

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25600071

研究課題名(和文)半導体表面上の人工神経細胞回路網構築と神経信号伝達計測

研究課題名(英文)Fabrication and evaluation of artificial neuronal networks on semiconductor surfaces

研究代表者

庭野 道夫(NIWANO, Michio)

東北大学・電気通信研究所・教授

研究者番号：20134075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らが培ってきた半導体表面・界面のナノ構造設計・計測技術に基づき、半導体表面上に神経細胞の二次元配列培養と極性制御(軸索と樹状突起の成長方向制御)した人工神経細胞回路網(脳の高次機能を維持しつつ可能な限り簡略化したin vitroモデル実験系)を構築し、さらに、神経活動ダイナミクスを実験的に計測・評価した。またこの結果を理論的に裏付けるためのシミュレーションモデルの構築にも並行して取り組んだ。

本研究の成果は、脳科学の研究分野に新しい解析手法をもたらすととも新規の神経信号伝達機構を解明し、バイオエレクトロニクスや神経回路学の分野の発展にも貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Human brain is a complex, hierarchical system comprised of 10 billion neurons. By engineering a simple neuronal network in vitro that mimics the in vivo architecture and functions, a novel system for studying of the dynamical properties of the neuronal networks in the brain will become available.

In the current project, we developed a series of surface micromodification techniques for fabricating "template" surfaces for neuronal cell patterning. We then evaluated the spontaneous activity of the micropatterned neuronal networks via fluorescent calcium imaging. A simulation model of neuronal networks based on a biophysical model was also developed to theoretically investigate activity modulation in micropatterned networks.

研究分野：バイオエレクトロニクス

キーワード：ニューロエレクトロニクス 信号伝達 培養神経細胞 神経回路 シナプス タンパク質 マイクロパターニング 表面改質

1. 研究開始当初の背景

神経可塑性は、特定の頻度の電気刺激を受けたシナプスにおいて、その後のシナプス伝達が長期間にわたって増強（長期増強：long-term potentiation, LTP）または抑圧される現象のことであり、記憶・学習のような高次脳機能の基礎とされている。1973年のLTPの発見以来、その分子メカニズムの解明やニューラルネットワーク理論の観点から多くの研究者を惹きつけている。しかし、脳のもつ複雑さから、40年近く経た今でもLTPの発現メカニズム等、結論の出ない問題が多いのが現状である。

脳のように複雑な試料を研究対象とする場合、高次機能を維持しつつ可能な限り簡略化したモデル実験系の構築がブレークスルーを生み出すと考える。現在、LTPのような高次機能の研究には *in vivo* や薄切標本（脳スライス）のような複雑な試料を用いるのが標準的であるが、試料自体の制御が難しいという大きな問題がある。一方、最もシンプルな試料の培養神経細胞では長期可塑性は観測されず、近年報告が相次いでいる神経細胞のパターニング培養においても、LTPのような長期可塑性を報告した例はない。申請者らは、脳スライスを培養した培養スライス標本では長期可塑性が発現されることに着目し、脳内での神経細胞の配列・配向・ネットワークを人工的に再構成することにより、可塑性機能を有する培養神経細胞回路網の構築できると考え、本申請を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らがこれまでに培ってきた固体表面・界面制御・計測技術を活用し、

固体表面の二次元パターニングにより培養神経細胞の配列・配向の制御を行い、長期可塑性機能を獲得した培養神経細胞網を構築し、

人工再構成神経回路系の神経細胞活動と信号伝達を観測・評価し、

さらに、観測結果とニューラルネットワーク理論に基づいた計算結果を比較することにより神経信号伝達機構のダイナミクスを解明する。

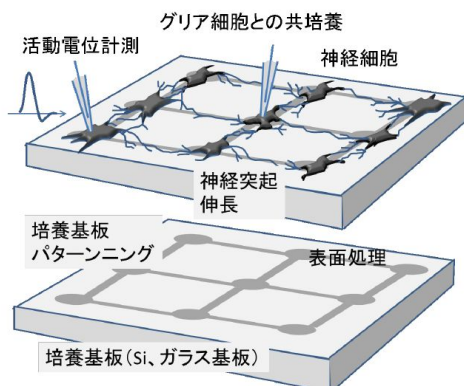


図1:人工再構成神経回路の構築

本研究により、培養細胞の扱いやすさと、可塑性機能が結合されれば、脳研究の分野に新たな *in vitro* モデル系が登場することとなり、神経科学の分野に大きなブレークスルーをもたらすとともに、新しい神経ネットワーク機構の構築により脳型コンピュータの実現など情報科学の分野の発展にも寄与できると期待される。

3. 研究の方法

(1) マイクロパターン基板の作製

マイクロコンタクトプリンティング法を用いたマイクロパターン基板作製方法を確立した。ポリリジンとコラーゲンの混合液と、ポリリジンと細胞外基質ゲルの混合液のそれぞれにおける、最適なパターン作製方法を模索した。その結果、ポリリジンと細胞外基質ゲルの混合液インクの方がパターン転写効率と細胞接着効率が高いことがわかった。細胞外基質ゲルの粘度がコラーゲン溶液よりも高いことが、転写効率が向上した原因だと考えられる。

(2) 人工再構成神経回路の作製

マイクロコンタクトプリンティング法により作製したパターン基板上に胎生 18 日目のラット胎仔海馬から採取した神経細胞を播種し、グリア細胞（アストロサイトと）共培養した。培養 6～10 日後の細胞を MAP2 (microtubule-associated protein 2; 細胞体と樹状突起), Synapsin 1 (前シナプス), PSD95 (postsynaptic density protein 95; 後シナプス) で三重染色し、共焦点レーザー顕微鏡でイメージングして Synapsin 1 と PSD95 の共局在を調べることで、形成されたシナプスを可視化した。イメージングには東北大学大学院医工学研究科の共通機器として整備されている TCS SP8 (Leica) を使用し、画像解析には ImageJ (NIH) を用いた。

(3) 人工再構成神経回路の活動計測

マイクロパターン基板上で神経細胞を 10 日間培養した後に、蛍光カルシウムプローブ Fluo-4 を細胞内に導入した。蛍光顕微鏡下で Fluo-4 の輝度変化を観察することにより、神経細胞の自発活動を計測した。なお、この実験では 1 つのパターン上に数十個程度の細胞が配置された $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ 四方のマイクロパターンを使用した。

(4) 人工再構成神経回路の理論モデリング

神経細胞のモデルには積分発火モデルを用いた。時刻 t における各細胞の膜電位 $V(t)$ は下の方程式に基づいて計算される：

$$\tau_{\text{mem}} \frac{dV(t)}{dt} = E_L - V(t) + R_{\text{in}} I_{\text{tot}}(t)$$

ここで、 τ_{mem} : 細胞膜の時定数、 E_L : 静止膜電位、 R_{in} : 入力抵抗、 I_{tot} : 入力電流、 V_{th} :

発火閾値，である．入力電流 I_{tot} は

$$I_{tot}(t) = \sum_j I_j(t) + \xi(t)$$

として，細胞 j から受けるシナプス性入力 ($I_j(t)$) とノイズ $\xi(t)$ の和として計算した．

それぞれ k 本の結合を持つ N 個の興奮性ニューロンが，規則的な結合を持つネットワークを初期構造とし，全ての結合を無作為に組み替えて，ランダム接合ネットワークを構成した．各細胞に対して独立に入力されるノイズ電流によって駆動される，ネットワークの自発活動を解析した．Connectivity ($=k/M$) を一定に保ちながらスケールリングすることで規模の異なるネットワークを作製し，それらの自発活動パターンを比較した．

4. 研究成果

(1) 初代神経細胞の軸索-樹状突起極性制御

ポリリジンと細胞外基質ゲルの混合液を用いた基板作製方法の最適化により，単一細胞ごとに配列させられた初代神経細胞を 10 日以上に渡って安定に培養し続けられるパターンの作製条件を確立した．初めに，このような表面上にパターンニングした神経細胞の軸索-樹状突起極性の制御性を評価した．設計した直線，十字，蛸足の 3 種類のパターンの上に神経細胞を培養し，軸索マーカーである tau1 と樹状突起マーカーである MAP2 の二重免疫蛍光染色により極性制御効率を調べた．

各パターンの円領域に細胞体に乗った神経細胞について評価を行ったところ，直線パターンでは 72%，十字パターンでは 69%，蛸足パターンでは 71% の確率で極性が制御できていることがわかり，どのパターンでも極性を制御することができ，また制御効率にパターン形状依存性はないことがわかった．

(2) マイクロパターン神経細胞間に形成されるシナプス接合の解析

パターン基板上的神経細胞において信号伝達に必要なシナプス接合がどのように形成されていくのかを調べた．一般的な培養神経細胞においては，培養開始後 4 日目ごろからシナプスが形成され始める．マイクロパターン上の培養神経細胞においても機能的なシナプスが形成されることは生理学的実験により確かめられているが，その成熟化プロセスや通常の培養神経回路におけるシナプスとの違いは不明であった．本研究では免疫蛍光染色法を用いて，培養 6, 8, 10 日目の神経細胞に形成されるシナプスの分布や大きさ，さらにはその形成過程を調べた．シナプス形成を評価するため，シナプス前膜に局在する Synapsin1 タンパクと，シナプス後膜に局在する PSD95 タンパクをそれぞれ染色し，両方のタンパクが共局在している部位をシ

ナプスと判断した．また，細胞体・樹状突起マーカーとして MAP2 タンパクを染色した．十字パターンと蛸足パターンでは，全面を細胞外基質ゲルでコートした基板と同様にシナプスが形成されていることがわかった．一方，直線パターン上では，培養 8 日目から 10 日目でシナプスの肥大化が起らなかった．この実験を通じて，今後，単一細胞レベルで機能的な神経回路を再構成する際のパターン形状の設計指針を得ることができた．

(3) 人工再構成神経回路の自発活動パターン

生体神経回路は外部刺激を受けていない状態でも自発的に活動する．このような自発活動は培養細胞系でも起こり，脳の自発活動の起源を調べるためのモデル系となる．

パターンニングを施していない培養神経回路においては回路全体に渡る同期的な神経活動が観測されるが，神経細胞をパターン基板上で培養し，1 つの回路を構成する細胞数を数十個程度にまで縮小すると，生体神経回路に近い，非同期的な自発活動も観測されることが分かった．

(4) 人工再構成神経回路の自発活動パターン

細胞数 $N=1000$ ，結合本数 $k=100$ のネットワークモデルでは，培養細胞で観測されるような，一定周期でほぼ全ての細胞が同期的に発火する自発活動パターンが現われた．Connectivity ($=k/M$) が一定という条件のもと，細胞数 N を 400, 100 個と小さくすると，同期発火の頻度が減少し，さらに $N=40$ の場合には同期発火は起きず全ての細胞がランダムに発火した．これらの結果は，マイクロパターン培養神経回路において観察されるダイナミクス変化をよく表現しており，

細胞ごとの膜電位のランダムな揺らぎによる活動電位の生成と，

ネットワーク中の興奮性シナプス結合による活動の正帰還的増幅，

という 2 つの単純なメカニズムによって培養神経回路における同期バーストの生成と回路サイズ依存的なダイナミクスの変調が説明できることが分かった．また今回の計算結果は，面積を変えたマイクロパターン上の培養神経回路が connectivity 一定という条件に従って縮小されている可能性も示唆している．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

I. Sakurai, S. Kubota, M. Niwano: The onset and closure of critical period plasticity regulated by feedforward inhibition. *Neurocomputing* 143 (2014)

261-268. (査読有)

I. Sakurai, S. Kubota, M. Niwano: A model for ocular dominance plasticity controlled by feedforward and feedback inhibition. IEICE Trans. Fundamentals E97 (2014) 1780-1786. (査読有)

A. Hirano-Iwata, R. Matsumura, R. Tezuka, M. Niwano, T.V.P. Bliss, M. Sugawara: Interference between field excitatory postsynaptic potentials and simultaneously recorded chronoamperometric L-glutamate currents in mouse hippocampal slices. Electrochem. Commun. 45 (2014) 1-4. (査読有)

A. Oshima, A. Hirano-Iwata, H. Mozumi, Y. Ishinari, Y. Kimura, M. Niwano: Reconstitution of human ether-a-go-go-related gene channels in microfabricated silicon chips. Anal. Chem. 85 (2013) 4363-4369. (査読有)

[学会発表](計 21 件)

高沖英里, 山本英明, 松村亮佑, 桂林秀太郎, 平野愛弓, 庭野道夫: マイクロパターン基板上の単一神経細胞間に形成されるシナプスの解析. 第 62 回応用物理学会春季学術講演会, 東海大学(神奈川県, 平塚市), 2015 年 3 月 12 日.

千田雄大, 山本英明, 平野愛弓, 石原広識, 藤森壮也, 谷井孝至, 久保田 繁, 庭野道夫: マイクロパターン神経細胞回路の活動様式に関する理論的考察. 第 62 回応用物理学会春季学術講演会, 東海大学(神奈川県, 平塚市), 2015 年 3 月 12 日.

山本英明, 谷井孝至, 庭野道夫, 平野愛弓: 培養神経細胞・神経回路操作のための表面マイクロ加工技術. 第 52 回日本生物物理学会年会(招待講演), 札幌コンベンションセンター(北海道, 札幌市), 2014 年 9 月 25 日.

高沖英里, 山本英明, 桂林秀太郎, 木村康男, 平野愛弓, 庭野道夫: マイクロコンタクトプリンティング法による培養マウス海馬神経細胞の軸索誘導. 第 37 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市), 2014 年 9 月 13 日.

高沖英里, 小山内進一郎, 平野愛弓, 木村康男, 庭野道夫: マイクロコンタクトプリンティング法に基づく培養神経細胞の極性制御. 第 61 回応用物理学会春季学

術講演会, 青山学院大学(神奈川県, 相模原市), 2014 年 3 月 17-20 日.

I. Sakurai, S. Kubota, M. Niwano: Correlated inhibitory firing and spike-timing-dependent plasticity. International Conference of Neural Information Processing, 大邱広域(韓国), 2013 年 11 月 3-7 日.

[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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.niwano.riec.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庭野 道夫 (NIWANO, Michio)
東北大学・電気通信研究所・教授
研究者番号: 20134075

(2) 研究分担者

平野 愛弓 (HIRANO-IWATA, Ayumi)
東北大学・医工学研究科・准教授
研究者番号: 80339241

木村 康男 (KIMURA, Yasuo)
東京工科大学・
コンピュータサイエンス学部・教授
研究者番号: 40312673

山本 英明 (YAMAMOTO, Hideaki)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・
助教
研究者番号：10552036
(2014年5月14日～)

(3)連携研究者

なし