

神経細胞の活性化およびシナプス伝達における
マグネシウムイオンの生理的機能の解析

Analysis for the physiological function of the Mg^{2+} in neuronal activation and synaptic transmission

日本女子大学大学院

理学研究科

物質・生物機能科学専攻

古川 由里子

Yuriko Furukawa

2020年（令和2年）度

目次

【要旨】	5
第1章 序論	
1-1 研究の背景	8
1-2 研究の目的	10
1-3 本論文の構成	10
◆第1章の参考文献	12
第2章 ラット大脳皮質および海馬培養神経細胞に及ぼす低 Mg^{2+} の影響	
2-1 はじめに	14
2-2 実験方法	15
2-2-1 細胞培養	15
(1) 大脳皮質および海馬の初代神経細胞培養	15
(2) 海馬スライス培養	18
2-2-2 微小電極アレイ (MEA) を用いた神経活動の計測	20
2-2-3 フローサイトメトリーによる膜電位の測定	23
2-2-4 グルタミン酸放出量のリアルタイム計測	25
2-2-5 共焦点レーザー蛍光顕微鏡による細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の解析	29
2-3 実験結果	31
2-3-1 細胞外マグネシウム濃度 ($[Mg^{2+}]_o$) 減少による膜電位の変化	31
2-3-2 $[Mg^{2+}]_o$ 減少によるグルタミン酸放出量のリアルタイム計測	34
2-3-3 $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光強度の変化	38
2-4 考察	43
2-5 まとめ	45
◆第2章の略語一覧	46
◆第2章の参考文献	48

第3章 ラット大脳皮質培養神経細胞を用いたグルタミン酸添加に対する細胞内マグネシウム ($[Mg^{2+}]_i$) 変化

3-1	はじめに	52
3-2	実験方法	54
3-2-1	神経細胞培養	54
3-2-2	グルタミン酸および KCl 添加による $[Mg^{2+}]_i$ 測定	55
3-2-3	グルタミン酸受容体阻害による $[Mg^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ 測定	56
3-3	実験結果	57
3-4	考察	62
3-5	まとめ	63
◆	第3章の略語一覧	65
◆	第3章の参考文献	67

第4章 微小電極アレイによる神経幹細胞の分化の評価

4-1	はじめに	70
4-2	実験方法	71
4-2-1	ニューロスフィア (Neurosphere) の培養	71
4-2-2	神経幹細胞 (NSCs) の培養	73
4-2-3	大脳皮質神経細胞培養	75
4-2-4	免疫染色	75
4-2-5	細胞移動 (migration) の観察	76
4-2-6	KCl 添加による $[Ca^{2+}]_i$ 測定	77
4-2-7	導電性高分子を修飾した微小電極アレイ (MEA) による電気計測	77
4-3	実験結果	79
4-3-1	NSCs の免疫染色	79
4-3-2	NSCs および大脳皮質神経細胞の細胞移動 (migration) 計測	81
4-3-3	KCl 添加による NSCs および大脳皮質神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 測定	84
4-3-4	導電性高分子を修飾した MEA による NSCs の活動電位計測	84
4-4	考察	88
4-5	まとめ	89

◆第4章の略語一覧	91
◆第4章の参考文献	92
第5章 総括	96
5-1 結論	96
5-2 今後の課題・展望	98
◆第5章の参考文献	100
【謝辞】	102

【要旨】

神経細胞は情報伝達に特化した細胞であり、末端に形成されているシナプスの結合を介して情報伝達をしている。活動電位が電気信号として神経細胞終末であるシナプスに到達すると、 Ca^{2+} の流入によりシナプス小胞に格納されている神経伝達物質が放出され、次の神経細胞に情報が伝達される。シナプス伝達効率は可塑的に変化し、このシナプス可塑性が記憶・学習のメカニズムと言われている。 Ca^{2+} は神経細胞においてアポトーシス、情報伝達物質の放出、興奮性伝達など重要な役割を担っており、膜電位の脱分極が起こると電位依存性 Ca^{2+} チャンネル通して細胞内に大量に流入するため検出しやすく、これまでも数多くの研究が報告されている。一方、 Mg^{2+} は、神経細胞において Na^+ と K^+ の能動輸送 (Na^+/K^+ ATPase) の調節や Ca^{2+} 流入の制御など情報伝達に重要な役割を持っているにも関わらず、その研究報告はあまり多くない。本論文では Mg^{2+} に焦点をあて、 Mg^{2+} が神経活動に及ぼす影響について検討した。

大脳皮質および海馬は、記憶・学習において重要な脳領域であり、大脳皮質は古い記憶、海馬は新しい記憶を貯蔵する場所と言われている。第2章では、大脳皮質および海馬培養神経細胞、海馬切片を試料とし、低濃度 Mg^{2+} が神経活動に及ぼす影響について検討を行った。

64 チャンネル微小電極アレイ (Micro-electrode array ; MEA) を用いた活動電位計測および MEA を酵素修飾することによるアレイ型オンラインセンサを用いたグルタミン酸放出量計測を行ったところ、細胞外 Mg^{2+} の減少によって活動電位数は増加し、グルタミン酸放出量の増加も認められた。さらに、膜電位感受性蛍光色素 DiBAC₄(3)を用いたフローサイトメトリーによる膜電位計測および Ca^{2+} の蛍光プローブである Fluo4-AM を用いた共焦点レーザー蛍光

顕微鏡観察により、細胞内 Ca^{2+} の挙動に対して低濃度 Mg^{2+} が及ぼす影響を検討したところ、大脳皮質および海馬とで Mg^{2+} 感受性に違いがあることが示唆された。

第 3 章では大脳皮質神経細胞を試料とし、細胞内 Mg^{2+} を可視化できる蛍光プローブの KMG-20-AM および Ca^{2+} 蛍光プローブの Fluo4-AM を用い、共焦点レーザ蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーで蛍光変化を測定した。主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸および膜電位の脱分極を誘発する KCl 添加により細胞内 Mg^{2+} 濃度 ($[\text{Mg}^{2+}]_i$) は一過性に増加するが、低濃度 Ca^{2+} および低濃度 Mg^{2+} 溶液中で測定したところ $[\text{Mg}^{2+}]_i$ は減少した。さらに Mg^{2+} の生理機能について検討するため、グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体、非 NMDA 受容体、代謝型受容体) の阻害剤および活性剤、イノシトール三リン酸 (Inositol trisphosphate ; IP3) 受容体の阻害剤、ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (Mitochondrial permeability transition pore ; mPTP) の開口阻害剤を用い、 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ および細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の蛍光測定を行った。その結果、グルタミン酸および KCl 添加による $[\text{Mg}^{2+}]_i$ の一過的な増加には、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 同様、細胞外からの流入と細胞内小器官 (小胞体やミトコンドリア) からの流出の 2 つ経路があることが確認された。ただし、そのメカニズムは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ とは異なり、細胞内小器官からの流出が支配的であることが示唆された。

第 4 章では、神経幹細胞 (Neural stem cells ; NSCs) を試料とし、生体親和性の高い導電性高分子である PEDOT-PSS (poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate)) を修飾した微小電極アレイ (MEA) を用い、NSCs の分化・成長過程における電気活動を計測した。また、共焦点レーザ蛍光顕微鏡および生細胞タイムラプス顕微鏡を用い、NSCs の分化・成長に伴う神経回路の蛍光観察を試みた。その結果、PEDOT-PSS を修飾した MEA での活動電位

計測において細胞間での相関関係が確認され、神経回路が形成されたことが示唆された。また、蛍光観察（免疫染色および $[Ca^{2+}]_i$ 変化の計測）においても NSCs から神経細胞に分化し、神経回路が形成されたことが認められ、PEDOT-PSS を修飾した MEA が神経活動の評価において有用であることが確認された。この方法は非侵襲・非破壊的であり生体親和性も高いため、製薬分析などの初期および予備段階での有用なツールとなることが期待される。

大脳皮質および海馬培養神経細胞において、 Mg^{2+} 濃度に依存する電気活動や $[Ca^{2+}]_i$ 変化、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ 変化の計測により、 Mg^{2+} が神経活動に影響を及ぼすことが確認され、その代謝メカニズムについても検討を進めることができた。最近では、セカンドメッセンジャーとしての Mg^{2+} の機能や、 Mg^{2+} が学習や記憶を増強するなどの報告、さらに多発性硬化症などの脱髄疾患や心疾患・精神疾患にも Mg^{2+} が関与しているという報告もあり、 Mg^{2+} の重要性が次第に明らかになりつつある。本研究は、 Mg^{2+} の生理的機能解析を進める上でこれまでにない新たなアプローチであり、その有用性から、今後さらに研究を進めることで創薬や疾病治療への貢献が期待できると考える。

第 1 章 序論

1-1 研究の背景

マグネシウムイオン (Mg^{2+}) はカルシウムイオン (Ca^{2+}) との拮抗作用で骨や筋肉などで生体内のホメオスタシスに関わり、ATP 産生にも関わる生命維持に必須なミネラルである。 Mg^{2+} は約 300 以上の酵素反応に関与しており、タンパク質の合成、心機能の維持、筋収縮、血圧調整などの働きを持っている。最近では、糖尿病^{1),2)} や生活習慣病^{3),4)}、長寿⁵⁾⁻⁷⁾ にも関与しているとの報告もあり、医学や栄養学の分野では研究報告が多いものの、神経活動に関する報告はあまり多くないのが現状である。 Ca^{2+} は神経細胞においてメッセンジャーとしての重要な役割を担っており、アポトーシス、情報伝達物質の放出、興奮性伝達などに関わり、シナプス可塑性にも Ca^{2+} が必要である。一方 Mg^{2+} は神経細胞において、ナトリウムイオン (Na^+) とカリウムイオン (K^+) の能動輸送 (Na^+-K^+ ATPase) の調節や、興奮性神経伝達物質のグルタミン酸受容体の 1 つである NMDA 受容体のブロック作用が良く知られており^{8),9)}、 Ca^{2+} 流入の制御という重要な役割をしているにもかかわらず、神経活動に関する研究報告は少なく、メッセンジャーとしての役割に関してはほとんど解明されていない。

Mg^{2+} が Ca^{2+} 同様生体内に不可欠な物質でありながら、そのダイナミクスに関する研究がほとんど進展していない理由の 1 つとして、 Mg^{2+} を選択的に捕らえることのできる蛍光プローブが無かったことがあげられる。これまでも Mg^{2+} の蛍光プローブは存在したが、 Ca^{2+} と Mg^{2+} は化学的性質が良く似ており、多くの Mg^{2+} 蛍光プローブは Ca^{2+} との錯体形成定数が高く Ca^{2+} も一緒に捕捉してしまうため、正確に生体内の Mg^{2+} 濃度を測定できなかった。最近にな

って Mg^{2+} の挙動を解明する可視化蛍光プローブの開発が進み、細胞内における Mg^{2+} の動態を蛍光観察で捕らえることが出来るようになってきた。本研究でも Mg^{2+} 選択性の高い可視化蛍光プローブを用い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で Mg^{2+} の挙動を測定している。共焦点レーザー蛍光顕微鏡は通常の蛍光顕微鏡と違い、結像する位置にピンホールを置き、レーザーの経路を制限することで散乱光を排除し、コントラストの高いクリアな画像を得ることができる。これにより、これまで Mg^{2+} 選択性の低い蛍光色素で、通常の蛍光顕微鏡による不明瞭な画像での解析しかできなかった測定が、 Mg^{2+} 選択性の高い蛍光色素と共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いることで、生きた神経細胞の Mg^{2+} 動態を高速かつクリアで微細な変化として捕らえることができるようになった。

本研究では細胞活性の計測にフローサイトメトリーも使用している。フローサイトメトリーは、細胞などの粒子 1 個ずつから形態の情報や抗体染色などの蛍光色素による蛍光量を得ることで、その相関を解析する装置である。フローサイトメトリーは、免疫系における細胞表面マーカー解析、細胞周期解析や DNA 解析、アポトーシスなど生命工学や臨床検査などの分野でよく利用されているが、細胞の活性評価に利用された報告はあまり多くない。フローサイトメトリーを用い、細胞群全体の蛍光強度変化を相関ヒストグラムで解析することは、顕微鏡による個々の培養細胞の蛍光変化だけでなく、細胞を集団として捕らえた場合の蛍光変化を解析できる利点がある。

以上述べてきたように、本論文では、独自に開発した微小電極アレイやアレイ型グルタミン酸センサによる計測とともに、 Mg^{2+} 選択性の高い蛍光プローブ、共焦点レーザー蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーを使用し、 Mg^{2+} の挙動を測定することで、未だ明らかにされてい

ない Mg^{2+} の動態や生理機能の解明に取り組んだ。

1-2 研究の目的

細胞内の Mg^{2+} 濃度は mM オーダーであり細胞内外の濃度差は数倍程度だが、 Ca^{2+} は細胞内に数十 nM ($10^{-7}M$)、細胞外では数 mM ($10^{-3}M$)、細胞内小器官には約 1mM と内外の濃度差が大きい。 Ca^{2+} と比べ極めて細胞内濃度の高い Mg^{2+} だが、前述したように、シナプスでの NMDA 受容体ブロック作用など、学習・記憶に関与している Ca^{2+} を制御し、神経疾患や精神疾患に関与しているという報告もあることなどから、 Mg^{2+} が神経活動に何らかの影響を及ぼしている可能性があると考えられる。本研究では、これまで開発してきた活動電位を計測できる微小電極アレイやグルタミン酸放出量を計測できるアレイ型オンラインセンサを用いて、 Mg^{2+} の神経活動に対する影響を明らかにするとともに、 Mg^{2+} 蛍光プローブを用い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で挙動を解析することで、神経細胞における Mg^{2+} の機能を検討し、明らかにすることを目的とする。これまで細胞レベルでの神経活動に対する Mg^{2+} の機能を検討した例はあまりなく、疾患や病態を理解する一助になると思われる。

1-3 本論文の構成

本論文は本章を含め、全 5 章で構成されている。各章の概要は以下の通りである。

第 2 章では、ラット大脳皮質および海馬初代培養神経細胞、海馬の切片を試料とし、細胞外マグネシウム濃度 ($[Mg^{2+}]_o$) が神経活動に及ぼす影響を、微小電極アレイ (MEA) を使った活動電位計測、アレイ型オンラインセンサを使ったグルタミン酸放出量のリアルタイム

計測、さらに共焦点レーザー蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーを用いた細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の蛍光計測による結果を述べる。第3章では、興奮性神経伝達物質のグルタミン酸や脱分極を誘発する塩化カリウム (KCl) により神経細胞を活性化し、細胞内マグネシウム ($[Mg^{2+}]_i$) の挙動を、共焦点レーザー蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーで検討した結果を述べる。また、グルタミン酸受容体の阻害剤を用い、グルタミン酸添加における $[Mg^{2+}]_i$ の透過経路を検討する。第4章では、神経幹細胞 (Neural stem cells; NSCs) を試料とし、生体親和性の高い導電性高分子を使用した電極を用いて、神経幹細胞の分化をきたまま電氣的に評価する。また、共焦点レーザー蛍光顕微鏡による $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光計測やタイムラプス顕微鏡による細胞移動 (migration) の計測により、NSCs から分化した神経細胞と大脳皮質神経細胞の比較検討も試みる。第5章では結論と今後の課題を述べ、総括とする。

◆ 第 1 章の参考文献

- 1) Kim DJ, Xun P, Liu K, Loria C, Yokota K, Jacobs DR, He K; Magnesium intake in relation to systemic inflammation, insulin, resistance, and the incidence of diabetes. *Diabetes Care*, 33(12), 2604-2610, 2010
- 2) Nanri A, Mizoue T, Noda M, Takahashi Y, Kirii K, Inoue M, Tsugane S; Magnesium intake and type II diabetes in Japanese men and women' the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Eur J Clin Nutr*, 64(10). 1244-1247, 2010
- 3) 横田 邦信 ; 生活習慣病発症要因としてのマグネシウムの重要性. 日本未病システム学会、25、22-30、2019
- 4) Dibaba DT, Xun P, Fly AD, Yokota K, He K; Dietary magnesium intake and risk of metabolic syndrome: a meta-analysis. *Diabet Med*, 31(11), 1301-1309, 2014
- 5) Barbagallo M, Domingez L; Magnesium Role in Health and Longevity. *Trace Elements and Minerals in Health and Longevity*, 235-264, 2018
- 6) Killilea DW, Maier JAM; A connection between magnesium deficiency and aging: new insights from cellular studies. *Magnes Res*, 21(2), 77-82, 2008
- 7) Bellosta RV; Dietary magnesium supplementation improves lifespan in a mouse model of progeria. *EMBO Mol Med*, 12(10), 1-13, 2020
- 8) Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB; Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA response in spinal cord neurons. *Nature*, 309, 261-263, 1984
- 9) Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochaintz A; Magnesium gates glutamate-

activated channels in mouse central neurons. *Nature*, 307, 462-465, 1984

- 10) Y. Suzuki, H. Komatsu, T. Ikeda, N. Saito, S. Araki, D. Citterio, H. Hisamoto, Y. Kitamura, T. Kubota, J. Nakagawa, K. Oka and K. Suzuki; Design and synthesis of Mg^{2+} -selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg^{2+} measurement in a living cell, *Anal Chem*, 74, 1423-1428, 2002

第2章 ラット大脳皮質および海馬培養神経細胞に及ぼす低 Mg^{2+} の影響

2-1 はじめに

本章では細胞外マグネシウム濃度 ($[Mg^{2+}]_o$) に焦点をあて、 $[Mg^{2+}]_o$ の減少が神経活動に及ぼす影響を検討するため、ラット大脳皮質培養神経細胞および海馬スライスを用い、64 チャンネルの微小電極アレイ (Micro electrode array ; MEA) を用いた活動電位の計測^{1),2)}や MEA を酵素修飾することによるアレイ型オンラインセンサを用いたグルタミン酸放出量のリアルタイム計測³⁾⁻⁶⁾、フローサイトメトリーによる膜電位蛍光測定を行った^{7),8)}。さらに共焦点レーザー蛍光顕微鏡と Ca^{2+} の蛍光プローブである Fluo4-AM (Invitrogen) を用い、ラット大脳皮質および海馬培養神経細胞を試料とした、 $[Mg^{2+}]_o$ と培養期間に対する細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化を解析した^{7),8)}。神経細胞における Ca^{2+} 濃度は細胞内で数十 nM (10^{-7} M)、細胞外で数 mM (10^{-3} M) であるが、刺激が加わると細胞外からの Ca^{2+} 流入および細胞内小器官に蓄積されていた Ca^{2+} の流出があり、 $[Ca^{2+}]_i$ は 1,000-10,000 倍にも増加する。刺激に伴う $[Ca^{2+}]_i$ の変化は大きく 2 つに大別され、急激に上昇した後、緩やかに戻るスパイク状の変化 (Ca^{2+} スパイク) と周期的に繰り返し引き起こす現象の Ca^{2+} オシレーションがある^{9),10)}。本研究では $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ の応答変化の度合いを示す指標として、この Ca^{2+} オシレーションについても解析した。

生体内での Mg^{2+} 濃度は、部位によって異なるがおおよそ mM オーダーであり、脳脊髄液では 2.2 mM という報告もあることから¹¹⁾、測定には Mg^{2+} 濃度 2.0 mM の測定溶液 (表 1-C) を用いた。 $[Mg^{2+}]_o$ を低濃度にする場合は、 Mg^{2+} 濃度 2.0 mM の測定溶液を Mg^{2+} 濃度 0 mM の

測定溶液への灌流、または Mg^{2+} 濃度 2.0 mM 以下の測定溶液と置換することにより、段階的に低濃度とした。生体における低マグネシウム血症は血中 Mg^{2+} 濃度が 0.7 mM 未満になることとされており、細胞外 Mg^{2+} 濃度 2.0 mM から 0 mM への変化は生理的範囲内と考えられる。

2-2 実験方法

2-2-1 細胞培養

(1) 大脳皮質および海馬の初代神経細胞培養

本研究では胎生 18 日目の Wistar ラットを用い、大脳皮質および海馬神経細胞の初代培養を無血清培地で行った。初代培養は継代培養と異なり、生体組織から取得した細胞を直接培養するため、より生体に近い情報が得られるという利点がある。無血清培養は組成の明らかな成分からできている培地を使用するため、血清添加培養での血清ロットによる生物活性の変動や、各種微生物およびウイルス汚染の心配もない^{12),13)}。

2-3%のイソフルラン (Isoflurane、Abbott Japan) で妊娠 18 日目のラットに深麻酔を施した後、胎児を取り出し、胎児から大脳皮質および海馬を取り出した。2.5 mg/ml トリプシン (Trypsin、Invitrogen) を用いて 37°C で 10 分酵素処理をした後、遠心分離 (1000 rpm、5 分) およびピペッティングにより細胞を分散し、細胞懸濁液を作製した。細胞培養液として 0.074 mg/ml L-グルタミン (L-glutamine、Sigma-Aldrich)、25 μ M グルタミン酸 (Glutamate、Sigma-Aldrich)、50 μ g/ml ゲンタマイシン (Gentamycin、Invitrogen)、2% B-27 supplement (Invitrogen) を含む Neurobasal Medium (Invitrogen) を用い (表 1-A)、細胞懸濁液を 50 μ m フィルターで濾過後、濃度を $1-5 \times 10^6$ 個/ml に調整した。あらかじめ 20 μ g/ml ラミニン (Laminin、

A 大脳皮質および海馬神経細胞培養液の組成

濃度	薬品名
	Neurobasal medium
0.074 mg/ml	L-グルタミン
25 μ M	グルタミン酸
2 %	B-27 supplement
50 μ g/ml	ゲンタマイシン

B 海馬スライス培養液の組成

濃度	薬品名
	DMEM
5 %	非働化仔ウシ血清
5 %	非働化ウマ血清
2.5 μ g/ml	インシュリン
100 U/mL Penicillin 100 μ g/mL Streptomycin	ペニシリン-ストレプトマイシン
20 ng/ml	NGF
20 ng/ml	BDNF

Ca²⁺濃度: 0 mM

濃度	薬品名
148 mM	NaCl
2.8 mM	KCl
0 mM	CaCl ₂
2 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES
10 mM	Glucose

C 測定溶液の組成 (pH=7.2)

Mg²⁺濃度: 2.0 mM

濃度	薬品名
148 mM	NaCl
2.8 mM	KCl
2 mM	CaCl ₂
2 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES
10 mM	Glucose

Mg²⁺濃度: 1.0 mM

濃度	薬品名
148 mM	NaCl
2.8 mM	KCl
2 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES
10 mM	Glucose

Mg²⁺濃度: 0.5 mM

濃度	薬品名
148 mM	NaCl
2.8 mM	KCl
2 mM	CaCl ₂
0.5 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES
10 mM	Glucose

Mg²⁺濃度: 0 mM

濃度	薬品名
148 mM	NaCl
2.8 mM	KCl
2 mM	CaCl ₂
0 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES
10 mM	Glucose

表 1 各溶液の組成 (1)

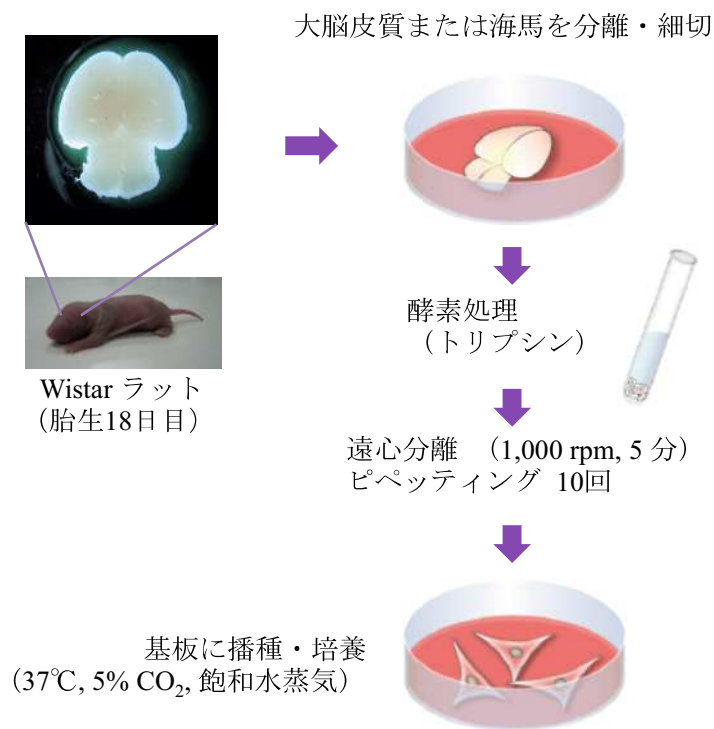


図1 大脳皮質および海馬初代神経細胞培養

胎生18日目のWistarラットの脳から、大脳皮質および海馬を取り出し、トリプシンでの酵素処理や遠心分離により細胞を分散する。細胞懸濁液 (1-5x10⁶個/mL) は、ラミニンおよびポリリジンでコーティングしたガラスボトムディッシュや電極上に播種し、インキュベータ内 (37°C、5%CO₂、飽和水蒸気) で無血清培養をする。

Sigma-Aldrich) および 100 µg/ml ポリリジン (Poly-D-Lysine、M.W. 70,000-150,000, Sigma-Aldrich) でコーティングした電極および培養皿 (35mm ガラスボトムディッシュ、Matsunami) 上に播種し、37°C、5% CO₂、飽和水蒸気下で 1-4 週間培養を行った (図 1)。本研究では、ガラスボトムディッシュへの接着性を高めるコーティング剤として、人工合成ポリマーであるポリリジンと生体由来のタンパク質であるラミニンを併用している。ポリリジンは細胞膜上の陰イオンと培養容器表面上の接着因子が持つ表面陽イオンとの間の相互作用を促進する働きを持ち、細胞外マトリクスであるラミニンは基底膜の主成分であり、細胞の接着や軸索成長を促進する。

(2) 海馬スライス培養

本研究では、アレイ型オンラインセンサを用いたグルタミン酸放出量の計測を行う試料として、海馬のスライス培養も行った。スライス培養は組織培養の 1 つであり、分散培養と異なり組織構造を維持しているため、電気生理の実験で良く用いられている。

生後 8-11 日の Wistar ラットの脳から海馬を取り出し、ビブラトーム (Leica) を用いて 400 µm 厚の切片を作製した。ビブラトームは刃を細かく振動させて試料を切る装置である。切り出した切片を、あらかじめラミニンとポリリジンをコーティングした多孔質のポリカーボネート膜 (膜厚 7 µm、孔径 0.8 µm) 上にのせ、34°C、5% CO₂、飽和水蒸気下で 5-7 日間培養した (図 2)。培養液として 5% 非働化仔ウシ血清 (heat-inactivated fetal bovine serum、HyClone)、5% 非働化ウマ血清 (heat-inactivated horse serum、Invitrogen)、2.5 µg/mL インシュリン (Insulin、Sigma-Aldrich)、100 units/mL ペニシリン-100 µg/mL ストレプトマイシン (Pe

生後8-11日目のWistarラットから
 海馬を取り出す
 ↓
 ビブラトームで海馬を薄切（400 μm厚）
 ↓
 多孔質ポリカーボネート膜の上で
 5-7日間培養
 （34℃、5% CO₂、飽和水蒸気）
 ↓
 多孔質膜ごと電極アレイに密着させ、
 95% O₂ / 5% CO₂混合ガスで1時間安定させる
 ↓
 測定

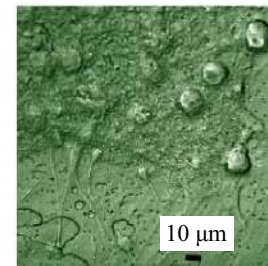
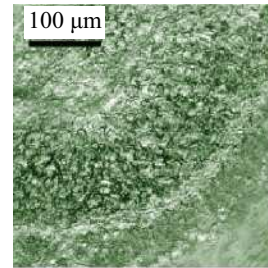


図2 海馬のスライス培養

生後8-11日目のWistarラットの脳から海馬を取り出し、ビブラトームを用い、400μm厚の切片を作製する。切片をポリリジンおよびラミニンをコーティングした多孔質のポリカーボネート膜にのせ、インキュベーター内（34℃、5%CO₂、飽和水蒸気）で培養する。測定時は、多孔質膜ごと電極アレイに密着させ、あらかじめ30分間、95% O₂ / 5% CO₂混合ガスを通気して飽和させておき、0.4 ml/minで灌流しながら1時間安定させた後、測定に使用する。

（Gordon Research Conferences 2002 ポスターより改変）

nicillin- streptomycin、Sigma-Aldrich)、20 ng/ml NGF (Nerve growth factor、Alomone Labs)、20 ng/ml BDNF (Brain-derived neurotrophic factor、Alomone Labs) を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium、Invitrogen) を用いた (表 1-B)。測定には、HEPES を含む測定溶液 (表 1-C) を用いた。グルタミン酸放出量計測では、多孔質膜上に培養した海馬スライスを微小電極アレイ (MEA) 上に密着させ、あらかじめ 30 分間、95% O₂ / 5% CO₂ 混合ガスを通気して飽和させておき、0.4 ml/min で灌流しながら 1 時間安定させ、測定に使用した。

2-2-2 微小電極アレイ (MEA) を用いた神経活動の計測

活動電位計測には 64 チャンネルの MEA を用いた。MEA はマスクパターンを基板上に転写するフォトリソグラフィ技術により作製した^{1),2)}。ガラス基板上に 150 nm 厚の Indium tin oxide (ITO、酸化インジウムスズ) を蒸着し、ウェットエッチングにより電極パターンを形成した後、微小電極部を除く基板表面に 0.5 μm 厚のフォトレジストで絶縁膜を形成した (図 3)。64 個の電極は、1 辺が 30 μm の正方形であり、100-150 μm 間隔で 8 x 8 の配列で構成されている。

培養神経細胞は神経回路形成段階に応じた自発活動を示し¹⁴⁾、電気刺激に対しては刺激に応じた誘発応答が観測される¹⁵⁾。MEA 上で神経細胞を培養することにより、神経活動の刺激応答性変化の計測が可能であり、学習・記憶などのシナプス可塑性の研究にも使用されている。本研究ではラット大脳皮質培養神経細胞を用い、[Mg²⁺]_o 減少による活動電位の変化を測定した。[Mg²⁺]_o は、Mg²⁺ 濃度 2.0 mM から 0 mM に測定溶液を灌流することにより低濃度にした (表 1-C)。微小電極により計測された活動電位は、3 kHz の周波数でサンプリングし、100-10 kHz の周波数帯域でアンプ (NF Corp.) を用いて増幅した (図 4)。

64チャンネル 微小電極アレイ

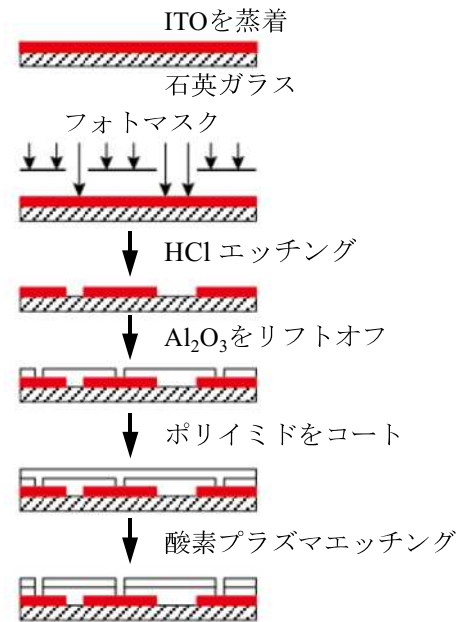
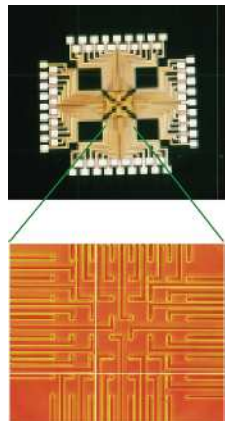


図3 微小電極アレイ (MEA) の作製法

ガラス基板の上に150nm厚のIndium tin oxide (ITO) を蒸着し、ウェットエッチングにより電極パターンを形成した後、微小電極部を除く基板表面に0.5 μ m厚のフォトリソ絶縁膜を形成した。64個の電極は1辺が30 μ mの正方形であり、100-150 μ m間隔で、8x8の配列で構成されている。(Neuroscience 2009 ポスターより改変)

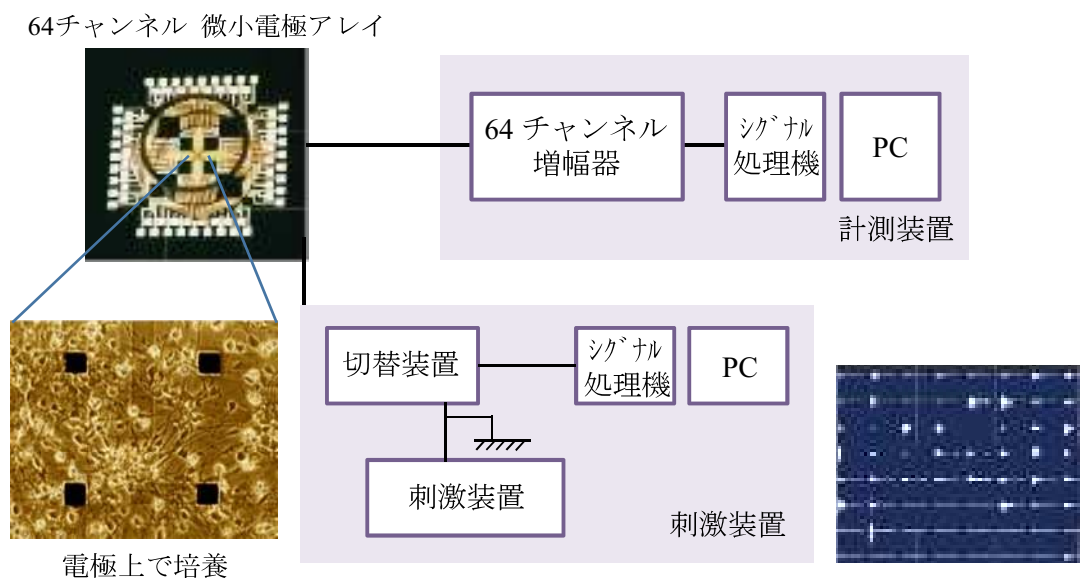


図4 活動電位計測装置

64チャンネル微小電極アレイ（MEA）による活動電位計測の測定系の概略を示す。切替装置により、計測と刺激入力が可能である。微小電極により計測された活動電位は、3kHzの周波数でサンプリングし、100-10kHzの周波数帯域でアンプ（NF Corp.）を用いて増幅した後、記録される。（参考文献 26 より改変）

2-2-3 フローサイトメトリーによる膜電位の測定

[Mg²⁺]_i減少による膜電位の変化を、フローサイトメトリー(Flow cytometry、EPICS XL ADC、Beckman Coulter, Inc.)で測定した。フローサイトメトリーは通常、白血球などの免疫細胞表面に存在する分子(表面抗原)に結合するモノクローナル抗体を用いた測定から始まり、細胞周期解析やDNA解析、アポトーシスなどの解析に使われている。細胞や粒子1個ずつにレーザ光を照射し、散乱光(前方散乱光: Forward Scatter, FS/側方散乱光: Side Scatter, SS)と蛍光(Fluorescence, FL)を計測することにより、細胞の大きさや形態および蛍光の情報を取得し、それらの相関ヒストグラムを作製することで細胞の状態を解析する(図5)。本研究では、細胞の蛍光強度変化の計測に使用した。顕微鏡による測定では個々の細胞の変化が計測できるが、フローサイトメトリーで測定することにより、細胞を集団として捕らえた蛍光変化を計測できる(数千個/秒)。

測定は、分散直後(培養前)と培養12日目の大脳皮質神経細胞懸濁液を、事前に測定溶液に置換してから使用した(表1-C)。分散直後の細胞懸濁液とは、生体から取り出して処理した直後の懸濁液を指し(2-2-1(1)参照)、培養12日目の細胞懸濁液は、培養した細胞をTrypsin-EDTA(0.05% Trypsin、0.53 mM EDTA-4Na、Invitrogen)とピペッティングにより、培養皿から剥離して作製した細胞懸濁液を指す。5 μM Propidium Iodide (PI、Ex=488/536 nm、Em=617 nm、Sigma-Aldrich)で37°C、1時間染色し死細胞を識別した後、膜電位の変化には膜電位感受性蛍光色素2.5 μM DiBAC₄(3)(Ex=495 nm、Em=517 nm、Dojindo)を用い、室温で10分染色した^{16),17)}。DiBAC₄(3)はBis-oxonol型のアニオン性膜電位感受性色素であり、細胞膜の脱分極に伴い細胞質中へ流入し、膜やタンパク質に結合することで蛍光が増加するの

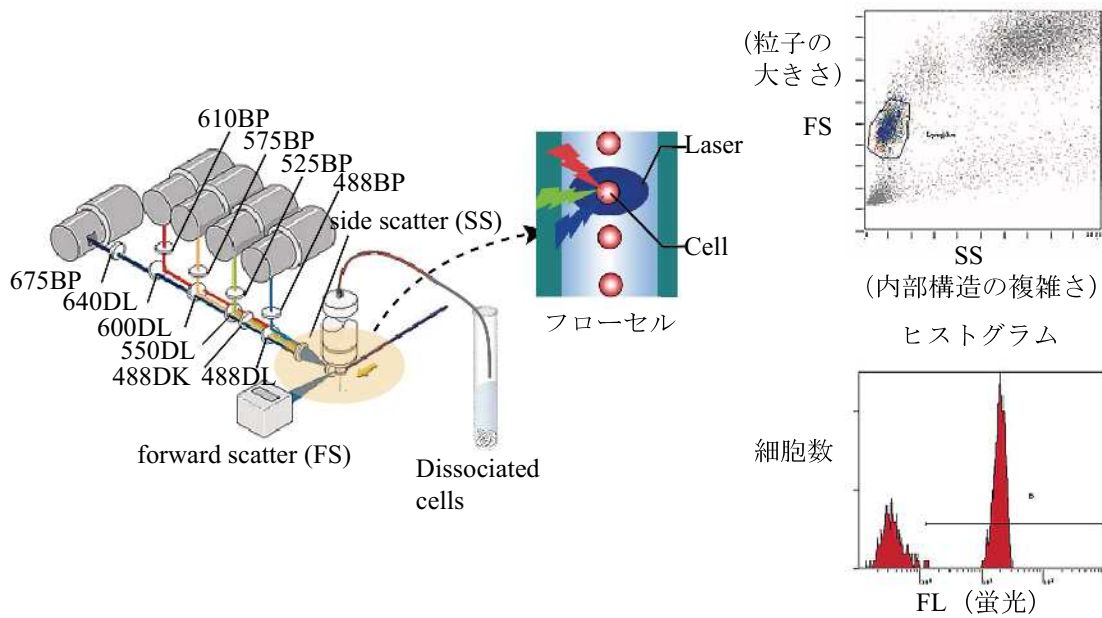


図5 フローサイトメトリーとヒストグラム

フローサイトメトリーの概略図とヒストグラムを示す。細胞や粒子1個ずつにレーザ光を照射し、散乱光（前方散乱光：Forward Scatter, FS／側方散乱光：Side Scatter, SS）と蛍光（Fluorescence, FL）を計測することにより大きさや蛍光などの情報を取得し、その相関ヒストグラムを作成し、解析する。
 (Beckman CoulterのHPより改変)

で、蛍光強度変化を測定することにより膜電位の変化を計測できる。また、膜電位の較正曲線作製のため、1 μM グラミシジン (Gramicidin、Sigma-Aldrich) を添加することにより、膜電位を 0 mV にした。グラミシジンは細胞膜を変質させ、イオン透過性を高めるため、ナトリウムイオン (Na^+) やカリウムイオン (K^+) などが通るようになる。グラミシジンのようにイオンが細胞膜を通過できるようにしてしまう物質を総称してイオノフォア (Ionophore) という。通常イオン勾配により神経細胞の膜電位は約-70 mV の静止膜電位に保たれているが、イオン勾配が無くなることにより膜電位は 0 mV になる。

本研究では、 1.5×10^6 個/ml の大脳皮質細胞懸濁液を、フローサイトメトリーにより細胞数 10,000 個/回 (2,000 個/秒、5 秒間) で測定後、細胞の大きさを反映する FS と蛍光を示す FL の 2 つの情報によりヒストグラムを作製し、その分布の違いから $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 減少が膜電位に及ぼす影響を解析した。また、大脳皮質および海馬神経細胞において $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 減少に伴う膜電位変化を、較正曲線を用いて比較検討した。 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ は、測定毎に Mg^{2+} 濃度 2.0 mM から 0.5 mM までの各濃度の測定溶液に置換し、測定を行った (表 1-C)。

2-2-4 グルタミン酸放出量のリアルタイム計測

グルタミン酸の検出法は、これまで HPLC (高速液体クロマトグラフィー、High performance liquid chromatography) による検出の他、酵素反応と組み合わせた蛍光を用いる方法、電気化学的反応を用いる方法などが一般的であった¹⁸⁾⁻²⁰⁾が、最近では、試料を連続的にサンプリングでき、測定感度が高く安定性のあるオンラインタイプのセンサが用いられるようになった²¹⁾。最も一般的なのは L-グルタミン酸酸化酵素 (GluOx) と電極を組み合わせたものであり

22)、GluOx を電極上に修飾し、グルタミン酸との反応によって生成した過酸化水素 (H_2O_2) を電極で検出する方法である。しかしながら、直接過酸化水素を検出するためには高い電極電位が必要である。そこで GluOx と西洋わさびペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase ; HRP) の 2 つの酵素を組み合わせることにより、低電位で選択性の高いオンラインセンサを作製し、10 nM という高い検出感度で、神経細胞から放出されたグルタミン酸を検出することができるようになった^{23),24)}。細胞から放出されたグルタミン酸は特異的に反応する GluOx で酸化され、生成された過酸化水素は HRP とメディエータであるオスミウム錯体により、最終的に電流変化として検出される。電極からの還元電流は基質濃度に比例するため、得られた電流値よりグルタミン酸を定量することができる (図 6)。

このオンラインセンサと前述 (2-2-2) の微小電極アレイを組み合わせ、2 つの酵素 (GluOx、HRP) を微小電極アレイに修飾して、アレイ型のグルタミン酸オンラインセンサを作製し、ラット海馬スライスにおける $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 減少によるグルタミン酸放出量の測定を行った。 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ は、 Mg^{2+} 濃度 2.0 mM の測定溶液から 0 mM の測定溶液に灌流し、低濃度にした (表 1-C)。このアレイ型オンライングルタミン酸センサは空間分解能や時間分解能に優れ、多点で非侵襲にグルタミン酸を検出できる³⁾⁻⁵⁾。アレイ型オンライングルタミン酸センサは以下のように作製した。まず、電極 (作用極) には 8 x 8 の平板 ITO 微小電極アレイを使用し、2 種類の酵素 (GluOx、HRP) およびメディエータであるオスミウム-ポリビニルピリジン錯体高分子 ($(\text{Med})_{\text{ox}}$, $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^{3+}$) を電極上に修飾する。修飾は、① $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}]^{3+}$ および HRP を含有するポリビニルピリジン溶液 (Polyvinulpyridine、BAS 社)、② 5% ナフィオン (Nafion、Sigma-Aldrich)、③ 2.2% GluOx (ヤマサ醤油) および 14% ウシ血清アルブミン (BSA ; Bovine

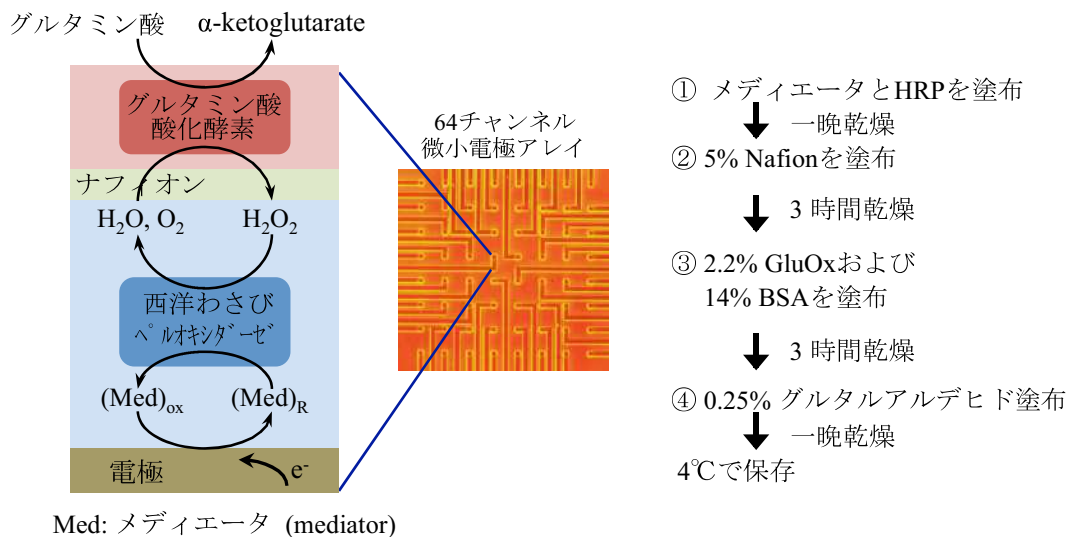


図6 アレイ型オンラインセンサにおけるグルタミン酸の検出原理

アレイ型オンラインセンサにおけるグルタミン酸の検出原理を示す。溶液中のグルタミン酸はL-グルタミン酸酸化酵素 (GluOx) により酸化され、その際に生成される過酸化水素 (H_2O_2) は西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) とメディエータであるオスミウム錯体により、最終的に電流変化として検出される。電極からの還元電流は基質濃度に比例するため、電流値によりグルタミン酸を定量できる。この2つの酵素 (GluOx、HRP) を微小電極アレイに修飾することにより、アレイ型オンライングルタミン酸センサを作製する。

(参考文献 26 より改変)

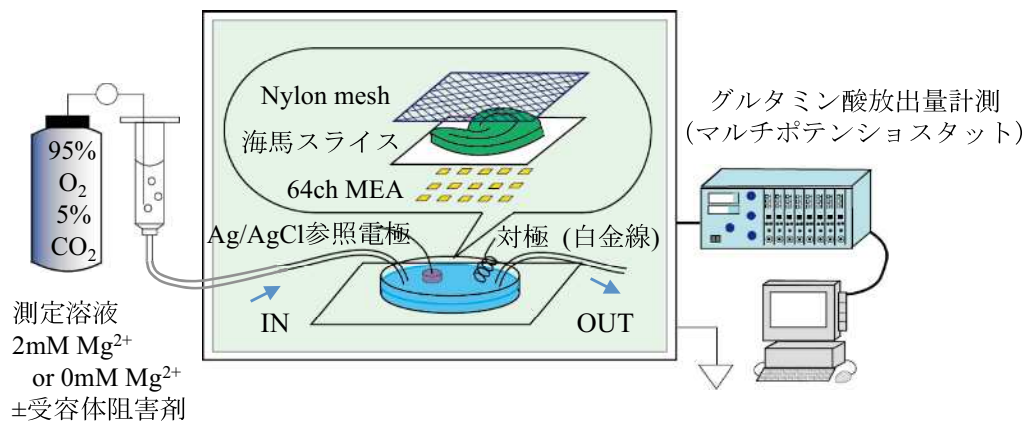


図7 グルタミン酸放出量計測装置

ラット海馬スライスにおける[Mg²⁺]_o減少によるグルタミン酸放出量を、参照極には銀/塩化銀 (Ag/AgCl) 電極、対極には白金線を用い、マルチポテンシostatで計測した。培養した海馬スライスは倒立顕微鏡で観察しながら、ナイロンメッシュを用いて多孔質膜ごと電極アレイ上に密着させた。測定溶液にはあらかじめ30分間、95%O₂/5%CO₂混合ガスを通気して飽和させておき、0.4 ml/minで灌流しながら1時間安定させた。

(Gordon Research Conferences 2002 ポスターより改変)

serum albumin、Sigma-Aldrich)、④0.25% グルタルアルデヒド (Glutaraldehyde、関東化学) を順次電極上に塗布することにより行った。グルタルアルデヒドで架橋反応により酵素を固定化する。溶液①および③の塗布は先端径 80 μm のガラスキャピラリーを用いて微量エア吐出型ポンプ (PV820, WPI) により行い、各溶液の塗布後、室内で十分に乾燥させた。参照極には銀/塩化銀電極 (Ag/AgCl) を、対極には白金線を用い、マルチポテンシオスタット (HA1010mM8、北斗電工) で定電位 (-0.1V vs. Ag/AgCl) 下における各電極の電流値を計測した (図 7)。培養した海馬スライスは倒立顕微鏡 (Diaphoto-TMD、Nikon) で観察しながら、ナイロンメッシュを用いて多孔質膜ごと電極アレイ上に密着させた。測定溶液 (表 1-C) にはあらかじめ 30 分間、95% O_2 / 5% CO_2 混合ガスを通気して飽和させておき、0.4 ml/min で灌流しながら 1 時間回復させた。グルタミン酸放出量の時間的変化を、グルタミン酸受容体の NMDA 受容体阻害剤である 500 μM MK801 ((5R,10S)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]-cyclohepten-5-10-imine maleate、TOCRIS) および非 NMDA 受容体阻害剤である 500 μM CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione、TOCRIS) 存在下で比較検討した。

2-2-5 共焦点レーザー蛍光顕微鏡による細胞内カルシウム濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の解析

培養神経細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定には共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (MRC1024MP、Bio-Rad、Zeiss Axiovert 135、Kr/Ar laser) を用いた。共焦点顕微鏡は、反射光が結像する位置にピンホールを置くことで散乱光をカットし、コントラストの高いクリアな画像を得ることのできる顕微鏡であり、生物学の分野では良く用いられる。 Ca^{2+} の蛍光プローブには 10 $\mu\text{g/ml}$ Fluo4-AM (Molecular Probe、Ex=494 nm, Em=516 nm) を用い、37°C で 1 時間、細胞を染色した後、 $[\text{Mg}^{2+}]_i$ を測定した。

の濃度変化による $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光変化を、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で経時的に測定した。あらかじめ蛍光標識したサンプルを測定溶液（2 mM Mg^{2+} ）で満たしておき、 Mg^{2+} 濃度の低い測定溶液（0-1.9 mM Mg^{2+} ）と灌流で置換することにより（5 ml/min）、 $[Mg^{2+}]_o$ を低濃度にした（表 1-C）。試料には無血清培地を用いたラット大脳皮質および海馬初代培養神経細胞を用い、ガラスボトムディッシュで約2週間培養し、測定に使用した。

$[Mg^{2+}]_o$ が低濃度になると $[Ca^{2+}]_i$ は上昇することが知られている²⁵⁾。 $[Mg^{2+}]_o$ の濃度変化による $[Ca^{2+}]_i$ の応答変化を、 Mg^{2+} 濃度と培養日数における応答の違いで検討した。さらに Ca^{2+} 振動（オシレーション）に着目し、 Ca^{2+} 動態の中でも複雑な生理的現象であるオシレーションを引き起こす Mg^{2+} 濃度の特定と培養日数における応答の違いも検討した。また、グルタミン酸受容体の阻害剤 MK801（NMDA 受容体）および CNQX（非 NMDA 受容体）を用い、グルタミン酸受容体を阻害した場合の $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ 変化も測定した。

$[Mg^{2+}]_o$ 減少によるシナプス活動の変化を調べるため 50 μ M FM1-43 (Invitrogen, Ex=480 nm, Em=580 nm)を用い、蛍光変化を経時的に測定した。 $[Mg^{2+}]_o$ は、 Mg^{2+} 濃度を 2.0 mM から 0 mM の測定溶液に灌流し置換する（表 1-C）。FM1-43 は脂溶性であり、細胞膜に付着し蛍光を発する。疎水性の細胞膜を通り抜けることができない細胞外の物質を取り込む機能の1つであるエンドサイトーシス（Endocytosis）によりシナプス小胞に取り込まれ、シナプス活動に応じた蛍光が確認できる。さらに取り込まれた FM1-43 は、細胞膜の脱分極により細胞内で合成された物質を分泌する機能の1つであるエキソサイトーシス（Exocytosis）が起こると放出されるため、蛍光強度の変化からシナプス小胞の動態解析が可能である。

2-3 実験結果

2-3-1 $[Mg^{2+}]_i$ 減少による膜電位の変化

微小電極アレイ (MEA) を用い、ラット大脳皮質神経細胞における $[Mg^{2+}]_i$ 減少による活動電位の変化を測定した。 $[Mg^{2+}]_i$ を減少させることにより、自発の活動電位 (図 8-A) および、電気刺激で誘起した活動電位 (図 8-B) が頻繁になった。

またフローサイトメトリーを用いることで、 $[Mg^{2+}]_i$ 減少による膜電位変化を測定した。神経細胞の細胞膜は機械的、化学的、電気的な刺激を受けると膜電位が変化し、脱分極を引き起こす。図 9-A は塩化カリウム (KCl) で細胞膜を脱分極させた時のカリウム (K^+) 濃度と膜電位の校正曲線であり、 K^+ 濃度と蛍光強度の相関性から膜電位を求めることが可能である。図 9-A の緑の正方形はグラミシジン (Gramicidin) を添加して膜電位を 0 mV にした時の蛍光強度を示す。 K^+ 濃度が上昇すると、脱分極により膜電位蛍光色素 DiBAC₄(3) の蛍光強度も増加するため、KCl 濃度ごとの蛍光強度を測定した。図 9-B は、蛍光染色していない細胞のヒストグラム (赤)、DiBAC₄(3) で染色した細胞の静止膜電位でのヒストグラム (青)、およびグラミシジンにより膜電位を 0 mV にした時のヒストグラム (緑) を示す。蛍光強度の増加、すなわちピーク値が右方向に移動することは、膜電位が 0 mV に近づき、細胞膜が脱分極をしていることを意味する。図 9-A と照らし合わせると、DiBAC₄(3) で染色した細胞の蛍光強度は、静止膜電位の約 -70 mV になっているのがわかる。

図 10-A は、大脳皮質神経細胞の蛍光分布を示したプロットであり、DiBAC₄(3) および PI (Propidium Iodide) で染色した細胞の蛍光分布を見るため、各蛍光波長である FL1 (蛍光、525 nm BP) と FL3 (蛍光、620 nm BP) で測定した。図 10-A-a は PI で染色された死細胞の領

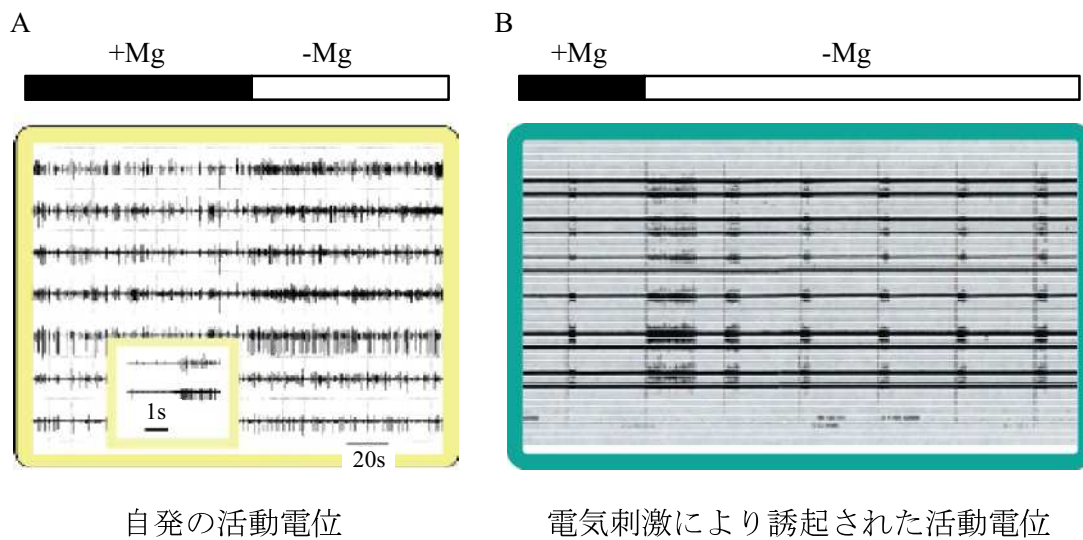


図 8 $[Mg^{2+}]_o$ 除去による活動電位計測

微小電極アレイ (MEA) により計測された活動電位は、3kHzの周波数でサンプリングし、100-10kHzの周波数帯域でアンプを用い増幅した。Aは $[Mg^{2+}]_o$ 減少による自発の活動電位、Bは $[Mg^{2+}]_o$ を減少させた時の電気刺激により誘起された活動電位を示す。

(参考文献 8 より改変)

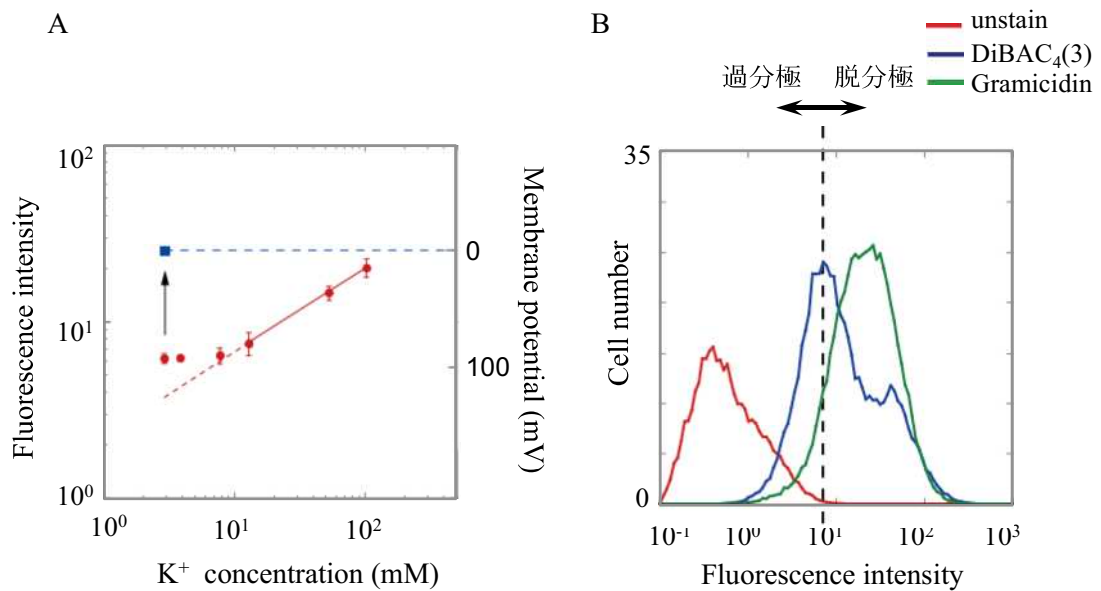


図9 フローサイトメトリーによる膜電位計測 (1)

膜電位感受性蛍光色素DiBAC₄(3)とイオノフォアであるグラミシジン (Gramicidin) を用い、フローサイトメトリーによりK⁺濃度 (K⁺ concentration) と膜電位 (Membrane potential) の校正曲線を作成した (A)。Aの緑の正方形はグラミシジンを添加した時の蛍光強度であり、膜電位0mVを示す。Bは蛍光強度と細胞数のヒストグラムであり、赤は蛍光染色していない細胞、青はDiBAC₄(3)で染色した静止膜電位の細胞、緑はグラミシジンにより膜電位を0mVにした細胞の蛍光強度を示す。試料として大脳皮質神経細胞を用いた。(参考文献 7 より改変)

域を示しており、DiBAC₄(3)で染色された領域である図 10-A-b が生細胞を示していると考えられる。従って、図 10-A-b の領域の変化を解析することで膜電位の変化が確認できる。図 10-B-a, b は、図 10-A-b 領域における DiBAC₄(3)の蛍光変化を、細胞数と蛍光強度のヒストグラムで示したものである。図 10-B-a は分散直後の細胞（培養前）、図 10-B-b は 12 日目の培養細胞の膜電位変化であり、各々[Mg²⁺]_oが 2.0、1.0、0.5 mM の時の蛍光強度を示す。B-a, b 両方とも、[Mg²⁺]_oが減少するにつれピークが右方向に移動しており、蛍光強度の増加、つまり膜電位の脱分極が確認された。図 10-C-a, b は、図 10-A-b 領域での[Mg²⁺]_o減少による DiBAC₄(3)の変化を、FS（前方散乱光：細胞の大きさ）と蛍光（FL1）で示した散布図のプロットである。図 10-C-a は[Mg²⁺]_oが 2.0 mM の時の蛍光分布、図 10-C-b は[Mg²⁺]_oを 0.5 mM にした時の蛍光分布を示しており、図 10-C-b は図 10-C-a と比較すると細胞群全体が上方向にシフトしており、[Mg²⁺]_o減少による膜電位蛍光強度の上昇が認められた。

図 11 は[Mg²⁺]_o（横軸）と膜電位（縦軸）の関係を示すグラフであり、大脳皮質および海馬神経細胞を用い、図 9-A の校正曲線より膜電位を算出し、比較した。図 11-A は大脳皮質神経細胞、図 11-B は海馬神経細胞の膜電位変化を示している。大脳皮質神経細胞および海馬神経細胞ともに、[Mg²⁺]_oが減少するにつれ膜電位が+方向に近づき脱分極傾向を示していることが確認された。

2-3-2 [Mg²⁺]_o減少によるグルタミン酸放出量のリアルタイム計測

アレイ型オンラインセンサを用いた、海馬スライス各領域でのグルタミン酸放出量の測定結果を図 12 に示す。Mg²⁺濃度 2.0 mM から 0 mM への測定溶液の灌流による[Mg²⁺]_oの減少に

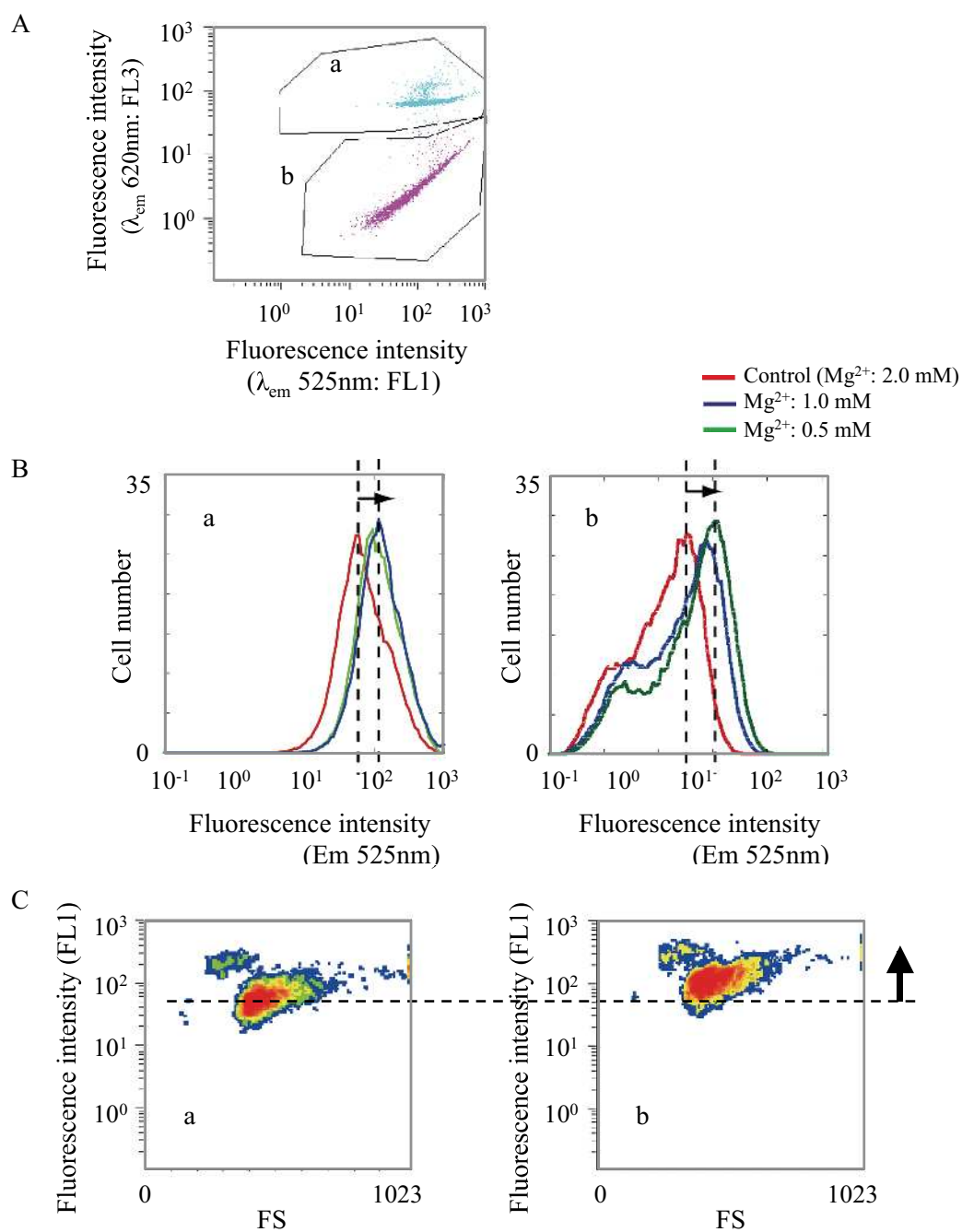
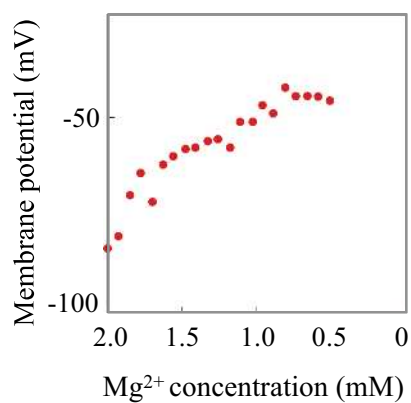


図10 フローサイトメトリーによる膜電位計測 (2)

膜電位感受性蛍光色素DiBAC₄(3)を用いた、 $[Mg^{2+}]_o$ 減少による膜電位蛍光変化をフローサイトメトリーで測定した。AはDiBAC₄(3)およびPIで染色した細胞の、FL1およびFL3の蛍光分布である。A-aはPI (死細胞)、A-bはDiBAC₄(3) (生細胞) の蛍光領域を示している。BはA-bについて、 $[Mg^{2+}]_o$ を減少させた時のDiBAC₄(3)蛍光強度 (Fluorescence intensity) と細胞数 (Cell number) のヒストグラムである。B-aは分散直後 (培養前) の細胞、B-bは培養12日目の細胞での膜電位蛍光変化を示す。赤はControl (2.0mM)、青は1.0 mM、緑は0.5 mMの $[Mg^{2+}]_o$ で測定した。Cは $[Mg^{2+}]_o$ を減少させた時の蛍光の散布図であり、C-aは $[Mg^{2+}]_o$ が2.0mM、C-bは $[Mg^{2+}]_o$ が0.5mMである。
(参考文献 8 より改変)

A 大脳皮質神経細胞



B 海馬神経細胞

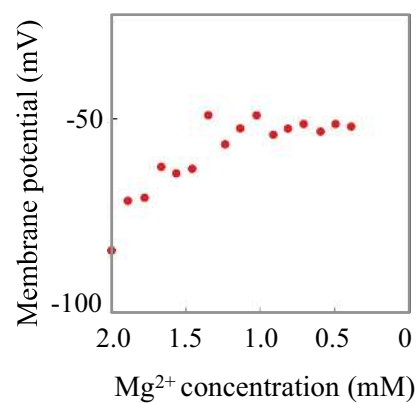


図11 大脳皮質および海馬神経細胞の[Mg²⁺]_o減少による膜電位変化

膜電位感受性蛍光色素DiBAC₄(3)を用い、[Mg²⁺]_o減少による膜電位変化を、大脳皮質神経細胞 (A) と海馬神経細胞 (B) で比較した。膜電位は図9の較正曲線により算出した。縦軸は膜電位 (Membrane potential, mV)、横軸はMg²⁺濃度 (Mg²⁺ concentration) を示す。

(参考文献 8 より改変)

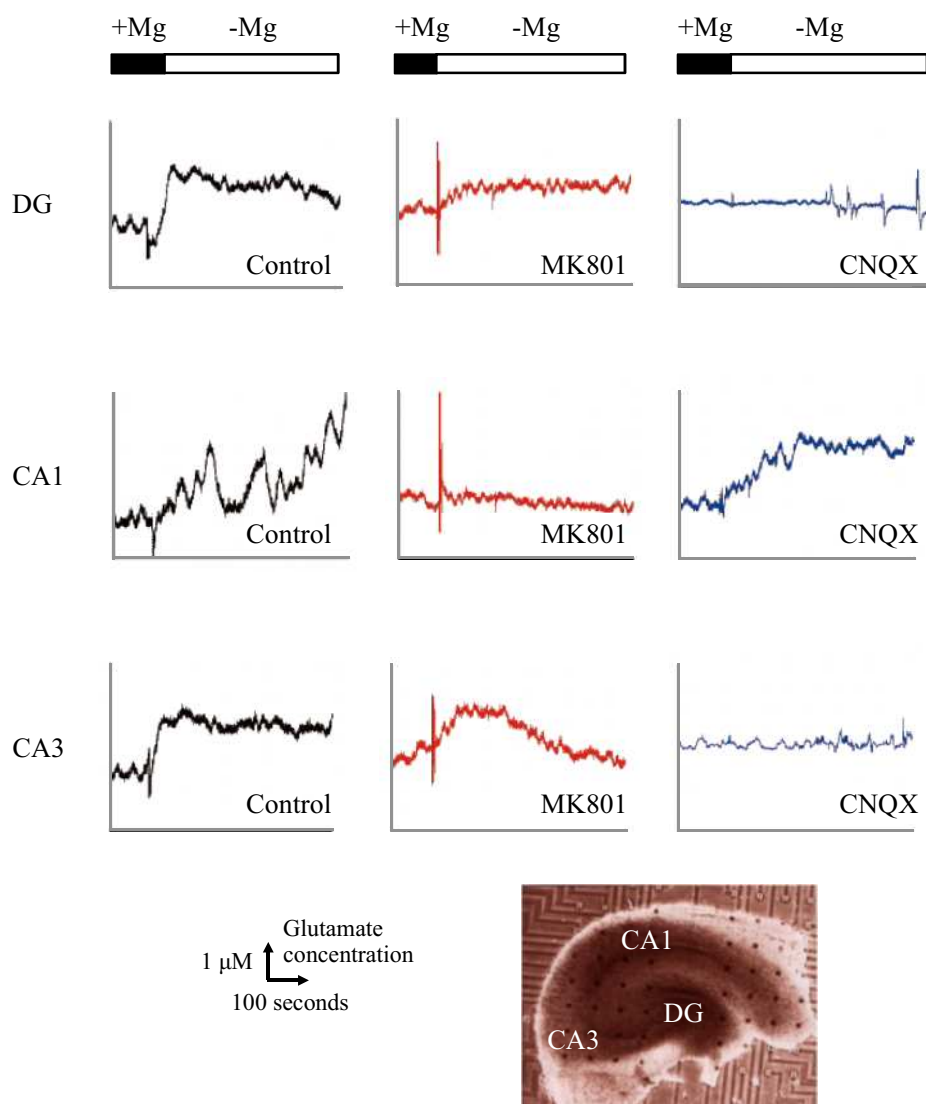


図12 アレイ型オンラインセンサによるグルタミン酸放出量の計測

図6のアレイ型オンラインセンサと図7のグルタミン酸計測装置により、海馬各領域（DG（歯状回）、CA1、CA3）での $[Mg^{2+}]_o$ 減少によるグルタミン酸放出量を計測した。グルタミン酸受容体の阻害剤MK801（NMDA受容体）およびCNQX（非NMDA受容体）を用い、各領域のグルタミン酸放出量を比較検討した。（参考文献 8 より改変）

より、海馬の各領域におけるグルタミン酸放出量は一過性に増加した。グルタミン酸放出量の時間的变化を、グルタミン酸受容体である NMDA 受容体の阻害剤 500 μ M MK801 および非 NMDA 受容体の阻害剤 500 μ M CNQX 存在下で比較検討したところ、MK801 は CA1 の応答を抑制するが、DG や CA3 にはあまり影響を与えておらず、CNQX は DG や CA3 での応答は抑制するが、CA1 では影響を与えていないことが明らかとなった。

$[\text{Mg}^{2+}]_o$ の減少によりグルタミン酸放出量が増加することから、 Mg^{2+} が神経活動に影響を与えることが明らかとなった。また、海馬各領域においてグルタミン酸受容体の阻害剤に対する応答が異なることから、受容体分布が異なることが示唆された。

2-3-3 $[\text{Mg}^{2+}]_o$ 減少による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の蛍光強度の変化

MEA を用いた神経活動の計測により培養開始直後はほとんど信号が検出されないが、培養開始後 3-4 日後くらいから自発活動を始めることがわかっている^{1),2)}。その後各チャンネル間で同期し始めるが、この応答は細胞でのシナプスの数、すなわち細胞への入出力に依存すると考えられる。この際 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定すると、発火に伴い $[\text{Ca}^{2+}]_i$ も周期的に変化することを確認している^{25),26)}。これらのことを考慮し、培養開始 5 日目より細胞内カルシウム濃度測定を試みた。

図 13 に、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用い、 $[\text{Mg}^{2+}]_o$ 減少によるシナプス小胞の動態とそれに伴う $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を示した。その結果、 $[\text{Mg}^{2+}]_o$ 減少によりシナプス小胞内に含まれる FM1-43 の蛍光強度が減少した(図 13-A)。これは脱分極によりエキソサイトーシスが起こり、FM1-43 が放出されたためと考えられる。この反応と同時に Ca^{2+} が細胞内に流入し、 Ca^{2+} オシ

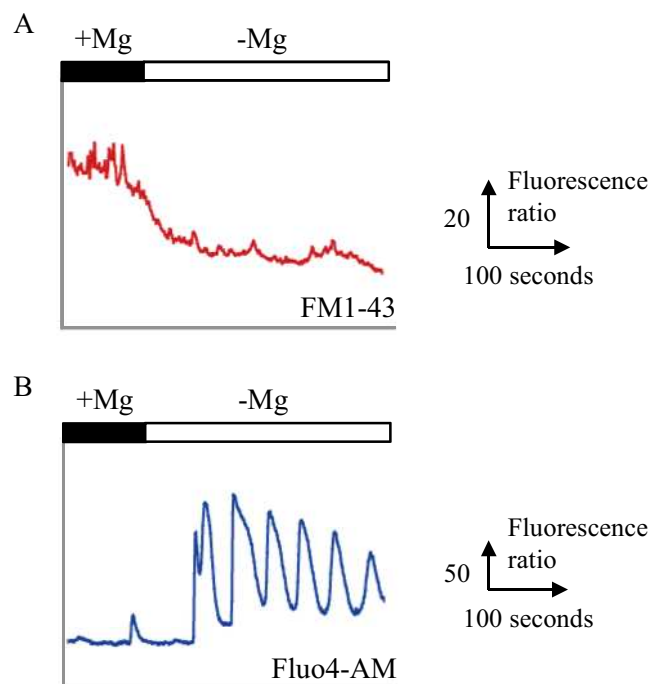
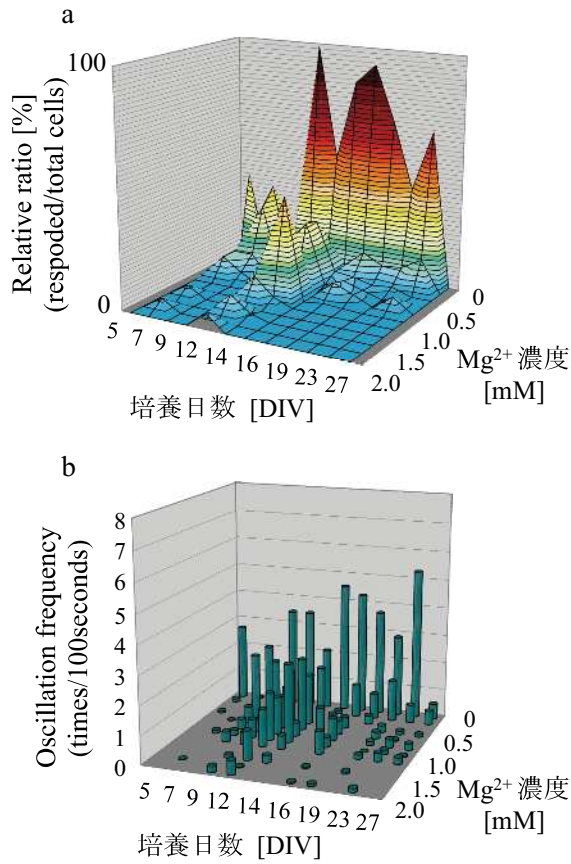


図13 $[Mg^{2+}]_o$ 減少によるシナプス小胞の動態と $[Ca^{2+}]_i$ 変化
 $[Mg^{2+}]_o$ 減少によるシナプス小胞の動態 (A) とそれに伴う $[Ca^{2+}]_i$ (B) の変化を示す。シナプス小胞の蛍光プローブには細胞膜に付着して蛍光を発するFM1-43を用い、 Ca^{2+} の蛍光プローブにはFluo4-AMを用いて蛍光変化を測定した。(参考文献 7 より改変)

レーションが生じていることが確認された (図 13-B)。

$[Mg^{2+}]_o$ の減少に伴い $[Ca^{2+}]_i$ が増加することは知られており²²⁾、この現象を詳細に検討するため、異なる部位 (大脳皮質および海馬神経細胞) において、異なる培養期間での $[Ca^{2+}]_i$ に対する $[Mg^{2+}]_o$ 減少の影響を共焦点レーザー蛍光顕微鏡により計測した。図 14 に培養期間ごとに計測した、 $[Mg^{2+}]_o$ 減少における $[Ca^{2+}]_i$ の応答変化を示す。大脳皮質神経細胞 (A) および海馬神経細胞 (B) の $[Ca^{2+}]_i$ 変化は、 Ca^{2+} 蛍光プローブである Fluo4-AM で標識し、 $[Mg^{2+}]_o$ 減少 (1.9-0 mM) による $[Ca^{2+}]_i$ 変化を経時的に測定した。図 14-A, B-a に Mg^{2+} 濃度 (mM)、培養日数 (DIV ; days in vitro) および総細胞数に対し応答変化のあった細胞数の割合 (%) の等高線グラフを示し、図 14-A, B-b には Mg^{2+} 濃度 (mM)、培養日数 (DIV) および Ca^{2+} オシレーションの頻度を示す。オシレーション頻度は、100 秒間に起こるオシレーションの回数 (回/100 秒) とし、数値が大きいほどオシレーション頻度が高いことを示している。図 14-A, B-a において、どちらも培養 5 日目辺りから $[Mg^{2+}]_o$ に対する $[Ca^{2+}]_i$ の応答変化が始まっているがその後の傾向は異なり、大脳皮質神経細胞 (A) では培養 12 日目で最も変化が激しく、比較的高濃度の $[Mg^{2+}]_o$ でも変化が見られたが、培養期間が長くなると高濃度の $[Mg^{2+}]_o$ では変化せず、0 mM に近い低濃度の $[Mg^{2+}]_o$ に対してのみ変化が見られた。一方、海馬神経細胞 (B) では培養 14 日目で最も変化が激しくなり、1.8 mM とかなり高い $[Mg^{2+}]_o$ でも $[Ca^{2+}]_i$ の応答変化が見られたが、その傾向は培養期間が長くなった場合にも変わらなかった。図 14-A, B-b のオシレーション頻度で比較した場合においても大脳皮質神経細胞と海馬神経細胞の応答の違いは顕著であり、大脳皮質神経細胞では低濃度の $[Mg^{2+}]_o$ でのオシレーション頻度が高く、それは培養期間に依らない。一方、海馬神経細胞では培養期間が長くてもオシレーション頻度

A 大脳皮質神経細胞



B 海馬神経細胞

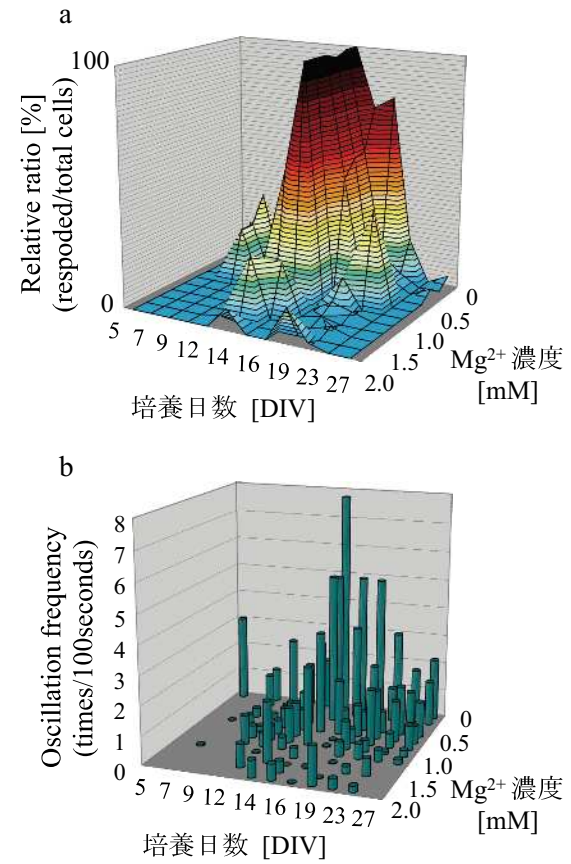


図14 $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ の応答変化とオシレーション頻度

大脳皮質神経細胞 (A) および海馬神経細胞 (B) において、培養期間ごとに計測した $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ の応答変化 (a) とオシレーション頻度 (b) を示す。 Ca^{2+} の蛍光プローブにはFluo4-AMを用いた。横軸は培養日数 (DIV: days in vitro、5-27日) および Mg^{2+} 濃度 (2.0-0 mM) であり、縦軸は、aは総細胞数に対し応答変化のあった細胞数の割合、bは100秒間のオシレーション回数 (回/100秒) を示す。 (参考文献 8 より改変)

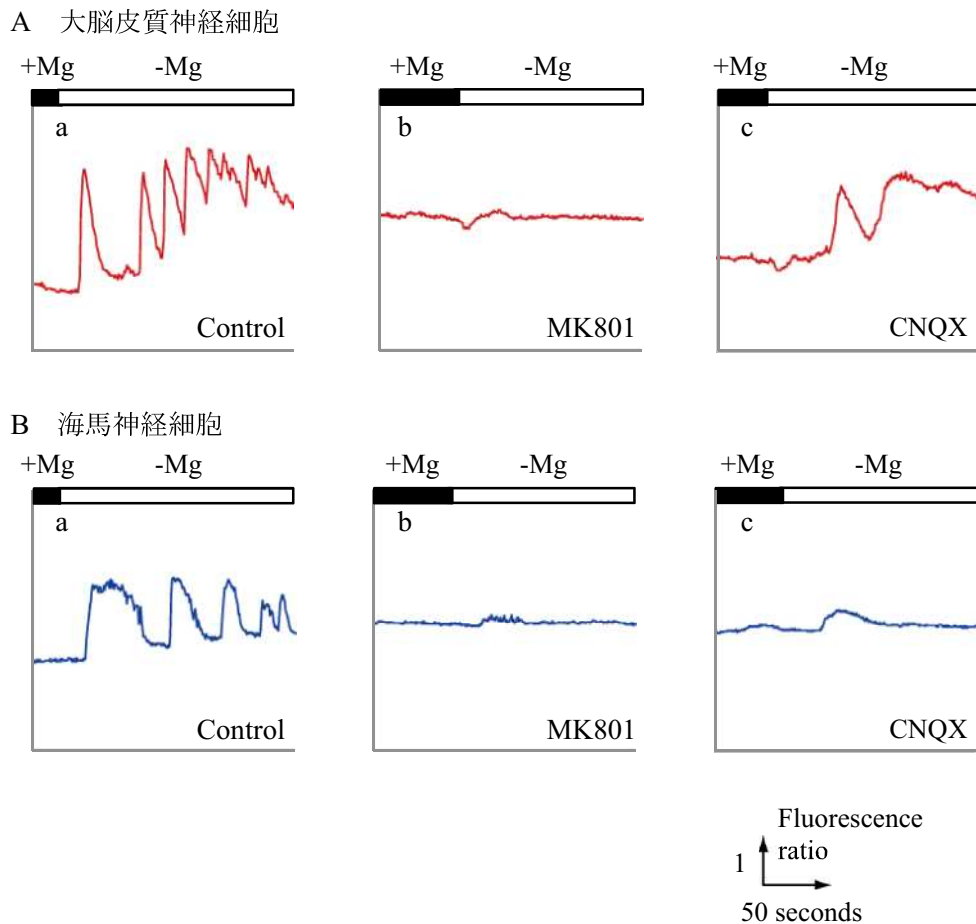


図15 グルタミン酸受容体の阻害剤を用いた $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ 変化

大脳皮質神経細胞 (A) および海馬神経細胞 (B) における、グルタミン酸受容体の阻害剤を用いた場合の $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ 変化を示す。 Ca^{2+} の蛍光プローブにはFluo4-AMを用いた。AはControl (グルタミン酸添加のみ) の応答変化、bはNMDA受容体の阻害剤MK801を用いた場合、cは非NMDA受容体の阻害剤CNQXを用いた場合の応答変化を示す。

(参考文献 8 より改変)

が高く、特に 12-16 日目での頻度が高かった。オシレーション頻度の高低は応答の強弱に比例するものであり、海馬神経細胞の方が $[Mg^{2+}]_o$ に対する感受性が高いことが確認された。

図 15 にグルタミン酸の受容体である NMDA 受容体の阻害剤 MK801 および非 NMDA 受容体の阻害剤 CNQX を用いた場合の、 $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ 変化の測定結果を示す。図 15-A は大脳皮質神経細胞、図 15-B は海馬神経細胞の測定結果である。大脳皮質神経細胞においては、 $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ 変化は MK801 により抑制され（図 15-A-b）、CNQX ではオシレーションのみが抑制された（図 15-A-c）。海馬神経細胞においては、 $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ 変化は MK801 により抑制され（図 15-B-b）、CNQX においても抑制傾向を示した（図 15-B-c）。海馬スライスにおいて、領域による受容体分布の違いが示唆されたように（図 12）、大脳皮質神経細胞および海馬神経細胞においても、受容体分布の違いが $[Ca^{2+}]_i$ 変化の違いとなつたと考えられる。

2-4 考察

MEA による活動電位の計測、アレイ型オンラインセンサによるグルタミン酸放出量のリアルタイム測定、フローサイトメトリーを用いた膜電位計測、共焦点レーザ蛍光顕微鏡による $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光測定により、 Mg^{2+} が神経活動に影響を及ぼしていることが確認された。 $[Mg^{2+}]_o$ の減少により自発および電気刺激で誘起された活動電位は頻繁になり、海馬ではグルタミン酸放出の増加が認められ、その放出は領域により異なることが確認された。 $[Mg^{2+}]_o$ 減少による膜電位の測定では、大脳皮質および海馬神経細胞ともに $[Mg^{2+}]_o$ が減少するにつれ脱分極傾向を示すことが確認された。また $[Ca^{2+}]_i$ 測定においては、 $[Mg^{2+}]_o$ 減少が大脳皮質および海

馬神経細胞に及ぼす影響に相違が見られた。培養期間や $[Mg^{2+}]_o$ の違いにより $[Ca^{2+}]_i$ 変化に顕著な差が認められ、海馬神経細胞は培養期間が長くても、僅かな $[Mg^{2+}]_o$ の濃度変化に対しても応答が認められるのに対し、大脳皮質神経細胞は大きな濃度変化に対してのみの応答であった。 Ca^{2+} オシレーションに着目した結果も同様で、海馬神経細胞では培養 14 日目でオシレーション頻度が最も高くなり、僅かな $[Mg^{2+}]_o$ の濃度変化に対しても応答が見られ、培養期間が長くてもオシレーションが認められた。大脳皮質神経細胞は培養 12 日目でオシレーション頻度が最も高くなり、培養期間に依らず大きな濃度変化に対してのみの応答であった。この結果より、海馬神経細胞は大脳皮質神経細胞より、わずかな Mg^{2+} 濃度変化で反応するといった高い Mg^{2+} 感受性を持つことが明らかとなった。さらにグルタミン酸受容体の阻害剤 (MK801 および CNQX) を用いた場合にも、大脳皮質神経細胞および海馬神経細胞での $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ 変化の相違が認められ、部位によるグルタミン酸受容体分布の違いも示唆された。

2-5 まとめ

$[Mg^{2+}]_o$ 減少により神経活動が頻繁になり、 Mg^{2+} が神経活動に影響を及ぼしていることが明らかとなった。海馬では $[Mg^{2+}]_o$ 減少によりグルタミン酸放出量が増加し、各領域 (DG, CA1, CA3) での $[Mg^{2+}]_o$ 減少に対する応答に違いが見られた。海馬各領域でのグルタミン酸受容体分布と Mg^{2+} との関連も興味深い。また大脳皮質および海馬神経細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 変化の比較では、 $[Mg^{2+}]_o$ と培養期間に対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答変化に違いが認められた。海馬神経細胞の方が Mg^{2+} に対する感受性が高いことが明らかとなり、海馬が短期記憶を担っていることから、

Mg²⁺が短期記憶に関与していることが示唆された。

◆第2章の略語一覧

[Mg²⁺]_o : 細胞外マグネシウム濃度

[Ca²⁺]_i : 細胞内カルシウム濃度

NGF : 神経成長因子 (Nerve growth factor)

BDNF : 脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor)

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium、培地

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid、緩衝剤

MEA : 微小電極アレイ (Micro electrode array)

ITO : 酸化インジウムスズ (Indium tin oxide)

FS : 前方散乱光 (Forward scatter)

SS : 側方散乱光 (Side scatter)

FL : 蛍光 (Fluorescence)

PI : 死細胞の核酸染色色素 (Propidium Iodide)

DiBAC₄(3) : 膜電位感受性色素 (Bis(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol, sodium salt)

Ex : 励起波長 (Excitation wavelength)

Em : 蛍光波長 (Fluorescence wavelength)

HPLC : 高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography)

GluOx : L-グルタミン酸酸化酵素 (L-グルタミン酸オキシダーゼ、L-glutamate oxidase)

HRP : 西洋わさびペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase)

BSA : ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin)

NMDA 受容体：グルタミン酸のイオンチャネル型受容体

N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartic acid)

MK801：NMDA 受容体の阻害剤 ((+)-MK801 マレイン酸塩、(+)-MK801 maleate) (Dizocilpine、

(5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]-cyclohepten-5-10-imine maleate)

CNQX：AMPA およびカイニン酸受容体の阻害剤 (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)

DIV：培養日数 (days in vitro)

DG：歯状回 (Dentate Gyrus)

◆第2章の参考文献

- 1) Jimbo Y, Tateno T, Robinson HP; Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophys J*, 76 (2), 670-678, 1999
- 2) Jimbo Y, Kasai N, Torimitsu K, Tateno T, Robinson HP; A system for MEA-based multisite stimulation. *IEEE Trans Biomed Eng*, 50, 241-248, 2003
- 3) 河西 奈保子、神保 泰彦、丹羽 修、鳥光 慶一；化学修飾電極アレイによる神経伝達物質の測定 -ラット海馬から放出されるグルタミン酸の多点電気化学計測-. *電子情報通信学会技術研究報告*, 100(479)、27-32、2000
- 4) Kasai N, Jimbo Y, Niwa O, Matsue T, Torimitsu K; Real-time multisite observation glutamate release in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett*, 304, 112-116, 2001
- 5) Kasai N, Jimbo Y, Torimitsu K; Electrochemical monitoring of glutamate release at multiple positions in a rat hippocampal slice. *Anal Sci*, 18, 1325-1327, 2002
- 6) 鳥光 慶一、古川 由里子、河西 奈保子；神経伝達物質放出空間分布のリアルタイム測定法. *日本薬理学雑誌*, 121(5)、349-356、2003
- 7) 古川 由里子、鳥光 慶一；ラット大脳皮質および海馬培養神経細胞に及ぼす低マグネシウムの影響. *Journal of Japanese for Magnesium Research*, 27 卷 2 号, 75-82、2008
- 8) Yuriko Furukawa, Nahoko Kasai, Keiichi Torimitsu; Effect of Mg^{2+} on neural activity of rat cortical and hippocampal neurons in vitro. *Magnesium Research*, 22(3), 174S-181S, 2009
- 9) 飯野 正光；細胞内カルシウム・シグナルの制御機構. *日本老年医学雑誌*, 37、182-187、2000

- 10) Iino M; Spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ signaling and its physiological roles. *Proc Jpn Acad*, 86, 244-256, 2010
- 11) Fishman RA; Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System. 2nd Edition, WB Saunders Company, 1992
- 12) Fukuda J, Yamaguchi K, Akimoto S, Tada Y; NGF-dependent and -independent growth of neurites from sympathetic ganglion cells of the aged human in a serum-free culture. *Neurosci Res*, 2, 460-471, 1985
- 13) Bottenstein JE, Skaper SD, Varon SS, Sato GH; Selective survival of neurons from chick embryo sensory ganglionic dissociates utilizing serum-free supplemented medium. *Exp Cell Res*, 125, 183-191, 1980
- 14) Kamioka H, Maeda E, Jimbo Y, Robinson HPC, Kawana A; Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neurosci Lett*, 206, 109-112, 1996
- 15) Jimbo Y, Kawana A, Parodi P, Torre V; The dynamics of a neuronal culture of dissociated cortical neurons of neonatal rats. *Biol Cybern*, 83, 1-20, 2000
- 16) Lopez-Amoros R, Castel S, Comas-Riu J; Vives-Rego J. Assessment of E. coli and Salmonella viability and starvation by confocal laser microscopy and flow cytometry using rhodamine 123, DiBAC₄(3), propidium iodide, and CTC. *Cytometry*, 29, 298-305, 1997
- 17) Wickens HJ, Pinney RJ, Mason DJ, Gant VA; Flow cytometric investigation of filamentation, membrane patency, and membrane potential in escherichia coli following ciprofloxacin exposure.

Antimicrob Agents Chemother, 44, 682-687, 2000

- 18) Cordek J, Wan GX, Tan W; Direct immobilization of glutamate dehydrogenase on optical fiber probes for ultrasensitive glutamate detection. *Anal Chem*, 71, 1529-1533, 1999
- 19) Tamiya E, Sugiura Y, Akiyama A, Karube I; Ultramicro-H₂O₂ electrode for fabrication of the in vivo biosensor. *Ann N Y Acad Sci*, 613, 396-400, 1990
- 20) Hu Y, Mitchell KM, Al Bahadlly FN, Mitchells EK, Wilson GS; Direct measurement of glutamate release in the brain using a dual enzyme-based electrochemical sensor. *Brain Res*, 659, 117-125, 1994
- 21) Zilkha E, Obrenovitch TP, Koshy A, Kusakabe H, Bennetto HP; Extracellular glutamate: on-line monitoring using microdialysis coupled to enzyme-amperometric analysis. *J Neurosci Methods*, 60, 1-9, 1995
- 22) Karayakin AA, Karayakina EE, Gorton L; Amperometric biosensor for glutamate using Prussian Blue-based "artificial peroxidase" as a transducer for hydrogen peroxide. *Anal Chem*, 72, 1720-1723, 2000
- 23) Torimitsu K, Niwa O; Real-time detection of GABA-induced synaptic glutamate release in cultured rat cortex. *Neuroreport*, 8, 1353-1358, 1997
- 24) Niwa O, Torimitsu K, Morita M, Osborne P, Yamamoto K; Concentration of extracellular L-glutamate released from cultured nerve cells measured with a small-volume online sensor. *Anal Chem*, 68, 1865-1870, 1996
- 25) Robinson HP, Kawahara M, Jimbo Y, Torimitsu K, Kuroda Y, Kawana A; Periodic synchronized

bursting and intracellular calcium transients elicited by low magnesium in cultured cortical neurons. *J of Neurophysiol*, 70, 1606-1616, 1993

- 26) 鳥光 慶一、河西 奈保子、古川 由里子 ; 海馬神経活動と Mg. *Clinical Calcium*、医薬ジャーナル社、14 卷 8 号, 26-33、2004

第3章 ラット大脳皮質培養神経細胞を用いたグルタミン酸添加に対する細胞内マグネシウム ($[Mg^{2+}]_i$) 変化

3-1 はじめに

本章では細胞内マグネシウム濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) に焦点をあて、グルタミン酸添加における Mg^{2+} の透過経路について検討した¹⁾。

Mg^{2+} は Ca^{2+} と同様、生体に不可欠な物質であり、ATP の産生、神経細胞における情報伝達の調整、筋肉の収縮やホルモンの分泌、様々な酵素反応の活性化などに関与していることが知られている。中枢神経系の神経活動においては、グルタミン酸受容体の一つである NMDA 受容体に対する抑制作用が良く知られているが^{2),3)}、 Mg^{2+} の神経活動に対する影響を研究した報告はあまり多くないのが現状である^{4),5)}。

Mg^{2+} の神経活動に関する研究があまり進んでいない要因の1つとして、蛍光プローブの問題があった。これまでも mag-fura-2 や mag-indo-1 など、 Mg^{2+} の蛍光プローブは存在したが、 Ca^{2+} との錯形成定数も高く Ca^{2+} も一緒に捕捉してしまうなどの問題があり、 Mg^{2+} の詳細な動態解析が難しかった。最近になって Mg^{2+} に選択性の高い可視化蛍光プローブの開発も進み⁶⁾、細胞内 Mg^{2+} の動態が調べられるようになってきた。本章では Mg^{2+} を標識する蛍光プローブ KMG-20-AM (Wako) を用い、共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いたグルタミン酸および KCl 添加による $[Mg^{2+}]_i$ の蛍光変化とグルタミン酸受容体阻害剤を用いることによる Mg^{2+} の透過経路についての検討を行った。

グルタミン酸は中枢神経において主要な興奮性神経伝達物質である。シナプス前細胞から

放出されたグルタミン酸をシナプス後細胞の受容体が受け取り、脱分極することにより情報が伝達される。グルタミン酸の受容体は、その構造や性質からイオンチャネル型受容体と代謝型受容体の2つに大別できる。イオンチャネル型受容体は、グルタミン酸との結合によりその構造が変化し、イオンの通り道であるイオンチャネルが開口することで膜電位変化を引き起こす^{7,8)}。イオンチャネル型受容体は薬理学的な違いにより、NMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸; N-methyl-D-aspartic acid) 受容体、AMPA (α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサゾール-4-プロピオン酸; α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 受容体、カイニン酸 (Kainic acid) 受容体の3つに分けられる。NMDA 受容体は高い Ca^{2+} 透過性があり、学習や記憶の基礎となるシナプス可塑性に関与している。NMDA 受容体には静止膜電位状態では Mg^{2+} が結合しており、その活性化を阻害しているが、細胞膜の脱分極に伴い Mg^{2+} が解離し、 Na^+ や K^+ および Ca^{2+} を通すようになる^{2),3)}。AMPA/カイニン酸受容体は Na^+ や K^+ は通すがある条件下以外では Ca^{2+} を通さないとされており、非 NMDA 受容体とも呼ばれている。一方、代謝型受容体 (Metabotropic glutamate receptor; mGluR) は、それ自体はイオンチャネルを持たず、セカンドメッセンジャーである G タンパク質 (Gアニンヌクレオチド結合タンパク質) などを介してイオンチャネルの開閉や酵素活性に関わっている^{7),9)}。G タンパク質を介してホスホリパーゼ C (phospholipase C; PLC) を活性化し、イノシトール三リン酸 (inositol 1,4,5-trisphosphate、IP3) を産生することで細胞内小器官の1つである小胞体膜上の IP3 受容体 (IP3R) から Ca^{2+} を放出するのもその1例である。

グルタミン酸添加による Ca^{2+} の透過経路は、細胞外からの流入と細胞内小器官 (小胞体やミトコンドリア) からの流出の2つの経路がある。前者としては、脱分極による Ca^{2+} チャネ

ルからの流入（電位依存性 Ca^{2+} チャンネル、voltage gated Ca^{2+} channel; VGCC）および NMDA、非 NMDA 受容体からの流入（リガンド依存性 Ca^{2+} チャンネル、ligand gated Ca^{2+} channel; LGCC）があり、後者としては mGluR を介した小胞体膜上にあるイノシトール 3 リン酸受容体 (inositol 1,4,5-triphosphate receptor; IP3R) からの放出 (Inositol trisphosphate induced Ca^{2+} release; IICR) および小胞体膜上にあるリアノジン受容体 3 (ryanodine receptor; RyR3) からの Ca^{2+} 誘発性の放出 (Ca^{2+} induced Ca^{2+} release; CICR) がある¹⁰⁾⁻¹⁴⁾。 Ca^{2+} はミトコンドリアからも放出され、ミトコンドリア内膜と外膜との接触部位に存在するミトコンドリア膜透過性遷移孔 (Mitochondrial permeability transition pore ; mPTP) と呼ばれる穴構造から Ca^{2+} に依存して Ca^{2+} が放出される。 Mg^{2+} は Ca^{2+} と化学的性質が類似しており、 Mg^{2+} も Ca^{2+} と同様の流出入経路があると考えられる。

3-2 実験方法

3-2-1 神経細胞培養

本研究でも第 2 章同様、無血清培地での大脳皮質培養神経細胞を用いた^{15),16)}。胎生 18 日 (18th embryonic day ; E18) の Wistar ラットから大脳皮質を取り出し、2.5 mg/ml Trypsin を用い 37°C で 10 分酵素処理をした後、遠心分離 (1000 rpm、5 分) およびピペッティングにより細胞を分散し、細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を 50 μm フィルターで濾過後、濃度を $1-5 \times 10^6$ cells/ml に調整し、培養および測定に使用した。フローサイトメトリーでの測定には分散直後 (培養前) の細胞懸濁液を使用し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡での測定には 12-14 日目の培養細胞を使用した。培養細胞は、あらかじめ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ラミニンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ポリリジンで

コーティングした培養皿（35 mm ガラスボトムディッシュ、MatTek）上に播種し、37°C、5% CO₂、飽和水蒸気下で約2週間培養を行った。培養液には0.074 mg/ml L-グルタミン、25 μM グルタミン酸、50 μg/ml ゲンタマイシン、2% B-27 supplement を含む Neurobasal Medium を用いた（表 1-A）。

3-2-2 グルタミン酸および KCl 添加による[Mg²⁺]_i測定

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸および脱分極を誘発する塩化カリウム（KCl）添加における[Mg²⁺]_iの変化を、共焦点レーザー蛍光顕微鏡（LSM510 META、Carl Zeiss）およびフローサイトメトリー（EPICS XL ADC、Beckman Coulter）を用い、測定した。さらに[Mg²⁺]_oおよび[Ca²⁺]_o減少における[Mg²⁺]_iの変化も測定し、Mg²⁺およびCa²⁺のキレート剤としてEDTA（エチレンジアミン四酢酸、ethylenediaminetetraacetic acid）、Ca²⁺のキレート剤としてBAPTA（O,O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N',N',N'-tetraacetic acid, tetrapotassium salt, hydrate）を用いた場合も測定した。Ca²⁺の蛍光プローブには10 μg/ml Fluo4-AM（Ex=494 nm, Em=516 nm、Molecular Probe）、Mg²⁺の蛍光プローブには10 μM KMG-20-AM（Ex=440 nm, Em=500-530 nm、Wako）を用い各々1時間細胞を染色した後、500 μM グルタミン酸添加による[Mg²⁺]_i変化を、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で、蛍光強度変化として1秒毎に経時的に測定した。測定にはHEPESを含む測定溶液（Mg²⁺およびCa²⁺濃度は2 mM または0 mM、表 1-C）を使用した。

フローサイトメトリーでの[Mg²⁺]_i測定においては、KMG-20-AMの他に5 μM PI（Propidium Iodide、Ex=488/536 nm、Em=617 nm、）で同時に染色し、死細胞を識別した。測定には共焦点レーザー蛍光顕微鏡測定と同様に、Mg²⁺およびCa²⁺濃度が2 mM または0 mMの測定溶液（表

1-C) を使用し、10 mM グルタミン酸添加後の蛍光強度変化を、細胞数 10,000 個/回 (2,000 個/秒、5 秒間) で測定した。蛍光励起波長 (Em) 525 nm での蛍光強度と細胞数のヒストグラムを作成し、その分布の違いからグルタミン酸添加に対する $[Mg^{2+}]_i$ の変化を解析した。統計処理には平均値の信頼性を示す標準誤差を用い、検定は ANOVA-Tukey's HSD 検定を有意水準 0.05 で行った。

3-2-3 グルタミン酸受容体阻害による $[Mg^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ 測定

グルタミン酸受容体阻害による $[Mg^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ の変化を、3-2-2 同様、共焦点レーザー蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用い、測定した。 Ca^{2+} の蛍光プローブには 10 μ g/ml Fluo4-AM、 Mg^{2+} の蛍光プローブには KMG-20-AM を用い、各々1 時間細胞を染色した後、500 μ M グルタミン酸に対する $[Mg^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ の濃度変化を、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で蛍光強度変化として1 秒毎に経時的に測定した。NMDA 受容体の阻害剤として 100 μ M MK801、非 NMDA 受容体の阻害剤として 100 μ M CNQX、mGluR の阻害剤として 100 μ M MCPG ((+)- α -Methyl-4-carboxyphenylglycine、Sigma-Aldrich)、IP3R の阻害剤には Xestospongin C (XeC、Sigma-Aldrich) を使用した。さらに PLC の活性剤として m-3M3FBS (2,4,6-Trimethyl-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzenesulfonamide、Tocris bioscience)、mGluR の活性剤として(RS)-3,5-DHPG ((RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycine、Tocris bioscience)、ミトコンドリア PTP の阻害剤として Cyclosporine A (CsA、Wako) を使用し、 $[Mg^{2+}]_i$ の変化を測定した。測定には 2mM Mg^{2+} の測定溶液 (表 1-C) を使用した。統計処理には平均値の信頼性を示す標準誤差を用い、検定は ANOVA-Tukey's HSD 検定を有意水準 0.05 で行った。

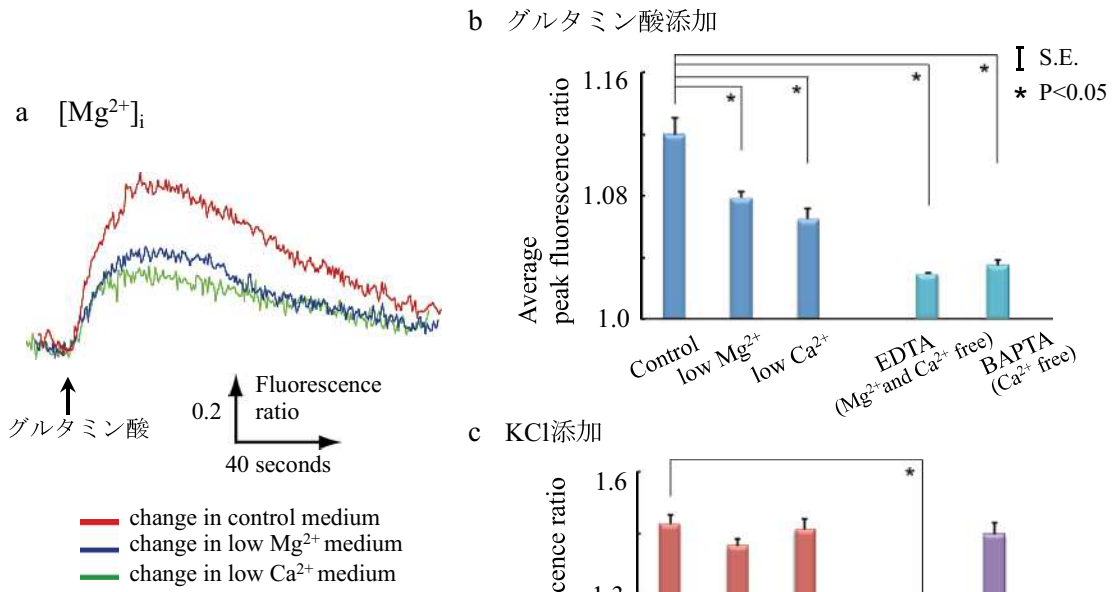
3-3 実験結果

グルタミン酸およびKCl添加による $[Mg^{2+}]_i$ の変化を図16に示す。図16-Aは共焦点レーザー蛍光顕微鏡による蛍光変化測定、図16-Bはフローサイトメトリーによる蛍光変化測定の結果を示し、a はグルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の経時的な蛍光変化のグラフ、b（グルタミン酸）および c(KCl) は蛍光変化のピーク値を変化分として算出し、その平均値を棒グラフとした。

500 μ M グルタミン酸添加により $[Mg^{2+}]_i$ は一過性に増加し、その増加は、 $[Mg^{2+}]_o$ および $[Ca^{2+}]_o$ を低濃度にすることによって有意に減少した（図16-A-a, b, $p < 0.05$ ）。グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加は、キレート剤であるEDTAおよびBAPTAを使用することで、さらに減少した（図16-A-b・水色、 $p < 0.05$ ）。脱分極を誘発するKCl添加においても $[Mg^{2+}]_i$ は一過性に増加した（図16-A-c）。KCl添加による一過性の増加は、キレート剤であるEDTAを用いた場合は有意に減少した（図16-A-c・紫、 $p < 0.05$ ）が、BAPTAを使用した場合はあまり変化が見られなかった。フローサイトメトリーによる $[Mg^{2+}]_i$ の測定においても共焦点レーザー蛍光顕微鏡での測定結果同様に、グルタミン酸およびKCl添加により $[Mg^{2+}]_i$ が一過性に増加したことが認められ（図16-B）、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加は、 $[Mg^{2+}]_o$ または $[Ca^{2+}]_o$ を低濃度にするにより、有意に減少した（図16-B-b、 $p < 0.05$ ）。

グルタミン酸受容体の阻害剤を用いた場合の、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ 変化の測定結果を、図17に示す。共焦点レーザー蛍光顕微鏡（図17-A）およびフローサイトメトリー（図17-B）を使用し、2 mM Mg^{2+} および Ca^{2+} の測定溶液（表1-C）を用いて測定した。図17-A、B共にaはグルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の経時的な蛍光変化、bは $[Mg^{2+}]_i$ の蛍光変

A



B

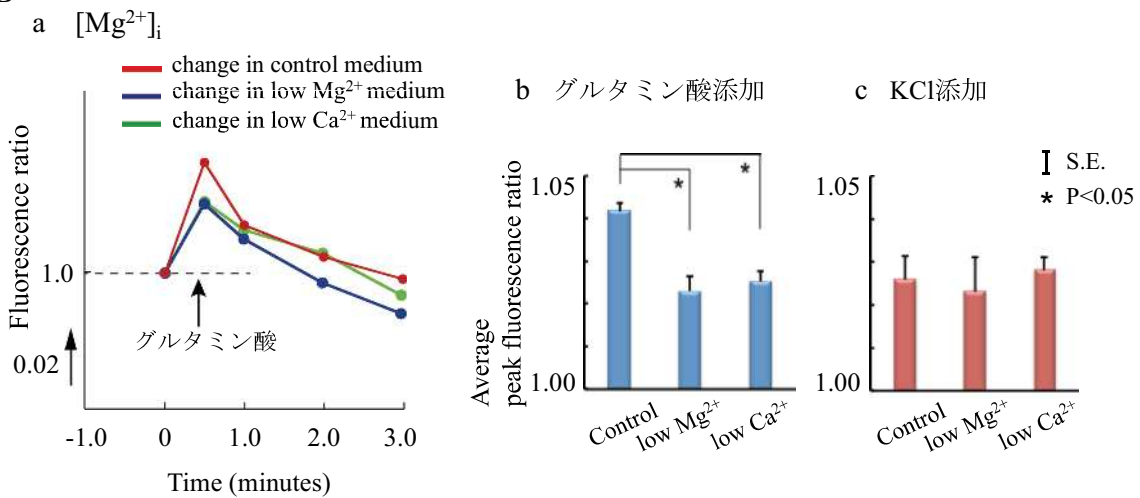


図16 $[Mg^{2+}]_o$ および $[Ca^{2+}]_o$ 減少におけるグルタミン酸およびKCl添加による $[Mg^{2+}]_i$ 測定
 グルタミン酸およびKCl添加による $[Mg^{2+}]_i$ の蛍光変化を示す。試料として培養13-14日目の大脳皮質神経細胞、 Mg^{2+} の蛍光プローブとしてKMG-20-AMを用い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (A) およびフローサイトメトリー (B) により測定した。 $[Mg^{2+}]_o$ および $[Ca^{2+}]_o$ 減少による蛍光変化を測定し、さらに Mg^{2+} および Ca^{2+} のキレート剤としてEDTA、 Ca^{2+} のキレート剤としてBAPTAを用いた場合も測定した(棒グラフの水色および紫)。A、B共にaはグルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の経時的な蛍光変化、b (グルタミン酸添加) およびc (KCl添加) は蛍光変化ピーク値変化分の平均値の棒グラフを示す。(参考文献1より改変)

化のピーク値を変化分として算出し、その平均値を棒グラフとした。A-cはグルタミン酸添加による経時的な $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光変化であり、蛍光変化のピーク値変化分の平均値を棒グラフで示した。A-dは $[Mg^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ の応答変化の速度の違いを示す。グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加は、NMDA受容体阻害剤のMK801および非NMDA受容体阻害剤のCNQXにおいて、減少はしたが有意な差は認められなかったが、代謝型受容体の阻害剤MCPGおよびIP3受容体の阻害剤XeCでは有意に減少した（図17-A-a, b, $p<0.05$ ）。また、ミトコンドリア内に Mg^{2+} がストアされているという報告もあり¹⁷⁾、ミトコンドリアPTP (mPTP) の阻害剤であるCsAで阻害すると、一過性の $[Mg^{2+}]_i$ 増加は有意に抑制された（図17-A-a, b, $p<0.05$ ）。

グルタミン酸添加による一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の増加は、mPTPの阻害剤であるCsAを除く全ての阻害剤において抑制された（図17-A-c, $p<0.05$ ）。しかし、その抑制傾向は $[Mg^{2+}]_i$ 変化とは異なり、MK801およびCNQXによる抑制の方がMCPGおよびXeCの抑制より大きかった。また、 $[Mg^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ の応答変化の速度を比較すると顕著に異なり、 $[Ca^{2+}]_i$ はグルタミン酸添加後、直ちに応答変化を示すが、 $[Mg^{2+}]_i$ は比較的ゆっくりとした変化であった（図17-A-d）。阻害剤による抑制とは逆に、代謝型受容体の活性剤であるDHPGおよびPLCの活性剤であるm-3M3FBSを使用し、グルタミン酸添加による蛍光変化を測定したところ、Controlとの比較で相違は認められなかった（図17-A-a, b, c）。また、フローサイトメトリーによる蛍光変化測定においてもグルタミン酸添加により $[Mg^{2+}]_i$ は一過性に増加し、その増加はMK801、CNQXおよびMCPGで阻害することにより有意に減少した（図17-B-a, b, $p<0.05$ ）。

図18には、 $[Mg^{2+}]_o$ を低濃度にした場合の、グルタミン酸受容体阻害による $[Mg^{2+}]_i$ の蛍光変化を示す。 $[Mg^{2+}]_i$ 蛍光変化は共焦点レーザー蛍光顕微鏡で測定し、図18-Aはグルタミン酸添

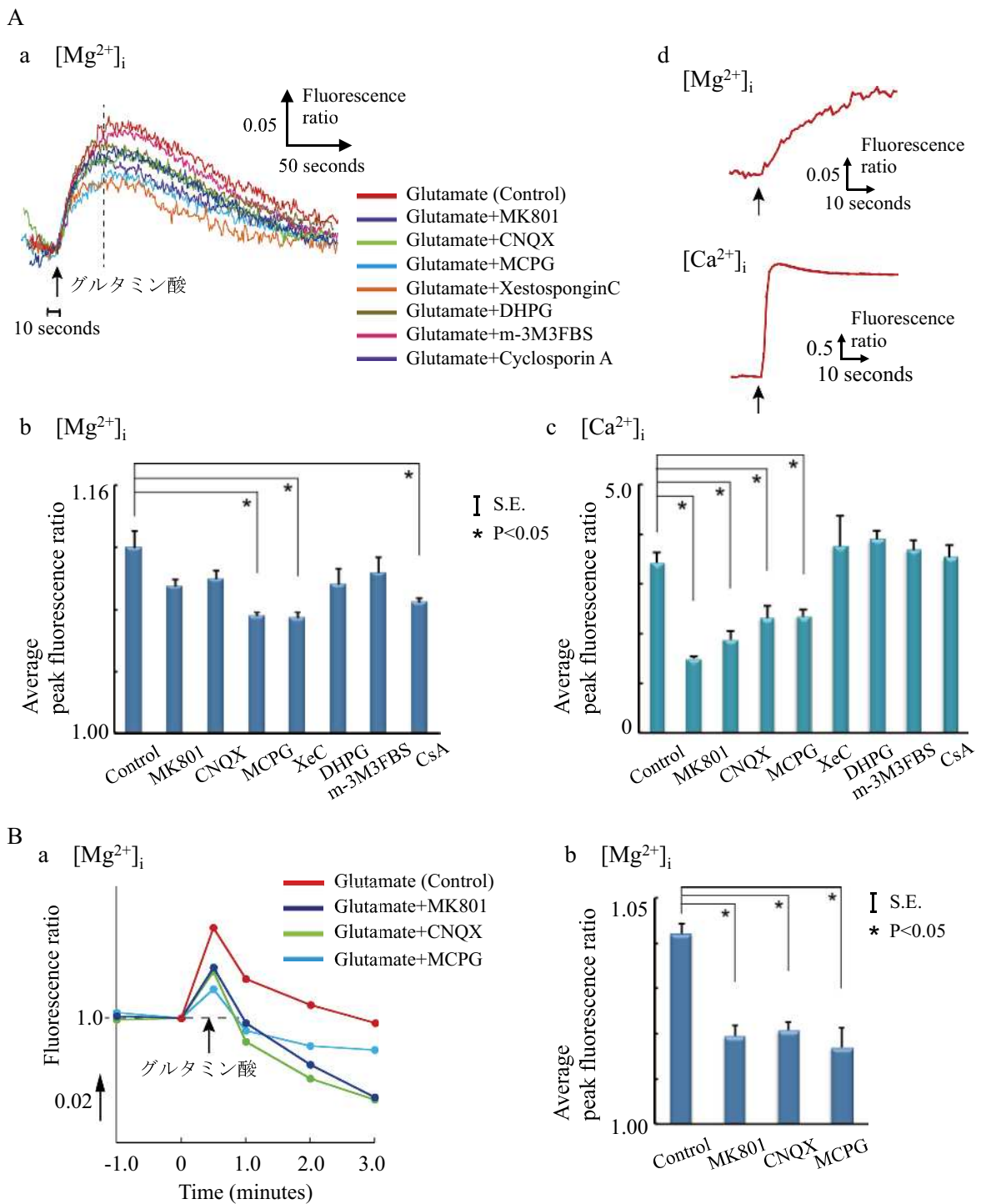
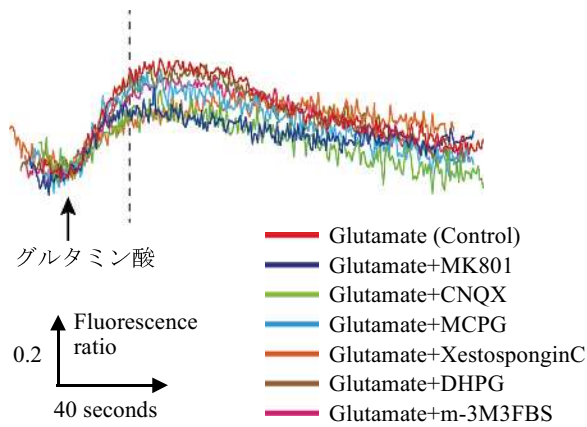


図17 グルタミン酸受容体阻害による $[Mg^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ 測定

グルタミン酸受容体阻害による $[Mg^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光変化を示す。試料として培養13-14日目の大脳皮質神経細胞、 Mg^{2+} の蛍光色素としてKMG-20-AM、Caの蛍光色素としてFluo4-AMを用い、共焦点レーザー顕微鏡 (A) およびフローサイトメトリー (B) により測定した。A、B共にaはグルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の経時的な蛍光変化、bは $[Mg^{2+}]_i$ の蛍光変化ピーク値変化分の平均値の棒グラフ、A-cは $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光変化ピーク値変化分平均値の棒グラフ、A-dは $[Mg^{2+}]_i$ および $[Ca^{2+}]_i$ の応答変化の速度の違いを示す。(参考文献1より改変)

A $[Mg^{2+}]_i$



B $[Mg^{2+}]_i$

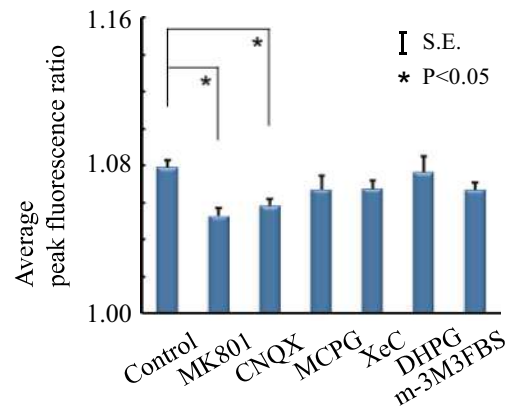


図18 $[Mg^{2+}]_o$ 減少におけるグルタミン酸受容体阻害による $[Mg^{2+}]_i$ 測定

$[Mg^{2+}]_o$ 減少におけるグルタミン酸受容体阻害による $[Mg^{2+}]_i$ の蛍光変化を示す。試料として培養13-14日目の大脳皮質神経細胞、 Mg^{2+} の蛍光プローブとしてKMG-20-AMを用い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡により測定した。Aはグルタミン酸添加による経時的な蛍光変化、Bは $[Mg^{2+}]_i$ の蛍光変化ピーク値変化分の平均値を棒グラフで示す。(参考文献1より改変)

加による $[Mg^{2+}]_i$ の経時的な蛍光変化のグラフ、図18-Bは $[Mg^{2+}]_i$ の蛍光変化ピーク値の変化分の平均値を棒グラフで示す。 $[Mg^{2+}]_o$ が低濃度の場合でも、グルタミン酸添加により $[Mg^{2+}]_i$ は一過性に増加し、その増加は阻害剤MK801およびCNQXにより有意に減少した（図18-A, B, $p<0.05$ ）。

3-4 考察

グルタミン酸添加により $[Mg^{2+}]_i$ は一過性に増加し、その増加は $[Mg^{2+}]_o$ または $[Ca^{2+}]_o$ が低濃度になると減少した。この結果は細胞外からの流入と Ca^{2+} 依存の増加があることを示している。さらに KCl 添加によっても $[Mg^{2+}]_i$ は一過性に増加し、その増加はキレート剤を使用して $[Mg^{2+}]_o$ が低濃度になると減少したことから、電位依存性の Mg^{2+} 流入の経路があることが示唆された。

また、グルタミン酸受容体の阻害剤を用いた実験により、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加は、イオンチャネル型受容体（NMDA 受容体および非 NMDA 受容体）を介した細胞外からの流入および代謝型受容体を介した細胞内小器官からの流出の 2 つの経路があることが認められた。さらに、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加は、代謝型受容体、IP3 受容体および mPTP の阻害剤を使用した抑制の方が大きかったことから、イオンチャネル型受容体を介した細胞外からの流入よりも細胞内小器官からの流出の方が支配的であることが明らかとなった。一方、グルタミン酸添加による $[Ca^{2+}]_i$ の一過性の増加は、代謝型受容体を介した細胞内小器官からの流出よりもイオンチャネル型受容体を介した細胞外からの流入の方が大きいという結果となり、 $[Mg^{2+}]_i$ の場合とは流出入の経路に違いがあること

が確認された。また、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ と $[Ca^{2+}]_i$ の応答速度の違いを比較したところ、 $[Ca^{2+}]_i$ は添加後直ちに变化するのに対し、 $[Mg^{2+}]_i$ は比較的ゆっくりとした応答変化であった。グルタミン酸受容体を介したシナプス伝達について、速いシナプス伝達を担っているのがイオンチャネル型受容体、遅いシナプス伝達を担っているのが代謝型受容体であることが知られており^{8),9)}、この結果からもグルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の変化は、代謝型受容体を介した経路が主であることが確認された。

3-5 まとめ

神経活動における Ca^{2+} の役割に関しては古くから研究されているが、 Mg^{2+} に関する報告はあまり多くない。 Ca^{2+} チャネルの1つとして知られているTRP (Transient receptor potential channel) チャネルの中でもTRPV1, 2, 4, TRPM6, 7は Ca^{2+} よりも Mg^{2+} を良く通すと言われている¹⁸⁾⁻²²⁾が、TRPチャネルの脳内での分布はまだ良くわかっておらず、神経細胞における Mg^{2+} チャネルについての議論もまだ始まったばかりである。

本研究により、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加が確認された。グルタミン酸受容体の阻害剤や低濃度 Mg^{2+} あるいは Ca^{2+} 測定溶液を用いた実験に基づき、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加は、細胞外からの流入と小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官からの流出の2つの経路があることが明らかとなった。さらに $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加は、細胞内小器官からの流出が主要な経路であることが確認された。

最近では、セカンドメッセンジャーとしての Mg^{2+} の機能²³⁾や、 Mg^{2+} が学習や記憶を増強する²⁴⁾などの報告、さらに多発性硬化症などの脱髄疾患にも関与しているという報告²⁵⁾もあり、

神経細胞における Mg^{2+} の重要性が次第に明らかになりつつある。神経活動に関与する Mg^{2+} の生理機能を解明することは、学習および記憶のメカニズム解明に繋がると考えられる。

◆第3章の略語一覧

[Mg²⁺]_i : 細胞内マグネシウム濃度

E18 : 胎生 18 日 (18th embryonic day)

NMDA 受容体 : グルタミン酸のイオンチャネル型受容体

N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartic acid)

AMPA 受容体 : グルタミン酸のイオンチャネル型受容体

α-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサゾール-4-プロピオン酸

(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)

mGluR : グルタミン酸の代謝型受容体 (Metabotropic glutamate receptor)

PLC : ホスホリパーゼ C (Phospholipase C)

IP3 : イノシトール三リン酸 (Inositol 1,4,5-trisphosphate)

IP3R : イノシトール三リン酸受容体 (Inositol 1,4,5-triphosphate receptor)

RyR3 : リアノジン受容体 3 (Ryanodine receptor 3)

G タンパク質 : グアニンヌクレオチド結合タンパク質

VGCC : 電位依存性カルシウムチャネル (Voltage gated Ca²⁺ channel)

LGCC : リガンド感受性カルシウムチャネル (Ligand gated Ca²⁺ channel)

IICR : イノシトール三リン酸によるカルシウム放出 (Inositol trisphosphate induced Ca²⁺ release)

CICR : カルシウム誘発性カルシウム放出 (Ca²⁺ induced Ca²⁺ release)

mPTP : ミトコンドリア膜透過性遷移孔 (Mitochondrial permeability transition pore)

EDTA : Ca²⁺およびMg²⁺キレート剤 (エチレンジアミン四酢酸) (Ethylenediaminetetraacetic acid)

BAPTA : Ca²⁺キレート剤 (ビス 2 アミノフェニルエチレングリコール四酢酸)

(O,O'-Bis(2-aminophenyl)ethyleneglycol-N,N,N',N'-tetraacetic acid, tetrapotassium salt, hydrate)

MK801 : NMDA 受容体の阻害剤 ((+)-MK801 マレイン酸塩、(+)-MK801 maleate) (Dizoclipine

(5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]-cyclohepten-5-10-imine maleate))

CNQX : AMPA およびカイニン酸受容体の阻害剤 (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)

MCPG : 代謝型受容体の阻害剤 ((+)- α -Methyl-4-carboxyphenylglycine)

XeC : IP3 受容体の阻害剤 (Xestospongin C)

m3M3FBS : PLC の活性化剤 (2,4,6-Trimethyl-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]benzenesulfonamide)

DHPG : 代謝型受容体の活性化剤 ((RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycine ((RS)-3,5-DHPG))

CsA : ミトコンドリア膜透過性遷移孔の阻害剤 (Cyclosporine A)

TRP チャネル : Transient receptor potential channel

◆ 第3章の参考文献

- 1) Yuriko Furukawa, Takenori Miyamoto, Keiichi Torimitsu; Glutamate-induced intracellular Mg^{2+} responses in rat cultured cortical neurons. *Journal of Magnesium Research*, 39(1), 37-45, 2020
- 2) Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB; Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA response in spinal cord neurons. *Nature*, 309, 261-263, 1984
- 3) Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochaintz A; Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, 307, 462-465, 1984
- 4) Cheng C, Reynolds I J; Subcellular localization of glutamate-stimulated intracellular magnesium concentration changes in cultured rat forebrain neurons using confocal microscopy. *Neuroscience*, 95(4), 973-979, 2000
- 5) Smith DA, Connick JH, Stone TW; Effect of changing extracellular levels of magnesium on spontaneous activity and glutamate release in the mouse neocortical slice. *Br J Pharmacol*, 97(2), 475-482, 1989
- 6) Y. Suzuki, H. Komatsu, T. Ikeda, N. Saito, S. Araki, D. Citterio, H. Hisamoto, Y. Kitamura, T. Kubota, J. Nakagawa, K. Oka and K. Suzuki; Design and synthesis of Mg^{2+} -selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg^{2+} measurement in a living cell, *Anal Chem*, 74, 1423-1428, 2002
- 7) 龍野 徹、田中 祥裕 ; 神経伝達物質グルタミン酸の受容体と神経細胞死. *化学と生物*, 31(11)、726-734, 1993
- 8) Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF; The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol*

- Rev*, 51(1), 7-61, 1999
- 9) Niswender CM, Conn PJ; Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 295-322, 2010
- 10) Nicholls D, Attwell D; The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci*, 11(11), 462-468, 1990
- 11) Clapham DE; Calcium signaling. *Cell*, 80(2), 259-268, 1995
- 12) Keizer J, Li YX, Stojkovic S, Rinzel J; InsP₃-induced Ca²⁺ excitability of the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 6(8), 945-951, 1995
- 13) Berridge ML; Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1), 13-26, 1998
- 14) Miyakawa T, Mizushima A, Hirose K, Yamazawa T, Bezprozvanny I, Kuroski T, Iino M; Ca²⁺-sensor region of IP₃ receptor controls intracellular Ca²⁺ signaling. *EMBO J*, 20(7), 1674-1680, 2001
- 15) Fukuda J, Yamaguchi K, Akimoto S, Tada Y; NGF-dependent and -independent growth of neurites from sympathetic ganglion cells of the aged human in a serum-free culture. *Neurosci Res*, 2, 460-471, 1985
- 16) Bottenstein JE, Skaper SD, Varon SS, Sato GH; Selective survival of neurons from chick embryo sensory ganglionic dissociates utilizing serum-free supplemented medium. *Exp Cell Res*, 125, 183-191, 1980
- 17) Rutter GA, Osbaldesion NJ, McCormack JG, Denton RM; Measurement of matrix free Mg²⁺ concentration in rat heart mitochondria by using entrapped fluorescent probes. *Biochem J*, 271(3),

627-634, 1990

- 18) Numata T, Kozai D, Takahashi N, Kato K, Uriu Y, Yamamoto S, Kaneko T, Shinmoto T, Mori Y;
Structures and variable function TRP channels. *Seikagaku*, 81(11), 962-983, 2009
- 19) 佐藤 義昭、福田 潤 ; 神経細胞における Mg^{2+} のはたらき. *Clinical Calcium*、医薬ジャーナル社、14 卷 8 号, 50-57、2004
- 20) Clapham DE; TRP channel as cellular sensors. *Nature*, 426, 517-524, 2003
- 21) Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop Jg;
TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. *J Biol Chem*, 279, 19-25, 2003
- 22) Moran MM, Xu H, Clapham DE; TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 14, 362-369, 2004
- 23) Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, Matthews HF, Douek DC, Cohen JI, Uzel G, Su HC, Lenardo MJ; Second messenger role for Mg^{2+} revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature*, 475(7357), 471-476, 2011
- 24) Slutsky I, Abumaria N, Wu LJ, Huang C, Zhang L, Li B, Zhao X, Govindarajan A, Zhao MG, Zhuo M, Tonegawa S, Liu G; Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron*, 65(2), 165-177, 2010
- 25) Kuramoto T, Kuwamura M, Tokuda S, Izawa T, Nakane Y, Kitada K, Akao M, Guenet JL, Serikawa T; A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg^{2+} channel MRS2 results in demyelination in the rat. *PLoS Genet*, 7(1), e1001262, 2011

第4章 微小電極アレイによる神経幹細胞の分化の評価

4-1 はじめに

本章では、ラットの神経幹細胞 (Neural stem cells; NSCs) を試料として、生体親和性の高いポリマーを使った電極を用い、NSCs の分化を生きたまま電氣的に評価することを目的に検討を行った¹⁾。

哺乳類の成体脳では新たに神経細胞が産生されることはないと言われてきたが、近年の脳科学研究において、成体脳でも NSCs および神経前駆細胞 (Neural progenitor cells; NPCs) が産生され、要求に応じて神経細胞やグリア細胞に分化することがわかってきた²⁾。急速な神経再生機構解明の進展とともに、外傷性脳損傷の機能回復や変性疾患の治療のためなど、臨床治療の場でも NSCs 使用の可能性が広く研究されている³⁾。一度移植された NSCs の状態を知ることは非常に困難であり、機能障害回復のためには、NSCs の状態を観察・解析する方法を開発する必要がある。

微小電極アレイ (MEA) を使用した神経細胞の活動電位計測は、非侵襲的で非破壊的なため、活動電位の長期的な観察に使用することができる⁴⁾⁻⁷⁾。また 64 チャンネルの多点計測により、シナプス結合による神経回路のシグナル伝達経路およびシグナル分布の情報を得ることができる⁸⁾。微小電極のように、電極面積が小さくなると電気抵抗が高くなり、S/N 比 (シグナルとノイズの比率) も低下する。その対策として、電極表面を白金黒などで修飾することにより、電気抵抗を少なくする対策が施されてきた。近年では、白金黒などの金属の他に、生体環境下においても電気化学的に安定している導電性高分子を電極として利用する研究が

進んでいる^{9),10)}。

本研究で使用している導電性高分子の PEDOT-PSS (poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate)) と EDOT (ethylenedioxythiophene) の混合物を電気化学的に重合し、多点微小電極に修飾することで、電極へのインピーダンスを縮小し、電気信号の S/N 比を改善することが確認されている¹¹⁾。PEDOT-PSS を修飾することにより、MEA の生体適合性が大幅に改善し、長期的な刺激および観察が可能となった。ラット胎児大脳皮質培養神経細胞の神経回路で誘発された電気信号は、PEDOT-PSS を修飾していない MEA と比較して、PEDOT-PSS を修飾した MEA において非常に安定していた^{11),12)}。

本研究では PEDOT-PSS を修飾した MEA で活動電位を計測することにより、ラット胎児より採取した NSCs の分化および成長を電気生理学的な視点から評価した。さらに、共焦点レーザー蛍光顕微鏡による $[Ca^{2+}]_i$ 変化の蛍光計測やタイムラプス顕微鏡による細胞移動(migration) の計測により、NSCs から分化した神経細胞と大脳皮質神経細胞の比較検討も試みた。

4-2 実験方法

4-2-1 ニューロスフィア (Neurosphere) の培養

ニューロスフィア法は 1992 年に Weiss らが確立した方法¹³⁾で、神経幹細胞の選択的培養法である。神経幹細胞を含む細胞群に増殖因子等を加えることにより、神経幹細胞のみが増殖して細胞塊 (Neurosphere ; ニューロスフィア) となり浮遊する。ニューロスフィアを構成する細胞は主に未分化な NSCs や NPCs ではあるが、NSCs と NPCs の区別も難しく、分化した神経細胞やグリア細胞も含んでいる。NSCs や NPCs を神経細胞やグリア細胞に分化させるに

A 基本培地

濃度	薬品名
	DMEM/F12
0.5 mg/ml	Heparin
100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin	ペニシリン-ストレプトマイシン

B ニューロスフィアの培養液

濃度	薬品名
	基本培地
20 ng/ml	b-FGF
20 ng/ml	EGF
2 %	B-27 supplement

D 大脳皮質神経細胞培養液

濃度	薬品名
	Neurobasal medium
0.074 mg/ml	L-グルタミン
25 µM	グルタミン酸
2 %	B-27 supplement
50 µg/ml	ゲンタマイシン

C 神経幹細胞 (NSCs) の培養液

a 維持・分裂増殖用

濃度	薬品名
	基本培地
2 %	B-27 supplement

b 分化用

濃度	薬品名
	基本培地
50 ng/ml	NGF
50 ng/ml	BDNF
2 %	B-27 supplement

E 測定溶液

濃度	薬品名
148 mM	NaCl
2.8 mM	KCl
2 mM	CaCl ₂
2 mM	MgCl ₂
10 mM	HEPES
10 mM	Glucose

表 2 各溶液の組成 (2)

は、増殖因子非存在下で接着培養することによって誘導できる^{13),14)}。

本研究ではまず、ラット胎児の線条体から NSCs および NPCs を含む細胞を取り出し、NSCs の分裂・増殖を目的としたニューロスフィアの培養を試みた。線条体から採取したニューロスフィアは脳室下帯に存在する NSCs/NPCs に由来する¹⁵⁾。

胎生 16 日目の Wistar ラットから線条体を取り出し、0.05% Trypsin/EDTA (Invitrogen) を用い 37°C で酵素処理した後、遠心分離 (1000 rpm、5 分) およびピペティングで細胞を分散した。細胞の処理には、DMEM/F12 (Invitrogen)、0.5 mg/ml ヘパリン (Heparin, Nacalai) および 100 units/ml ペニシリン-100 µg/ml ストレプトマイシン (Penicillin-streptomycin, Sigma-Aldrich) から成る基本培地を使用した (表 2-A)。細胞濃度を 2×10^7 cells/ml に調整し、2% Pluronic F-127 (Invitrogen) でコーティングした培養皿に播き、37°C、5% CO₂、飽和水蒸気下で 3 日間浮遊培養し、ニューロスフィアを作製した。培養液として 2% B-27 supplement (Invitrogen)、20 ng/ml b-FGF (basic Fibroblast growth factor; 繊維芽細胞増殖因子、R&D System) および 20 ng/ml EGF (Epidermal growth factor; 上皮成長因子、R&D System) を添加した基本培地を使用した (表 2-B)。

4-2-2 神経幹細胞 (NSCs) の培養

幹細胞とは多分化能と自己複製能を持つ細胞のことであり、NSCs は中枢神経を構成する主要な細胞である神経細胞およびグリア細胞 (アストロサイト: astrocyte、オリゴデンドロサイト: oligodendrocyte) を産み出し、分裂による複製ができる能力を持つ細胞である。神経幹細胞は分裂により、まず神経細胞になる神経前駆細胞 (NPCs) とアストロサイトおよびオリゴ

デンドロサイトになるグリア前駆細胞になり、神経細胞やグリア細胞に分化するという順序をたどる。成熟した脳では新たに神経細胞が産生されることはないと言われてきたが、最近の研究では脳室下帯および海馬の歯状回では成体脳においても NSCs が存在し、神経細胞が産生され、移動し、配置されることがわかっている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。

本研究では NSCs および NPCs の分化を評価するために、2つの方法により培養を行った。1つは、NSCs および NPCs の維持・分裂増殖を目的とする培養であり、ポリスチレン結合ペプチドを融合した EGF 溶液 (EGF-PS_t; 1 mg/ml EGF-PS、8 M 尿素、5 mM メルカプトエタノール) で処理した基板で接着培養を行った。NSCs は EGF 受容体を特異的に発現するため、EGF を基板表面に固定することにより NSCs が選択的に接着し、迅速かつ大量に増殖する。4-2-1 で培養したニューロスフィアを 3 日間培養した後回収し、細胞濃度 $2-4 \times 10^6$ cells/ml になるよう調整した後、EGF-PS_t で処理した電極および培養皿 (35 mm ガラスボトムディッシュ、Matsunami) 上に播種し、37°C、5% CO₂、飽和水蒸気下で接着培養を行った¹⁹⁾。培養液として 2% B-27 supplement (Invitrogen) を添加した基本培地を使用した (表 2-C-a)。

もう1つの培養法は、NSCs および NPCs の神経細胞への分化を目的とする接着培養である。4-2-1 で培養したニューロスフィアを回収し、細胞濃度 $2-4 \times 10^6$ cells/ml になるよう調整した後、20 µg/ml ラミニン (Laminin、Sigma-Aldrich) と 100 µg/ml ポリリジン (Poly-D-Lysine、M.W. 70,000-150,000, Sigma-Aldrich) でコーティングした電極および培養皿上に播種し、37°C、5% CO₂、飽和水蒸気下で接着培養を行った。培養液は 2% B-27 supplement、50 ng/ml NGF (Nerve growth factor; 神経成長因子、Alomone labs) および 50 ng/ml BDNF (Brain-derived neurotrophic factor; 脳由来神経成長因子、Wako) を添加した基本培地を使用した (表 2-C-b)。

4-2-3 大脳皮質神経細胞培養

胎生 18 日目の Wistar ラットから大脳皮質を取り出し、2.5 mg/ml トリプシンで酵素処理をした後、遠心分離（1000 rpm、5 分）およびピペッティングにより細胞を分散し、細胞懸濁液を作製した。50 μm フィルターで濾過した後、 $1\text{-}5 \times 10^6$ cells/ml になるよう調整し、20 $\mu\text{g/ml}$ ラミニンおよび 100 $\mu\text{g/ml}$ ポリリジンでコーティングした培養皿上に播種し、37°C、5% CO_2 、飽和水蒸気下で接着培養を行った。培養液は 0.074 mg/ml L-グルタミン（L-glutamine、Sigma-Aldrich）、25 μM グルタミン酸（Glutamate、Sigma-Aldrich）、50 $\mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシン（Gentamycin、Invitrogen）および 2% B-27 supplement（Invitrogen）を添加した Neurobasal medium（Invitrogen）を使用した（表 2-D）。

4-2-4 免疫染色

本研究では、NSCs の分化の状態を免疫染色により確認した。NSCs を 4、10、22 日間培養した後、4% パラホルムアルデヒド（Paraformaldehyde、Sigma-Aldrich）を用い、15 分間、固定した。一次抗体として、NSCs には Nestin 抗体（R&D systems）、神経細胞には Tubulin 抗体（class III-tubulin, Convance）およびグリア細胞の 1 つであるアストロサイトには GFAP 抗体（Merk Millipore）を各々 200-1,000 倍希釈で使用した。Nestin はクラス VI の中間径フィラメントの 1 つで、胚発生過程の初期において中枢神経系の幹細胞などで発現し、分化が進むにつれ消失するため、神経幹細胞や神経前駆細胞のマーカーとして用いた。Tubulin は微小管を構成するタンパク質で神経系に広く分布しており神経軸索内に多く見られるため、神経細胞の

マーカーとして用い、GFAP (グリア細胞繊維性酸性タンパク質、Glial fibrillary acidic protein) はグリア細胞の主成分でありアストロサイトに特異的に存在するため、グリア細胞のマーカーとして用いた。二次抗体には各々、Alexa Fluor 蛍光標識抗体 (488/546/633 nm、Invitrogen) を 400 倍希釈で使用し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (LSM510-META、Carl Zeiss) で観察した。統計処理には平均値の信頼性を示す標準誤差を用い、検定は Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を有意水準 0.05 で行った。

4-2-5 細胞移動 (migration) の観察

脳が形成されるためには、神経細胞の基となる NSCs および NPCs が産生された場所から特定の領域に移動し、正しく配置される必要がある。中枢神経系の場合も、神経細胞が産生される部位と、配置されて実際に機能する部位とが異なる。特に大脳皮質を構成する興奮性神経細胞と抑制性神経細胞については研究が進んでおり、大脳皮質神経細胞の約 8 割を占める興奮性神経細胞は脳室近くで誕生した後すぐには移動を開始せず、多数の突起を伸縮させながら長時間留まった後、脳表面へ放射状方向 (縦方向) に移動することがわかっている²⁰⁾。

本研究では NSCs と大脳皮質神経細胞の細胞移動を、生細胞タイムラプスイメージング顕微鏡 (Biostation IM-Q, Nikon) で観察した。生細胞タイムラプスイメージング顕微鏡は、顕微鏡にインキュベータと同等の機能が備わっているため、生きたままの細胞の動態を長時間観察できる。3 分毎に 1 フレームの頻度で画像を取り込み、培養 2-3 日で 20 時間観察した。細胞の移動距離は動画から動きをトレースすることで計測し、20 時間で動いた長さで比較した。統計処理には平均値の信頼性を示す標準誤差を用い、検定は Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を

有意水準 0.05 で行った。

4-2-6 KCl 添加による $[Ca^{2+}]_i$ の測定

KCl 添加による $[Ca^{2+}]_i$ 変化は共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (LSM510 META、Carl Zeiss) で観察した。培養 13-14 日目の NSCs と大脳皮質神経細胞を用い、 Ca^{2+} 蛍光プローブである 10 $\mu\text{g/ml}$ Fluo4-AM (Ex=494 nm, Em=516 nm, Molecular Probe) を 1 時間、染色した。50 mM KCl を添加することによる $[Ca^{2+}]_i$ の濃度変化を、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で蛍光強度変化として 1 秒毎に経時的に測定した。測定には HEPES を含む測定溶液 (表 2-E) を使用した。

4-2-7 導電性高分子を修飾した微小電極アレイ (MEA) による電気計測

神経細胞の自発の活動電位は 64 チャンネル微小電極用刺激・計測装置 (周波数帯域: 100-10 kHz) を用いて、培養 3-14 日目で計測した⁸⁾ (図 4 参照)。MEA は、マスクパターンを基板上に転写するフォトリソグラフィ技術により作製する (図 3 参照)。ガラス基板上に ITO (Indium tin oxide) を蒸着し、エッチングにより電極パターンを形成した後、電極基板表面をシリコン由来の 0.5 μm 厚フォトレジストにより、微小電極部を除き絶縁膜を形成した。今回使用した MEA は、1 辺が 20 μm の正方形の ITO からなる電極が 8x8 に配列して構成されており、電極間の間隔は 70 μm である。

導電性高分子による多点微小電極の修飾は、PEDOT-PSS (H.C. Stark Japan) と EDOT (Bayer Japan) の混合物を、電気化学的に重合することにより行った。これにより、周波数 1 kHz で約 270 k Ω であった ITO 電極のインピーダンスは、5-10 k Ω に低減することができた。計測デ

ータはアンプ（周波数帯域 100-10kHz）で増幅され、NI PCI-4472（National Instruments Corp.）の A/D コンバータを介し、LabVIEW（National Instruments Corp.）により、サンプリング周波数 20kHz でデジタル化した。64 チャンネルのうち 63 チャンネルは活動電位計測に使われ、残り 1 チャンネルは信号記録のトリガーとして使用した¹⁾。

1 つの微小電極から計測された活動電位は、単独もしくは複数の信号が混在している可能性があるため、特定のアルゴリズムにより信号を分離する必要がある。さらに異なる微小電極から計測された電気信号が、同一の神経細胞由来の信号なのか複数の神経細胞由来の信号なのかを相互相関ヒストグラムにより分離しなければならない。

まず、測定された電気信号において閾値を設定し、それ以上に電位が変動した場合に活動電位が生じたとして、その時間を記録した。検出された自発的な活動は主成分分析²⁾に基づき、offline Sorter（オフラインスパイクソートソフトウェア、Plexon Inc.）を用いて相互相関解析を行い、神経細胞由来の活動電位（波形）を分離した。微小電極上に複数の神経細胞が存在する場合、電気信号には複数の神経細胞由来の活動電位が重なる。この時、微小電極と神経細胞との接触の程度および位置関係により活動電位の波形はそれぞれ異なるため、EM アルゴリズム（Expectation-maximization algorithm）に基づき、1 つの微小電極で計測された活動電位を神経細胞毎に分離した。EM アルゴリズムは、不完全なデータの集合を取り扱える統計法で、観測できるデータと観測できないデータが存在する場合に最尤推定を行うための手法である。期待値最大化法とも呼ばれ、期待値（expectation）と最大化（maximization）を交互に繰り返し計算することで求められる。観測した X のデータを最も良く説明しうるパラメータを探すことで、観測した任意の X に対する最尤推定値を求めることができる。

次に、異なる微小電極により計測された活動電位の時系列データを、相互相関を解析することにより神経細胞毎に分離した。異なる 2 つの微小電極で計測された活動電位には同一の神経細胞由来のもの、異なる神経細胞由来のものが想定される。異なる神経細胞由来の場合、その 2 つの神経細胞が相互相関を有する場合と有しない場合に分けられる。さらに神経細胞には興奮性および抑制性の結合があるため、正および負の相関が存在する。従って異なる 2 つの微小電極で計測された活動電位同士には 4 種類の相互相関が想定される。この相互相関を表す指標として相互相関ヒストグラム (cross-correlogram) があり、1 つの神経細胞由来の活動電位が発火した時間を基準として、もう 1 つの神経細胞由来の活動電位の数を、時間のずれを指標としてヒストグラムにしたものである。この相互相関ヒストグラムにより、2 つの電極から得られた電位データの相関関係を解析し、相関の有無を判断する。

4-3 実験結果

4-3-1 NSCs の免疫染色

図 19 に培養した NSCs の免疫染色の結果を示す。図 19-A は分化を目的に 50 ng/ml NGF および BDNF を添加して培養した NSCs (a) と維持・増殖を目的に EGF-PS_t 処理を施した基板で培養した NSCs (b) の培養 10 日目の培養結果である。共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察し、左は蛍光像 (Nestin および Tubulin)、右は透過像を示す。図 19-A-a は神経細胞を標識する Tubulin (赤) で染まる細胞が多く、分化が促進されたことが確認され、図 19-A-b は NSCs および NPCs を標識する Nestin (緑) で染まる細胞が多く、未分化の状態が維持されていることが確認された。図 19-A-c は A-a および A-b の結果について、免疫染色で染まった細胞数の割

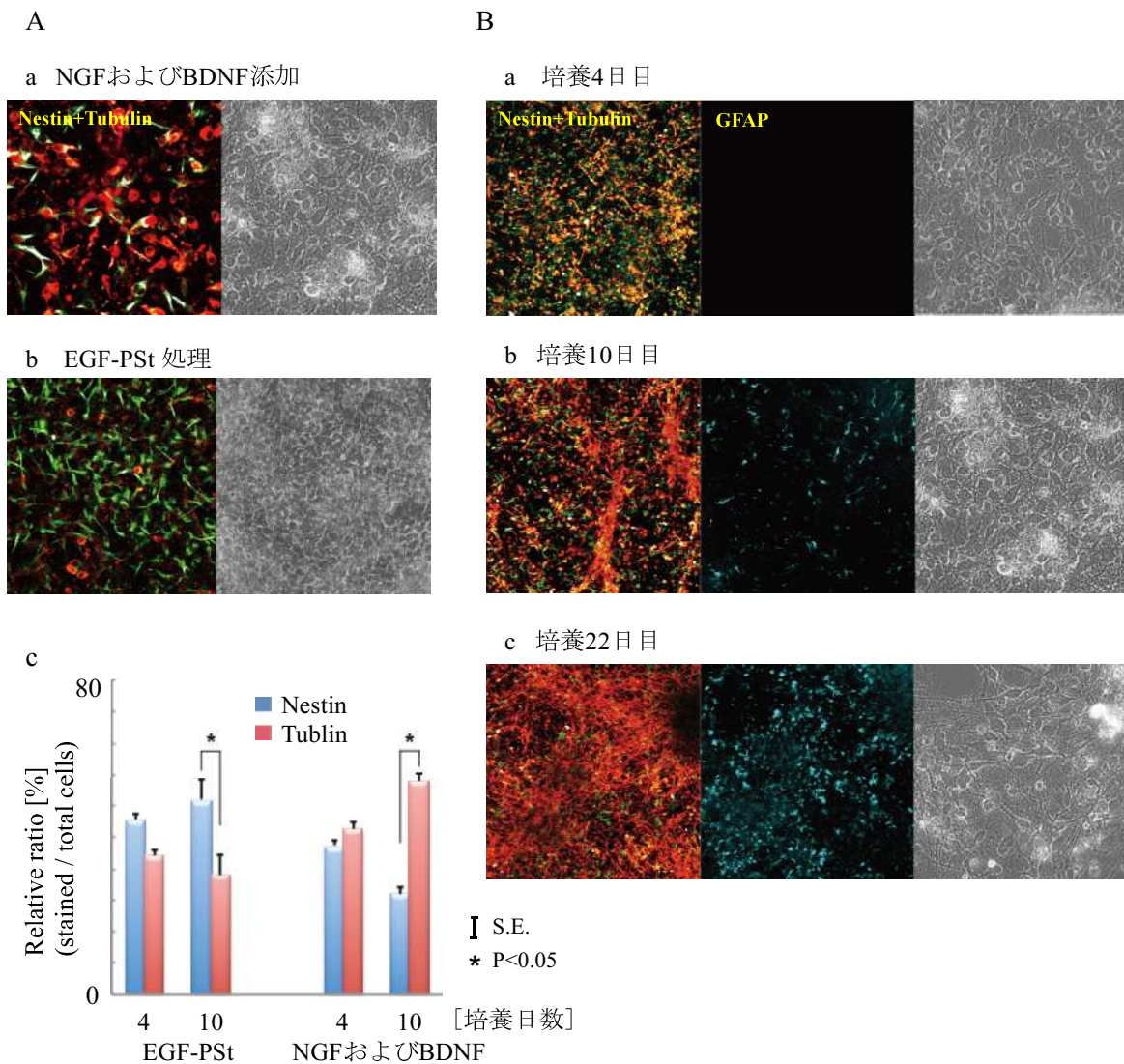


図19 神経幹細胞 (NSCs) の免疫染色

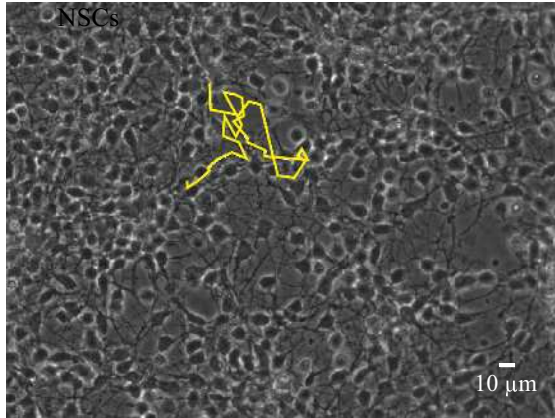
NSCs培養の免疫染色の結果を示す。A-aはNGFおよびBDNFを添加して培養したNSCs、A-bはEGF-PS_t処理した基板で培養したNSCsの免疫染色である。10日間培養した後、Nestin抗体（緑、NSCs/NPCsのマーカ）およびTubulin抗体（赤、神経細胞のマーカ）で染色した。A-cはA-a, bにおいて染色された細胞の割合を4日目と10日目で比較したグラフである。BはNGFおよびBDNFを添加した細胞について、4 (a)、10 (b)、22 (c)日目で染色した結果である。左はNestin抗体とTubulin抗体の二重染色、真中はGFAP抗体（水色、グリア細胞のマーカ）、右は透過像を示す。（参考文献1より改変）

合を示したグラフであり、A-a, b 各々の培養細胞について、Nestin (棒グラフ/青) と Tubulin (棒グラフ/赤) で染色された細胞数の割合を培養 4 日目と 10 日目で比較している。EGF-PSi で処理した基板で培養した NSCs は Nestin で染色された細胞が多く、特に培養 10 日目で有意な差が認められた (図 19-A-c, 左グラフ、 $p<0.05$)。NGF および BDNF を添加して培養した NSCs は Tubulin で染色された細胞が多く、特に培養 10 日目で有意な差が認められ (図 19-A-c, 右グラフ、 $p<0.05$)、既に培養 4 日目で分化が始まっていることが示唆された。図 19-B は分化を目的とした NGF および BDNF を添加して培養した NSCs において、培養日数毎の免疫染色の結果を示す。図 19-B-a は培養 4 日目、B-b は培養 10 日目、B-c は培養 22 日目の蛍光像と透過像で、各々左は Nestin (緑) と Tubulin (赤)、真中は GFAP (水色)、右は透過像を示す。培養が進むにつれ分化が進み、培養 22 日目ではほとんどの細胞が神経細胞に分化したことが確認された。GFAP に標識されたグリア細胞も増加したが、この系ではグリア細胞に比べ、神経細胞の割合が多い神経回路を形成したことが示唆された。

4-3-2 NSCs および大脳皮質神経細胞の細胞移動 (migration) 計測

図 20 は NSCs と大脳皮質神経細胞の細胞移動の状態を示している。図 20-A が NSCs、B が大脳皮質神経細胞の細胞移動を示しており、培養 2-3 日目における 20 時間の様子を、生細胞タイムラプスイメージング装置 (Biostation、Nikon) で観察した。写真中の黄線は細胞移動の軌跡を示す。図 20-C は軌跡の距離の平均値を NSCs および大脳皮質神経細胞で比較したグラフである。NSCs の細胞移動の平均距離が $335.37\pm 14.91 \mu\text{m}/20\text{h}$ であるのに対し、大脳皮質神経細胞は $86.23\pm 6.60 \mu\text{m}/20\text{h}$ であり、NSCs の方が約 4 倍長かった ($n=20$ 、 $p<0.05$)。NSCs は

A 神経幹細胞 (NSCs)



B 大脳皮質神経細胞

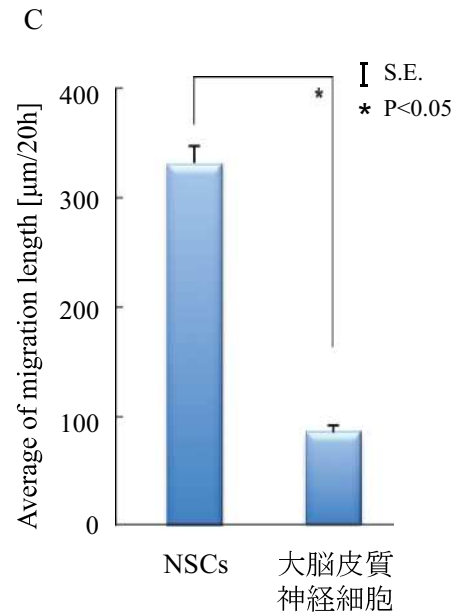
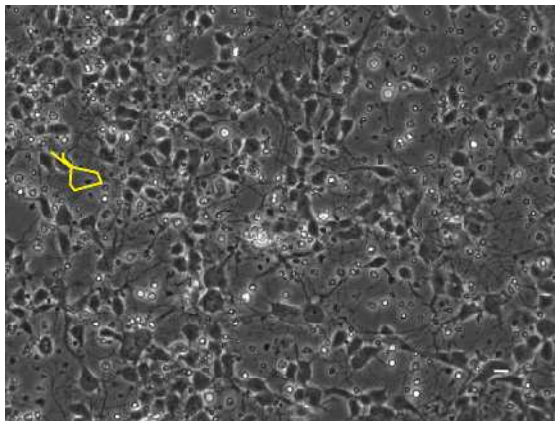


図20 神経幹細胞 (NSCs) と大脳皮質神経細胞の細胞移動 (migration)

NSCsと大脳皮質神経細胞の細胞移動の状態を示す。AがNSCs、Bが大脳皮質神経細胞の細胞移動であり、培養2-3日目における20時間の様子を生細胞タイムラプスイメージング装置 (Biostation、Nikon) で観察した。写真中 (A, B) の黄線は細胞移動の軌跡を示す。Cは細胞移動の軌跡の距離の平均値をNSCsおよび大脳皮質神経細胞で比較したグラフである。NSCsの細胞移動の平均距離が $335.37 \pm 14.91 \mu\text{m}/20\text{h}$ であるのに対し、大脳皮質神経細胞は $86.23 \pm 6.60 \mu\text{m}/20\text{h}$ であり、NSCsの方が約4倍長かった ($n=20$, $p<0.05$)。 (参考文献1より改変)

A 神経幹細胞 (NSCs)

B 大脳皮質神経細胞

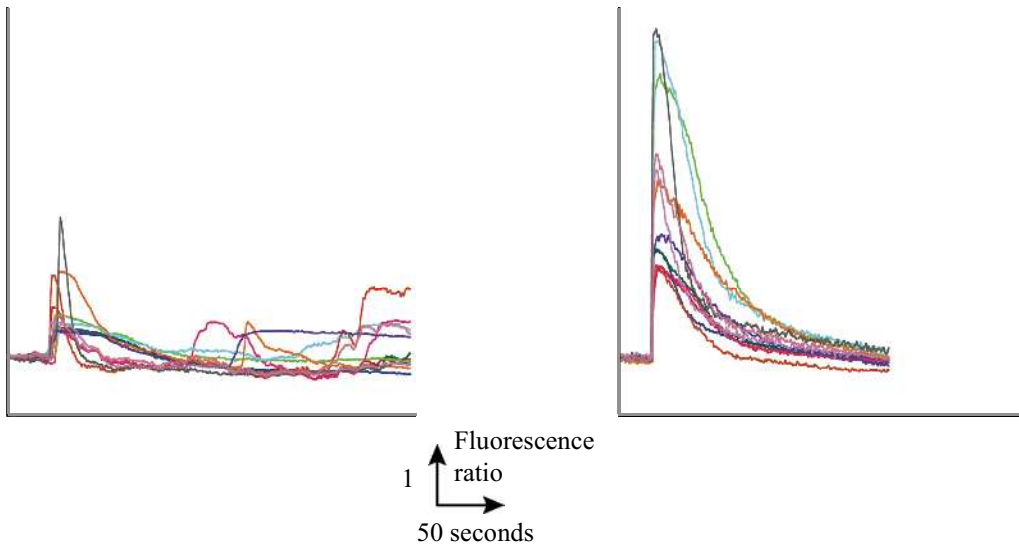


図21 KCl添加によるNSCsおよび大脳皮質神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変化

KCl添加によるNSCs (A) および大脳皮質神経細胞 (B) の $[Ca^{2+}]_i$ 変化の代表例を示す。各細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を色別に示している。NSCsはNGFおよびBDNFを添加して培養した細胞を使用した。 Ca^{2+} の蛍光プローブとしてFluo4-AMを用い、培養11-12日目の細胞を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で測定した。
(参考文献1より改変)

活発に動き回るが、大脳皮質神経細胞はその場で留まっている細胞が多かった。

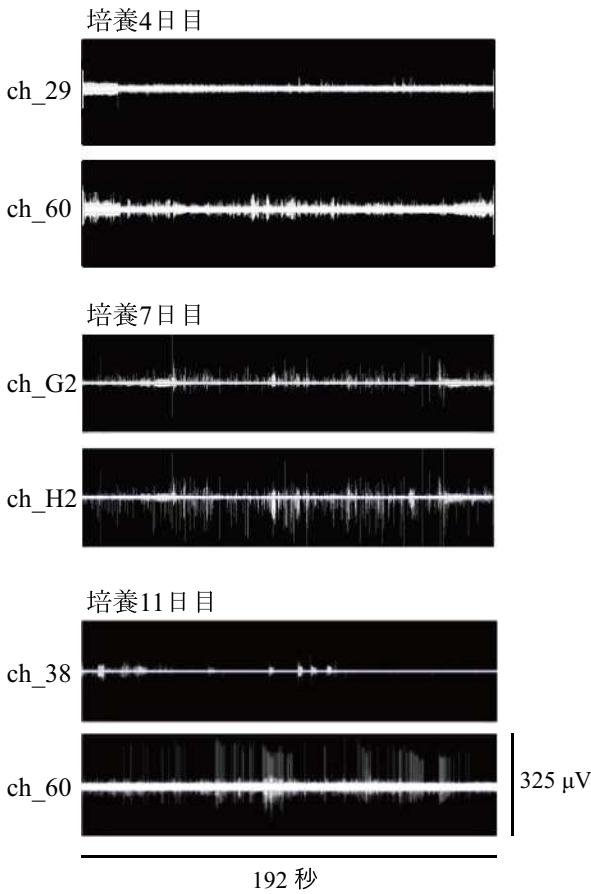
4-3-3 KCl 添加による NSCs および大脳皮質神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 測定

図 21 に、培養 11-12 日目の NSCs (A) および大脳皮質神経細胞 (B) において、50 mM KCl 添加による $[Ca^{2+}]_i$ の変化を、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で測定した結果を示す。図 21-A, B 共に、各細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を、色別に示している。KCl 添加により、 $[Ca^{2+}]_i$ は一過性に増加する。 $[Ca^{2+}]_i$ 変化は大脳皮質神経細胞においては一様に著しく増加するが、NSCs においては $[Ca^{2+}]_i$ 変化にバラツキが認められ、NSCs の分化により構築された神経回路は 1 種類ではなく、成熟段階の異なる数種類の細胞の存在が示唆された。

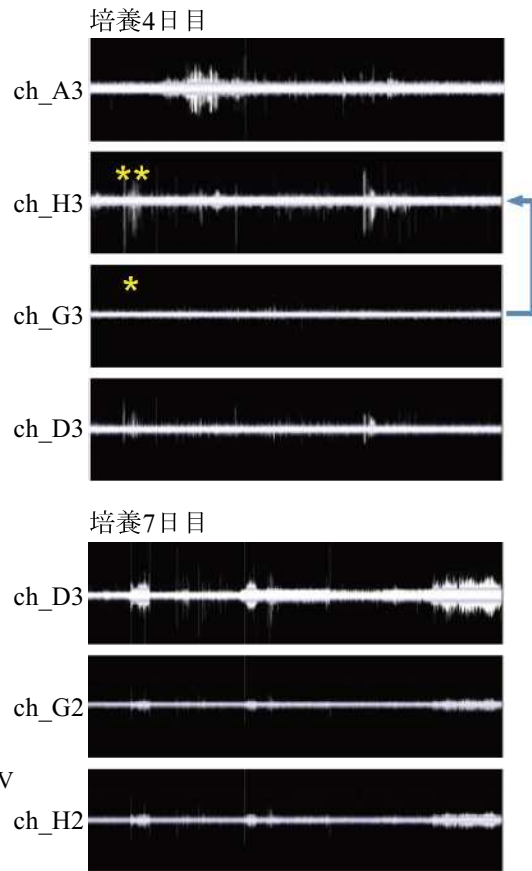
4-3-4 導電性高分子を修飾した MEA による NSCs の活動電位計測

図 22 に、EGF-PSSt 処理した基板で培養した NSCs (A) および NGF と BDNF を添加して培養した NSCs (B) の自発的な活動電位の計測および解析結果を示す。PEDOT-PSS を修飾した 64 チャンネル MEA 上で、NSCs を 4-11 日間培養した。電位データ (図 22-A, B) のスケールは x 方向が 192 秒、y 方向が 325 μ V である。図 22-D は活動電位の測定例であり (64 チャンネル)、図 22-A, B に示す各電位データは、図 22-D に示すような 64 個の電位データから抜粋したものである。NGF および BDNF を添加して培養した NSCs (図 22-B) の活動電位の計測結果より、培養 4 日目から分化した神経回路に見られる同期した活動電位が観察された。一方、EGF-PSSt 処理をした基板で培養した NSCs (図 22-A) では、分化せず NSCs の状態が維持されているため、培養 11 日目まで分化した神経回路のような同期した活動電位は認められ

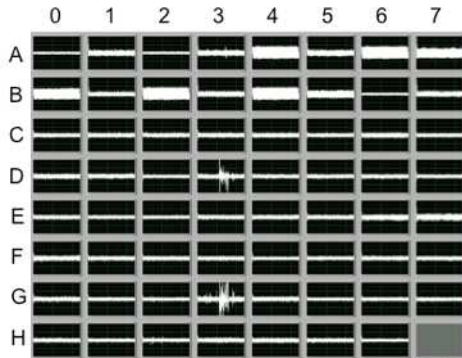
A EGF-PSt 処理



B NGFおよびBDNF添加



D 計測された活動電位の例 (64チャンネル)



C Synaptic connection observed

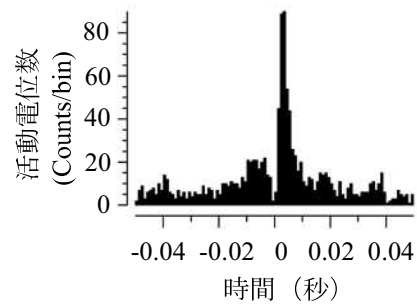


図22 神経幹細胞 (NSCs) の自発的な活動電位

EGF-PStで処理した基板で培養したNSCs (A) およびNGFとBDNFを添加して培養したNSCs (B) の自発的な活動電位の計測結果を示す。AおよびBは各チャンネルでの活動電位データであり、スケールはx方向が192seconds、y方向が325 μ Vである。NSCsはPEDOT-PSSを修飾した64チャンネルMEA上で4-11日間培養した。Cは2つの微小電極間の活動電位の相互相関ヒストグラムを活動電位数 (縦軸) と時間 (横軸) で示しており、B-培養4日目の (*) と (**) の関連性を表している。Dは計測された64チャンネルの活動電位の例を示しており、AおよびBの電位データはDに示すような64個の活動電位データからの抜粋である。

(参考文献 1 より改変)

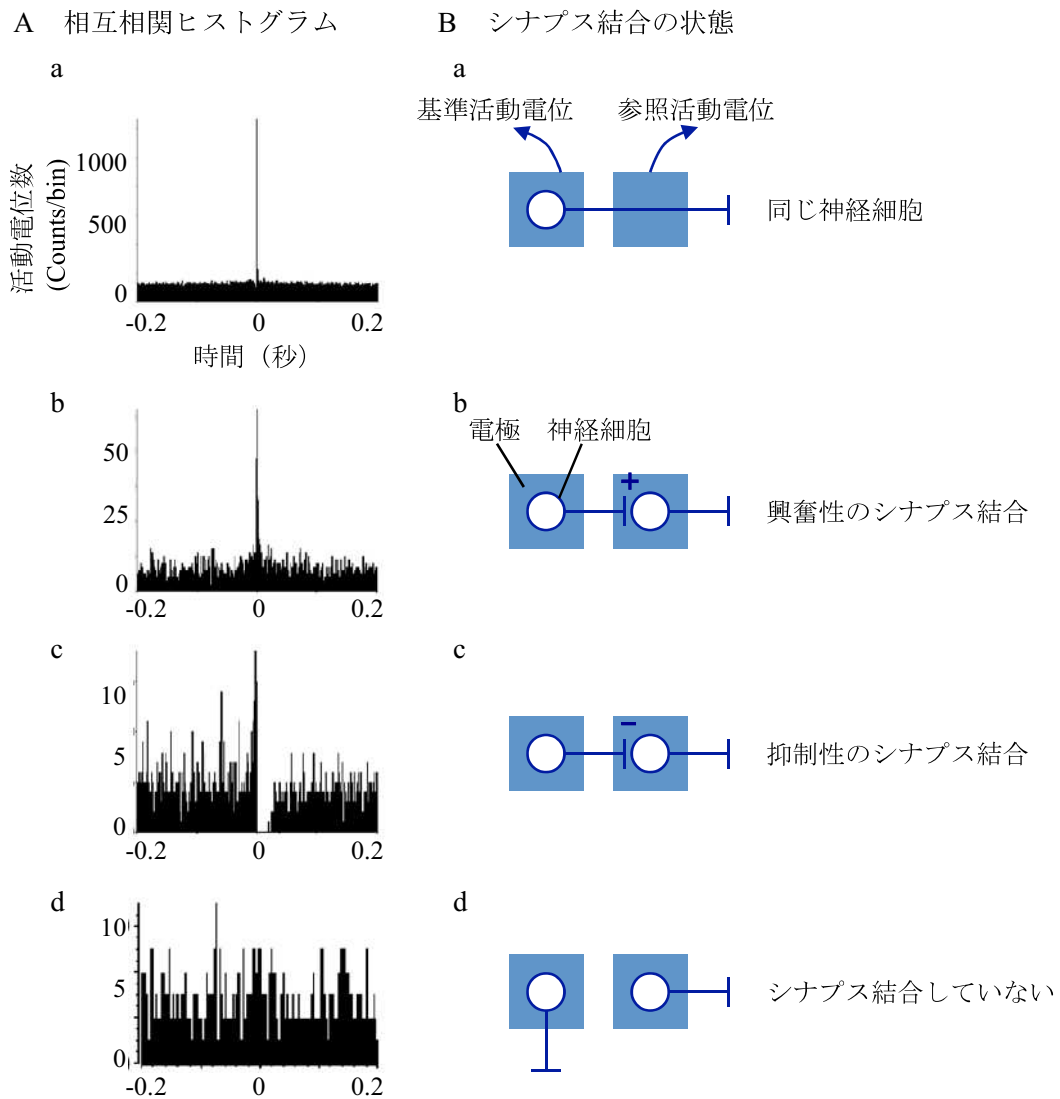


図23 相互相関ヒストグラム (cross-correlogram) とシナプス結合

相互相関ヒストグラム (A) と神経細胞のシナプス結合 (B) の関係性を示す。Bの左の電極で計測された活動電位の発火時間を基準 (基準活動電位) とし、右の電極で計測された活動電位の発火 (参照活動電位) を前後200ミリ秒に亘って解析したのがAの相互相関ヒストグラムである。相互相関ヒストグラムより推測されるシナプス結合は大きく分けて4種類あり (B)、同じ神経細胞の活動電位 (a)、興奮性のシナプス結合 (b)、抑制性のシナプス結合 (c)、シナプス結合していない (d) の4つである。 (参考文献 22 より改変)

なかった。

微小電極から得られた活動電位を、4-2-7 で記述した offline Sorter および EM アルゴリズムに基づいて相互相関を解析した結果、NGF および BDNF を添加して培養した NSCs の活動電位は、電極間で相関関係が認められる結果が得られた (図 22-B *および**、図 22-C)。図 22-C は 2 つの微小電極の活動電位から作製した相互相関ヒストグラムであり、図 23 に相互相関ヒストグラム (A) と神経細胞のシナプス結合 (B) の関係性を示す。図 23 の相互相関ヒストグラム (A) は、図 23-B における左の電極 (基準) が活動電位を発火した時間を基準として、右の電極 (参照) が活動電位を発火した、前後 200 ミリ秒の活動電位の変化を示しており、縦軸は活動電位の数、横軸は時間である。相互相関ヒストグラムより推測されるシナプス結合の種類は大きく分けて 4 種類ある (図 23-B)。図 23-A-a の相互相関ヒストグラムは、0-1 ミリ秒において急峻なピークを有しており、これは基準および参照活動電位の発火時間のずれが 1 ミリ秒以内であり、ずれがほとんどないことを示している。従って図 23-A-a の相互相関ヒストグラムは、同じ神経細胞の活動電位を計測していると考えられる (B-a)。図 23-A-b の相互相関ヒストグラムは、基準活動電位が発火してから数ミリ秒以内に参照活動電位がピークを示しており、図 23-A-a よりも発火タイミングが遅く、興奮性シナプス結合を介して情報が伝達されていると想定される (B-b)。図 23-A-c は基準活動電位が発火後、数十ミリ秒に亘って参照活動電位が抑えられていることから、抑制性シナプス結合を介した情報伝達と考えられる (B-c)。図 23-A-d は相互相関ヒストグラムが平坦になっており、基準活動電位と参照活動電位の発火が独立していることを示しており、シナプス結合をしていないと推測される (B-d) ²²⁾。

図 22-C は 2 つの微小電極間の活動電位の相互相関ヒストグラムを活動電位数と時間で示しており、図 22-B-培養 4 日目の (*) と (**) の関連性を表している。図 23 を参考に、基準活動電位 (図 22-B-培養 4 日目-ch_G3-*) が発火した時間の前後 40 ミリ秒における参照活動電位 (図 22-培養 4 日目-ch_H3-**) を解析し、相互相関ヒストグラムを作製したところ、数ミリ秒以内に急峻なピークを示すことが確認された (図 22-C)。これは基準活動電位 (*) および参照活動電位 (**) の発火時間のずれが数ミリ秒以内の正の遅れであり、図 23-A-b と類似している。従って、図 22-B 培養 4 日目の ch_G3 と ch_H3 は興奮性シナプス結合を介して情報が伝達されていると推測され、NGF および BDNF を添加して培養した NSCs は、培養 4 日目で既にシナプス接続を形成していることが確認された。

4-4 考察

免疫染色の結果、EFG-PSI 処理で培養した NSCs は、Nestin 陽性細胞が有意に多く NSCs の状態が維持されていたが、NGF および BDNF を添加して培養した NSCs は、Tubulin 陽性細胞が有意に多く、神経細胞に分化したことが確認された。

PEDOT-PSS を修飾した MEA での培養 4 日目の活動電位を見ると、EGF-PSI 処理した基板で培養した NSCs ではランダムで無秩序な活動電位を示しており (図 22-A)、NGF および BDNF を添加して培養した NSCs は、分化した神経回路に見られる活動電位が観察された (図 22-B)。大脳皮質培養神経細胞では、培養 3 日目にはランダムな電気信号が観察され始め、4 日目辺りから同期した活動電位に変化することが報告されている⁴⁾。NGF および BDNF を添加して培養した NSCs は、培養 4 日目から同期した活動電位が測定されており、分化した神経回路

の活動電位と非常に良く似ている。一方、EFG-PSt 処理した基板で培養した NSCs でも培養 11 日目では同様の活動電位が認められており、この理由として 2 つのことが推測される。1 つは、神経細胞の数が少ない場合、神経回路を構成するシナプス接続のために長い伸張が必要で時間がかかるということ、もう 1 つは図 20 に示すように、NSCs は大脳皮質培養神経細胞よりも細胞移動が活発で広い範囲を移動するため、繁雑でランダムな発火が交錯している可能性があり、MEA で適切な活動電位を計測するのが困難であるということである。さらに図 21 に示すように、NSCs において KCl 添加による $[Ca^{2+}]_i$ 変化は大脳皮質培養神経細胞の応答とは明らかに異なっており、NGF および BDNF の添加は NSCs を神経細胞に分化させるが分化した神経細胞は均一になっておらず、成熟に至るまでの様々な段階の細胞が含まれており、細胞の不均一が活動電位の違いをもたらしていると考えられる。

NSCs や NPCs は本来あるべき場所から遠く離れた場所で誕生し、短期間に的確な場所へ移動することは一般的に良く知られている。最近の研究では、様々な細胞の接線方向やランダムな動きの違いなど細胞移動の性質に焦点をあてた報告もある²³⁾⁻²⁵⁾。本研究では非常に未熟な細胞（胎生 16 日目）を使用したこともあり、細胞の種類を特定した上での成長過程における動きを追跡することは困難であった。しかしながら、細胞の種類と MEA での電気信号を関連づけるのは興味深いことである。神経回路形成に影響を与える神経細胞の挙動を理解するには、さらに研究が必要であると思われる。

4-5 まとめ

PEDOT-PSS を修飾した MEA での活動電位計測により、NSCs から神経細胞に分化し、神

経回路が構築されたことが明らかとなった。分化が不十分な NSCs の場合、神経細胞の数も少ないため神経回路の形成にも時間がかかり、同期した電気信号も観察されない。また、細胞が活発に動き回るため適切な信号を計測することが難しく、ランダムな電気信号を示したと思われる。一方、NSCs が分化し神経細胞が多くなれば、分化した神経回路に見られる一般的な活動電位と同様の活動電位が計測される。

NSCs の分化の段階を確認するにはさらなる研究が必要だが、MEA の活動電位データを解析することにより、分化の過程における細胞の状態を知ることができるようになり、 Mg^{2+} が NSCs の成長に関与している可能性も検討できると思われる。PEDOT-PSS を修飾した MEA での計測は、非侵襲性、非破壊的、そして高い生体適合性により、細胞が生きたままの連続測定を可能にしており、染色を必要としない、製薬分析の初期および予備段階での有用なツールになると考えられる。

◆第4章の略語一覧

NSCs : 神経幹細胞 (Neural stem cells)

NPCs : 神経前駆細胞 (Neural progenitor cells)

MEA : 微小電極アレイ (Micro electrode array)

PEDOT-PSS : Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate)

EDOT : Ethylenedioxythiophene

DMEM/F12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12、培地

b-FGF : 繊維芽細胞増殖因子 (basic Fibroblast growth factor)

EGF : 上皮成長因子 (Epidermal growth factor)

GFAP : グリア細胞繊維性酸性タンパク質 (Glial fibrillary acidic protein)

NGF : 神経成長因子 (Nerve growth factor)

BDNF : 脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor)

ITO : 酸化インジウムスズ (Indium tin oxide)

EM アルゴリズム : Expectation-maximization algorithm

◆第4章の参考文献

- 1) Yuriko Furukawa, Akiyoshi Shimada, Koichi Kato, Hiroo Iwata, Keiichi Torimitsu; Monitoring neural stem cell differentiation using PEDOT-PSS based MEA. *Biochim Biophys Acta*, 1830(9), 4329-4333, 2013
- 2) Temple S; The development of neural stem cells. *Nature*, 414, 112–117, 2001
- 3) Nakajima M, Ishimuro T, Kato K, Ko IK, Hirata I, Arima Y, Iwata H; Combinatorial protein display for the cell-based screening of biomaterials that direct neural stem cell differentiation. *Biomaterials*, 28, 1048-1060, 2007
- 4) Kamioka H, Maeda E, Jimbo Y, Robinson HP, Kawana A; Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neurosci Lett*, 206, 109-112, 1996
- 5) Mistry SK, Keefer EW, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL; Cultured rat hippocampal neural progenitors generate spontaneously active neural networks. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 1621–1626, 2002
- 6) Ban J, Bonifazi P, Pinato G, Broccard FD, Studer L, Torre V, Ruaro ME; Embryonic stem cell-derived neurons form functional networks in vitro. *Stem Cells*, 25, 738–749, 2007
- 7) Illes S, Fleischer W, Siebler M, Hartung HP, Dihné M; Development and pharmacological modulation of embryonic stem cell-derived neuronal network activity. *Exp Neurol*, 207, 171–176, 2007
- 8) Jimbo Y, Kasai N, Torimitsu K, Tateno T, Robinson HP; A system for MEA-based multisite

- stimulation. *IEEE Trans Biomed Eng*, 50, 241-248, 2003
- 9) Cui XY, Martin DC; Electrochemical deposition and characterization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on neural microelectrode arrays. *Sens Actuator B-Chem*, 89, 92-102, 2003
 - 10) Ghosh S, Ingnas O; Electrochemical characterization of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) based conducting hydrogel networks. *J Electrochem Soc*, 147, 1872–1877, 2000
 - 11) Nyberg T, Shimada A, Torimitsu K; Ion conducting polymer microelectrodes for interfacing with neural networks. *J Neurosci Methods*, 160, 16-25, 2007
 - 12) Tsukada S, Nakashima H, Torimitsu K; Conductive polymer combined silk fiber bundle for the bioelectrical signal recording. *PLoS ONE*, 7, e33689-1-10, 2012
 - 13) Reynolds BA, Weiss S; Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255(5052), 1707-1710, 1992.
 - 14) Chojnacki A, Weiss S; Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells. *Nat Protoc*, 3(6), 935-940, 2008.
 - 15) Yamashita T, Ninomiya M, Acosta PH, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Okano H, Sawamoto K; Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci*, 26(24), 6627-6636, 2006
 - 16) Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL; Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat Neurosci*, 4(2), 143-150, 2001

- 17) Kaneko N, Sawamoto K; Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neurosci Res*, 63(3), 155-164, 2009.
- 18) Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH; Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4(11), 1313-1317, 1998.
- 19) Konagaya S, Kato K, Nakaji-Hirabayashi T, Iwata H; Design of culture sub-strates for large-scale expansion of neural stem cells. *Biomaterials*, 32, 992–1001, 2011
- 20) Lois C, Alvarez-Buylla A; Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(5), 2074-2077, 1993
- 21) Pearson K; On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine*, 2, 559-572, 1901
- 22) 島田 明佳、河西 奈保子、古川 由里子、Tobias Nyberg、鳥光 慶一；導電性高分子で修飾された多点微小電極による神経情報伝達の計測. *電気学会論文誌C*、129(2)、267-271、2009
- 23) Ghashghaei HT, Lai C, Anton ES; Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci*, 8(2), 141-151, 2007
- 24) Yoshinaga S, Ohkubo T, Sasaki S, Nuriya M, Ogawa Y, Yasui M, Tabata H, Nakajima K; A phosphatidylinositol lipids system, lamellipodin, and Ena/VASP regulate dynamic morphology of multipolar migrating cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*, 32(34), 11643-11656, 2012
- 25) Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S; A role for mDia, a Rho-regulated actin

nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat Neurosci*, 15(3), 373-380, 2012

第 5 章 総括

5-1 結論

第 2 章において、微小電極アレイによる神経活動の計測、アレイ型オンラインセンサによるグルタミン酸放出量の測定、共焦点レーザー蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いた $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光測定により、 $[Mg^{2+}]_o$ 減少が神経活動に影響を及ぼしていることが明らかとなった。 $[Mg^{2+}]_o$ の減少により、自発および電気刺激により誘起された神経活動は頻繁になり、グルタミン酸の放出量は増加した。海馬におけるグルタミン酸の放出量は領域（DG・CA1・CA3）によって異なることが確認されたが、海馬の場合は、各領域で神経細胞の種類や作用が異なるためと思われる。 $[Mg^{2+}]_o$ 減少による膜電位の変化は、大脳皮質神経細胞および海馬神経細胞ともに $[Mg^{2+}]_o$ が減少するにつれ脱分極傾向を示すことが確認され、 $[Ca^{2+}]_i$ 測定においては $[Mg^{2+}]_o$ の減少が大脳皮質神経細胞および海馬神経細胞に及ぼす影響に相違が見られた。培養期間および $[Mg^{2+}]_o$ の違いによる $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光変化およびオシレーション頻度から、海馬神経細胞の方が Mg^{2+} に対し感受性が高いことが確認され、海馬は短期記憶を担う脳領域であることから、 Mg^{2+} は短期記憶に関与している可能性が考えられる。また、NMDA 受容体の阻害剤 MK801 および非 NMDA 受容体の阻害剤 CNQX などグルタミン酸受容体の阻害剤を用いた場合にも、大脳皮質神経細胞および海馬神経細胞での $[Mg^{2+}]_o$ 減少による $[Ca^{2+}]_i$ 変化の相違が認められ、受容体分布の違いが確認された。

これまで、共焦点レーザー蛍光顕微鏡および Mg^{2+} 選択性の高い蛍光プローブ KMG-20-AM を用いた研究例は他に類がなく、第 3 章において、 $[Mg^{2+}]_i$ の動態を初めて明らかにすることが

できた。グルタミン酸および KCl 添加による神経細胞の活性化により、 $[Mg^{2+}]_i$ は一過性に増加することが確認された。その増加は、 $[Mg^{2+}]_o$ の減少において両者とも有意に抑制され、 $[Ca^{2+}]_o$ の減少においてはグルタミン酸添加では有意に抑制されるが、KCl 添加ではほぼ変化が見られなかった。これらの結果より、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加は、細胞外からの流入と、 Ca^{2+} 依存性の増加があることが示唆され、KCl 添加により $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加が認められることから、電位依存性の流入があることも明らかとなった。グルタミン酸受容体の阻害剤 MK801、CNQX、MCPG および IP3 受容体の阻害剤 Xestospongine C、ミトコンドリア PTP 開口阻害剤 Cyclosporine A を用い、各受容体を阻害した $[Mg^{2+}]_i$ の蛍光測定により、グルタミン酸による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加には、細胞外からの流入および小胞体やミトコンドリアのような細胞内小器官からの流出の 2 つの経路があることが明らかとなった。さらに $[Ca^{2+}]_i$ 変化との比較により、 $[Mg^{2+}]_i$ 変化の方が応答速度が遅いことも確認され、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ の一過性の増加は、細胞外からの流入が主流となる $[Ca^{2+}]_i$ 変化と異なり、細胞内小器官からの流出が支配的であることが明らかとなった。

また、第 4 章では神経幹細胞を用いた電氣的評価も検討した。神経幹細胞および神経前駆細胞は、神経成長・栄養因子である NGF および BDNF の添加により、神経細胞に分化したことが免疫染色により確認された。また微小電極アレイでの活電位計測により細胞間での相関も認められ、シナプス結合による神経回路が構築されたことが示唆された。しかしながら $[Ca^{2+}]_i$ の計測において神経幹細胞の分化により構築された神経回路は、大脳皮質などの初代培養神経細胞で構築された神経回路とは応答変化が異なり、一様な神経回路を構築するためには他の要因も必要であると思われる。導電性高分子である PEDOT-PSS は生体適合性が高

いため、非侵襲・非破壊的に活動電位の連続測定が可能であり、長期培養が可能である。

PEDOT-PSS を用いた微小電極アレイを使用することにより、神経幹細胞が神経細胞へと分化する過程を生きのまま電氣的に評価できたことは本研究における新たな成果である。

以上の結果より、大脳皮質および海馬培養神経細胞において、 Mg^{2+} 濃度に依存する電気活動や $[Ca^{2+}]_i$ 変化、グルタミン酸添加による $[Mg^{2+}]_i$ 変化の計測により、 Mg^{2+} が神経活動に影響を及ぼすことが確認され、グルタミン酸が誘起する透過経路についても検討を進めることができた。最近では、セカンドメッセンジャーとしての Mg^{2+} の機能¹⁾や、 Mg^{2+} が学習や記憶を増強するなどの報告²⁾、さらに多発性硬化症などの脱髄疾患にも関与しているという報告³⁾もあり、神経活動における Mg^{2+} の重要性が次第に明らかになりつつある。本研究は、 Mg^{2+} の生理的機能解析を進める上でこれまでにあまり例のない新たなアプローチであり、その有用性から、今後さらに研究を進めることで創薬等への薬物応用や疾病治療への貢献が期待できると考える。

5-2 今後の課題・展望

神経活動における Mg^{2+} の生理的機能解明はまだ始まったばかりである。本研究においては、中枢神経において主要な神経伝達物質であり、学習と記憶のメカニズムに関与するグルタミン酸と Mg^{2+} の関係について検討し、 $[Mg^{2+}]_i$ の神経活動への影響、グルタミン酸が誘起する $[Mg^{2+}]_i$ 増加の透過経路について報告した。学習や記憶に関与する神経伝達物質はグルタミン酸だけでなく、抑制性神経伝達物質である GABA (γ -aminobutyric acid ; γ -アミノ酪酸) も関係しており、最近では、GABA が記憶の整理や消去に関与しているとの報告^{4),5)}もある。今

後、 Mg^{2+} と GABA との関係も検討する必要があると思われる。また、今回 2 次元の培養細胞において実験を行ったが、より生体に近い切片などの組織での検証も必要であり、さらに Mg^{2+} 欠乏飼料などを投与することによる個体レベルでの検証も考えられる。

Mg^{2+} は心疾患^{6),7)}や神経疾患⁸⁾、精神疾患⁹⁾⁻¹¹⁾、さらにアルツハイマー^{12),13)}などにも関与しているとの報告もあり、今後さらに神経活動と Mg^{2+} について研究を進めることで、疾患や病態を理解する一助になり、認知症などの緩和や創薬への応用、疾病治療への貢献が期待できると考える。

◆第5章の参考文献

- 1) Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, Davis JC, Matthews HF, Douek DC, Cohen JI, Uzel G, Su HC, Lenardo MJ; Second messenger role for Mg^{2+} revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature*, 475(7357), 471-476, 2011
- 2) Slutsky I, Abumaria N, Wu LJ, Huang C, Zhang L, Li B, Zhao X, Govindarajan A, Zhao MG, Zhuo M, Tonegawa S, Liu G; Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron*, 65(2), 165-177, 2010
- 3) Kuramoto T, Kuwamura M, Tokuda S, Izawa T, Nakane Y, Kitada K, Akao M, Guenet JL, Serikawa T; A mutation in the gene encoding mitochondrial Mg^{2+} channel MRS2 results in demyelination in the rat. *PLoS Genet*, 7(1), e1001262, 2011
- 4) Hayama T, Noguchi J, Watanabe S, Takahashi N, Hayashi-Takagi A, Ellis-Davies GCR, Matsuzaki M, Kasai H; GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca^{2+} signaling. *Nat Neurosci*, 16(10), 1409-1416, 2013
- 5) Yoshiike Y, Kimura T, Yamashita S, Furudate H, Mizoroki T, Murayama M, Takashima A; GABA(A) receptor-mediated acceleration of aging-associated memory decline in APP/PS1 mice and its pharmacological treatment by picrotoxin. *PLoS One*, 3(8), e3029, 2008
- 6) Tangvoraphonkchai K, Davenport A; Magnesium and Cardiovascular Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 25(3), 251-260, 2018
- 7) DiNicolantonio JJ, Liu J, O'Keefe JH; Magnesium for the prevention and treatment of cardiovascular disease. *Open Heart*, 5(2), 1-10, 2018

- 8) Kirkland AE, Sario GL, Holton KF; The Role of Magnesium in Neurological Disorders. *Nutrients*, 10(6), 730. 2018
- 9) Eby GA, Eby KL; Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. *Med Hypotheses*, 67(2), 362-370, 2006
- 10) Szewczyk B, Poleszak E, Kucma MS, Siwek M, Dudek D, Pokrasniewicz BR, Zaleska MR, Opoka W, Czekaj J, Pilc A, Nowak G; Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. *Pharmacol Rep*, 60(5), 588-599, 2008
- 11) Sartori SB, Whittle N, Hetzenauer A, Singewald; Magnesium deficiency induces anxiety and HPA axis dysregulation: Modulation by therapeutic drug treatment. *Neuropharmacology*, 62(1), 304-312, 2012
- 12) Dehau C, Zheng C, Jia Y, Honglin Z, Weishan W, Yuetao S, Huan Y, Liang Z; Magnesium in Alzheimer's disease. *Magnesium in the Central Nervous System [Internet]*, 2011
- 13) Veronese N, Zurlo A, Solmi M, Luchini C, Trevisan C, Bano G, Manzato E, Sergi G, Rylander R; Magnesium Status in Alzheimer's Disease: A Systematic Review, *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 31(3), 2016

【謝辞】

本研究に取り組み、学位論文にまとめるまでは、多くの方々のご支援とご指導を賜りました。この場を借りて感謝の意を記したいと思います。

学位を取得したいという突然のお願いにも拘わらず、快く主査を引き受けて下さいました、日本女子大学 理学部 物質生物科学科 生体情報科学研究室 宮本武典教授に深く感謝いたします。お忙しい中、学位取得に関する雑務にお時間を割いて下さり、スライドや論文作成において的確なご指摘・ご助言を数多く頂きました。また、認識の甘さに対し敢えて苦言を呈して下さいるなど、時には優しく時には厳しく指導していただきました。先生のご尽力が無ければ、学位取得は難しかったと思います。

本研究を進めるにあたり、終始厳しくも暖かいご指導と激励を賜りました東北大学大学院 工学研究科 ファインメカニクス専攻 鳥光慶一教授に心から感謝の意を表します。先生の前職、日本電信電話株式会社 物性科学基礎研究所にて先生の下で研究に携わらせて頂き、研究の面白さや厳しさに触れることで、学位取得を目指すことがいつしか筆者の目標となりました。お忙しい中、外部副査も引き受けて下さり、学術論文はもちろん学位論文の執筆においても、論文作成の基礎から博士としての心構えまで多岐にわたり多大なるご指導を頂き、言葉では言い尽くせない程感謝しております。先生の叱咤激励がなかったら、おそらく学位取得は断念していたと思います。

日本女子大学 理学部 物質生物科学科 分子生物学研究室 和賀祥教授、進化遺伝学研究室 深町昌司教授は、お忙しい中、快く副査を引き受けて下さいました。また同大学理学部 物質生物科学科 分析化学研究室 佐藤香枝教授は専攻科長として取り纏めをして下さり、書類の

不備にも優しく対応して下さいました。同大学の卒業生ではありますが、卒業後はあまり大学と関わることも無かった不義理な筆者に対し、皆さま快く迎え入れて下さいました。先生方には有意義なご指摘・ご助言も数多く頂き、大変感謝しております。

学位論文の一部（第4章）となる学術論文に関して、京都大学 COI 拠点研究推進機構 機構戦略支援統括部門長 岩田博夫教授、広島大学大学院医系科学研究科 生体材料学 加藤功一教授には、当時共同研究者としてご指導を賜り、論文投稿の際も共同執筆者としてご協力頂き、精査していただきました。共著の論文を学位論文に使用させていただくことも快くご承諾下さった上に激励も賜り、深く感謝申し上げます。

同様に学位論文の一部（第2章・第4章）となる学術論文に関して、共同執筆者としてご協力頂いた東京都立大学 大学教育センター 河西奈保子教授、日本電信電話株式会社 知的財産センタ 島田明佳博士には、折に触れ多くの示唆を頂き、共に充実した研究生を送らせていただきました。共著の論文を学位論文に使用させていただくことも快く承諾して下さい、学位取得に関しても激励の言葉をいただき、大変感謝しております。また、学術論文におけるデータ取得に協力していただきました杉本亜希さんにも感謝の意を伝えたいと思います。

仕事を続けながら学位論文が執筆できるよう環境を整え、深い理解と応援をしていただいたユビックス株式会社 新實忠之社長にも大変感謝いたしております。新實社長には日本女子大学に学術研究員として在籍する際もご助力いただきました。

また、国立研究開発法人 科学技術振興機構に所属させていただいた際には、本研究の主軸となる研究を進めることができ、複数の論文も執筆させていただきました。当時の CREST および SORST の関係者の皆様方にも感謝の意を表したいと思います。

大学で植物を専攻していたにも拘わらず、動物実験が必須である医薬品の研究開発業務に受け入れて下さった旧・日立化成工業株式会社 茨城研究所（医薬品部門）の当時の研究室の皆様方にも感謝いたします。そこで培った技術や背景がその後の研究生活に繋がったと思っております。

最後になりましたが、研究生活の礎となった卒業論文を執筆させていただいた日本女子大学 館岡孝教授（当時）、そして国立研究開発法人 理化学研究所の当時の関係者の皆様方にも感謝したいと思います。

学位論文の執筆作業も漸く終わりを迎え、本当に多くの方々に支えられて本研究を進められたことに、改めて深い感慨を覚えずにはられません。本当にありがとうございました。