

論文の内容の要旨

論文題目 マイクロデバイスを用いた青斑核-海馬共培養系の構築
 —迷走神経刺激作用機序の解明に向けて—

氏 名 吉田 壘

難治性てんかんの治療法である迷走神経刺激療法の作用メカニズムの詳細を解明するため、迷走神経刺激療法において重要な役割を果たす青斑核とてんかん焦点になる傾向がある海馬の局所的な相互作用を評価する実験系の構築とそのダイナミクスの理解によるノルアドレナリンの神経調節作用の評価を本研究の目的とし、その目的を達成するため、以下の検討を行った。

1. 成熟した培養神経回路網に対するノルアドレナリンの添加

青斑核と海馬の *in vitro* 共培養系のダイナミクス評価に対して、海馬に対するネットワークレベルでのノルアドレナリン (NE; Norepinephrine) の効果に関する基礎的な知見を得るため、微小電極アレイ (MEA; microelectrode array) 上に培養された成熟した海馬由来神経回路網に対してノルアドレナリンを添加し、その影響を評価した。その結果、ノルアドレナリンを添加することにより、スパイク数、電極バースト数、ネットワークバースト数など活動に関する指標が有意に減少するといった活動抑制効果が確認された。また、平均発火率、標準化されたフーリエスペクトルの算出により、NE 添加によって、活動のベースラインが下がり、およそ 200 秒周期の活動パターンが強調される、周期的な活動の強調を促す効果が確認された。

2. ノルアドレナリンの効果に関する系統的な評価

系統的にノルアドレナリンの効果を評価するため、培養神経回路網のダイナミクスが変化する発達過程における影響、ノルアドレナリンの濃度変化に対する影響、アドレナリン受容体アゴニスト添加によるダイナミクス変化の評価を行った。その結果、発達段階の影響に関しては、ダイナミクスが変化する培養開始後2週から4週の間を試料に共通して、ノルアドレナリンの添加による活動抑制効果が現れた。また、ネットワークバーストのバースト数以外の特徴量に対する影響については、発達段階に応じて異なる反応が見られ、発達における GABA 作動性神経細胞の発達やネットワーク構造の変化が関与していることが示唆された。濃度依存性については、ノルアドレナリンの濃度を 1 μM , 10 μM , 20 μM と3条件に分けて複数添加したが、条件に依存せず、つまり濃度には依存せず活動抑制効果が確認された。しかし、その活動抑制効果の度合いについては濃度に依存していることが示唆され、その依存性については試料によって異なることも示唆された。そして、関与する受容体に関しては、アドレナリン受容体のアゴニストを添加す

ることで、 $\alpha 1$ 受容体は周期的な活動の強調に寄与すること、 $\alpha 2$ 受容体は活動抑制効果と周期的な活動の強調に大きく関与することが示唆された。

以上の結果より、ノルアドレナリンの、発達段階、濃度に大きく依存しないロバストな活動抑制効果が見られ、その効果は主に $\alpha 2$ アドレナリン受容体が関与していることが示唆された。

3. 青斑核の単独培養系におけるダイナミクス評価

青斑核と海馬の *in vitro* 共培養系の構築に向けて、培養方法が確立されていなかった MEA を用いた青斑核の培養系を確立し、単独培養系におけるダイナミクスを評価した。その結果、青斑核由来培養神経回路網は、海馬や大脳皮質由来培養神経回路網が示す特徴的な同期活動であるネットワークバーストを示さず、非同期的な活動を行っていた。また、移動エントロピーの解析によって、青斑核の結合強度は、海馬や大脳皮質の結合強度に比べて、極めて小さいこと、青斑核由来培養神経回路網内の結合は疎であることが示唆された。また、スパイク間隔 (ISI; inter-spike interval) ヒストグラムが生体内で計測された青斑核から算出された ISI ヒストグラムと類似していたことから、本実験系における青斑核由来培養神経回路網はノルアドレナリン作動性神経細胞を有していることが示唆された。これらの結果より、MEA における青斑核の単独培養系を確立したと考えられる。

4. 青斑核と海馬の共培養系におけるダイナミクス評価

独自に設計し、作製した MEA と生体適合性の高いシリコーンゴム PDMS (polydimethylsiloxane) 構造物を組み合わせたデバイスを作製し、青斑核と海馬の共培養を行い、そのダイナミクスについて評価した。その結果、共培養系における海馬のスパイク数、ネットワークバースト数は、海馬の単独培養系における両指標に比べて、小さく、活動が抑制されていることが確認され、その抑制効果にはノルアドレナリンが寄与していることが示唆された。また、共培養系における両培養区画の結合を評価するための相対スパイク時刻、移動エントロピーに関する解析結果より、海馬と青斑核は機能的な結合を有していることが確認され、海馬から青斑核へ向かう結合が強いことが示された。以上の結果より、青斑核と海馬の共培養系が確立できたと考えられ、これまで不明であったネットワークレベルでの青斑核と海馬のダイナミクスと相互作用が明らかとなった。

以上より、本研究を通して、培養神経回路網に対するノルアドレナリンの活動修飾作用の理解、MEA を用いた青斑核の単独培養系の確立とそのダイナミクスの理解、独自のデバイスを用いた青斑核と海馬の共培養系の確立とそのダイナミクスの理解が可能となった。