

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19884

研究課題名（和文）神経軸索の構造に依存した新規伝導調節則の解明

研究課題名（英文）Exploring axon conduction modulation rule dependent on axon structure

研究代表者

榎葉 健太（Shimba, Kenta）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：80792655

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：軸索の新しい伝導調節則の理解に向けて、光刺激により軸索の特性を評価する方法の確立、および軸索薬理刺激デバイスの開発に取り組んだ。結果、連続した電気刺激により軸索の伝導が持続的に変化すること、および特定の頻度の刺激により伝導時間が振動する現象を示すことを見出した。さらに、高密度電極アレイ上にマイクロ流路を形成することで、軸索に対する選択的な薬理刺激と応答計測が可能であることを示した。これらは、軸索の機能を探る上での基盤的な技術となりえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、神経細胞が持つ軸索の機能を詳細に評価するための基盤技術が完成した。これらの技術により研究を進めることで、神経細胞の集団から構成される脳の機能がどのように発現するかの機序解明につながる。脳や神経細胞が持つ機能を明らかにすることは、より高機能かつ低エネルギーで動作するAIの開発や、神経機能が低下する疾患の発症機序解明・新たな治療薬の開発といった面から社会に対して貢献し得る。

研究成果の概要（英文）：To understand the new regulation law of axonal conduction, we established a method to evaluate the characteristics of axons by repetitive electrical stimulation and developed an axonal pharmacological stimulation device. As a result, we found that the conduction of axons is continuously changed by electrical stimulation, and that the conduction time oscillates with a specific frequency of stimulation. Furthermore, by forming microfluidic channels on high-density electrode arrays, we showed that selective pharmacological stimulation of axons and measurement of their responses are possible. These methods may serve as a fundamental technology to explore the function of axons.

研究分野：神経工学

キーワード：軸索 高密度電極アレイ 神経細胞 電気刺激 マイクロ加工

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脳は神経細胞が軸索を介して結合した神経回路網で構成されている。脳の機能を理解するためには、素子である神経細胞やその集合体である神経回路網の機能の理解が不可欠である。神経細胞の軸索は、単に信号を伝えるためのケーブルとみなされてきたが、近年軸索の計算機能に注目が集まっている。例えば、神経細胞の軸索が周囲の細胞の影響で伝導特性を調節したり [1]、活動依存的に伝導速度を調節したり [2] することが知られている。さらに、髄鞘を形成したグリア細胞による影響 [3] が発見され、軸索の伝導特性が神経系のダイナミクスを変化させることが期待されたが、神経回路網のダイナミクスにおいて軸索の役割は明らかでない。従来手法では、軸索を伝導する活動の時間差を 2 点の電極で記録し、伝導特性を評価していた。そのため、時間的な変化は記録できるものの、電極間の軸索の形状が考慮されておらず、空間情報を計測できないことが課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、軸索の形状を考慮したうえで、その特性を評価するための方法論の開発を目的に設定する。具体的には、以下 2 点の技術を開発した。1 点目は、電気刺激により誘発された軸索の応答を加算平均せずに抽出するための方法である。この手法により、連続的な活動による軸索の応答時刻の経時変化が抽出できるようになる。2 点目は、高密度電極アレイとマイクロ構造を組み合わせることで、マイクロトンネル内に伸長した軸索に対して、選択的に薬剤を添加するためのデバイスである。上記 2 点の開発を通して、軸索を評価する上での基盤技術を確立することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 連続電気刺激による感覚神経細胞の軸索の応答時刻変化の評価

胎齢 15 日の Wistar rat から後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) を採取し、trypsin を用いて酵素処理した。polyethyleneimine および laminin を用いてコートした培養領域に播種した。培養液として、Neurobasal medium, B27 supplement, GlutaMAX, penicillin-streptomycin, および nerve growth factor から構成される溶液を用いた。すべての動物実験は、東京大学の動物実験委員会の認可のもと、東京大学動物実験マニュアルに従って実施した。

高密度に電極を集積した計測チップである高密度電極アレイ (HD-MEA) を用いて DRG 神経細胞から活動を計測した。1 枚のチップには、およそ 25000 点の電極が集積化されており、同時に選択した 1000 点程度の電極からデータを記録可能である。一般に、DRG 神経細胞は培養条件においてほとんど自発活動を示さない。そこで、アデノ随伴ウイルスを用いて、青色の光で開口するイオンチャネルである ChR2 を細胞に発現させた。同時に緑色蛍光タンパク質を発現させ、蛍光顕微鏡により細胞を選択したうえで、DMD を用いて細胞選択的に光刺激を印加した。

高密度電極アレイの制御ソフトウェアから、Axon recording assay を用いて信号を記録した。

対象とした神経細胞の細胞体における活動時刻を基準として信号を加算平均することで、チップ全体における軸索の伝搬の信号を算出した (図 1)。算出した信号から任意の電極を決め、電気刺激を印加するための刺激電極とした。さらに、刺激電極より末端側の軸索の信号を検出した電極を自動的に抽出し、計測電極とした。

電気刺激に対する軸索の応答を抽出するために、最初に連続的な刺激により波形が変化しないと考えられる 2 Hz の刺激を与え、応答を加算平均することで軸索の応答波形のテンプレートを作成した。その後、様々な頻度で電気刺激を印加し、複数点の電極の信号に対するテンプレートマッチングにより、応答時刻を検出した。

(2) 軸索に対する選択的薬理刺激のためのマイクロデバイスの構築

微細構造物は UV 光によって硬化するネガ型フォトリソグرافィにより作製した。まず SU-8 と基板の接着性を高めるため HD-MEA の電極上に 1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザンを滴下し真空機で 10 分放置した。次に SU-8 を厚さ 5 μm でスピコートした。

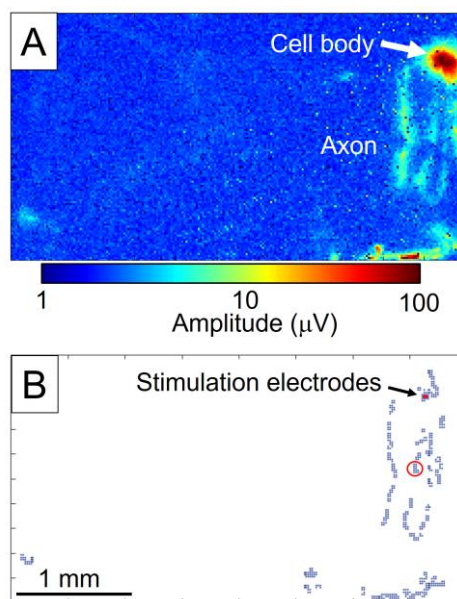


図 1 軸索の検出と刺激・計測電極の決定。A) 細胞体と軸索の位置。B) 刺激電極と計測電極の位置。赤丸は図 3 に示すデータ。

光パターン照射装置 MIGHTEX Polygon1000-G を用いて UV 光を照射し、電極上に壁 60 μm 、溝 30 μm 、長さ 890 μm の SU-8 微細構造物を作製した。

SU-8 微細構造物の天井となる PDMS は、幅 200 μm 、高さ 35 μm の流路と薬液を注入するためのシリコンチューブを持つ形状に設計した。HD-MEA に細胞培養のための親水化・滅菌処理を行った後、プラズマ処理したシリコンチューブ付き PDMS を接着し、150°C で 40 分加熱し接着力を高めた。

細胞は胎齢 19 日目 Wistar rat の大脳皮質から採取し、trypsin で酵素処理し単離した。10 倍希釈した Matrigel でコーティングした HD-MEA に 10000 cells/mm² で播種した。37°C、CO₂ 5% のインキュベータで培養し、週に 2 回培養液の半量を交換した。

培養 31 日目に電気活動計測と薬理刺激実験を行った。HD-MEA システム (MaxWell Biosystems 社) を用いて細胞外電位を計測した。計測する電極は、初めに電極面全体をスキャンして計測し、活発な活動が検出されたトンネル内の電極を 10 トンネル分選択した。

図 2 に計測用インキュベータ内の薬理刺激システムの概要と実験時の様子を示す。薬液を保持する inlet には 200 μl のピペットチップの先端に外径 2 mm、内径 1.5 mm のシリコンチューブを接続し、プラズマ処理を行ったものを用いた。outlet には注射針を挿し、ペリスタポンプで 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ で 90 秒間吸引した。薬液が流路内に送られていることは inlet の液面の高さの変化で確認した。薬液の交換はクランプで保持したピペットチップを外し、別の液体で満たされたピペットチップに付け替えることで行った。薬液としてナトリウムイオンチャネルブロッカーである TTX を 5 nM、10 nM、100 nM の 3 つの濃度で用いた。

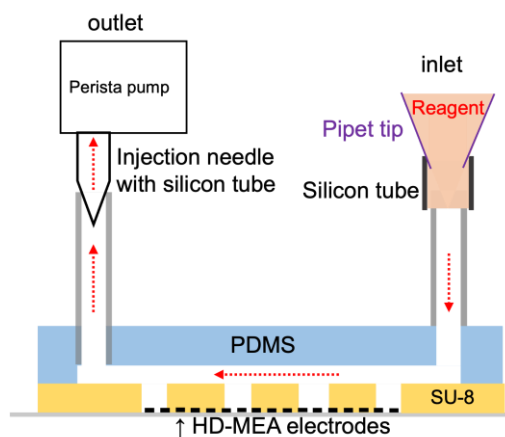


図 2 軸索への選択的薬理刺激のための薬理刺激システムの概要と実験時の様子を示す。薬液を保持する inlet には 200 μl のピペットチップの先端に外径 2 mm、内径 1.5 mm のシリコンチューブを接続し、プラズマ処理を行ったものを用いた。outlet には注射針を挿し、ペリスタポンプで 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ で 90 秒間吸引した。薬液が流路内に送られていることは inlet の液面の高さの変化で確認した。薬液の交換はクランプで保持したピペットチップを外し、別の液体で満たされたピペットチップに付け替えることで行った。薬液としてナトリウムイオンチャネルブロッカーである TTX を 5 nM、10 nM、100 nM の 3 つの濃度で用いた。

4. 研究成果

(1) 電気刺激による軸索の応答評価

軸索に対して印加した刺激の数と軸索応答の潜時の関係を図 3 に示す。比較的応答までの時間差が短い軸索（細胞体付近）では、刺激によって伝導時間が長くなり、ある刺激回数からプラトーに達した。刺激頻度があるレベルを超えると、伝導が起こらなくなり、プラトー期は観察されなかった（図 3A）。一方、伝導時間の長い部位（遠位部）では、刺激周波数が 10 Hz までは潜時が増加したが、20 Hz で刺激を加えると伝導不全が生じた（図 3B）。伝導不全が一定時間続いたのち、伝導が再度現れ、その時の伝導時間は伝導不全発生の直前と比較して短かった。結果として、伝導時間の振動が現れた。

2) 軸索に対する選択的薬理刺激のためのマイクロデバイスの構築

図 4 に HD-MEA 上の SU-8 微細構造物の顕微鏡写真を示す。構造物は設計値 壁 60 μm 、溝 30 μm に対して実測値 59.6 \pm 0.5、30.5 \pm 0.7 μm であり、精度 1 μm

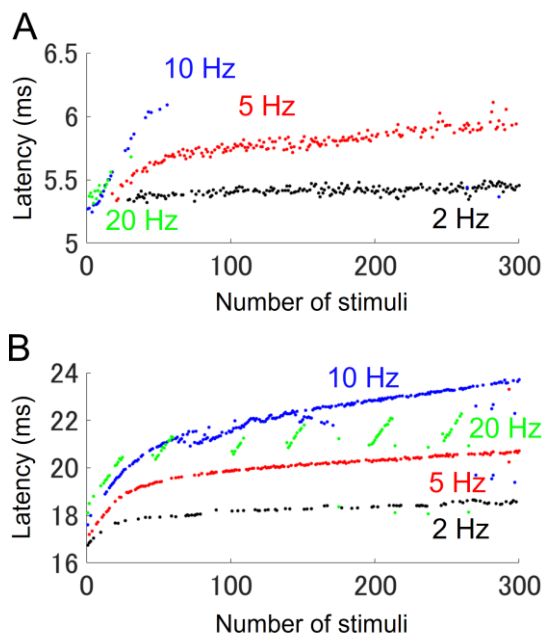


図 3. 連続刺激による伝導時間の変化。A) 細胞体に近い近位部の応答。B) 細胞体から遠い遠位部の応答。20 Hz の刺激により、伝導時間に振動が発生した。

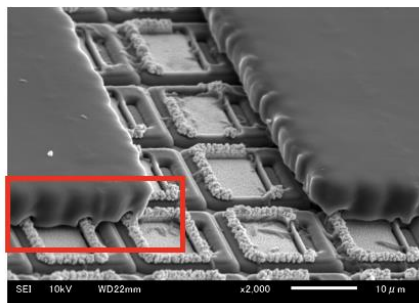
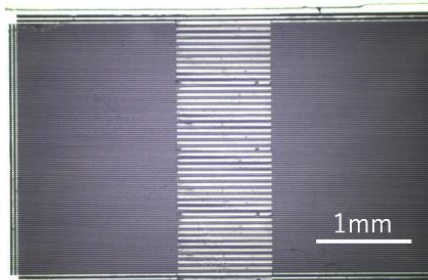


図 4. HD-MEA 上の SU-8 の微細構造物の形状. 上段: 顕微鏡写真. 設計通りの寸法でトンネル構造が形成された. 下段: 電子顕微鏡写真. 赤枠で示した端部の観察より, SU-8 が HD-MEA の電極に入り込み強固に接着されたことが確認できた.

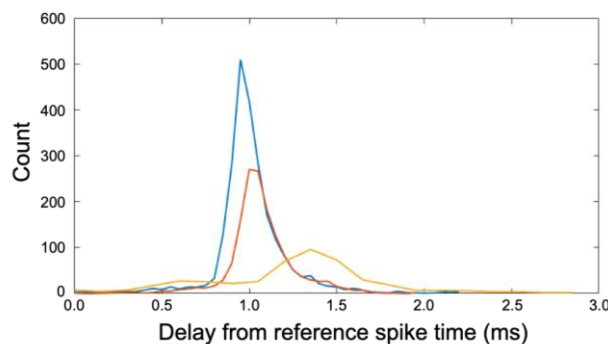
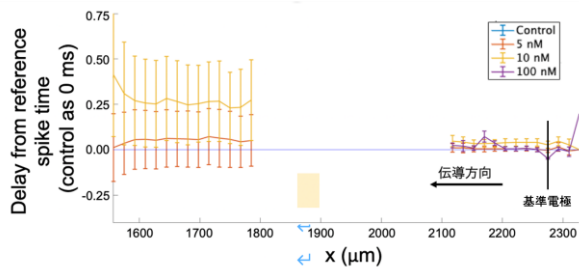


図 5. 3 種類の濃度の TTX による伝導にかかる時間の变化. (上図) Control を 0 ms とした x 座標ごとの伝導の delay. (下図) 基準電極に対して流路の反対側に位置する電極における delay のヒストグラム.

以下の加工が可能であった. また図 4 下図に走査型電子顕微鏡を用いて撮影した SU-8 微細構造物の断面写真を示す. SU-8 が電極の凹凸に噛み合う様子 (図の赤枠) や溝の電極が SU-8 で覆われていないことが確認された.

図 5 上図に x 座標ごとの伝導の delay を Control でのスパイク伝導に要した時間を 0 として算出したものを示す. また下図に代表的な 1 電極 (基準電極に対して流路の反対側に位置する電極) の delay のヒストグラムを示す. 伝導が流路の反対側に到達すると delay が増加し, 増加幅は薬剤濃度に相関した. また流路外 ($1600 < x < 1800$ と $2100 < x < 2300$) では delay が一定であることから, delay の上昇は流路直下のみ薬剤が作用したことを示唆する. 100 nM TTX 注入後の活動では, 流路部分で活動が消失し流路の反対側にスパイクが伝導しなかった. また, 濃度の上昇に相関した delay の増加に従いスパイク毎の delay のばらつきも増加した.

一方で, 流路直下の電極 ($1800 < x < 2100$)からはスパイクが検出できなかった. マイクロトンネルによる信号の増幅は天井の高さに影響されるため, 流路直下の電極でスパイクを検出するには流路の高さが高すぎたと考えられる. 加えて, 流路部分で天井の高さが変わることによるインピーダンスの差により流路の端に位置する電極では波形に歪みが見られた. 流路の高さを最適化し, 流路直下の電極からもスパイクを検出することで, トンネル全体においてスパイクを時空間的に追跡可能になり, 軸索の部位による薬剤の効果の差等も検出可能になると考えられる.

参考文献

- [1] T Sasaki, The axon as a unique computational unit in neurons, *Neurosci Res*, Vol 75, No 2, pp. 83–88, 2013.
- [2] A F Soleng, K Chiu, and M Raastad, Unmyelinated axons in the rat hippocampus hyperpolarize and activate an H current when spike frequency exceeds 1 Hz, *J Physiol*, Vol. 15, No. 552, pp. 459–470, 2003.
- [3] K Chida, K Kaneko, S Fujii, and Y Yamazaki, Activity-dependent modulation of the axonal conduction of action potentials along rat hippocampal mossy fibers, *Eur J Neurosci*, Vol. 41, Issue 1, pp. 45–54, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shimba Kenta, Asahina Takahiro, Sakai Koji, Kotani Kiyoshi, Jimbo Yasuhiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Recording Saltatory Conduction Along Sensory Axons Using a High-Density Microelectrode Array	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 854637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.854637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shimba Kenta, Kotani Kiyoshi, Jimbo Yasuhiko, School of Engineering, The University of Tokyo 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8904, Japan	4. 巻 34
2. 論文標題 Evaluating Axon Conduction Characteristics of Cultured Sensory Neurons Toward Soft Robot Control	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Robotics and Mechatronics	6. 最初と最後の頁 263 ~ 265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20965/jrm.2022.p0263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉谷千恵, 張智翔, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 微細構造物による軸索の活動計測と選択的な刺激方法の検討
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉谷千恵, 張智翔, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 マスクレス露光によるマイクロトンネル構造の形成 軸索の特性評価への応用
3. 学会等名 2022年 電気学会 電子・情報・システム部門大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉谷千恵, 張智翔, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 軸索の機能評価に向けたHD-MEA上へのマイクロトンネル形成
3. 学会等名 令和4年電気学会 医用・生体工学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉谷千恵, 張智翔, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 微細加工を用いた軸索特性評価デバイスの開発
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林透己, 朝比奈昂洋, 古川拓磨, 張智翔, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦
2. 発表標題 神経ネットワークの理解に向けた精密光刺激による機能的結合の直接計測
3. 学会等名 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------