

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14620

研究課題名(和文) 神経プレート技術を用いた一細胞レベル神経回路構築

研究課題名(英文) Engineering neural circuits at the single-cell-level by the neuro-plate technique

研究代表者

吉田 昭太郎 (Yoshida, Shotaro)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：20785349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳をチップ上に再現するブレイン・オン・チップ技術の実現のために、生きた神経回路を一細胞レベルで設計・構築可能にする「神経プレート技術」を開発した。マイクロデバイス技術を応用した本技術を用いることで、単一神経細胞の細胞体・軸索・樹状突起の長さや方向を一つ一つ制御できること、またその神経細胞同士を繋ぐことで神経回路が構築され、その回路に機能的なシナプス結合が発現し信号伝達が起こることを示した。本成果によって一細胞レベルで神経回路を設計・構築できるようになり、神経回路の形成や情報伝達の解明のための有用な実験ツールを開発することができたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記憶・学習などの脳機能を司る神経回路の情報処理メカニズムは未だ不明な点が多く、多くの研究が為されているものの、精神疾患の根本的な治療や、精密なサイボーグ技術などの開発へは繋がっていない。困難な技術的課題のひとつが、これまでの神経回路の研究は神経細胞の「繋がり方」を制御することができなかったため、ランダムに形成された回路のみを解析対象とせざるを得なかったことである。本研究では神経回路中の要素である単一神経細胞を個別に制御し、選択的に繋げていくという、電子回路工作のように神経回路を構築する技術を開発した。この技術を発展させ、神経回路の解析をより精密に行うことで脳機能の解明を目指せると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, a method for engineering cultured neural circuits at the single-cell-level has been developed as one of the brain-on-chip technologies. A microfabricated device was developed that enabled morphological control of a cell body, an axon, and dendrites of single neurons, and manipulation of their position during in vitro cultivation. The morphologically controlled single neurons could be assembled in a neuronal circuit, and synaptic connections as well as synchronized neural activities were observed. The technology will be useful for basic neuroscience research of neural circuit formation and signal transmission for unravelling the mechanisms of brain functions such as memory, learning, and pattern recognition.

研究分野：バイオエレクトロニクス

キーワード：神経科学 MEMS パターニング マイクロ加工 マイクロマニピュレーション 神経回路 バイオMEMS  
ブレイン・オン・チップ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来神経細胞は一度培養すると位置を変更できず、ランダムに形成された回路のみを解析対象としていた。一細胞単位で生きた神経回路の全体を観察できる実験技術が存在しないことにより、神経回路の情報処理メカニズムの解明は困難である。有望視される技術の一つとして、マイクロパターン技術による培養神経回路の制御が国内外で開発されてきた。細胞接着性の分子を平面に回路状にマイクロパターンすることで、細胞の接着位置をある程度制御することが可能であることが示されてきた。理想的には回路全体を一細胞単位で制御したいが、従来研究ではパターンに対する細胞の頻繁な重複・欠如により制御率が低く、回路全体を一細胞単位ではほぼ制御できなかった。

2. 研究の目的

本研究では神経細胞の細胞体・軸索・樹状突起を、生きたまま動的に変えることを世界で初めて実現する。神経回路中の要素である単一神経細胞を個別に選択し組み合わせるといふ電子回路工作のような方法論で神経回路を構築することを初めて提案している点で独創的である。神経回路を一細胞レベルで設計・構築可能にするデバイス「神経プレート」を開発すること、および「神経プレート」技術を用いて構築した神経回路に機能的なシナプス結合が構築されることを示す。

3. 研究の方法

研究代表者が開発している「神経プレート」デバイスの構造を検討し、初代培養神経細胞を用いた試験によって単一神経細胞の形態制御および回路構築が可能であることを示す。特に、神経回路を設計・構築するプロセスの安定化のためにプレートを組み立てる土台となるマイクロデバイスおよび組み立て方法を開発する。さらに、設計・構築した神経回路の機能解析として、シナプス形成能の計測を免疫染色による形態評価およびカルシウムイメージングによる機能評価の2つの観点で行う。以上により提案手法によって機能的な神経回路を構築可能であることを示す。

4. 研究成果

本研究では図1に示すように、通常はランダムな軸索・樹状突起・細胞体の形態を示す神経細胞を、マイクロマシン技術を応用して製作した「マイクロプレート」デバイスに載せることで、単一細胞ひとつひとつの形態制御を可能にし、またそれらを移動可能にすることで選択的に組み合わせることで神経回路を構築できるようにした。マイクロパターンングによって培養神経回路の構造制御を試みた研究は国内外で多く存在するが、単一細胞レベルでの精密制御に成功したのは本研究が世界初である。本研究は国内外の学会・論文誌で広く発信し、研究者・メディアで高く評価され、報道された。今後は本技術によってヒト細胞からなる神経回路をデザインし、特定の構造を持つ神経回路が発現する情報処理様式を理論モデルと照らし合わせて明らかにする神経情報学の研究へ展開可能である。さらに、神経回路が知能的な情報処理を発現する仕組みが明らかになれば、ヒトの知能に限りなく近いAI・ロボットを実現可能な未来がある。

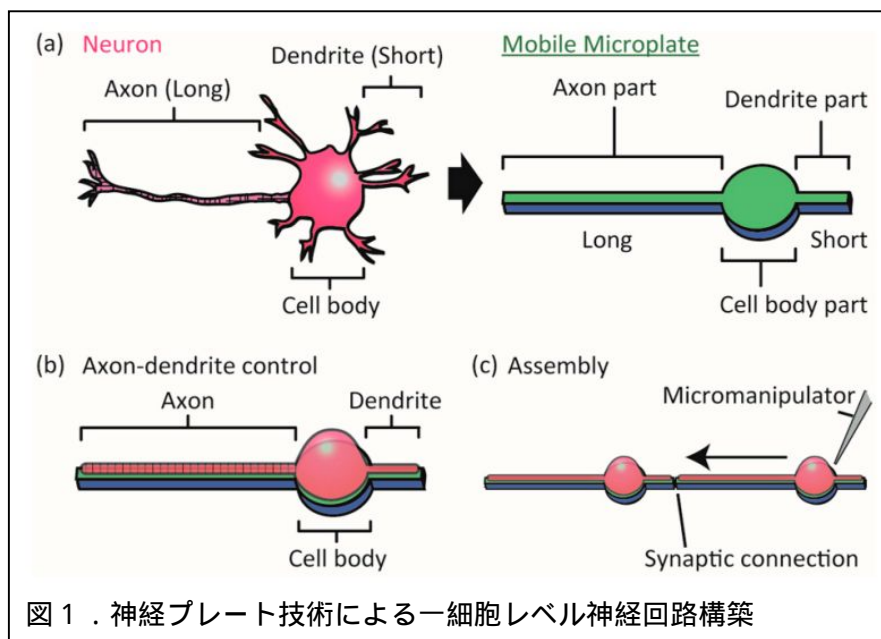


図1. 神経プレート技術による一細胞レベル神経回路構築

本研究課題では、まずラット初代培養海馬神経細胞のためにプレートを設計し、神経細胞の軸索・樹状突起・細胞体がプレートの形状によって制御できる収率を定量化した。この結果は今後デバイスを改良のための基礎となった。また、神経プレートを組み合わせ

て回路を構築する際に、シナプス結合が形成されるまでに2週間以上の培養中に、回路が一定の位置で安定して存在できるような回路基板が必要であることを見出した。そこで、マイクロマシン技術を用いて付随的なデバイスを開発し、回路基板にパターン可能な細胞非接着材料の検討、およびプレートの固定化が可能な基板形状の至適条件の検討を行った。また、神経細胞が載ったプレートから神経細胞の細胞体および神経突起が脱走する現象が稀に見られたことから、マイクロ加工技術を用いてプレートの側面に脱走防止用のマイクロサイズの壁面を設け、細胞非接着性の分子を修飾するプロセスを開発した。これらの技術により安定してプレートを組み合わせることが可能となった。さらに、ドイツの共同研究者と協働で、図2に示すような、三次元的に回路を組み立てるための三次元回路基板を二光子レーザーリソグラフィ技術によって構築する技術を開発し、電動マイクロピンセットによって神経細胞を三次元回路基板へ配置可能なことを示した。この新技術によって、生体に近い複雑な三次元神経回路を構築可能になると考えられる。

また、構築した神経回路に対して免疫染色およびカルシウムイメージングによって回路が機能していることを確認した。アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子工学技術を適用することで、リアルタイムに神経活動をイメージングすることができた。これは、「神経プレート」が2次元的で透明であるため蛍光顕微鏡観察に適することにより可能となった。今後は光学的な回路の機能解析に加え、神経活動計測用のバイオ電極を本技術に取り入れ、長期間の電気的な活動計測へ発展可能であると考えられる。

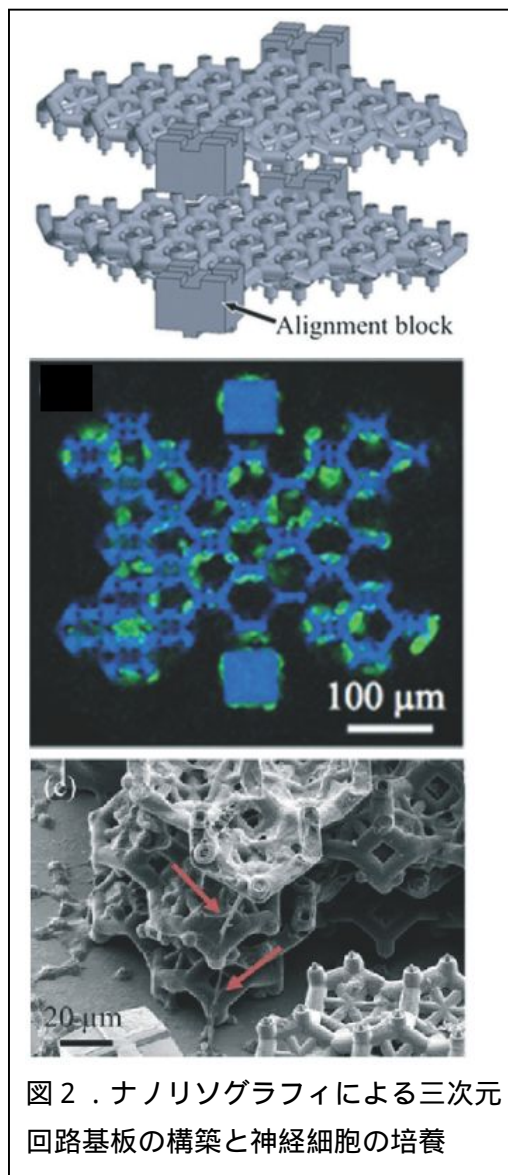


図2 . ナノリソグラフィによる三次元回路基板の構築と神経細胞の培養

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

Florian Larramendy, Shotaro Yoshida, Daniela Maier, Zoltan Fekete, Shoji Takeuchi and Oliver Paul, 3D Arrays of Microcages by Two-photon Lithography for Spatial Organization of Living Cells, Lab on a Chip, 19, 875-884 (2019) doi: 10.1039/C8LC01240G (査読有り)

Shotaro Yoshida, Midori Kato-Negishi, Shoji Takeuchi, Assembly and connection of micropatterned single neurons for neuronal network formation, Micromachines, 9, 2356 (2018) doi:10.3390/mi9050235 (査読有り) \*論文誌表紙に採択

### 〔学会発表〕(計1件)

Shotaro Yoshida, Midori Kato-Negishi, and Shoji Takeuchi, Assembly of Micropatterned Neurons for Artificial Neural Network Formation, The 1st WPI-IRCN Retreat 2018, (2018)

### 〔図書〕(計0件)

### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[研究成果のプレスリリース]パズルのように神経回路を組み立てる 生きた神経細胞を自在につなぎ、ネットワークを構築

<https://www.iis.u-tokyo.ac.jp/ja/news/2909/>

[国内における研究成果の報道]

神経細胞を自在に制御できる技術を開発

<https://news.mynavi.jp/article/20180515-629498/>

[海外における研究成果の報道]

Researchers make a two-neuron network

<https://phys.org/news/2018-05-two-neuron-network.html>

Researchers recreate a brain, piece by piece

<https://techcrunch.com/2018/05/22/researchers-recreate-a-brain-piece-by-piece/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。