

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04277

研究課題名（和文）一細胞レベル神経回路構築技術によるバイオAIの創出

研究課題名（英文）Single-cell-level Neural Circuit Engineering for BioAI Technology

研究代表者

吉田 昭太郎（Yoshida, Shotaro）

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：20785349

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体外で神経回路を一細胞レベルで設計・構築可能にするマイクロデバイス：「単一神経細胞プレート」を開発することで、神経情報処理の仕組みの解明に寄与する実験ツールを構築することを目的とした。生体適合性の高いハイドロゲルを従来手法より簡便かつ安価に微細加工可能な新規の鋳型形成プロセスを開発し、さらに単一神経細胞の神経突起のサイズである線と細胞体のサイズである円の構造を持つ細胞接着性の表面を有する微小なプレートを、細胞非接着性の表面に対してマイクロアレイ状に並べて製造する新しいプロセスを開発し、神経系の細胞株及びヒトiPS細胞由来神経細胞を培養可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体外で脳神経組織を再構成する生体模倣システムの研究が創薬や病理研究のために世界中で盛んに進められている中で、一細胞レベルの高解像度で神経回路を構築しようと試みている研究者は10名にも満たない。本研究ではその中でも特異な、1細胞ずつを個別に形態制御しながら培養中に位置を変えることを可能にする「単一神経細胞プレート」の開発を行っており、一細胞レベルで複数の細胞からなる神経回路を構築可能な現時点で唯一の技術と言える。神経回路がどのように情報処理を行っているか一細胞レベルの高精度で計測・解析できるようになることで、医療のみならずAI・知的情報処理の分野においても新知見の発見に繋がると期待できる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to develop a microdevice that enables the design and construction of neural circuits at the single-cell level in vitro, thereby creating an experimental tool that will contribute to the elucidation of the mechanisms of neural information processing. We developed a novel template formation process that enables microfabrication of biocompatible hydrogels more easily and inexpensively than conventional methods, and further developed a microplate with a cell-adhesive surface having a structure of lines of the size of neurites of a single neuron, and circles of the size of cell bodies, and fabricated in microarray form against a non-cell-adhesive surface. Finally we showed that neural cells including human iPSC-derived neurons can be cultured on the microplates.

研究分野：バイオマイクロデバイス

キーワード：神経回路 神経細胞 MEMS ハイドロゲル マイクロパターニング マイクロマニピュレーション

1. 研究開始当初の背景

一細胞単位で生きた神経回路の全体を観察できる実験技術が存在しないことが、神経回路の情報処理メカニズムの解明を困難にしている。有望視される技術の一つとして、マイクロパターン技術による培養神経回路の制御が国内外で研究されてきた(図1)。一般的に培養神経回路は、乱雑で実験ごとに細胞体・神経突起の位置の再現性のない状態で得られるが、細胞接着性の分子を平面に回路状にマイクロパターンすることで、細胞の接着位置をある程度制御することができる。理想的には回路全体を一細胞単位で制御したいが、従来研究では、パターンに対する細胞の頻繁な重複・欠如により制御率が低く、回路全体を一細胞単位ではほぼ制御できなかった。そこで、本研究ではこの問題点を解決する技術を提案する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経回路を一細胞レベルで設計・構築可能にするデバイスを開発することである(図2)。神経細胞が接着可能な一細胞サイズの微小なプレート:「単一神経細胞プレート」として、細胞体が接着する 10~50 μm の円と神経突起が接着する幅 5~10 μm 長さ 20~100 μm の線の形になるように細胞接着性物質を加工し、それを細胞非接着性表面にマイクロアレイ状に配置する。神経細胞を播種すると、1細胞が1つのプレートの円の上を選択的に接着して成長し、線の部分に神経突起を伸長させる。神経細胞ごとに接着及び成長の様式は様々であるため、中には複数の細胞が接着してしまったり神経突起が伸長しない細胞も存在する。先行研究においてはこのパターンと細胞の1対1の対応が取れないことで神経回路を1細胞レベルで精密に制御することは困難であったが、プレートはマニピュレータで所望の細胞付きプレートのみを選択的に輸送することができる。これにより、神経突起の形態が制御された1細胞を選択的に集めて神経回路の構造を形成することが可能となる。

本研究では、以前に検討した単一神経細胞プレートは材料にパリレンを用いており、アルミニウムの犠牲層を利用して酸によるウェットエッチングおよび真空下でのドライエッチングという生体親和性材料にとって過酷な状況での煩雑でコストのかかる微細加工が必要であったこと、また用いることができる材料や構造に制約があったことから、より安価かつ簡便に生体親和性材料を微細加工し、機能的な材料や構造の作り込みを可能とするような新たな製作プロセスを確立することを目指した。これによって、先行研究において形態制御制を確認した神経細胞(PC12ラット細胞株およびラット初代培養海馬・大脳皮質神経細胞)および他種類(ヒトiPS細胞由来神経細胞、ラットグリア細胞)の培養が可能であること、また神経回路を構築するために必要となるマイクロマニピュレータでの操作性を評価することを目的とした。

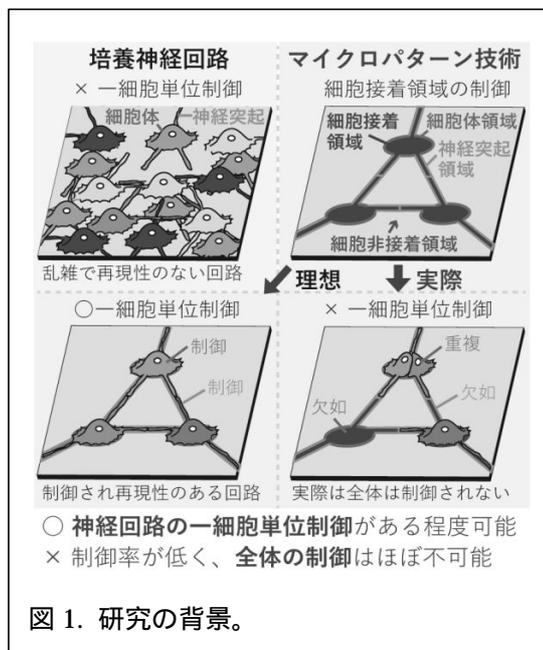


図1. 研究の背景。

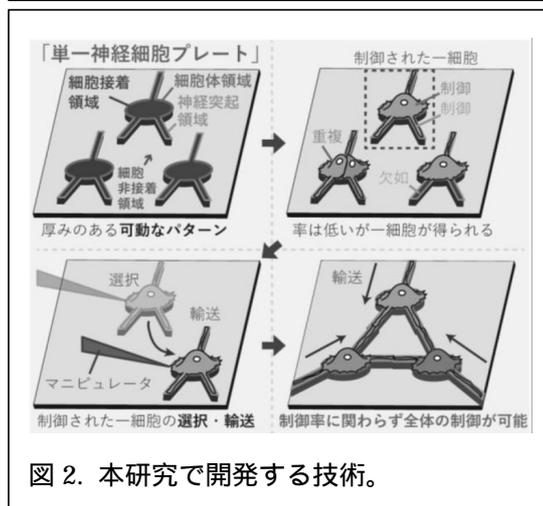


図2. 本研究で開発する技術。

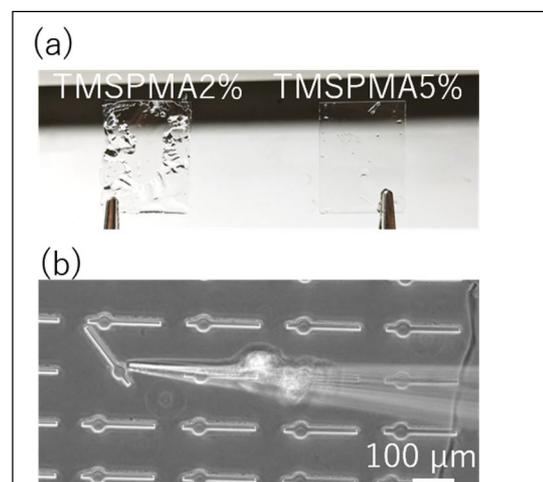


図3. 先行研究から材料及び製作プロセスを安価かつ簡便に改良した単一神経細胞プレート。(a)シラン化剤の検討により均一に形成したゲルの膜。(b)ゲルを加工して製作した単一神経細胞プレート。

### 3. 研究の方法

まず、初年度には研究室立ち上げと共に確立した微細加工設備及び細胞培養・評価用実験設備を利用して、ポリ L リジンをを用いたマイクロパターンとゼラチンメタクリレートによるパターンの検討を進め、最適な材料の組成と単一神経細胞プレートの寸法について詳細に検討を行った。製作にはソフトリソグラフィ法を用い、ポリジメチルシロキサンの鋳型を形成した後に、神経細胞が接着することが知られているポリ L リジンのマイクロコンタクトプリントおよび生体親和性のハイドロゲルを構築可能なゼラチンメタクリレート(GelMA)の鋳型形成法によるプレートの製作検討を行った。

次に、プレート上の細胞接着性領域及びそれ以外の細胞非接着領域のパターニングの検討を行うため、プレートの材質としてポリエチレングリコールジアクリレート(PEGDA)も GelMA に加えて検討し、それぞれの濃度を変えて基盤との接着性およびマイクロマニピュレーションにおける操作性を評価した。また、細胞非接着領域として、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーおよび PEGDA ゲルの薄膜を、様々な濃度で形成してプレートとの接着性および細胞の選択的パターン性を細胞培養実験によって評価した。

さらに、ゲルを安価な紫外線硬化装置を用いて製作する際に光の漏れを防ぐためのカーボンブラックを導入したフォトマスク一体型ポリジメチルシロキサン(PDMS)鋳型を考案し、それにより紫外線が漏れてプレート同士が固まってしまうこと無く加工可能であるか評価した。最後に、PC12 細胞株およびラットグリア細胞、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を培養してマイクロマニピュレーションを行い、操作性について評価した。

### 4. 研究成果

まず、細胞非接着性の MPC ポリマーの薄膜をガラス基板上に形成した後に、ソフトリソグラフィによって作成した PDMS 製の鋳型を利用して PEGDA ハイドロゲルおよび GelMA ハイドロゲルをマイクロサイズのプレートに加工するための条件を見出した。その際、濃度が高いほど基盤との接着性が高いが、濃度が低いほど神経細胞が接着しやすいことがわかった。MPC ポリマーと PEGDA、GelMA の接着性は高くは無く、製作中及び細胞培養中に基盤からプレートが外れてしまう現象が見受けられたため、細胞非接着性の PEGDA の薄膜をガラス基板上に形成する手法を検討し、ガラスと PEGDA を接着させるためにシラン化剤(3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate, TMSPMA)を5%コーティングすることで安定して薄膜を形成できることを見出した(図 3a)。これによって、神経細胞の細胞体のサイズの円と神経突起のサイズの線を持つ単一神経細胞プレートをアレイ状にして製作することができた(図 3b)。

一方で、PDMS の鋳型に PEGDA や GelMA の溶液を導入し紫外線露光によって加工するプロセスにおいて、形成したプレート同士が床面の薄膜で接合してしまう問題が起こることがわかった。これを回避するため、カーボンブラック粉末を部分的に PDMS 鋳型に導入する技術を開発し、鋳型に導入した PEGDA や GelMA には紫外線が露光されるがそれ以外は紫外線が遮断されるようなフォトマスク一体型の PDMS 鋳型を構築することに成功した(図 4a)。これによって、細胞非接着領域に PEGDA や GelMA の薄膜が形成されず、プレートを完全に単離された状態で製作することができるようになった。PEGDA 製のプレートにコラーゲンあるいは GelMA をコーティングする、あるいは細胞接着性の GelMA によってプレートを製作することで、PC12 細胞やグリア細胞を選択的にプレート上で培養できることがわかった(図 4b)。また、プレートは上面では細胞接着を良好にしつつ、下面では培養中にマイクロマニピュレータで押すと外れる程度に基盤と接着しているという機能を持つことが望ましいが、これを実現するために、プレートの上面と下面で濃度の異なる GelMA ハイドロゲルが接合されているような二層構造を製作するためのプロセスを新たに開

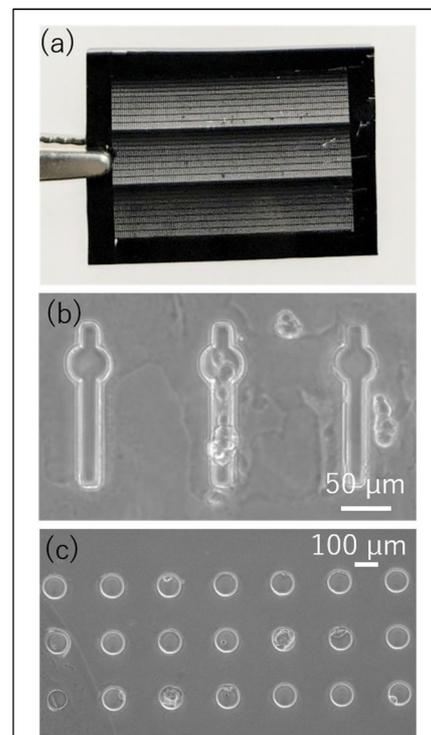


図 4.細胞接着/非接着のパターン化に成功した単一神経細胞プレート。(a)カーボンブラックを部分的に導入したフォトマスク一体型 PDMS 鋳型。(b) コラーゲンや GelMA の塗布による神経系細胞および (c) グリア細胞の選択的培養に成功した。

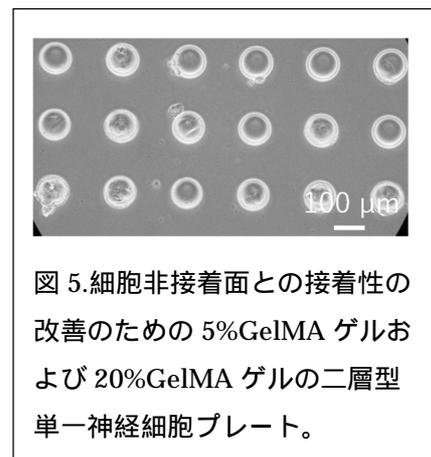


図 5.細胞非接着面との接着性の改善のための 5%GelMA ゲルおよび 20%GelMA ゲルの二層型単一神経細胞プレート。

発した。細胞が接着する上面は 5%の GeIMA ハイドロゲル、下面は 20%の GeIMA ハイドロゲルで構築することで、細胞を培養しつつ基盤からはマイクロマニピュレータで押すまでは外れないような機能を実現することができた(図 5)。

形成した単一神経細胞プレートにヒト iPS 神経細胞を培養する検討を行ったが、神経突起の伸長制御のためにはさらに表面の細胞接着タンパク質の材質検討が必要であることがわかった。さらに、形成した神経回路の機能解析のためにはマイクロ電極および薬剤輸送システムが必要であるため、カーボンナノチューブを溶液化したインクによってマイクロ電極を製造する方法を検討し、また薬剤輸送のための微小ポンプの検討を行った。さらにカーボンナノチューブや導電性高分子を用いたマイクロ電極システムの開発にも着手し、さまざまな材料と加工法の検討を行った。特に神経細胞の分泌物であるグルタミン酸を定量的に計測可能なマイクロセンサーの開発を行い、濃度依存的な反応の計測に成功した。以上によって、神経回路を単一細胞レベルで設計・構築するためのデバイス：単一神経細胞プレートを先行研究よりも格段に安価かつ簡便に製作するプロセスの開発に成功し、利用できる機能的な生体親和性材料及び構造の幅が広がったことで、より製作可能な神経回路の種類を増やすことができると考えられる。また、構築した神経回路の機能解析のための電極センサシステムの開発も行うことができ、当初の目標以上に研究が進展した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤萌, 吉田昭太郎
2. 発表標題 グリア細胞の化学物質分泌センシングに向けた有機電気化学センサーの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第45回研究会 (CHEMINAS 45)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 彌田尚希, 吉田昭太郎
2. 発表標題 神経回路の一細胞レベル電位計測のためのマイクロ電極アレイセンサの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第45回研究会 (CHEMINAS 45)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畑翔太, 礎慎太郎, 吉田昭太郎
2. 発表標題 グリア細胞を一細胞単位で培養可能なマイクロアレイデバイスの開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第45回研究会 (CHEMINAS 45)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 彌田 尚希, 原 悠真, 村上 達哉, 吉田 昭太郎
2. 発表標題 神経回路の一細胞レベル電位計測のためのマイクロ有機電極アレイセンサの開発
3. 学会等名 第13回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畑 翔太, 礎 慎太郎, 吉田 昭太郎
2. 発表標題 グリア細胞を一細胞単位で操作可能なマイクロアレイデバイスの開発
3. 学会等名 第13回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 児玉 泰河, 礎 慎太郎, 吉田 昭太郎
2. 発表標題 培養神経回路への局所的な薬剤投与のための有機電子イオンポンプの製作
3. 学会等名 第13回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 礎 慎太郎, 畑 翔太, 児玉 泰河, 吉田 昭太郎
2. 発表標題 単一神経細胞の制御と可動化のためのマイクロハイドロゲルアレイの開発
3. 学会等名 第13回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 児玉 泰河, 吉田 昭太郎
2. 発表標題 マイクロデバイスを用いたヒト iPS 神経細胞パターンニング技術の開発
3. 学会等名 第12回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 礎 慎太郎, 吉田 昭太郎
2. 発表標題 単一神経細胞の制御のためのマイクロプレートデバイスの開発
3. 学会等名 第12回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉田昭太郎, 村上 達哉	4. 発行年 2023年
2. 出版社 公益社団法人 精密工学会	5. 総ページ数 4
3. 書名 精密工学会誌	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>JST新技術説明会(2021年8月31日)における本研究の技術紹介 「培養神経回路のシングルセル解析用マイクロデバイス」  <a href="https://www.youtube.com/watch?v=RAehiXHY0uc">https://www.youtube.com/watch?v=RAehiXHY0uc</a>  <a href="https://shingi.jst.go.jp/list/list_2021/2021_toyo-sophia-chuo.html">https://shingi.jst.go.jp/list/list_2021/2021_toyo-sophia-chuo.html</a></p> <p>中央大学 理工学部 電気電子情報通信工学科 吉田研究室ホームページ  <a href="https://yoshidalab.r.chuo-u.ac.jp/">https://yoshidalab.r.chuo-u.ac.jp/</a></p>
---

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
---------	---------