

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590120

研究課題名(和文) 神経細胞死の位置特異的情報の獲得とマイクロドメインの寄与の解明

研究課題名(英文) Acquisition of location-specific information of neuronal cell death and elucidation of contribution of the microdomains of the cell

研究代表者

枝川 義邦 (Edagawa, Yoshikuni)

早稲田大学・付置研究所・教授

研究者番号：50303607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、単一培養細胞における細胞死の位置特異的情報について細胞内のマイクロドメインの寄与について検討するためにマイクロシステムの構築とその応用を目的とした。マイクロ流体デバイスによって、孤立化した複数の単一細胞を非侵襲的に捕獲およびその場所での微小培養を実現し、層流による局所的な薬液曝露による細胞死誘発刺激の負荷を行ったところ、細胞核付近でアポトーシスのエフェクターカスパーゼである活性化型Caspase-3の発現を誘発するためには、細胞突起部のマイクロドメインに限局したストレス負荷で充分であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：This study was designed by using the microsystem in order to obtain the location-specific information of cell death in single cells in culture and to examine the contribution of cell micro-domains to it. The microfluidic device developed in the present study enabled to no-invasive capture and culture of isolated single cells in the micro-environment. And the system realized to monitor the process of the cell death induced by the localized stress exposed with a laminar flow of chemical fluid. The present study suggest that a microdomain of a cell projection played a critical role in inducing the apoptotic cell death, because the chemical stress of that was confirmed to be sufficient to induce expression of activated caspase-3 as an effector caspases of apoptosis in the vicinity of the cell nucleus.

研究分野：神経薬理学

キーワード：細胞死 神経薬理学 アポトーシス マイクロ流体システム ミクロ薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

認知症に代表される難治性の神経変性疾患には、神経細胞死が主要な原因であることが多く、機能的な脳領域の神経細胞が変性・脱落することで当該機能の維持が困難になるという神経細胞死を中心としたスキームが描かれてきている。

このことは、神経細胞死を阻害する薬物が認知症モデルとなる神経変性動物の病態を軽減させることから重要性が認められるところである。

しかし、これらの主軸となる細胞レベルでの研究は通常の培養皿における培養細胞を標本とするものであり、これまでに病態メカニズムの細胞中における詳細な位置情報は得られていない。

最近では、細胞の微小領域における応答性と細胞全体の機能性の関連が示唆されてきている。細胞表面にある受容体などの機能分子の存在確率やマルチマー化して機能を獲得する際の効率性を鑑みると、細胞膜のラフト構造のような構造的に規定されたマイクロドメインが機能単位として働く可能性が高い。そしてこのことは、細胞内のマイクロドメインのような限局した領域でのイベントが細胞全体の機能変化を導く可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、単一培養細胞における細胞死の位置特異的情報について細胞内のマイクロドメインの寄与について検討するためにマイクロシステムの構築とその応用である。細胞のマイクロドメインに対する刺激が細胞全体に及ぼす影響を観察するシステムを構築し、神経細胞の細胞死における位置特異的メカニズムを明らかにするためには、単一細胞のハンドリングを可能とするマイクロシステムをデザインし、神経細胞のパターニングや長期間の微小培養、細胞形態の制御、細胞のマイクロドメインに対する局所薬液投与システムを構築することを含む。

## 3. 研究の方法

半導体分野で頻用される微細加工技術を用いてマイクロ流体デバイスを作製し、デバイス内での細胞の孤立化と捕獲、捕獲部位での微小領域における培養を行う。また、デバイス内での培養細胞を対象としたマイクロ薬理的な刺激を行った際のライブイメージングなど形態学的・機能的な解析を施す。

## 4. 研究成果

単一培養細胞における細胞死の位置特異的情報の獲得に向けたマイクロシステムの構築においては、マイクロ流体デバイスに汎用される polydimethylsiloxane により作製したレプリカをガラスディッシュにマウントしたのを用い、デバイス内部のデザインが直線状のメインチャンネルと細胞を取り扱う半円筒状のマイクロチャンバーを配した構造のものとした。さらに、倒立型顕微鏡と簡易型インキュベータによる顕微鏡観察下での細胞培養や CCD カメラによる経時観察と組み合わせることにより捕獲後の培養細胞の挙動をライブ観察した。

デバイスのデザインと条件設定の最適化を行った結果、細胞分散液および細胞培養液をメインチャンネルに導入しメインチャンネルを流れる溶液の流量を調節し2液間のバランスを最適にすることによりマイクロチャンバーにおける単一細胞の孤立捕獲が可能であり、10の5乗個オーダーの孤立化細胞を培養液の微小流とともにデバイス内に注入することで、孤立化した単一細胞の捕獲がほぼ確実に行えることが再現でき、また、捕獲細胞が神経成長因子により形態変化を生じ突起を伸長する過程が再現可能であった。

さらに、デバイス内の微小環境において十分な突起長に伸長させた後に層流による位置特異的な薬液曝露を行うとともに培養細胞の細胞死に至る細胞内シグナルの可視化も行えることを確認した。

蛍光プローブを用いたライブイメージングにより Staurosporine 曝露が及ぼす影響の検討では、活性型 Caspase-3 に対して FRET 関連様に蛍光色を変化させる GFP・Alexa の蛍光プローブを用いることで薬液曝露のストレス誘発性に蛍光色を変化させることを確認した。

また、細胞死に至るストレスが細胞内の位置特異的に生じせしめられているかの検討では、ストレス負荷が細胞核付近での活性型 Caspase-3 発現を誘発するためには細胞突起部のマイクロドメインに限局した薬液刺激で充分であること、および、刺激領域から細胞体への細胞死情報の伝達が必要であることが明らかになった。

## 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9件)

1) Y Edagawa, T Watanabe, M Fujii, S Shoji, Local stimulation-induced cell death on microfluidic analysis: implication for intracellular

- transmission of apoptotic impact, Neurosci Res, 71:342 (2011)
- 2) Y Edagawa, T Watanabe, M Fujii, K Kawai, S Shoji, Microfluidic analysis of neurodegenerative impact evoked by local stimulation-triggered apoptotic information, Micro Tot Anal Sys, 15:1511 (2011)
- 3) 枝川義邦, “細胞死”, 日経ドラッグインフォメーション, 175: PE8-9 (2012)
- 4) 枝川義邦, “カルシウムチャネル”, 日経ドラッグインフォメーション, 181, 8-9 (2012)
- 5) 枝川義邦, “NMDA 受容体と記憶 (神経細胞保護作用を中心に)”, 脳 2 1, 15, 454-460 (2012)
- 6) R Kajiyama, T Watanabe, Y Edagawa, T Sekiguchi, S Shoji, Local cell damage-induced apoptosis analysis on microfluidic system, J Pharmacol Sci, 121:220 (2013)
- 7) 枝川義邦, “核内受容体”, 日経ドラッグインフォメーション, 190, 12-13 (2013)
- 8) R Kajiyama, Y Edagawa, M Suzuki, A Nakahara, DH Yoon, T Sekiguchi, S Shoji, Live imaging of cell apoptosis using FRET-based bioprobes in MEMS fabricated microculture dish, Transducers, 2013:2560 (2013)
- 9) 枝川義邦, “メラトニン作動薬”, 日経ドラッグインフォメーション, 193, 12-13 (2013)

〔学会発表〕(計 13 件)

- 1) Y Edagawa, T Watanabe, M Fujii, K Kawai, S Shoji, Microfluidic analysis of neurodegenerative impact evoked by local stimulation-triggered apoptotic information, 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (米国・シアトル / 2011.10)
- 2) Y Edagawa, From a part to the whole: Microsystem analysis of mechanism to control the fate of the cell, Seminar at SEMEL Institute (米国・ロサンジェルス / 2011.10)
- 3) 枝川義邦, 記憶形成における NMDA 受容体の役割, 山武郡市医師会学術講演会 (千葉 / 2012.8)
- 4) 枝川義邦, 認知症における記憶障害と NMDA 受容体調節の効果, 第 2 回成田認知症カンファレンス (千葉 / 2012.8)
- 5) 枝川義邦, 記憶形成の分子メカニズムと認知症治療における NMDA 受容体からのアプローチ, 東葛 AD カンファレンス (千葉 / 2013. 2)
- 6) 枝川義邦, アルツハイマー型認知症に

- おける記憶障害と NMDA 型グルタミン酸受容体の調節効果について, 千葉市認知症地域連携 AD カンファレンス (千葉 / 2013.2)
- 7) 梶山理沙, 渡辺卓, 枝川義邦, 関口哲志, 庄子習一, マイクロ流体システムを用いた局所的損傷刺激によるアポトーシス解析, 第 86 回日本薬理学会, (福岡 / 2013.3)
- 8) 枝川義邦, 梶山理沙, 鈴木美穂, 関口哲志, 庄子習一, 細胞の形態と生育領域を制御する培養系の開発と細胞内イベントの可視化, 日本薬学会第 133 年会, (横浜 / 2013.3)
- 9) 枝川義邦, アルツハイマー病の分子病態と NMDA 受容体機能の調節効果, CHIBA Memory Alzheimer's Disease Conference (千葉 / 2013.5)
- 10) R Kajiyama, Y Edagawa, M Suzuki, A Nakahara, DH Yoon, T Sekiguchi, S Shoji, “Live imaging of cell apoptosis using FRET-based bioprobes in MEMS fabricated microculture dish”, The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (スペイン・バルセロナ / 2013.6)
- 11) 枝川義邦, アルツハイマー病の分子病態と治療: NMDA 型グルタミン酸受容体の障害性と阻害薬の効果, 香川県医学会 (香川 / 2013.10)
- 12) 枝川義邦, アルツハイマー型認知症における NMDA 受容体をターゲットとした分子アプローチ, 認知症カンファレンス (神戸 / 2014.12)
- 13) 枝川義邦, 記憶形成における NMDA 受容体の役割と分子病態, AD Round Table Discussion in Yokohama (横浜 / 2015.3)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

枝川 義邦 (EDAGAWA, Yoshikuni)

研究者番号: 50303607

所属機関： 早稲田大学  
部局： 研究戦略センター  
職名： 教授

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：