

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19200036

研究課題名(和文) 時空間精密電気刺激による細胞機能の計測と制御

研究課題名(英文) Measurement and control of cellular functions
using spatio-temporal electrical stimulation

研究代表者

神保 泰彦(JIMBO YASUHIKO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20372401

研究成果の概要(和文)：

時空間的に制御した電気刺激パターンの印加により細胞群に誘導される変化を調べた。心筋細胞に対する半日間の連続刺激により拍動リズムの引き込み現象が起こること、神経細胞に対する時空間的な刺激パターンの履歴が誘発応答に反映されることがわかった。また、幹細胞について多数の胚様体を同時刺激するマイクロデバイスを開発した。電気刺激の時空間パターンを精密に設計することにより、急性・慢性両面において生体现象を人為的に制御する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

Modification of cellular activity induced by spatio-temporal electrical stimulation was studied. Continuous application of 2 Hz stimulus for 12 hours elicited approximately the same contraction rhythm in cultured cardiomyocytes. In cultured cortical neurons, the history of spatio-temporal stimulation was reflected in their evoked responses. A novel microcavity-array device was developed for ensemble stimulation of embryoid bodies of stem cells. Intracellular calcium transients were elicited by the stimulus, which would be promising as a tool for regulating cell differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	17,700,000	5,310,000	23,010,000
2008年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
総計	38,000,000	11,400,000	49,400,000

研究代表者の専門分野：神経工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体情報・計測，電気刺激，細胞

1. 研究開始当初の背景

不整脈治療に対する自動体外式除細動器(Automated External Defibrillator, AED)の普及が示すとおり、生体電気現象の制御に対する電気刺激の有効性は広く認められていた。一方で、心臓拍動リズムに対するより低侵襲な刺激システムの開発に対する要求があり、

また脳神経系に対する電気刺激が短期的、長期的にどのような作用を及ぼすかについて様々な方面から研究が進められている状況であった。例えば、記憶と学習の神経機構として有力な候補と考えられているシナプスの長期増強(Long-term potentiation: LTP)、長期抑圧(Long-term depression: LTD)の誘導に

は高頻度刺激が広く用いられているが、これらシナプス特性の可塑的な変化が神経回路活動、さらには生体としての機能にどのように反映されるかは明らかにされておらず、分子-細胞-細胞集団という階層構造において「ミクロな現象がどのように統合されてマクロな機能として発現するか」が1つの重要な視点であると考えられていた。

細胞単体にとどまらず、その集団の長期的な振る舞いを可視化する手段として、申請者のグループでは集積化電極アレイ (Micro Electrode Array: MEA) の開発を進めていた。この手法は、主として電子デバイス分野で発達した微細加工技術を利用して製作する電極アレイ付き細胞培養皿であり、細胞群の電気活動を長期間非侵襲的に計測できる他、時空間的に様々な電気刺激パターンを設計して印加することが可能という特徴を有する。後者の特徴を積極的に利用することにより、心筋、神経、幹細胞等様々な細胞群に対する電気刺激の効果を短期・長期両面から理解する道が開かれると考えた。

2. 研究の目的

神経・心筋細胞等電氣的にアクティブな組織を対象に個々の細胞を可視化した細胞集団を *in vitro* 系に構成し、単一細胞のレベルで時空間的に精密に制御した電気刺激を印加してその効果につき調べる。このような時空間精密電気刺激の効果は短期的な細胞興奮現象の誘導にとどまらず、長期的・慢性的な遺伝子発現過程に関与する可能性があると考えるのが本研究の立場である。時空間精密電気刺激の効果を、短期的な細胞群興奮制御 (心筋細胞系)、中期的な神経回路可塑性の誘導 (大脳皮質神経系)、長期的な遺伝子発現制御 (心筋細胞・神経細胞両者への分化能を有する P19 細胞系) という3つの具体的な課題を設定する。(1) 不整脈治療の視点から精密電気刺激の効果を検証する、(2) 神経回路可塑性における複数情報の統合過程に関する知見を得る、(3) 物理刺激による細胞分化・遺伝子発現制御技術の開発、を本研究の目的とする。得られた時空間精密電気刺激の効果を総合的に評価し、物理現象として説明できる要素と細胞内代謝系の活動を伴う要



図1 集積化電極基板
(MicroElectrode Array: MEA)

素を区別して理解、将来的な医療応用に向けた検討課題の提示を目指す。

3. 研究の方法

(1) 時空間精密電気刺激系の製作

64個のマイクロ電極を集積化したMEA基板上で細胞培養を行い、時空間的に制御した電気刺激を印加するシステムを製作した。MEAの写真を図1に示す。ガラスリング内が細胞培養用シャーレになっており、底面中央付近に細胞電気活動計測用マイクロ電極が集積化されている。個々の電極は先端の計測部分のサイズが $30 \times 30 \mu\text{m}$ 、表面を白金黒でコーティングして電気刺激、細胞電気活動記録に適したインピーダンスを調整した。刺激信号入力系と細胞電気信号計測系との自動切り替え制御により、刺激入力点を含めて誘発応答の全過程が記録できるシステムとして構成した。

(2) 細胞培養

心筋細胞、神経細胞、幹細胞の3種類の細胞群をMEA基板上で培養した。手順の概要を以下にまとめる。

心筋細胞は2-3日齢のWistar Rat新生児から採取した。心室組織片を1mm以下に細切した後、酵素処理とピペッティングにより細胞1つ1つに単離した。さらに $70 \mu\text{m}$ 孔径セルストレイナーを通し、細胞培養フラスコに入れて20分間培養して線維芽細胞を除去、心室筋細胞の懸濁液としてMEA上に播種した。神経細胞は胎齢18日のWistar rat胎児から採取した。採取した大脳皮質組織を細切した後、酵素処理とピペッティングにより単離

した。培養液はウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) 10% を含む DMEM とし、2 日毎に半量交換することで培養環境を維持した。幹細胞としては心筋、神経両組織への分化能を有する P19 胚性腫瘍細胞株を用いた。未分化の P19 細胞は 10% FBS と Penicillin-Streptomycin を添加した α -MEM 中で培養した。継代培養 2 日目に増殖した細胞を酵素処理によって回収、神経分化誘導は、胚様体 (embryoid body; EB) を形成した状態の P19 細胞群をレチノイン酸 (retinoic acid; RA) 存在下で 4 日間浮遊培養を行うことにより実施した。分化誘導した P19 細胞をポリエチレンジアミン (polyethyleneimine; PEI) コーティングした MEA 基板上に播種した。

(3) 電気刺激と細胞電気活動記録

刺激入力点の選択と刺激信号強度、タイミングは PC からのプログラム制御とした。心筋細胞群に対しては、誘発応答が認められる刺激強度、刺激入力点を決定した後、周期 2 Hz を一定とし、継続時間をパラメータとする刺激を印加し、刺激前後の自律拍動リズムを比較した。拍動リズムは画像計測、細胞外記録による活動電位計測、細胞内 Ca 濃度変化計測を併用して評価した。神経細胞群に対しては、2 点からの刺激入力のタイミング (時間遅れ) をパラメータとする誘発応答記録を中心に実験を実施した。幹細胞に対しては、多数の EB を 1 枚の基板上に配列させる電極付きマイクロデバイスを試作、印加した電気刺激により誘起される細胞内 Ca イオン濃度変化を指標に評価を行った。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞群に対する電気刺激の効果

心筋細胞群は培養開始から数日で自律同期拍動が観測される。この時点で記録される拍動は試料によりその周期が異なる。これらの系に 2 Hz の電気刺激を印加することにより生じる変化を評価した。12 時間継続して刺激を印加した場合の結果を図 2 に示す。初期状態において 4 つの試料で 1.3-12.3 秒と大きな差異が認められたものが、刺激後は印加した刺激周期に近いリズムに収束している様子がわかる。個々の試料毎のリズム変動についても顕著な減少が認められ、慢性電気刺激により安定したリズムを誘導できる可能性が示された。有効な誘導効果を得る条件 (刺激継続時間、刺激間隔等) を明らかにすることが今後の課題である。

心拍リズムは自律神経系による制御を受けており、不整脈発生メカニズムの解明、治療方法の確立に向けて神経系を含めた制御が望ましい。今回、1 枚の MEA 基板上に 2 つの細胞培養区画を設け、一方に心筋細胞、他方に交感神経細胞 (上頸神経節細胞) を播種して共培養系を構成した。免疫染色法の適用により、交感神経細胞側から心筋細胞側への突起伸長とシナプス結合形成を確認した。また、交感神経細胞群に対する電気刺激印加に対応した心筋細胞拍動の亢進が観測された。 β 受容体に対するアンタゴニスト (propranolol) 投与によりこの応答が抑制されたことから、この共培養系が自律神経-心筋細胞系の拍動制御観測系として有効であることが示された。

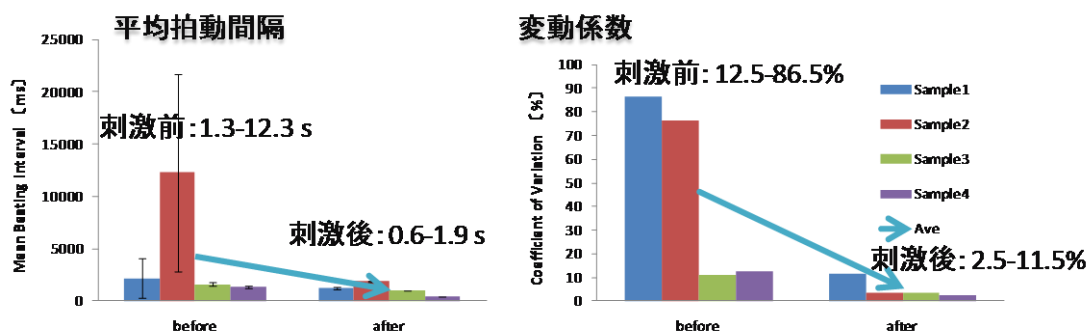
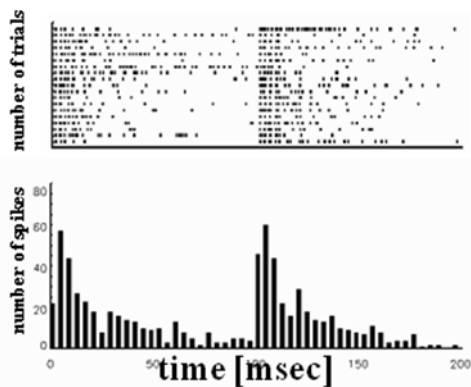


図 2 電気刺激による培養心筋細胞拍動リズムの誘導

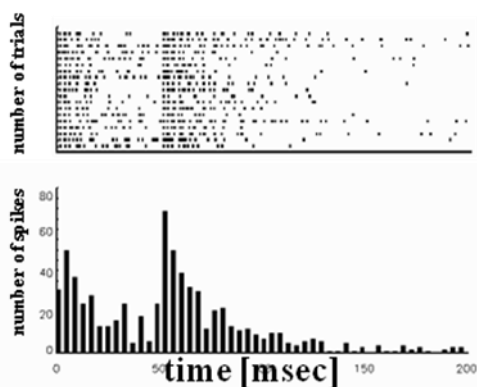
(2) 神経系に対する電気刺激の効果

入力信号の時空間的なパターンの履歴が神経回路応答に変化を生じるかどうか注目した実験を行った。最初に2つの電極を選択し、各点からの入力に対する応答を記録する。ついで「両方の入力がわずかな時間差をもって繰り返し印加される」という状況を作り、この経験後に各点からの入力に対する応答に変化が生じるかどうかを調べた。時間差

(A) A&B100



(B) A&B50



(C) A&B10

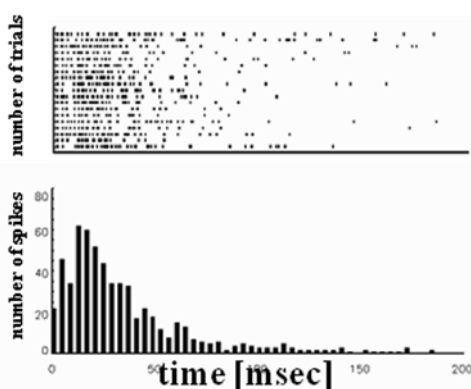


図3 2点刺激により誘起された神経活動

は±100 ms の範囲で変化させた (2つの入力点 A, B に対して B 点からの刺激が A 点からの入力の 100 ms 後に印加される状態から、この時間遅れを 50, 20, 10 ms と段階的に短くし、0 ms (同時入力) を経て、逆に B からの入力が先行するパターンを経験させた)。誘発応答の一例を図3に示す。時間遅れ 100, 50, 10 ms の設定に対して記録された活動をラスター表示及びヒストグラムとして表示している。100, 50 ms の時間遅れに対しては2つの誘発応答が明確に分離した結果になっており、10 ms に対しては両者の重なりが顕著に認められる。

A 点からの刺激に対する誘発応答において、A, B という順序での2点刺激を繰り返し経験した後、刺激印加後数 10 ms の成分が増えるという結果が得られた。このとき B 点からの刺激に対する応答に有意な変化は認められなかった。2つの事象が一定の相関関係を維持した状態で繰り返し経験されることにより、一方の入力のみで他方に対する応答も含む活動が誘起される可能性を示すものと考えている。段階的な時間遅れに対して定量的に対応した成分の増強、A, B の順序を逆転した場合の履歴の反映については今後さらに検討を要する。

(3) 幹細胞系に対する電気刺激

多数の EB を電極基板上に配列させて電気刺激を印加するデバイスを開発・製作した。直径 200 μm のマイクロキャビティを 17×17 のアレイ状に配置したデバイスの SEM 写真、各ウェルに EB を挿入した状態で電気刺激を行った際の細胞内 Ca イオン濃度変化計測結果を図4に示す。Ca イオン濃度測定は Fluo-4 を指示薬とする蛍光画像取得により実施した。図では9つのウェルの蛍光画像及び各ウェル内から抽出した1つの細胞における Ca イオン濃度変の時間変化を表示している。4回の電気刺激印加に対してそれぞれ Ca イオン濃度上昇が認められ、初期状態に復帰するまで5分以上を要する現象であることがわかる。細胞内 Ca イオン濃度の上昇は、電気刺激が細胞の代謝反応を誘起するトリガとなる可能性を示唆するものであり、現時点で標準的な手法とされている試薬 (RA) による分

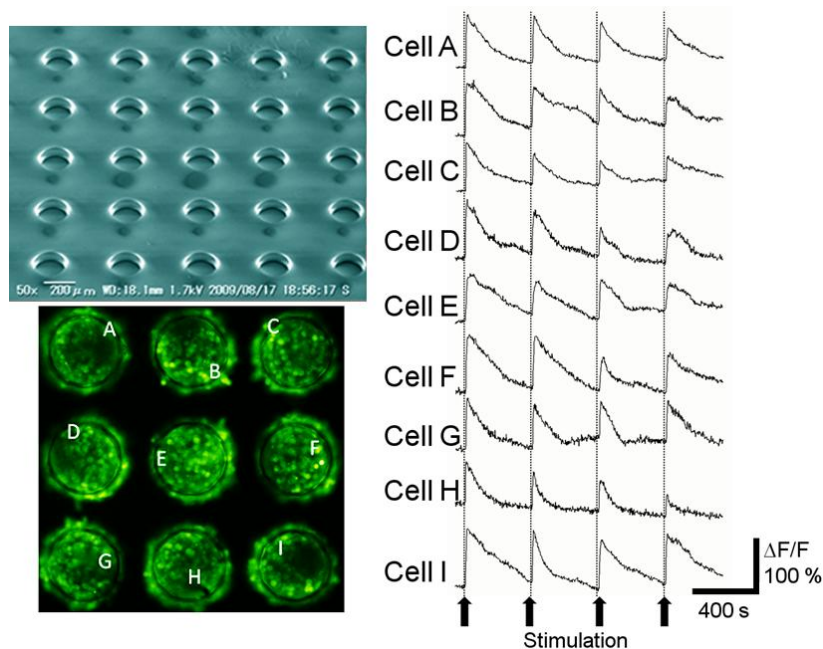


図4 マイクロキャビティアレイによる胚様体電気刺激

化誘導に対して発現する遺伝子群を指標に、様々な電気刺激パターンの印加で誘導される遺伝子発現を解析することにより、電気刺激の細胞分化過程に対する影響、人為的な制御の可能性に関する知見を得ることが期待できる。

(4) 総括

心筋細胞、神経細胞、幹細胞という3種類の細胞群に対して時空間的に精密制御した電気刺激を印加し、短期的な膜興奮現象、中期的な可塑性、長期的な細胞内代謝過程という3つの視点からその効果を調べた。低侵襲不整脈治療手法の開発に向けた医療応用への展開、シナプス可塑性と脳における記憶・学習機能を結ぶ神経回路レベルでの現象解明に向けた学術的な進展が期待できる結果を得た。再生医療の基礎としての物理的な手法による細胞分化制御の可能性につき、今後さらに検討を進める。

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 28 件)

- ① Takeuchi A., Nakafutami S., Tani H., Mori M., Takayama Y., Moriguchi H.,

Kotani K., Miwa K., Lee J., Noshiro M., Jimbo Y., Device for co-culture of sympathetic neurons and cardiomyocytes using micro-fabrication, Lab Chip, 査読有, DOI: 10.1039/C0LC00327A, 2011

- ② Takayama Y., Saito A., Moriguchi H., Kotani K., Jimbo Y., Ensemble recording of electrical activity in neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells, Electron. Commun. Jpn., 査読有, 94, pp. 9-19, 2011

- ③ Takeuchi A., Moriguchi H., Kotani K., Miwa K., Lee J., Noshiro M., Jimbo Y., Development of Spatially-separated co-culture system of the sympathetic neuron and the cardiomyocyte, IEEJ Trans., 査読有, 6, pp. 151-156, 2011

- ④ Saito A., Takayama Y., Moriguchi H., Kotani K., Jimbo Y., Effects of extremely low frequency magnetic fields on neuronal development of P19 embryonal carcinoma cells, IEEJ Trans., 査読有, 6, pp. 157-162, 2011

- ⑤ Suzurikawa J., Kanzaki R., Nakao M., Jimbo Y., Takahashi H., Optimization of thin-film configuration for light-addressable stimulation electrode holdings, Electron. Commun. Jpn., 査読有, 94, pp. 61-68, 2011

- ⑥ Takayama Y., Moriguchi H., Kotani K., Jimbo Y., Spontaneous calcium oscillations in cultured cortical networks during development, IEEE Trans. BME, 査読有, 56, pp. 2649-2956, 2009

- ⑦ Suzurikawa J., Nakao M., Jimbo Y., Kanzaki

- R., Takahashi H., Light-addressed stimulation under Ca^{2+} imaging of cultured neurons, IEEE Trans. BME, 査読有, 56, pp. 2660-2665, 2009
- ⑧ Takayama Y., Saito A., Moriguchi H., Jimbo Y., Ensemble stimulation of embryoid bodies using substrate-embedded electrodes, IEEJ Trans., 査読有, 4, pp. 734-735, 2009
- ⑨ Jimbo Y., MEA-based recording of neuronal activity *in vitro*, Arch. Ital. Biol., 査読有, 145, pp. 289-297, 2007
- ⑩ Suzurikawa J., Takahashi H., Kanzaki R., Nakao M., Takayama Y., Jimbo Y., Light-addressable electrode with hydrogenated amorphous silicon and low-conductive passivation layer for stimulation of cultured neurons, Appl. Phys. Lett., 査読有, 90, 09390, 2007

[学会発表] (計 30 件)

- ① Goto M., Moriguchi H., Saito A., Takayama Y., Kotani K., Jimbo Y., The measurement of neuronal-network activity using "micropipette drawing", 7th FENS Forum, Amsterdam, 3 July 2010
- ② Takayama Y., Moriguchi H., Saito A., Kotani K., Jimbo Y., Interaction of P19 cell-derived neuronal networks and mouse cortical networks co-cultured on micro-electrode array, 7th FENS Forum, Amsterdam, 3 July 2010
- ③ Takeuchi A., Tani M., Mori M., Kotani K., Miwa K., Lee J., Noshiro M., Jimbo Y., Effects of electrical stimulation in sympathetic neuron-cardiomyocyte co-cultures, 7th FENS Forum, Amsterdam, 3 July 2010
- ④ Saito A., Takayama Y., Moriguchi H., Kotani K., Jimbo Y., Evaluation of neuronal differentiation of P19EC cells after alternating current magnetic field exposure, 7th FENS Forum, Amsterdam, 3 July 2010
- ⑤ Takeuchi A., Moriguchi H., Kotani K., Miwa K., Lee J., Noshiro M., Jimbo Y., Development of semi-separated co-culture system of sympathetic neuron and cardiomyocyte, 31st Ann. Int. IEEE EMBS Conf., Minneapolis, 2 September 2009
- ⑥ Saito A., Takayama Y., Moriguchi H., Kotani K., Jimbo Y., Developmental effects of low frequency magnetic fields on P19-derived neuronal cells, 31st Ann. Int. IEEE EMBS Conf., Minneapolis, 2 September 2009
- ⑦ Takayama Y., Moriguchi H., Saito A., Kotani K., Jimbo Y., Ensemble stimulation of embryoid bodies using microfabricated ITO substrates, 31st Ann. Int. IEEE EMBS Conf.,

Minneapolis, 2 September 2009

- ⑧ Moriguchi H., Tamai N., Takayama Y., Kotani K., Jimbo Y., Hierarchical oscillatory patterns observed in the spontaneous and evoked activity in cultured small recurrent networks, 6th FENS Forum, Geneva, 12 July 2008
- ⑨ Takayama Y., Saito A., Moriguchi H., Kotani K., Jimbo Y., Neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells establish functional neuronal network, 6th FENS Forum, Geneva, 12 July 2008
- ⑩ Suzurikawa J. Nakao M., Jimbo Y., Kanzaki R., Takahashi H., Characterization of response patterns evoked by light addressed electrical stimulation in cultured neuronal network, 6th Int. Meet. Substrate-Integrated Microelectrodes, Reutlingen, 8 July 2008

[図書] (計 3 件)

- ① 神保, 高山, 分化誘導細胞によって形成した神経回路の電気活動, 神原, 松永, 植田編「シングルセル解析の最前線」分担執筆, CMC 出版, pp. 88-94, 2010
- ② 神保, 神経回路活動の計測, 合原, 神崎編「理工系からの脳科学入門」分担執筆, 東京大学出版会, pp. 147-161, 2008
- ③ 神保, 森口, 高山, 電極アレイシステムを用いる神経機能解析, 酒井, 民谷編「動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス」分担執筆, pp. 31-38, CMC 出版 2007

[その他]

ホームページ等

<http://neuron.k.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神保 泰彦 (JIMBO YASUHIKO)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
 研究者番号: 20372401

(2) 研究分担者

満渕 邦彦 (MABUCHI KUNIHICO)
 東京大学・大学院工学系研究科・教授
 研究者番号: 50192349

佐久間 一郎 (SAKUMA ICHIRO)
 東京大学・大学院情報理工学系研究科・教授
 研究者番号: 50178597