

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：92704

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17499

研究課題名(和文) 基板弾性の可逆的制御による人工神経回路の構築

研究課題名(英文) Fabrication of artificial neural network by reversibly controlling elastic properties of a hydrogel substrate

研究代表者

田中 あや (Tanaka, Aya)

日本電信電話株式会社 NTT 物性科学基礎研究所・機能物質科学研究部・研究主任

研究者番号：80564278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体情報伝達を担う中枢神経系の神経回路形成において、細胞外環境の力学的特性が及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。本研究では、神経回路形成の初期段階である神経突起形成に着目して検討を行った。研究の第一段階として、生体内の力学的特性を模倣した、弾性率が空間的に制御されたハイドロゲルを作製手法を確立した。このハイドロゲル基板上で神経細胞を培養することにより、基板の弾性率が神経細胞の成長・機能形成に影響を与えることを明らかにした。本結果は、再生医療やブレインマシンインターフェースの材料開発のための *in vitro* モデルとしての利用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This research aims to reveal how the mechanical properties of the extracellular microenvironment affect neural network formation in the CNS. Here, I focus on neurite initiation from a cell body, which is known to be the first step towards forming a functional nervous network. For this purpose, stiffness-controlled hydrogel substrates were prepared. It was found that the neurite initiation depended on an elastic properties of the hydrogel substrate. This result provides an insight for developing a scaffold for designing a compliant interface between tissue and a device such as a brain-machine interface.

研究分野：生体関連高分子

キーワード：メカノバイオロジー 神経細胞 ハイドロゲル ヤング率

1. 研究開始当初の背景

生体情報伝達を担う中枢神経系は、生体内の様々な環境変化に応答することで複雑な神経回路を形成している。そのため、神経回路を形成するメカニズムの解明を目指し、細胞外環境の変化に対する神経細胞の応答に関して多くの研究がなされてきた。その中で近年、細胞外環境の力学的物性が神経系の分化や成長などに影響を及ぼすことが明らかになってきた。例えば、脳組織切片の弾性マッピングでは、弾性分布が不均一であることや、組織の成熟に応じて弾性が動的に変化することが明らかにされており、細胞外環境の力学的物性が神経機能に関与していることが示唆されている。*in vitro* 系では、任意の硬さに設計したエラストマーやハイドロゲルを用い、基板弾性の違いが神経細胞の接着や分化・成長に与える影響についての検討が行われている。しかしながら、*in vivo* では組織弾性は不均一であり、成長や環境変化に応じて可逆的に変化していくため、生体内の力学的物性の役割を *in vitro* 系で検討するためには、弾性を局所的かつ可逆的に制御可能な培養基板が求められている。

2. 研究の目的

上述に示す背景より、弾性を局所的かつ可逆的に制御可能な培養基板を用い、神経細胞が細胞外環境の力学的物性変化を認識し、成長していくメカニズムを解明することが最終目標である。

これまでに、均一な弾性率のハイドロゲル基板を用いて神経細胞を *in vitro* で培養し、その時の神経突起形成を検討した報告がある。しかしながら、神経細胞の種類が異なること、および、基板表面の細胞接着分子が異なることから、実験系によって結果が異なっている。

そこで本研究では、神経細胞の成長・機能形成の初期段階である神経突起形成に着目し、神経突起形成時における細胞外環境の力学的物性の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、海馬の神経細胞を用いた。文献より、海馬組織の弾性率が 1 kPa 程度であることが報告されており、これを基準として任意の弾性率を有するハイドロゲル基板を作製した。ハイドロゲルは、アクリルアミドとビスアクリルアミドの混合溶液から作製し、弾性率はビスアクリルアミドの濃度によって調整した。このハイドロゲル前駆体水溶液をビニル化カバーガラスと酸素プラズマ処理を行ったカバーガラスで挟み込み、360 nm の光を 10 mW/cm²、10 分間照射することでゲル化を行った。弾性率分布を有するハイドロゲルの作製する場合には、ハイドロゲル前駆体水溶液に対してフォトマスクを設置し、360 nm の光を 100 mW/cm²、2 分間照射

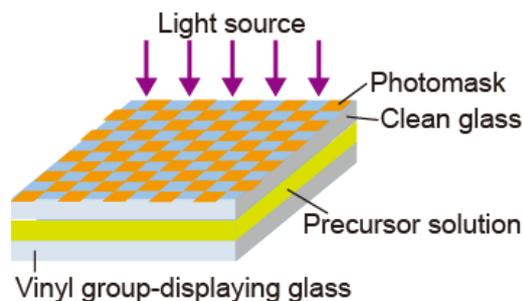


図 1. 弾性率分布を有するハイドロゲル基板の作製方法。

することによってゲル化を行った (図 1)。作製したハイドロゲルの表面をポリ-D-リジン (PDL) で修飾後、神経細胞の培養を行った。作製したハイドロゲルの弾性率は原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて評価した。

神経突起形成は calcein-AM による生細胞の蛍光イメージングから検討し、細胞骨格構造を 4% PFA 固定後 F-actin を Phalloidin で染色した神経細胞の観察によって検討した。

4. 研究成果

任意の弾性率のハイドロゲル基板上での神経細胞の神経突起形成を検討した。神経突起が未形成の神経細胞を stage 1 とし、各基板上の全神経細胞中の stage 1 の細胞の割合を図 2 に示す。ハイドロゲル基板の弾性率が

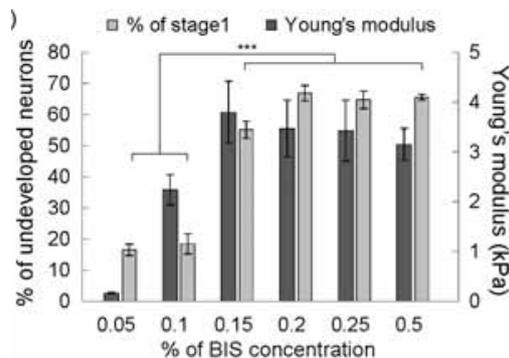


図 2. ハイドロゲル基板の弾性率と神経突起形成の関係。

2 kPa を閾値として、より高弾性率の基板上では神経突起形成が抑制されることが示された。このメカニズムを明らかにするため、神経突起の主構成成分の 1 つであり、突起形成時に大きな構造変化が起こることが知られている F-actin に注目した。ビスアクリルアミド濃度 0.05% 及び 0.5% の時のハイドロゲルをそれぞれ soft 基板と stiff 基板とし、各基板上の神経細胞の細胞骨格構造を共焦点顕微鏡によって観察した (図 3)。その結果、stiff 基板上の神経細胞では actin meshwork および actin arc と呼ばれる F-actin 構造が細胞体の辺縁を取り囲むように形成しており、これが突起形成を抑制していることを明らかにした。

次に、フォトマスクを用いて弾性率分布をもつハイドロゲル基板（パターン基板）を作製した（図4）。形状像が示すように、ハイド

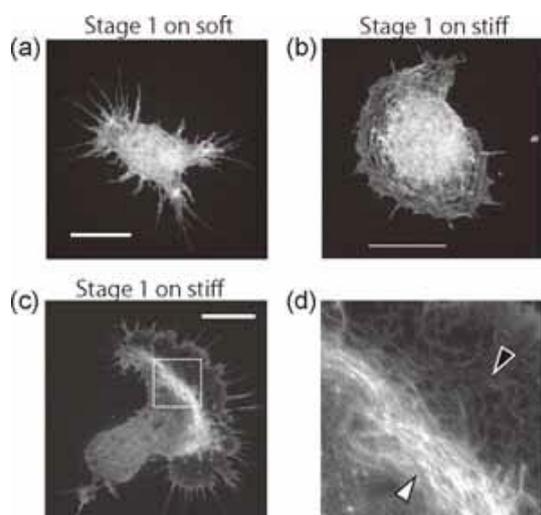


図3. ハイドロゲル基板上的の Stage 1 神経細胞の F-actin 構造. (a) Soft 基板上, (b, c, d) stiff 基板上の神経細胞. (d)は(c)の白点線で囲われた領域の拡大図. 白矢印は actin arc 構造, 黒矢印は actin mesh 構造を示す.

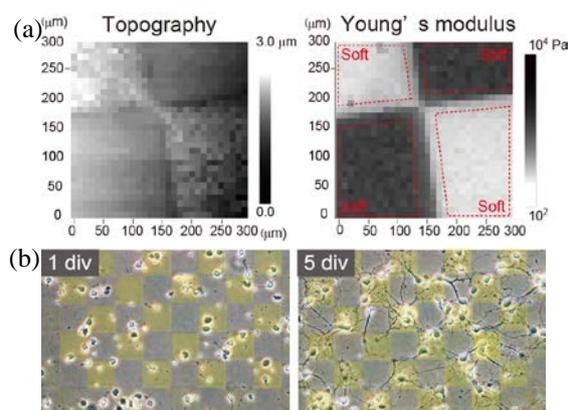


図4. 弾性率分布を有するハイドロゲル基板上的での神経細胞の接着. (a)AFM による形状及びヤング率計測結果. (b)基板に接着した神経細胞の位相差顕微鏡による観察結果. 黄点線内は高弾性率領域を示す. 黄枠の1辺は 62.5 μm.

ロゲル基板は各弾性率領域の高低差が数百 nm であり、細胞レベルでは平坦な基板と考えられる。基板の凹凸は平坦な一方で、弾性率は相対的に高弾性率な領域（3.5 kPa）と低弾性率な領域（2.0 kPa）に分布しており、高弾性率領域は上述の均一な弾性率のハイドロゲル基板においては神経突起形成が抑制される弾性率に相当することを確認した。この基板上で神経細胞を培養した結果、神経突起形成の弾性率依存性は観察されなかった。一方で、神経細胞の細胞体は高弾性率領域により多く接着していることが分かった。この結果から、弾性率の絶対値だけでなく、弾性

率の空間的な分布が神経突起形成に影響を与えることが示された。

以上から、弾性率が神経細胞の成長・機能形成に影響を与えることが示された。本研究で作製したハイドロゲル基板は、弾性率および弾性率分布のパターンをハイドロゲル前駆体溶液の組成およびフォトマスクによって任意に調整可能である。そのため、生体組織の弾性率分布を模倣することで、再生医療やブレインマシンインターフェースの材料開発の *in vitro* モデル基板としての利用が期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計1件）

Aya Tanaka, Yuki Fujii, Nahoko Kasai, Takaharu Okajima, Hiroshi Nakashima, Regulation of Neuritogenesis in Hippocampal Neurons using Stiffness of Extracellular Microenvironment, PLOS ONE 誌, 査読有, Vol. 13, No.2, 2018, e0191928

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191928>

〔学会発表〕（計6件）

- ① 廣野航平, 田中あや, 藤井裕紀, 松本悠暉, 中島寛, 岡嶋孝治, 細胞集団運動測定に利用可能な硬さパターンゲル基板の作製, 第 65 回応用物理学会春季学術講演会
- ② 松本悠暉, 田中あや, 廣野航平, 藤井裕紀, 中島寛, 岡嶋孝治, 蛍光高分子ゲルを用いた細胞牽引力顕微鏡の開発, 第 65 回応用物理学会春季学術講演会
- ③ Aya Tanaka, Yuki Fujii, Nahoko Kasai, Takaharu Okajima, Hiroshi Nakashima, Mechanical regulation of neurite outgrowth of hippocampal cells by controlling substrate stiffness, MRS fall meeting
- ④ 田中あや, 藤井裕紀, 河西奈保子, 岡嶋孝治, 中島寛, 細胞外微小環境の弾性率による神経突起形成の制御, 第 78 回応用物理学会秋季学術講演会
- ⑤ 田中あや, 藤井裕紀, 河西奈保子, 岡嶋孝治, 中島寛, 基板の弾性制御による神経細胞の成長制御, 第 66 回高分子学会年次大会
- ⑥ 田中あや, 藤井裕紀, 河西奈保子, 岡嶋孝治, 中島寛, 基板の弾性率分布のパターニングによる神経細胞の成長制御, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：細胞培養材料、細胞モデル、及び細胞培養材料の製造方法

発明者：田中あや、手島哲彦、中島寛、岡嶋孝治、藤井裕紀

権利者：日本電信電話株式会社および北海道大学

種類：特許

番号：特許願 2017-032733 号

出願年月日：2017 年 03 月 18 日

国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 あや (TANAKA, Aya)

日本電信電話株式会社・NTT 物性科学基礎
研究所・機能物質科学研究部・研究主任
研究者番号：80564278

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()