

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04498

研究課題名（和文）高精細電気計測による疼痛情報発生の細胞内メカニズム解明

研究課題名（英文）Studying Intracellular Mechanisms of Pain Information Generation by High-Resolution Electrical Measurement

研究代表者

榛葉 健太（Shimba, Kenta）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：80792655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞内のどこで痛みが生じるかの理解を目的として、培養した感覚神経細胞に対する高精度な電気計測手法の開発を行った。結果、これまで計測が困難であった、跳躍伝導と呼ばれる現象の空間的な伝搬パターンの電気計測に世界で初めて成功した。また、痛みの信号が発生する原因となる、細胞が刺激に対してより過敏に応答する現象である感作状態を計測チップ上で再現できた。以上の成果は、痛みがどこで発生するかへの理解に向けた基盤技術を開発できたという点で重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で計測された跳躍伝導の空間的な伝搬パターンを計測することで、染色や組織の観察によって脱髄が観察されるより早く、ミエリン鞘が変性する現象である脱髄による機能低下を発見できる可能性がある。よって、脱髄疾患を早期に診断したり、進行機序を理解したりするうえで重要な技術となり得る。また、今回計測できた感作状態をより詳細に調べることで、通常は痛いと感じないレベルの信号で痛みが発生する現象の理解につながる。これらの技術は、新たな治療法の開発や、薬剤を作る際のアッセイシステムとして有効である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a electrical measurement method with high spatial resolution for cultured sensory neurons toward understanding where pain occurs within cells. As a result, we successfully measured the spatial propagation pattern of a phenomenon called "saltatory conduction" for the first time. Additionally, we were able to mimic the sensitization, which is the cellular hypersensitivity response that serves as the cause of pain signal generation, on the measurement chip. These findings are significant in terms of developing fundamental technologies for understanding where pain originates.

研究分野：生体医工学

キーワード：軸索 電気計測 ミエリン鞘 末梢神経 疼痛

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛みは体内の異常を知らせる重要な信号であるが、過剰な痛みや慢性的な痛みは生活の質を著しく低下させる。感覚神経細胞の興奮によって起こる神経障害性疼痛に限っても、有病率は先進国で全人口の7-10%程度とされ [1]、高齢化の進行に伴ってさらに上昇する可能性が高い。末梢神経障害に起因した疼痛は、感覚神経細胞の末梢側の軸索終末、軸索、および細胞体での変化が原因となり、過剰な興奮や刺激に対する反応性上昇により発生する。

これまでに各部位における痛み情報の発生機序は解明されつつあるが [2]、対症療法を除いて有効な治療法は見つかっていない。原因として、末梢神経系における痛みの発生が複数の部位が関係する複雑な反応であるのに対して、痛みの信号の発生を細胞体に対する電気計測により判断していたことが挙げられる。複雑な反応であることを考慮すると、より空間分解能の高い計測法を用いて、どこから活動が生じ、どのように伝達されるかを計測することが望ましい。しかし、直径が数 μm と細い軸索に対する高い空間分解能での計測は技術的に困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロデバイスを用いて、疼痛が起こる様々な条件下の感覚神経細胞におけるサブ細胞レベルでの興奮発生部位・機序の解明を目指す。さらに、発生した興奮が細胞内で統合され中枢へと伝達される様式を明らかにし、様々な機序をカバーする疼痛モデルの構築により新治療法開発への貢献へとつなげる。研究にあたり、サブ細胞レベルでの活動計測を行うための計測技術の開発、脱髄による痛みを対象とするために有髄神経線維の形成、および活動が少なく通常は計測が困難な感覚神経細胞の効率的な計測プロトコルの確立が重要と考えた。本研究では、上記3点について研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 細胞の取り出しと有髄軸索の形成

ミエリン鞘が形成された有髄線維を得るために感覚神経細胞とシュワン細胞を採取し培養した。具体的には、ラット胎児より感覚神経細胞の細胞体がある後根神経節(dorsal root ganglion, DRG)を採取し酵素処理により分散した。分散後の神経細胞およびシュワン細胞を培養皿もしくは計測チップ上に播種した。培養液として先行研究に報告した組成[3]を用い、ミエリン鞘の形成を促進するために培養6日目からアスコルビン酸を添加した。試料は操作時以外は CO_2 インキュベータ内に静置し、1週間に2回半量の培養液を交換した。

ミエリン鞘が形成されたことを確認するために、免疫組織化学染色および透過型電子顕微鏡を用いた観察を行った。免疫組織化学染色では、試料をパラホルムアルデヒドで固定し、細胞膜の可溶化およびブロッキング処理を施した。その後、ミエリン鞘を対象とした抗MBP抗体やNaチャンネル対象とした抗panNav抗体を用いて染色を行った。蛍光観察のため、蛍光標識した二次抗体を利用し、倒立型の顕微鏡を用いて観察した。透過型電子顕微鏡による観察についても、固定、包埋、薄切といったプロセスを経たのち、試料を観察した。

(2) 軸索の信号の検出

計測には2万6千点の電極が配置されたMaxwell Biosystems社の高密度電極アレイ(HD-MEA)を用いた。HD-MEAによる計測では、同時に1000点ほどの電極から信号を計測できるため、細胞の信号を検出できるアクティブな電極を選択する必要がある。一般に、Activity scanと呼ばれる機能を用い、走査的に全電極を短時間計測した後、検出された信号の振幅や回数を基準として電極を選択する。また、軸索の信号を検出するためには、細胞体の活動でトリガをかけ、周囲の電極の信号を加算平均するAxon assayと呼ばれる計測法が用いられる。DRGの感覚神経細胞は、自発的な活動が少なく、刺激により活動を誘発しても1分程度で活動が止まることが知られている。そこで、光遺伝学の技術を用いてDRGに光応答性を付与し、光刺激により一定の頻度で発火させることとした。DRGにアデノ随伴ウイルスを用いてChR2-GFPを発現させ、GFPの蛍光信号を基に光刺激を印加する細胞を選択した。各細胞に対して、0.5 Hzの頻度で単回のパルス刺激を印加し、その応答を計測した。

(3) 電極の選択手法

Activity scanで効率よく電極を選択するためには、対象とした細胞がある程度の頻度で長期的に活動を続ける必要がある。しかし、前述のとおりDRGの活動頻度は低く、自発活動を用いた場合Activity scanでは効率的に電極を選択できないことが想定された。加えて、薬理応答の計測の際は、細胞に対して前述の光刺激を印加することは望ましくない。そこで本研究では、生きた神経細胞に取り込まれる蛍光色素であるNeuOを添加し、蛍光信号を基に神経細胞の位置を検出し電極を選択した。Activity scanとNeuOでそれぞれの電極を選択し、薬理刺激に対する応答が得られた電極の数を基準として、本手法の有効性を評価した。

(4) 末梢性感作の誘発

感覚神経細胞は、炎症などの刺激により、特定の刺激に対する感受性が上昇する現象である感作状態となることが知られている。感作は慢性痛の発症にも重要であると考えられており、HD-MEA を用いた系においても検出できることが望ましい。そこで、前述の電極選択を行った後、感覚神経細胞に対してカプサイシンを添加し、感作を引き起こす前後でカプサイシンに対する応答の変化を比較した。カプサイシンの応答評価には、添加後 1 分間の発火数を指標として用いた。

4. 研究成果

(1) 培養系における有髄線維の形成

培養 1 か月における感覚神経細胞を免疫組織化学染色で可視化した。図 1 に結果を示す。図 1A は MBP でミエリン鞘、panNav でミエリン鞘の間でできる Na チャネルのクラスターを染色した結果です。MBP 陽性の部分の間に panNav 陽性のドット上の構造が観察され、ミエリン鞘とランビエ絞輪が形成されたことが示された。さらに、ミエリン鞘の端部に発現する接着タンパク質 Caspr と panNav が交互に発現する様子も見られた(図 1B)。以上から、ミエリン鞘が形成されたことが示唆された。

2 か月程度培養した試料について、培養底面に垂直に薄切し TEM を用いて観察した。観察結果に疑似カラーを施した結果が図 2 である。ミエリン鞘はないものの軸索がシュワン細胞によって束ねられた様子 (Bundle)、形成途中のミエリン鞘 (Myelinating)、完成したミエリン鞘 (Compact myelin) が観察された。完成したミエリン鞘について拡大したところ、10 以上の層が形成されたことが観察され、成熟した状態であることが示唆された。軸索の直径とミエリン鞘まで含めた直径の比である G-ratio を計算したところ、生体内で一般的に観察される値と同様であった。

以上の結果より、細胞培養系において、感覚神経細胞の軸索に対して成熟したミエリン鞘を形成させる方法を決定できた。

(2) 跳躍伝導の計測

HD-MEA を用いてミエリン鞘を形成させた試料から軸索の伝導を検出した。1 つの感覚神経細胞から、合わせて 10mm を超える長さの軸索が検出された。代表的な結果を図 3 に示す。図 3 は上から、伝導の遅れ、伝導速度、および計測された信号の振幅を示す。伝導速度について、早い部分と遅い部分が交互に観察され、速度の遅い部分では振幅が高い傾向があった。これは、ミエリン鞘が形成され、ミエリン鞘の間に Na チャネルが集積した状態と矛盾がない。また、早い区画は 2.0m/s 程度の速度であり、数値計算の結果からも跳躍伝導が発生していたことが示唆された。加えて、数は少ないが免疫染色で観察したミエリン鞘の位置と、電気活動から検出された早い部分の位置が一致した場所が見られた。以上より、HD-MEA を用いて多点電極による電気計測から、跳躍伝導の検出に成功したと結論付けた。

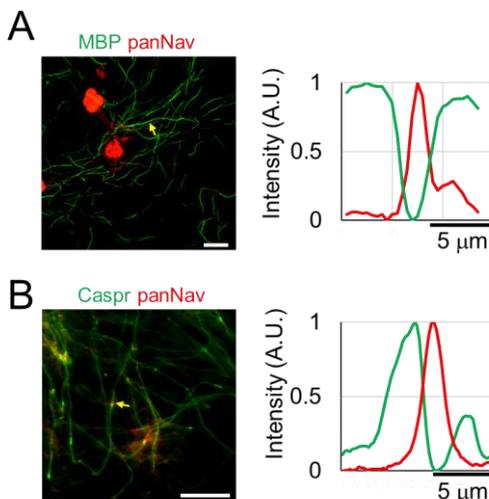


図 1 ミエリン鞘に対する染色結果.

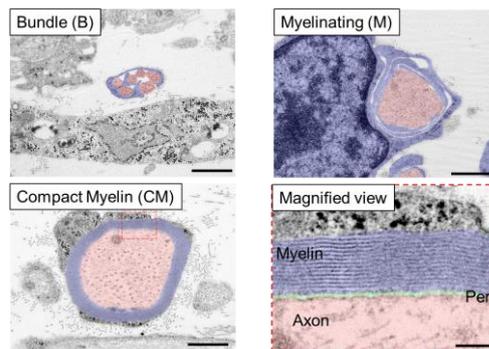


図 2 ミエリン鞘の TEM 観察像.

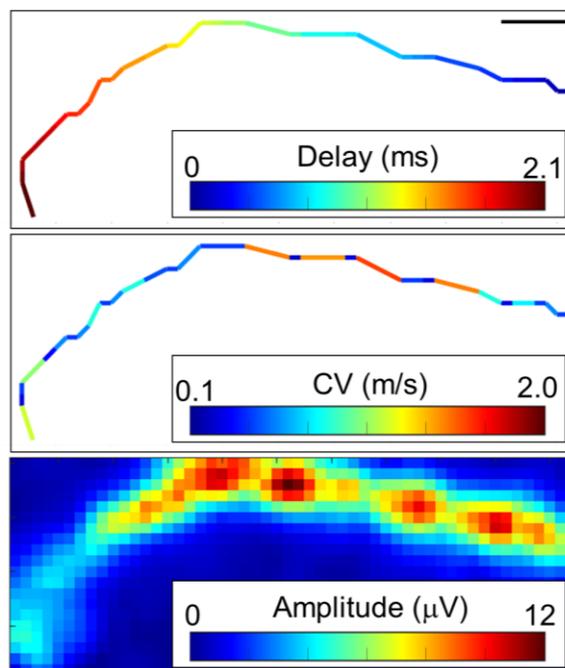


図 3 検出した軸索の特性.

(3) 電極選択の効率化

計測前に感覚神経細胞を検出するために、生きた状態の神経細胞を染色できる NeuO を用いて蛍光観察を行った。NeuO による観察と、同じ視野で固定後に免疫組織化学染色を行った結果を図 4 に示す。図 4 上段は NeuO と、神経細胞の細胞核のマーカーである NeuN 陽性部分の重ね合わせ像である。NeuN 陽性の部分の周囲に NeuO の信号が見られることより、感覚神経細胞に対しても NeuO の染色が有効であることが示された。また、NeuO で染色された神経細胞は、カプサイシンの刺激を受容する TRPV1 やサブスタンス P を受容する NK1R といったタンパク質を発現しており、感作の誘発実験に適切であることが示唆された。NeuO の信号から電極を選択した結果、Activity scan を用いた場合と比較して 5 倍程度の電極から有効な活動を検出できた。以上から、発火頻度が低く、発火が一定でない神経細胞の計測において、NeuO を用いた染色が有効であることが示された。

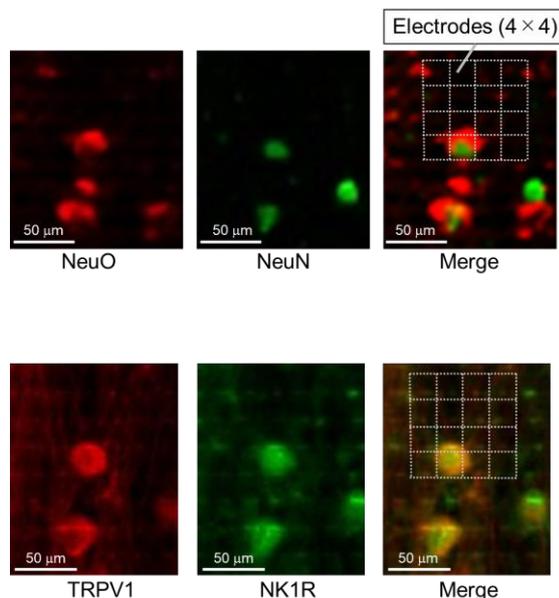


図 4 感覚神経細胞の染色画像。

(4) 感作の検出

感覚神経細胞の感作状態を検出するために、感作を誘発することで知られるサブスタンス P を添加し、カプサイシンに対する応答を計測した。結果を図 5 に示す。図 5A はサブスタンス P 添加前後でのカプサイシンに対する応答の比較である。添加後のデータを示す赤色の線は、添加前の黒色と比較して高い値をとり、サブスタンス P によってカプサイシンに対する応答が増加したことが示された。加えて、サブスタンス P を受容する NK1R に対する阻害剤を添加した条件で同様の実験を行ったところ、サブスタンス P の効果は見られなかった(図 5B)。よって、生体内と同様に、サブスタンス P が NK1R を介してカプサイシンに対する応答性を上昇させたことが示唆された。以上から、培養系で HD-MEA を用いて感作状態を検出することに成功した。

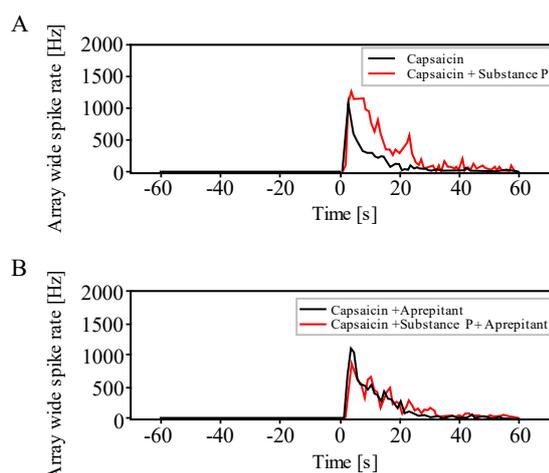


図 5 カプサイシンに対する応答。

<引用文献>

- [1] Ulderico Freo, Patrizia Romualdi, Hans G Kress, Tapentadol for neuropathic pain: a review of clinical studies, *J Pain Res*, Vol. 12, pp. 1537-1551, 2019.
- [2] Eva L Feldman, Klaus-Armin Nave, Troels S Jensen, David L H Bennett, *New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain*, *Neuron*, Vol. 93, No. 6, pp. 1296-1313, 2017.
- [3] Koji Sakai, Kenta Shimba, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, A co-culture microtunnel technique demonstrating a significant contribution of unmyelinated Schwann cells to the acceleration of axonal conduction in Schwann cell-regulated peripheral nerve development, *Integrative Biology*, Vol. 9, No. 8, pp. 678-686, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 宮原優希, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦	4. 巻 採択済み
2. 論文標題 電気活動計測を用いた培養感覚神経細胞に対する感作性評価手法の開発	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 電気学会論文誌C	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimba Kenta, Asahina Takahiro, Sakai Koji, Kotani Kiyoshi, Jimbo Yasuhiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Recording Saltatory Conduction Along Sensory Axons Using a High-Density Microelectrode Array	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 854637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2022.854637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kenta Shimba, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo	4. 巻 34
2. 論文標題 Evaluating Axon Conduction Characteristics of Cultured Sensory Neurons Toward Soft Robot Control	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Robotics and Mechatronics	6. 最初と最後の頁 263-265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 宮原優希, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 高密度微小電極アレイを用いた培養脊髄スライスのネットワーク特性評価
3. 学会等名 令和4年電気学会 医用・生体工学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林透己, 朝比奈昂洋, 古川拓磨, 張智翔, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 分散培養系における細胞外電位からの閾値下情報抽出法の検討
3. 学会等名 2022年 電気学会 電子・情報・システム部門大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮原優希, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 培養系における末梢性感作の誘発と感覚神経軸索からの活動測定手法の開発
3. 学会等名 2022年 電気学会 電子・情報・システム部門大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenta Shimba
2. 発表標題 High resolution spatiotemporal evaluation of rat sensory axons
3. 学会等名 2nd In-Vitro 2D & 3D Neuronal Networks Summit (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉谷千恵, 張智翔, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 軸索の機能評価に向けたHD-MEA上へのマイクロトンネル形成
3. 学会等名 令和4年電気学会 医用・生体工学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉谷千恵, 張智翔, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 微細加工を用いた軸索特性評価デバイスの開発
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林透己, 朝比奈昂洋, 古川拓磨, 張智翔, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 神経ネットワークの理解に向けた 精密光刺激による機能的結合の直接計測
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 高密度電極アレイを用いた軸索の伝導特性評価
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenta Shimba, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo
2. 発表標題 Recording propagating action potential along sensory fibers with high density microelectrode array toward in vitro detection of saltatory conduction
3. 学会等名 FENS2020 Virtual Forum (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenta Shimba, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo
2. 発表標題 IN VITRO RECORDING OF PROPAGATING ACTION POTENTIAL ALONG SENSORY AXON WITH HIGH DENSITY MICROELECTRODE ARRAY
3. 学会等名 ISSCR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高山 祐三 (Takayama Yuzo) (60608438)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------