

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82636

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15143

研究課題名（和文）神経ネットワーク発達に伴うダイナミクス変化の網羅的計測

研究課題名（英文）Comprehensive measurement of dynamics changes during neuronal network development

研究代表者

箕嶋 渉（Minoshima, Wataru）

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所神戸フロンティア研究センター・研究員

研究者番号：70802875

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）：脳神経系のモデルとして有用な分散培養された神経細胞ネットワークでは、発達・成熟を示す活動電位の特徴的なダイナミクス変化が観察される。しかしながら、活動電位変化は神経細胞ネットワークダイナミクスがもつ1側面に過ぎず、神経細胞を構成する分子群のダイナミクス変化は不明なままである。そこで、本研究では微小電極アレイと光ピンセットによる細胞操作手法とを併用し、神経ネットワークに生じるダイナミクス変化を網羅的に評価することを目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、分散培養された神経細胞ネットワークを対象に微小電極アレイによる細胞外電位多点測定と光ピンセットによる分子群ダイナミクス制御を同時に行い、神経細胞ネットワークの成熟に伴い変化する時空間ダイナミクスの評価を多角的に行った。結果として、光ピンセットで神経細胞シナプス領域に局在するシナプス小胞を光捕捉過程において神経活動の頻度が増加したことを明らかにし、ネットワーク全体の同期性が向上したことを明らかにした。本研究成果は、神経細胞ネットワークのダイナミクスを光ピンセットにより非接触・非破壊的に制御できたことを示す。

研究成果の概要（英文）：In cultured neuronal networks, which are models of the brain nervous system, characteristic dynamic changes in action potentials that indicate development and maturation are observed. However, action potential changes are only an aspect of neuronal network dynamics, and changes in the molecular dynamics in the neurons remain unknown. In this study, we aim to comprehensively evaluate the dynamics changes that occur in neuronal networks by simultaneous measurement of neuronal electrical activity by using microelectrode array and manipulation of synaptic molecules by using optical tweezers.

研究分野：神経情報工学

キーワード：培養神経回路網 顕微蛍光イメージング レーザー 顕微鏡 光ピンセット ラマン顕微鏡 微小電極アレイ

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・神経系の情報処理は、基本素子である神経細胞がシナプスを介して結合することで空間的に広がりを持つネットワークを形成し、ネットワーク中を神経細胞で自発的に発生する電気信号(スパイク)が行き交うことによる時間的、空間的な広がりを持つダイナミクスにより実現される。脳機能の解明のため個体や脳スライス標本の自発スパイクを研究対象とする場合、組織の損傷を避けることはできず、ネットワークを形成・発達する過程まで長期にわたってダイナミクス変化を評価することは不可能である。この問題は生体外で神経細胞を培養し、自律的に形成された培養神経細胞ネットワークを対象とすることで克服できる。こうした背景のもと、申請者は培養神経細胞ネットワークにおいて自発スパイクが創り出す時空間ダイナミクスを微小電極アレイで低侵襲に計測するスパイク多点計測法に取り組んできた。微小電極アレイに分散播種された神経細胞は1ヶ月以上にもわたる発達過程を示し、その過程で多点計測されたスパイクは単発スパイクから同期バースト活動を示すように変化する。

低侵襲なスパイク多点計測法が発展する一方で、スパイクのダイナミクス変化に伴って変化する神経細胞、神経突起、シナプス部位などを構成する分子群のダイナミクスを低侵襲にイメージングすることは困難である。生きた細胞試料の分子イメージングには一般的に免疫組織化学染色によるライブセル顕微鏡蛍光観察が有効であるとされるが、染色時の物理的なダメージにより細胞の活性が損なわれる他、蛍光色素の褪色により1ヶ月以上にわたるダイナミクス計測は難しい。スパイクのダイナミクス変化に伴う構成分子群のダイナミクス変化を解析するためには、侵襲性が低く、かつラベリングを必要としない計測方法が望ましい。

そこで、微小電極アレイによる細胞外電位計測とラマン散乱イメージングによる電気活動と細胞内外分子群動態評価を並列して実行し、神経細胞ネットワークの時空間ダイナミクスを網羅的に評価した。

2. 研究の目的

本研究課題では、分散培養された神経細胞ネットワークにおける電気活動および細胞構成分子群のダイナミクス変化を網羅的に解決することを目指す。分散培養された神経細胞ネットワークでは、発達・成熟を示す活動電位の特徴的なダイナミクス変化が観察される。しかしながら、活動電位変化は神経細胞ネットワークダイナミクスがもつ1側面に過ぎず、神経細胞を構成する分子群のダイナミクス変化は不明なままである。そこで、本研究では微小電極アレイによる神経細胞の細胞外電位、ラマン散乱イメージングによる細胞内分子動態計測、および光ピンセットによる細胞内分子操作を同時計測し、神経細胞ネットワークのダイナミクス変化を網羅的に評価する。

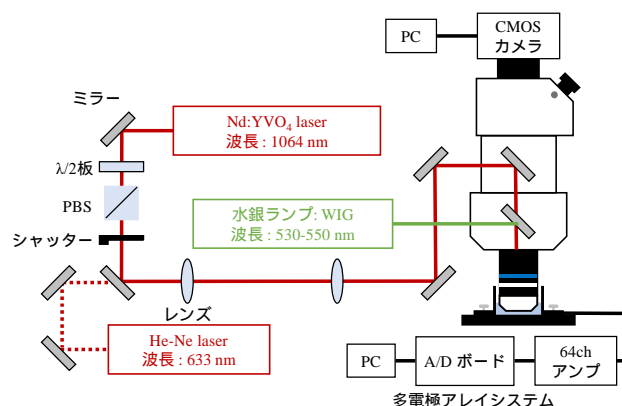


Fig. 1 光ピンセット-細胞外電位多点計測システム

2. 研究の方法

(1) グルタミン酸内包リポソームの光捕捉に伴うラマン散乱解析

シナプス領域分子群を模倣した実験系として、大脳の主要な神経伝達物質であるグルタミン酸を内包したリポソームを作製し、バッファー中に分散させた。光ピンセット用レーザーおよびラマン散乱の励起用レーザーとして波長 575 nm の連続レーザーを倒立型蛍光顕微鏡に導入し、液中のリポソームに 60 倍の対物レンズで集光した。レーザー集光領域における散乱光を分光器に導入し、ラマン散乱を検出した。

(2) 神経細胞内シナプス小胞光捕捉過程での神経活動変化解析

神経細胞試料として胎生 18 日のラット大脳海馬領域由来の神経細胞ネットワークを微小電極アレイ上に培養した。試料の細胞内シナプス小胞群を FM1-43 で蛍光標識した。光ピンセット用および二光子励起用レーザー光源として波長 1064 nm の Nd:YVO₄ レーザーを正立型蛍光顕微鏡に導入し、60 倍の水浸対物レンズでシナプス領域に局在する細胞内シナプス小胞群に集光した。試料からの蛍光は sCMOS カメラを用いて検出した。顕微鏡システムに細胞外電位多点計測システムを導入し、シナプス小胞群ダイナミクスの蛍光解析と、細胞外電位計測を両立できる実験

装置を構築した (Fig.1)。

(3) 神経細胞間結合特性解析手法の開発

続いて、微小電極アレイによる細胞外電位多点計測を用いて培養 2 カ月以上にわたる電気活動の時空間ダイナミクスを細胞外電位として計測し、活動電位を表すスパイクを検出した。得られたスパイク列に対して、移動エントロピーおよび結合エントロピー解析を行い、神経細胞間の結合強度評価を行った。

4. 研究成果

(1) グルタミン酸内包リポソームの光捕捉に伴うラマン散乱解析

グルタミン酸を内包したリポソームの分散液中で光ピンセット用およびラマン散乱励起用レーザーを照射し、リポソームを光捕捉することで、レーザー集光領域におけるグルタミン酸由来のラマンスペクトルをラマン散乱で検出することが可能であることを示した。このことから、神経伝達物質検出におけるラマン散乱イメージング顕微鏡の有効性を確認した (Fig.2)。

(2) 神経細胞内シナプス小胞光捕捉過程での神経活動変化解析

海馬領域由来の神経細胞を微小電極アレイ上に培養し、神経細胞ネットワークを再構成させた。神経細胞内シナプス小胞群に光ピンセット用レーザーを集光し、細胞外電位との同時計測した。レーザー集光領域内の FM1-43 の二光子励起蛍光強度の時間変化を解析した結果、レーザー低強度条件 (100 mW) の時は蛍光褪色により蛍光強度が減少し続けたが、レーザー光強度条件 (500 mW) では一時的な蛍光褪色の後に蛍光強度が増加した。この結果は、光ピンセット用レーザー照射に伴い、レーザー集光領域にシナプス小胞が光捕捉され、集合することを明らかにした。続いて、シナプス小胞の光捕捉と細胞外電位との同時計測を行い、得られた細胞外電位データから神経活動を示すスパイクを検出した。結果として、レーザー低強度条件ではレーザー照射前、照射中、レーザーOFF後の神経スパイク頻度は有意に変化しなかったが、レーザー高強度条件ではレーザー照射中とレーザーOFF後の神経スパイク数が有意に増加した。この結果は、シナプス小胞の集合光捕捉に伴い、一時的に神経伝達効率に変化を伴い、神経活動パターンが変化している可能性がある。そこで、相互相関解析を用いてスパイク列の解析を行った結果、レーザー低強度条件ではレーザー照射前後および照射中で相互相関値が変化しなかったが、レーザー高強度条件ではレーザー照射中と照射後に有意に相互相関値が高くなったことから、神経細胞ネットワーク活動の同期性が高まったことが明らかとなった。本手法により、神経細胞間の情報伝達を制御できることが期待される。

(3) 神経細胞間結合特性解析手法の開発

2 カ月にわたる神経スパイク列の計測データに対して移動エントロピー解析を適用したところ、神経細胞ネットワークの成熟に伴う神経細胞間結合強度変化を反映する結果を得た。この結果は、移動エントロピー解析が神経細胞間結合強度推定に有効であることを示す。また、結合エントロピー解析では、移動エントロピーと同様に神経細胞ネットワークの成熟を示す結果を得られた上、計算負荷が移動エントロピーよりも軽いため、神経細胞間結合強度変化のリアルタイム解析に用いることができると期待される。

以上の研究成果をまとめた研究成果として、学術論文および英文プロシーディングが 5 報掲載済みであり、3 報を投稿準備中である。また、国際学会国内学会を含めた多数の学会発表を行った。

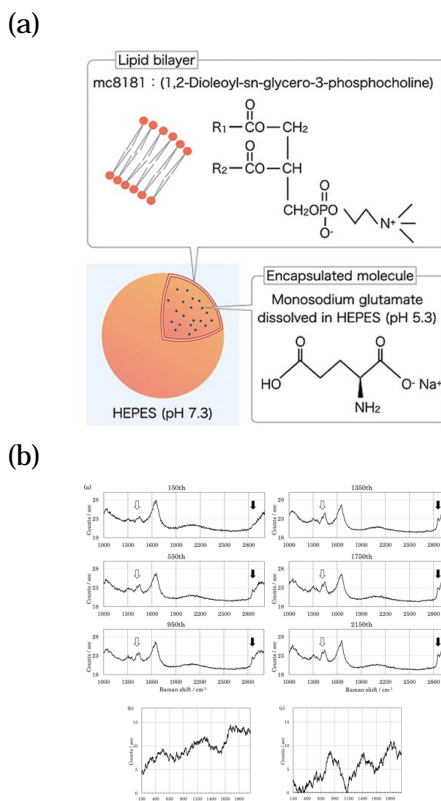


Fig. 2 (a) 合成したリポソームの概要。
(b) 光捕捉されたリポソームのラマンスペクトル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Masui Kyoko, Nawa Yasunori, Tokumitsu Shunsuke, Nagano Takahiro, Kawarai Makoto, Tanaka Hirokazu, Hamamoto Tatsuki, Minoshima Wataru, Tani Tomomi, Fujita Satoshi, Ishitobi Hidekazu, Hosokawa Chie, Inouye Yasushi | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Detection of Glutamate Encapsulated in Liposomes by Optical Trapping Raman Spectroscopy | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ACS Omega | 6. 最初と最後の頁 9701 ~ 9709 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c07206 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Minoshima Wataru, Masui Kyoko, Tani Tomomi, Nawa Yasunori, Fujita Satoshi, Ishitobi Hidekazu, Hosokawa Chie, Inouye Yasushi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Deuterated Glutamate-Mediated Neuronal Activity on Micro-Electrode Arrays | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Micromachines | 6. 最初と最後の頁 830 ~ 830 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi11090830 | 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 Kishimoto Tatsunori, Masui Kyoko, Minoshima Wataru, Hosokawa Chie | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 Recent advances in optical manipulation of cells and molecules for biological science | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews | 6. 最初と最後の頁 100554 ~ 100554 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphotochemrev.2022.100554 | 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24件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Wataru Minoshima, Kyoko Masui, Tomomi Tani, Yasunori Nawa, Satoshi Fujita, Hidekazu Ishitobi, Chie Hosokawa, Yasushi Inouye |
| 2. 発表標題 Acute effects of deuterated glutamate on neuronal activity in cultured hippocampal neurons |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 CJK第1回国際会議 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 箕嶋 渉, 瀬川 夕海, 細川 千絵 |
| 2. 発表標題 移動エントロピー解析による神経回路網の結合特性評価 |
| 3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Wataru Minoshima, Yumi Segawa, Chie Hosokawa |
| 2. 発表標題 Connection strengths in cultured neurons on multi-electrodes array evaluated by transfer entropy |
| 3. 学会等名 The 174 Committee Workshop International workshop on Symbiosis of Biology and Nanodevices (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Wataru Minoshima, Kyoko Masui, Tomomi Tani, Yasunori Nawa, Satoshi Fujita, Hidekazu Ishitobi, Chie Hosokawa, Yasushi Inouye |
| 2. 発表標題 Deuterated glutamate-mediated electrical activity of neuronal networks measured by multi-electrode arrays |
| 3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 箕嶋 渉, 瀬川 夕海, 増井 恭子, 柚山 健一, 尾松 孝茂, 細川 千絵 |
| 2. 発表標題 ナノ秒光渦照射による単一神経細胞の神経活動変化 |
| 3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 箕嶋 涉, 増井 恭子, 谷 知巳, 名和 靖矩, 藤田 聡史, 石飛 秀和, 細川千絵, 井上 康志 |
| 2. 発表標題 多電極アレイ上の神経回路網における重水素化グルタミン酸に活性化された神経活動特性 |
| 3. 学会等名 第81回応用物理学会 秋季学術講演会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 瀬川 夕海, 箕嶋 涉, 細川 千絵 |
| 2. 発表標題 集光フェムト秒レーザー照射に伴う神経回路網の活動変化 |
| 3. 学会等名 電気学会 光・量子デバイス研究会・医療・バイオ研究に有効なインターフェースと量子ビーム応用の未来 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 瀬川 夕海, 箕嶋 涉, 細川 千絵 |
| 2. 発表標題 集光フェムト秒レーザー照射に伴う神経回路網の誘発応答解析 |
| 3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Wataru Minoshima, Taketo Yasuda, Kyoko Masui, Chie Hosokawa |
| 2. 発表標題 Network-wide neuronal activity under optical trapping of synaptic vesicles in cultured neurons |
| 3. 学会等名 OPTICS & PHOTONICS International Congress 2023 (OPIC2023) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yumi Segawa, Yasushi Tanimoto, Ken-ichi Yuyama, Wataru Minoshima, Kyoko Masui, Takashige Omatsu, Chie Hosokawa |
| 2. 発表標題 Mechanisms of neuronal stimulation with a focused nanosecond optical vortex |
| 3. 学会等名 OPTICS & PHOTONICS Internatilonal Congress 2023 (OPIC2023) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Taketo Yasuda, Wataru Minoshima, Kyoko Masui, Chie Hosokawa |
| 2. 発表標題 Simultaneous Measurement of Extracellular Potentials with Optical Trapping of Synaptic Vesicles in Neurons |
| 3. 学会等名 15th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2022) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yumi Segawa, Wataru Minoshima, Chie Hosokawa |
| 2. 発表標題 Single-cell stimulation in neuronal networks with a focused femtosecond laser |
| 3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2021) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 箕嶋 渉, 瀬川夕海, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 結合エントロピーによる神経細胞間の結合強度解析 |
| 3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 箕嶋渉, 瀬川夕海, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 神経回路網の発達に伴い変化する結合強度の移動エントロピー解析 |
| 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 安田健人, 箕嶋渉, 増井恭子, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 神経細胞内シナプス小胞群の光捕捉 過程 における 神経活動パターン解析 |
| 3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大谷莞, 瀬川夕海, 箕嶋渉, 増井恭子, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 集光フェムト秒レーザーの高頻度照射により誘発された神経活動の評価 |
| 3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 瀬川夕海, 箕嶋渉, 増井恭子, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 神経細胞内シナプス小胞群の光捕捉 過程 における 神経活動パターン解析 |
| 3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大谷莞, 瀬川夕海, 箕嶋渉, 増井恭子, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 集光フェムト秒レーザーの短時間照射により誘発された神経活動 |
| 3. 学会等名 第60回日本生物物理学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安田健人, 箕嶋渉, 増井恭子, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 神経細胞内シナプス小胞群の光捕捉下における神経活動測定 |
| 3. 学会等名 第60回日本生物物理学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 瀬川夕海, 箕嶋渉, 増井恭子, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 集光フェムト秒レーザーによる単一神経細胞での神経電気活動誘発 |
| 3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 安田健人, 箕嶋渉, 増井恭子, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 多電極アレイ上で培養した神経細胞内シナプス小胞群の光捕捉 |
| 3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 石原悠人, 箕嶋渉, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 光圧下のナノ粒子集合体形成過程の数値解析 |
| 3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 植野昂, 岸本龍典, 箕嶋渉, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 共鳴光の波長に依存したナノ粒子の光捕捉過程 |
| 3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石原悠人, 岸本龍典, 箕嶋渉, 杭田芙子, 森垣憲一, 細川千絵 |
| 2. 発表標題 光圧による人工脂質二分子膜の拡散特性変化 |
| 3. 学会等名 ナノ学会第19回大会 |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|