

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650249

研究課題名(和文)アルツハイマー性神経回路変調発生・伝搬過程の可視化

研究課題名(英文) Coculture system for visualizing AD neurodegeneration process

研究代表者

神保 泰彦 (Jimbo, Yasuhiko)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20372401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー性神経障害の発生、伝搬過程を可視化する細胞培養マイクロデバイスを開発した。多数のマイクロ電極を集積化した基板にシリコンゴム製の立体構造物を利用して複数の細胞培養区画を配置し、区画間をトンネルで連絡する構造とした。ラット海馬から採取した神経細胞を培養し、アルツハイマー性障害発生原因物質の有力な候補とされているアミロイド投与による神経変性障害発生・伝搬の様子を電気活動、細胞内Ca濃度変化計測により評価し、Caの細胞内過剰流入を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Cell-culture substrates for visualizing generation and propagation of Alzheimer's neuro-degeneration processes were developed. Multiple micro-chambers made of PDMS for cell culture were integrated on a substrate with 64 embedded micro-electrodes. The micro-chambers were connected each other via parallel PDMS micro-tunnels. The height of the tunnel structure was designed as 5 μ m to avoid migration of cell bodies. Hippocampal neurons were taken from Wistar rat embryos and cultured on the substrates. Immunohistochemical staining with beta3-tubulin, which was a specific marker for neuronal cytoskeleton, suggested that neurites were successfully guided into the micro-tunnels and reached the neighbor chamber. Ab was applied to one of the micro-chambers and the activity was evaluated by extracellular recording and intracellular Ca transients. The results suggested that excess elevation of Ca concentration was induced by Ab application, which might be one of the causes of neuro-degeneration.

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：脳・神経 神経変性疾患 細胞・組織 神経科学 ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) 発症メカニズムの有力な候補としてアミロイド仮説があるが、その作用機序、神経回路の変調に至る過程は不明な要素が多い (Palop and Mucke, Nat. Neurosci. 13, pp. 812-818, 2010) 状況であった。アミロイド β (amyloid- β peptide; A β) の作用として興奮性シナプスの機能低下や脱落 (Shankar et al., Nat. Med., 14, 837-842, 2008) が認められる一方、電気活動の異常な亢進 (Busche et al., Science 321, pp. 1686-1689, 2008) も報告され、抑制性シナプスを含む A β の多様な作用が示唆された。Small により提案された synaptic scaling 仮説 (Small, Trends Mol. Med. 14, pp. 103-108, 2008) は、興奮性シナプスの機能低下を補償するメカニズムがコリン作動性神経調節系等を通して働き、短期的には障害の発現を抑えるが長期的には健全な細胞の細胞内 Ca イオン濃度制御系を乱すゆえに障害の伝搬を生じるという考え方であり、シナプス-細胞-神経回路を統合した理解が可能になる。

上記仮説の実験的検証には A β の作用を「神経回路レベルの現象として長期間」追跡する計測手法が必要であり、申請者のグループが有する集積化電極基板、マイクロ培養系集積化技術の適用が有効と考えた。AD 発生・伝播現象の理解により、新たな薬理治療技術等開発への展開も想定した。

2. 研究の目的

AD 性障害を、シナプスや細胞骨格の変化だけでなく神経回路レベルの現象として理解することを目指し、マイクロチャンバ、流路、トンネルを集積化した電極基板 (micro-electrode array; MEA) 上の培養神経系として AD モデルシステムを構築することを目的として設定した。AD において顕著な障害が生じることが知られている海馬と前脳基底部 (AcetylCholine (ACh) 作動性ニューロンを含む神経核) の共培養系を構成し、A β 投与により誘導される変化を観測、神経回路変調発生・伝播過程を可視化し synaptic scaling 仮説の関与を検証することを目指す。

3. 研究の方法

3つの細胞培養マイクロチャンバ、マイクロ流路、マイクロトンネルを集積化した MEA 基板を設計・製作する。マイクロトンネルは神経突起のみが進入可能なサイズとし、3つの培養チャンバから伸長した神経突起がマイクロトンネルを通過して第4のチャンバで相互作用し、障害が空間的に広がっていく過程を可視化することを想定する。細胞培養条件の最適化に向け、神経細胞の細胞内骨格構成要素である β III-tubulin に対する免疫組織染色により、特に神経突起伸長に焦点を当てて形態観察を行なう。A β 投与により培養海馬神経回路に AD 性神経変性障害を誘導し、自発電気活動の変化、細胞内 Ca イオン濃度変化を指標に評価する。

4. 研究成果

(1) AD *in vitro* モデル基板の設計と製作

複数の細胞培養区画を集積化し、区画間をトンネル構造で連結した構造を有する電極付き基板を設計、製作した。図1にその概要を示す。2つの海馬細胞群 (AD モデル及び対照) と前脳基底部細胞群を想定した 1×3 mm の細胞培養区画3ヶ所が中央の六角形を囲む配置とした。各培養区画と中央の六角形の間は幅 50 μ m、長さ 300 μ m、高さ 5 μ m のマイクロトンネル 10 本で連絡する。

製作プロセスの概要は以下のとおりである (図1(A)): (1) シリコンウェハ上に厚膜フォトリソグレイド SU-8(3005, 3050) を用いて培養区画と通路形状の鋳型を製作、(2) シリコンゴム (polydimethylsiloxane; PDMS) を鋳型に流し込んで固化させ、さらに細胞懸濁液注入口を開けた後ウェハから剥離、(3) 剥離した PDMS マイクロ構造物を MEA 上に位置合わせして固定。MEA は3つの細胞培養区画と中央の六角形の領域に 50 μ m 角の電極をそれぞれ 16 個ずつ配置したパターンとした。フォトリソグラフィによりパイレクスガラス基板上に透明導電性材料 (Indium-Tin-Oxide; ITO) で電極パターンを作製し、電極先端とコンタクトパッド部分を除いてフォトリソグレイド (OFPR) で被覆、白金黒コーティングを施した MEA 上に PDMS マイクロ構造物を固定した基板とトンネル構造部分断面の走査電子顕微鏡画像を図1(B)に示す。トンネルの高さは設計仕様に近いサイズになっていることが確認できた。

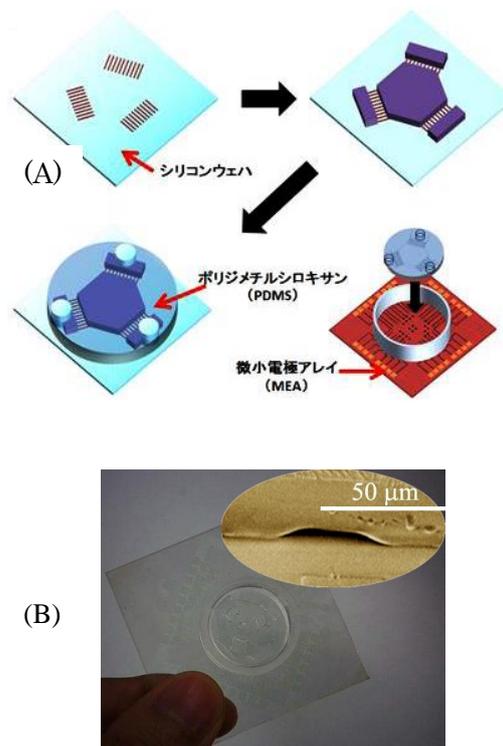


図1 AD *in vitro* モデル基板 (A) 製作プロセス、(B) 基板とトンネル部分の断面 (SEM 像)

(2) MEA 基板上での細胞培養

18 日胚の Wistar rat 胎児から海馬組織を採取し、トリプシン処理により単離、基板上に播種した。培養液は Neurobasal medium に 2 % B27 supplement, 1 % Glutamax, 1 % penicillin/streptomycin を添加し、新規調整したものとアストロサイト馴化処理を行なったものを 3:2 の割合で混合して使用した。

図 2 に培養区画間を連絡するトンネル構造付近の写真を示す。(A)は位相差顕微鏡像、(B)は固定化処理後免疫組織化学染色した試料の蛍光画像である。βIII-tubulin により神経細胞の形態 (緑色)、synapsin I をマーカーとしてシナプス形成の様子 (赤色) を可視化した。トンネル構造内には (細胞体は存在せず) 神経突起のみが進入し、中央六角形の領域に到達していることが確認できた。

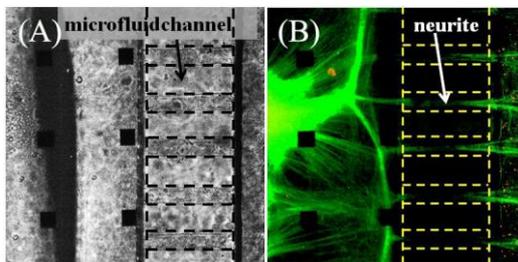


図 2 マイクロトンネル構造による海馬培養神経細胞神経突起の成長方向誘導 (A) 位相差顕微鏡像, (B) 蛍光画像。

(3) Aβ 投与による神経変性障害の誘導

Aβ を投与した試料と対照試料について、培養開始後 18 日の時点で形態を比較した結果を図 3 に示す。薬理操作を行なった試料では繊維状の構造が認められ、長さは 60 μm 程度であった。

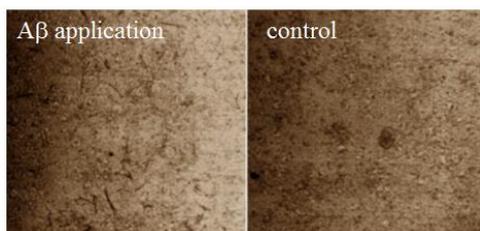


図 3 培養神経回路の形態観察

ついで、蛍光指示薬 Fluo-4 を利用して細胞内 Ca イオン濃度変化を計測した。図 4 に観測された蛍光画像及び視野内の 2 つの細胞における輝度値の時間経過を示す。神経回路の自発活動に伴うと考えられるイオン濃度の過渡的な変化が認められた。得られたカーブのピーク輝度値を指標に、Aβ 投与領域と対照領域の細胞群における細胞内 Ca イオン濃度の相対的な比較を試みた。各領域それぞれ 10 個の細胞のピーク輝度値の平均として、薬理操作を施した細胞群のピーク強度が約 20 % 高いという結果になった。

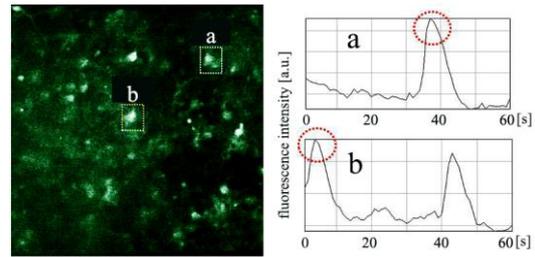


図 4 細胞内 Ca イオン濃度変化

(4) 神経細胞自発電気活動

ラット海馬神経回路が培養環境下で成熟段階に達すると考えられる培養開始後 1 ヶ月を目安として計測を行なった。MEA 基板電極から導出される細胞外電位を増幅、明確なアクティビティを含まない区間の信号レベルの標準偏差の 5 倍を閾値として神経スパイク信号を検出し、ラスタプロットとして表示した例を図 5(A) に示す。

Aβ 投与の影響を調べた結果を図 5(B) に示す。培養開始後 24 日の時点で最初の信号記録を実施、その後一方の培養区画のみに濃度 10 μM の Aβ42 溶液を投与して同様の計測を 28 日目まで 5 日間にわたって行なった。Aβ 投与区画、対照区画両領域間で同期した電気活動が観測されたことから、空間的に隔てられた細胞群がマイクロトンネル構造を通過して伸長した神経突起を介して接触、細胞間に機能的なシナプス結合が形成されていることが示唆された。5 分間にそれぞれの領域全体で記録されたスパイク数をカウントし、初日の薬理操作前後及びその後の 5 日間について比較した。検出されたスパイク数は Aβ 投与直後にわずかに増加したが、その後 5 日間にわたって顕著な変化はなく、対照群との比較においても有意な差は認められなかった。

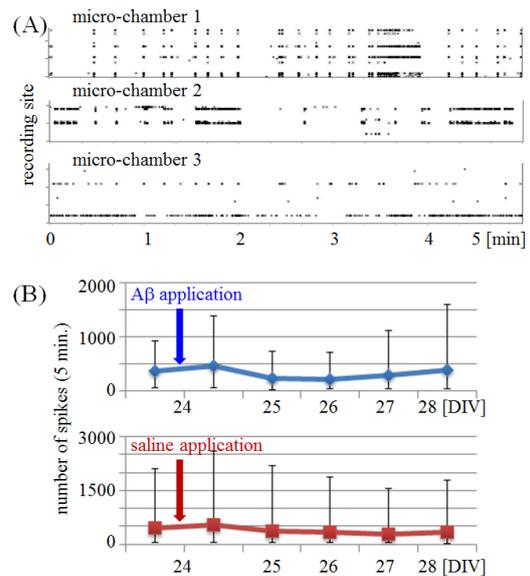


図 5 MEA による電気活動計測

(A) ラスタプロット, (B) Aβ 投与の影響

(5) 今後の展望

MEA は神経細胞集団の電気活動を長期間計測する手法として有効である。本研究ではこの技術を基本とし、MEA 基板上にさらにPDMS 製の3次元マイクロ構造を集積化することにより、アルツハイマー性神経障害を発症する原因物質の有力な候補と考えられている $A\beta$ の投与に伴う神経変性の発生とその空間的な伝搬過程を可視化する細胞培養マイクロデバイスを開発した。

PDMS マイクロ構造により、複数の細胞集団を空間的に分離した状態で、伸長する神経突起を介した機能的な結合形成を導くことができることを実証した。 $A\beta$ 投与という薬理操作を1枚の基板上に集積化した複数の細胞培養区画から標的を選択して実施することも可能になった。このデバイスの利用により、ラット海馬培養神経回路に対する $A\beta$ 投与の結果として繊維化という形態的な変化が生じること、自発活動に伴う細胞内 Ca イオン濃度上昇が過剰になっている可能性を示唆する実験結果を得た。さらに、MEA 法の特徴である長期計測機能を利用して $A\beta$ 投与の結果として生じる変化を自発電気活動を指標に検出することを試みたが、5日間の計測期間中には対照群との有意な差異は検出されなかった。今後はさらに長期間にわたって変化の検出を試みる。

本研究の視点は、細胞内 Ca イオン濃度の調節機構に対するコリン作動性神経細胞群の関与であり、その実験系への組み込みが今後の重要な課題となる。前脳基底部から採取する神経細胞群と海馬神経回路との共培養系構築が次のステップである。 $A\beta$ 投与の結果生じると考えられる海馬神経細胞群とそのシナプス伝達の変化に対する補償作用、コリン作動性神経細胞群の調節作用が系全体に及ぼす長期的な影響を理解し、アルツハイマー性神経変性障害発生・伝搬のメカニズムに関する新たな知見を得ることが新たな治療法確立につながると考えている。

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)

- ① 榎葉健太、有松和之、磯村拓哉、武内彬正、小谷潔、神保泰彦、セロトニンによる培養神経回路網の発火パターン調節、電気学会論文誌、査読有、C133、2013、1814-1819
DOI: 10.1541/ieejieiss.133.1814
- ② 磯村拓哉、武内彬正、榎葉健太、小谷潔、神保泰彦、結合強度推定に基づくニューロン種の分類-ドーパミンニューロンを含む神経回路網の電気活動-、電気学会論文誌、査読有、C133、2013、1806-1813
DOI: 10.1541/ieejieiss.133.1806
- ③ 吉田壘、小谷潔、神保泰彦、マルチスケ

ールな小規模神経回路構築のためのデバイス作製と時空間パターンに関する自発電気活動解析、電気学会論文誌、査読有、C133、2013、971-977

DOI: 10.1541/ieejieiss.133.971

[学会発表] (計7件)

- ① 丸山拓真、吉田壘、小谷潔、鈴木誠一、神保泰彦、アルツハイマー病 *in vitro* モデルを用いたアミロイド $\beta(1-42)$ 伝搬毒性の評価、第51回日本生物物理学会年会、京都国際会館(京都市左京区)、2013年10月28日-30日
- ② Maruyama T., Suzuki S., Yoshida L., Kotani K., Jimbo Y., Development of a novel co-culture device of neuronal cells for construction of *in vitro* Alzheimer's disease model -pathogenicity analysis of Amyloid $\beta(1-42)$ peptide-, BMEiCON 2013, Krabi, Thailand, October 23-25, 2013
- ③ Maruyama T., Yoshida L., Kotani K., Suzuki S., Jimbo Y., Evaluation of Amyloid $\beta(1-42)$ toxicity using Alzheimer's disease *in vitro* model, 28th Symp. Biol. Physiol. Engng., 慶應義塾大学(横浜市港北区), 2013年9月13日-15日
- ④ 小川雄太郎、小谷潔、神保泰彦、アルツハイマー病患者の脳波研究に向けた時間遅れを含む視床-皮質モデルの構築、電気学会電子情報システム部門大会、弘前大学(弘前市文京町)、2012年9月5日-7日
- ⑤ 丸山拓真、武内彬正、榎葉健太、吉田壘、後藤美穂、高山祐三、小谷潔、鈴木誠一、神保泰彦、アルツハイマー病 *in vitro* モデル構築に向けた培養デバイスの作製、電気学会電子情報システム部門大会、弘前大学(弘前市文京町)、2012年9月5日-7日

[その他]

ホームページ等

<http://neuron.t.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

神保 泰彦 (JIMBO, Yasuhiko)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20372401