

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700459

研究課題名(和文) 衝撃ひずみ負荷による軸索損傷と神経細胞間情報伝達の機能的解析

研究課題名(英文) Impulsive strain-induced axonal injury and functional analysis of cell-to-cell communication in neurons

研究代表者

中楯 浩康(Nakadate, Hiromichi)

首都大学東京・システムデザイン学部・助教

研究者番号：10514987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：交通事故，コンタクトスポーツ，転倒等による頭部外傷は脳神経損傷を引き起こす．脳表の
大脳皮質と脳底部の脳幹を連絡している軸索が，回転加速度に伴う引張り応力により断裂または損傷し，神経情報伝達
が阻害されることが原因である．本研究では，引張り応力により生じる神経組織の衝撃ひずみが神経細胞間の情報伝達に
どのような影響を与えるかを検討するため，培養したラット脳神経細胞に引張りひずみを負荷し，軸索輸送物質であるア
ミロイド前駆体タンパク質を免疫蛍光染色した結果，軸索損傷により軸索輸送障害を引き起こし，細胞間情報伝達に影
響を及ぼす可能性がある閾値は，ひずみ15～22%，ひずみ速度21～27/sであることを示した．

研究成果の概要(英文)：Traumatic brain injury caused by traffic accidents, blow, falls and contact sports
, is an important public health problem throughout societies because of a contribution of disability and d
eath. While diffuse axonal injury (DAI) is one of the most serious traumatic brain injuries, DAI is caused
by sudden inertial loading to the head associated with rapid deformation of brain tissue, resulting in th
e stretching of neural axons. In this study, the cultured rat brain neuronal cells were stretched, the bet
a-amyloid precursor protein (beta-APP) that is conveyed by axonal transport accumulates where axonal tran
sport is disrupted, was stained and observed using fluorescence microscopy.
The results show that the threshold of interruption of axonal transport is strains of 15-22% at strain rat
es of 21-27/s and the accumulation of beta-APP is a quantitative marker for traumatic axonal injury at a c
ellular level.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：頭部外傷 びまん性軸索損傷 アミロイド前駆体タンパク質 脳神経細胞 細胞引張実験 衝撃ひずみ
免疫蛍光染色 微細加工

1. 研究開始当初の背景

交通事故等による頭部外傷は脳神経損傷を引き起こす。脳表の脳皮質と脳底部の脳幹を連絡している軸索が、回転加速度に伴う引張り応力により断裂または損傷し、神経情報伝達が阻害されることが原因である。引張り応力により生じる神経組織の衝撃ひずみが神経細胞間の情報伝達にどのような影響を与えるかが分かれば脳神経損傷の発症予測や発症予防の一助となる。

研究代表者はこれまでに、微細加工技術を用いて軸索の伸長方向を制御することに成功している(図1, 2)。配向させた1本の軸索に衝撃ひずみを正確に負荷することが可能となり、初期の軸索損傷である瘤生成を定量的に解析してきた。

2. 研究の目的

神経線維の走行方向は脳白質内で様々であるため、力学的負荷に対する走行方向の違いにより軸索損傷程度が異なると考えられる。そこで本研究では、マイクロフルイディクス技術を用いて神経突起を直線的に伸長させた培養神経細胞に対し、引張方向の違いによる神経突起の継時的な形態変化を観察した。また、DAI患者の脳内に多く発現が認められているβアミロイド前駆体タンパク質(beta-amyloid precursor protein: β-APP)に着目した。軸索輸送物質であるβ-APPは、引張損傷後の軸索膨張部位に蓄積し軸索輸送機能を低下させる。また、軸索球と呼ばれる軸索断裂部位への蓄積は、輸送機能の停止を引き起こす。頭部外傷時の脳組織変形による神経細胞の引張挙動を模擬可能な衝撃引張りひずみ負荷装置を用い、引張後の神経軸索のβ-APP蓄積を観察することで軸索損傷を定量的に評価した。

3. 研究の方法

衝撃引張りひずみ負荷装置

本研究で用いた衝撃引張りひずみ負荷装置の概略図を図3に示す。本装置は、単軸引張が可能なPDMS(polydimethylsiloxane)製チャンバー、サーボアクチュエータ、制御PC、ポテンショメータにより構成される。PDMSチャンバーに引張荷重を加えることでPDMS上の神経細胞にひずみを負荷することができる。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、様々なひずみとひずみ速度を組み合わせることが可能である。

衝撃負荷方向の違いによる軸索損傷評価

神経細胞を播種するための培養穴(6mm)と細胞体から伸長する軸索を直線的に配向

させるためのマイクロトンネル(幅50μm, 高さ50μm, 長さ2mm×20本)を加工したPDMS(図4)を用い、0°, 45°, 90°に配向させた軸索に対して単軸引張(ひずみ22%, ひずみ速度27s⁻¹)を負荷した。引張前、引張5分後から24時間後まで同一の細胞を観察し、軸索の断裂、膨張、退縮、消失といった形態変化を評価した。

β-APPの観察による軸索損傷評価

ラット大脳皮質由来初代培養神経細胞に4種類の衝撃ひずみ(ひずみ[%]/ひずみ速度[1/s]: 10/11, 15/21, 22/27, 30/38)を負荷し、負荷後3時間経過した神経細胞のβ-APPを免疫染色および蛍光観察した。軸索輸送が低下した神経細胞を軸索瘤にβ-APPが蓄積した細胞数で、軸索輸送が停止した神経細胞を軸索球にβ-APPが蓄積した細胞数で定量化した。

4. 研究成果

衝撃負荷方向の違いによる軸索損傷評価

神経突起の伸長方向に対して90°方向から衝撃を負荷した時の観察画像を図5に示す。引張1時間後には神経突起に瘤が生成され始め、時間経過と共に瘤数の増加や瘤の大きさの変化が確認された。また6時間後から24時間後にかけては神経突起の消失が確認された(楕円部分)。

引張後の断裂は、引張方向に対して0°(平行)もしくは90°(垂直)に配向させた軸索に多く観察された(表1)。しかし、90°に配向させた軸索は、引張後の膨張が1時間以内の一過性の増加だったのに対し、0°に配向させた軸索は引張24時間後まで膨張数が増加した(図6)。これらの結果より、軸索に負荷されるひずみの大きさだけでなく、方向の違いによっても軸索損傷の種類と度合いが異なることを示した。

β-APPの観察による軸索損傷評価

ひずみを負荷しない対照群とひずみ10%、ひずみ速度11/sの衝撃ではβ-APPの蓄積はほとんど観察されなかったが、負荷した衝撃が大きくなるにつれ、3時間後の観察において、多くの軸索瘤や軸索球が観察された(図7)。また、ひずみ22%、ひずみ速度27/s以上においてβ-APPが蓄積した軸索瘤が観察された軸索を有する細胞の割合、β-APPが蓄積した軸索球が観察された軸索を有する細胞の割合が共に有意に増加した(図8)。よって、神経細胞間の情報伝達機能を低下もしくは停止させる軸索損傷の閾値が、ひずみ15~22%、ひずみ速度21~27/sに存在することを示した。

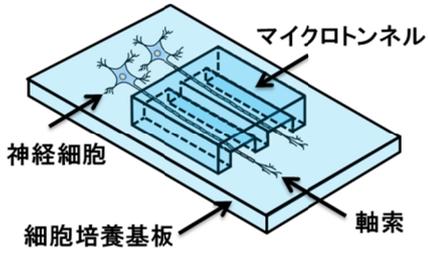


図1 マイクロトンネルを用いた軸索伸長制御

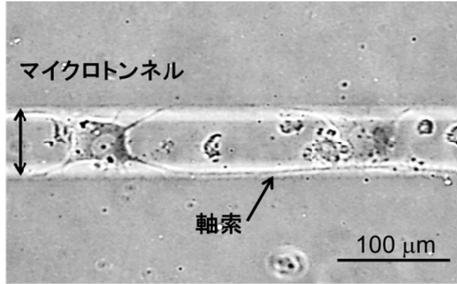


図2 マイクロトンネル内に軸索が伸長している様子

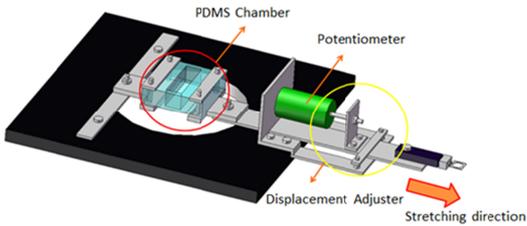


図3 衝撃引張ひずみ負荷装置

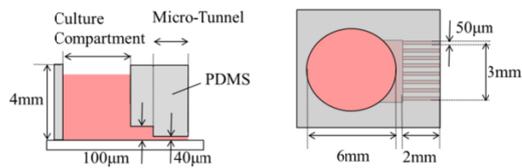
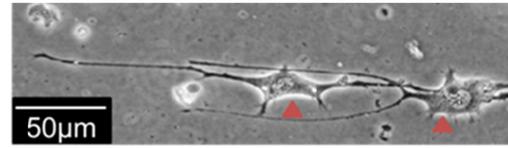


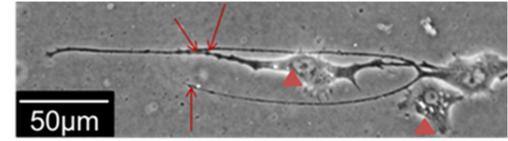
図4 衝撃引張ひずみ負荷装置の断面図(左)と平面図(右)

表1 神経突起の断裂割合と退縮割合

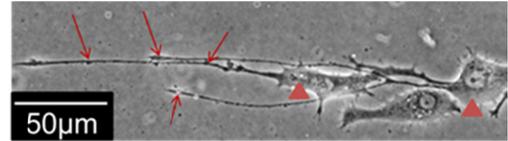
	対照群	0°	45°	90°
断裂割合	0%	22%	8%	20%
退縮割合	24%	54%	42%	52%



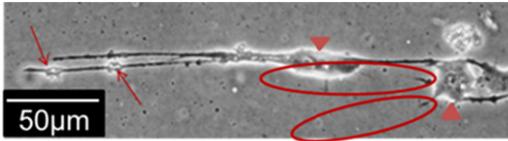
引張前



引張1時間後



引張6時間後



引張24時間後

図5 引張後の細胞形態変化(矢尻:細胞体, 矢印:神経突起に生成された瘤, 楕円領域:神経突起の消失部分)

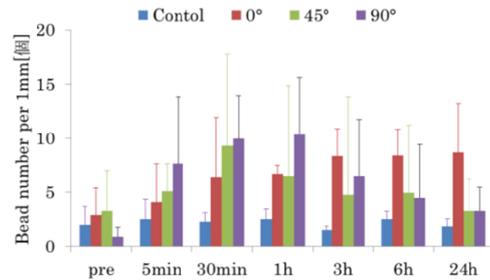
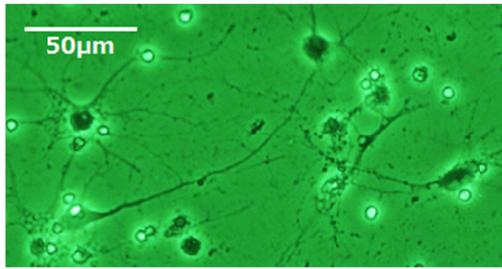
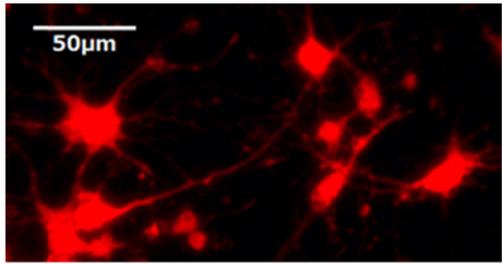


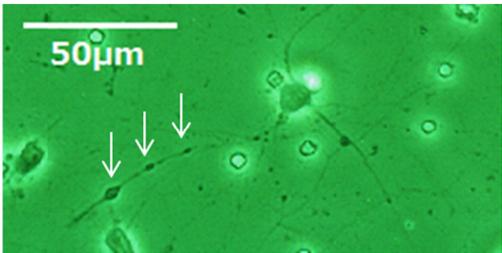
図6 引張方向に対する配向別の神経突起に形成された経時的な瘤の数の変化



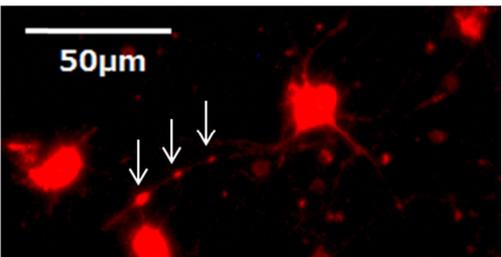
対照群：位相差画像



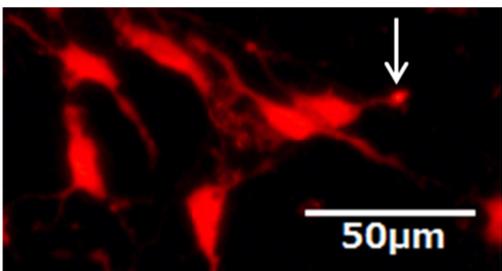
対照群：β-APP 染色画像



軸索瘤：位相差画像



軸索瘤：β-APP 染色画像



軸索球：β-APP 染色画像

図7 軸索損傷画像（矢印：β-APP 蓄積）

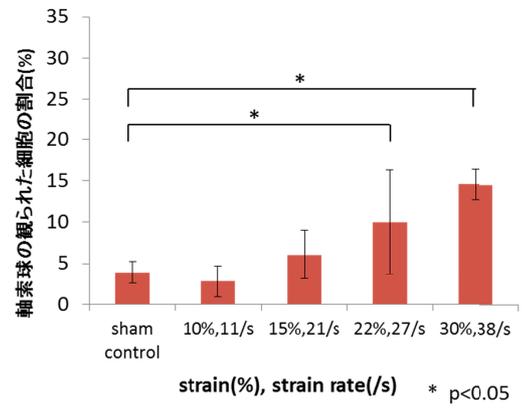
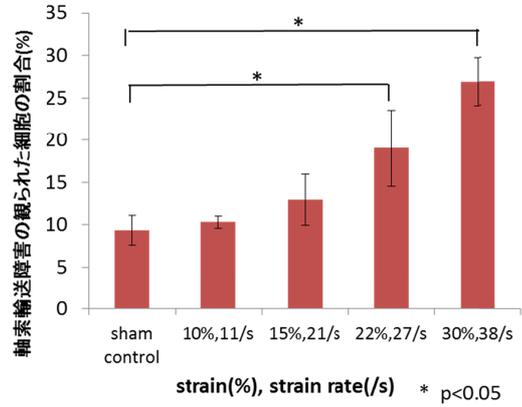


図8 軸索瘤（上）もしくは軸索球（下）が観察された軸索を有する細胞割合

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3件)

Nakadate, H., Aomura, S. and Kakuta, A., An in Vitro Stretch-Injury Model for Elongation-Controlled Neuronal Cells: Effect of Strains Along Neurite, IFMBE Proceedings 43, pp.756-759.

Nakadate, H., Umahashi, H., Kakuta, A. and Aomura, S., Progression to cell death correlates with neurite swelling induced by stretch injury, Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol.7, No.4, pp.406-415, November 2012.

中楯 浩康, 馬橋 洋人, 張 月琳, 角田 陽, 青村 茂, 二軸引張応力を負荷した培養神経細胞の損傷評価, 日本機械学会論文集A編, 78巻, 791号, 1090-1099頁, 2012年7月.

〔学会発表〕(計11件)

Nakadate, H., Aomura, S. and Kakuta, A., An in Vitro Stretch-Injury Model for Elongation-Controlled Neuronal Cells: Effect of Strains Along Neurite, The 15th International Conference on Biomedical Engineering, December, 2013 Singapore.

鶴見 明冴美, 中楯 浩康, 青村 茂, 角田 陽, 伸長方向制御した脳神経軸索の引張損傷評価, 日本機械学会 関東支部 第20期総会・講演会, 2014年3月, 東京農工大学 小金井キャンパス.

金子 由磨, 菊田 和紘, 中楯 浩康, 青村 茂, 角田 陽, 衝撃ひずみを負荷した脳神経細胞の軸索損傷評価, 日本機械学会 第26回バイオエンジニアリング講演会, 2014年1月, 仙台. 東北大学片平キャンパス.

菊田 和紘, 中楯 浩康, 角田 陽, 青村 茂, 培養神経細胞の活動電位計測のためのひずみ負荷装置の開発, 日本機械学会 第24回バイオフロンティア講演会, 2013年11月, 京都. 同志社大学 室町キャンパス 寒梅館.

中楯 浩康, 金子 由磨, 菊田 和紘, 青村 茂, 角田 陽, 軸索ひずみ損傷評価のための細胞引張装置の開発, 日本機械学会 2013年度年次大会講演論文集, J022015, 2013年9月, 岡山大学 津島キャンパス.

中楯 浩康, マイクロフルイディクスを用いた神経軸索伸長制御の細胞引張試験への応

用, BIOtech2013 アカデミックフォーラム, 2013年5月, 東京ビッグサイト.

菊田 和紘, 中楯 浩康, 角田 陽, 青村 茂, 神経活動測定のための引張損傷装置の開発, 日本機械学会関東学生会第52回学生員卒業研究発表講演会, 2013年3月, 首都大学東京 南大沢キャンパス.

中田 雄, 宮崎 祐介, 中楯 浩康, 青村 茂, 脳実質粘弾性特性を模擬した培養面のせん断変形挙動と神経細胞損傷との関係, 日本機械学会 第25回バイオエンジニアリング講演会, 2013年1月, (独)産業技術総合研究所 つくばセンター.

福村 洋平, 金子 由磨, 中楯 浩康, 青村 茂, 角田 陽, 伸長方向に沿ったひずみの違いによる軸索損傷評価, 日本機械学会 第25回バイオエンジニアリング講演会, 2013年1月, (独)産業技術総合研究所 つくばセンター.

金子 由磨, 青村 茂, 福村 洋平, 中楯 浩康, 角田 陽, 神経突起の伸長方向に対する衝撃ひずみ損傷評価, 日本機械学会第23回バイオフロンティア講演会, 2012年10, 弘前文化センター.

中楯 浩康, 青村 茂, 角田 陽, 引張衝撃負荷による培養神経細胞の機械的損傷, 日本機械学会 2012年度年次大会, 2012年9月, 金沢大学 角間キャンパス.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中楯 浩康 (Nakadate, Hiromichi)
首都大学東京・システムデザイン研究科・助教
研究者番号: 22604991