

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350509

研究課題名(和文) 衝撃ひずみ負荷による脳神経細胞の活動電位変化と軸索損傷の定量的評価

研究課題名(英文) Quantitative evaluation of the change in action potential and axonal injury in brain neurons exposed to impulsive strain

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：軸索損傷は急激な頭部の加減速による慣性力が脳を変形させ、結果として軸索が引っ張られることで起こる。本研究では、軸索損傷の発症閾値におけるひずみ速度依存性の影響を調べるため、培養神経細胞に単軸引張を負荷した。ひずみ0.15以上かつひずみ速度30 /s以上の引張条件下で軸索損傷が増加することを示した。また軸索に沿ったひずみが軸索損傷に与える影響を調べるため、引張方向に対する軸索の配向角度別に軸索損傷を測定した結果、軸索ひずみが大きいほど損傷していることが認められた。これらの結果を踏まえ、個々の軸索により正確にひずみを負荷でき、引張前後で同一細胞の活動電位を計測できる実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Axonal injury is caused by sudden inertial loading to the head associated with rapid deformation of brain tissue, resulting in the stretching of neural axons. This study aims to clarify the relation between axonal stretch and the onset of axonal injury. To examine the influence of strain rate on the threshold for axonal injury, cultured neurons were subjected to uniaxial stretching. Axonal injury increased significantly more than strain rate of 30 /s with more than strain of 0.15 even though those formations did not depend on strain rates in cultures exposed to a strain of 0.10. To examine the influence of the strain along an axon on axonal injury axonal injury was measured at every axonal angle in the stretching direction. The axons that were parallel to stretching direction were injured the most. We proposed an experimental model that subjected an axon to more accurate strain for the measurement of action potential in single neuron before and after stretching.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：頭部外傷 軸索損傷 ひずみ ひずみ速度 軸索伸長方向制御 Axonal swellings Axonal bulb Tauタンパク質

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明らかになることで脳神経損傷の発症予測や発症予防の一助となる。

申請者はこれまでに、微細加工技術を用いて軸索の伸長方向を制御し、直線的に配向させた1本の軸索に衝撃ひずみを正確に負荷できる手法を確立してきた。また、衝撃ひずみ負荷直後の軸索損傷がその後起こる細胞死と強く相関することを示し、損傷後の神経細胞の状態遷移とひずみが深く関連することを示唆した。さらに本申請研究では、衝撃ひずみによる軸索損傷が神経細胞の電気的活動に与える影響を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、衝撃ひずみに対する軸索損傷と細胞外電位の関係を明らかにする。PDMS製細胞培養基板に衝撃時の電位計測が可能な微小電極を製作し、微小電極上に細胞体を配置して軸索の伸長方向を制御することで、衝撃ひずみ負荷による神経活動変化を1細胞単位で計測し、軸索損傷との対応関係を定量的に解析する。さらに、経時的な活動電位を計測することで、神経活動の変化が可逆的もしくは不可逆的となる衝撃ひずみの閾値を明らかにする。

3. 研究の方法

単軸引張装置

本装置は、単軸引張が可能なPDMS (polydimethylsiloxane) 製チャンパー、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チャンパ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。

細胞培養

本実験では、マウス神経幹細胞 (NSCs: neural stem cells) を用いた。NSCsは神経細胞やグリア細胞に分化可能である。分化にはアストロサイト調整培地を用いた。播種密度は約50000 cells/cm²、培養期間は6日間とした。

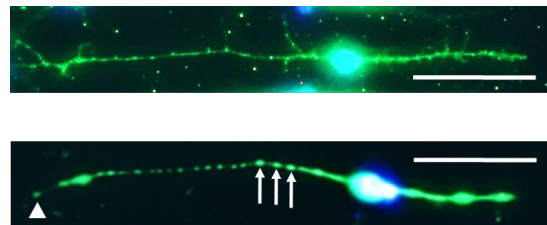
軸索損傷評価

衝撃負荷後3時間経過した神経細胞のTauタンパク質を間接法により免疫染色および蛍光観察した。Tauは軸索に局在する微小管関連タンパク質の一種である。軸索内で物質を輸送する微小管を結合させる役割を持ち、軸索内輸送にも関与するとされる。

神経損傷時の代表的な形態変化の軸索瘤 (axonal swellings) は、軸索内の微小管が断裂することで、軸索を輸送される物質が蓄積したものと考えられており、損傷後3時間程度で生成し、軸索輸送機能を低下、停止させる。また、軸索球 (axonal bulb) と呼ばれる軸索切断時に発現する末端部の大きな蓄積は、輸送機能の断絶を引き起こす。

本研究では、Tauが蓄積した軸索瘤、軸索球を持つ神経細胞を軸索損傷と定義した (図1)。軸索瘤、軸索球は直径3 μm以上の軸索上に見られる膨らみとした。またチャンパーを装置に取付けた後、引張を負荷せずに取り外し、3時間インキュベートしたものを Sham control とした。

Figure 1 The formation of axonal swellings (arrows) and bulbs (arrowhead)



The top image shows the neurons in sham control. The bottom image shows the neurons following stretching. The scale bar is 50 μm.

4. 研究成果

軸索損傷閾値のひずみ速度依存性

神経細胞を培養したPDMSチャンパーに12種類の引張変位を負荷した (図2)。ひずみ0.10の条件下では、どのひずみ速度においても引張負荷なし (sham control) と比較して軸索が損傷している神経細胞の割合に変化はなかった (図3A, B)。一方、ひずみ0.15の条件下では、軸索瘤はひずみ速度50 /sで (図3C, D)、軸索球はひずみ速度70 /sで (図3E, F) 有意に増加した。ひずみ0.20の条件下では、軸索瘤、軸索球ともにひずみ速度30 /s以上で有意に増加した。以上の結果より、軸索損傷の発症閾値は、ひずみ0.15ではひずみ速度50 /s以上の引張条件下で、ひずみ0.20ではひずみ速度30 /s以上の引張条件下でひずみ速度依存性が認められた。

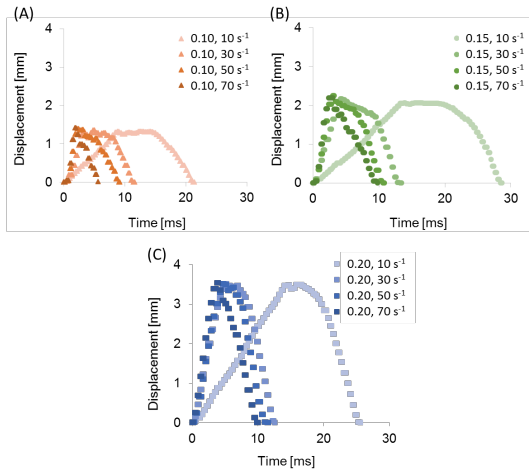


Figure 2 The displacement histories of 0.10 strain with 10 s-1 strain rate, 0.10 strain with 30 s-1 strain rate, 0.10 strain with 50 s-1 strain rate, 0.10 strain with 70 s-1 strain rate (A), 0.15 strain with 10 s-1 strain rate, 0.15 strain with 30 s-1 strain rate, 0.15 strain with 50 s-1 strain rate, 0.15 strain with 70 s-1 strain rate (B), 0.20 strain with 10 s-1 strain rate, 0.20 strain with 30 s-1 strain rate, 0.20 strain with 50 s-1 strain rate, and 0.20 strain with 70 s-1 strain rate (C).

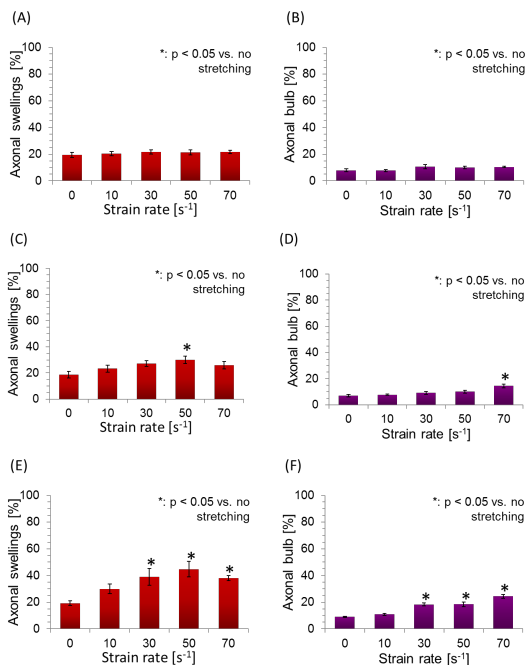


Figure 3 The rate of formation of axonal swellings (A, C, and E) and axonal bulbs (B, D, and F)

The neurons were subjected to strains of 0.10 (A and B), 0.15 (C and D), and 0.20 (E and F).

軸索ひずみと軸索損傷の関係

軸索に沿ったひずみが軸索損傷に与える影響を調べるため、引張方向に対する軸索の配向角度別に軸索損傷を測定した。その結果、軸索ひずみが多いほど単位長当たりの軸索瘤が増加していることが認められた(図4)。

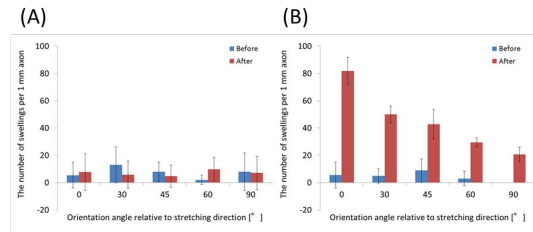


Figure 4 The number of swellings in the neurons in sham control (A) and in neurons following stretching (B)

軸索ひずみ負荷モデル

前述までの結果を踏まえ、個々の軸索により正確にひずみを負荷でき、引張前後で同一細胞の活動電位を計測できる実験系を確立した。

マイクロコンタクトプリンティング法を用いて軸索を配向制御した神経細胞に引張ひずみを負荷し、負荷前後の軸索形態と細胞外電位の変化を評価した。フォトリソグラフィとモールディングにより、PDMS製微小溝を作製し、凸部に細胞接着タンパク質を塗布、PDMS培養面に凸部をスタンプすることで、ライン&スペース状の幅0.025 mmの細胞接着部位と非接着部位を選択的に作製した。細胞接着タンパク質をパターンニングしたPDMS培養面にマウス神経幹細胞を播種、神経細胞とグリア細胞に分化させ実験に使用した。引張ひずみ負荷実験では、ひずみ10%、15%、20%とひずみ速度10/s、20/s、30/sを組み合わせ、9種類の引張条件で軸索損傷を評価した。引張ひずみ負荷により軸索が損傷した神経細胞の割合は、ひずみの増加とともにより低いひずみ速度で多くなることが分かった。一方、引張前後の経時的な観察により、引張後、軸索損傷が起こるまでの時間を計測した結果、異なるひずみ速度による時間変化は認められなかった。

以上の結果より、神経軸索の損傷割合は、ひずみ速度の増加とともに高くなることを示した。また、マイクロピペット型微小電極による細胞外電位記録では、引張前後で著しい変化は認められなかった。より感度の高い微小電極を製作する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- [1] Nakadate, H., Kurtoglu, E., Koizumi, M., Furukawa, H., Aomura, S. and Kakuta, A., Micro groove structures for directional control of neuronal growth for DAI investigation, Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology, Vol. 4, No. 5 May 2017 (in press).
- [2] Kurtoglu, E., Nakadate, H., Kikuta, K., Aomura, S. and Kakuta, A., Uniaxial stretch-induced axonal injury thresholds for axonal dysfunction and disruption and strain rate effects on thresholds for mouse neuronal stem cells, Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol. 12, No. 1, p. 16-00598, February 2017.
- [3] 柳田 航, 藤江 裕道, 大家 溪, 中樞 浩康, 小泉 宏太, 中村 憲正, 動的ひずみ環境下培養による幹細胞自己生成組織の高強度化, 臨床バイオメカニクス, Vol. 37, pp. 23-28, September 2016.
- [4] Nakadate, H., Kurtoglu, E., Shirasaki, S. and Aomura, S., Repetitive stretching enhances the formation of neurite swellings in cultured neuronal cells, Integrative Molecular Medicine, Vol.3, No.4, pp. 723-728, August 2016.
- [5] Aomura, S., Nakadate, H., Kaneko, Y., Nishimura, A. and Willinger, R., Stretch-Induced functional disorder of axonal transport in the cultured rat cortex neuron, Integrative Molecular Medicine, Vol.3, No.3, pp.654-660, May 2016.
- [6] Nakadate, H., Fukumura, Y., Kaneko, Y., Kakuta, A., Furukawa, H. and Aomura, S., In vitro uniaxial stretch model for evaluating the effect of strain along axon on damage to neurons, Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol.9, No.3, p.14-00136, December 2014.

〔学会発表〕(計 23 件)

- [1] 中樞浩康, 青村茂, 角田陽, 頭部外傷における細胞レベルの変化, 第 15 回日本機械学会傷害バイオメカニクス研究会, 2017 年 2 月 24 日, 東京都市大学世田谷キャンパス(招待講演)(東京都世田谷区)

- [2] 白崎祥多, 中樞浩康, 青村茂, 角田陽, 繰り返し引張ひずみを受ける神経細胞の経時的観察, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 1 月 19-20 日, ウィンクあいち(愛知県名古屋市中区)
- [3] 佐藤尚樹, 中樞浩康, 青村茂, 角田陽, 回転衝撃による二軸ひずみを受ける神経細胞の経時的損傷評価, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 1 月 19-20 日, ウィンクあいち(愛知県名古屋市中区)
- [4] 鶴見明冴美, Kurtoglu Evrim, 中樞浩康, 青村茂, 角田陽, 衝撃引張による神経軸索損傷のひずみ速度依存性, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 1 月 19-20 日, ウィンクあいち(愛知県名古屋市中区)
- [5] 古川英典, 中樞浩康, 青村茂, 角田陽, 神経軸索の方向制御技術に応用した細胞引張実験と損傷評価, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 1 月 19-20 日, ウィンクあいち(愛知県名古屋市中区)
- [6] 青村茂, 中樞浩康, 佐藤尚樹, 古川英典, 松井靖浩, 回転衝撃を受ける神経細胞の耐性評価, 自動車技術会 2016 年秋季大会, 2016 年 10 月 19-21 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- [7] 中樞浩康, Kurtoglu Evrim, 青村茂, 角田陽, 松井靖浩, 脳神経細胞のひずみ耐性評価, 自動車技術会 2016 年秋季大会, 2016 年 10 月 19-21 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- [8] 中樞浩康, 古川英典, 佐藤尚樹, 青村茂, 角田陽, 培養神経細胞の衝撃耐性評価のための一軸引張装置の開発, 第 43 回日本臨床バイオメカニクス学会, 2016 年 10 月 8-9 日, 北海道立道民活動センターかでの 2・7(北海道札幌市)
- [9] 中樞浩康, 青村茂, 角田陽, 脳神経細胞の衝撃ひずみ耐性評価, 日本機械学会 2016 年度年次大会, 2016 年 9 月 12-14 日, 九州大学伊都キャンパス(福岡県福岡市)
- [10] 中樞浩康, 青村茂, Kurtoglu Evrim, 古川英典, 佐藤尚樹, 衝撃引張ひずみによる培養神経細胞の軸索損傷評価, Dynamics and Design Conference 2016, 2016 年 8 月 23-26 日, 山口大学常盤キャンパス(山口県宇部市)

- [11] 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 脳神経細胞における耐性値の開発, 第 52 回日本交通科学学会学術講演会 2016年6月18-19日, 東京都立産業技術高等専門学校荒川キャンパス(東京都荒川区)
- [12] 白崎祥多, 青村茂, 中楯浩康, 繰り返し低ひずみが与える神経細胞の損傷評価, 日本機械学会関東学生会第 55 回学生員卒業研究発表講演会 2016年3月10日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)
- [13] 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 外傷性脳損傷研究のための衝撃試験装置の開発と脳細胞の耐性評価, 日本機械学会バイオエンジニアリング部門 第13回回傷害バイオメカニクス研究会, 2016年2月5日, 東京都市大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区)
- [14] 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 外傷性脳損傷研究のための衝撃試験装置の開発と脳組織・細胞の耐性評価, 日本生体医工学会専門別研究会 第 157 回バイオメカニクス研究会, 2016年1月8日, 首都大学東京日野キャンパス(東京都日野市)
- [15] Kurtoglu Evrim, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 衝撃引張りひずみを受ける培養神経細胞の耐性評価, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016年1月9-10日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)
- [16] 佐藤尚樹, Kurtoglu, Evrim, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 脳神経細胞の耐衝撃回転加速度の評価のための実験装置の設計・開発, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016年1月9-10日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)
- [17] 古川英典, Kurtoglu, Evrim, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 伸長方向制御した神経軸索の衝撃引張りひずみ耐性評価, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016年1月9-10日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区)
- [18] 中楯浩康, 佐藤尚樹, 青村茂, 角田陽, 衝撃ひずみを負荷した培養脳神経細胞における軸索輸送の損傷閾値, 日本機械学会 2015 年度年次大会, 2015年9月13-16日, 北海道大学札幌キャンパス(北海道札幌市)
- [19] Hiromichi NAKADATE, Kazuhiro KIKUTA, Evrim KURTOGLU, Shigeru AOMURA, Akira KAKUTA, Caroline DECK, Remy WILLINGER, Injury threshold for axonal transport by observation of β -amyloid precursor protein in cultured rat brain neurons exposed to impulsive strain, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, 16-19 September 2015, Hokkaido University (北海道札幌市)
- [20] Hidenori Furukawa, Akira KAKUTA, Hiromichi NAKADATE, Shigeru AOMURA, Evaluation of effect of impulsive strain and growth direction control of cultured brain neuronal cells, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, 16-19 September 2015, Hokkaido University (北海道札幌市)
- [21] 菊田和紘, 中楯浩康, 青村茂, 角田陽, 衝撃ひずみが脳神経細胞の情報伝達に与える影響, 日本機械学会 第 27 回バイオエンジニアリング講演会, 2015年1月9-10日, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)
- [22] Aomura, S. and Nakadate, H., Diagnosis of Axonal Injury by observing the leaked β -APP, The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, 1-4 September 2014, Shima Kanko Hotel The Classic (三重県志摩市)
- [23] Nakadate, H., Kaneko, Y., Kikuta, K., Aomura, S. and Kakuta, A., Evaluation of Stretch-injured Axon in Brain Neuronal Cell by Observation of β -Amyloid Precursor Protein, 7th World Congress of Biomechanics, 6-11 July 2014, Boston (USA)

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