

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K04917

研究課題名(和文)神経細胞ネットワークの構造制御と特性測定

研究課題名(英文)Structural control and characterization of neural network

研究代表者

宇野 秀隆 (Uno, Hidetaka)

名古屋大学・未来社会創造機構・特任助教

研究者番号：70749663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：難病である筋萎縮性側索硬化症(ALS)等の疾患の治療法は限定される。この問題の克服には神経細胞ネットワークの正確な分析技術が必要である。唯一ピペットパッチクランプ法は、細胞の状態を正確に分析できる。ただし、神経回路網は不均一であり、神経回路網内の全細胞の同時測定がこの方法では不可能です。平面パッチクランプ法は、多点測定とハイスループット分析に利点があり、神経細胞ネットワークの機能分析に適用できる。2016年-2019年の科学研究費基盤(C)では神経細胞のネットワーク形成技術とイメージング技術の開発を進めた。それにより基板製作、マイクロ流路製作、神経細胞培養等の要素技術開発の課題解決を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞の特性については、ピペットパッチクランプにより精密な計測が可能となり、膨大な知識が集積されつつある。しかし、ピペットパッチクランプは多点計測が困難なため、非常にヘテロかつ自己組織能力を有する細胞集団からなる神経細胞ネットワークについては、今だ精密な特性の計測がなされた例がない。神経細胞ネットワークをピペットパッチクランプ並みの精密さで多点計測を行うことにより、ネットワークとしての特性をはじめてあきらかにすることは、ネットワークの異常として現れる、多くの神経難病の原因解明や、治療法開発大きく役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Neurological diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are intractable diseases whose causes are unknown and the therapeutics are restricted. To overcome these issues, it has been anticipated to develop precise analysis technology of in vitro neuronal cell network.

Pipette patch clamps can analyze state of cells precisely. But, since in vitro neuronal network is heterogeneous, it is necessary to measure many cells in the neuronal network at the same time, which is impossible with this technique. Planar patch clamp has many advantages in multipoint measurement and high throughput analysis, so attempts have been made to apply them to functional analysis of neuronal cell networks. In 2016-2019 Grant-in-Aid for Scientific Research(C), we advanced the development of neural cell network formation technology and imaging technology. As a result, we solved the problems of element technology development such as substrate fabrication, microchannel fabrication, and neuronal cell culture.

研究分野：マイクロナノデバイス

キーワード：神経細胞ネットワーク プレーナーパッチクランプ 細胞培養 iPS細胞 細胞外マトリックス 運動ニューロン マイクロ流路 マイクロバルブ

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患は100年以上の研究にもかかわらず、原因も確たる治療法も不明である。原因は、患部の脳神経細胞を患者の存命中に採取できないという点にある。この点を補うため、これまで、マウスなどの疾患モデル動物が開発され、膨大な研究がなされたが、動物モデルにおける有効性は、必ずしも臨床試験には反映されていない(すなわちヒトでは期待したほど有効でない)ことが創薬の現場で問題にされている。すなわち、モデル動物ではなくヒトでのハイスループット研究、すなわち *in vitro* でのヒト神経細胞ネットワークの利用が重要であることを意味している。まず、ハイスループットスクリーニングに利用できる、*in vitro* ヒト神経細胞ネットワーク形成技術を早急に開発することが必要であることがわかる。しかし、神経細胞ネットワーク形成については重要な課題が残っている。細胞は遊走するため、凝集しやすい。そのため、面内での均一性が良く、かつ長期培養が可能なネットワーク形成技術がまだ開発されていない現状で、多点計測を必要とするハイスループットスクリーニング技術開発のために早急に開発する必要がある。我々は、(神経細胞のネットワーク形成時の挙動自体はラットやマウスとヒトの神経細胞との間で大きな差異が見られないことから、これまで取り扱いの容易なラット大脳皮質神経細胞を用いて研究を行ってきた)。面内均一性の良いネットワークを形成する目的で基板表面に多数の“柵”を形成し、その柵の中に細胞を設置してネットワークを形成するセルケージ法を開発したが、細胞の面内均一性の観点からは不完全な段階であった。さらに、面内均一性の良いネットワークを形成できたとしても、ハイスループットスクリーニングを実施するために、何を計測するかという課題も残っていた。Ca²⁺イメージングをはじめとする各種のイメージング技術は発達しているが、神経細胞ネットワークの機能を十分に表現しているとは言えない。神経細胞の機能を計測する最も優れた手法としてピペットパッチクランプがあるが、これは多点計測が不可能に近いという問題があった。我々は神経細胞に適用でき、多点計測が可能な培養型プレーナーパッチクランプ法 (T. Urisu et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 2703-2709) を開発し、神経細胞ネットワークからのイオンチャンネル電流の計測にはじめて成功した (H. Uno et al., *Sensors & Actuators B: Chemical*, 193 (2014) 660-668.) が、ネットワーク形成技術が未開発のため、計測される信号の生理学的意味を理解するまでに至っていなかった。このような状況を考慮し、本研究では、面内均一性の良い長期培養が可能な神経細胞ネットワーク形成技術を開発し、プレーナーパッチクランプにより計測されるチャンネル電流信号を解析し、各種イメージング計測と合わせたハイスループットスクリーニング技術の開発を目指す事を目的とした。

2. 研究の目的

アルツハイマーや筋委縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患はいまだに原因不明であり、それにより治療法も不明な難病である。理由は、患者の脳神経を存命中に採取できないという問題以外に、創薬に必要なハイスループットスクリーニング技術がないことも大きな理由である。ハイスループットスクリーニングには多点計測に利用できる神経細胞ネットワークの制御された形成技術が必須である。本研究では、ラット大脳皮質神経細胞を利用し、当グループが発明したセルケージ基板上に再現性の良い神経細胞ネットワーク形成技術を開発し、ハイスループットスクリーニング技術の基盤技術としての神経細胞培養技術を確立する。下記の技術課題を重点的に進めることで。

1. 細胞播種密度が低いので、グリア細胞を活用した安定した培養技術を開発する。

2. 抗体染色、イオンチャンネル電流計測、Ca²⁺イメージングによりネットワークの構造と特性を明らかにする。

3. 遺伝子導入により疾患状態を形成し、上記特性への影響を明らかにする。

4. そのネットワークがハイスループットスクリーニングに利用できることを実証する。

上記の技術課題を重点的に進めることで神経系疾患難病の原因解明や創薬に必須な精度の高いハイスループットスクリーニング技術の開発を目指す事を目的とした。

3. 研究の方法

本研究にあたり3つの課題に重点を置き遂行した。(1) “多点計測用単位ネットワーク”を確立する工程、(2)このネットワークから定常的にイオンチャンネル電流を計測できるようにすること、および(3)測定されたシナプス自然放出電流を解析すること、の3点であった。(1)については、細胞が育ちにくい低密度培養で、かつ興奮性と抑制性を識別して選択播種が不可能であることから、ある程度、多様かつ多数のネットワークを形成し、特徴を分類する方針で進めた。(2)については、セルケージの構造パラメータをふって、チャンネル電流がほぼ確実に測定できる、すなわち細胞が必ず計測点の上にくるようにした。(3)については、上記の(1)の分類にそって、各種アンタゴニストを活用し、測定信号の起源などを解明した。

4. 研究成果

(1) “多点計測用単位ネットワーク”の確立

神経細胞の培養はネットワークが成熟に形成されるまでに、約3週間必要であり、抗体染色やCa²⁺イメージング計測用のサンプルが少ない時期に、十分な数の播種基板(セルケージ基板)を

製作した。ネットワークのパターン形状については、主要パラメーターである、播種する細胞の数と細胞と細胞の間隔を、これまでの経験を反映して設定して、数種類のパターンを決めた(図1)。ある程度の数のネットワークのサンプルの準備後、Ca²⁺イメージングの測定を開始した。Ca²⁺イメージングで自然発火の観測がされたら、それは成熟したネットワーク、すなわち十分な数のシナプスが形成されていることを意味するので、その中からできるだけシンプルで細胞数の少ないパターンを選択した。上記の選別したパターンについて、抑制性細胞と興奮性細胞の識別の染色を行った。さらにシナプシン染色、チューブリン染色などを行い、選別したネットワークの構造を決定した。これらの結果を総合して、“多点計測用単位ネットワーク”を確立した。

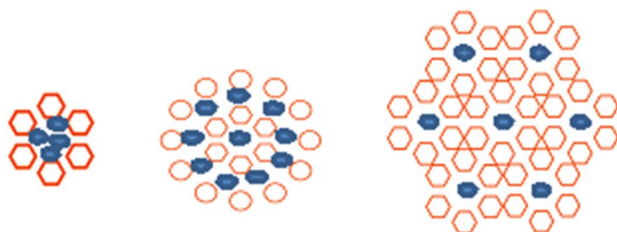


図1のセルケージパタンの例
赤丸はケージを構成する柵の柱。青丸は播種された細胞。左端は柵の中に複数の細胞を播種するケース。中央は外側の領域に複数の細胞を播種。

(2) 多点計測用単位ネットワークから定期的にイオンチャンネル電流の計測決定した“多点計測用単位ネットワーク”について、セルケージの細胞播種領域(柵の内側の領域)の面積をパラメータとして変えて培養を行い、柵の内側にある微細貫通穴(計測点)の上に細胞がほぼ確実に位置する最適条件を決定した。基板への細胞播種について興奮性細胞と抑制性細胞の識別播種が不可能なこと、また播種する細胞数の精密な制御が不可能に近いことを考慮し、数十程度のネットワークを形成し、チャンネル電流計測、Ca²⁺イメージング計測を行い、抗体染色の結果ともあわせて決定し、そのサンプルと並行して準備したサンプルを用いて定常的なイオンチャンネル電流の計測を行った。

(3) 測定されたシナプス自然放出電流の解析

計測されるチャンネル電流信号としては、(a)シナプス前膜から自然放出される神経伝達物質によるシナプス電流、(b)およびこれが蓄積し脱分極が誘起されて生ずる自然発火によるチャンネル電流が予測された。シナプス密度が大きくなると多数のパルス状信号が重なってしまい、解析が困難であった。Ca²⁺イメージングにおいては(シナプス電流によるCa²⁺イオンの増大は弱くて明確には検出しにくい)自然発火によるCa²⁺イオンの増大および、代謝型受容体の刺激に伴って生ずる、細胞内の小胞体やミトコンドリアからのCa²⁺の放出やCa²⁺イオンの振動などが観測された。これらは、細胞播種と引き続き自己組織化の後、錐体細胞とインターニューロン(すなわち興奮性細胞と抑制性細胞)がどのように配置されるかにより電流信号とCa²⁺濃度信号の様子が変わる。このネットワーク構造と観測された信号の特徴を解析し、ネットワークパターンとの相関も含めたネットワークの特性として分類した。

これまでの成果をヒトモデルに発展させるため、iPS細胞技術を利用し、ヒト神経細胞を用いたin vitroでの神経細胞ネットワークを形成目指し、ヒト神経細胞に適用した新たな培養及び播種方法の開発を行った。具体的には同一のiPS細胞から、大脳皮質神経細胞と運動ニューロン、グリア細胞への分化誘導技術を開発し、セルケージの内部の単一細胞を運動ニューロンとした、ヒト単一細胞ネットワークモデルを基板上にて形成させた。基板上でのiPS細胞の分化誘導は既に確立されている細胞培養皿を用いたケースと異なり困難を極めたが、細胞外マトリックスの再検証の結果、従来のPLLコーティングと比較しPEI+iMatrixのコーティングにより均一な単層培養が可能である事が判明した。低雑音の精度の高いイオンチャンネル電流測定のためには、更に低密度で培養する必要がある。そこで播種方法について(A)運動ニューロン前駆細胞の直接播種法と(B)プライミングした運動ニューロンの再播種法の二通りの播種法を検討した結果、現時点でイメージング観察結果から神経軸索の成長過程においてヒト単一細胞ネットワークモデルとしてはプライミングした運動ニューロンの再播種法が最適であると判明した。今後はこれまでの確立した技術を用いて本研究の本願である筋委縮性側索硬化症(ALS)の研究に供することを旨とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 宇理須恒雄、王志宏、宇野秀隆、栗田裕子	4. 巻 36巻3号
2. 論文標題 培養型プレーナーパッチクランプを用いた神経細胞ネットワーク診断プラットフォームの開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 バイオマテリアル - 生体材料 -	6. 最初と最後の頁 208-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Y. Nagaoka, Z-H. Wang, H. Uno, T. Urisu
2. 発表標題 Fabrication of incubation type planar patch clamp device
3. 学会等名 13th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (ISNM2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Bhardwaj, PT. Trong, S. Isigaki, H. Uno, Z-H. Wang, Y. Ukita, S. Iwabuchi, S. Hashimoto, T. Oka, K. Kawahara, G. Sobue, T. Urisu, D. Hirose, Y. Takamura
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF PZT ACTUATOR ARRAY ON AN ACTIVE-MATRIX OXIDE TFTS FOR SINGLE CELL SPATIAL TRANSCRIPTOME AIMING NEURODEGENERATIVE DISEASE
3. 学会等名 The Twenty Third International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長岡靖崇、王志宏、宇野秀隆、高田紀子、栗田裕子、宇理須恒雄
2. 発表標題 培養型プレーナーパッチクランプにおけるシール抵抗とシリーズ抵抗
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇野秀隆、高田紀子、王志宏、近藤聖彦、浮田芳昭、高村禪、宇理須恒雄
2. 発表標題 高性能マイクロ流路バルブシステムの開発
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗田裕子、宇野秀隆、王志宏、宇理須恒雄
2. 発表標題 The effect of ECM on the seal resistance in the neuron network channel current measurements using incubation type planar patch clamp
3. 学会等名 ナノ学会 第16回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王志宏、宇野秀隆、栗田裕子、高田紀子、宇理須恒雄
2. 発表標題 Influence of the neuron primary culture density on the synapse spontaneous channel current
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗田裕子、王志宏、宇野秀隆、坂内博子、李艶君、宇理須恒雄
2. 発表標題 チャンネル電流計測において、細胞外マトリックスがシール抵抗値に及ぼす影響
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇野秀隆、高田紀子、王志宏、栗田裕子、近藤聖彦、浮田芳昭、高村禪、宇理須恒雄
2. 発表標題 グレースケール露光によるマイクロ流路バルブの開発と性能評価
3. 学会等名 第79回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 王志宏, 宇野秀隆, 栗田裕子, 高田紀子, 中尾聡, 上田正, 浮田芳昭, 高村禪, 中山章弘, 宇理須恒雄
2. 発表標題 培養型プレナーパッチクランプの製作と自発的シナプス電流測定への応用
3. 学会等名 第65回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗田 裕子、宇野 秀隆、王 志宏、宇理須 恒雄
2. 発表標題 in vitro初代培養神経細胞ネットワーク形成における インターニューロン密度制御の自然発火への影響
3. 学会等名 第64回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王志宏, 宇野秀隆, 栗田裕子, 中尾聡, 高田紀子, 鈴井光一, 宇理須恒雄
2. 発表標題 Control of micropore fine structure in the incubation type planar patch clamp chips
3. 学会等名 第64回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇理須恒雄, 王志宏, 栗田裕子, 高田紀子, 鈴木光一, 宇野秀隆
2. 発表標題 Neuronal Network High Throughput Screening Device
3. 学会等名 BIT's 5th Annual Conference of AnalytiX-2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王志宏, 宇野秀隆, 栗田裕子, 高田紀子, 中尾聡, 宇理須恒雄
2. 発表標題 Micropore structure optimization of incubation type planar patch clamp chips
3. 学会等名 第77回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 栗田裕子, 宇野秀隆, 王志宏, 吉村由美子, 小松由紀夫, 宇理須恒雄
2. 発表標題 ハイスループットスクリーニング装置用神経細胞ネットワークの形成とセルケージ内細胞種の判定
3. 学会等名 第77回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 王志宏, 宇野秀隆, 栗田裕子, 中尾聡, 高田紀子, 青山正樹, 鈴木光一, 中原康, 杉浦広峻, 長谷川貴之, 新井史人, 山本英明, 宇理須恒雄
2. 発表標題 ボッシュプロセスによるプレナーパッチクランプチップの製作及びよく制御された神経細胞ネットワーク結成
3. 学会等名 ナノ学会第14回大会
4. 発表年 2016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
研究 分担 者	王 志宏 (Wang Zhi Hong) (20377980)	名古屋大学・未来社会創造機構・特任助教 (13901)	