターに分類された (Fig. 2-6A、blue)。中用量及び高容量は、低用量のクラスターとは異なるクラスターに分類された。痙攣陽性化合物の中高用量は、化合物ごとに異なるクラスターに分類された (Fig. 2-6A)。さらに、GABA 受容体に作用することが知られている picrotoxin、CGP 35348 及び chlorpromazine のクラスターが隣り合って形成された。一方で、他の E/I バランスでは、各低容量のクラスターに複数の中用量、高用量の化合物応答が含まれていた (Fig. 2-6B-E、blue)。中高用量では、いくつかの化合物の独立したクラスターや、複数の化合物が含まれるクラスターが形成された。痙攣陽性化合物に対す応答性が最も高かった GABA52 では、中高用量の chlorpromazine と strychnine のみが独立したクラスターに分類された。以上から、生体脳の E/I バランスに最も近い GABA16 のサンプルが痙攣陽性化合物への応答性が高い GABA52 よりも化合物応答の分離に適していることを示唆している。

2-4. 考察

興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの比率が異なる 5 種類のヒト iPS 神経ネットワークを構築した。細胞播種時の E/I バランスは、100/0、75/25、50/50、25/75、0/100 だったが、培養 83 日後の比率は免疫化学染色より、それぞれ 88/12、84/16、74/26、58/42、48/52 であった (Fig. 2-1B)。興奮性ニューロンとして播種された細胞が 100%ではなく、興奮性ニューロン 88%であり、抑制性ニューロンとして播種された細胞が抑制性ニューロン 52%であったと仮定する。この場合、播種時の比率は、75/25 は 78/22、50/50 は 68/32、25/75 は 58/42 と算出される。したがって、細胞播種後の培養中に自己組織的に E/I バランスを調整するのではなく、播種時の E/I バランスを維持しながらネットワークが形成されたと考えられる。しかしながら、大脳皮質第 5 層グルタミン酸作動性ニューロンのバイアルに含まれるグルタミン酸作動性ニューロンとパルブアルブミン陽性 GABA 作動性ニューロンのバイアルに含まれるグルタミン酸作動性ニューロンの特性は異なると考えられる。Supplementary Fig. 2-1 は第 5 層グルタミン酸作動性ニューロン (GABA12) のバイアルのグルタミン酸作動性ニューロンの形態を示している。GABA12 で観察されたグルタミン酸作動性ニューロンは、細胞体が大きく錐体ニューロンのような形態であったが、GABA52 で観察されたものは、より小さな細胞体であった。E/I バランスに加えて、グルタミン酸作動性ニューロンの特性の差異がスパイクパターンの違いを引き起こしていた可能性が示唆された。

自発活動の継時変化の結果から、興奮性ニューロンの比率が高くなるにつれてスパイク数が増加する傾向が見られた [Fig. 2-2D (a)]。この結果は、抑制性シナプスの入力、Na⁺チャネルの発現レベル、及び NMDA 受容体の発現レベルの違いによるものであると考えられる。抑制性シナプスの入力はポスト側のニューロン活動を抑制するため、抑制性ニューロンの割合が高くなるにつれてスパイク数が減少するのは妥当である。GABA 受容体のアンタゴニストである picrotoxin と CGP 35348 の投与により、抑制性ニューロンの比率が低い GABA12 と GABA16 では活動変化が小さく、GABA26、GABA42、GABA52 では活動の変化が大きかった。そのため、E/I バランスにより抑制性入力に差異があることは明らかである (Fig. 2-1、2-4A、2-4B)。より厳密に理解するためには、GABA を介した伝達が脱分極しているかどうか、また、脱分極している場合は培養期間の長さを考慮する必要があるかもしれない。

皮質錐体ニューロンでは、Nav1.6 が多く発現している。Nav1.6 は、他のサブタイプの Na⁺チャネルよりも低電圧で活性化し、活動電位の発生を促進することが知られている [102-104]。したがって、第 5 層グルタミン酸作動性ニューロンの比率が高い神経ネットワークでは、スパイク数が増加すると考えられる。NMDA 受容体の発現は、抑制性ニューロンに比べて興奮性ニューロンで多いことが知られている [105]。GABA12 のサンプルにおいて、NMDA 受容体のアンタゴニストである AP-5 の投与により、NB 数の顕著な減少が見られ

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

たことから、GABA12におけるNMDA受容体の発現とその早期機能化が示唆された [Fig. 2-3C (a)]。培養50日後に興奮性ニューロンの比率が高いサンプルでスパイク数が増加した潜在的な理由は、AMPA受容体を介したNBによるNMDA受容体の機能化が促進されたことが原因の1つとして考えられる [106,107]。

スパイク数はGABA12で最も多く見られたが、NB数はGABA16で最も多かった (Fig. 2-2D)。これは主に、神経ネットワーク全体ではなく、ネットワーク内の部分的な回路によって発生するNBなどの多様性が見られたためである。しかしながら、培養80日目には、神経ネットワークの成熟化と共に、E/IバランスによるNB数の有意な差は見られなくなった [Fig. 2-2D (b)]。神経ネットワークが成熟するにつれて、NB以外のスパイクや単一電極でのローカルバーストは観察されなくなった。これは、神経ネットワークが自己組織的に自発活動を調整していることを示唆している。

NB波形の振幅 (Peak potential) がE/Iバランスにより異なることは大変興味深い現象である (Fig. 2-3A、2-3B)。細胞外電位計測は、活動電位発生時のNa⁺イオンの流れによる電極表面の電気二重層の変化を電位として記録している。錐体ニューロンは、先述のようにNav1.6の発現に一部起因して、Na⁺チャネルの発現が多い。したがって、興奮性ニューロンの比率が高いサンプルでは、活動電位の発生時にNa⁺イオンの流れが強くなるため、興奮性ニューロンの比率が高いサンプルほど電位の振幅が大きくなったと考えられる。

痙攣陽性化合物に対する応答は、E/Iバランスによって異なっていた (Fig. 2-4、2-5)。GABA12のサンプルにおいて、GABA_A受容体のアンタゴニストであるpicrotoxinとGABA_B受容体のアンタゴニストであるCGP 35348は、顕著な応答が見られなかった (Fig. 2-4、2-5A、B)。この結果は、GABA受容体に作用する化合物を評価するためには、評価サンプルのGABA作動性ニューロンの比率が、少なくとも生体脳と同等以上である必要があることを示している。K⁺チャネルのブロッカーである4-APは、細胞内のCa²⁺の濃度を増加させることが知られている。したがって、4-APは発作のようなスパイクを誘発し、10 μM以上の用量でE/Iバランスに関係なく連続的なスパイクを生成する (Fig. 2-4、2-5E)。さらに、4-APはシナプス前終末からのグルタミン酸とGABAの放出を増加させる [108]。GABA作動性ニューロンの割合が高いサンプル (GABA52、GABA42、GABA26) に1 μMまたは3 μMの4-APを投与した際にNB群が発生した原因は、4-APによるグルタミン酸とGABAの放出のバランス変化によるものであると考えられる。

ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) のアンタゴニストであるpilocarpineは、M1 mAChR活性により媒介されるパルブアルブミン (PV) GABA作動性ニューロンの脱分極により興奮作用を引き起こす。さらに、その後のPV GABA作動性ニューロンの活動は減少または消失する [109]。したがって、抑制性入力が増加し、発作が引き起こされる。PV GABA作動性ニューロンの比率が最も高いGABA52では、スパイク数、NB、MFの顕著な増加が見られた (Fig. 2-4、2-5F)。この結果は上記の作用機序 (mechanism of action; MoA) と一致している。一方、GABA12のサンプルには、PV GABA作動性ニューロンが

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

含まれておらず、最初から抑制性入力が高かったため、pilocarpine による有意な変化は見られなかったと考えられる。D₂受容体のアンタゴニストである chlorpromazine は、高用量で NMDA 受容体を阻害する [110]。GABA₅₂ 以外のサンプルでは、10 μ M の chlorpromazine を投与すると、スパイク数と NB 数の減少が見られた。これはおそらく NMDA 受容体阻害によるものであると考えられる (Fig. 2-5G)。GABA₅₂ では、chlorpromazine 1 μ M 以上投与で NB 群が観察され、NB 数と MF の増加が見られた (Fig. 2-4、2-5G)。GABA₅₂ のサンプルは、D₂受容体の比率が他のサンプルよりも高く、興奮性入力が D₂受容体阻害により増大した可能性が考えられる。

Strychnine は、グリシン受容体を阻害し、抑制性入力を減少させることで神経ネットワークを興奮させ、発作を引き起こす痙攣陽性化合物である。しかしながら、全ての E/I バランスのサンプルにおいてスパイク数の増加が見られず、strychnine 30 μ M 投与時にスパイク数は減少した (Fig. 2-5H)。全ての E/I バランスのサンプルで CV of MF の減少傾向が観察されたことから、strychnine の作用は他の痙攣陽性化合物とは異なるスパイクパターンとして現れることが示唆された。

Muscimol と baclofen の投与後、全ての E/I バランスのサンプルでスパイク数と NB 数が減少した (Fig. 2-5C、2-5D)。これらの結果は、全ての E/I バランスにおいて GABA_A 受容体及び GABA_B 受容体が発現、機能していることを示している。興味深いことに、muscimol と baclofen の低用量から中用量で NB 群が出現した (Fig. 2-4C、2-4D)。これは、抑制性入力が増加することで NB 群が発生することを示している。低用量の GABA 受容体のアゴニストを投与した差に見られる興奮作用は、ラット海馬切片に baclofen を投与した場合にもみられることが報告されている [111]。Muscimol と baclofen は、抗てんかん薬として使用されてきたが、発作の発現や悪化などの副作用が臨床で報告されている [112-114]。この研究で観察された GABA 入力由来の痙攣様応答は *in vitro* でこれらの副作用を再現している可能性がある。

GABA₅₂ は、この研究で投与した 6 つの痙攣陽性化合物に対して有意な応答を示し、その応答は低用量から観察された (Fig. 2-5)。これらの結果は、GABA₅₂ の E/I バランスが痙攣陽性化合物に対して高い応答検出感度を有することを示している。しかし、同時に擬陽性を引き起こすリスクもあると考えられる。GABA₅₂ に加えて、GABA₁₂ も他の E/I バランスとは異なる反応性を示した。しかしながら、痙攣陽性化合物に対する応答の有意差は 5 つの条件の中で最少だった。GABA₁₂ は GABA 受容体のアゴニストである muscimol や baclofen に対して顕著な応答を示したことから、GABA₁₂ は神経活動を抑制する化合物の評価に適していると考えられる。さらに、まったく同じ化合物応答を示す E/I バランスのサンプルはなかった。有意差を示した解析パラメータは E/I バランスに依存していたことから、化合物の有効性を評価するためには、それぞれの E/I バランスに適した解析パラメータを選出する必要があることが示された。また、異なるベンダーから取得した様々な E/I バランスを持つ神経ネットワークの化合物応答を比較するには、共通の解析パラメータを使用

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

することは難しいことが示された。本研究では、NB 群が観察されたため、アーティファクトなしで NB の期間を検出することは困難だった。したがって、期間に関連するパラメータを除いて、6つの代表的なパラメータを分析に使用した。

MoA により化合物応答を分類するためにクラスタリング分析を行った。化合物応答性が最も高かった GABA52 では、chlorpromazine と strychnine のみが MoA によって分類された (Fig. 2-6E)。GABA52 は全ての痙攣陽性化合物に対して非常に反応性が高く、strychnine を除き、NB 群の発生という特徴的な応答を示した。高い化合物応答性が MoA による分類を妨げたと考えられる。GABA26 と GABA42 では、一部の化合物のみが分離された (Fig. 2-6C、2-6D)。興奮性ニューロンの割合が最も高い GABA12 では、GABA 受容体に作用する picrotoxin、CGP 35348、chlorpromazine の全ての用量が低用量クラスターに分類された (Fig. 2-6B)。これは、GABA12 の神経ネットワーク内の GABA 作動性ニューロンの数が少なく、GABA 受容体に作用する痙攣陽性化合物に対する応答性が低いためであると考えられる。生体脳の E/I バランスに最も近い GABA16 は、全ての痙攣陽性化合物がそれぞれ別のクラスターに分類された (Fig. 2-6A)。さらに、GABA 受容体に作用する picrotoxin、CGP 35348、chlorpromazine のクラスターは互いに隣接していた。本研究結果は、生体脳の E/I バランスに最も近い GABA16 が痙攣陽性化合物の MoA 分離に最も適していることを示した。さらに、GABA16 は、他の E/I バランスと異なり、低用量の応答が単一のクラスターに分類された (Fig. 2-6A)。この結果は、毒性用量を検出できる可能性を示しており、GABA16 が化合物の痙攣傾向の強さを決定できる比率であることが示唆された。

本研究では、異なる 5 種類の E/I バランスのヒト iPSC 由来神経ネットワークを構築し、痙攣陽性化合物に対する応答性を評価した。痙攣誘発応答を検出するために解析パラメータは E/I バランスにより異なっており、評価サンプルの E/I バランスに適した解析パラメータを特定することに重要性を示唆している。さらに、GABA52 は痙攣陽性化合物に対して最も顕著な応答を示したが、擬陽性を生み出す可能性も示唆された。生体脳の E/I バランスに最も近い GABA16 は、最も優れた MoA の分離能を示した。本研究の結果は、ヒト iPSC 由来ニューロンを使用した MEA 評価における化合物の痙攣応答感受性及び、MoA の予測には、生体脳と同様の E/I バランスが重要であることを示唆している。

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの
バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

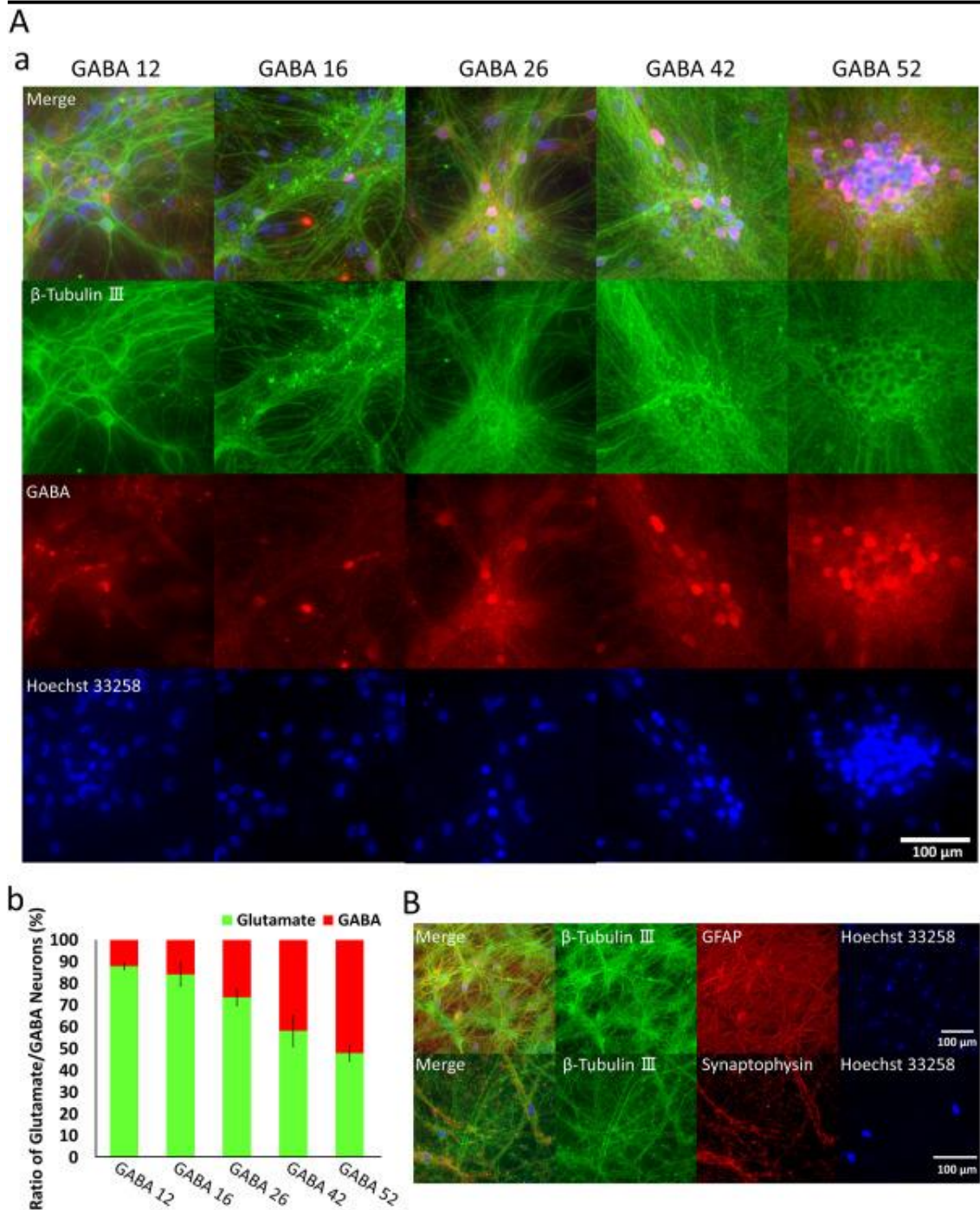


Figure 2-1. ヒト iPS 細胞由来大脳皮質ニューロンの E/I バランス

(A) E/I バランスが異なる 5 種類のヒト iPSC 由来神経ネットワーク。(a) グルタミン酸作動性ニューロンと GABA 作動性ニューロンを混合して培養した神経ネットワークの免疫化学染色画像。 β -tubulin III (緑)、GABA (赤)、Hoechst 33258 (青) の抗体を使用して、培養 83 日目に免疫化学染色を行った。Scale bar=100 μ m。(b) 各神経ネットワークにおけるグルタミン酸作動性ニューロンと GABA 作動性ニューロンの比率 (GABA12 : n=5、GABA16、GABA26、GABA42、GABA52 : n=4)。比率は、 β -tubulin III の染色画

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

像内のニューロンの数と、GABA の染色画像内の GABA 作動性ニューロンの数をカウントすることで算出された。(B) GFAP 抗体 (赤) で染色されたアストロサイト共培養の免疫蛍光画像 (上段)。Synaptophysin 抗体 (赤) で染色したシナプス形成を示す免疫蛍光画像 (下段)。 β -Tubulin III (緑)、Hoechst 33258 (青)。染色は培養 143 日目に行った。Scale bars=100 μ m。

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの
バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

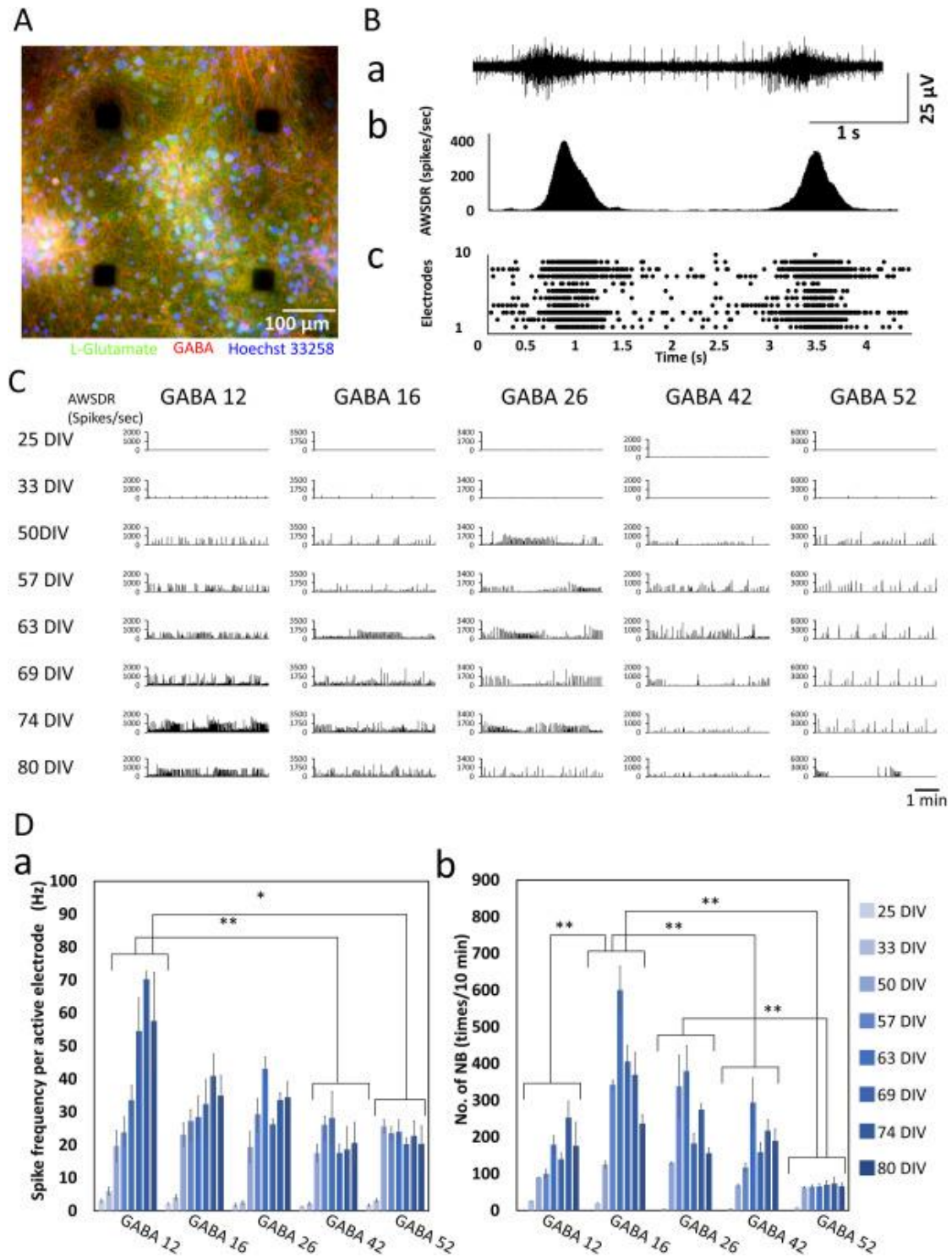


Figure 2-2. 神経ネットワークの E/I バランスによる自発活動の継時変化。

(A) MEA プレート上に培養したヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの免疫蛍光画像。培養 143 日目に、L-グルタミン酸 (緑)、GABA (赤)、Hoechst 33258 (青) の抗体を使用して染色した。Scale bars=100 μ m。(B) ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークで観察された、典型的なスパイクパターン。(a) 単一電極における NB の典型的な電圧波形。(b) 1つのウェ

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

ル全体の1秒当たりのスパイク数 (AWSDR)。Bin size = 1 ms。(C) 1つのウェルのスパイクのラスタプロット。(C) 培養25日目から培養80日目に観察された自発活動のAWSDR。Bin size = 1 sec。Scale bars = 1 min。(D) 自発活動の経時変化。自発活動は培養25日から80日目までの期間中にそれぞれ10分間測定された。培養25日目のデータを100%として計測した各日のスパイク頻度とNB数を正規化した。各E/Iバランスのデータの検定は、one-way ANOVA と Holm-Bonferroni 法を用いて行われた。(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)。エラーバーは標準誤差を示す。(a) アクティブ電極あたりのスパイク頻度の経時変化 (GABA12 : 25 DIV から 63 DIV は $n=4$ 、69 DIV 以降は $n=3$ 。GABA16 : 25 DIV は $n=3$ 。33 DIV 以降は $n=4$ 、GABA36、GABA42、GABA52 : $n=4$)。スパイクが 1Hz 以上の電極をアクティブ電極とした。(b) NB 数の経時変化 (GABA12 : 25 DIV から 63 DIV は $n=4$ 、69 DIV 以降は $n=3$ 。GABA16 : 25 DIV は $n=3$ 。33 DIV 以降は $n=4$ 、GABA36、GABA42、GABA52 : $n=4$)。

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの
バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

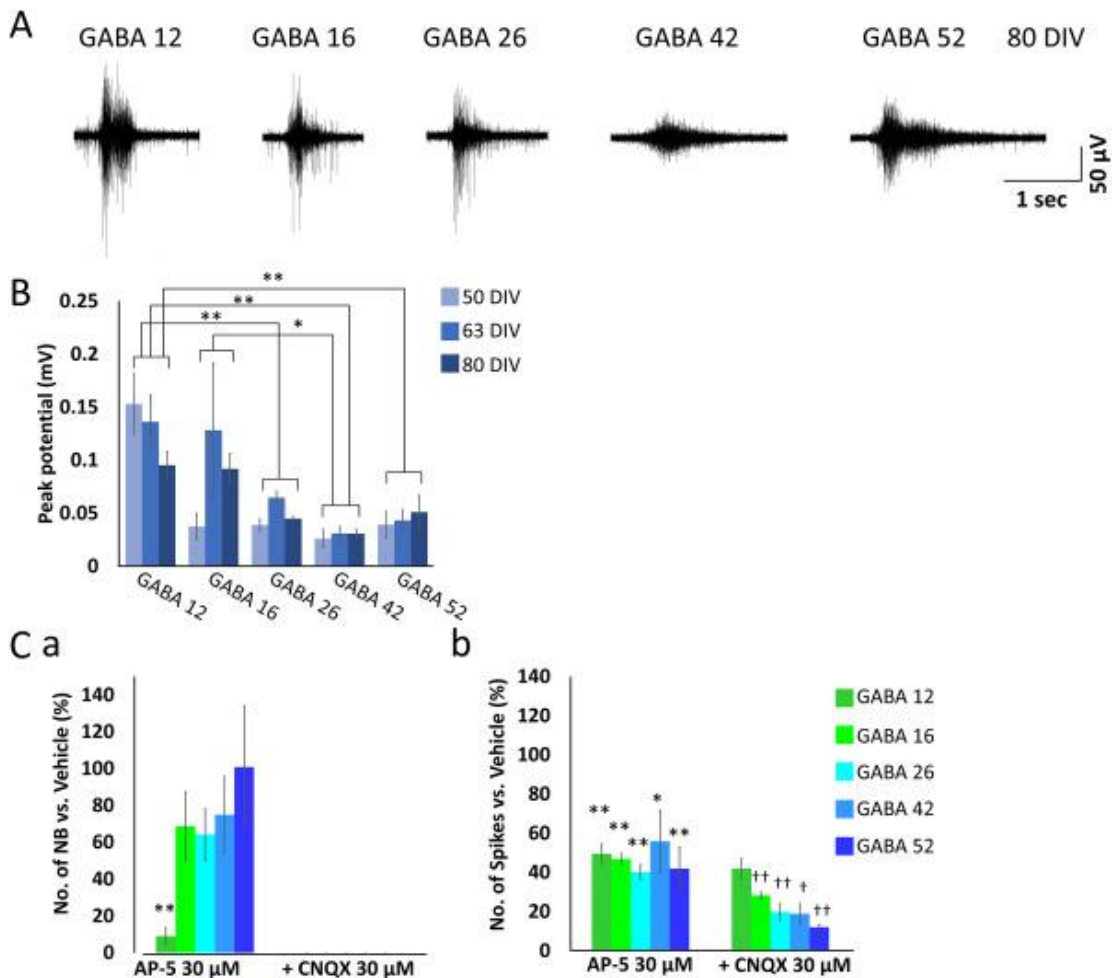


Figure 2-3. E/I バランスに依存した NB 波形の振幅とグルタミン酸受容体の電気生理学的機能。

(A) 培養 80 日目の各 E/I バランスの NB の典型的な電圧波形。(B) NB のピーク電圧振幅の経時変化 (n=3 電極)。各ウェル内から最も高い電圧振幅を示す電極を選択した。培養 50、63、80 日目の 10 分間の自発活動のピーク電圧振幅の平均を算出した。各 E/I バランス間を比較するために、one-way ANOVA と Holm-Bonferroni 法を用いて検定を行った (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。 (C) E/I バランスに依存したグルタミン酸受容体の機能。培養 56 日目に、AP-5 30 μ M と CNQX 30 μ M の累積投与を行った。各化合物の投与前後 10 分間の自発活動を計測した。10 分間のスパイク数と NB 数の変化を Vehicle を 100%として算出した。エラーバーは標準誤差を示す。(a) NB 数の変化 (n=4 well, one-way ANOVA 並びに Holm-Bonferroni 法。 ** $p < 0.01$ vs. vehicle)。(b) スパイク数の変化 (n=4 well, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs. 30 μ M AP-5)。

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

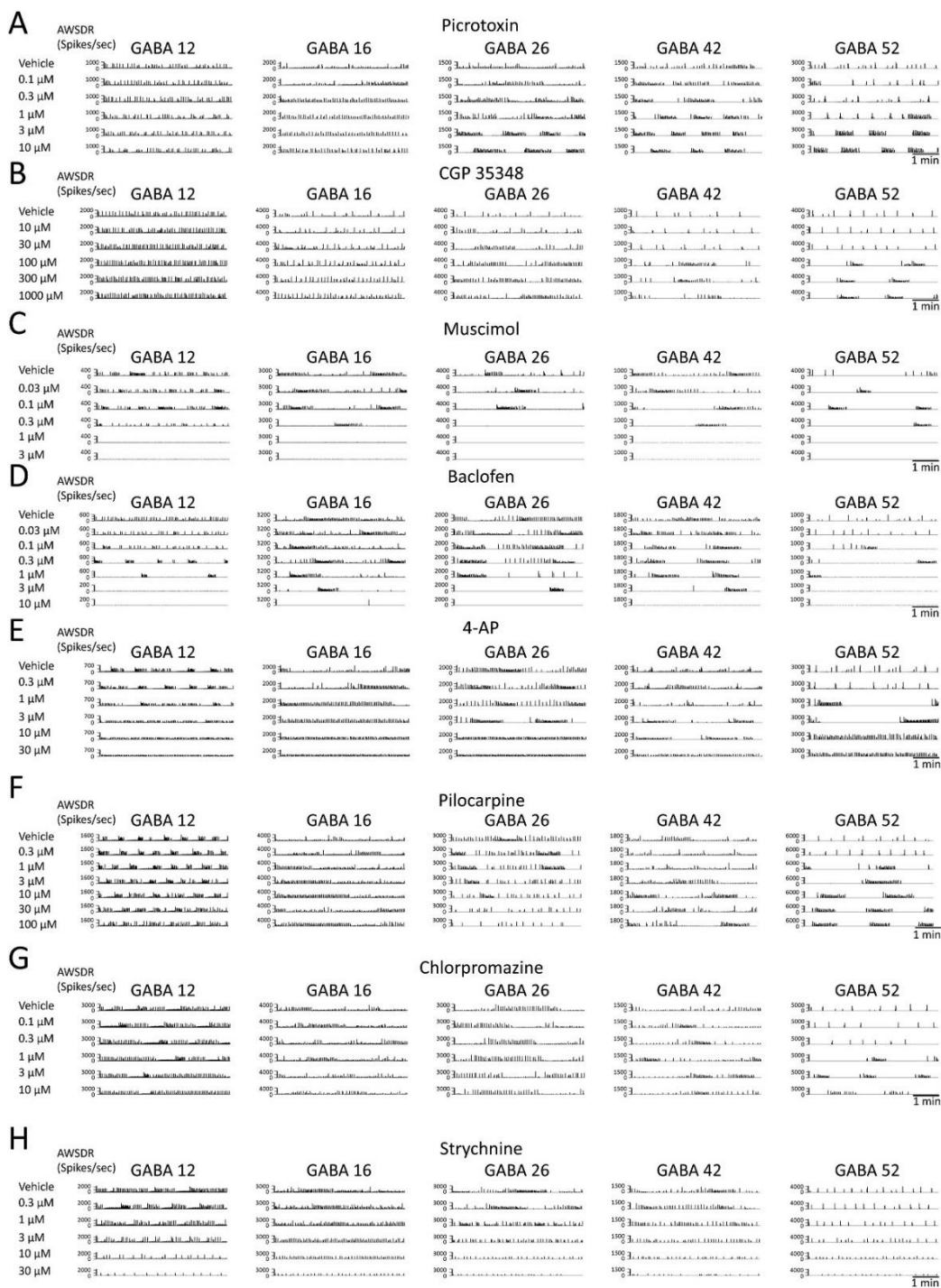


Figure 2-4. 化合物投与後の各 E/I バランスの用量依存的な自発活動の変化。

培養 7 から 11 週目に 8 つの化合物を神経ネットワークに投与した。全ての化合物について、投与前後 10 分間の自発活動を計測した。図は、化合物投与前後 5 分間の AWSDR (spike/sec) を示している。Bin size = 1 sec. Scale bars = 1 min. (A) picrotoxin. (B) CGP 35348. (C) muscimol. (D) baclofen. (E) 4-AP. (F) pilocarpine. (G) chlorpromazine. (H) strychnine.

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの
バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

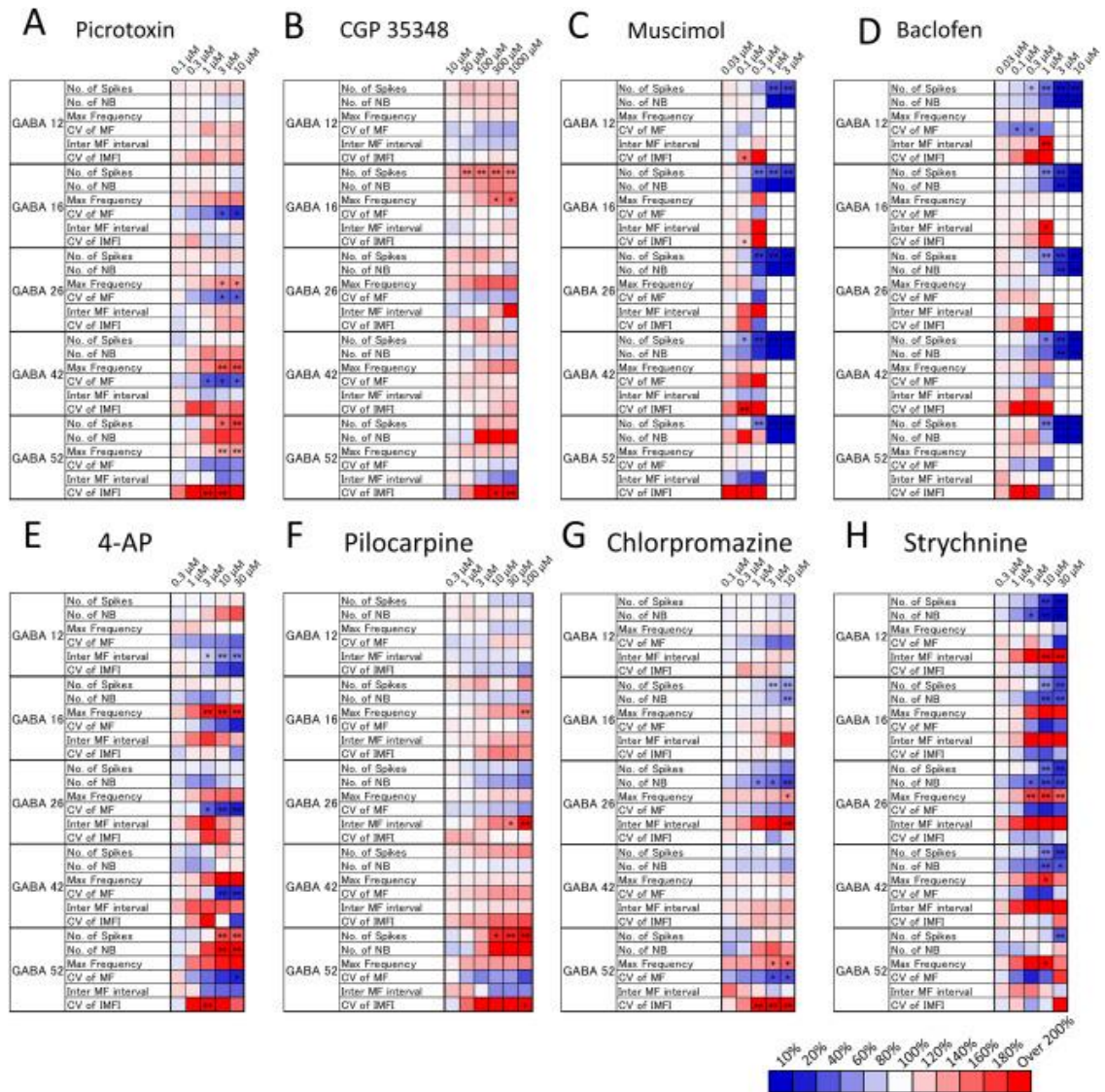


Figure 2-5. E/I バランスに依存した化合物応答。

8つの化合物に対する応答評価は、スパイク数、NB数、NB内のスパイク数の最大値 (MF)、MFの変動係数 (CV of MF)、MFの平均時間間隔 (IMFI)、IMFIの変動係数 (CV of IMFI) の6つのパラメータを使用して行われた。図は、培養7から11週目の化合物応答のヒートマップを示す (n=4)。Vehicle (100%) と比較して、赤が増加、青が減少を示す。各解析パラメータの検定は、one-way ANOVA と Holm-Bonferroni 法を用いて行われた。(*p < 0.05, **p < 0.01 vs. Vehicle)。 (A) picrotoxin。 (B) CGP 35348。 (C) muscimol。 (D) baclofen。 (E) 4-AP。 (F) pilocarpine。 (G) chlorpromazine。 (H) strychnine。

第2章

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの
バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

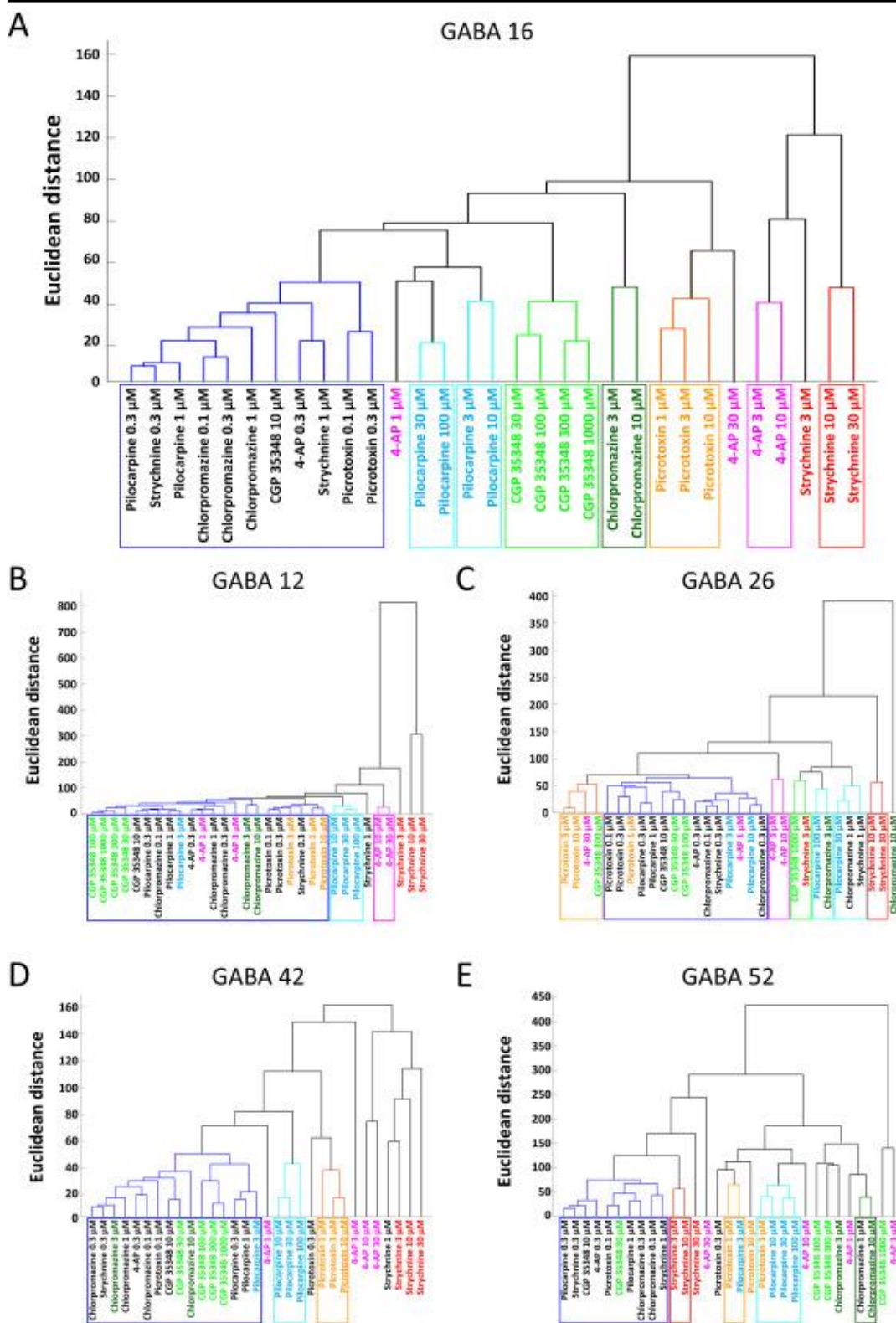
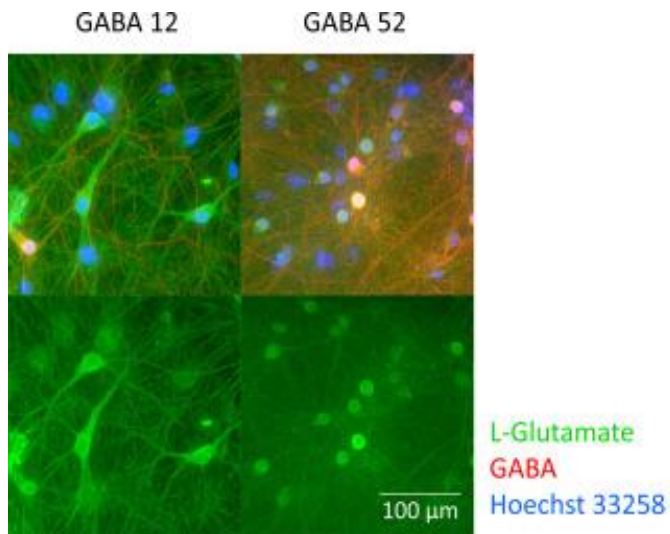


Figure 2-6. E/I バランスに依存した MoA 分離。

培養 7 から 11 週目に測定した痙攣陽性化合物に対する応答のクラスタリングは、各化合物の各用量の 6 つの解析パラメータセットを使用して行われた。(A) GABA16。(B)

第2章 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの興奮性と抑制性ニューロンの バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価

GABA12。(C) GABA26。(D) GABA42。(E) GABA52。各 E/I バランスでは、6つの痙攣陽性化合物の最低用量に対する応答が1つのクラスター（青い四角）に分類されるユークリッド距離を基準とし、それ未満の距離のものを1つのクラスターとした。四角で囲まれた部分は、各クラスターを示す。また、色付けされた部分は、GABA16の低用量に含まれない化合物応答を示す（Picrotoxin：オレンジ、CGP 35348：黄緑、4-AP：ピンク、Pilocarpine；水色、Chlorpromazine：緑、Strychnine：赤）。



Supplementary Figure 2-1. 各 E/I バランスのグルタミン作動性ニューロンと GABA 作動性ニューロンの形態。

培養 143 日目の GABA12 (左) と GABA52 (右) の神経ネットワークに対し、L-グルタミン酸 (緑)、GABA (赤)、Hoechst 33258 (青) の抗体を用いて免疫化学染色を行った。GABA12 で細胞体のサイズが大きく、特徴的な錐体ニューロン様の形態が観察された。Scale bars = 100 μm。

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

3-1. 序論

オルガノイドは、*in vitro*での三次元細胞集合体であり、自己再生、自己組織化が可能かつ、臓器のような生体機能を示す[43]。オルガノイドは、ヒトの多機能幹細胞や単離された臓器の前駆細胞から作製される。近年、*in vitro*の知見から *in vivo*の現象を再現、予測する *in vitro to in vivo extrapolation* (IVIVE) が重要なアプローチとなっている。生体構造に近いオルガノイドは、IVIVE が重要である生物学や、個別化医療へ応用期待されている[44]。現在までに、ヒト脳、胃、網膜、食道、肺、肝臓、前立腺、卵巣、腸、腎臓、膵臓のオルガノイド作製法が確立されている[45,46]。ヒト脳オルガノイドは、初期の胚及び胎児の脳の発達、ヒト特有の疾患の非常に高度な *in vitro* モデルである[47]。現在、海馬[49]、中脳[50]、視床下部[51]、小脳[52]、脳下垂体前葉[53]などの様々な特徴を持つ脳オルガノイドの作製法が開発されている。

痙攣発作は、脳神経活動の異常な興奮として定義され、様々な化合物における深刻な副作用である[115,116]。医薬品開発の前臨床試験段階において、ヒトに外挿できる医薬品の痙攣を予測するための高精度な評価系を開発する必要がある。創薬や医薬品の安全性薬理学の分野では、新しい抗てんかん薬(antiepileptic drugs ; AED)の開発が急務となっている[117]。ヒト iPSC の使用はヒトへの外挿性が期待されている。培養ヒト iPSC 由来神経ネットワークに対する MEA 計測法を用いて、化合物の痙攣毒性を予測する方法が報告されている[26,76,118]。しかし、培養ヒト iPSC 細胞由来神経ネットワークは脳組織とは異なるランダムな構造を持つ。そのため、脳オルガノイドを使用することは、IVIVE の有効な手段であると考えられる。

近年、MEA を使用したオルガノイドの電気活動計測が報告されている[119-124]。MEA を使用した機能測定は、シングルユニット、マルチユニット、フィールドポテンシャル、シナプス電流記録など、解析の目的に合わせて測定方法を選択することができる。また、シリコンプローブ法、MEA 法、Ca²⁺イメージング法、パッチクランプ法など、目的に合わせた計測手法を選択するところも可能である。MEA 計測の場合、オルガノイドを MEA プローブ上にマウントするだけで、自発活動を測定できるため、医薬品の毒性評価や創薬スクリーニングに有効だと考えられる。MEA を用いたオルガノイド計測は、マルチユニット解析が主流であるが、フィールドポテンシャルの周波数解析も有効な手法である。周波数成分解析を用いて脳オルガノイドの化合物応答を検出できれば、新しい AED の開発における痙攣毒性評価や作用機序の分析に有効な指標となる可能性がある。将来的には、生体内脳波との比較が期待されている。痙攣発作時の生体脳波では、通常 500 Hz 未満の周波数帯域が分析に使用されている[125,126]。したがって、脳オルガノイドの電気活動特性、化合物応答は 500 Hz 以下で見られる可能性がある。本研究では、MEA を使用してヒト iPSC 由来大脳皮質オ

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いたMEA計測法の構築

ルガノイドから得られた電気信号の周波数成分を解析した。

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

3-2. 実験方法

3-2-1. ヒト iPSC 由来脳オルガノイドの培養

理化学研究所から取得した健常者由来ヒト iPSC(201B7)は6well ディッシュ上で StemFit (AK02N、Ajinomoto) を用いて培養された。細胞がコンフルエントになった後に、Gentle Cell Dissociation Reagent (ST-07174、STEMCELL Technologies) を使用して細胞を収集した。収集した細胞を室温で 800 rpm にて 5 分間遠心分離した。上清を取り除いた後、1 mL の EB seeding medium (10 mM Y-27632 を添加した EB formation medium) を添加し、細胞ペレットを再懸濁した。EB seeding medium を用いて iPSC を 9.0×10^3 cells/well で播種した。培養 2 日目、4 日目に 100 μ L/well の EB formation medium を添加した。培養 5 日目に、オルガノイドを観察し、球形のサンプルを選択した。選択したサンプルを EB formation medium から induction medium に置換し、2 日間インキュベートした。培養 7 日目に、Matrigel (354,277、Corning) で包埋し、expansion medium で 3 日間インキュベートした。その後、expansion medium を maturation medium に置換し、オービタルシェイカー (COSH6、AS ONE Corporation) 上でオルガノイドを培養した。オルガノイドは、maturation medium で 3 か月間培養され、培地は、3~4 日ごとに交換された。オルガノイドの形成には、STEMdiff Cerebral Organoid Kit (ST-08570、STEMCELL Technologies) の培地を使用した。

3-2-2. 免疫化学染色

培養した脳オルガノイドは、4% paraformaldehyde を含む PBS を用いて固定された。固定したサンプルを Optimal Cutting Temperature Compound (45833、Sakura Finetek Japan) に包埋し、クライオスタット (CM3050、Leica) を使用して厚さ 10 μ m の切片を作製した。オルガノイド切片を透過処理し、preblock buffer でインキュベートした。その後、一次抗体を添加した preblock buffer を加えて 4°C で 12 時間インキュベートした。一次抗体は、anti-pax6 (ab5790、Abcam)、anti- β -Tubulin III (ab7751、Abcam)、anti-ctip2 (ab18465、Abcam) を使用した。免疫標識は、anti-rat 647 Alexa Fluor (ab150155、Abcam)、anti-mouse 546 Alexa Fluor (A10036、Invitrogen)、anti-rabbit 488 Alexa Fluor (A21206、Invitrogen) を preblock buffer で 1000 倍希釈して室温で 1 時間インキュベートした。また、1 μ g/mL の Hoechst 33258 (H341、DOJINDO) を室温で 1 時間インキュベートし、細胞核を染色した。染色したオルガノイド切片は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP8、Leica) を使用して観察され、取得した画像を ImageJ software (NIH) にて解析した。

3-2-3. MEA 計測とスパイク検出

MEA 計測並びにスパイクの検出は、前述の 2-2-3、2-2-5 と同様の方法にて行った。培養 4 か月後の脳オルガノイドを 24 well MEA プレート (Comfort; Alpha Med Scientific) にマウントし、Presto を使用して自発活動を取得した。

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

3-2-4. 薬理試験

培養 4 か月の脳オルガノイドを 24well プレートにマウントした。MEA 上にオルガノイドを 10 分間静置した後に自発活動を計測した。計測が終了したオルガノイドは直ちに培養プレートに回収した。オルガノイドの薬剤応答性を調べるために、GABA_A受容体のアンタゴニストである pentylenetetrazol (PTZ; P0046, Tokyo chemical Industry)、グリシン受容体のアンタゴニストである strychnine (S0632-5G, Sigma-Aldrich)、Na⁺チャンネルのプロッカーである phenytoin (166-12082, Wako)、AMPA 受容体のアゴニストである perampanel を投与した。各化合物の各用量において、自発活動を 20 分間計測した。

3-2-5. 周波数分析

周波数分析は、MATLAB の「Wavelet Toolbox」の cwt 関数を使用して行った。計測した生データ $f(t)$ は次の式で変換される。

$$W(b, a) = \frac{1}{\sqrt{a}} \int_{-\infty}^{\infty} f(t) G\left(\frac{t-b}{a}\right) dt$$

ここで、 a と b は、それぞれマザーウェーブレット関数のスケーリングファクター (1/Hz) と中心位置 (ms) を示す。 $1/a$ は 0.1 から 250 Hz まで変化した。 $G(x)$ は Morlet 関数を示す。

$$G(x) = \frac{1}{\sqrt{\pi F_B}} \exp\left(-\frac{x^2}{F_B}\right) \exp(2i\pi F_C x)$$

ここで、 $F_B=5$ は周波数帯域幅または波数、 $F_C=1$ は中心周波数を示す。

ウェーブレットパワースペクトル $W(b, a)$ も指定された。この変換の振幅は絶対値から取得され、色分けされた。スカログラムは、Y 軸が 181 ピクセルの周波数帯域を示し、X 軸は時間を示す。X 軸の 1 ピクセルは 50 μ s を示す。

$$WT_A = \frac{WT_S}{N_X \times N_Y(f)}$$

WT_A : 各周波数帯域のピクセル当たりのウェーブレット変換係数

WT_S : 各周波数帯域のピクセル当たりのウェーブレット変換係数の総和

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

N_x : X 軸のピクセル数

$N_y(f)$: Y 軸上のピクセル数、 f は周波数帯域

ピーク電圧値を生波形から検出し、 $20 \mu\text{V}$ 以下のものは解析から除外した。さらにピーク時間の $\pm 250 \text{ ms}$ での周波数パワーを算出し、80 秒間の平均のスカログラムを作製した。

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

3-3. 結果

3-3-1. ヒト iPSC 由来脳オルガノイドの作製

作製した脳オルガノイドの神経細胞の分化特性を調べるために、免疫化学染色を行った [Fig. 3-1A(b)]. スライスした脳オルガノイドは、細胞核のマーカである Hoechst 33258、未分化細胞マーカである PAX6、ニューロンのマーカである β -Tubulin III、皮質マーカである *ctip2* を用いて染色した。免疫化学染色により、 β -Tubulin III と *ctip2* が脳オルガノイドで発現していることが確認された。この結果は、作製した脳オルガノイドは発達中のヒト大脳皮質の *in vitro* モデルにおける基本的な要素を含むことを示しており、ヒト大脳皮質オルガノイドが機能的な構造を有することを示唆している。

3-3-2. 痙攣陽性化合物投与後の脳オルガノイドにおける電気活動の周波数解析

作製した脳オルガノイドの機能を調べるために、MEA システムを使用して自発活動計測と典型的な痙攣陽性化合物である PTZ に対する応答を計測した [Fig. 3-1A (a)]. Fig. 3-1B (a) は PTZ 投与 10 分後の自発活動の生波形を示し、Fig. 3-1B (b) は、ハイパスフィルタを用いて 100 Hz 未満の成分をカットした波形を示している。脳オルガノイドの自発活動は、vehicle 投与で観察された [Fig. 3-1B (a)]. PTZ 投与により、用量依存的にオシレーションの頻度と振幅が増加した [Fig. 3-1B (a)]. また、1、3、10 mM の PTZ 投与により、オシレーションが連続する現象が見られた。この現象は、最初のオシレーションから 4 分以上観察された [Fig. 3-1B (a)、(b)]. これらの神経回路の連続した活動は、平面培養の神経ネットワークでは見られない活動である。

Fig. 3-1C (a) のラスタプロットは、PTZ 投与後 10 分間の 16 電極 (1well) での自発活動発火を示す。Fig. 3-1C (b) は、vehicle を 100% として正規化した 10 分間のスパイク数の変化率を示す。PTZ 投与後スパイク数は、0.1 mM で 163.7%、0.3 mM で 191.9%、1 mM で 258%、3 mM で 303.2%、10 mM で 252.2% に増加した。スパイクの解析では、平面培養で見られる network burst が検出されなかったため、PTZ 投与によるスパイク数の増加しか検出できず、生波形で見られた変化を十分に検出できなかった。そこで、500 Hz 以下の周波数成分の特性を調べた (Fig. 3-2)。

Fig. 3-2A は、PTZ 投与後 5 分間の生波形と 0.3~9 Hz のウェーブレット変換のスカログラムを示している。Fig. 3-2A (a) のスカログラムに示されているように、Vehicle、PTZ 0.1 mM、0.3 mM では、オシレーションが離散的であった。0.1 mM、0.3 mM では、30~40 秒間隔のオシレーションが 1~3 Hz の周波数帯で見られた。1 mM 以上では、周期的な持続したオシレーションに変化した [Fig. 3-2A (a)]. また、3 mM、10 mM での最初のオシレーションは、その後のオシレーションより強い周波数成分を示した。Fig. 3-2A (b) は、Fig. 3-2A (a) における赤線部分の周波数パワーのヒストグラムを示している。オシレーション周波数パワーの合計値のピークは、vehicle では 1661.49 (1.41 Hz)、0.1 mM では 1430.84

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

(1.41 Hz)、0.3 mM では 1542.90 (1.41 Hz)、1 mM では 5474.25 (1.26 Hz)、3 mM では 3089.08 (1.12 Hz)、10 mM では 5735.20 (0.89 Hz) であった。周波数パワーのピークは 1 mM から顕著な増加を示した。これらの結果は、脳オルガノイドの PTZ 投与による用量依存的な持続的かつ周期的な活動を示している。

次に、のオシレーションの周波数特性を調べた。生波形からオシレーション部分を検出し [Fig. 3-2B (a) の赤い点]、4~500 Hz の周波数パワーを算出した [Fig. 3-2B (b)]。PTZ 投与により、4~10 Hz、60~460 Hz 帯の周波数パワーが用量依存的に増加した [Fig. 3-2-B (b)]。特に、3 mM、10 mM 投与で 100~300 Hz 帯のパワーが増加した。さらに、増加した周波数パワーの持続時間は、3 mM、10 mM において、約 250 ms であった [Fig. 3-2-B (b)]。以上のように、脳オルガノイドの電気活動波形の周波数成分には、PTZ に対する応答の情報が含まれている。また、オシレーションごとの周波数成分を分析することで、さらに詳細な化合物応答を検出することができることが分かった。

作製した脳オルガノイドが他の作用機序をもつ化合物に対しても応答が検出できるか調べた。Fig. 3-3 は、strychnine 投与 5 分後の電気活動の生波形とウェーブレット変換のスカログラムを示している。オシレーション数は、vehicle で 4 回、0.3 μ M で 2 回、1 μ M で 6 回、3 μ M で 3 回、10 μ M で 22 回、30 μ M で 8 回であった。周波数解析では、strychnine 投与による 4~10 Hz 帯のパワーの増強が見られた。さらに、10 μ M では 4~500 Hz 帯の周波数パワーの増加が見られた。グリシン受容体のアンタゴニストである strychnine の応答が見られたことから、脳オルガノイドにおいて、グリシン受容体が発現、機能している可能性が示唆された。

以上から、PTZ と strychnine に対する応答は低周波帯で観察されることが分かった。

3-3-3. 脳オルガノイドの抗てんかん薬投与に対する応答

抗てんかん薬 (antiepileptic drugs ; AED) に対する応答を調べるために、培養 4 か月目の脳オルガノイドに perampanel と phenytoin を投与し、投与前後の電気活動を測定した。Fig. 3-4A は perampanel、phenytoin 投与後 10 分間の生波形を示す。Perampanel 投与により、用量依存的にオシレーション頻度が減少し、1 μ M 異常で消失した [Fig. 3-4A (a)]。Fig. 3-4B、3-4-C は、抗てんかん薬投与後 10 分間の典型的なラスタプロットとスパイク数の総和を示す。スパイク数は vehicle を 100% として正規化した。Perampanel 投与後、スパイク数は 0.03 μ M で 64%、0.1 μ M で 29.4%、0.3 μ M で 10.4%、1 μ M で 6.54%、3 μ M で 5.64% に減少した [Fig. 3-4B (a)、3-4-C (a)]。一方、phenytoin 投与後のスパイク数は、30 μ M まで減少が見られず、100 μ M で 47.3%、300 μ M で 2.12% に減少した [Fig. 3-4A (b)、3-4-B (b)、Fig. 3-4C (b)]。Fig. 3-4D は、Fig. 3-4A の赤線の特徴的な電気活動波形と周波数解析の結果を示している。Perampanel、phenytoin を投与した両サンプルで 1 回のオシレーション後に 10~30 Hz 帯の反復した活動が見られた (Fig. 3-4D)。この反復した神経活動は、perampanel、phenytoin により減少した。脳オルガノイドにおいて、perampanel と

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

phenytoin による反復した活動の減少はという応答は類似していたが、オシレーション頻度は perampanel では減少、phenytoin では中用量で増加という異なる変化を示した。以上から、脳オルガノイドで作用機序の異なる AED の応答を検出できる可能性が示唆された。

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

3-4. 考察

ヒト iPSC 由来の脳オルガノイドの MEA 計測を行い、得られた電気活動の周波数解析を行った。痙攣陽性化合物である pentylenetetrazol (PTZ) と strychnine を投与し、持続的なオシレーション活動を伴う用量依存的な発作様の波形が観察された (Fig. 3-1、3-2、3-3)。さらに、PTZ 投与により、スパイク数の用量依存的な増加が見られた [Fig. 3-1C (b)]。ラット electroencephalography (EEG) では、PTZ の経口投与で神経ネットワークの活動が増加する [127]。したがって、これらの結果は、脳オルガノイドの電気的活動が哺乳類の電気的活動に類似していることを示唆している。PTZ 1 mM 以上の投与で、持続したオシレーション活動が見られた。平面培養 iPSC 由来神経ネットワークでは、化合物投与前に見られた network burst 頻度が PTZ 投与により増加することが報告されている [17]。したがって、本研究で見られたオルガノイドの持続的なオシレーション活動は、培養神経ネットワークでは見られない特徴的な現象であると考えられる。

脳オルガノイドの電気活動波形の 500 Hz 以下の低周波解析を行った結果、PTZ 投与により、10 Hz 未満の周波数強度が用量依存的に増加した。また、1 mM、3 mM、10 mM 投与時には、60~460 Hz 帯の周波数成分が増強した (Fig. 3-2B)。特に、3 mM、10 mM 投与時に 100~300 Hz 帯が増強した [Fig. 3-2B (b)]。以上から、脳オルガノイドの電気活動波形の 500Hz 以下の周波数解析は、化合物の痙攣応答の検出に有効な手法であると考えられる。

Perampanel は、主に AMPA グルタミン酸受容体に作用する抗てんかん薬 (antiepileptic drugs ; AED) である。Perampanel 投与により、スパイクとオシレーション頻度の用量依存的な減少が見られた [Fig. 3-4B (a)、3-4-C (a)]。ラットでは pilocarpine 誘発性てんかん様脳波が perampanel 投与により抑制されることが報告されている [128]。さらに、Na⁺チャネルの阻害薬である phenytoin は、100~300 μM 投与でスパイク数が著しく減少した [Fig. 3-4B (b)、3-4C (b)]。硬膜外に電極を移植したラットでは、FeCl₃ の皮質内投与後に誘発されたてんかん様脳波が、phenytoin を投与により抑制された [129]。さらに、てんかん様脳波は、ヒトにおいても phenytoin の経口投与で抑制される [130]。興味深いことに、脳オルガノイドへの phenytoin 投与により、オシレーションが連続する痙攣発作様の応答が観察された [Fig. 3-4A (b)]。Phenytoin はてんかん発作に対する代表的な AED であるが、その副作用についても報告されている [131]。したがって、脳オルガノイドで見られたオシレーション頻度の上昇は phenytoin の副作用を反映している可能性がある。周波数解析では、perampanel 及び phenytoin の投与により、用量依存的にオシレーション後の連続した活動が減少することが示された [Fig. 3-4D (a)、(b)]。perampanel と phenytoin により神経ネットワークのシナプス伝達が阻害されたことにより、再帰的な周波数成分の減少が見られたと考えられる。本研究の結果から、作用機序の異なる AED の応答をヒト iPSC 由来脳オルガノイドで評価することが可能であることが示された。

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いたMEA計測法の構築

本結果は、ヒト脳オルガノイドの痙攣陽性化合物並びにAEDに対する応答を500 Hz以下の周波数解析により検出できることを示している。しかしながら、再現性の高い脳オルガノイドの作製は依然として課題となっている。脳オルガノイドで見られた発作様の応答(Fig. 3-1B)は、PTZを投与することによって必ず観察される現象ではない。自発活動のパターンの安定性は、作製した脳オルガノイドの状態に依存していると考えられる。したがって、今後、安定した脳オルガノイド評価系を構築するためには、作製した脳オルガノイドと電気活動の関係を明らかにする必要がある。さらに、本研究では、オルガノイドをおもり無しでMEAチップ上にマウントしオルガノイドの表面からの信号を計測した。MEAシステムを用いてオルガノイドの電気生理学的機能をより詳細に解析するためには、オルガノイド内部の活動を測定する必要がある。したがって、次の課題は脳オルガノイドの切片を作製し、電気活動を測定することである。依然として、脳オルガノイドのMEA計測における課題はあるものの、本研究の低周波解析法は、今後のオルガノイドを研究する上で重要な解析手法となることが期待されており、オルガノイド自体の機能や生体ヒト脳の発達、様々な疾患の治療に関する科学的研究を支援することが可能であると考えられる。

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いたMEA計測法の構築

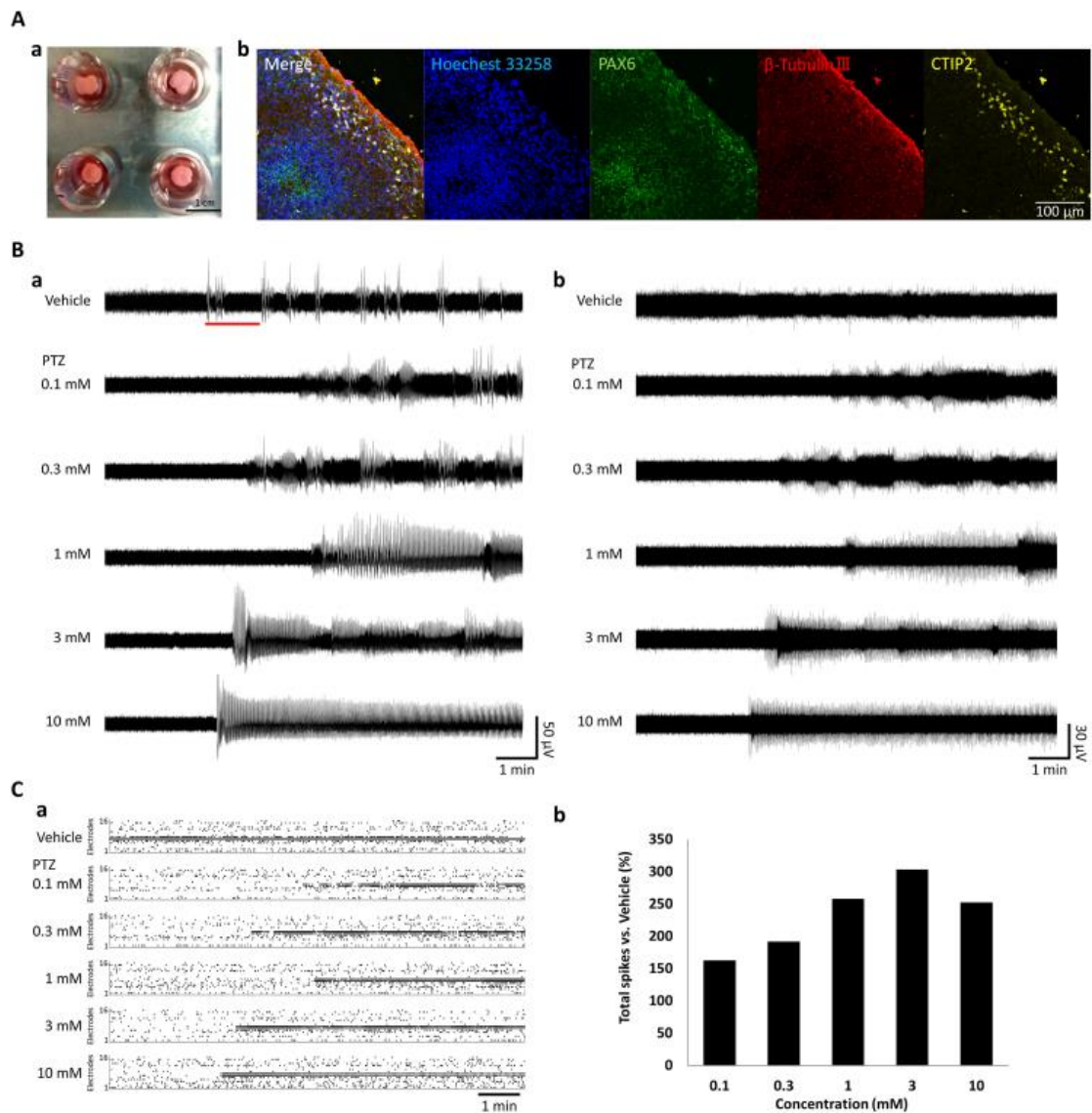


Figure 3-1. 培養4か月目の脳オルガノイドにおけるPTZ投与時のMEA計測
 (A) 培養4か月のヒトiPSC由来脳オルガノイド。(a) MEA上にマウントされた脳オルガノイド。(b) 脳オルガノイドの免疫化学染色画像。Hoechst 33258 (青)、paired box protein 6 (PAX6、緑)、 β -tubulin III (赤)、CTIP2 (黄)。(B) PTZ投与後10分間の自発活動。(a) 自発活動生波形。(b) ハイパスフィルタにより100 Hz未満の成分を除去した自発活動波形。(C) PTZ投与によるスパイク数の変化。(a) 16電極/wellのラスタープロット。(b) Vehicleに対するスパイク数の変化。

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

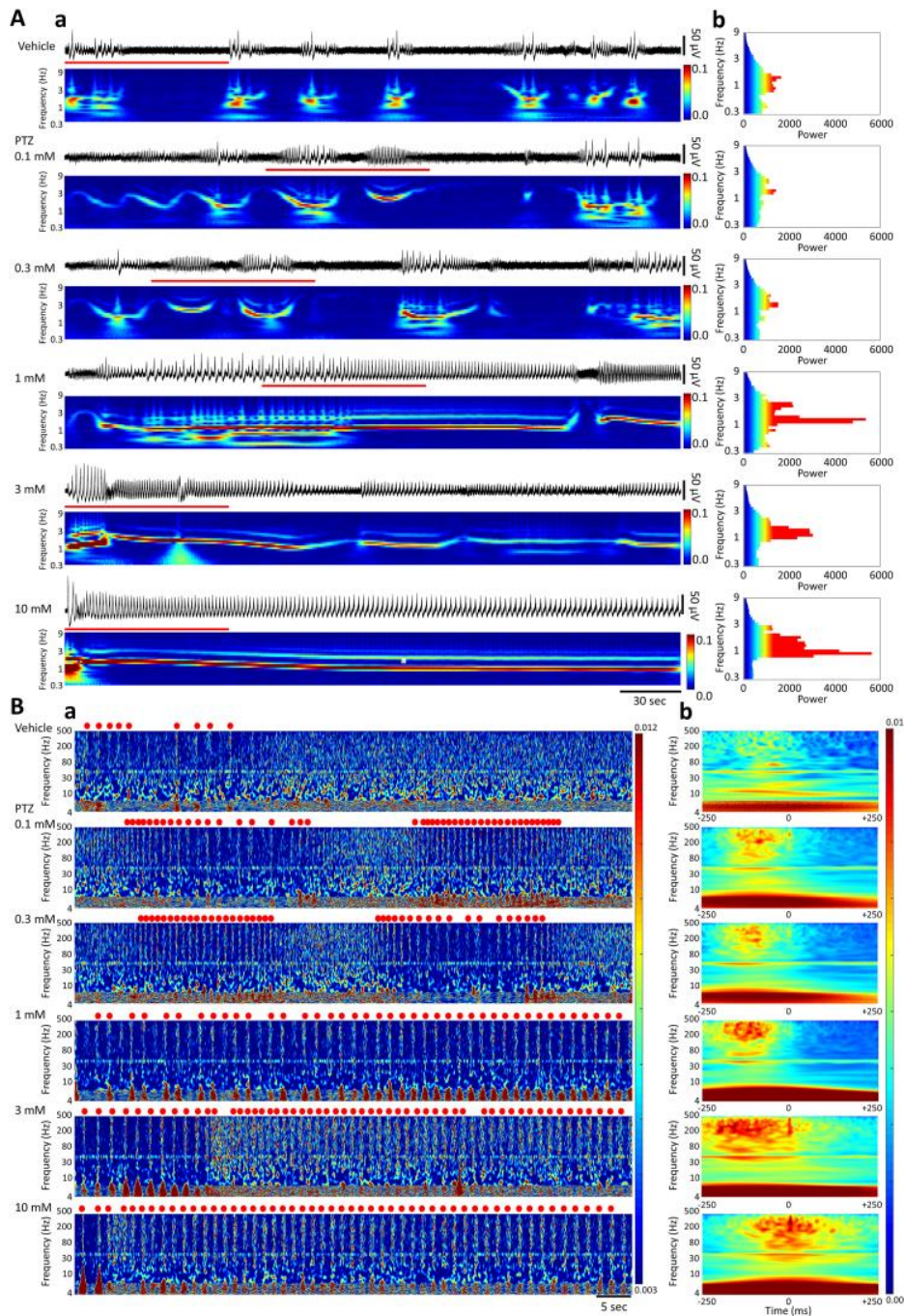


Figure 3-2. PTZ 投与時の 500 Hz 未満の周波数成分。

(A) 投与後 5 分間の周波数分析。(a) 5 分間の自発活動生波形と 0.3~9 Hz のスカログラム。生波形は Fig. 3-1B の赤線部分の拡大図。(b) 0.3~9 Hz の周波数パワーのヒストグラム。(B) (a) Fig. 3-2A (a) 赤線部分の 80 秒間のスカログラム。赤い点は、オシレーションを示す。(b) 検出したオシレーションごとの周波数パワーの平均値。オシレーションのピーク検出時間の ± 250 ms のスカログラム。Vehicle (n=9)、0.1 mM (n=44)、0.3 mM (n=39)、1 mM (n=41)、3 mM (n=55)、10 mM (n=51)

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いたMEA計測法の構築

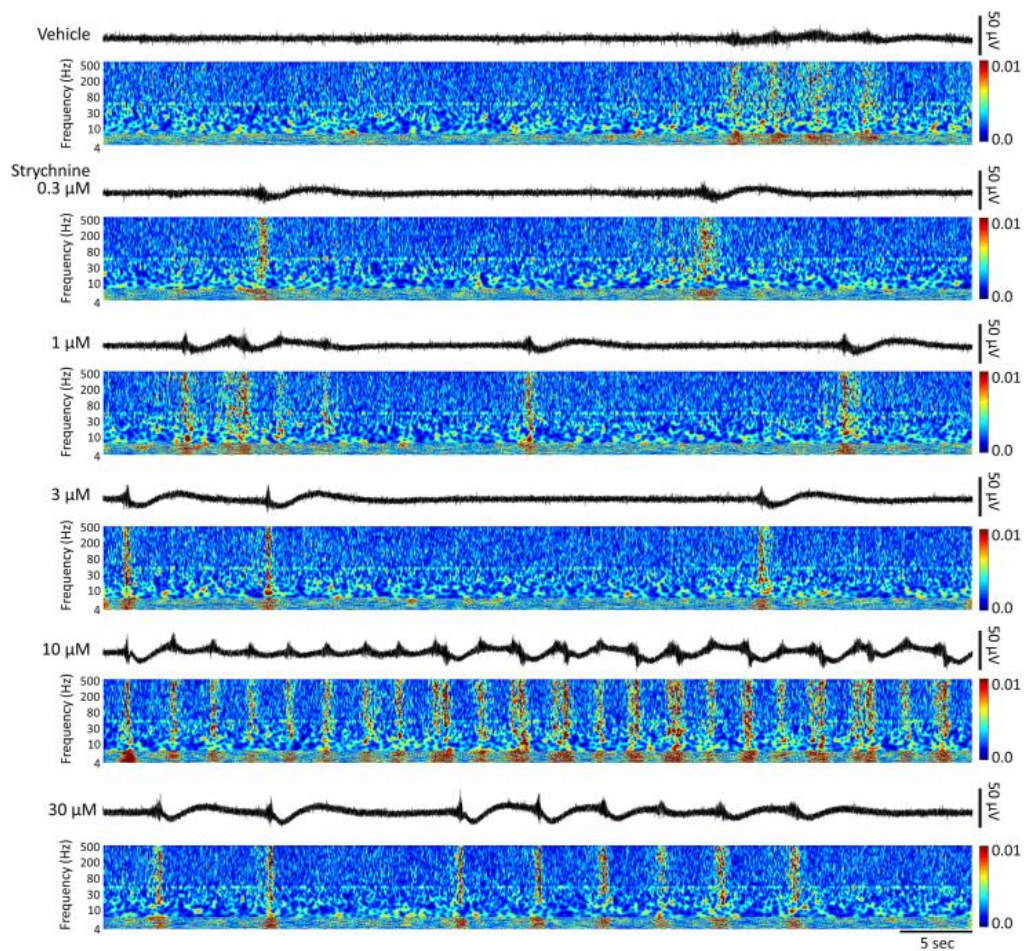


Figure 3-3. 培養4か月の脳オルガノイドにおけるstrychnineに対する応答。
Strychnine投与時の自発活動の生波形とスカログラム。Strychnine投与後の60秒間の特
徴的な波形のウェーブレット分析を行った(4~500 Hz)。

第3章 ヒト脳オルガノイドを用いた MEA 計測法の構築

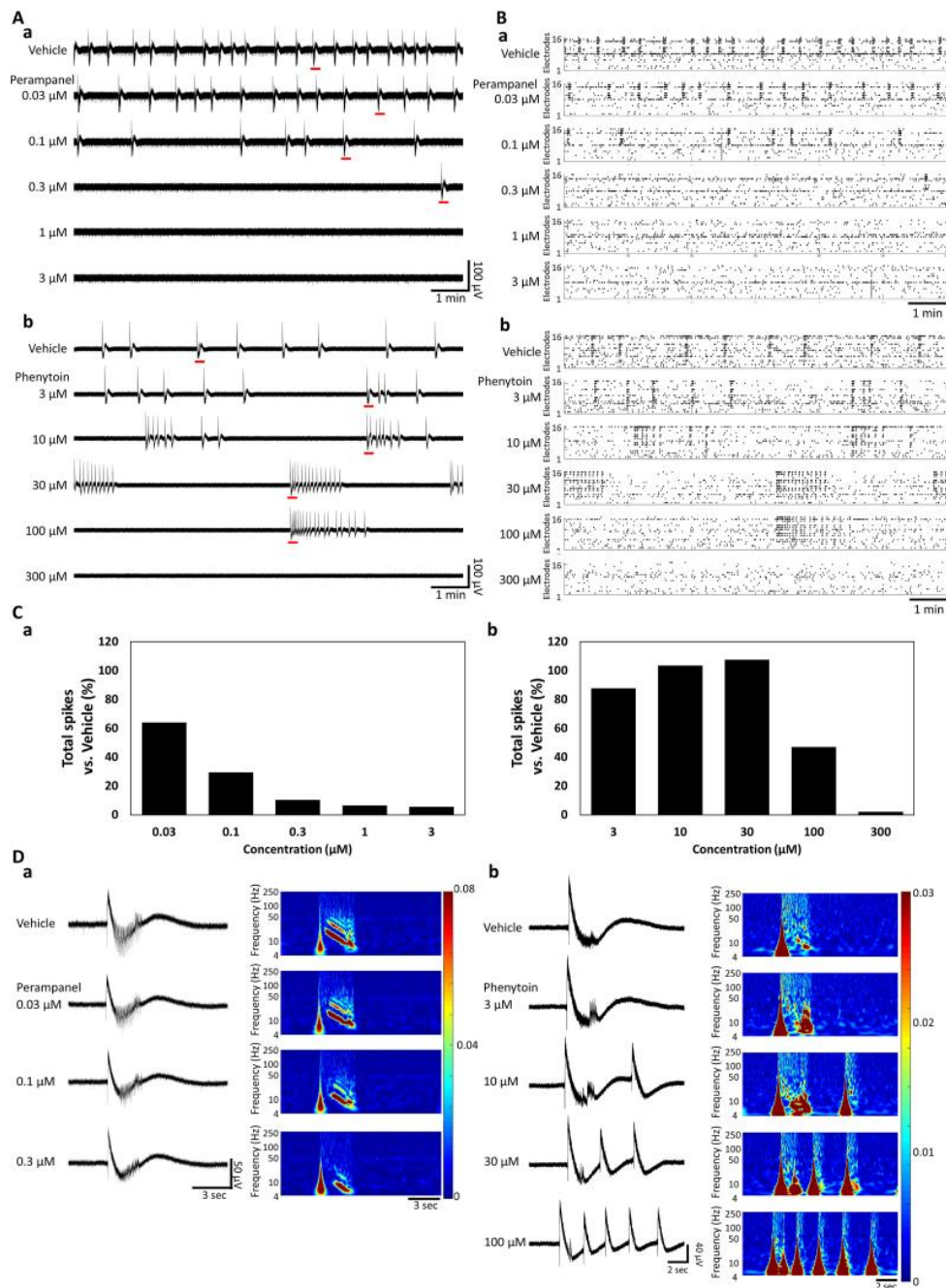


Figure 3-4. 培養4か月目の脳オルガノイドの抗てんかん薬(antiepileptic drugs ; AED)に対する応答。

(A) AED 投与後の10分間の自発活動生波形。(a) perampanel。(b) phenytoin。(B) AED 投与後の16電極/wellにおける10分間の典型的なラスタプロット。(a) perampanel。(b) phenytoin。(C) スパイク数の変化。(a) perampanel。(b) phenytoin。(D) Fig. 3-4A 赤線部分のオシレーションの周波数分析。AEDを投与後15秒の特徴的な生波形(左)と4~250 Hz帯のスカログラム(右)。(a) perampanel。(b) phenytoin。

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした医薬品の痙攣毒性評価

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした医薬品の痙攣毒性評価

4-1. 序論

神経創薬において、ターゲットとする神経疾患患者に対する候補化合物の安全性を評価することが重要である。健常者では毒性が認められないが、疾患患者では禁忌薬として報告されている薬が存在する。例えば、Na⁺チャンネルに欠損があることが知られているドラベ症候群では、Na⁺チャンネルに作用する化合物の投与は禁忌である。安全性薬理の分野において、このような疾患特異的な化合物応答を検出することができる評価系の構築が求められている。

ヒト iPS 細胞の開発により、様々な疾患患者由来の iPS 細胞が作製されている。脳神経系の疾患では、ドラベ症候群[63,64]やレット症候群[65,66]、アンジェルマン症候群[67,68]など難治性てんかん患者由来 iPS 細胞の作製が盛んに行われている。これらの疾患患者由来 iPS 細胞から神経細胞を作製することで、疾患メカニズムの解明や、疾患特異的なヒト由来 *in vitro* 評価系の構築が期待されている。その中でも近年開発された脳オルガノイド法[48]は、自己組織的に三次元の構造を再現し、疾患特異的な組織が作製できることから、より生体に近いサンプルとして *in vitro* 毒性評価系への応用が期待されている。現在、脳オルガノイドを用いた研究では、形態評価や遺伝子発現といったオルガノイド作製自体の評価[54-62]や、パッチクランプ法[59,61,122,132-135]や Ca²⁺イメージング[48,56,119,135,136]、平面微小電極アレイ(MEA)[70,71,119,120,122,124,132,136-143]を用いた電気活動計測が行われている。我々はこれまで MEA 計測法を用いて、大脳皮質オルガノイドの MEA 計測法の構築を行ってきた。痙攣陽性化合物であるベンチレンテトラゾールの投与による活動増強の検出、および従来の MEA 計測法で解析されてきたスパイク成分だけではなく、500 Hz 以下の低周波帯にオルガノイドの電気活動の特徴が現れることを見出してきた[144]。

ドラベ症候群は、難治性てんかん発作と認知機能障害を伴う発達性てんかん性脳症であり、ドラベ症候群患者の約 70%が Na⁺チャンネルの Nav1.1 をコードする SCN1A 遺伝子の変異がみられる[145]。Nav1.1 は抑制性のニューロンである介在ニューロンに多く発現していることが知られており[146,147]、抑制性入力が増加することでてんかん発作を引き起こされる。また、Na⁺チャンネルに障害があるため、Na⁺チャンネルをブロックすることで痙攣を抑制する phenytoin や carbamazepine、lamotrigine は発作を悪化させる可能性があり、禁忌薬とされている。Electroencephalography(EEG)の計測では、マウスモデルの成熟度に依存した周波数特性の違いや、熱誘発痙攣時の周波数特性の検出も行われている。例えば、ドラベ症候群のマウスモデルでは、発作が確認される前の幼児期には自発活動の周波数特性に健常と差異はなく、発作重症期では theta、alpha 波帯のパワーが弱くなることが報告されている[148]。さらに、発作時の EEG では、ラットモデルでは delta、theta

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした 医薬品の痙攣毒性評価

波のパワーが増強し[149]、マウスモデルでは alpha、beta 波帯のパワーが強くなる[150]ことが報告されている。

近年では、ドラベ症候群患者から iPSC が作製され、疾患 iPSC から分化された神経細胞の電気生理学的機能計測も行われている。パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能計測では、終脳の抑制性ニューロンの Na⁺電流や自発活動の減少、グルタミン酸作動性ニューロンの Na チャネルの活性化やそれに伴う活動の増加が報告されている[38]。また、軽度の熱性てんかん患者とドラベ症候群患者由来のグルタミン酸作動性ニューロンの過興奮の程度は、臨床での重症度と同様にドラベ症候群患者の方が深刻であることが患者由来 iPSC 細胞試験において報告されている[64]。さらに、ドラベ症候群患者由来 iPSC から作製した腹側前脳オルガノイドは、健常者由来オルガノイドと比較して、GABA 関連遺伝子である GAD67 と ABAT の発現レベルが上昇し、遺伝子発現の異常は、患者の重症度に依存していることが報告されている[69]。

ドラベ症候群脳オルガノイドで電気活動を指標とした禁忌薬の応答を検出できれば、ドラベ疾患患者に対する医薬品候補化合物の安全性試験や、疾患や患者ごとの至適化合物の選定といった個別化医療への応用につながる。そこで、本研究ではドラベ症候群患者由来 iPSC から大脳皮質オルガノイドを作製し、MEA 計測法を用いて禁忌薬に対する応答評価および波形の周波数特性の評価を行った。

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした 医薬品の痙攣毒性評価

4-2. 実験方法

4-2-1. ドラベ症候群患者及び健常者由来脳オルガノイドの培養

理化学研究所から取得した健常者由来ヒト iPSC (201B7) とドラベ症候群患者由来ヒト iPS 細胞 (HPS2834) は、それぞれ 6well ディッシュ上で StemFit (AK02N, Ajinomoto) を用いて培養された。細胞がコンフルエントになった後に、Gentle Cell Dissociation Reagent (ST-07174, STEMCELL Technologies) を使用して細胞を収集した。収集した細胞を室温で 800 rpm にて 5 分間遠心分離した。上清を取り除いた後、1 mL の EB seeding medium (10 mM Y-27632 を添加した EB formation medium) を添加し、細胞ペレットを再懸濁した。EB seeding medium を用いて iPSC を 9.0×10^3 cells/well で播種した。培養 2 日目、4 日目に 100 μ L/well の EB formation medium を添加した。培養 5 日目に、オルガノイドを観察し、球形のサンプルを選択した。選択したサンプルを EB formation medium から induction medium に置換し、2 日間インキュベートした。培養 7 日目に、Matrigel (354,277, Corning) で包埋し、expansion medium で 3 日間インキュベートした。その後、expansion medium を maturation medium に置換し、オービタルシェイカー (COSH6, AS ONE Corporation) 上でオルガノイドを培養した。オルガノイドは、maturation medium で 3 か月間培養され、培地は、3~4 日ごとに交換された。オルガノイドの形成には、STEMdiff Cerebral Organoid Kit (ST-08570, STEMCELL Technologies) の培地を使用した。

4-2-2. 免疫化学染色

培養した脳オルガノイドは、4% paraformaldehyde を含む PBS を用いて固定された。固定したサンプルを Optimal Cutting Temperature Compound (45833, Sakura Finetek Japan) に包埋し、クライオスタット (CM 1950, Leica) を使用して厚さ 10 μ m の切片を作製した。オルガノイド切片を透過処理し、preblock buffer でインキュベートした。その後、一次抗体を添加した preblock buffer を加えて 4°C で 12 時間インキュベートした。一次抗体は、anti- β -Tubulin III (60052, STEMCELL Technologies)、anti-ctip2 (ab18465, abcam) を使用した。免疫標識は、anti-rat 647 Alexa Fluor (ab150155, abcam)、anti-mouse 546 Alexa Fluor (A10036, Thermo Fisher Scientific Inc.) を preblock buffer で 1000 倍希釈して室温で 1 時間インキュベートした。また、1 μ g/mL の Hoechst 33258 (H341, DOJINDO) を室温で 1 時間インキュベートし、細胞核を染色した。

4-2-3. MEA 計測

培養 5-6 か月の大脳皮質オルガノイドを 24 well MEA プレートにマウントした。MEA 上でオルガノイドを 10 分間静置した後に自発活動を計測した。計測は、24 well MEA システム (Presto; Alpha Med Scientific Inc.) を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 20 kHz のサンプリングで行った。

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした 医薬品の痙攣毒性評価

4-2-4. 薬理試験

作製したドラベ症候群患者由来脳オルガノイドで禁忌薬の応答を検出できるか調べるために、培養 5~6 か月の脳オルガノイドに carbamazepine (CBZ ; 034-23701、Wako) と phenytoin (PHT ; PHR-1139-1G、Sigma-Aldrich、治療薬である sodium valproate (VPA ; 197-09722、Wako) を投与した。各化合物の各用量において、自発活動を 30 分間計測した。各試験は、CBZ; Control: n=4, Dravet: n=6, PHT; Control: n=4, Dravet: n=5, VPA; Control: n=5, Dravet: n=6 で行った。

4-2-5. CMOS MEA を用いた疾患脳オルガノイドの計測

我々は、電極サイズ $11.22 \mu\text{m} \times 11.22 \mu\text{m}$ ($126 \mu\text{m}^2$)、23,6880 電極、計測可能面積 32.8mm^2 の CMOS-MEA を用いた Field potential imaging (FPI) 法を提案してきた[151]。培養 6 か月のドラベ症候群脳オルガノイドを CMOS-MEA system (Sony semiconductor solutions) にマウントし、5 % CO₂、37 °C 下で CBZ の投与試験を行った (n=1)。各用量で 3 分間の電気活動を計測した。電気活動は、サンプリングレート 5 kHz で取得され、500 サンプルごとに最小二乗法によりトレンド除去によってオフセット補正された。電圧波形からピートマップを作製し、オシレーション時間を目視で検出した。オシレーション時に 100 μV 以上の振幅がみられた電極をアクティブ電極とした。また、オシレーション時のアクティブ電極の平均波形をオシレーション波形とし、個々の電極の波形とのコサイン類似度が 0.25 を超えたものをオシレーション電極とした。コサイン類似度の算出には下記の式を用いた。

$$\text{cosine similarity} = \frac{\sum_{i=1}^N (A_i \times B_i)}{\sqrt{\sum_{i=1}^N A_i^2} \times \sqrt{\sum_{i=1}^N B_i^2}}$$

この時の A はアクティブ電極の平均波形、B は 1 電極の波形、N は切り出したオシレーション波形のサンプリング数を示す。

4-2-6. オシレーションの検出

脳オルガノイドから取得した電圧の生波形に移動平均波形を算出した。移動平均波形から閾値を設定し、閾値を超えている区間をオシレーションとした。また、オシレーション区間のピーク値を Max. voltage として検出した。

4-2-7. 波形のポテンシャル解析

取得した 30 分の電気活動波形から、5 分に 1 回オシレーションを検出した。検出したオシレーション波形に FIR バンドパスフィルタを用いてゼロ位相フィルタ処理を行い、周波

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした 医薬品の痙攣毒性評価

数ごとに分割した。分割波形から各周波数帯のポテンシャルを算出した。解析した周波数帯は、delta (0.5~3 Hz)、theta (4~7 Hz)、alpha (8~11 Hz)、beta (12~29 Hz)、gamma (30~100 Hz)、high-gamma (100~150 Hz) である。

4-2-8. 統計解析

統計解析は、すべて one-way ANOVA および Holm-Bonferroni methods にて行った。薬理試験データは、control と dravet の各条件で、vehicle と各用量群の多重検定を行った。自発活動データは、周波数帯ごとに control 群と dravet 群の検定を行った。

4-3. 結果

4-3-1. ドラベ症候群患者由来脳オルガノイドの作製

作製した脳オルガノイドの神経細胞の分化特性を調べるために、免疫化学染色を行った [Fig. 3-1A(a)]。スライスした脳オルガノイドは、細胞核のマーカである Hoechst 33258、ニューロンのマーカである β -Tubulin III、皮質マーカである *ctip2* を用いて染色した。免疫化学染色により、 β -Tubulin III と *ctip2* が脳オルガノイドで発現していることが確認された。この結果は、作製した脳オルガノイドは発達中のヒト大脳皮質の *in vitro* モデルにおける基本的な要素を含むことを示しており、ヒト大脳皮質オルガノイドが機能的な構造を有することを示唆している。

作製した脳オルガノイドを、おもり無しで 24-well MEA plate 上にマウントし、電気活動計測を行った (Fig. 1B)。Control とドラベ症候群 (DS) オルガノイドの代表的なオシレーション波形を Fig. 1C に示す。16 electrodes/well で取得した電圧波形の中から、well ごとに最も振幅が高い電極を選択して解析を行った。

4-3-2. ドラベ症候群患者由来脳オルガノイドにおける禁忌薬の応答評価

ドラベ症候群患者由来脳オルガノイドで禁忌薬の応答を検出できるか検証するために、禁忌薬である CBZ と PHT、治療薬である VPA の投与試験を行った。各化合物に対するオシレーション頻度とオシレーション時の最大電圧値 (Max. voltage) を解析した。MEA で取得される電気信号は、複数の神経細胞活動の総和であるため、Max. voltage はオシレーションの活動強度を示す。CBZ では、30 μ M まで、健常とドラベ症候群でオシレーション頻度の用量依存的な増加がみられた。100 μ M 時は、健常では 51.2% \pm 5.31% ($p < 0.01$, one-way ANOVA and Holm-Bonferroni methods) に有意に減少したが、ドラベ症候群では 248 \pm 41.2% ($p < 0.01$) に顕著に増加し、健常とドラベ症候群の応答に有意差がみられた [Fig. 4-1D(b)]。Max. voltage は、健常では 3 μ M から 41.1 \pm 18.2% ($p < 0.01$) に顕著に減少したが、ドラベ症候群では 100 μ M でも 67.1 \pm 4.27% までしか減少しなかった [Fig. 4-1D(c)]。Max. voltage は 3 μ M から健常とドラベ症候群に有意差がみられた ($p < 0.01$)。ドラベ症候群では、オシレーションの振幅を保ちながら、頻度が増加していた。PHT 投与では、健常、ドラベ症候群ともにオシレーション頻度は用量依存的に上昇したが、300 μ M 時の応答は健常とドラベ症候群に有意差がみられた [$p < 0.01$, Fig. 4-1E(b)]。Max. voltage は、健常のみ 300 μ M 投与時に 25.2 \pm 6.66% に顕著に減少した [$p < 0.05$, Fig. 4-1E(c)]。CBZ 投与時と同様に、ドラベ症候群はオシレーションの振幅を保ちながら、頻度が増加していた。治療薬である VPA 投与では、10 mM で健常では 7.64 \pm 2.12% ($p < 0.01$)、ドラベ症候群では 4.69 \pm 3.31% ($p < 0.01$) にオシレーション頻度が有意に減少した [Fig. 4-1F(b)]。Max. voltage は、健常、ドラベ症候群ともに用量依存的に減少した [Fig. 4-1F(c)]。治療薬であ

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした 医薬品の痙攣毒性評価

る VPA 投与では、健常とドラベ症候群の応答に有意な差はみられなかった。一方、禁忌薬である CBZ と PHT を投与したドラベ症候群脳オルガノイドは、オシレーションの振幅を保ちながらオシレーション頻度が上昇する禁忌薬の応答を示した。

4-3-3. CMOS MEA を用いたドラベ症候群脳オルガノイドの禁忌薬に対する応答評価

High density (HD) -CMOS MEA は、空間分解能が高く、計測可能範囲が大きいため、MEA 基板との接着面における脳オルガノイド活動を詳細に計測することが可能である [151-153]。我々は、電極サイズ $11.22 \mu\text{m} \times 11.22 \mu\text{m}$ ($127 \mu\text{m}^2$)、236,880 電極の CMOS-MEA を用いた Field potential imaging (FPI) 法を提案してきた [151]。CMOS MEA 上にドラベ症候群脳オルガノイドをマウントし、CBZ の累積投与試験を行った。CMOS MEA で計測したドラベ症候群脳オルガノイドの典型的なオシレーション活動動画を supplement fig.1 に示す。79,729 電極がオルガノイドと接着し、約 11.0mm^2 の範囲の活動が、空間分解能 $1.4 \text{mm}^2/\text{electrode}$ で計測された。オルガノイドの右側部分でオシレーションが顕著に観察され、Fig2A は、オシレーション後 400ms 間の最大電圧値のヒートマップを示す。CBZ $30 \mu\text{M}$ 以上で、オシレーション活動エリアが減少し、 $300 \mu\text{M}$ ではオシレーションの持続時間も減少した。しかしながら、CBZ 投与により常に活動する領域がみられるようになった (Fig. 4-2A 下部)。オシレーション時に $100 \mu\text{V}$ 以上の振幅がみられた電極をアクティブ電極とした。アクティブ電極数は CBZ 投与により、有意差は見られなかったものの用量依存的に増加した [Fig. 4-2B (a)]。この結果は、CBZ により、オルガノイドの活動エリアが上昇したことを示している。オシレーション時のアクティブ電極の平均波形をオシレーション波形とし、個々の電極の波形とのコサイン類似度が 0.25 を超えたものをオシレーション電極、それ以外を非オシレーション電極とした。アクティブ電極数中のオシレーション電極と非オシレーション電極の割合を Fig. 4-2B(b) に示す。非オシレーション電極数の割合は用量依存的に上昇し、vehicle 投与時の $74.5 \pm 3.59\%$ から、 $300 \mu\text{M}$ 投与時には $95.8 \pm 1.21\%$ に増加した [Fig. 4-2B (b)]。つまり、オルガノイドの活動の上昇は、オシレーション以外の活動エリアの増強によることを示している。CMOS MEA を用いることで、ドラベ症候群脳オルガノイドにおいて、CBZ はオシレーション活動以外の活動を増強させることも分かった。

4-3-4. ドラベ症候群脳オルガノイドの周波数特性

スパイク成分とは異なる delta (0.5-3 Hz)、theta (4-7 Hz)、alpha (8-11 Hz)、beta (12-29 Hz)、gamma (30-100 Hz)、High-gamma (100-150 Hz) 波帯のポテンシャルを算出した。周波数ごとの典型的なオシレーション波形を Fig. 4-3A に示す。ドラベ症候群脳オルガノイドでは、健常者オルガノイド比べて theta、alpha、beta 波帯でオシレーションパワーが強かった [theta 波: $0.590 \pm 0.0319 \mu\text{V}$ (Dravet syndrome) > $0.203 \pm 0.0123 \mu\text{V}$ (Control), alpha 波: $0.391 \pm 0.0205 \mu\text{V}$ (Dravet syndrome) > $0.140 \pm 0.00463 \mu\text{V}$ (Control), beta

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした 医薬品の痙攣毒性評価

波： $0.598 \pm 0.0325 \mu\text{V}$ (Dravet syndrome) $> 0.274 \pm 0.00593 \mu\text{V}$ (Control) , $p < 0.01$, one-way ANOVA and Holm–Bonferroni methods, Fig. 4-3A and B)。一方、delta、gamma、High-gamma 波帯は、健常者に比べて弱いパワーを示した [delta 波： $4.87 \pm 0.156 \mu\text{V}$ (Dravet syndrome) $< 18.9 \pm 1.10 \mu\text{V}$ (Control) , gamma 波： $0.448 \pm 0.00836 \mu\text{V}$ (Dravet syndrome) $< 0.532 \pm 0.0109 \mu\text{V}$ (Control) , high-gamma 波： $0.231 \pm 0.00198 \mu\text{V}$ (Dravet syndrome) $< 0.366 \pm 0.00752 \mu\text{V}$ (Control) , one-way ANOVA and Holm–Bonferroni methods, Fig. 4-3A and B)。

次に、抗てんかん薬に対する周波数特性の変化を調べた (Fig. 4-4)。ドラベ症候群は、CBZ 3,10,30 μM 投与において、健常者に比べて、 δ 波～High gamma 派成分の変動が弱かった。健常オルガノドでオシレーションが消失した 300 μM では各周波数帯で減少が認められた (one-way ANOVA and Holm–Bonferroni methods, Fig. 4, left)。PHT 投与では、健常では 30 μM から theta 波帯以外のポテンシャルが減少したが、ドラベ症候群は beta 波以外でのポテンシャルの減少はみられなかった (Fig. 4, middle)。VPA 投与では、健常では有意差はみられないものの、0.1 mM から周波数強度の減少が見られたが、ドラベ症候群は 3mM から変化が見られ、10 mM 投与時には、delta 波、theta 波、beta 波のポテンシャルが有意に減少した (one-way ANOVA and Holm–Bonferroni methods, Fig. 4, right)。まとめると、ドラベ症候群脳オルガノイドは、特に抗てんかん薬の低用量において、健常オルガノイドと比べて周波数成分の変化が弱い傾向を有していた。治療薬である VPA に対しては、高用量で複数の周波数帯においてポテンシャルの減少がみられた。

4-4. 考察

本研究では、ドラベ症候群患者由来大脳皮質オルガノイドを作製し、禁忌薬と治療薬の応答と周波数特性を MEA 計測にて調べた。

ドラベ症候群の禁忌薬である CBZ と PHT の急性投与では、健常、ドラベ症候群ともにオシレーション頻度の上昇がみられた。しかしながら、ドラベ症候群では、ピーク電圧値を維持したままオシレーション頻度が上昇するという健常とは異なる応答を示した (Fig. 4-2D and DE)。また、CBZ 投与では、健常でオシレーション活動がみられなくなった 300 μ Mでもオシレーション活動がみられた。この結果は、ドラベ症候群オルガノイドを用いた禁忌薬の顕著な応答を示している。一方、治療薬である VPA では、ドラベ症候群と健常の応答に差異は見られず、10 mM 用投与時にオシレーション頻度と Max. voltage が減少した [Fig. 4-2F]。本結果から、ドラベ症候群オルガノイドの MEA 計測において、禁忌薬の応答を検出できたと言える。また、脳オルガノイドの抗てんかん作用はオシレーションの振幅の減少に現れると考えられる。臨床でも、てんかん患者に対する CBZ 投与により、光刺激に対する発作の減少と共に脳波波形の振幅が減少することが報告されている [154]。

CBZ の投与の CMOS-MEA 計測の結果、オシレーション活動以外の増強がみられた [Fig. 4-2B(b)]。ドラベ症候群マウスモデルの ECoG において、CBZ 投与による発作時以外のスパイク活動が増強することが報告されている [155]。本研究で見られた応答はマウスモデルでの応答を反映している可能性がある。

ドラベ症候群脳オルガノイドの自発活動のオシレーションは、健常オルガノイドと比較して、theta、alpha、beta 波帯が強く、delta、gamma、High-gamma 波帯が弱かった (Fig. 4-3B)。6 歳以上のドラベ症候群患者の EEG 計測では、健常者と比較して、発作間欠期の theta 波成分が強く、alpha 波成分が弱いという報告がある [156]。本研究で見られた、強い theta 波成分の結果と一部一致している。また、水玉模様のパターン刺激により発作が誘発されたドラベ症候群患者では、theta 波と beta 波の混合波がみられるという報告がある [157]。本研究で見られた強い theta 波と beta 波の成分は発作との関連があるのかもしれない。さらに、ドラベ症候群患者は、健常者と比較して、音刺激で誘発される gamma 波帯の活動が健常と比較して弱いことが報告されている [158]。本研究では、外部刺激はなかったものの、gamma 波帯の成分が弱かったことから、gamma 波成分の生成能力が弱いドラベ症候群患者の特性を反映している可能性が考えられる。皮質において、delta 波の活動は、パルブアルブミン介在ニューロンが関係しているとされている [159,160]。また、gamma 波以上の活動にも、GABA 作動性ニューロンがその発生と制御に関与していることが知られている [161-163]。ドラベ症候群は GABA 作動性ニューロンの活動が弱いため、delta、gamma、high-gamma 波帯のパワーが弱かった可能性がある。以上から、ドラベ症候群脳オルガノイドの自発活動の周波数特性は、ドラベ症候群の生体脳波での特徴を一部反映している可能性が示唆された。

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした 医薬品の痙攣毒性評価

抗てんかん薬に対する周波数特性の変化を調べたところ、ドラベ症候群脳オルガノイドは、抗てんかん薬に対する応答性が低いことが分かった (Fig. 4-4)。CBZ 投与により、健常者、てんかん患者の両方で、delta、theta 波帯の増強、alpha 波帯の減少が報告されている [164-170]。本研究で用いた脳オルガノイドでは delta、theta 波の増強はみられなかったが、alpha 波帯の減少がみられた。また、ドラベ症候群では、alpha 波帯の減少に、より高い用量が必要であった。健常者への PHT 投与時の EEG は、delta、theta、alpha 波の活動の変化が主に報告されているが、その増減はそれぞれの報告で異なっている [130,171,172]。また、てんかん患者への PHT 投与では、delta 波と theta 波帯の増強が報告されている [173]。ドラベ症候群脳オルガノイドでは、有意差は見られなかったが、delta 波が 30、100 μM で、theta 波が 10~100 μM で上昇した。この活動の増強は、てんかん患者特有の応答を示している可能性が考えられる。VPA では、健常はすべての周波数帯で、ドラベ症候群では delta から beta 波帯の減少がみられた。VPA は主に GABA 作動性ニューロンの増強により抗てんかん作用を示すことが知られている。GABA 作動性ニューロンの入力が増強が、ドラベ症候群で作用して複数の周波数帯の減少が見られたと考えられる。また、てんかん患者への VPA 投与では、主に delta~gamma 波帯の減少が報告されている [174-176]。ドラベ症候群脳オルガノイドでは、gamma 波帯の減少は見られなかったものの、臨床で見られる低周波帯の活動の減少がみられた。以上から、脳オルガノイドの抗てんかん薬に対する応答は、生体脳で見られる応答を一部反映している可能性が示唆された。

疾患患者 iPS 細胞から作製する脳オルガノイドは、同一疾患であっても、患者毎に特性は異なる。実際、複数のドラベ症候群患者由来 iPS 細胞から作製された脳オルガノイドでは、患者の重症度により GABA 関連遺伝子などの発現が異なることが報告されている。今後は、作製した脳オルガノイドの構造や遺伝子発現と電気生理学的活動の相関性を検証する必要がある。また、単一の疾患 iPS 細胞株のみでは、ドラベ症候群に対する抗てんかん薬の評価指標を同定することは難しいが、臨床では、患者ごとに抗てんかん薬に対する応答性が異なる。すなわち、本研究で実施した抗てんかん薬投与による周波数成分の解析結果は、患者毎に異なる可能性がある。今後、複数のドラベ症候群患者から作製された脳オルガノイドの抗てんかん薬のデータを周波数解析することで、本研究で実施した周波数成分の指標が至適抗てんかん薬を選定するパラメータになる可能性がある。

本研究では、ドラベ症候群大脳皮質オルガノイドの MEA 計測により、禁忌薬に対する応答を見出した。また、周波数解析により、生体脳波の周波数特性を一部反映している可能性を見出した。周波数解析を含めたドラベ症候群脳オルガノイドの MEA 計測法は、ドラベ症候群患者に対する医薬品の安全性評価、至適抗てんかん薬選定を可能とする個別化医療、抗てんかん薬のスクリーニング法として有効であると考えられる。

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした医薬品の痙攣毒性評価

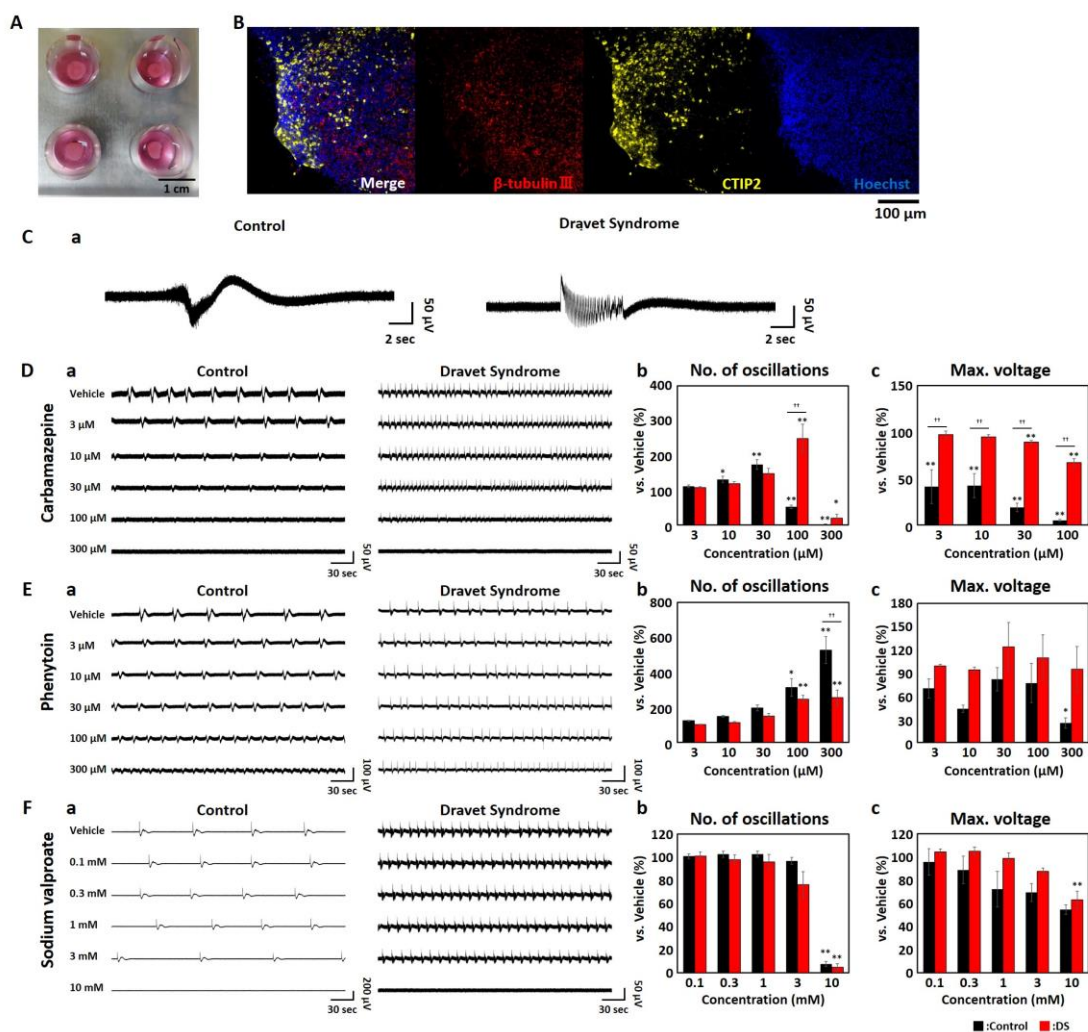


Figure 4-1. 培養5-6か月のドラベ症候群と健常脳オルガノイドの抗てんかん薬に対する応答

(A) MEA上にマウントされたドラベ症候群脳オルガノイド。(B) 培養8か月の脳オルガノイドの免疫化学染色画像。 β -tubulin III (赤)、CTIP2 (黄)、Hoechst 33258 (青)。

Scale bar=100 μ m。(C) 脳オルガノイドで観察された典型的なオシレーションパターン。

(a) Control。(b) Dravet syndrome。抗てんかん薬投与後15分間の活動波形とオシレーション頻度とMax. voltageの変化。化合物投与後30分の活動からオシレーションを検出し、頻度とピーク電圧の変化を調べた。Vehicleを100%として正規化した。各条件のvehicleとの比較と、健常とドラベ症候群のデータの比較は、one-way ANOVAとHolm-Bonferroni法を用いて行われた。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle, †† $p < 0.01$)。健常(黒)。ドラベ症候群(赤)。(D) carbamazepine。(a) 代表的な活動電位波形。(b) オシレーション頻度。(c) Max. voltage。(E) phenytoin。(a) 代表的な活動電位波形。(b) オシレーション頻度。(c) Max. voltage。(F) sodium valproate。(a) 代表的な活動電位波形。(b) オシレーション頻度。(c) Max. voltage。

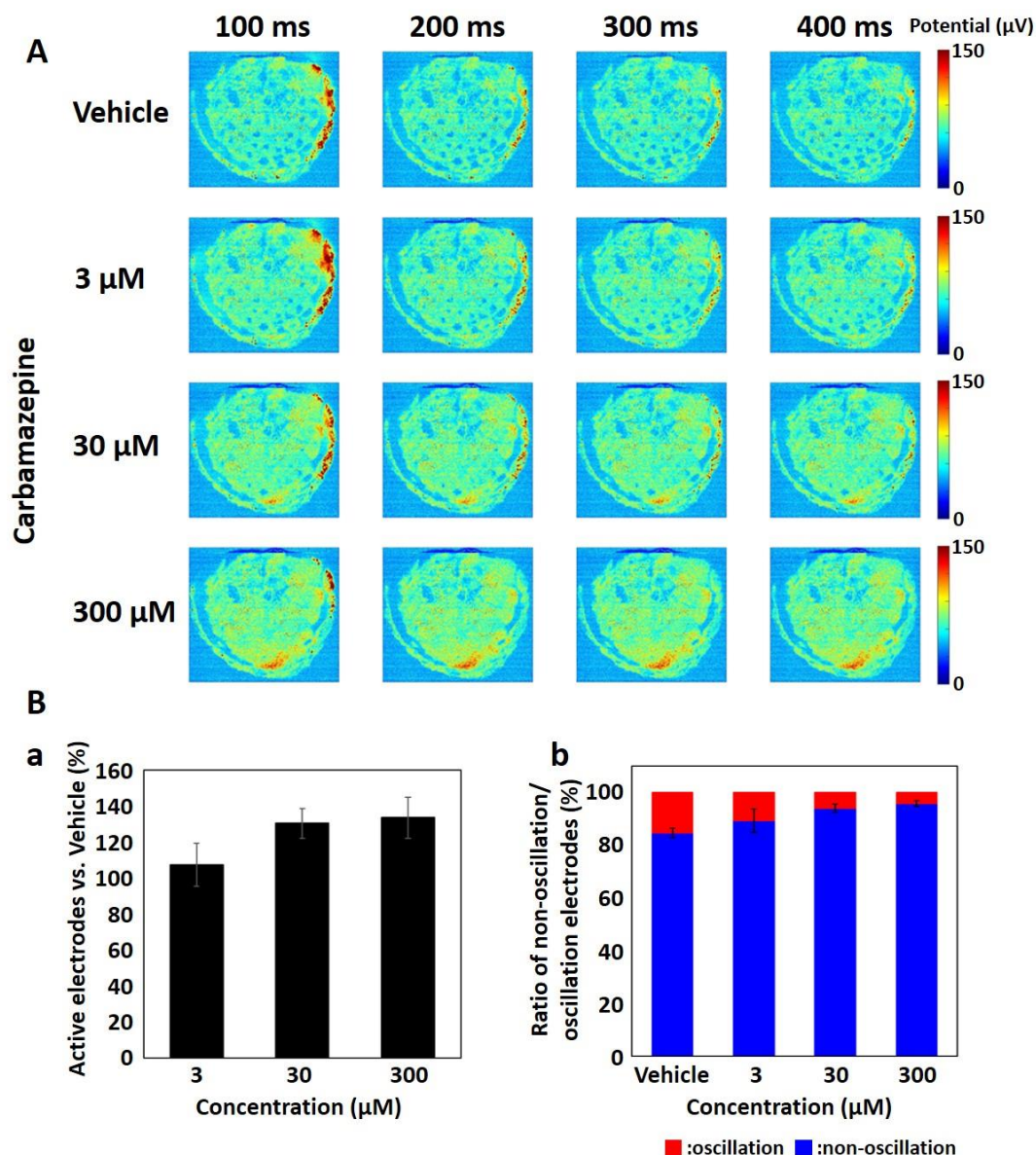


Figure 4-2. CMOS MEA を用いたドラベ症候群脳オルガノイドのCBZ に対する応答
(A) オシレーション時の自発活動電圧波形。
(B) CBZ 投与に対する応答。(a) アクティブ電極数。オシレーション時の最大電圧が $100 \mu\text{V}$ 以上の電極をアクティブ電極とした。Vehicle を 100% として正規化し、one-way ANOVA と Holm-Bonferroni 法にて検定を行った (* $p < 0.05$ vs. Vehicle)。(b) アクティブ電極数中のオシレーション電極と非オシレーション電極の割合。オシレーション時の全アクティブ電極の平均波形をオシレーション波形として、オシレーション波形とのコサイン類似度が 0.25 以上の電極をオシレーション電極、それ以外を非オシレーション電極とした。

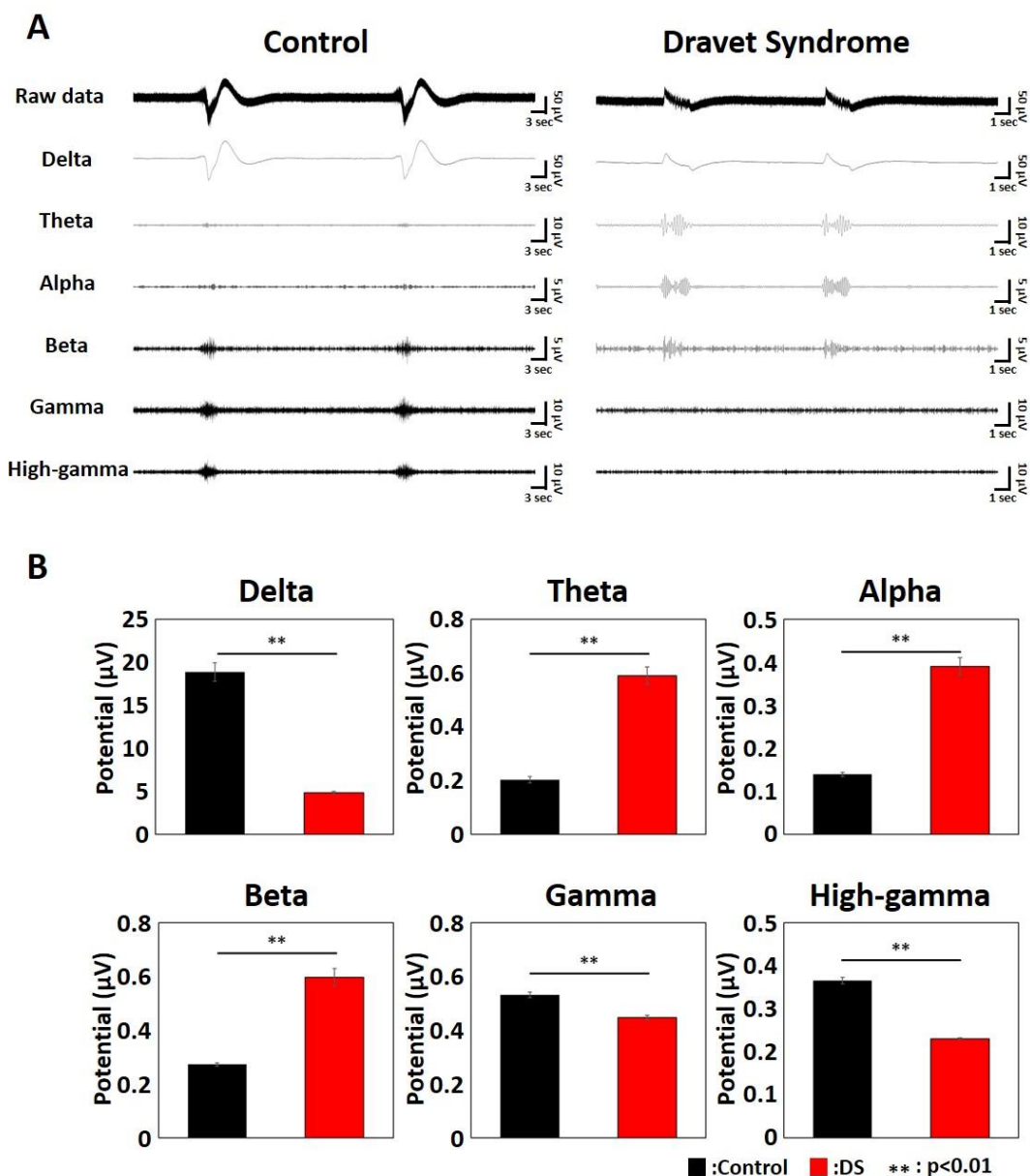


Figure 4-3. ドラベ症候群患者、健常者由来大脳皮質オルガノイドの抗てんかん薬に対する応答

(A) 周波数帯ごとの自発活動波形。上から、生波形、delta、theta、alpha、beta、gamma、high-gamma の波形。健常（左）。ドラベ症候群（右）。

(B) 周波数帯ごとのポテンシャル。培養 5-6 か月に行われた健常、ドラベ症候群の自発活動計測波形 (n=17) からオシレーションを検出し、各周波数帯のポテンシャルを算出した。健常とドラベ症候群の各周波数帯のポテンシャルに対し、one-way ANOVA と Holm-Bonferroni 法にて検定を行った (*p < 0.05、**p < 0.01)。健常（黒）。ドラベ症候群（赤）。

第4章 疾患脳オルガノイドを用いた疾患患者を対象とした
医薬品の痙攣毒性評価

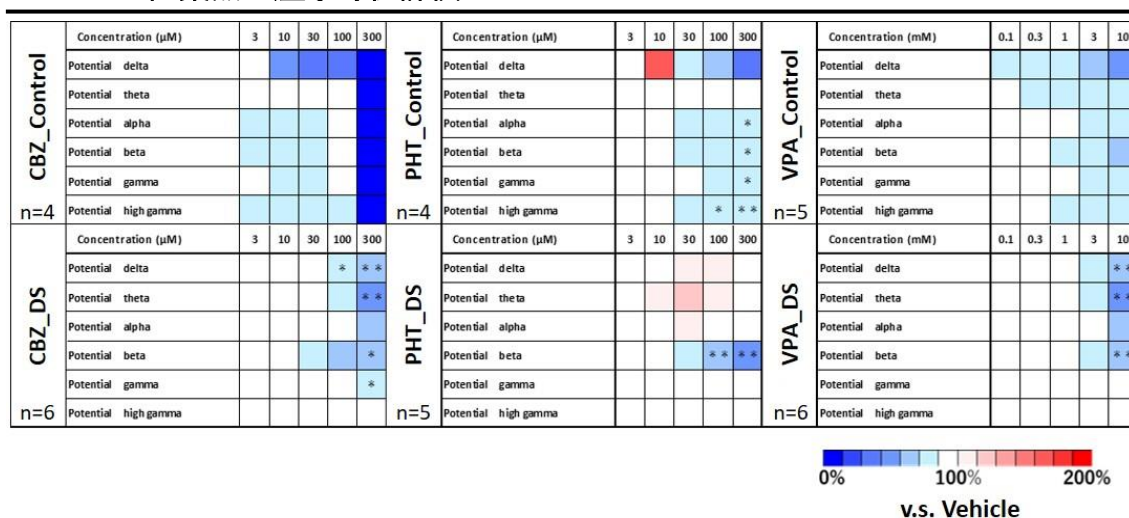


Figure 4-4. 抗てんかん薬に対する周波数ポテンシャルの変化。健常（上段）。ドラベ症候群（下段）。各周波数帯のポテンシャルの変化率ヒートマップを示す（CBZ：健常 n=4、ドラベ n=6、PHT：健常 n=4、ドラベ n=5、VPA：健常 n=5、ドラベ n=6）。Vehicle と比較して、赤が増加、青が減少を示す。検定は、one-way ANOVA と Holm-Bonferroni 法を用いて行われた。（*p < 0.05、**p < 0.01 vs. Vehicle）。

第5章 結言

第5章 結言

本研究ではヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSC) 由来中枢神経モデルを用いた医薬品候補化合物の痙攣毒性評価系の構築を目的として、二次元神経ネットワークの痙攣毒性評価に最適な興奮性と抑制性ニューロンのバランス(E/Iバランス)の同定を行った。また、三次元脳オルガノイドの MEA 計測法の構築を行い、ドラベ症候群患者由来脳オルガノイドの禁忌薬に対する応答を調べた。

第1章では、脳の E/I バランスの乱れにより引き起こされる痙攣毒性が医薬品候補化合物で頻繁にみられることから、前臨床試験の段階でヒトの痙攣毒性を高精度に予測可能な評価系の開発が必要であることを述べた。ヒト iPSC 由来ニューロンの MEA 計測による痙攣毒性評価において、計測サンプルに最適な E/I バランスが同定されていないことが課題であることを述べた。また、in vivo 外挿性に有効な手法として、生体での現象を再現できる三次元脳オルガノイドを用いた評価系の構築が期待されていることを述べた。さらに、疾患患者を対象とした痙攣毒性評価において、疾患特異的な応答を検出するために患者由来 iPSC 神経モデルが有効であることを述べた。最後に、本研究の目的と研究内容について述べた。

第2章では、ヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの E/I バランスに依存した痙攣陽性化合物の応答評価について述べた。

E/I バランスが 88/12(GABA12)、84/16(GABA16)、74/26(GABA26)、58/42(GABA42)、48/52(GABA52)の5種のヒト iPSC 由来神経ネットワークを構築した。自発活動において、スパイク数と network burst (NB)数、NBの振幅が E/I バランスにより異なっていた。

6種の痙攣陽性化合物に対する応答を、6つの解析パラメータを用いて評価した。GABA12では、GABA 受容体のアンタゴニストである picrotoxin と CGP35348 に対する顕著な応答がみられず、GABA 受容体に作用する化合物を評価するためには、評価サンプルの GABA 作動性ニューロンの比率が、少なくとも生体脳と同等以上である必要があることが示された。GABA52は、本研究で投与した6種の痙攣陽性化合物全てに対して有意な応答を示し、その応答は低用量から観察された。これらの結果は、GABA52の E/I バランスが痙攣陽性化合物に対して高い応答検出感度を有することを示している。しかし、同時に擬陽性を引き起こすリスクもあると考えられる。まったく同じ化合物応答を示す E/I バランスのサンプルはなかった。有意差を示した解析パラメータは E/I バランスに依存していたことから、化合物の有効性を評価するためには、それぞれの E/I バランスに適した解析パラメータを選出する必要があることが示された。

痙攣陽性化合物の応答を作用機序(mechanism of action; MoA)により分類するためにクラスタリング分析を行った。化合物応答性が最も高かった GABA52では、chlorpromazine と strychnine のみ MoA によって分類された。GABA52で見られた高い化合物応答性が MoA による分類を妨げたと考えられる。生体脳の E/I バランスに最も近い GABA16は、全ての痙攣陽性化合物がそれぞれ別のクラスターに分類された。さらに、GABA 受容体に作用す

第5章 結言

る picrotoxin、CGP 35348、chlorpromazine のクラスターは互いに隣接していた。本研究結果は、生体脳の E/I バランスに最も近い GABA16 が痙攣陽性化合物の MoA の分離において最も優れていることを示した。さらに、GABA16 は、他の E/I バランスと異なり、低用量の応答が単一のクラスターに分類された。この結果は、毒性用量を検出できる可能性を示しており、GABA16 が化合物の痙攣傾向の強さを決定できる比率であることが示唆された。

第2章では、E/I バランスが異なる5種類のヒト iPSC 由来神経ネットワークを構築し、痙攣陽性化合物に対する応答を評価した。応答が検出された解析パラメータは E/I バランスにより異なっており、評価サンプルに適した解析パラメータを特定する重要性を示唆している。生体脳の E/I バランスに最も近い GABA16 は、最も優れた MoA の分離能を示した。ヒト iPSC 由来ニューロンを使用した MEA 評価における化合物の痙攣応答検出及び、MoA の予測には、生体脳と同様の E/I バランスが最適であることを見出した。

第3章では、ヒト脳オルガノイドの MEA 計測法の構築について述べた。

痙攣陽性化合物である pentylenetetrazol (PTZ) 1 mM 以上の投与で、突発的発火した活動が持続する現象が見られた。これは、二次元培養神経ネットワークでは見られない特徴的な現象であった。PTZ 投与で、オシレーション波形の 10 Hz 未満の周波数強度が用量依存的に増加した。また、1 mM、3 mM、10 mM 投与時、60~460 Hz 帯の周波数成分が増強した。特に、100~300 Hz 帯域は、3 mM、10 mM 投与時に増強した。本研究結果から、脳オルガノイドの電気活動波形の 500 Hz 以下の周波数解析は、化合物の痙攣応答予測に有効な手法であると考えられる。

脳オルガノイドに対する perampanel 及び phenytoin の投与により、オシレーション後の 10~30 Hz 帯の周波数成分が減少した。perampanel と phenytoin により神経ネットワークのシナプス伝達が阻害されたことにより、再帰的な周波数成分の減少が見られたと考えられる。また、Perampanel ではスパイク頻度が減少したのみであったが phenytoin を投与では、増加が見られた。本結果から、作用機序の異なる抗てんかん薬の応答をヒト iPSC 由来脳オルガノイドで評価することが可能であることが分かった。

第3章の結果から、ヒト iPSC 由来脳オルガノイドの MEA 計測では、500 Hz 以下の周波数解析が有効であることが明らかになった。

第4章では、ドラベ症候群患者由来 iPSC から作製した脳オルガノイドの禁忌薬に対する応答評価について述べた。

ドラベ症候群の禁忌薬である carbamazepine (CBZ) と phenytoin (PHT) の急性投与では、健常、ドラベ症候群ともにオシレーション頻度の上昇がみられた。しかしながら、ドラベ症候群では、ピーク電圧値を維持したままオシレーション頻度が上昇するという健常とは異なる応答を示した。この結果は、ドラベ症候群オルガノイドを用いた禁忌薬の顕著な応答を示している。一方、治療薬である sodium valproate (VPA) では、ドラベ症候群と健常の応答に差異は見られなかった。本結果から、ドラベ症候群オルガノイドの MEA 計測において、禁忌薬の応答を検出できたとと言える。また、脳オルガノイドの抗てんかん作用はオン

第5章 結言

レーションの振幅の減少に現れると考えられる。臨床でも、てんかん患者に対する CBZ 投与により、光刺激に対する発作の減少と共に脳波波形の振幅が減少することが報告されている。

CBZ の投与の CMOS-MEA 計測の結果、オシレーション活動以外の増強がみられた。ドラベ症候群マウスモデルの electrocorticography において、CBZ 投与による発作時以外のスパイク活動が増強することが報告されている。本研究で見られた応答はマウスモデルでの応答を反映している可能性がある。

ドラベ症候群脳オルガノイドの自発活動オシレーションは、健常と比較して、theta、alpha、beta 波帯が強く、delta、gamma、High-gamma 波帯が弱かった。ドラベ症候群患者の electroencephalography (EEG) 計測では、健常者と比較して、発作間欠期の theta 波成分が強く、alpha 波成分が弱いという報告と一部一致している。また、パターン刺激により誘発された発作では、theta 波と beta 波の混合波がみられるという報告がある。本研究で見られた強い theta 波と beta 波の成分は発作との関連があるのかもしれない。さらに、ドラベ症候群患者は、健常者と比較して、音刺激で誘発される gamma 波帯の活動が健常と比較して弱いことが報告されている。本研究では、外部刺激はなかったものの、gamma 波帯の成分が弱かったことから、生体での gamma 波成分の生成能力が弱いドラベ症候群患者の特性を反映している可能性が考えられる。ヒト脳において、delta 波の活動は、パルブアルブミン介在ニューロンが関係しているとされている。また、gamma 波以上の活動にも、GABA 作動性ニューロンがその発生と制御に関与していることが知られている。ドラベ症候群は GABA 作動性ニューロンの活動が弱いため、delta、gamma、high-gamma 波帯のパワーが弱かった可能性がある。以上から、ドラベ症候群脳オルガノイドの自発活動の周波数特性は、ドラベ症候群の生体脳波での特徴を一部反映している可能性が示唆された。

抗てんかん薬に対する周波数特性の変化を調べたところ、ドラベ症候群脳オルガノイドは、抗てんかん薬に対する応答性が低いことが分かった。CBZ 投与により、健常者、てんかん患者の両方で、delta、theta 波帯の増強、alpha 波帯の減少が報告されている。脳オルガノイドでは delta、theta 波の増強はみられなかったが、alpha 波帯の減少がみられた。てんかん患者への PHT 投与では、delta 波と theta 波帯の増強が報告されている。ドラベ症候群脳オルガノイドでは、有意差は見られなかったが、中用量で delta 波と theta 波が上昇した。この活動の増強は、てんかん患者特有の応答を示している可能性が考えられる。VPA では、ドラベ症候群脳オルガノイドで、臨床で見られる低周波帯の活動の減少がみられた。以上から、脳オルガノイドの抗てんかん薬に対する応答は、生体脳で見られる応答を一部反映している可能性が示唆された。

第4章では、ドラベ症候群大脳皮質オルガノイドの MEA 計測により、禁忌薬に対する応答を見出した。また、周波数解析により、生体脳波の周波数特性を一部反映している可能性を見出した。

本研究では、ヒト iPSC 由来中枢神経モデルを用いた医薬品候補化合物の痙攣毒性評価系

第5章 結言

の構築を目的として研究を行った。二次元培養において、生体バランスに最も近い 84/16 のサンプルが、痙攣毒性検出および作用機序予測に最適であることを見出し、三次元脳オルガノイドの MEA 計測および痙攣毒性評価において、低周波解析が有効であることを見出した。また、ドラベ症候群脳オルガノイドで禁忌薬の応答が検出され、また、一部 *in vivo* を反映する周波数の特徴を見出した。再現性の高い脳オルガノイドの作製法の開発や、患者ごとの特徴検出などの課題はあるものの、本研究で得られた知見は、患者に対する医薬品の安全性評価、至適抗てんかん薬選定を可能とする個別化医療、抗てんかん薬のスクリーニング法として有効であると考えられる。

参考文献

参考文献

1. Cook, D.; Brown, D.; Alexander, R.; March, R.; Morgan, P.; Satterthwaite, G.; Pangalos, M.N. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nature reviews. Drug discovery* **2014**, *13*, 419-431, doi:10.1038/nrd4309.
2. Authier, S.; Arezzo, J.; Delatte, M.S.; Kallman, M.J.; Markgraf, C.; Paquette, D.; Pugsley, M.K.; Ratcliffe, S.; Redfern, W.S.; Stevens, J.; et al. Safety pharmacology investigations on the nervous system: An industry survey. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **2016**, *81*, 37-46, doi:10.1016/j.vascn.2016.06.001.
3. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell* **2006**, *126*, 663-676.
4. Hartfield, E.M.; Yamasaki-Mann, M.; Ribeiro Fernandes, H.J.; Vowles, J.; James, W.S.; Cowley, S.A.; Wade-Martins, R. Physiological characterisation of human iPS-derived dopaminergic neurons. *PloS one* **2014**, *9*, e87388.
5. Vazin, T.; Ball, K.A.; Lu, H.; Park, H.; Ataeijannati, Y.; Head-Gordon, T.; Poo, M.-m.; Schaffer, D.V. Efficient derivation of cortical glutamatergic neurons from human pluripotent stem cells: a model system to study neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease* **2014**, *62*, 62-72.
6. DeRosa, B.A.; Belle, K.C.; Thomas, B.J.; Cukier, H.N.; Pericak-Vance, M.A.; Vance, J.M.; Dykxhoorn, D.M. hVGAT-mCherry: A novel molecular tool for analysis of GABAergic neurons derived from human pluripotent stem cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* **2015**, *68*, 244-257.
7. Iida, S.; Shimba, K.; Sakai, K.; Kotani, K.; Jimbo, Y. Synchronous firing patterns of induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons depend on the network structure consisting of excitatory and inhibitory neurons. *Biochemical and biophysical research communications* **2018**, *501*, 152-157.
8. Yu, D.X.; Di Giorgio, F.P.; Yao, J.; Marchetto, M.C.; Brennand, K.; Wright, R.; Mei, A.; Mchenry, L.; Lisuk, D.; Grasmick, J.M. Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem cell reports* **2014**, *2*, 295-310.
9. Shi, Y.; Kirwan, P.; Smith, J.; Robinson, H.P.; Livesey, F.J. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nature neuroscience* **2012**, *15*, 477-486.
10. Bergström, P.; Agholme, L.; Nazir, F.H.; Satir, T.M.; Toombs, J.; Wellington, H.; Strandberg, J.; Bontell, T.O.; Kvartsberg, H.; Holmström, M. Amyloid precursor protein expression and processing are differentially regulated during cortical neuron differentiation. *Scientific reports* **2016**, *6*, 29200.

参考文献

11. Pei, Y.; Peng, J.; Behl, M.; Sipes, N.S.; Shockley, K.R.; Rao, M.S.; Tice, R.R.; Zeng, X. Comparative neurotoxicity screening in human iPSC-derived neural stem cells, neurons and astrocytes. *Brain research* **2016**, *1638*, 57-73.
12. Wheeler, H.E.; Wing, C.; Delaney, S.M.; Komatsu, M.; Dolan, M.E. Modeling chemotherapeutic neurotoxicity with human induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells. *PloS one* **2015**, *10*, e0118020.
13. Ohara, R.; Imamura, K.; Morii, F.; Egawa, N.; Tsukita, K.; Enami, T.; Shibukawa, R.; Mizuno, T.; Nakagawa, M.; Inoue, H. Modeling drug - induced neuropathy using human iPSCs for predictive toxicology. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2017**, *101*, 754-762.
14. Balez, R.; Steiner, N.; Engel, M.; Muñoz, S.S.; Lum, J.S.; Wu, Y.; Wang, D.; Vallotton, P.; Sachdev, P.; O'Connor, M. Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. *Scientific reports* **2016**, *6*, 31450.
15. Ishii, M.N.; Yamamoto, K.; Shoji, M.; Asami, A.; Kawamata, Y. Human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons respond to convulsant drugs when co-cultured with hiPSC-derived astrocytes. *Toxicology* **2017**, *389*, 130-138, doi:10.1016/j.tox.2017.06.010.
16. Odawara, A.; Saitoh, Y.; Alhebshi, A.; Gotoh, M.; Suzuki, I. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochemical and biophysical research communications* **2014**, *443*, 1176-1181.
17. Odawara, A.; Katoh, H.; Matsuda, N.; Suzuki, I. Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture. *Scientific reports* **2016**, *6*, 26181.
18. Ojima, A.; Miyamoto, N. Method for MEA data analysis of drug-treated rat primary neurons and human iPSC-derived neurons to evaluate the risk of drug-induced seizures. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* **2018**, *138*, 823-828.
19. Bosca, A.; Martina, M.; Py, C. Planar patch clamp for neuronal networks—Considerations and future perspectives. *Patch-Clamp Methods and Protocols* **2014**, 93-113.
20. Franz, D.; Olsen, H.L.; Klink, O.; Gimsa, J. Automated and manual patch clamp data of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons. *Scientific data* **2017**, *4*, 1-11.
21. Pacico, N.; Mingorance-Le Meur, A. New in vitro phenotypic assay for epilepsy: fluorescent measurement of synchronized neuronal calcium oscillations. *PloS one* **2014**, *9*, e84755.

参考文献

22. Obien, M.E.J.; Deligkaris, K.; Bullmann, T.; Bakkum, D.J.; Frey, U. Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Frontiers in neuroscience* **2015**, *8*, 423.
23. Black, B.J.; Atmaramani, R.; Pancrazio, J.J. Spontaneous and evoked activity from murine ventral horn cultures on microelectrode arrays. *Frontiers in cellular neuroscience* **2017**, *11*, 304.
24. Toivanen, M.; Pelkonen, A.; Mäkinen, M.; Ylä-Outinen, L.; Sukki, L.; Kallio, P.; Ristola, M.; Narkilahti, S. Optimised PDMS tunnel devices on MEAs increase the probability of detecting electrical activity from human stem cell-derived neuronal networks. *Frontiers in neuroscience* **2017**, *11*, 606.
25. Bradley, J.A.; Luithardt, H.H.; Metea, M.R.; Strock, C.J. In vitro screening for seizure liability using microelectrode array technology. *Toxicological Sciences* **2018**, *163*, 240-253.
26. Grainger, A.I.; King, M.C.; Nagel, D.A.; Parri, H.R.; Coleman, M.D.; Hill, E.J. In vitro models for seizure-liability testing using induced pluripotent stem cells. *Frontiers in Neuroscience* **2018**, *12*, 590.
27. Kayama, T.; Suzuki, I.; Odawara, A.; Sasaki, T.; Ikegaya, Y. Temporally coordinated spiking activity of human induced pluripotent stem cell-derived neurons co-cultured with astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **2018**, *495*, 1028-1033.
28. Kreir, M.; Van Deuren, B.; Versweyveld, S.; De Bondt, A.; Van den Wyngaert, I.; Van der Linde, H.; Lu, H.; Teuns, G.; Gallacher, D. Do in vitro assays in rat primary neurons predict drug-induced seizure liability in humans? *Toxicology and Applied Pharmacology* **2018**, *346*, 45-57.
29. Ryyänen, T.; Toivanen, M.; Salminen, T.; Ylä-Outinen, L.; Narkilahti, S.; Lekkala, J. Ion beam assisted E-beam deposited TiN microelectrodes—applied to neuronal cell culture medium evaluation. *Frontiers in neuroscience* **2018**, *12*, 882.
30. Ishibashi, Y.; Odawara, A.; Kinoshita, K.; Okamura, A.; Shirakawa, T.; Suzuki, I. Principal component analysis to distinguish seizure liability of drugs in human iPS cell-derived neurons. *Toxicological Sciences* **2021**, *184*, 265-275.
31. Matsuda, N.; Kinoshita, K.; Okamura, A.; Shirakawa, T.; Suzuki, I. Histograms of frequency-intensity distribution deep learning to predict the seizure liability of drugs in electroencephalography. *Toxicological Sciences* **2021**, *182*, 229-242.
32. Sasaki, T.; Suzuki, I.; Yokoi, R.; Sato, K.; Ikegaya, Y. Synchronous spike patterns in differently mixed cultures of human iPSC-derived glutamatergic and GABAergic neurons. *Biochemical and biophysical research communications* **2019**, *513*, 300-305.
33. Yuan, X.; Schröter, M.; Obien, M.E.J.; Fiscella, M.; Gong, W.; Kikuchi, T.; Odawara, A.; Noji, S.; Suzuki, I.; Takahashi, J. Versatile live-cell activity analysis platform for characterization of neuronal dynamics at single-cell and network level. *Nature*

参考文献

- communications* **2020**, *11*, 4854.
34. Thomas, C.A., Jr.; Springer, P.A.; Loeb, G.E.; Berwald-Netter, Y.; Okun, L.M. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental cell research* **1972**, *74*, 61-66, doi:10.1016/0014-4827(72)90481-8.
 35. Gross, G.W. Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface. *IEEE transactions on bio-medical engineering* **1979**, *26*, 273-279, doi:10.1109/tbme.1979.326402.
 36. Pine, J. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *Journal of neuroscience methods* **1980**, *2*, 19-31, doi:10.1016/0165-0270(80)90042-4.
 37. Zhang, W.; Peterson, M.; Beyer, B.; Frankel, W.N.; Zhang, Z.W. Loss of MeCP2 from forebrain excitatory neurons leads to cortical hyperexcitation and seizures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2014**, *34*, 2754-2763, doi:10.1523/jneurosci.4900-12.2014.
 38. Sun, Y.; Paşca, S.P.; Portmann, T.; Goold, C.; Worringer, K.A.; Guan, W.; Chan, K.C.; Gai, H.; Vogt, D.; Chen, Y.J.; et al. A deleterious Nav1.1 mutation selectively impairs telencephalic inhibitory neurons derived from Dravet Syndrome patients. *eLife* **2016**, *5*, doi:10.7554/eLife.13073.
 39. Ortolano, S.; Vieitez, I.; Agis-Balboa, R.C.; Spuch, C. Loss of GABAergic cortical neurons underlies the neuropathology of Lafora disease. *Molecular brain* **2014**, *7*, 1-17.
 40. Jiang, X.; Lachance, M.; Rossignol, E. Involvement of cortical fast-spiking parvalbumin-positive basket cells in epilepsy. *Progress in brain research* **2016**, *226*, 81-126.
 41. Rossignol, E.; Kruglikov, I.; Van Den Maagdenberg, A.M.; Rudy, B.; Fishell, G. CaV2. 1 ablation in cortical interneurons selectively impairs fast - spiking basket cells and causes generalized seizures. *Annals of neurology* **2013**, *74*, 209-222.
 42. Hedreen, J.C.; Peyser, C.E.; Folstein, S.E.; Ross, C.A. Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neuroscience letters* **1991**, *133*, 257-261.
 43. Lancaster, M.A.; Knoblich, J.A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science (New York, N.Y.)* **2014**, *345*, 1247125, doi:10.1126/science.1247125.
 44. Dutta, D.; Heo, I.; Clevers, H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends in molecular medicine* **2017**, *23*, 393-410, doi:10.1016/j.molmed.2017.02.007.
 45. Ramani, S.; Crawford, S.E.; Blutt, S.E.; Estes, M.K. Human organoid cultures: transformative new tools for human virus studies. *Current opinion in virology* **2018**, *29*, 79-86, doi:10.1016/j.coviro.2018.04.001.

参考文献

46. Dye, B.R.; Hill, D.R.; Ferguson, M.A.; Tsai, Y.H.; Nagy, M.S.; Dyal, R.; Wells, J.M.; Mayhew, C.N.; Nattiv, R.; Klein, O.D.; et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *eLife* **2015**, *4*, doi:10.7554/eLife.05098.
47. Kelava, I.; Lancaster, M.A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Developmental biology* **2016**, *420*, 199-209, doi:10.1016/j.ydbio.2016.06.037.
48. Lancaster, M.A.; Renner, M.; Martin, C.A.; Wenzel, D.; Bicknell, L.S.; Hurles, M.E.; Homfray, T.; Penninger, J.M.; Jackson, A.P.; Knoblich, J.A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **2013**, *501*, 373-379, doi:10.1038/nature12517.
49. Sakaguchi, H.; Kadoshima, T.; Soen, M.; Narii, N.; Ishida, Y.; Ohgushi, M.; Takahashi, J.; Eiraku, M.; Sasai, Y. Generation of functional hippocampal neurons from self-organizing human embryonic stem cell-derived dorsomedial telencephalic tissue. *Nat Commun* **2015**, *6*, 8896, doi:10.1038/ncomms9896.
50. Jo, J.; Xiao, Y.; Sun, A.X.; Cukuroglu, E.; Tran, H.D.; Göke, J.; Tan, Z.Y.; Saw, T.Y.; Tan, C.P.; Lokman, H.; et al. Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. *Cell stem cell* **2016**, *19*, 248-257, doi:10.1016/j.stem.2016.07.005.
51. Wataya, T.; Ando, S.; Muguruma, K.; Ikeda, H.; Watanabe, K.; Eiraku, M.; Kawada, M.; Takahashi, J.; Hashimoto, N.; Sasai, Y. Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 11796-11801, doi:10.1073/pnas.0803078105.
52. Muguruma, K.; Nishiyama, A.; Kawakami, H.; Hashimoto, K.; Sasai, Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell reports* **2015**, *10*, 537-550, doi:10.1016/j.celrep.2014.12.051.
53. Suga, H.; Kadoshima, T.; Minaguchi, M.; Ohgushi, M.; Soen, M.; Nakano, T.; Takata, N.; Wataya, T.; Muguruma, K.; Miyoshi, H.; et al. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature* **2011**, *480*, 57-62, doi:10.1038/nature10637.
54. Kanton, S.; Boyle, M.J.; He, Z.; Santel, M.; Weigert, A.; Sanchís-Calleja, F.; Guijarro, P.; Sidow, L.; Fleck, J.S.; Han, D.; et al. Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development. *Nature* **2019**, *574*, 418-422, doi:10.1038/s41586-019-1654-9.
55. Velasco, S.; Kedaigle, A.J.; Simmons, S.K.; Nash, A.; Rocha, M.; Quadrato, G.; Paulsen, B.; Nguyen, L.; Adiconis, X.; Regev, A.; et al. Individual brain organoids reproducibly form

参考文献

- cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature* **2019**, *570*, 523-527, doi:10.1038/s41586-019-1289-x.
56. Cho, A.N.; Bright, F.; Morey, N.; Au, C.; Ittner, L.M.; Ke, Y.D. Efficient Gene Expression in Human Stem Cell Derived-Cortical Organoids Using Adeno Associated Virus. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/cells11203194.
57. Camp, J.G.; Badsha, F.; Florio, M.; Kanton, S.; Gerber, T.; Wilsch-Bräuninger, M.; Lewitus, E.; Sykes, A.; Hevers, W.; Lancaster, M.; et al. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, *112*, 15672-15677, doi:10.1073/pnas.1520760112.
58. Luo, C.; Lancaster, M.A.; Castanon, R.; Nery, J.R.; Knoblich, J.A.; Ecker, J.R. Cerebral Organoids Recapitulate Epigenomic Signatures of the Human Fetal Brain. *Cell reports* **2016**, *17*, 3369-3384, doi:10.1016/j.celrep.2016.12.001.
59. Gordon, A.; Yoon, S.J.; Tran, S.S.; Makinson, C.D.; Park, J.Y.; Andersen, J.; Valencia, A.M.; Horvath, S.; Xiao, X.; Huguenard, J.R.; et al. Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions. *Nat Neurosci* **2021**, *24*, 331-342, doi:10.1038/s41593-021-00802-y.
60. Wang, P.; Mokhtari, R.; Pedrosa, E.; Kirschenbaum, M.; Bayrak, C.; Zheng, D.; Lachman, H.M. CRISPR/Cas9-mediated heterozygous knockout of the autism gene CHD8 and characterization of its transcriptional networks in cerebral organoids derived from iPSC cells. *Molecular autism* **2017**, *8*, 11, doi:10.1186/s13229-017-0124-1.
61. Mariani, J.; Coppola, G.; Zhang, P.; Abyzov, A.; Provini, L.; Tomasini, L.; Amenduni, M.; Szekely, A.; Palejev, D.; Wilson, M.; et al. FOXP1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell* **2015**, *162*, 375-390, doi:10.1016/j.cell.2015.06.034.
62. Yildirim, M.; Delepine, C.; Feldman, D.; Pham, V.A.; Chou, S.; Ip, J.; Nott, A.; Tsai, L.H.; Ming, G.L.; So, P.T.C.; et al. Label-free three-photon imaging of intact human cerebral organoids for tracking early events in brain development and deficits in Rett syndrome. *eLife* **2022**, *11*, doi:10.7554/eLife.78079.
63. Liu, Y.; Lopez-Santiago, L.F.; Yuan, Y.; Jones, J.M.; Zhang, H.; O'Malley, H.A.; Patino, G.A.; O'Brien, J.E.; Rusconi, R.; Gupta, A.; et al. Dravet syndrome patient-derived neurons suggest a novel epilepsy mechanism. *Ann Neurol* **2013**, *74*, 128-139, doi:10.1002/ana.23897.
64. Jiao, J.; Yang, Y.; Shi, Y.; Chen, J.; Gao, R.; Fan, Y.; Yao, H.; Liao, W.; Sun, X.F.; Gao, S. Modeling Dravet syndrome using induced pluripotent stem cells (iPSCs) and directly converted neurons. *Human molecular genetics* **2013**, *22*, 4241-4252,

参考文献

- doi:10.1093/hmg/ddt275.
65. Marchetto, M.C.; Carrameu, C.; Acab, A.; Yu, D.; Yeo, G.W.; Mu, Y.; Chen, G.; Gage, F.H.; Muotri, A.R. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* **2010**, *143*, 527-539, doi:10.1016/j.cell.2010.10.016.
 66. Hotta, A.; Cheung, A.Y.; Farra, N.; Vijayaragavan, K.; Séguin, C.A.; Draper, J.S.; Pasceri, P.; Maksakova, I.A.; Mager, D.L.; Rossant, J.; et al. Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nature methods* **2009**, *6*, 370-376, doi:10.1038/nmeth.1325.
 67. Chamberlain, S.J.; Chen, P.F.; Ng, K.Y.; Bourgois-Rocha, F.; Lemtiri-Chlieh, F.; Levine, E.S.; Lalande, M. Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 17668-17673, doi:10.1073/pnas.1004487107.
 68. Stanurova, J.; Neureiter, A.; Hiber, M.; de Oliveira Kessler, H.; Stolp, K.; Goetzke, R.; Klein, D.; Bankfalvi, A.; Klump, H.; Steenpass, L. Angelman syndrome-derived neurons display late onset of paternal UBE3A silencing. *Sci Rep* **2016**, *6*, 30792, doi:10.1038/srep30792.
 69. Zayat, V.; Kuczynska, Z.; Liput, M.; Metin, E.; Rzonca-Niewczas, S.; Smyk, M.; Mazurczak, T.; Goszczanska-Ciuchta, A.; Leszczynski, P.; Hoffman-Zacharska, D.; et al. The Generation of Human iPSC Lines from Three Individuals with Dravet Syndrome and Characterization of Neural Differentiation Markers in iPSC-Derived Ventral Forebrain Organoid Model. *Cells* **2023**, *12*, doi:10.3390/cells12020339.
 70. Foliaki, S.T.; Schwarz, B.; Groveman, B.R.; Walters, R.O.; Ferreira, N.C.; Orrù, C.D.; Smith, A.; Wood, A.; Schmit, O.M.; Freitag, P.; et al. Neuronal excitatory-to-inhibitory balance is altered in cerebral organoid models of genetic neurological diseases. *Mol Brain* **2021**, *14*, 156, doi:10.1186/s13041-021-00864-w.
 71. Ghatak, S.; Dolatabadi, N.; Trudler, D.; Zhang, X.; Wu, Y.; Mohata, M.; Ambasadhan, R.; Talantova, M.; Lipton, S.A. Mechanisms of hyperexcitability in Alzheimer's disease hiPSC-derived neurons and cerebral organoids vs isogenic controls. *eLife* **2019**, *8*, doi:10.7554/eLife.50333.
 72. Anson, B.D.; Kolaja, K.; Kamp, T.J. Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2011**, *89*, 754-758.
 73. Singh, V.K.; Kalsan, M.; Kumar, N.; Saini, A.; Chandra, R. Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Frontiers in cell and developmental biology* **2015**, *3*, 2.

参考文献

74. Shi, Y.; Inoue, H.; Wu, J.C.; Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature reviews Drug discovery* **2017**, *16*, 115-130.
75. Omole, A.E.; Fakoya, A.O.J. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ* **2018**, *6*, e4370.
76. Odawara, A.; Matsuda, N.; Ishibashi, Y.; Yokoi, R.; Suzuki, I. Toxicological evaluation of convulsant and anticonvulsant drugs in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks using an MEA system. *Sci Rep* **2018**, *8*, 10416, doi:10.1038/s41598-018-28835-7.
77. Mack, C.M.; Lin, B.J.; Turner, J.D.; Johnstone, A.F.; Burgoon, L.D.; Shafer, T.J. Burst and principal components analyses of MEA data for 16 chemicals describe at least three effects classes. *Neurotoxicology* **2014**, *40*, 75-85, doi:10.1016/j.neuro.2013.11.008.
78. Fukushima, K.; Miura, Y.; Sawada, K.; Yamazaki, K.; Ito, M. Establishment of a Human Neuronal Network Assessment System by Using a Human Neuron/Astrocyte Co-Culture Derived from Fetal Neural Stem/Progenitor Cells. *Journal of biomolecular screening* **2016**, *21*, 54-64, doi:10.1177/1087057115610055.
79. Matsuda, N.; Odawara, A.; Katoh, H.; Okuyama, N.; Yokoi, R.; Suzuki, I. Detection of synchronized burst firing in cultured human induced pluripotent stem cell-derived neurons using a 4-step method. *Biochemical and biophysical research communications* **2018**, *497*, 612-618.
80. Barker, J.; McBurney, R.; Mathers, D. Convulsant-induced depression of amino acid responses in cultured mouse spinal neurones studied under voltage clamp. *British journal of pharmacology* **1983**, *80*, 619.
81. Constanti, A. The "mixed" effect of picrotoxin on the GABA dose/conductance relation recorded from lobster muscle. *Neuropharmacology* **1978**, *17*, 159-167.
82. Takeuchi, A.; Takeuchi, N. A study of the action of picrotoxin on the inhibitory neuromuscular junction of the crayfish. *The Journal of physiology* **1969**, *205*, 377-391.
83. Olpe, H.-R.; Karlsson, G.; Pozza, M.F.; Brugger, F.; Steinmann, M.; Van Riezen, H.; Fagg, G.; Hall, R.G.; Froestl, W.; Bittiger, H. CGP 35348: a centrally active blocker of GABAB receptors. *European journal of pharmacology* **1990**, *187*, 27-38.
84. Beaumont, K.; Chilton, W.; Yamamura, H.; Enna, S. Muscimol binding in rat brain: association with synaptic GABA receptors. *Brain research* **1978**, *148*, 153-162.
85. Deng, L.; Ransom, R.W.; Olsen, R.W. [3H]muscimol photolabels the gamma-aminobutyric acid receptor binding site on a peptide subunit distinct from that labeled with benzodiazepines. *Biochem Biophys Res Commun* **1986**, *138*, 1308-1314, doi:10.1016/s0006-291x(86)80425-9.

参考文献

86. Jones, M.V.; Sahara, Y.; Dzubay, J.A.; Westbrook, G.L. Defining affinity with the GABAA receptor. *Journal of Neuroscience* **1998**, *18*, 8590-8604.
87. Smith, G.B.; Olsen, R.W. Identification of a [3H] muscimol photoaffinity substrate in the bovine gamma-aminobutyric acidA receptor alpha subunit. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 20380-20387.
88. Bormann, J. Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends in neurosciences* **1988**, *11*, 112-116.
89. Bostock, H.; Sears, T.; Sherratt, R. The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres. *The Journal of Physiology* **1981**, *313*, 301-315.
90. Choquet, D.; Korn, H. Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. *The Journal of general physiology* **1992**, *99*, 217-240.
91. Gutman, G.A.; Chandy, K.G.; Grissmer, S.; Lazdunski, M.; Mckinnon, D.; Pardo, L.A.; Robertson, G.A.; Rudy, B.; Sanguinetti, M.C.; Stühmer, W. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacological reviews* **2005**, *57*, 473-508.
92. Kirsch, G.; Shieh, C.-C.; Drewe, J.; Vener, D.; Brownt, A. Segmental exchanges define 4-aminopyridine binding and the inner mouth of K⁺ pores. *Neuron* **1993**, *11*, 503-512.
93. Kirsch, G.E.; Narahashi, T. Site of action and active form of aminopyridines in squid axon membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1983**, *226*, 174-179.
94. McCormack, K.; Joiner, W.I.; Heinemann, S.H. A characterization of the activating structural rearrangements in voltage-dependent Shaker K⁺ channels. *Neuron* **1994**, *12*, 301-315.
95. Yeh, J.; Oxford, G.; Wu, C.; Narahashi, T. Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. *Biophysical journal* **1976**, *16*, 77-81.
96. Lee, M.; Young Choi, B.; Won Suh, S. Unexpected effects of acetylcholine precursors on pilocarpine seizure-induced neuronal death. *Current Neuropharmacology* **2018**, *16*, 51-58.
97. Turski, L.; Ikonomidou, C.; Turski, W.A.; Bortolotto, Z.A.; Cavalheiro, E.A. Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* **1989**, *3*, 154-171.
98. Horn, A.S.; Snyder, S.H. Chlorpromazie and dopamine: conformational similarities that correlate with the antischizophrenic activity of phenothiazine drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1971**, *68*, 2325-2328.
99. York, D. Dopamine receptor blockade—a central action of chlorpromazine on striatal neurones. *Brain research* **1972**, *37*, 91-99.

参考文献

100. Markram, H.; Toledo-Rodriguez, M.; Wang, Y.; Gupta, A.; Silberberg, G.; Wu, C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews neuroscience* **2004**, *5*, 793-807.
101. Wong, F.K.; Bercsenyi, K.; Sreenivasan, V.; Portalés, A.; Fernández-Otero, M.; Marín, O. Pyramidal cell regulation of interneuron survival sculpts cortical networks. *Nature* **2018**, *557*, 668-673.
102. Lorincz, A.; Nusser, Z. Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *Journal of Neuroscience* **2008**, *28*, 14329-14340.
103. Hu, W.; Tian, C.; Li, T.; Yang, M.; Hou, H.; Shu, Y. Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* **2009**, *12*, 996-1002, doi:10.1038/nn.2359.
104. Katz, E.; Stoler, O.; Scheller, A.; Khrapunsky, Y.; Goebbels, S.; Kirchhoff, F.; Gutnick, M.J.; Wolf, F.; Fleidervish, I.A. Role of sodium channel subtype in action potential generation by neocortical pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2018**, *115*, E7184-E7192.
105. Conti, F. Localization of NMDA receptors in the cerebral cortex: a schematic overview. *Brazilian journal of medical and biological research* **1997**, *30*, 555-560.
106. Ben-Ari, Y.; Khazipov, R.; Leinekugel, X.; Caillard, O.; Gaiarsa, J.-L. GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated ménage à trois'. *Trends in neurosciences* **1997**, *20*, 523-529.
107. Groc, L.; Gustafsson, B.; Hanse, E. AMPA signalling in nascent glutamatergic synapses: there and not there! *Trends in neurosciences* **2006**, *29*, 132-139.
108. Gu, Y.; Ge, S.-Y.; Ruan, D.-Y. Effect of 4-aminopyridine on synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Brain research* **2004**, *1006*, 225-232.
109. Yi, F.; DeCan, E.; Stoll, K.; Marceau, E.; Deisseroth, K.; Lawrence, J.J. Muscarinic excitation of parvalbumin - positive interneurons contributes to the severity of pilocarpine - induced seizures. *Epilepsia* **2015**, *56*, 297-309.
110. Lidsky, T.; Yablonsky-Alter, E.; Zuck, L.; Banerjee, S. Antipsychotic drug effects on glutamatergic activity. *Brain research* **1997**, *764*, 46-52.
111. Lewis, D.V.; Jones, L.S.; Mott, D.D. Baclofen induces spontaneous, rhythmic sharp waves in the rat hippocampal slice. *Experimental neurology* **1989**, *106*, 181-186.
112. Shoulson, I.; Goldblatt, D.; Charlton, M.; Joynt, R.J. Huntington's disease: treatment with muscimol, a GABA - mimetic drug. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* **1978**, *4*, 279-284.
113. MD, H.E.P.; MD, R.O.W.; MD, M.W.S.; MD, A.D.W. Baclofen overdose: drug experimentation in a group of adolescents. *Pediatrics* **1998**, *101*, 1045-1048.

参考文献

114. De Rinaldis, M.; Losito, L.; Gennaro, L.; Trabacca, A. Long-term oral baclofen treatment in a child with cerebral palsy: electroencephalographic changes and clinical adverse effects. *Journal of child neurology* **2010**, *25*, 1272-1274.
115. Franson, K.L.; Hay, D.P.; Neppe, V.; Dahdal, W.Y.; Mirza, W.U.; Grossberg, G.T.; Chatel, D.M.; Szwabo, P.A.; Kotegal, S. Drug-induced seizures in the elderly. Causative agents and optimal management. *Drugs & aging* **1995**, *7*, 38-48, doi:10.2165/00002512-199507010-00005.
116. Roberts, R.; Authier, S.; Mellon, R.D.; Morton, M.; Suzuki, I.; Tjalkens, R.B.; Valentin, J.P.; Pierson, J.B. Can We Panelize Seizure? *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **2021**, *179*, 3-13, doi:10.1093/toxsci/kfaa167.
117. Hanaya, R.; Arita, K. The New Antiepileptic Drugs: Their Neuropharmacology and Clinical Indications. *Neurologia medico-chirurgica* **2016**, *56*, 205-220, doi:10.2176/nmc.ra.2015-0344.
118. Shirakawa, T.; Suzuki, I. Approach to Neurotoxicity using Human iPSC Neurons: Consortium for Safety Assessment using Human iPS Cells. *Current pharmaceutical biotechnology* **2020**, *21*, 780-786, doi:10.2174/1389201020666191129103730.
119. Sun, G.; Chiuppesi, F.; Chen, X.; Wang, C.; Tian, E.; Nguyen, J.; Kha, M.; Trinh, D.; Zhang, H.; Marchetto, M.C.; et al. Modeling Human Cytomegalovirus-Induced Microcephaly in Human iPSC-Derived Brain Organoids. *Cell reports. Medicine* **2020**, *1*, 100002, doi:10.1016/j.xcrm.2020.100002.
120. Kathuria, A.; Lopez-Lengowski, K.; Jagtap, S.S.; McPhie, D.; Perlis, R.H.; Cohen, B.M.; Karmacharya, R. Transcriptomic Landscape and Functional Characterization of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cerebral Organoids in Schizophrenia. *JAMA psychiatry* **2020**, *77*, 745-754, doi:10.1001/jamapsychiatry.2020.0196.
121. Shin, H.; Jeong, S.; Lee, J.H.; Sun, W.; Choi, N.; Cho, I.J. 3D high-density microelectrode array with optical stimulation and drug delivery for investigating neural circuit dynamics. *Nat Commun* **2021**, *12*, 492, doi:10.1038/s41467-020-20763-3.
122. Yao, H.; Wu, W.; Cerf, I.; Zhao, H.W.; Wang, J.; Negraes, P.D.; Muotri, A.R.; Haddad, G.G. Methadone interrupts neural growth and function in human cortical organoids. *Stem cell research* **2020**, *49*, 102065, doi:10.1016/j.scr.2020.102065.
123. Fair, S.R.; Julian, D.; Hartlaub, A.M.; Pusuluri, S.T.; Malik, G.; Summerfied, T.L.; Zhao, G.; Hester, A.B.; Ackerman, W.E.t.; Hollingsworth, E.W.; et al. Electrophysiological Maturation of Cerebral Organoids Correlates with Dynamic Morphological and Cellular Development. *Stem Cell Reports* **2020**, *15*, 855-868, doi:10.1016/j.stemcr.2020.08.017.
124. Trujillo, C.A.; Adams, J.W.; Negraes, P.D.; Carromeu, C.; Tejwani, L.; Acab, A.; Tsuda, B.; Thomas, C.A.; Sodhi, N.; Fichter, K.M.; et al. Pharmacological reversal of synaptic and

参考文献

- network pathology in human MECP2-KO neurons and cortical organoids. *EMBO molecular medicine* **2021**, *13*, e12523, doi:10.15252/emmm.202012523.
125. Wang, D.; Shan, Y.; Bartolomei, F.; Kahane, P.; An, Y.; Li, M.; Zhang, H.; Fan, X.; Ou, S.; Yang, Y.; et al. Electrophysiological properties and seizure networks in hypothalamic hamartoma. *Annals of clinical and translational neurology* **2020**, *7*, 653-666, doi:10.1002/acn3.51033.
126. Urrestarazu, E.; Jirsch, J.D.; LeVan, P.; Hall, J.; Avoli, M.; Dubeau, F.; Gotman, J. High-frequency intracerebral EEG activity (100-500 Hz) following interictal spikes. *Epilepsia* **2006**, *47*, 1465-1476, doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00618.x.
127. Lee, S.A.; Spencer, D.D.; Spencer, S.S. Intracranial EEG seizure-onset patterns in neocortical epilepsy. *Epilepsia* **2000**, *41*, 297-307, doi:10.1111/j.1528-1157.2000.tb00159.x.
128. Mohammad, H.; Sekar, S.; Wei, Z.; Moien-Afshari, F.; Taghibiglou, C. Perampanel but Not Amantadine Prevents Behavioral Alterations and Epileptogenesis in Pilocarpine Rat Model of Status Epilepticus. *Molecular neurobiology* **2019**, *56*, 2508-2523, doi:10.1007/s12035-018-1230-6.
129. Srivastava, A.K.; Gupta, S.K.; Jain, S.; Gupta, Y.K. Effect of melatonin and phenytoin on an intracortical ferric chloride model of posttraumatic seizures in rats. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* **2002**, *24*, 145-149, doi:10.1358/mf.2002.24.3.802299.
130. Fink, M.; Irwin, P.; Sannita, W.; Papakostas, Y.; Green, M.A. Phenytoin: EEG effects and plasma levels in volunteers. *Therapeutic drug monitoring* **1979**, *1*, 93-103.
131. Antoniou, T.; Gomes, T.; Mamdani, M.M.; Juurlink, D.N. Trimethoprim/sulfamethoxazole-induced phenytoin toxicity in the elderly: a population-based study. *British journal of clinical pharmacology* **2011**, *71*, 544-549, doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03866.x.
132. Sabate-Soler, S.; Nickels, S.L.; Saraiva, C.; Berger, E.; Dubonyte, U.; Barmpla, K.; Lan, Y.J.; Kouno, T.; Jarazo, J.; Robertson, G.; et al. Microglia integration into human midbrain organoids leads to increased neuronal maturation and functionality. *Glia* **2022**, *70*, 1267-1288, doi:10.1002/glia.24167.
133. Saleem, A.; Santos, A.C.; Aquilino, M.S.; Sivitilli, A.A.; Attisano, L.; Carlen, P.L. Modelling hyperexcitability in human cerebral cortical organoids: Oxygen/glucose deprivation most effective stimulant. *Heliyon* **2023**, *9*, e14999, doi:10.1016/j.heliyon.2023.e14999.
134. Wu, W.; Yao, H.; Negraes, P.D.; Wang, J.; Trujillo, C.A.; de Souza, J.S.; Muotri, A.R.; Haddad, G.G. Neuronal hyperexcitability and ion channel dysfunction in CDKL5-

参考文献

- deficiency patient iPSC-derived cortical organoids. *Neurobiol Dis* **2022**, *174*, 105882, doi:10.1016/j.nbd.2022.105882.
135. Gomes, A.R.; Fernandes, T.G.; Vaz, S.H.; Silva, T.P.; Bekman, E.P.; Xapelli, S.; Duarte, S.; Ghazvini, M.; Gribnau, J.; Muotri, A.R.; et al. Modeling Rett Syndrome With Human Patient-Specific Forebrain Organoids. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 610427, doi:10.3389/fcell.2020.610427.
136. Chen, X.; Sun, G.; Tian, E.; Zhang, M.; Davtyan, H.; Beach, T.G.; Reiman, E.M.; Blurton-Jones, M.; Holtzman, D.M.; Shi, Y. Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)* **2021**, *8*, e2101462, doi:10.1002/advs.202101462.
137. Trujillo, C.A.; Rice, E.S.; Schaefer, N.K.; Chaim, I.A.; Wheeler, E.C.; Madrigal, A.A.; Buchanan, J.; Preissl, S.; Wang, A.; Negraes, P.D.; et al. Reintroduction of the archaic variant of NOVA1 in cortical organoids alters neurodevelopment. *Science (New York, N.Y.)* **2021**, *371*, doi:10.1126/science.aax2537.
138. Meng, Q.; Zhang, W.; Wang, X.; Jiao, C.; Xu, S.; Liu, C.; Tang, B.; Chen, C. Human forebrain organoids reveal connections between valproic acid exposure and autism risk. *Translational psychiatry* **2022**, *12*, 130, doi:10.1038/s41398-022-01898-x.
139. Phouphetlinthong, O.; Partiot, E.; Bernou, C.; Sebban, A.; Gaudin, R.; Charlot, B. Protruding cantilever microelectrode array to monitor the inner electrical activity of cerebral organoids. *Lab on a chip* **2023**, *23*, 3603-3614, doi:10.1039/d3lc00294b.
140. Fagerlund, I.; Dougalis, A.; Shakirzyanova, A.; Gómez-Budia, M.; Pelkonen, A.; Konttinen, H.; Ohtonen, S.; Fazaludeen, M.F.; Koskivi, M.; Kuusisto, J.; et al. Microglia-like Cells Promote Neuronal Functions in Cerebral Organoids. *Cells* **2021**, *11*, doi:10.3390/cells11010124.
141. Adams, J.W.; Negraes, P.D.; Truong, J.; Tran, T.; Szeto, R.A.; Guerra, B.S.; Herai, R.H.; Teodorof-Diedrich, C.; Spector, S.A.; Del Campo, M.; et al. Impact of alcohol exposure on neural development and network formation in human cortical organoids. *Molecular psychiatry* **2023**, *28*, 1571-1584, doi:10.1038/s41380-022-01862-7.
142. Silvana, M.J.; Mercado, N.R.; Merlock, N.; Vidhate, S.; Mejia-Alvarez, R.; Yuan, T.T.; Willis, A.M.; Lybrand, Z.R. Understanding Primary Blast Injury: High Frequency Pressure Acutely Disrupts Neuronal Network Dynamics in Cerebral Organoids. *Journal of neurotrauma* **2022**, *39*, 1575-1590, doi:10.1089/neu.2022.0044.
143. Morelli, K.H.; Jin, W.; Shathe, S.; Madrigal, A.A.; Jones, K.L.; Schwartz, J.L.; Bridges, T.; Mueller, J.R.; Shankar, A.; Chaim, I.A.; et al. MECP2-related pathways are dysregulated in a cortical organoid model of myotonic dystrophy. *Science translational medicine* **2022**, *14*, eabn2375, doi:10.1126/scitranslmed.abn2375.

参考文献

144. Yokoi, R.; Shibata, M.; Odawara, A.; Ishibashi, Y.; Nagafuku, N.; Matsuda, N.; Suzuki, I. Analysis of signal components < 500 Hz in brain organoids coupled to microelectrode arrays: A reliable test-bed for preclinical seizure liability assessment of drugs and screening of antiepileptic drugs. *Biochemistry and biophysics reports* **2021**, *28*, 101148, doi:10.1016/j.bbrep.2021.101148.
145. Dravet, C. Dravet syndrome history. *Developmental medicine and child neurology* **2011**, *53 Suppl 2*, 1-6, doi:10.1111/j.1469-8749.2011.03964.x.
146. Ogiwara, I.; Miyamoto, H.; Morita, N.; Atapour, N.; Mazaki, E.; Inoue, I.; Takeuchi, T.; Itohara, S.; Yanagawa, Y.; Obata, K.; et al. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2007**, *27*, 5903-5914, doi:10.1523/jneurosci.5270-06.2007.
147. Dutton, S.B.; Makinson, C.D.; Papale, L.A.; Shankar, A.; Balakrishnan, B.; Nakazawa, K.; Escayg, A. Preferential inactivation of Scn1a in parvalbumin interneurons increases seizure susceptibility. *Neurobiol Dis* **2013**, *49*, 211-220, doi:10.1016/j.nbd.2012.08.012.
148. Fadila, S.; Quinn, S.; Turchetti Maia, A.; Yakubovich, D.; Ovadia, M.; Anderson, K.L.; Giladi, M.; Rubinstein, M. Convulsive seizures and some behavioral comorbidities are uncoupled in the Scn1a(A1783V) Dravet syndrome mouse model. *Epilepsia* **2020**, *61*, 2289-2300, doi:10.1111/epi.16662.
149. Li, M.; Yang, L.; Qian, W.; Ray, S.; Lu, Z.; Liu, T.; Zou, Y.Y.; Naumann, R.K.; Wang, H. A novel rat model of Dravet syndrome recapitulates clinical hallmarks. *Neurobiol Dis* **2023**, *184*, 106193, doi:10.1016/j.nbd.2023.106193.
150. Kuo, F.S.; Cleary, C.M.; LoTurco, J.J.; Chen, X.; Mulkey, D.K. Disordered breathing in a mouse model of Dravet syndrome. *eLife* **2019**, *8*, doi:10.7554/eLife.43387.
151. Suzuki, I.; Matsuda, N.; Han, X.; Noji, S.; Shibata, M.; Nagafuku, N.; Ishibashi, Y. Large-Area Field Potential Imaging Having Single Neuron Resolution Using 236 880 Electrodes CMOS-MEA Technology. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)* **2023**, *10*, e2207732, doi:10.1002/advs.202207732.
152. Sharf, T.; van der Molen, T.; Glasauer, S.M.K.; Guzman, E.; Buccino, A.P.; Luna, G.; Cheng, Z.; Audouard, M.; Ranasinghe, K.G.; Kudo, K.; et al. Functional neuronal circuitry and oscillatory dynamics in human brain organoids. *Nat Commun* **2022**, *13*, 4403, doi:10.1038/s41467-022-32115-4.
153. Schröter, M.; Wang, C.; Terrigno, M.; Hornauer, P.; Huang, Z.; Jagasia, R.; Hierlemann, A. Functional imaging of brain organoids using high-density microelectrode arrays. *MRS bulletin* **2022**, *47*, 530-544, doi:10.1557/s43577-022-00282-w.
154. Okon, E.A.; Oshie, N.C.; Ubong, I.A.; Kelechi, O.S. The Effect of Carbamazepine on EEG

参考文献

- Tracings of People with Seizure Disorders in Calabar, Nigeria.
155. Quinn, S.; Brusel, M.; Ovadia, M.; Rubinstein, M. Acute effect of antiseizure drugs on background oscillations in Scn1a (A1783V) Dravet syndrome mouse model. *Frontiers in pharmacology* **2023**, *14*, 1118216, doi:10.3389/fphar.2023.1118216.
 156. Holmes, G.L.; Bender, A.C.; Wu, E.X.; Scott, R.C.; Lenck-Santini, P.P.; Morse, R.P. Maturation of EEG oscillations in children with sodium channel mutations. *Brain & development* **2012**, *34*, 469-477, doi:10.1016/j.braindev.2011.08.009.
 157. Akiyama, M.; Kobayashi, K.; Yoshinaga, H.; Ohtsuka, Y. A long-term follow-up study of Dravet syndrome up to adulthood. *Epilepsia* **2010**, *51*, 1043-1052, doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02466.x.
 158. Sanchez-Carpintero, R.; Urrestarazu, E.; Cieza, S.; Alegre, M.; Artieda, J.; Crespo-Eguilaz, N.; Valencia, M. Abnormal brain gamma oscillations in response to auditory stimulation in Dravet syndrome. *European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society* **2020**, *24*, 134-141, doi:10.1016/j.ejpn.2019.12.004.
 159. Kuki, T.; Fujihara, K.; Miwa, H.; Tamamaki, N.; Yanagawa, Y.; Mushiake, H. Contribution of parvalbumin and somatostatin-expressing GABAergic neurons to slow oscillations and the balance in beta-gamma oscillations across cortical layers. *Frontiers in neural circuits* **2015**, *9*, 6, doi:10.3389/fncir.2015.00006.
 160. Kalume, F.; Oakley, J.C.; Westenbroek, R.E.; Gile, J.; de la Iglesia, H.O.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. Sleep impairment and reduced interneuron excitability in a mouse model of Dravet Syndrome. *Neurobiol Dis* **2015**, *77*, 141-154, doi:10.1016/j.nbd.2015.02.016.
 161. Cardin, J.A. Inhibitory Interneurons Regulate Temporal Precision and Correlations in Cortical Circuits. *Trends Neurosci* **2018**, *41*, 689-700, doi:10.1016/j.tins.2018.07.015.
 162. Cardin, J.A. Snapshots of the Brain in Action: Local Circuit Operations through the Lens of γ Oscillations. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2016**, *36*, 10496-10504, doi:10.1523/jneurosci.1021-16.2016.
 163. Buzsáki, G.; Wang, X.J. Mechanisms of gamma oscillations. *Annual review of neuroscience* **2012**, *35*, 203-225, doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150444.
 164. Besser, R.; Hornung, K.; Theisohn, M.; Rothacher, G.; Krämer, G. EEG changes in patients during the introduction of carbamazepine. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* **1992**, *83*, 19-23, doi:10.1016/0013-4694(92)90128-5.
 165. Salinsky, M.C.; Oken, B.S.; Morehead, L. Intraindividual analysis of antiepileptic drug effects on EEG background rhythms. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* **1994**, *90*, 186-193, doi:10.1016/0013-4694(94)90090-6.
 166. Wu, X.; Xiao, C.H. Quantitative pharmaco-EEG of carbamazepine in volunteers and

参考文献

- epileptics. *Clinical EEG (electroencephalography)* **1996**, *27*, 40-45, doi:10.1177/155005949602700107.
167. Salinsky, M.C.; Binder, L.M.; Oken, B.S.; Storzbach, D.; Aron, C.R.; Dodrill, C.B. Effects of gabapentin and carbamazepine on the EEG and cognition in healthy volunteers. *Epilepsia* **2002**, *43*, 482-490, doi:10.1046/j.1528-1157.2002.22501.x.
168. Clemens, B.; Ménes, A.; Nagy, Z. Objective assessment of neurotoxicity while shifting from carbamazepine to oxcarbazepine. *Acta neurologica Scandinavica* **2004**, *109*, 324-329, doi:10.1046/j.1600-0404.2003.00234.x.
169. Clemens, B.; Ménes, A.; Piros, P.; Bessenyei, M.; Altmann, A.; Jerney, J.; Kollár, K.; Rosdy, B.; Rózsavölgyi, M.; Steinecker, K.; et al. Quantitative EEG effects of carbamazepine, oxcarbazepine, valproate, lamotrigine, and possible clinical relevance of the findings. *Epilepsy research* **2006**, *70*, 190-199, doi:10.1016/j.eplesyres.2006.05.003.
170. Meador, K.J.; Loring, D.W.; Boyd, A.; Echaz, J.; LaRoche, S.; Velez-Ruiz, N.; Korb, P.; Byrnes, W.; Dilley, D.; Borghs, S.; et al. Randomized double-blind comparison of cognitive and EEG effects of lacosamide and carbamazepine. *Epilepsy & behavior : E&B* **2016**, *62*, 267-275, doi:10.1016/j.yebeh.2016.07.007.
171. Chung, S.S.; McEvoy, L.K.; Smith, M.E.; Gevins, A.; Meador, K.; Laxer, K.D. Task-related EEG and ERP changes without performance impairment following a single dose of phenytoin. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* **2002**, *113*, 806-814, doi:10.1016/s1388-2457(02)00067-6.
172. Salinsky, M.C.; Spencer, D.C.; Oken, B.S.; Storzbach, D. Effects of oxcarbazepine and phenytoin on the EEG and cognition in healthy volunteers. *Epilepsy & behavior : E&B* **2004**, *5*, 894-902, doi:10.1016/j.yebeh.2004.07.011.
173. Herkes, G.K.; Lagerlund, T.D.; Sharbrough, F.W.; Eadie, M.J. Effects of antiepileptic drug treatment on the background frequency of EEGs in epileptic patients. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society* **1993**, *10*, 210-216, doi:10.1097/00004691-199304000-00008.
174. Arzy, S.; Allali, G.; Brunet, D.; Michel, C.M.; Kaplan, P.W.; Seeck, M. Antiepileptic drugs modify power of high EEG frequencies and their neural generators. *European journal of neurology* **2010**, *17*, 1308-1312, doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03018.x.
175. Clemens, B. Valproate decreases EEG synchronization in a use-dependent manner in idiopathic generalized epilepsy. *Seizure* **2008**, *17*, 224-233, doi:10.1016/j.seizure.2007.07.005.
176. Béla, C.; Mónika, B.; Márton, T.; István, K. Valproate selectively reduces EEG activity in anterior parts of the cortex in patients with idiopathic generalized epilepsy. A low resolution electromagnetic tomography (LORETA) study. *Epilepsy research* **2007**, *75*,

参考文献

186-191, doi:10.1016/j.eplepsyres.2007.06.009.

謝辞

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々にお世話になりました。ここに深く感謝の意を表します。

研究活動全般にわたり格別なるご指導とご鞭撻を頂き、またすばらしい研究環境を与えてくださった指導教官の東北工業大学大学院 工学研究科 鈴木郁郎教授に心より深く感謝申し上げます。

本研究での、細胞培養系、計測系、解析においてお力添えをしていただきました同研究室の永福菜美様及び松田直毅様、石橋勇人様に心より深く感謝申し上げます。