

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12624

研究課題名(和文) 繰り返し引張ひずみを受けた神経細胞の損傷・修復メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the damage and repair mechanisms of neuronal cells subjected to repetitive tensile strain

研究代表者

中楯 浩康 (Nakadate, Hiromichi)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：10514987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：繰り返し軽度外傷性脳損傷を模したin vitro衝撃負荷実験において、30%、30/sの引張ひずみを1日1回、5日間ラット胎児海馬神経細胞に負荷1日後、タウタンパク質のリン酸化を免疫染色とウェスタンブロッティングにより評価した。電気刺激は、各日の引張ひずみ負荷直後に300mV/cm、20 Hzの二相性パルス波を15分間印加した。その結果、繰り返しの引張ひずみ負荷によりリン酸化タウタンパク質の1細胞当たりの発現面積と発現量は増大したが、電気刺激を印可することでその増大が抑制された。軸索損傷の修復メカニズムにタウタンパク質のリン酸化抑制が関連していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷性脳損傷は受傷機転が頭部衝突であるため、本研究のような力学的なアプローチが必要である。一方で、外傷性脳損傷は現状、治療法がない。アメリカンフットボールなどのコンタクトスポーツで多い脳震盪や軽度外傷性脳損傷はCTやMRIの画像診断では明確な異常を認めず、問診以外に有効な診察方法がないため見過ごされてしまいが、短期間に再度同様な受傷をすると脳震盪では済まず、慢性外傷性脳症を発症する。頭部衝突を繰り返すことによる外傷性脳損傷の重症化メカニズムの解明とその治療のための神経再生技術の開発が急務である。

研究成果の概要(英文)：In an in vitro impulsive loading experiment that mimics repetitive mild traumatic brain injury, phosphorylation of tau protein was evaluated by immunostaining and western blotting in rat fetal hippocampal neurons after 1 day of loading with 30% and 30/s tensile strain once a day for 5 days. Electrical stimulation was applied immediately after each day's tensile strain loading, in the form of a biphasic pulse wave of 300 mV/cm and 20 Hz for 15 minutes. As a result, repeated tensile strain loading increased the area and amount of phosphorylated tau protein expression per cell, but this increase was suppressed by applying electrical stimulation. It was found that the suppression of tau protein phosphorylation is related to the repair mechanism of axonal injury.

研究分野：生体力学

キーワード：外傷性脳損傷 脳神経細胞 軸索損傷 タウタンパク質 リン酸化 細胞引張装置 ひずみ 電気刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、柔道、サッカー、ラグビーなどのコンタクトスポーツにおける繰り返される軽度外傷性脳損傷、特に脳震盪が危険視されている。脳震盪は意識障害が軽度でありほとんど後遺症を残さずに回復する病態として認識されてきた。しかし、繰り返し受傷すると脳は刺激に対して脆弱、敏感になり、追加される外傷に対する閾値が低下し、外傷が軽度であっても重度の外傷性脳損傷にみられるような記憶力や注意力の低下を引き起こす。この慢性外傷性脳症、いわゆるボクサー脳症の概念が初めて文献で述べられたのは約 80 年前であるが、この 10 年間で米国を中心に報告が増え、社会の大きな注目を浴びるようになった。

本研究室では、これまで脳神経細胞に対して様々なひずみを負荷し、耐性値や損傷度合いを測り、繰り返し軽度外傷性脳損傷の危険性を実験的に示してきた。この時、脳神経細胞では軸索損傷による輸送障害や細胞死が確認されており、輸送障害の一因とされているのがリン酸化タウタンパク質である。損傷機序は解明されている部分が多いが、有効な治療法は殆どないのが現状である。一方で、電気刺激が脳神経細胞の修復に有用であることが古くから報告されているが、タウタンパク質のリン酸化に与える影響は分かっていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、損傷した脳神経細胞に対する電気刺激の修復効果について検討する。繰り返し軽度外傷性脳損傷を模した衝撃負荷によるタウタンパク質の発現増減やリン酸化に電気刺激の印加が与える影響を *in vitro* 実験系で評価する。本研究を通して、電気刺激による軸索損傷の修復メカニズム解明と治療法開発の一助とする。

3. 研究の方法

3.1. 細胞培養

本研究で行ったラットの解剖は、信州大学動物実験委員会の承認を得て実施し（承認番号：019026）、信州大学の動物実験規則に従って実施した。

動物は妊娠 20 日目の雌 SD ラットを使用し、実験には妊娠ラットから胎児を摘出し、胎児の海馬から単離した脳神経細胞を用いた。Poly-D-Lysine をコーティングした PDMS 製チャンバーに播種、37°C、5% CO₂ の環境下で培養し、培養液を 2 日毎に半量交換し、播種後 10 日目に実験に使用した。

3.2. 細胞引張装置

本実験で用いた細胞引張装置は、単軸引張が可能な PDMS 製の単軸引張チャンバー、サーボアクチュエータ、コントローラ、制御 PC、ポテンショメータより構成される。本装置は、単軸引張チャンバーに引張荷重を加えることで、PDMS チャンバーの培養面上の脳神経細胞にひずみを負荷する。本装置は、アクチュエータの引張速度と引張変位を独立に制御することで、様々なひずみ (0.05 ~ 0.40) とひずみ速度 (0 ~ 35 s⁻¹) を組み合わせることが可能である。本実験では、単軸引張チャンバーに対して、引張変位 4.0 mm、ひずみ速度 35 s⁻¹ の引張ひずみを負荷した。これは培養面の脳神経細胞へは、0.30 のひずみを負荷したとこととなる。

3.3. 電気刺激装置

ファンクションジェネレータガラス管電極を接続し、PDMS チャンバー内の培地に 20 Hz の二相性パルス波を 15 分間印加した。電極には単一チャンネルかつ電極の先端が良導体であるタングステン電極を採用した。直径 10 μm のタングステン線を 1 cm にカットし、直径 100 μm の銅線を 10 cm にカットする。その後、タングステン線と銅線をドータイトで接着した。この金属導線をプラーで引っ張り製作したガラス管に挿入する。先端のガラスをニッパーで切断し、ガラスから金属導線が数 μm 頭を出すようにする。最後に PDMS でガラス管の両端を金属導線と固着させた。

3.4. 電気刺激装置

抗原抗体反応を利用したタンパク質の検出をした。免疫蛍光染色による発現面積とウェスタンブロットングによる細胞内タンパク質量比から評価した。各評価方法は、対象群、ひずみを負荷した ML (Mechanical Loading) 群、ひずみ負荷後に電気刺激を印加した ML+ES (Electrical Stimulation) 群の 3 条件で比較した。

損傷度合いのバイオマーカーとしてリン酸化タウタンパク質を用いた。タウタンパク質は神経微小管関連タンパク質の一種であり、微小管の構造を安定、軸索を伸長させるのに役立つ。老化や損傷によってタウタンパク質は過剰にリン酸化し、微小管から分離、凝集体を形成し、最終的には神経変性を引き起こす。この神経変性は、アルツハイマー病などの神経変性疾患で確認されており、脳疾患における重要なバイオマーカーとして注目されている。

4. 研究成果

4.1. リン酸化タウタンパク質の発現面積の測定

1細胞当たりの発現面積は、対象群に対してML群は38.5倍、ML+ES群は24.6倍となり有意な増加が認められ、繰り返しひずみ負荷によるリン酸化タウタンパク質の発現増大を確認した。また、ML+ES群はML群に対して0.72倍に減少した(図1)。

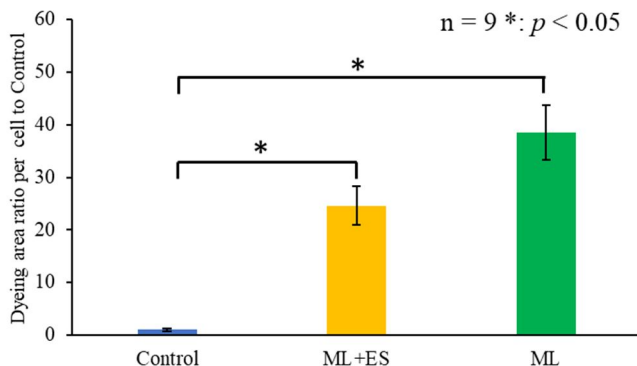


図1 リン酸化タウタンパク質の発現面積

4.2. リン酸化タウタンパク質量の測定

ローディングコントロールにはGAPDHを用いた。リン酸化タウタンパク質量は、対象群に対してML群は5.2倍、ML+ES群は2.8倍となり有意に増加した。また、ML+ES群はML群に対して0.54倍と有意な抑制が認められた(図2)。

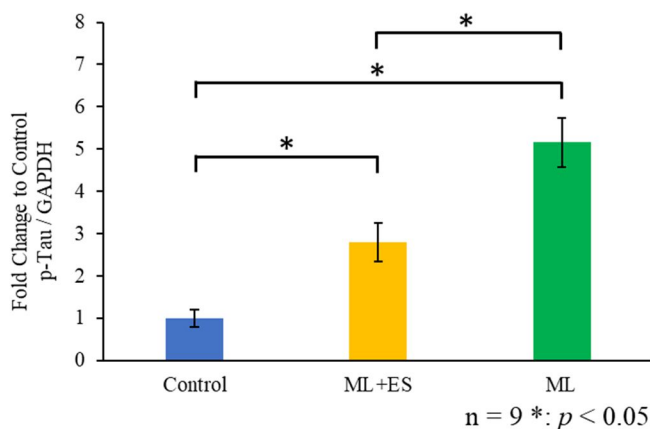


図2 リン酸化タウタンパク質量

本研究課題では、脳神経細胞への繰り返しひずみ負荷によるリン酸化タウタンパク質の発現増大と、電気刺激によるその抑制効果を示した。また、電気刺激は軸索損傷に対する修復効果を有し、機械的損傷に有効であることを示し、繰り返しひずみ負荷に対する電気刺激の有用性が明らかとなった。

本研究での培養手法の検討は、分子生物学・化学的な検証や評価をしていないため、今後更なる検討や解析が必要である。また、*in vivo*の外傷性脳損傷研究ではより長期的な観察がされており、*in vitro*での実現をするために、新手法の考案は不可欠である。本研究課題は損傷バイオマーカーによる評価をしたが、神経再生や突起伸長、生存率増加に関連するタンパク質などの修復バイオマーカーや、どちらにも関連するCa²⁺のイメージングと検出、グリア細胞との相互作用の観察による評価が、更なる電気刺激による有用性のメカニズム解明には必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 柴田 惇之介, 中楯 浩康	4. 巻 42
2. 論文標題 繰り返し電気刺激が細胞の増殖と分化に与える影響	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床バイオメカニクス	6. 最初と最後の頁 233, 238
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 佐野 拓海, 中楯 浩康	4. 巻 61
2. 論文標題 脳神経細胞に対する機械的損傷前後の電気刺激の保護効果	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生体医工学	6. 最初と最後の頁 39 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11239/jsmbe.61.39	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐野拓海, 中楯浩康, 柴田惇之介
2. 発表標題 電気刺激が損傷した脳神経細胞の軸索伸長に与える影響
3. 学会等名 日本機械学会北陸信越支部2022年合同講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野拓海, 柴田惇之介, 中楯浩康
2. 発表標題 電気刺激した脳神経細胞における軸索損傷の修復促進効果
3. 学会等名 第49回日本臨床バイオメカニクス学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野拓海, 柴田惇之介, 中楯浩康
2. 発表標題 繰り返しひずみを負荷した脳神経細胞のTauタンパク質リン酸化に対する電気刺激の抑制効果
3. 学会等名 第35回日本機械学会バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中楯浩康
2. 発表標題 繰り返し衝撃を受けた脳神経細胞のタウタンパク質リン酸化に対する電気刺激の影響
3. 学会等名 第42回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023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

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