

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710221

研究課題名（和文） 微小空間培養システムで長期記憶メカニズムに迫る

研究課題名（英文） New approach to the mechanism of long-term memory with microfluidic culturing systems

研究代表者

広井 賀子 (HIROI NORIKO)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：20548408

研究成果の概要（和文）：シナプス構造長期維持機構の数理モデルを作成しシグナル伝達因子の新規合成を介したネットワーク遷移が長期記憶成立に重要という結果を得た。これにより経験則として知られていた繰り返し刺激による記憶長期化のメカニズムを推定できた。モデルの結果検証の為にマイクロコンタクトプリンティング法による *in vivo* 環境を模した培養・刺激用デバイス、適切な刺激分配の為に電磁バルブ制御用電圧変換・信号分配用制御ボード、各種プログラムを開発し実験系制御に成功した。

研究成果の概要（英文）：We developed a mathematical model representing the mechanisms of sustainable synaptogenesis, which is the basal mechanism of long-term memory. The model predicted the essential mechanism of long-term memory is to keep the context of the signal transduction controlled by the time intervals of the external stimuli. To evaluate the prediction, we developed a microfluidic device, a control board and a set of software to control electromagnetic valves.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：活性発現の分子機構、数理モデル

1. 研究開始当初の背景

体内の神経細胞は一般的な培養環境よりも空間的にゆとりのない状態で様々な刺激に対する応答を行っているが、このような点に着目して神経細胞の具体的な機能を解析した事例は数少ない。

2. 研究の目的

本研究では、体内環境を模した微小空間内で詳細に細胞外からの刺激を制御しながら、形成されたシナプス構造の長期維持に必要と

されるトリックを明らかにすることで、長期記憶を実現する機構の謎に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

はじめに、シナプス構造の維持に関わる分子機構の数理モデルを作製し、このモデルが既に知られている実験生物学上の知見を再現できることを確認した後、モデルによって予想されたシナプス構造の長期維持に関わる機構である「繰り返し刺激」のパターンを実

験で精密に再現することによって、実際にシナプス構造の長期維持に必要となるメカニズムを同定する計画であった。

モデルの概要作製にはフリーのソフトウェア CellDesigner を使用し、システムバイオロジーに置ける標準言語及び描画仕様に準拠したモデルとして作製した。

最終的にモデルで必要となる数値計算のすべてが行えるシミュレーションエンジンが存在しなかったため、独自のシミュレーションライブラリを開発した。

このモデルで予測された結果を健勝留守実験に際し、マイクロ流体デバイスを利用することで、体内を模した微小空間での培養を実現し、また刺激のパターンを制御する準備として、培養底面に細胞が接着するパターンをコントロールするためのマイクロコンタクトプリンティング法を採用した。特に、*in vivo* 環境を模した流れ存在下での細胞パターン維持のためにマイクロコンタクトプリンティング法を活用し、またプリント後のガラスに培養チャンバーを吸着する技術として下記に記載する特別な方法を用いたデバイス開発を行った。マイクロコンタクトプリンティングによる細胞接着因子のガラス底面への結合には、生産効率向上と細胞毒性減少に留意して、プラズマ照射処理を利用した。培養槽の固定には、培養槽内をポンプで陰圧にする手法を利用し、簡便に装脱着出来るようにした。

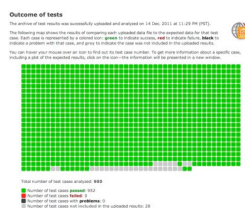
実験では、微小空間内での流体の性質を活かした正確な液性刺激分配を行うため、USB コネクタから 5V の制御信号を受け取り、電磁バルブ開閉のための 12V の電圧へ変換、及び信号を各バルブへ分配するための制御ボードを作製した。

バルブ制御用プログラム作成にあたり、多様な開発を効率化するためのライブラリを作成した。バルブの種類を区別して、バルブ開閉を行うプログラム、バルブ解放時間を算出するプログラム、この結果を利用し刺激の時間、回数、間隔に自動換算するためのプログラム、及び複数の実験を並列化を視野にいれ、バルブ解放時間からバルブ解放時間のスケジューリングを行うプログラムの開発およびこれら进行操作するための GUI を準備した。

4. 研究成果

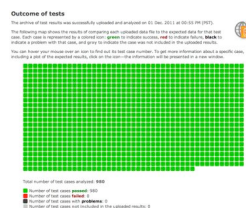
実験を再現するモデルを作成する過程で、従来用意されているシミュレーションエンジンでは計算不可能な形式の微分方程式を数値計算するため、新規に正確性に配慮したライブラリを開発を行った(図 1)。このライブラリは単独の技術報告として現在 Bioinformatics (Oxford Journals) に投稿中である。

Level 2 Version 4



Passed all 952 test cases

Level 3 Version 1



Passed all 980 test cases

■ : not included in this Level, Version

図 1 開発したシミュレーションエンジンライブラリ、libSBMLSim のテスト結果。システムバイオロジーに置けるモデル表記標準言語 SBML で表現可能なモデルとして、SBML 管理者の公式サイト(<http://sbml.org>)に用意されている全テストケースを解くことが出来る。

数理モデル(図 2)は繰り返し刺激によるシナプス構造の長期維持機構について、転写・翻訳を介したシグナル伝達因子の新規合成を介してネットワーク遷移が起きているためであるという説を裏付ける結果を得た。この数理モデルにより、これまで経験則として知られていた繰り返し刺激による記憶長期化のメカニズムを構成する要素をネットワークモジュール単位で推定することができた。モデルによって予言されたメカニズムは、記憶長期化における新しいメカニズムの発見を意味すると同時に、長期記憶のための刺激間隔(3~24 時間)に近いタイムラグを介して発現する生理現象の背景に、同様のメカニズムが存在しうることを示唆している。

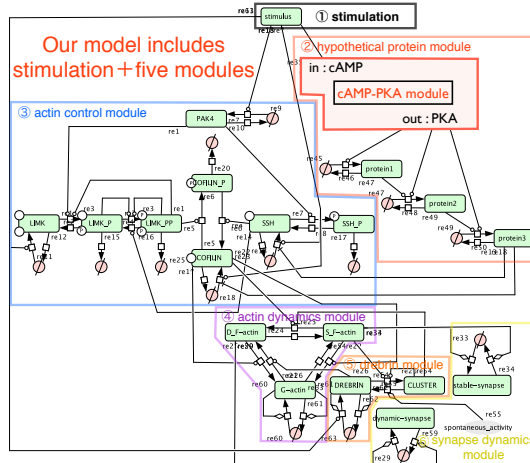


図 2 長期記憶モデル。5つのネットワークモジュールと1つの外部刺激から構成されている。

新規長期記憶メカニズム仮説の数理モデルによる裏付けは、重要な生命現象のメカニズム

ム解明における一歩となる。現在数理モデルについての論文は PLoS One に校正後の再提出準備中である。

モデルで予測した結果を検証するにあたり行ったデバイス開発では、流れのある環境での細胞パターンの維持を目的としたマイクロコンタクトプリンティング法と、プリントしたガラスを底面に培養チャンバーを吸着する技術について条件検討を行った(図3)。

流体中でパターンを維持しながら長期培養を行うデバイスの開発は、本研究計画における数理モデルによって得られた仮説の検証に欠かせないのみならず、今後他の同条件が必要な実験系への応用が可能である。開発したデバイスの応用範囲は、培養細胞から単細胞微生物まで培養可能な生物試料に対し広く応用でき新しい実験を可能にするものである。現在、開発したデバイス技術を用い、数理モデルによって予言されているメカニズムの検証を行っている。この際、微小空間内での流体の性質を活かすことで、生体内の環境を模した条件での検証実験が可能であると考えている。実際の手順において、デバイス内での

PC-12細胞の培養確認を行ったが、PC-12細胞の培養状態が不安定であったため、研究対象とする細胞株に新たにレチノイン酸で分化誘導可能なヒト神経芽細胞腫の細胞株、SK-N-SHを加え、またデバイス構造の改良を行った。具体的には、マイクロコンタクトプリンティングによる細胞接着因子のガラス底面への結合に、プラズマ照射処理を利用することで、有機化合物処理(OTS-APTS処理)を用いる場合に比べ生産効率を上げ、テスト回数を増やせるようにし、同時に薬物の洗浄不足などによる細胞毒性が出る可能性を減らすことに注力した。この改良を行う上で、ガラス基板に接着因子を結合した後にPDMS製の培養槽を貼付ける手段として、層内を陰圧にし、簡便に装脱着出来るようにした。

この内容は、システムバイオロジー分野の国際学会(ICSB2010, エジンバラ、イギリス)および定量生物学の会(q-bio.jp,2010, 東京大学)に

おいて発表を行った。

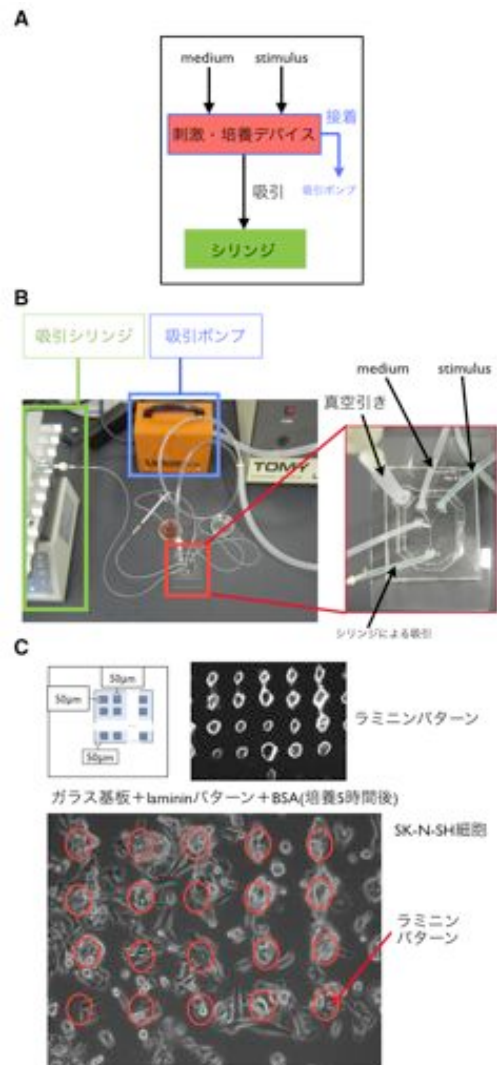


図3 開発したデバイスを用いた実験の様子。デバイスは刺激を含んだ培地とコントロール用の培地の流量を調節しながら流すことで、層流の境界面をずらしながらパターンニングされた細胞間の刺激条件を順番にずらし、各細胞間で設定したパルス刺激を与える仕組みとなっている。

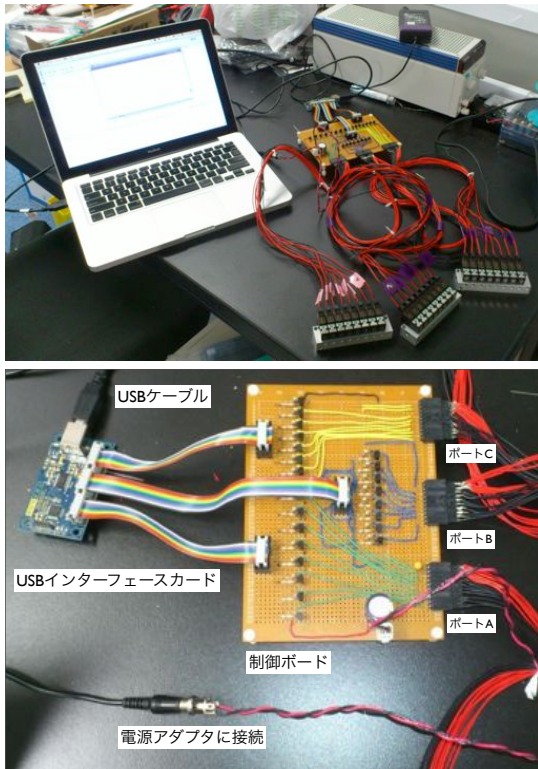


図 4 (上)制御ボードとコンピュータ、電磁バルブを接続したところ。コンピュータから送られたシグナルがボードで 5V から 12V に変換され、写真右下の電磁バルブに送られる。(下)作製したボード。USB を介して送られてきた信号を、全部で 24 カ所に分配して送ることが出来る。

USB コネクタからプログラムに書かれている制御シグナルを受け取り、電磁バルブを制御するのに必要となる、電圧変換および信号分配用の制御ボードを作製した(図 4)。この制御ボードと、下記のプログラムを使用することで、電磁バルブの制御をプログラム通りに行えることを確認した。

ボードの動作を制御するプログラムを作成するためのライブラリ開発を行った(図5)。この際、直接バルブの開閉に関わる制御関数を整備すると同時に、バルブの機能(通電時解放または通電時閉口)に合わせてユーザが設定を選ぶことで、バルブ開閉の制御を間違いなく行えるようにした。この単純なバルブの開閉は、最高で10⁶秒単位で制御を実現できることを確認した。同時に、制御したい項目に合わせて、直接刺激時間、刺激回数、刺激間隔として、命令を渡せるようにするための制御用プログラムも開発した。この時、将来的に複数の実験を並列化して行えるようにするための準備として、バルブ解放時間算出プログラ

ムを作製した。これにより、あるバルブの解放時間が別のバルブの解放時間と重ならないように解放時間を自動でずらすことが可能となっている。

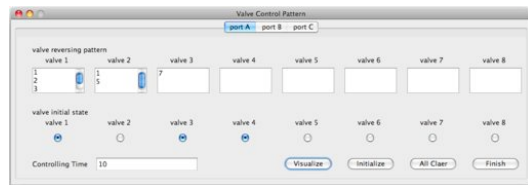
```
#include "funadevice.h"

int main(void)
{
    myDevice_t usbDev;

    openDevice(&usbDev); /* Open and Initialize device */
    identifyDevice(&usbDev); /* Identify my device */
    setOutputMode(&usbDev); /* Set as an Output port */
    /* Simple Test */
    int i;
    unsigned char val;
    for (i = 0; i < 8; i++) {
        val = 1 << i;
        writePortA(&usbDev, val);
        usleep(200000);
    }
    writeBinaryPortA(&usbDev, "10101010");
    writeBinaryPortB(&usbDev, "01101100");
    writeBinaryPortC(&usbDev, "00111111");
    closeDevice(&usbDev);
    return 0;
}
```

for文でON/OFFが切り替わる
valve 1 ON → 1 OFF, 2 ON →
2 OFF, 3 ON → ...

数字は8つのバルブ
の状態に対応
1がON、0がOFF



表示 ↑ ↓ コード生成

```
File1 : controlling_time
controlling_time = 10;

File2 : valve_initial_state
valveA_state = 13;
valveB_state = 0;
valveC_state = 0;

File3 : valve_reversing_pattern
valve_param[0]->reversing_times[valve_param[0]->num_of_reversing_times++] = 1; //0
valve_param[0]->reversing_times[valve_param[0]->num_of_reversing_times++] = 2; //0
valve_param[0]->reversing_times[valve_param[0]->num_of_reversing_times++] = 3; //0
...
```

図 5 バルブコントローラのコードの一部(上)及びバルブコントローラGUI とコード生成の仕組み(下)

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. Takumi Hiraiwa, Noriko Hiroi, Yoshinori Matsumoto, Norihisa Miki, Kotaro Oka and Akira Funahashi. "**Generic design for long-span cell culture devices.**"The 3rd annual mtg of q-bio.jp, Tokyo, Japan, 27th and 28th (両日同ポスターについて発表), Nov. 2010
2. Takumi Hiraiwa, Keisuke Iba, Suguru Sakuma, Hiromu Takizawa, Noriko Hiroi, and Akira Funahashi. "**The Development of an Automated Experimental Systems using MicrofluidicDevices for Use of**

Molecular and Cellular Biological Experiments." ICSB 2010, 10th Oct. – 15th Oct. (11th Oct に同ポスター発表)
Edinburgh, UK.

6. 研究組織

(1)研究代表者

広井 賀子 (HIROI NORIKO)
慶應義塾大学・理工学部・助教
研究者番号：20548408

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし