

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12870

研究課題名(和文) ストレス応答in vitro再構成による脳神経疾患発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) in vitro reconstruction of HPA negative feedback system underlying neurodegenerative diseases

研究代表者

神保 泰彦 (Jimbo, Yasuhiko)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：20372401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス環境が神経変性疾患につながる機構の解明に向けて、視床下部 - 下垂体 - 副腎系を構成する要素の培養手法確立、中枢神経系のストレスホルモン(GulcoCorticoid; GC)応答観測を目指して研究を実施した。GCフィードバックの起点となる視床下部室傍核の培養手法が確立され、主要な標的の一つである海馬細胞群において、培養環境下10 μMのGC投与に対して1週間の間自発バースト発生周期およびその時間的なパターンに変化が生じることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism by which the stress environment leads to neurodegenerative diseases, in vitro reconstruction of hypothalamus-pituitary-adrenal axis was studied. Cells including paraventricular nucleus of the hypothalamus, which is a starting point of GulcoCorticoid (GC) feedback, were successfully cultured. Hippocampal cells, which is one of the main targets of GC feedback, showed gradual changes in their spontaneous electrical activity patterns within one week under 10 μM GC administration.

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

ストレスが長期間持続すると、うつ病などの精神疾患を発症する可能性があることが経験的に知られているが、疾病につながるメカニズムは明らかになっていない。ストレス環境下で生体システムは自律神経系、免疫系と協調して視床下部-下垂体-副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA 系) が主要な役割を担い、長期間のストレス状態の継続により引き起こされるその変調が精神疾患につながる可能性が高いと考えられている。

HPA 系に備わる恒常性維持機構-副腎皮質から分泌されるストレスホルモン (Glucocorticoid; GC) によるネガティブフィードバックが鍵となると考えられるが、関与する脳部位は多様であり、全体像の理解は困難とされてきた。これに対し、2015年に視床下部室傍核 (paraventricular nucleus of the hypothalamus; PVN)、海馬 (hippocampus; HC)、内側前頭皮質 (medial prefrontal cortex; mPFC) の3ヶ所にGCに対する受容体が特に高濃度に発現しているという指摘がなされた (Bains et al., Nature Rev. Neurosci., 2015)。PVNから放出される corticotropin-releasing hormone (CRH) が下垂体に作用して副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone; ACTH) が分泌され、こらが副腎皮質に作用した結果分泌されるGCがPVNを含む中枢系にフィードバック作用を及ぼすというのが基本的な考え方である。

上記フィードバック系の起点となる PVN 細胞群のGCに対する応答を *in vitro* 系で調べ、さらにHCやmPFCを含む系に拡張することにより、長期間のストレス継続が脳神経疾患につながるメカニズムに関する知見を得ることが期待できる。視床下部細胞群の *in vitro* 系での研究はほとんど報告例がない状況であり、その培養手法の確立が必須となる。

2. 研究の目的

HPA 系を構成する各要素とそのフィードバックを受ける中枢脳神経組織を共培養して *in vitro* システムとして再構成、その起点となる PVN の活動亢進状態を誘起することにより、GC 高濃度状態の継続に対して中枢神経系に生じる神経活動の変調、神経変性を観測することが期待できる。これまでほとんど報告のない PVN 細胞群をはじめとしてシステムを構成する要素の培養手法を確立、GC に対する応答を観測することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

① PVN を含む視床下部細胞群

生後1-3日のWistar rat 新生児から脳全体を摘出、Tissue Chopper を利用して冠状面の切片試料 (厚さ 300 μm) を連続的に作成した。アトラスに基づいて PVN を含む位置の切片を選択、メスとピンセットで標的領域を切り

出した。採取した試料から酵素 (Trypsin) 処理により細胞懸濁液を調整、polyethyleneimine (PEI) をコーティングした培養皿に播種した。培養皿表面のコーティングについてはさらに laminine の効果についても検討した。Neurobasal Medium に成長因子等を添加した培地、DMEM に血清を加えた培地等を用いて最適培養条件の探索を実施、合わせて細胞分裂阻害薬 (cytisine arabinocid; Ara-C) 添加の影響についても評価した。

② 脳下垂体細胞群

Asaba 等の手法 (Asaba et al., Brain Res., 1998) に基づいて生後1-3日のWistar rat 新生児から脳下垂体を採取、酵素 (Collagenase) 処理により細胞懸濁液を調整、poly-D-Lysine をコーティングした培養皿に播種して DMEM に血清を加えた培地で培養した。

③ 海馬細胞群

Wistar rat 胎児 (18-19 日胚) から海馬を採取、酵素 (Trypsin) 処理により細胞懸濁液を調整、polyethyleneimine (PEI) をコーティングした培養皿に播種した。Neurobasal Medium に成長因子等を添加した培地で培養した。

(2) 免疫組織化学等染色

培養系に含まれる細胞種の評価に免疫組織化学染色を適用した。神経細胞のマーカーとして Microtubule Associated Protein (MAP)2、グリア細胞のマーカーとして Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) を用い、細胞核の染色 (DiAmidinoPhenylIndole; DAPI) と合わせて細胞群を可視化した。GC 投与の影響については Calcein AM、と Propidium Iodide を用いた生細胞、死細胞の判定を、Hoechst33342 による細胞核の染色と合わせて適用した。

(3) 活動計測

① 細胞内 Ca^{2+} イオン濃度計測

蛍光色素 (Fluo-8 AM) を利用した細胞内 Ca^{2+} イオン濃度変化のイメージングによる自発活動評価を行った。500 \times 500 pixel, 1 frame/s, 10 分間の条件で蛍光画像を取得した。

PVN 培養系に対しては、自発活動及び電位依存性 K^{+} チャンネルに対するアンタゴニスト (4-AminoPyridine; 4-AP) 存在下での活動につき記録した。合わせて Hoechst33342 による細胞核染色を適用し、活動を生じる細胞の割合を定量化した。脳下垂体細胞群については CRH 投与前後での活動変化を比較した。

② 電気活動計測

神経細胞群が発する spike 信号の細胞外計測を行なった。64 個のマイクロ電極を集積化した細胞培養基板 (MicroElectrode-Array; MEA) を利用し、100 Hz-2 kHz の帯域の信号について 2000 倍の増幅を適用し、分解能 12 bit、標本化周波数 25 kHz でハードディスクに記録した。閾値処理によって spike 信号を検出し、ラスタプロットとして表示した。

MEA 基板上に形成した海馬培養神経回路にげっ歯類における GC である corticosterone を投与し、自発活動パターンの変化を薬物投与後1週間まで継続して記録した。

4. 研究成果

(1) 視床下部細胞群の最適培養条件

培養開始後2週間の時点で固定して免疫組織化学染色を適用した結果を図1に示す. 中枢神経系の培養に用いられることの多い Neurobasal Medium ベースの培地を用いる条件では MAP2 陽性細胞の割合が低いという結果になった. MAP2 陽性細胞の割合が高く, 形態的にも良好な状態に維持されるという条件から, DMEM に FBS を 10% 添加した培地を用い, laminin コーティング, Ara-C 添加は行わないという条件が最適と判断した.

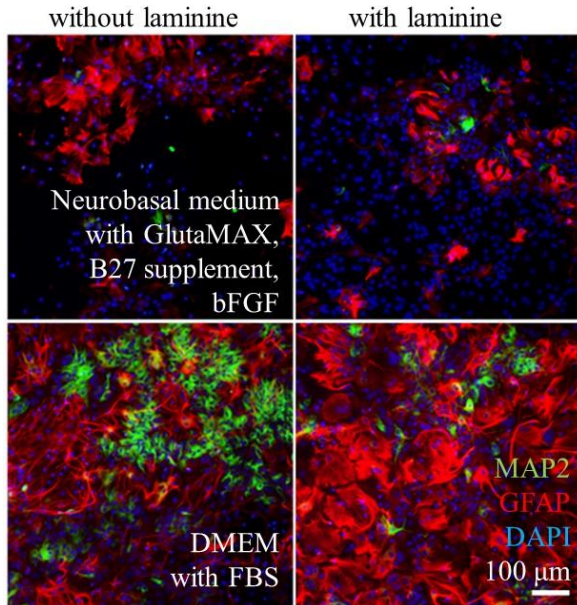


図1 免疫組織化学染色による培養系の評価

(2) 視床下部細胞群の activity

PVN を含む部位から採取した培養細胞系について細胞内 Ca^{2+} イオン濃度変動を計測した結果を図2示す. 培養条件下で Ca^{2+} 振動が観測された. 細胞群の自発活動を反映する信

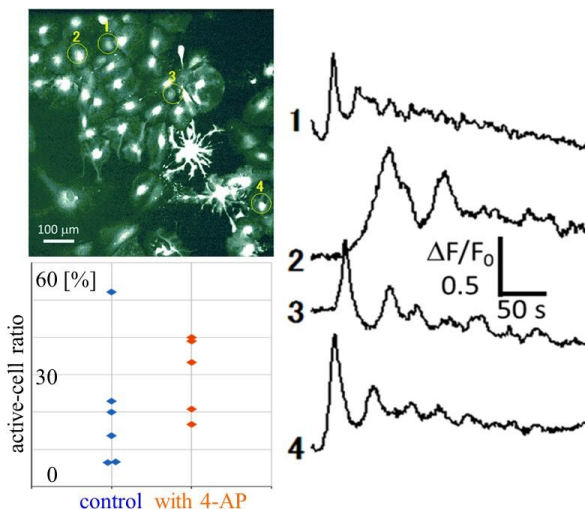


図2 PVN 培養細胞系の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

号と考えられるが, 周期が数 10 秒というゆっくりした変化であり, グリア細胞の活動である可能性がある. 観測視野中の細胞のうち活動を示した細胞の割合は $20 \pm 17\%$ (mean \pm SD) であった. これに対し, 4-AP 存在下では活動を示す細胞の割合が増加する ($30 \pm 11\%$) ことから, この自発活動における電位依存性 K^+ チャネルの寄与が示唆された.

(3) 下垂体細胞群の activity

下垂体から採取した培養細胞系についても細胞内 Ca^{2+} イメージングを行ない, 低速(数 10 秒)の自発的な変化が観測された. CRH 添加に対する活動変化について調べた結果を図3に示す. Control (HEPES buffer を注入) では注入操作後に活動の発生頻度に変化した細胞の割合は $6.8 \pm 3.5\%$ であったのに対し, CRH 添加に対しては $16.1 \pm 8.0\%$ (4 nM CRH injection), $17.7 \pm 15.8\%$ (40 nM CRH injection) という結果になった. CRH に対する応答性を有する培養細胞系が得られたと考えられるが, 薬物投与後に活動頻度が増加する場合と減少する場合があります, 応答機構の理解が今後の課題である.

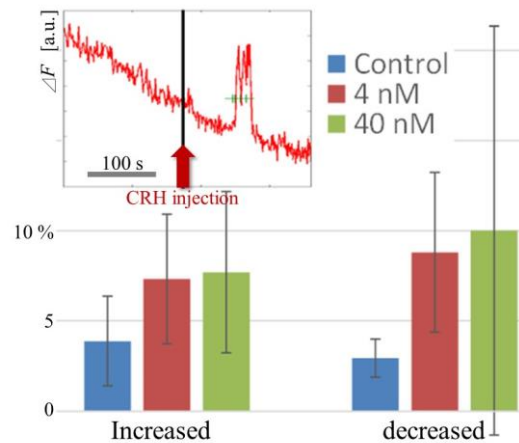


図3 下垂体細胞群の CRH 投与に対する応答

(4) 海馬細胞群の activity

培養海馬細胞系に対して GC を投与し, 48 h 経過時点で生細胞/死細胞の割合について評価した結果, GC 濃度 $10 \mu\text{M}$ 以下では顕著な影響が認められないことがわかった. この結果に基づき, MEA 基板上で 2 週間培養した細胞群について $10 \mu\text{M}$ の GC 存在下で生じる自発電気活動を 1 週間連続記録した. 結果を図4に示す.

海馬細胞群は培養系で自発電気活動を生じ, 特に周期的なバースト活動がその特徴であることが知られている. 今回用いた試料でも培養開始後2週間の時点で数秒周期のバースト活動が明確に認められた(図4(A)). GC 投与によりバースト活動が発生する周期が長くなり, 1日を過ぎる頃から非同期的な活

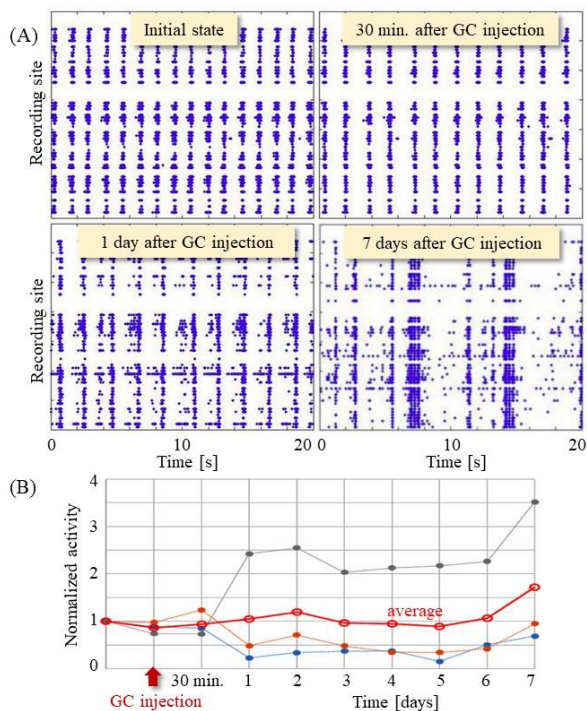


図4 海馬細胞群のGC存在下での自発活動
(A)ラスタプロット, (B)正規化活動強度

動が見られるようになった。1週間後にはその傾向はさらに顕著になり、同期活動発生周期が長くなる、各回の活動はバラつきが大きくなり1秒を越える長いバースト活動が発生する場合もある、非同期的な活動の割合が増える、という特徴が見られた。ただし、図4(B) (3つの試料について検出された単位時間当たりのスパイク数を正規化して表示)に示すとおり、活動の増減という観点からは一定の傾向は認められず、GC存在下で海馬細胞群に生じる変化の全体像解明に向けてさらに計測データを蓄積する必要がある。

(5) ストレス応答制御系の *in vitro* 再構成

PVN, 下垂体, 副腎皮質, 海馬を要素とするストレス応答ネガティブフィードバックシステムの *in vitro* 再構成に向けて、各要素の培養方法及び薬理応答につき検討した。従来ほとんど報告のなかったPVNについては組織採取・培養プロトコルが確立され、今後は神経細胞とグリア細胞の活動を区別した特性評価が課題となる。下垂体, 副腎皮質については培養系でホルモン投与に対する応答が確認された。GCフィードバックの標的の1つと考えられる海馬について、その自発電気活動を指標としてGC投与の影響を調べた結果、同期バースト活動パターンがGC存在下で徐々に乱れていく様子が観測された。

上記の成果に基づき、系を構成する各要素を1枚の基板上で共培養して海馬-PVN-下垂体間はシナプス結合、副腎皮質の前後はマイクロ流体回路で連結することによりストレス応答制御システムの *in vitro* 再構成が可

能になる。共培養基板はMEA上にシリコンゴム (Poly-DiMethyl-Siloxane; PDMS) 製のマイクロ培養チャンバ及びチャンバ間の連絡構造を形成するが、これについてもMEAパターンとPDMSの正確な位置合わせを可能にする製作条件につき検討し、最適条件を確立した。以上の成果を統合して *in vitro* 再構成系を利用した長期活動記録を行うことにより、ストレスの継続が中枢神経系に生じる神経活動の変調、神経変性につながるメカニズム解明が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Sakai K., Shimba K., Ishizuka K., Yang Z., Oiwa K., Takeuchi A., Kotani K., Jimbo Y., Functional innervation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by co-culture with sympathetic neurons developed using a microtunnel technique, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 494, pp. 138-143, 2017
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.10.065

[学会発表] (計5件)

- ① 浦田, 榛葉, 飯田, 酒井, 小谷, 神保, アルツハイマー病進行機序理解に向けたアミロイドβによるiPSC神経ネットワークへの影響評価, 電気学会医用・生体工学研究会, 東京, 2018年3月
- ② Shimba K., Sakai K., Kotani K., Yagi T., Jimbo Y., Microdevice for recording and pharmacological treatment to neural axons elongating into microtunnels, *Int. Conf. BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices*, Tokyo, Dec. 11-13, 2017
- ③ 榛葉, 酒井, 小谷, 神保, マイクロトンネル内の軸索に対する選択的薬理刺激法の開発, 電気学会電子情報システム部門大会, 高松, 2017年9月
- ④ Shimba K., Sakai K., Kotani K., Yagi T., Jimbo Y., Microfluidic device for electrophysiological evaluation of individual axons, *31st Symp. Biol. Physiol. Engng*, Osaka, November 3-5, 2016
- ⑤ Sakai K., Shimba K., Kotani K., Jimbo Y., A new culture substrate for evaluating myelinating effects on action potential propagation velocity, *31st Symp. Biol. Physiol. Engng*, Osaka, November 3-5, 2016

[その他]

ホームページ等

http://neuron.t.u-tokyo.ac.jp/?page_id=9

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