

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23240065

研究課題名(和文) 神経調節システム *in vitro* 再構成による迷走神経刺激作用機構の解明研究課題名(英文) *in vitro* reconstruction of the NE/5-HT neuromodulation system for studying vagus nerve stimulation

研究代表者

神保 泰彦 (JIMBO, Yasuhiko)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20372401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,000,000円

研究成果の概要(和文)：難治性てんかんに対する治療手法として臨床医療の場で用いられている迷走神経刺激療法VNSの作用機構解明に向けて、刺激を直接受容する脳幹の神経核(青斑核、縫線核)と、その標的組織である海馬から神経細胞を採取して培養系に再構成、電気活動時空間パターンの計測と解析を行った。海馬培養神経回路網は、全体で同期したバースト発火を繰り返し生じることが特徴とされているが、脳幹神経核のニューロン群の活動には同期性は認められず、これらと共培養した場合は海馬の周期活動も抑制される傾向が認められた。脳幹神経核に対する電気刺激により外部からその活動を制御し、VNSが有効に作用する最適条件を見出すことが今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Vagus nerve stimulation (VNS) is one of the novel methods for treatment-resistant epilepsy. The mechanisms of VNS have not been fully understood. In this work, we used *in vitro* reconstruction systems. Brainstem neurons (locus ceruleus; LC, dorsal raphe nucleus; DR) were taken from newborn Wistar rats and cultured with hippocampal neurons on microelectrode-array (MEA) substrates. It is well-known that hippocampal neurons generate synchronized bursts *in vitro*. The spatio-temporal patterns of the activity were modified by application of norepinephrine, which was the principal neurotransmitter of LC neurons. Asynchronous spontaneous activity was observed in both LC and DR neuronal cultures. The synchronized activity of hippocampal neurons were slightly reduced in co-cultures with brainstem neurons. The next step is application of electrical stimulation to brainstem neurons to find most efficient VNS conditions.

研究分野：神経工学

キーワード：脳神経疾患 細胞・組織 シグナル伝達 ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

迷走神経刺激療法 (Vagus Nerve Stimulation; VNS) は、電極を左頸部の迷走神経に埋め込み、不整脈治療に広く利用されているペースメーカーと同様に慢性的な電気刺激を加えるものである。難治性てんかんに対する発作抑制効果が確認され、1997年に米国FDAが認可、欧州でも普及した。日本でも2010年に薬事法による承認が得られ、保険適応の治療法となった。臨床医療におけるこのような状況 (最初の報告から約20年が経過し、4万人以上の適用実績がある) にも関わらず、脳神経系におけるその作用機構は明らかになっておらず、治療効果の予測 (有効に作用するか否か) は困難と考えられている。

迷走神経は、自律神経 (特に副交感神経) 系の一部とされているが、実際に含まれている神経線維のうち80%は求心性である。電気刺激によってこれらの神経線維に誘起される活動が中枢脳神経系の活動を修飾することが抗てんかん作用、気分の改善など治療効果をもたらすことが推測されるが、複雑かつ広範囲に作用する系であるため、作用メカニズム解明の研究は進んでいなかった。刺激の受容と上位中枢への伝達に關与する脳幹神経核の活動を *in vitro* 培養系で直接観測することが現象解明に向けた有力な手段であるが、脳幹神経核の細胞群を培養系に維持する手法も十分確立されていなかった。

2. 研究の目的

申請者の研究グループでは従来から(1)複数の神経細胞群を1枚の基板上で培養する技術、(2)細胞群の電気活動を長期連続計測する技術、(3)集積化電極基板 (Micro-Electrode Array; MEA) による電気刺激システムの開発を進めてきた。本研究ではその統合により、VNSにより誘起される活動が上位中枢に影響する部位として想定する脳幹の神経核 (青斑核-locus ceruleus; LC, ノルアドレナリン作動性神経細胞群を含む)、縫線核-dorsal raphe nucleus; DR, セロトニン作動性神経細胞群を含む) の培養手法を確立、さらにその投射を受ける海馬 (hippocampus; HC)、大脳皮質 (cerebral cortex; CX) 神経細胞群と共培養することにより、脳幹神経核の細胞群の活動パターンを明らかにし、その神経調節作用の結果生じる上位中枢細胞群の活動変化を観測することを目指した。VNSにより海馬や大脳皮質領域に誘導される活動変化と、それに関与する脳幹神経核、シナプス伝達物質に関する知見を蓄積することにより、VNS治療設計、適用症例選択に向けたデータを得ることを目的として設定した。

3. 研究の方法

複数のニューロン群を区別した状態で維持しつつ、両者の間にシナプス結合形成を導くことによってその相互作用を観測する細胞培養基板を設計・製作する。具体的には、

64個のマイクロ電極を集積化したMEA基板上にPDMS (polydimethylsiloxane) 製のマイクロ培養区画を複数形成、区画の間に神経突起のみが進入可能なサイズのトンネル構造を設けることによって両者の間にシナプス結合形成を導くことを想定した。製作した基板上でLC, DR, HC, CX細胞群を培養、電気活動時空間計測とその解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 共培養基板の設計・製作

2つのマイクロ細胞培養区画を1枚のMEA基板上に集積化した培養皿のパターン及び実際に製作したデバイスの写真を図1に示す。最初にパイレクスガラス表面にフォトリソグラフィを利用して透明導電性材料 (ITO; Indium-Tin-Oxide) で電極パターンを作製した。横4個×縦8個、計32個の電極を2つの区画に配置した。区画間の距離は750 μ m、区画内の隣接する電極間距離は400 μ m、電極サイズは50 μ m角とした。ついで、PDMS製のマイクロ細胞培養区画2つとそれを連絡する通路構造を製作した。培養区画は、それぞれ横5mm、縦7mm、深さ100 μ mの方形とし、これを幅50 μ m、高さ5 μ m、間隔200 μ mの平行トンネル構造で連結するパターンとした。

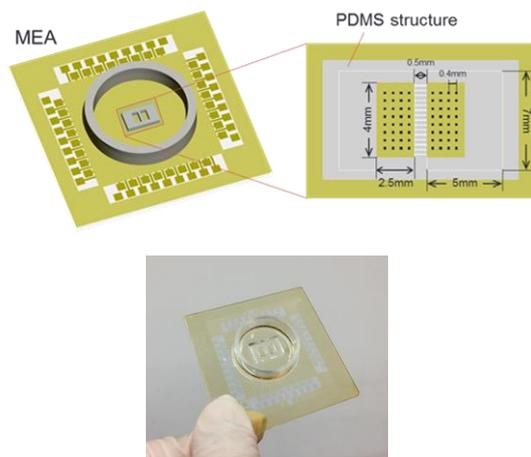


図1 マイクロ細胞培養区画集積化MEA基板

(2) LC, DR 培養神経回路の形成

1~5日齢のWistarラット新生児から摘出した全脳試料からtissue chopperを用いて厚さ300 μ mの切片群を調整した。アトラス (Joseph and Shirley 1994) を参照してLCもしくはDRを含む切片を選択、顕微鏡下で当該神経核を含む部分を切り出した。切り出した薄片を0.25% Trypsinで酵素処理して単離、培養デバイス上に播種した。基本培地はMinimum Essential Mediumに14.5mM D-glucose, 2% B-27 Supplement, 2mM L-glutamine, 25 unit/ml Penicillin-Streptomycinを添加した溶液とした。基本培地をラ

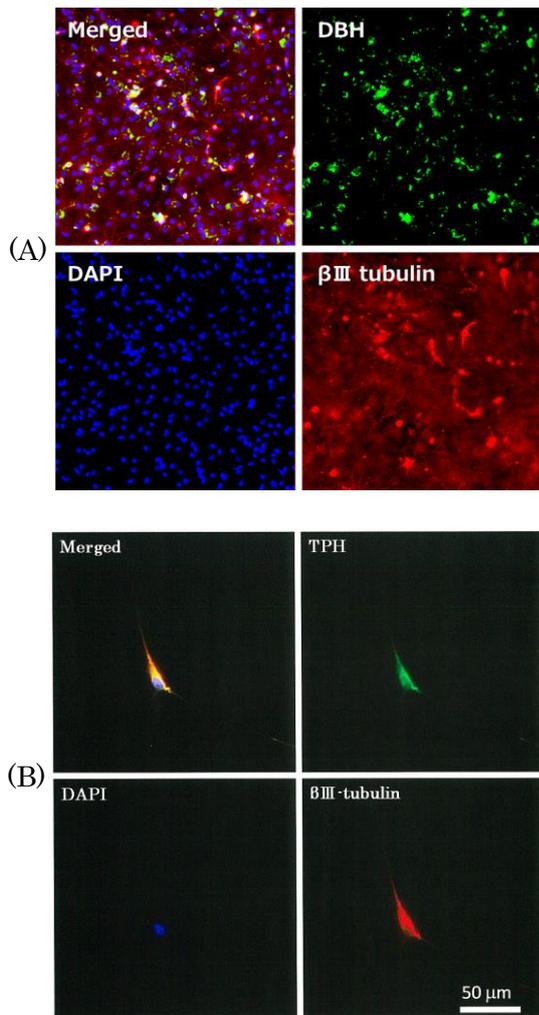


図2 免疫組織化学染色
(A) LC, (B) DR 培養神経細胞

ット新生児大脳皮質由来の神経細胞培養に 1 週間使用したものを馴化培地とし、基本培地と馴化培地を 1:1 の比率で混合した溶液を用いた。試料は 37 °C、水蒸気飽和、5 % CO₂ の条件に設定したインキュベータ内に保持し、1 週間に 2 回、半量の培地交換を行った。

想定している細胞群が抽出・培養されていることを確認するため、免疫組織化学染色を行なった。LC についてはノルアドレナリン作動性のマーカーである dopamine beta hydroxylase (DBH)、DR に対してはセロトニン作動性のマーカーである tryptophan hydroxylase (TPH) に対する抗体を使用し、神経細胞のマーカーとなる βIII-tubulin、細胞核を標識する 4,6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) と合わせて 3 重染色蛍光画像を取得した。結果を図 2 に示す。DBH、TPH 陽性部位がβIII-tubulin、DAPI でも標識されていることが認められ、目的とする神経細胞群が含まれていることが確認された。

(3) 自発電気活動パターン

海馬 (HC)、大脳皮質 (CX)、青斑核 (LC)、

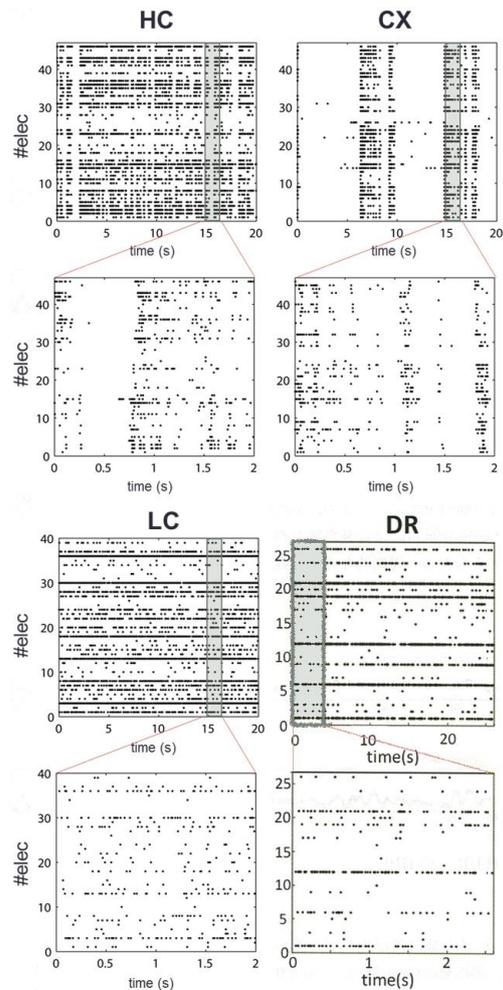


図3 海馬 HC、大脳皮質 CX、青斑核 LC、縫線核 DR 培養神経回路の自発電気活動時系列パターン

縫線核 (DR) 神経細胞群を MEA 基板上で 4 週間培養した試料から記録した自発電気活動について、スパイクを検出、ラスタプロットの形で表示したものを図 3 に示す。

① 海馬、大脳皮質培養神経回路

培養系における海馬や大脳皮質神経回路の自発電気活動については従来から多数の報告があり、回路の広い範囲で同期したバースト活動が周期的に発生することが知られている。今回の計測でもこの特徴的な自発電気活動が観測された。

② 青斑核培養神経回路

海馬や大脳皮質とは異なり、非同期的な活動が観測された。連続して発生するスパイク間の時間差—inter-spike interval; ISI—のヒストグラムは、*in vivo* 計測に基づく従来の報告と類似の特性を示した。さらに、時空間的に広がる活動パターンから移動エントロピーを指標とする細胞間結合強度推定を行った結果、結合強度は海馬や大脳皮質に比べて顕著に小さい、すなわち青斑核由来培養神経回路網の内部で形成されているシナプス結合は疎であることを示す結果を得た。

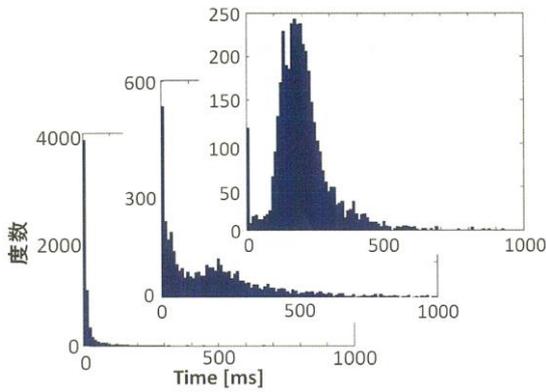


図 4 DR ニューロンの ISI ヒストグラム

③ 縫線核培養神経回路

青斑核と同様、自発活動は非同期的なスパイク時系列が主要な成分であった。1つの試料について3ヶ所の電極で検出されたスパイク時系列からそれぞれ作成したISIヒストグラムを図4に示す。時間間隔数msの位置に見られるピークは3電極に共通しているが、2つ目の電極ではこれに加えて200ms付近に新たなピークが生じており、3つ目ではそのピークがより顕著になっている。DRニューロン群についても*in vivo*計測で数Hzの定常発火を示す細胞とより短い時間間隔のバースト活動を生じるニューロンの存在が報告されており、培養系においてこれらの特性が維持されていることが明らかになった。

④ 海馬神経回路活動のノルアドレナリン投与による修飾

海馬培養神経回路に対してノルアドレナリンを薬理的に投与した際の活動パターン変化を評価した。基本的には発生するスパイク、バースト活動とも抑制される傾向が見られた。平均発火率及びスパイク時系列のフーリエスペクトルによりその特性を解析した結果、ノルアドレナリン添加によって活動のベースラインは低くなるが、約200秒という長周期を有する活動パターンが現われる(強調される)ことがわかった。

ついで、投与するノルアドレナリンの濃度に対する依存性、神経回路発達段階の影響、活動の修飾に関与する受容体つき調べた。1 μM 、10 μM のノルアドレナリンを含む溶液を15分間隔で複数回投与し、その間の自発活動変化を追跡したが、単純な濃度依存性を有する活動抑制効果にはならず、複雑な細胞内過程の寄与を示唆する結果となった。発達段階の影響に関しては、自発活動パターンが変化する培養開始後2週から4週間の試料に共通して、ノルアドレナリン添加による活動抑制効果が認められた。ただし、バースト数以外の特徴量については、発達段階に依存して異なる応答変化が見られ、GABA作動性抑制回路の発達やネットワーク構造の変化が関係することが考えられる。関与する受容体に関しては、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体

に対するアゴニスト投与実験の結果、 $\alpha 1$ 受容体は周期的な活動の強調、 $\alpha 2$ 受容体は活動抑制効果と周期的な活動の強調に関与することを示唆する結果となった。

(4) 共培養系における神経回路活動

青斑核 LC と海馬 HC、縫線核 DR と海馬 HC の共培養を行い、単独培養系での活動と比較した。結果を図5に示す。海馬の特徴である周期バーストはいずれにおいても認められるが、単独培養系に比べて共培養系では発生頻度が低くなっており、神経調節系が抑制の方向に作用していることがわかる。青斑核-海馬系について、相対スパイク時刻、移動エントロピーを指標に自発活動の発生・伝播に関する解析を行った結果、海馬から青斑核すなわち遠心性の結合が形成されている可能性を示唆する結果が得られた。

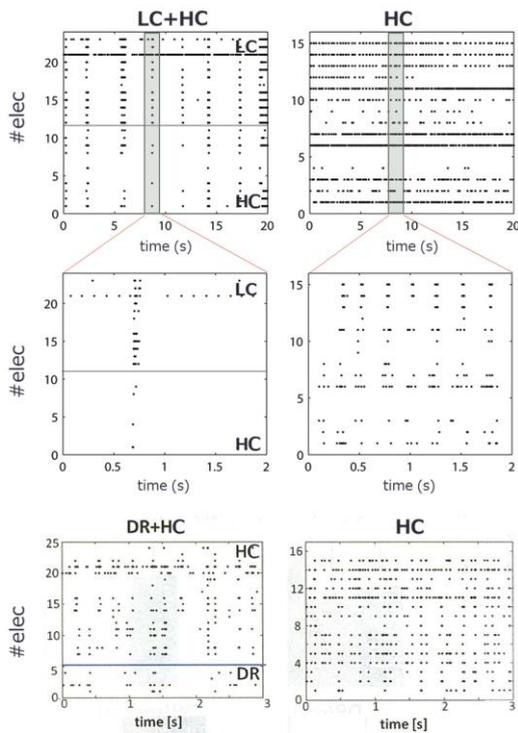


図 5 共培養神経回路の活動

(5) 総括と今後の展望

集積化電極基板上にPDMS製のマイクロ細胞培養チャンバを集積化し、チャンバ間を平行トンネル構造で連結した細胞培養皿を開発し、培養神経回路の自発活動を指標とする神経調節作用の評価を行なった。ノルアドレナリン作動性神経細胞を含む青斑核、セロトニン作動性ニューロンを含む縫線核培養神経回路の構築プロトコルを確立し、これら脳幹神経核の細胞群が海馬や大脳皮質とは異なり、培養系で非同期的な自発活動を発生していることを示した。さらに、周期バーストを特徴とする海馬培養神経回路の活動が、

これら脳幹神経核の神経調節 (neuro-modulation) 作用により抑制されていることを示唆する実験結果を得た。電気刺激により脳幹神経核の活動を外部から制御することにより VNS のてんかん発作抑制作用に結びつく知見を得ること、最も効率の良い刺激条件を見出すことにより VNS 適用条件を最適化することが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

- ① Isomura T., Ogawa Y., Kotani K., Jimbo Y., Accurate connection strength estimation based on variational Bayes for detecting synaptic plasticity, *Neural. Comput.* 27, pp. 819-844, 2015 査読有
DOI: 10.1002/eej.22517
- ② Shimba K., Sakai K., Isomura T., Kotani K., Jimbo Y., Axonal conduction slowing induced by spontaneous bursting activity in cortical neurons cultured in a microtunnel device, *Integr. Biol.* 7, pp. 64-72, 2015 査読有
DOI: 10.1039/c4ib00223g
- ③ 吉田 壘, 小谷 潔, 神保泰彦, ノルアドレナリンの複数添加による培養神経回路網に対する影響評価, *電気学会論文誌 C134*, pp. 1414-1421, 2014 査読有
DOI: 10.1541/ieej.134.1414
- ④ Saito A., Takayama Y., Kotani K., Jimbo Y., Induced current-pharmacological split stimulation system for neuronal networks, *IEEE Trans. BME* 61, pp. 463-472, 2014 査読有
DOI: 10.1109/TBME.2013.2281079
- ⑤ Hirota S., Saito A., Inoue K., Murakami A., Kotani K., Jimbo Y., *In vitro* reconstruction and functional development of the superior colliculus in the retinotectal pathway, *Neurosci. Lett.* 545, pp. 96-101, 2013 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2013.04.020
- ⑥ 磯村拓哉, 武内彬正, 榛葉健太, 小谷 潔, 神保泰彦, 結合強度推定に基づくニューロン種の分類-ドーパミンニューロンを含む神経回路網の電気活動-, *電気学会論文誌 C133*, pp. 1806-1813, 2013 査読有
DOI: 10.1541/ieej.133.1806
- ⑦ 榛葉健太, 有松和之, 磯村拓哉, 武内彬正, 小谷 潔, 神保泰彦, セロトニンによる培養神経回路網の発火パターン調節, *電気学会論文誌 C133*, pp. 1814-1819, 2013 査読有
DOI: 10.1541/ieej.133.1814
- ⑧ Takeuchi A., Shimba K., Mori M., Takayama Y., Moriguchi H., Kotani K., Lee J., Noshiro M., Jimbo Y., Sympathetic neurons modulate

beat rate of pluripotent cell-derived cardiomyocytes *in vitro*, *Integr. Biol.* 4, pp. 1532-1539, 2012 査読有

DOI: 10.1039/C2IB20060K

- ⑨ 齋藤淳史, 齊藤亜希, 森口裕之, 小谷 潔, 神保泰彦, 軟磁性材料を用いた培養神経回路網への局所誘導電流刺激, *電気学会論文誌 C132*, pp. 509-515, 2012 査読有
DOI: 10.1541/ieej.132.509
- ⑩ Takeuchi A., Nakafutami S., Tani H., Mori M., Takayama Y., Moriguchi H., Kotani K., Miwa K., Lee J., Noshiro M., Jimbo Y., Device for co-culture of sympathetic neurons and cardiomyocytes using micro-fabrication, *Lab Chip* 11, pp. 2268-2275, 2011 査読有
DOI: 10.1039/c0lc00327a

[学会発表] (計 83 件)

- ① 大岩孝輔, 榛葉健太, 湯ノ口万友, 小谷 潔, 神保泰彦, 微細加工技術を用いたマイクロ磁気刺激システムの構築, 第 54 回日本生体医工学会大会, 2015 年 5 月 7-9 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市熱田区)
- ② 磯村拓哉, 小谷 潔, 神保泰彦, 神経調節物質によるスパイク時刻依存可塑性修飾の理論, 第 54 回日本生体医工学会大会, 2015 年 5 月 7-9 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市熱田区)
- ③ 門倉智之助, 磯村拓哉, 小谷 潔, 神保泰彦, 培養神経回路網における可塑性に対するノルアドレナリン修飾作用, *電気学会電子情報システム部門大会*, 2014 年 9 月 3-5 日, 島根大学 (島根県松江市)
- ④ 吉田 壘, 小谷 潔, 神保泰彦, 青斑核由来培養神経回路網の活動評価, *電気学会電子情報システム部門大会*, 2014 年 9 月 3-5 日, 島根大学 (島根県松江市)
- ⑤ 田中幸美, 門倉智之助, 磯村拓哉, 榛葉健太, 小谷 潔, 神保泰彦, 神経新生 *in vitro* モデルの構築と空間パターン刺激に対する応答評価, *電気学会電子情報システム部門大会*, 2014 年 9 月 3-5 日, 島根大学 (島根県松江市)
- ⑥ 渡邊功治, 吉田 壘, 小谷 潔, 神保泰彦, パーキンソン病 *in vitro* モデル構築に向けた縫線核由来分散培養神経細胞の活動計測, *電気学会電子情報システム部門大会*, 2014 年 9 月 3-5 日, 島根大学 (島根県松江市)
- ⑦ Oiwa K., Shimba K., Numata T., Takeuchi A., Yunokuchi K., Kotani K., Jimbo Y., Towards micro-magnetic stimulation of autonomic nervous system -development of *in vitro* system-, 19th Int. Conf. Biomagnetism, Halifax, Canada, August 24-28, 2014
- ⑧ Yoshida L., Kotani K., Jimbo Y., Norepinephrine effect on network bursts in cultured neuronal network, 9th FENS Forum of Neuroscience, Milan Italy, July 5-9, 2014
- ⑨ Yoshida L., Kotani K., Jimbo Y.,

- Norepinephrine modulates bursting activity differently during development, 9th Int. Meet. Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, Reutlingen, Germany, July 1-4, 2014
- ⑩ 吉田 壘, 小谷 潔, 神保 泰彦, 培養神経回路網の発達におけるネットワークバーストに対するノルアドレナリンの影響評価, 電気学会医用・生体工学研究会, 東京, 2014年3月21日, 東京工業大学(東京都目黒区)
- ⑪ 田中 幸美, 門倉 智之助, 磯村 拓哉, 榛葉 健太, 小谷 潔, 神保 泰彦, 成体神経新生 *in vitro* モデルにおけるパターン認識, 電気学会医用・生体工学研究会, 東京, 2014年3月21日, 東京工業大学(東京都目黒区)
- ⑫ Iwaoka M., Shimba K., Isomura T., Kotani K., Jimbo Y., Neuronal death of dissociated cortical neurons induced by pilocarpine, 28th Symp. Biol. Physiol. Engng, 14 September, 2013, 慶應義塾大学(横浜市港北区)
- ⑬ 吉田 壘, 小谷 潔, 神保 泰彦, 海馬由来培養神経回路網のてんかん様活動に対するノルアドレナリンの影響評価, 電気学会電子情報システム部門大会, 2013年9月4-6日, 北見工業大学(北海道北見市)
- ⑭ 大岩 孝輔, 塗木 淳夫, 湯ノ口 万友, 玉利 陽三, 神保 泰彦, モデルを用いた経頭蓋磁気刺激におけるコイル配置の影響の検討, 電気学会電子情報システム部門大会, 2013年9月4-6日, 北見工業大学(北海道北見市)
- ⑮ Yoshida L., Kotani K., Jimbo Y., Norepinephrine Suppressed Bicuculline-induced bursting activity in cultured hippocampal neurons, 35th Ann. Int. IEEE EMBS Conf., July 3-7, 2013, 大阪府立国際会議場(大阪府大阪市)
- ⑯ 門倉 智之助, 磯村 拓哉, 有松 和之, 小谷 潔, 神保 泰彦, 培養神経回路網におけるノルアドレナリン修飾作用の情報量解析, 第36回日本神経科学大会, 京都国際会館(京都市左京区), 2013年6月20-23日
- ⑰ 門倉 智之助, 磯村 拓哉, 有松 和之, 小谷 潔, 神保 泰彦, 移動エントロピーを用いた培養神経回路網におけるノルアドレナリン修飾作用の解析, 電気学会医用・生体工学研究会, 東京大学先端科学技術研究センター(東京都目黒区), 2013年3月22日
- ⑱ Iwaoka M., Yoshida L., Shimba K., Takeuchi A., Kotani K., Noshiro M., Jimbo Y., Responses to electrical stimulation in reconstructed medullary-cortical system *in vitro*, 27th Symp. Biol. Physiol. Engng, 19-21 September, 2012, 北海道大学(北海道札幌市)
- ⑲ 岩岡 美由紀, 吉田 壘, 榛葉 健太, 武内 彬正, 小谷 潔, 野城 真理, 神保 泰彦, 大脳・延髄の共培養系構築と評価, 第51回日本

生体医工学会大会, 2012年5月10-12日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

- ⑳ 榛葉 健太, 村上 真菜, 磯村 拓哉, 後藤 美穂, 小谷 潔, 神保 泰彦, 培養神経回路網に対するセロトニンの効果, 第51回日本生体医工学会大会, 2012年5月10-12日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://neuron.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神保 泰彦 (JIMBO, Yasuhiko)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号: 20372401

(2) 研究分担者

湯ノ口 万友 (YUNOKUCHI, Kazutomo)
鹿児島大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 10094187

(3) 研究分担者

佐久間 一郎 (SAKUMA, Ichiro)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号: 50178597

(4) 研究分担者

川合 謙介 (KAWAI, Kensuke)
東京医療保健大学・医療保健学部・教授
研究者番号: 70260924