

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：神経回路基盤の網羅的解析による神経・精神疾患に対する創薬技術向上を目指した評価系の構築

Development of a novel method based on neural network analysis to improve techniques in drug discovery for neurological and psychiatric disorders

研究開発実施期間：令和2年12月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：加藤 大輔

Daisuke Kato

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東海国立大学機構名古屋大学・大学院医学系研究科分子細胞学・講師

Department of Anatomy and Molecular Cell Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Tokai National Higher Education and Research System, Lecturer

II 研究開発の概要

研究開発の概要

多様化する現代社会において高次脳機能障害を呈する神経・精神疾患の病態を明らかにし、創薬戦略を打ち立てることは喫緊の課題である。従って、創薬戦略の要となる評価系を樹立することは非常に意義深い。しかしながらこれまでのところ、これらの疾患モデル動物に対する創薬の評価系は、行動実験や脳スライスを用いた電気生理学的手法に限られており、神経回路基盤に着目し、神経細胞間の機能結合やその特性を動物行動と関連づけて評価する技術は未だない。そこで本研究は、網羅的に神経回路基盤を自動で可視化する系を構築し、これを動物行動と関連づけることで中枢神経系疾患に対する創薬技術向上のための評価系を確立することを目的とした。

研究開発の成果

●神経回路基盤の網羅的解析による創薬技術向上のための評価系の構築

1. 神経回路活動の変化をバイオマーカーとする創薬評価系の構築
2. 抑制性神経細胞も含む神経回路活動の変化に基づく創薬技術向上のための評価系の構築
3. 神経回路活動と動物行動との因果関係を検証するシステムの構築
4. 2領域間の機能的結合性変化に基づく創薬技術向上のための評価系の構築

2光子ホログラフィック顕微鏡(1細胞レベルの刺激精度を持ち、スポット解像度はXY:1.2 μ m、XZ:3.6 μ m)を用いて、神経回路基盤に関するデータを取得後、網羅的な解析を行い、安静時の神経回路活動の特徴を抽出する

ことで、創薬ターゲットの治療効果判定およびバイオマーカーの構築を目指した。アデノ随伴ウイルスを用いて、カルシウム感受性蛍光タンパク質と光応答タンパク質を第一次体性感覚野の神経細胞へ導入することで、神経細胞活動の可視化と操作を可能とした。①50~100個の神経細胞の自発活動時における2細胞間の活動同期性、②1つの神経細胞をホログラフィック光刺激した時の2細胞間の活動同期性、③2つの神経細胞を同時にホログラフィック光刺激した時の2細胞間の活動同期性を比較・検証した。その結果、自発活動時の2細胞間の活動同期性と神経細胞間に機能的結合が存在する2つの神経細胞を同時にホログラフィック刺激した時の2細胞間の活動同期性が類似していることが分かった。これは、神経細胞の自発活動から神経回路を特徴付ける神経細胞間の機能的結合を予測できる可能性を示唆した。また、2つの神経細胞の同時ホログラフィック光刺激により、抑制性細胞は興奮性細胞の活動を約30%抑制することが分かり、このデータを利用することで神経細胞の細胞種を予測することが可能となった。構築した評価系を炎症性疼痛モデルマウスに適応し、神経細胞活動を観察・操作することで、自発活動時の神経細胞間の活動同期性、および機能的結合の上昇という疼痛形成過程における神経回路活動の特徴抽出に成功し、これを研究成果として収めた(Okada, Kato et al., 2021)。さらに、これらの取得したデータを用いることで、痛み行動を担う重要な細胞を抽出することができるニューラルネットワークの構築に成功し、その抽出された神経細胞の活動をホログラフィック顕微鏡で操作することで痛み行動の誘発に成功した。これにより、神経回路活動と動物行動との因果関係を検証することが可能となった。

また、アルツハイマー型認知症モデルマウスを用い、高次脳機能に関わる脳梁膨大後部皮質の神経細胞の機能応答に対するコリンエステラーゼ阻害剤の効果を検証した。その結果、アミロイドプラーク周辺に存在する神経細胞はホログラフィック光刺激に対する機能応答の強度が高く、この強度の増加はコリンエステラーゼ阻害剤により減少する可能性が示唆され、構築した神経回路基盤の網羅的解析により、既存の薬剤の治療効果を評価することができた。さらに特定の脳領域の神経細胞活動操作時に、機能的結合のある別の脳領域の神経細胞集団の活動を fiber photometry によって同時に観察することで、2領域間の機能的結合を評価する実験系を構築できた。

5. 3次元レベルで神経細胞活動が評価できるシステムの改良・構築

6. 自動でホログラフィック光刺激できるシステムの構築

従来の2光子顕微鏡による撮像(2~30Hz)は時間分解能が低いことが問題であった。さらに大脳皮質は層構造をもつため、正確に神経細胞活動を観察するには、時間分解能が高く、かつ3次元レベルの空間情報をもつ神経細胞活動の評価法が必要である。アデノ随伴ウイルスを用いて、緑色カルシウム感受性蛍光タンパク質を神経細胞へ導入後、2光子ホログラフィック顕微鏡により神経細胞の2次元位置情報を取得した。そして、取得した画像内にある数10個の神経細胞に対して、この顕微鏡で2次元マルチスポットを作成後、ホログラフィック光刺激を行いながら、イメージングセンサーにより高時間分解能(100Hz~1000Hz)で画像取得した。さらに、150 μ m離れた異なる平面に存在する神経細胞に対しても同様のホログラフィック光刺激を行った。その結果、時間分解能が高く(100~1000Hz)、かつ3次元の空間情報をもつ神経細胞活動の評価系を構築することができた。さらに、これらのホログラフィック光刺激を自動かつ網羅的に実行するためのプログラム開発にも成功した。

本研究は、神経・精神疾患モデルマウスの神経回路基盤に着目し、チーム連携を推進しながら、2光子ホログラフィック顕微鏡及び深層学習を用い、神経細胞活動や神経細胞間の機能的結合の網羅的解析を行ってきた。そして、これらとホログラフィック光刺激による行動制御とを相関づけることで、創薬の画期的な評価系の構築に成功した。さらに、本研究課題で達成した局所の神経回路特性だけでなく、2領域間の神経回路特性の可視化に

より、ヒトの脳機能画像との比較に繋がると考える。今後は、確立したこの評価系を用いて、様々な神経・精神疾患モデルマウスに対する薬剤の治療効果やその機序解明をより一層推進させていきたい。

Development of a novel method based on neural network analysis to improve techniques in drug discovery for neurological and psychiatric disorders

In a diverse society, it is an urgent challenge to clarify the pathology of neuropsychiatric disorders presenting with higher brain dysfunction and to develop a drug discovery strategy. Therefore, it is of great significance to establish an evaluation system that will play a key role in drug discovery strategies. The aim of this study was to establish an evaluation system to improve drug discovery technology for neuropsychiatric disorders by developing a comprehensive, automated system to visualize the neuronal circuitry and correlating this with animal behavior.

● The establishment of an evaluation system for improving drug discovery technology using a comprehensive analysis of neuronal circuitry.

1. Development of a drug discovery evaluation system utilizing alterations in neuronal circuit activity as a biomarker.
2. Creation of an evaluation system to improve drug discovery technology by investigating changes in neuronal circuit activity, including inhibitory neurons.
3. Construction of a causal relationship between neuronal circuit activity and animal behavior.
4. Establishment of an evaluation system to improve drug discovery technology based on alterations in functional connectivity between two regions.

By employing a two-photon holographic microscope with precise stimulation accuracy at the single-cell level and spatial resolution (XY: 1.2 μm , XZ: 3.6 μm), we obtained data on the neuronal circuitry and conducted a comprehensive analysis to extract the features of spontaneous activity. The aim was to assess the therapeutic efficacy of drug targets and establish a biomarker. Through the introduction of calcium-sensitive fluorescent protein and light-responsive protein into neurons in the primary somatosensory cortex using adeno-associated virus, we visualized and manipulated neuronal activity. We compared and validated (1) the synchronization of activity between two cells during spontaneous activity of 50-100 neurons, (2) the synchronization of activity between two cells during holographic optical stimulation of a single neuron, and (3) the synchronization of activity between two cells during simultaneous holographic stimulation of two neurons. The results demonstrated similar synchronization of activity between the two cells during spontaneous activity and simultaneous holographic stimulation of two functionally connected neurons. This suggests the potential for predicting functional connections between neurons based on the spontaneous activity of the neurons. Furthermore, simultaneous holographic stimulation of two types of neuronal cells revealed that inhibitory neurons suppressed the activity of excitatory neurons by approximately 30%, providing data that can be used to predict neuronal cell types. By applying the constructed evaluation system to a mouse model of inflammatory pain, we successfully extracted the characteristics of neuronal circuit activity during pain formation. This included activity synchronization between neurons during spontaneous activity and increased functional connectivity. These findings have been published as a research result (Okada T, **Kato D** et al., 2021).

Additionally, using the acquired data, we constructed a neural network capable of identifying the crucial cells responsible for pain behavior. By manipulating the extracted neuronal activity with a holographic microscope, we were able to induce pain behavior, thus verifying the causal relationship between neuronal activity and animal behavior.

Moreover, we investigated the effects of cholinesterase inhibitors on the functional responses of neurons in the posterior cingulate cortex, a region involved in higher brain functions, using a mouse model of Alzheimer's disease. The results

suggested that neurons near amyloid plaques exhibited heightened functional response intensity to holographic stimulation, and this enhancement could be attenuated by cholinesterase inhibitors. This allowed for the comprehensive analysis of the constructed neural circuit infrastructure to assess the therapeutic effects of existing drugs. Additionally, by simultaneously observing the activity of neuronal populations in other brain regions with functional connections using fiber photometry during the manipulation of neuronal activity in a specific brain region, we established an experimental system for evaluating functional connections between the two regions.

5. Improvement and development of a system enabling the evaluation of neuronal activity in a three-dimensional level

6. Development of an automatic holographic stimulation system

The limitation of conventional two-photon microscopy imaging (2-30 Hz) lies in its low temporal resolution. Moreover, due to the layered structure of the cortex, there is a need for a method that can evaluate neuronal activity with high temporal resolution and three-dimensional spatial information in order to accurately observe neuronal dynamics. By introducing calcium-sensitive fluorescent protein into neurons using adeno-associated virus, we obtained two-dimensional positional information of the neurons through two-photon holographic microscopy. Subsequently, we captured images with high temporal resolution (100-1000 Hz) using an imaging sensor while applying holographic light stimulation to several groups of neurons within the acquired images, after creating two-dimensional multi-spots using this microscope. Additionally, we performed similar holographic stimulation on neurons in different planes at a distance of 150 μm . As a result, we established an evaluation system for neuronal activity with high temporal resolution (100-1000 Hz) and three-dimensional spatial information. Furthermore, we successfully developed a program for the automated and comprehensive implementation of these holographic stimulation.

In the future, we would like to use this established evaluation system to further elucidate the therapeutic effects of drugs and their mechanisms in mouse models of neurological and psychiatric disorders.