

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20631

研究課題名（和文）脳細胞ネットワークにおける乳酸代謝動学 - 脳の高次機能や神経疾患の解明を目指して -

研究課題名（英文）Dynamics of lactate metabolism in the network of brain cells -Aiming for the elucidation of brain function and neurological diseases -

研究代表者

雨宮 隆（Amemiya, Takashi）

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授

研究者番号：60344149

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究によりニューロン/アストロサイト混合系を確立することができたが、解糖系振動を観察するには至らなかった。実際の脳細胞の構造に近い内皮細胞を加えた混合培養系が有効であると推察した。脳細胞ネットワークのかわりに、ヒト子宮頸がんHeLa細胞の単培養系における代謝的相互作用の因果性を、Cross Convergent Mapping法を用いて解析した。その結果、HeLa細胞集団に複雑ネットワークの特徴を有するクラスター構造が検出された。本研究により、ANLS（Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle）仮説を検証するための実験系の指針と因果性解析手法を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸は糖代謝で産生する代謝中間体であり、脳のエネルギー代謝において特に重要な物質である。しかし、乳酸が脳機能に果たす役割には不明な部分が多い。例えば、乳酸は、脳の高次機能の発現に必要とされる一方、精神疾患にも深く関連している。乳酸が脳機能に果たす役割を解明するためには脳内の乳酸代謝動態を明らかにすることが必要である。本研究は、脳細胞における乳酸代謝動態を説明するANLS（Astrocyte Neuron Lactate Shuttle）仮説を検証するための実験手法ならびに代謝振動データの因果性解析手法を初めて開拓したことから、大きな学術的ならびに社会的意義を有するものである。

研究成果の概要（英文）：The present study could establish mix-culture systems of neuron and astrocyte, however glycolytic oscillations could not be observed in this system. To observe metabolic oscillations in brain cell systems, mix-culture systems of endothelial cells/neurons/astrocytes may be a candidate to take into account the role of endothelial cells in the brain. Cross convergent mapping (CCM) method was applied to a monolayer-system of HeLa cervical cancer cells. As a result, a cluster structure of metabolic interactions was obtained. In addition, the structure was suggested to have a characteristic of complex network. The present study could establish a guideline for the experimental systems and causal analytical method to verify the Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle (ANLS) hypothesis.

研究分野：非線形科学

キーワード：がん細胞 アストロサイト 解糖系振動 代謝振動 細胞共生 ANLS仮説

## 1. 研究開始当初の背景

乳酸は糖代謝で産生する代謝中間体であり、脳のエネルギー代謝において特に重要な物質である (Brooks, *Cell Metabolism*, 2018)。しかし、乳酸が脳機能に果たす役割には不明な部分が多い。脳細胞における乳酸代謝に関しては、ANLS (Astrocyte Neuron Lactate Shuttle) と呼ばれている仮説がある (Pellerin *et al.*, *PNAS*, 1994)。この仮説では、グルコースを代謝するのはグリア細胞の1種のアストロサイトであり、ここで産生された乳酸が神経細胞 (ニューロン) に輸送され、その後、ミトコンドリアで代謝されてニューロンのエネルギーとして利用されると考えられている。

しかし、この仮説はその真偽が直接証明されたことはなく、未だ確立した理論にはなっていない (Bak & Walls, *J. Physiol.*, 2018)。乳酸はなぜ、同じメカニズム (ANLS 仮説) にもとづく共生的糖代謝) のもとで全く異なる脳機能を導くことができるのか。

## 2. 研究の目的

乳酸が脳機能に果たす役割を解明するには、先ず ANLS 仮説の検証が必要である。さらに、実際の脳は多くのニューロンとニューロンの約 10 倍にも及ぶグリア細胞からなるネットワークで構成されるので、そのような脳細胞ネットワークにおいて ANLS 仮説の真偽を見極める必要がある。そこで、本研究は、乳酸が脳機能に果たす役割の解明を目指して、脳内におけるエネルギー代謝動態を時間・空間的に明らかにする「脳細胞ネットワークにおける乳酸代謝動学」を新たに開拓することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究を達成するために、1 細胞レベルの解糖系振動を利用した。解糖系振動とは、細胞の嫌気呼吸であるグルコースから乳酸を産生する過程で見られる代謝産物濃度の時間的振動である。ANLS 仮説によれば解糖系振動はアストロサイトで起こり、ミトコンドリアの膜電位振動はニューロンで起こる。これに対し、ANLS 仮説が成り立たなければ、この一連の振動はニューロンまたはアストロサイトの 1 細胞の中で完結することになる。解糖系振動は補酵素 NADH の自家蛍光強度の時間変化、ミトコンドリアの膜電位振動は膜電位感受性色素の蛍光強度の時間変化を用いてそれぞれ観測が可能である。従って、両方の振動を同時に観測すれば、ANLS の真偽をはじめ乳酸の代謝動態を直接確かめることができると考えられる。

しかしながら、実際の脳細胞ネットワークにおいては、それぞれのニューロンは複数のアストロサイトに覆われている。従って、あるニューロンがどのアストロサイトから乳酸の供給を受けたのか、あるいは、乳酸の供給を受けずに単独で糖代謝を行ったのか、などを特定する必要がある。

そこで本研究では、細胞間の振動データの因果性を調べるために、Granger解析などの統計学的手法をサーベイすることから開始した。例えば、Granger解析などは、複数の時系列データの因果関係を特定することができるので (Nicolaou *et al.*, *Front. Neuroinform.*, 2016)、数多くのアストロサイトとニューロンからなる脳細胞の解糖系振動と膜電位振動を乳酸の輸送を介した因果関係で結びつけることができる。

## 4. 研究成果

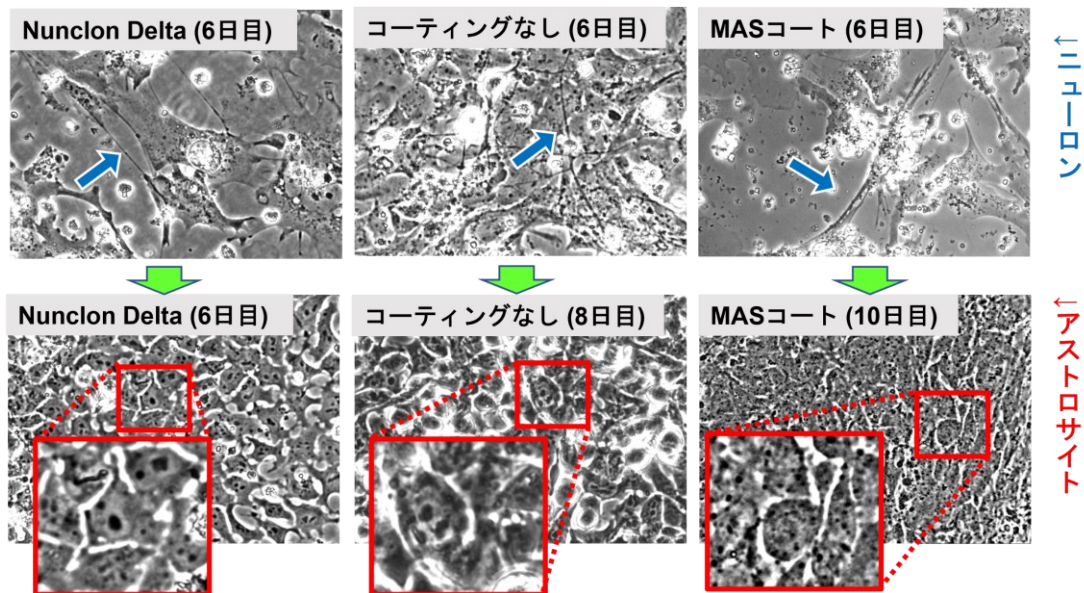


図 1. ニューロン/アストロサイト混合培養系の構築

マウス胚性腫瘍由来細胞 (P16C6) を培養し、レチノイン酸によりニューロンとアストロサイトに分化させた。3種類の基板 (Nunclon Delta, コーティングなし, MASコート) を用いた。いずれの基板においても軸索状の構造をもつニューロンと球形のアストロサイトに分化した。

#### 4-1 細胞実験

マウス胚性腫瘍由来細胞 (P16C6) を用いてニューロン/アストロサイト混合培養系を確立した (図 1)。次に、アストロサイトにおける解糖系振動を観察することを目的として、これまでがん細胞の研究で得られている結果を参考に、この脳細胞培養系にグルコース飢餓を施し解糖系を亢進させた。その結果、グルコースの取り込みによると思われるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の蛍光強度の一過的な上昇は観察されたが、引き続き起こると予想している振動現象は見られなかった。

なお、アストロサイトとニューロンのグルコース取り込み量を蛍光強度の上昇値を指標として評価したところ、アストロサイトはニューロンよりも有意にグルコースを多く取り込んでいた。このことは、アストロサイトでグルコースが代謝されて乳酸となり、ニューロンが細胞外に放出されたこの乳酸を取り込み代謝するという脳細胞の ANLS (Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle) 仮説を示唆するものである。実際の脳内では、血管を覆うように存在している内皮細胞が一酸化窒素 (NO) を産生し、それがアストロサイトの解糖系を亢進するとの研究がある (Brix *et al.*, *J Neurosci*, 2012)。そこで、NO がアストロサイトの解糖系に及ぼす効果を調べたり、脳内の細胞間相互作用により近いと考えられる内皮細胞/アストロサイト/ニューロン共培養系の構築を行ったりする必要があると考えられる。

#### 4-2 因果解析

細胞間の代謝共生動態を解析するために必要な統計的手法をサーベイし、Granger 解析の他に Convergent Cross Mapping (CCM) 法が有効であることを見出した。本研究では、アストロサイト/ニューロン共培養系において、代謝振動を観察することがで

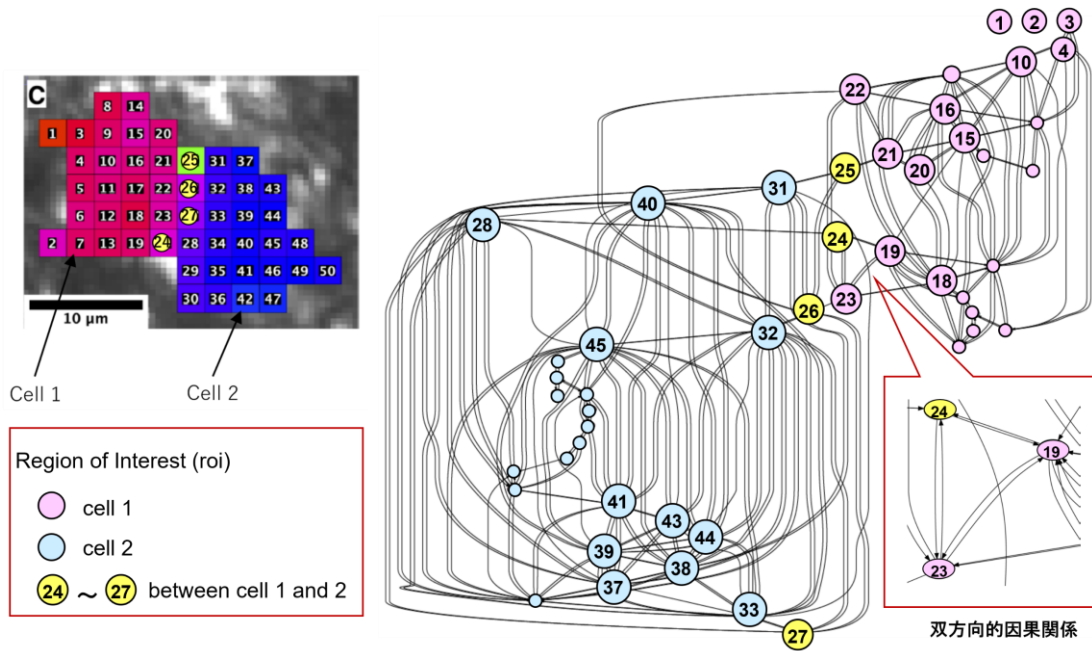


図 2. HeLa スフェロイド細胞の解糖系振動の因果性解析

左上の図はスフェロイド内の細胞 (Cell 1, Cell 2) を表す。赤と青は振動の位相が異なることを示す。細胞内の番号は分割した ROI を示す。ROI 24~27 は 2 つの細胞の境界にある。右側の図は、CCM 解析で得られた因果性のある ROI を線で結んだもの。それぞれの細胞内の ROI の振動データには双方向の因果性が見られた。一方、境界の ROI は Cell 1 と因果性が強いもの (24 と 25) と Cell 2 と因果性が強いもの (26 と 27) に分かれた。

きなかったもので、HeLa 細胞のスフェロイド (3 次元細胞塊) (Amemiya *et al.*, *FEBS J*, 2022) ならびに単層培養系 (Amemiya *et al.*, *Chaos*, 2017) における各細胞の解糖系振動データに CCM 法を適用し、振動データの因果性について検討した。

これまで、スフェロイドにおいては、実験系の解像度の限界から隣接する細胞の境界が不明瞭となる問題が生じていた。そこで、1 細胞の振動画像を約 25 個の領域 (ROI: Region of Interest) に分割し、各 ROI の振動データを CCM 法を用いて解析した (図 2)。その結果、因果関係は主に隣接する ROI 同士で見られ、多くの ROI で双方向的であった (図 2)。特に、境界の ROI 24 と 25 は Cell 1 と因果関係があり、ROI 26 と 27 は Cell 2 と因果性がある判明した。このように、CCM 解析は空間的な近傍関係が正確に抽出しており、ANLS の解析に有効であると考えられる。

また、単層培養系においては、平面単層培養された 133 個 (8,778 個の細胞対) の HeLa 細胞 (図 3) の振動時系列データを対象として CCM 解析を行い 17,556 個の CCM を得た。これらの CCM 値に対して真の因果性を抽出するために Surrogate Test (ST) を行った結果、1,013 個の CCM 値が残った。これらの CCM 値の細胞間距離依存性を調べた結果、細胞間距離が 100 μm

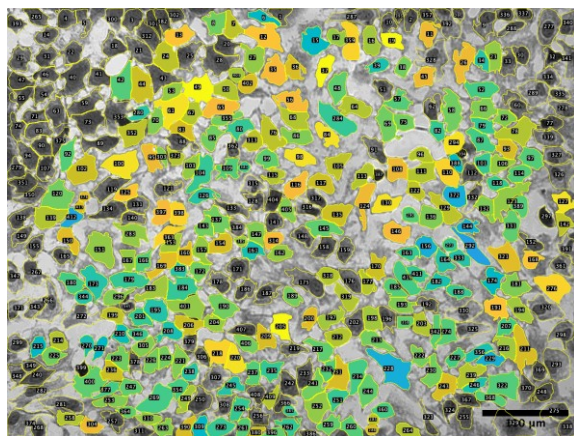


図 3. 単層培養された HeLa 細胞の顕微鏡写真  
各細胞が示す振動周波数の値で色分けしてある。

(細胞 3~10 個程度の距離) 以下の領域で代謝振動の相互作用の因果性が高いことが明らかとなった。この因果性を細胞の空間配置上にマッピングすると、細胞間の因果的相互作用に局所的クラスター構造が見られた (図 4)。さらに、解析を進めると、このクラスター構造は複雑ネットワークの特徴を有することも明らかとなった。

今のところ、HeLa 細胞においてみられるこの複雑ネットワークの生物物理学的メカニズムは明らかではないが、因果性を招く情報伝達物質としては HeLa 細胞がエネルギー代謝過程で細胞外に放出される

乳酸である可能性が高い。乳酸は、ニューロン/アストロサイトやがん細胞/CAFs 間の代謝的相互作用における情報伝達物質とされている。

本 CCM 解析では、HeLa 細胞同士において数細胞程度の距離にわたる代謝的相互作用があることをはじめて明らかにした。また、本解析手法はニューロン/アストロサイト混合培養系における代謝的相互作用を解析するための基盤を確立することができたと考えている。

#### 4-3 まとめ

実験的には、ニューロン/アストロサイト混合系を確立することができたが、解糖系振動を得るには至らなかった。脳細胞の代謝振動の観察には、実際の脳内の細胞間相互作用に近づけるために、内皮細胞/アストロサイト/ニューロンの共培養系が有効であるものと考えられる。

細胞間の因果的相互作用を調べるために、CCM 法を用いて、これまで実験的に得られている HeLa 細胞の単培養系における解糖系振動データを解析した。その結果、細胞間の代謝的相互作用の因果性が、3~10 個の細胞間距離においてクラスター構造として検出された。さらに、この構造は複雑ネットワークであることも示唆された。

本研究により、ANLS 仮説を検証するための実験系と因果性解析手法を確立することができた。

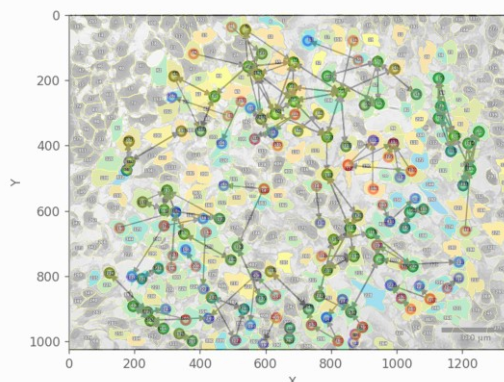


図 4. 単培養された HeLa 細胞の解糖系振動の陰性解析結果

CCM 解析で因果性が高い細胞同士を線で結んだもの。別途解析を進めると、このネットワークは複雑ネットワークの特徴を有することが分かった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Amemiya Takashi, Yamaguchi Tomohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Oscillations and Dynamic Symbiosis in Cellular Metabolism in Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.783908	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 -
1. 著者名 Amemiya Takashi, Shibata Kenichi, Takahashi Junpei, Watanabe Masatoshi, Nakata Satoshi, Nakamura Kazuyuki, Yamaguchi Tomohiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Glycolytic oscillations in HeLa cervical cancer cell spheroids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16454	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 -
1. 著者名 Kettunen Petteri, Huh Do Sung, Szalai Istvan, Yamaguchi Tomohiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Revival Oscillations in a Closed Bromate 1,4 Cyclohexanedione Acid System with Ferrioin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Theory and Simulations	6. 最初と最後の頁 2100277 ~ 2100277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adts.202100277	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 該当する
1. 著者名 渡邊昌俊, 山口智彦	4. 巻 279
2. 論文標題 今数理が面白い - 医学・生物学への応用 -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 181
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 無
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 雨宮隆, 柴田賢一, 山口智彦	4. 巻 279
2. 論文標題 がん細胞の解糖系振動と悪性度診断への応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 183-187
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 無
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 中村和幸	4. 巻 279
2. 論文標題 数理データサイエンスの拡がりと応用 - 生命科学から診断支援まで	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 188-193
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 無
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 雨宮隆	4. 巻 120
2. 論文標題 がん細胞と脳細胞における代謝振動と細胞間相互作用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 電子情報通信学会技術研究報告	6. 最初と最後の頁 37 ~ 39
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 無
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 Kubo Shintaroh, Kato Suguru, Nakamura Kazuyuki, Kodera Noriyuki, Takada Shoji	4. 巻 10
2. 論文標題 Resolving the data asynchronicity in high-speed atomic force microscopy measurement via the Kalman Smoother	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 342-351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75463-1	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 Ishizone Tsuyoshi、Nakamura Kazuyuki	4. 巻 695
2. 論文標題 LSLOCK: A Method to Estimate State Space Model by Spatiotemporal Continuity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc. 14th APCA International Conference on Automatic Control and Soft Computing(CONTROLO 2020), Lecture Notes in Electrical Engineering	6. 最初と最後の頁 342 ~ 351
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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 雨宮隆
2. 発表標題 がんの悪性度と代謝振動
3. 学会等名 電子情報通信学会 有機エレクトロニクス研究会 (OME)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 雨宮隆
2. 発表標題 細胞の代謝振動と共生 ~ 生命機能を探る ~
3. 学会等名 電子情報通信学会 有機エレクトロニクス研究会 (OME)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Amemiya
2. 発表標題 Glycolytic oscillations and their synchronization in cancer cells and astrocytes
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Takashi Amemiya
2. 発表標題 Oscillations and symbiosis in cellular metabolism
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (MRS-J) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田郁真, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 低酸素誘導因子HIFがヒト子宮頸がんHeLa細胞の解糖系振動へ及ぼす影響
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大平泰央, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 がん細胞におけるミトコンドリアを含めた代謝中間体振動モデル
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田雅貴, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 解糖系振動におけるミトコンドリアの役割
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大沼萌香, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 アストロサイト - ニューロン共培養系における解糖系振動
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田優月, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 脂肪細胞の解糖系振動とレプチン振動
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤白直人, 柴田賢一, 雨宮隆
2. 発表標題 乳がん細胞の解糖系振動
3. 学会等名 第31回 非線形反応と協同現象研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雨宮隆
2. 発表標題 細胞の代謝振動と数理モデル - がん細胞の悪性評価への応用 -
3. 学会等名 電子情報通信学会ソサエティ大会, 先端バイオテクノロジーの医工展開
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雨宮隆
2. 発表標題 細胞の代謝共生動態のメカニズムと機能
3. 学会等名 電子情報通信学会 有機エレクトロニクス研究会 ( OME )
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Han, Kazuyuki Nakamura
2. 発表標題 The influence of velocity refresh in Sequential MCMC with the Invertible Particle Flow and Discrete Bouncy Particle Sampler
3. 学会等名 The 53rd ISCIE International Symposium on Stochastic Systems Theory and Its Applications(SSS '21) ( 国際学会 )
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雨宮隆
2. 発表標題 がん細胞と脳細胞における代謝振動と細胞間相互作用
3. 学会等名 電子情報通信学会 有機エレクトロニクス研究会 ( OME )
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田賢一
2. 発表標題 解糖系振動のHowではなくWhyに答える試み
3. 学会等名 第2回非線形科学オンライン研究会会 ( 若手の会 ) - 非平衡下で時空間発展する現象 -
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石曾根毅, 樋口知之, 中村和幸
2. 発表標題 変分推論・非線形フィルタリングを駆使した時系列データの潜在モデルの推論・予測
3. 学会等名 情報処理学会第83回全国大会(オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下村真生, 中村和幸
2. 発表標題 予測値への負の寄与を考慮したCNN回帰モデル解釈手法
3. 学会等名 情報処理学会第83回全国大会(オンライン)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Takashi Amemiya, Kenichi Shibata, Masatoshi Watanabe, Satoshi Nakata, Kazuyuki Nakamura, Tomohiko Yamaguchi	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 15
3. 書名 Glycolytic Oscillations in Cancer Cells in Physics of Biological Oscillators	

1. 著者名 T. Amemiya et al., (A. Stefanovska and P. V. McClintock Eds.)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer International Publishing	5. 総ページ数 431
3. 書名 Physics of Biological Oscillators	

〔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
研究分担者	中村 和幸  (Nakamura Kazuyuki)  (40462171)	明治大学・総合数理学部・専任教授    (32682)	
研究分担者	山口 智彦  (Yamaguchi Tomohiko)  (70358232)	明治大学・研究・知財戦略機構(中野)・特任教授    (32682)	

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