

神経細胞ネットワークハイスループットスクリーニング素子の開発 —患者固有の疾患モデル素子—

研究代表者

宇理須 恒雄

Tsuneo Uris

名古屋大学革新ナノバイオデバイス研究センター 特任教授



はじめに

脳の神経変性疾患は変異タンパク質が解明されつつあるが、いまだに、原因不明で明確な治療法も無いという状況にある。その原因は、(1)変異タンパク質を特定できるのが、患者が死亡してからで、かつその種類も多様であること、また、さらに、(2)発症後の神経変性までの経路が非常に複雑多様であるため、対症療法として一つの経路をノックアウトしても防ぎきれず、治療効果がほとんど見られないことにあると考える。

前者(1)に関しては、最近脚光を浴びているiPS技術にブレイクスルーが期待できる。患者にほとんど負荷のかからない体細胞を採取しiPS化の後、疾患に対応する神経細胞に分化することにより、変異タンパク質の同定や、疾患の状況の把握が出来る可能性がある。孤発性疾患の場合、このようにして作成した細胞が疾患の状況をどの程度表現しているかは今後の詳細な研究を待たなくてはならないが、私自身は(現段階では直感でしかないが)貴重な情報が含まれているはずであると確信している。

一方、後者の問題(2)に関しては、家屋も、通信線も、電力系統も、行政組織もずたずたになってしまう津波のような細胞内の状況を思い浮かべる。即ち、発症してからでは手遅れで、発症以前の段階で、即ち、津波が上陸する前の段階で進行を防ぐ手だてが唯一の効果のある治療方法ではないかと考える。

では、そのような手だてを見いだすための研究手法としてどのような装置あるいは技術を開発したら良いのか。iPS細胞については、in vitro 神経細胞ネットワークは有力な系と考える。また、例えば、難病中の難病と言っても良いALS(筋萎縮側索硬化症)では、マウスモデルの系ではあるが、発症以前、出生直後で、既にNaチャンネル電流、活動電位発生頻度、および自然放出のシナプス電流に異常(hyperexcitation)が見られることが報告されていることから、神経細胞のイオンチャンネル電流を観測できるのは極めて有効な機能と考える。また、シナプス電流の

異常は、グルタミン酸受容体などの構造や機能と関連しており、その結果、Ca²⁺イオン過剰流入となって現れる。これらのことは、Ca²⁺イメージングや、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスのイメージング、シナプス小胞の動きのイメージングなどのイメージング機能の装備も非常に有用と考える。また、神経細胞ネットワーク自体が驚くほど不均一系で、実験結果を絶えず統計的視点で解析する必要から、多点計測、すなわち、創薬応用も視野に入れたハイスループットスクリーニング機能も非常に重要であると考えられる。

CREST研究をスタートしてほぼ3年を経過し、応用を明確にして素子の多チャンネル化を考える段階で、我々の開発中の素子が、たまたまこれらの要望にぴったりであることに気づいたというのが正直なところである。

現在、神経変性疾患の中でも発症後の症状が明瞭なALSに的を絞って、上記の機能を備えた多チャンネル素子の開発を進めているところである。現状と今後の方針について報告する。

めざす素子構造と技術課題

単一チャンネルのイオンチャンネルバイオセンサーについては、基板製作技術開発、安定電極の開発、必ずしも完璧とは言えないが、それなりの細胞トラップ技術と要素技術開発を進め、現在、多点でのイオンチャンネル電流計測、Ca²⁺イメージングを中心とするイメージング計測、レーザーあるいは電気刺激による単一細胞刺激などの機能を有する図1に示す素子構造を念頭に実験を進めている。

レーザー刺激の場合、特性の良い光受容体イオンチャンネルとその神経細胞への導入方法を必要とするが、チーム内の共同研究者である、石塚、深澤、木村らがチャンネル開口時の電流が大きく、特性の平坦なキメラ分子の開発と、発現効率の非常に高いレンチウイルスの探索を終えた段階である(図2)。

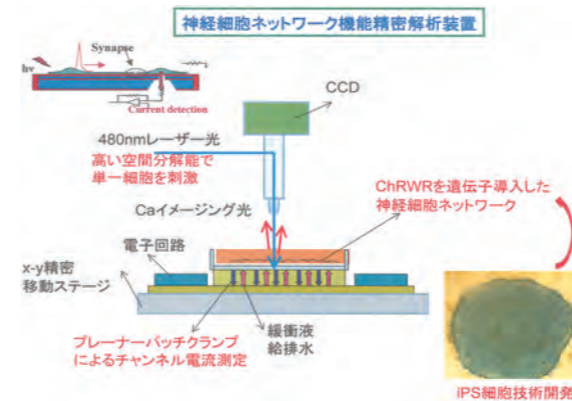


図1 開発中の素子構造

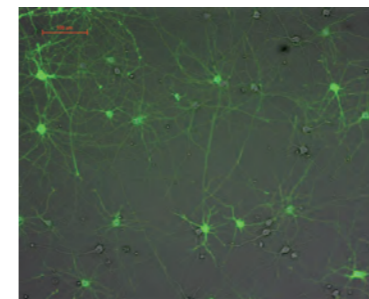


図2 チャンネルロドプシンをレンチウイルスを利用して神経細胞に遺伝子導入

技術課題として力を入れているのは、ネットワークの形成である。例えば、プレーナーパッチクランプを利用した単一細胞刺激と信号伝搬のCa²⁺イメージングによる観察の結果を図3に示すが、まず、細胞播種についてみると、均一なネットワークを形成するのが難しく、播種密度にムラが出来やすく、プレーナーパッチクランプの微細貫通孔の上に細胞を留めて、密度が均一な播種技術を開発する必要がある。細胞の位置を固定して安定なネットワークを形成する技術として、図4に示す柵(セルケージとよぶ)の利用が有効であることを見出し、これを一計測点あたり、25点、20チャンネルで合計500点に形成し細胞培養を行う基板製作を進めている(図4)。

この場合、これらの点に、将来の一方所一細胞も視野にいた播種技術の開発を考え、マイクロ流路による播種装置の設計製作を進めている。

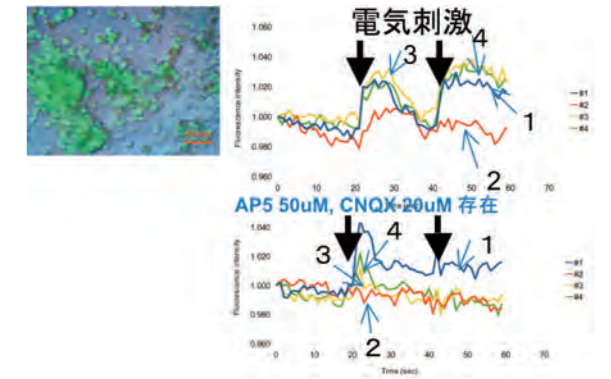


図3 平坦基板上に形成したネットワーク。細胞密度を大きくすると均一に播種するのが困難(左上)。微細貫通孔上にある細胞を電気刺激し、その細胞とその付近の3種類の細胞1~4のCa²⁺を観測(右上)。さらにグルタミン酸受容体のアンタゴニストであるAP5およびCNQXを混入し、観測した信号がシナプス経路で伝搬したものであることを確認(右下)。

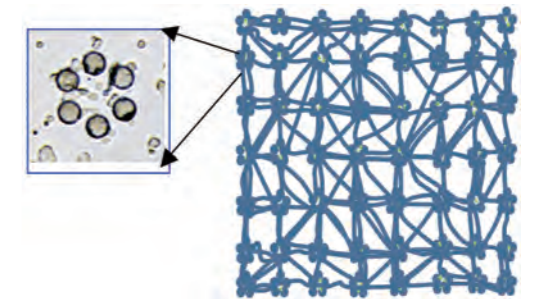


図4 細胞の位置を固定し、かつ安定なネットワークを形成できるセルケージ(左上)。および製作を進めている神経細胞ネットワーク(右)。長期間神経細胞ネットワークを安定に培養することができ、再現性のある特性が得られることを期待。

イオンチャンネル電流計測とiPS細胞技術

ラットの脳皮質や海馬の細胞を培養し、活動電位の自然発生や自然放出シナプス電流の計測を試みた。電流自体は観測できたが、細胞種が多種同時に存在するため、電流特性が播種のたびごとにばらつき、この場合もネットワークに規則性を与え、かつ多チャンネル計測が出来るようにする必要がある。電流計測はALSの原因解明や創薬応用において本研究で最重要視する計測であるが、最終目標としては、ヒトiPS細胞から運動ニューロンへの分化を効率よく行う技術開発の必要がある。iPS細胞技術については、iPS細胞の培養技術を確立し、神経分化に着手したところで、今後の最重要課題の一つである。