

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560202

研究課題名(和文)パーキンソン病早期診断に向けた神経変性・神経活動変化の評価

研究課題名(英文)Evaluation of neuronal degeneration and activity towards early Parkinson's disease diagnosis

研究代表者

神保 泰彦 (Jimbo, Yasuhiko)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20372401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)は運動障害が主症状とされるが、その発現時には神経変性が進行していることが知られており、早期診断手法の確立が重要である。本研究では早期症状の1つとされる不安やうつに関係する海馬と、海馬に投射しかつ早期段階で変性が進む縫線核(5-HT作動性ニューロンを含む)を電極アレイ基板上で共培養したPDモデル系を構築した。海馬の典型的な自発電気活動パターンとして知られている同期バーストの発生頻度が共培養系では低下する、HCの情報処理(パターン分離)性能にはニューロン新生が関与するという知見を得た。

研究成果の概要(英文)：It is well-known that the main symptom of Parkinson's disease (PD) is a motor impairment. Actually, however, nerve degeneration started several years before the expression of the motor impairment. Thus the early diagnosis and treatment are important. In this study, we focused hippocampus (HC), which is related to anxiety and depression that is one of the early symptoms in PD, and dorsal raphe nucleus (DRN), which also degenerates at the early PD stage, contains serotonergic neurons, and innervates HC. HC and DRN tissue were taken from newborn Wistar rats and were co-cultured on microelectrode-array substrates. Typical synchronized bursts were observed in HC, whereas DRN showed only asynchronous activity. Frequency of the synchronized activity decreased in the co-culture system as compared with that in the HC single culture. Another finding was the relationship between pattern-separation capability of HC and enhanced neurogenesis, which might underlie early PD symptoms.

研究分野：神経工学, 生体工学

キーワード：脳・神経 神経科学 神経工学 細胞・組織 ナノバイオ

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson's Disease; PD) は、その主要な症状と考えられている運動機能障害が発現した時点では、ドーパミン (dopamine; DA) 作動性ニューロンの 60 % が既に障害を受けており、線条体領域での DA 放出は 70 % 低下していることが報告されており^①、早期段階での診断手法、神経変性に対する治療法を確立することが重要な課題であるとされている。

運動障害よりも早い段階で発現する症状とされる嗅覚低下と気分・認知機能の異常^②に関与する脳部位は、成熟後もニューロン新生が起こる場所 (嗅球、海馬) に対応している。PD モデル動物では実際に海馬ニューロン新生の障害が認められ、その症状がセロトニン (serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT)) 再取り込み阻害剤 (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor; SSRI) 投与により改善されることが報告されている^③。さらに、PD とニューロン新生の関係に注目した総説^④では、PD の進行過程を分類した Braak のモデル^⑤における stage II から III の時点で 5-HT 作動性ニューロンに障害が生じ、海馬ニューロン新生にも異常が見られることが指摘されている。

「5-HT 神経調節システムによる神経支配を受ける海馬」という系を *in vitro* システムとして構成することができれば、神経調節作用が海馬神経活動に及ぼす影響を可視化することが可能になる。海馬の神経活動とそこに含まれる新生ニューロンの関係を評価する手法が確立されれば、PD の進行に伴う神経変性と海馬の機能 (主として情報処理) の関係が明らかになる。上記早期段階 PD モデル系を集積化電極アレイ (Micro-Electrode-array; MEA) 上に形成することにより、神経変性疾患進行過程の経時的なモニタリングの実現も想定できる。海馬神経細胞の培養については多数の報告があるが、5-HT 作動性ニューロンを含む主要な神経核である背側縫線核 (Dorsal Raphe Nucleus; DRN) についてはほとんど報告がないという状況であったことを勘案し、DRN 神経細胞群の採取とその培養手法の確立、DRN と海馬 (Hippocampus; HC) の共培養系構築、海馬神経活動・情報処理機能と新生ニューロンの関係評価の順で研究を進めることが妥当であると判断し、実施計画を立案した。

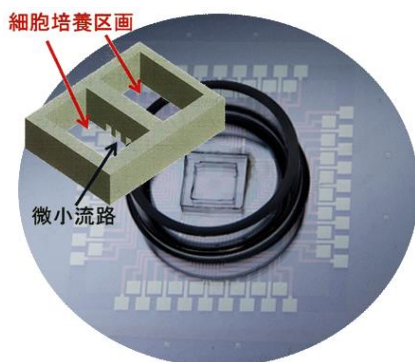


図 1 DRN/HC 共培養基板

2. 研究の目的

PD の早期段階で発現する症状の 1 つとされる不安やうつに関係する HC と、HC に注射しかつ同様に早期変性が進行することが報告されている DRN という 2 つの組織に焦点を当て、MEA 基板上にその共培養系を構築して 5-HT による神経調節作用を可視化することを研究目的として設定した。具体的には (1) DRN ニューロン群を採取して培養系に維持するプロトコルの確立、(2) MEA 基板上での DRN/HC 共培養系の形成、(3) HC の情報処理機能に対する新生ニューロンの寄与の評価手法確立の順で研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) DRN ニューロン群採取・培養プロトコル
動物実験は、東京大学動物実験実施規則に定められた手続きを行なった後、東京大学動物実験実施マニュアルに従って実施した。

2-3 日齢の Wistar Rat から全脳を摘出して厚さ 300 μm の脳切片に分割、DRN を含む部分を選択して実体顕微鏡下でアトラスとの対応により DRN 部位をメスで切り出し、酵素 (Trypsin) による単離処理後 Polyethyleneimine を塗布した基板上に 7 万 cell 播種した。培養液は Minimal Essential Medium に glucose, B-27 supplement, L-glutamine を加え、さらに抗生物質を添加したものを基本として馴化培地を調整・使用した。培養系に含まれる 5-HT 作動性ニューロンを確認するため、試料を固定して Tryptophan Hydroxylase (TPH) をマーカーとする免疫組織化学染色を適用した。

(2) DRN/HC 共培養系の形成

64 個のマイクロ電極を集積化した MEA 基板上に 5 \times 7 mm の 2 つの方形細胞培養区画を設けた培養皿を設計した。2 つの培養区画の間は幅 50、長さ 750、高さ 5 μm のマイクロトンネル 34 本で連結する構造とした。高さの制限により、トンネル内に細胞体は進入せず、DRN、HC 各細胞集団を独立に維持した状態で神経突起を介したシナプス結合形成が起こり、DRN から HC に対する神経支配が確立されることを想定したものである (図 1)。

2 つの細胞培養区画にそれぞれ DRN、HC 細胞群を播種して培養した。培養開始から 3, 4, 5 週の時点で自発電気活動を計測、DRN、HC それぞれの活動パターン、DRN 神経支配の有無による HC 活動パターンの変化を比較した。さらに、MEA 基板電極を利用した電気刺激により DRN の活動を人為的に増加させ、HC 活動パターン変化の誘導を試みた。

(3) HC の情報処理機能とニューロン新生

MEA 上に形成した HC 培養系において空間的に異なる 2 通りの電気刺激パターン (stim A, B) に対する誘発応答を観測し、高頻度刺激により誘導される応答の変化が情報処理機能の 1 つであるパターン分離性能^⑥にどのように影響するかを評価した。刺激印加後 100 ms の間に電極 i で記録される神経スパイク数 S_i を用いて 2 通りの刺激に対する応答の違いを規格化した値

$$\Delta_i = \frac{S_{i.stimA} - S_{i.stimB}}{(S_{i.stimA} + S_{i.stimB})/2} \quad \text{式 3-1}$$

を求め、電極ごとの値の分散 (SD) について高頻度刺激前後の差 $SD(\Delta_{i.post}) - SD(\Delta_{i.pre})$ を求めてパターン分離性能の指標とした。この指標を用いて、塩基性繊維芽細胞増殖因子 (Basic fibroblast growth factor; bFGF) もしくはシタラビン (Cytarabine; Ara-C) 添加によりニューロン新生をそれぞれ増強/抑制した場合の影響を評価した。ニューロン新生の増強・抑制は新たに合成された DNA に取り込まれるブロモデオキシウリジン (Bromodeoxyuridine; BrdU), 幼若ニューロンのマーカーとして用いられるダブルコルチン (Doublecortin; DCX) の発現により確認した。

4. 研究成果

(1) DRN ニューロン群採取・培養

1 ヶ月間培養系で維持した試料を固定して免疫組織化学染色を適用した結果を図 2 に示す。TPH 陽性部位が、細胞核を染める DAPI, ニューロンのマーカーである β III-tubulin 陽性部位と重なっている例であり、5-HT 作動性ニューロンを含む細胞集団を 1 ヶ月間培養系で維持する条件を確立したことが確認できた。

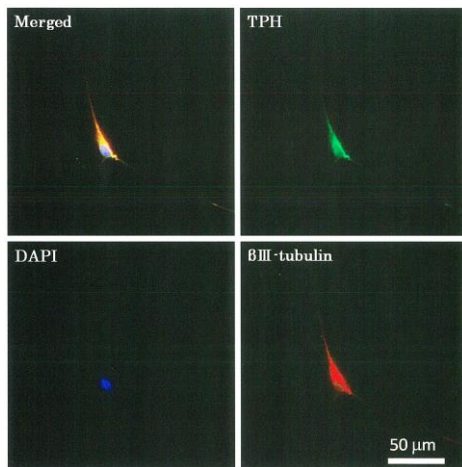


図 2 DRN 培養系における 5-HT 作動性ニューロン

(2) DRN/HC 共培養系の形成

培養開始から 33-35 日目の HC ニューロン群単独培養系 4 試料, 39-42 日目の DRN ニューロン群単独培養系 5 試料について、それぞれ 15 分間の自発活動計測を行なった。平均発火頻度は、HC: 約 7 spikes/s, DRN: 約 3 spikes/s であった。発火頻度の時間推移及び 1, 10, 100 μ M の 5-HT を添加した場合の変化を図 3 に示す。HC は同期発火が繰り返し発生し、5-HT 添加によりやや活動が減弱するようになる。DRN は持続的に非同期性の活動が発生しており、高濃度の 5-HT 投与時のみ抑制が認められる。

共培養系では DRN, HC 区画を結ぶマイクロトンネル内に神経突起が進入、伸長する様子が観察された。培養開始から 3, 4, 5 週 (weeks in

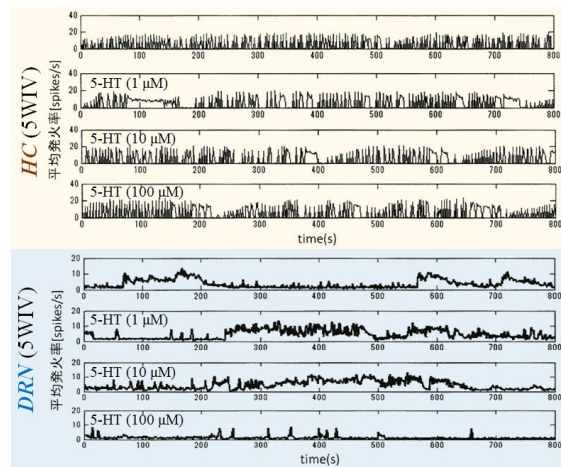


図 3 HC, DRN 単独培養系の自発活動パターン

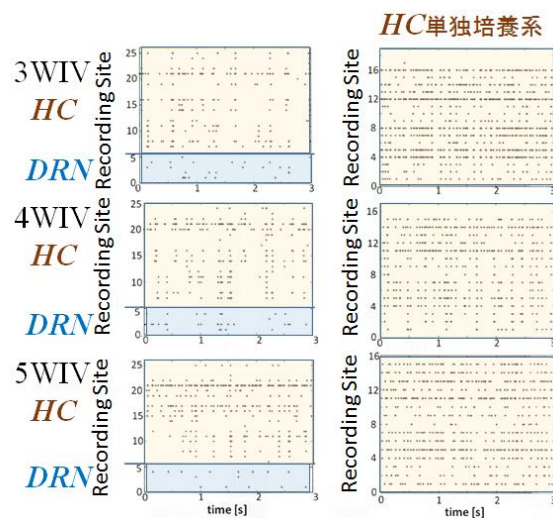


図 4 DRN 神経支配による HC 自発神経活動の変化

vitro; WIV) 経過した共培養試料について自発活動計測を行なった結果を図 4 に示す。比較のため同時に調整した HC 単独培養系の活動も合わせて表示している。DRN については単独培養の場合と明確な違いは認められず非同期のパターンを示したのに対し、共培養系の HC は同期活動の発生頻度が単独培養系に比べて減少しているように見える。ただし統計的に有意な差は検出できなかった。ついで DRN ニューロン群に電気刺激を印加してその活動を人為的に増強することを試みたが、これについても HC 側の活動に有意な変化は観測されなかった。

(3) HC の情報処理機能とニューロン新生

HC 培養神経回路のニューロン新生とパターン分離性能について調べた結果を図 5 に示す。BrdU と β 3-tubulin の陽性部位が重なっているものが新生ニューロンと考えられ、それがこの培養系に含まれていること、さらに bFGF 添加の試料では DCX 発現量が有意に増加しているという結果が得られた。ニューロン新生の増強/抑制に対応したパターン分離能力についても設定した指標で有意な差が生じることが確認された。

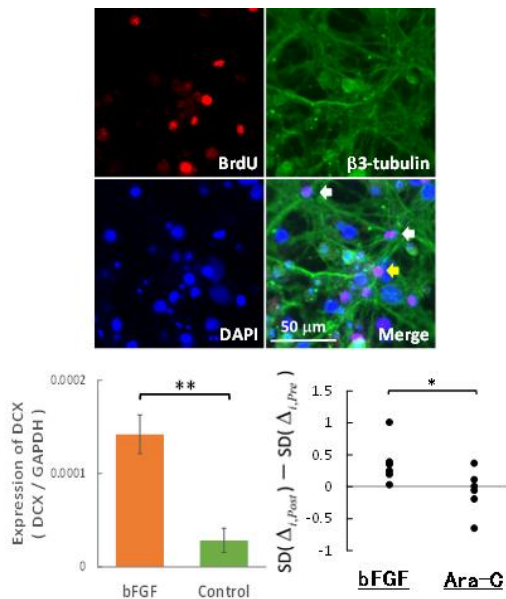


図5 海馬ニューロン新生とパターン分離性能

<引用文献>

- ① Winkler et al. 2011, Parkinson's disease risk score: moving to a premotor diagnosis, *J. Neurol.* 258, pp. S311-315
- ② O'Sullivan et al. 2008, Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study, *Mov. Disord.* 23, pp. 101-106
- ③ Kohl et al. 2012, Fluoxetine rescues impaired hippocampal neurogenesis in a transgenic A53T synuclein mouse model, *Eur. J. Neurosci.* 35, pp. 10-19
- ④ Marxreiter et al. 2013, Adult neurogenesis in Parkinson's disease, *Cell. Mol. Life Sci.* 70, pp. 459-473
- ⑤ Braak et al. 2003, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging.* 24, pp. 197-211
- ⑥ Sahay et al. 2011, Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation, *Nature* 472, pp. 466-470

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Isomura T., Sakai K., Kotani K., Jimbo Y., Linking neuromodulated spike-timing dependent plasticity with the free-energy principle, *Neural Comput.*, 査読有, in press
- ② 田中, 門倉, 磯村, 榛葉, 小谷, 神保, 培養海馬ニューロン新生の制御によるパターン分離能力の向上, *電気学会論文誌*, 査読有, C135, pp. 805-812, 2015
DOI: 10.1541/ieejieiss.135.805
- ③ Shimba K., Sakai K., Takayama Y., Kotani K., Jimbo Y., Recording axonal conduction to evaluate the integration of pluripotent cell-derived neurons into a neuronal network, *Biomed. Microdevices*, 査読有, 17, 94, 2015
DOI: 10.1007/s10544-015-9997-y
- ④ Isomura T., Ogawa Y., Kotani K., Jimbo Y.,

Accurate connection strength estimation based on variational Bayes for detecting synaptic plasticity, *Neural Comput.*, 査読有, 27, pp. 819-844, 2015
DOI: 10.1162/NECO_a_00721

[学会発表] (計8件)

- ① Tanaka Y., Isomura T., Shimba K., Kotani K., Jimbo Y., Distance-dependent activation of dissociated hippocampal network by tetanic stimulation, 37th Ann. Int. IEEE EMBS Conf., Milan, Italy, August 25-29, 2015
- ② Kaneko S., Sakai K., Shimba K., Kotani K., Jimbo Y., *In vitro* model for monitoring stress-related response of hippocampal neuronal network mediated by HPA axis activation, 30th Symp. Biol. Physiol. Engng, 九州工業大学(福岡県飯塚市), September 2-4, 2015
- ③ Isomura T., Kotani K., Jimbo Y., Developing *in silico/in vitro* models of schizophrenia positive symptoms, 30th Symp. Biol. Physiol. Engng, 九州工業大学(福岡県飯塚市), September 2-4, 2015
- ④ 田中, 磯村, 榛葉, 小谷, 神保, テタヌス刺激後における神経活動マーカー-c-fos の空間的評価, 第54回日本生体医工学会大会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2015年5月7-9日
- ⑤ 磯村, 小谷, 神保, 神経調節物質によるスパイク時刻依存可塑性修飾の理論, 第54回日本生体医工学会大会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2015年5月7-9日
- ⑥ Isomura T., Kotani K., Jimbo Y., Cultured cortical neurons can separate source signals from mixture inputs, 9th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays, Reutlingen, Germany, July 1-4, 2014
- ⑦ 金子, 榛葉, 酒井, 小谷, 神保, 視床下部-下垂体-副腎系の *in vitro* 再構築に向けた培養副腎細胞の活動評価, 電気学会電子情報システム部門大会, 島根大学(島根県松江市), 2014年9月3-5日
- ⑧ 渡邊, 吉田, 小谷, 神保, パーキンソン病 *in vitro* モデル構築に向けた縫線核由来分散培養神経細胞の活動計測, 電気学会電子情報システム部門大会, 島根大学(島根県松江市), 2014年9月3-5日

[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

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

(2)研究分担者

(3)連携研究者