

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：82704

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657111

研究課題名（和文）細胞選択的人工神経細胞回路の構築による細胞間コミュニケーションの解析

研究課題名（英文） The analysis of cell-to-cell communications by re-constructive artificial networks of neurons using non-invasive cell collection techniques

研究代表者

寺 蘭 英之（TERAZONO HIDEYUKI）

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・オンチップ・セラミクスプロジェクト・研究員

研究者番号：30398143

研究成果の概要（和文）：

神経細胞を用い、一細胞毎に伝達方向・細胞の種類を制御した人工的神経細胞回路を作製することで神経のネットワークレベルでの基本動作原理、記憶形成機構、情報処理機構の解明を目的とする。成果として、薄膜のアルギン酸シートを培養皿上に施す事で特定の初代神経細胞のみを一細胞毎に回収出来る技術の開発に成功した。本手法は一旦初代培養を回収し、神経細胞の形状を確認した後で回収し再利用する技術でありこれまでにない技術である。本手法と神経細胞のネットワークパターンを自在に操作する事が出来るアガロースマイクロ加工技術を組み合わせることで神経細胞ネットワークの基本的な動作原理を検証出来る可能性が高まった。

研究成果の概要（英文）：

We have been studying the living system by assembling artificial tissues composed of single cells as a minimum functional unit.

Along this research theme, we have studied cell-to-cell communications by controlling the spatial pattern of cell networks. In the course of research, our purpose is to understand information processing of neuron networks.

In the results, we developed a non-invasive culturing and cell sorting method for primary neurons using alginate thin sheet. Usually, neurons cannot be collected selectively because neurons form spherical so that cannot be distinguished by floating condition. Moreover, after growth, if there are injured by protease, neurons will be died. The method we developed allows each single particular neuron to collect after axon or neurites are growth. By combine our method and the agarose micro-patterning techniques to make neuronal network artificially, neuronal networks using actual neurons can be constructed artificially and we will demonstrate the principle how neuronal networks work.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：脳・神経系の情報処理/細胞間コミュニケーション

1. 研究開始当初の背景

現在行われている神経ネットワークの情

報処理の研究としては、神経細胞の分散培養系、脳組織の一部を切り出した急性スライス

実験系、MRI や脳波を測定することによる脳全体の *in vivo* イメージングの系を使用して研究が行われている。しかしながら、未だ神経ネットワークでどの様に情報処理が行われているか明らかにされていない。理由は複雑に形成される神経ネットワークを制御できないことにある。そのため現在行われている神経ネットワークの情報処理機構を研究する手段としてはコンピュータによるシミュレーション解析を行うことで議論されている。我々はこれまでに、アガロースマイクロ加工技術と呼ぶ培養シャーレ上に一細胞単位で神経細胞の軸索伸展方向を制御し、人工神経回路を作製する世界初の技術を開発してきた。そこで、コンピュータの配線をつなげるように実際の神経細胞を特定の位置に配置し情報伝達の方向性を制御した神経回路が作製できれば真に神経回路の動作原理を検証できると考えた。この技術の課題として目的の生理機能、例えば興奮性と抑制性神経の区別、特定の発火頻度を持った神経細胞を区別した上で配置する技術が必須になる。

2. 研究の目的

初代神経細胞を用い、一細胞毎に伝達方向・細胞の種類を制御した人工的神経細胞回路を構築することで従来の分散培養や脳組織を利用したスライスカルチャーでは複雑すぎて理解できなかった神経のネットワークレベルでの基本動作原理、記憶形成機構、情報処理機構の解明を目的とする。そのために「特定の細胞のみを一細胞毎に回収する技術」の開発と、「アガロースマイクロ加工技術を用いた細胞配置技術」とを組み合わせた人工神経回路の作製を目指す。さらに、神経回路として機能しうる様々な最小構成ユニットを作製し、ネットワークレベルでの神経可塑性、神経刺激の履歴現象を検証することで、基本動作原理、記憶形成機構、情報処理機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

海馬初代神経細胞を(1)神経突起の形状と(2)細胞外電位を指標とした一細胞毎回収・再配置する技術の開発を行う。

(1)に関しては、カルシウムイオンの有無でゲル-ゾルを変化するアルギン酸を用いる。(2)に関してはアルギン酸と多電極細胞外電位計測システムとの組み合わせによる技術開発を試みる。

(1)に関してまず、通常細胞接着能を有さないアルギン酸シートを培養皿状に施し、細胞接着因子を結合させアルギン酸シート状で細胞を孤立培養できるかどうかの検討を行う。通常アルギン酸は細胞接着能を有さない。そのため、キレート剤による可逆的なゾル-ゲル

反応を持たせつつも接着能を有するため、接着因子はポリリジンをマイクロコンタクトプリントすることにより行う。細胞回収に関してはガラスニードルを用い、必要な細胞付近にカルシウムイオンを与えることでゲル化したアルギン酸シートをゾル化することにより回収を試みる。(2)に関しては、細胞外電位計測システムに使用する多電極計測チップ上にアルギン酸シートを作製することで、細胞外電位計測を行いながら細胞回収を試みる。

4. 研究成果

培養皿上に薄膜アルギン酸シートを作製し接着因子をマイクロコンタクトプリンティングでドット状に施す事により神経細胞を孤立培養する事に成功した。また、孤立培養している神経細胞は軸索や樹状突起を伸張させ、神経細胞として成熟している過程も確認する事ができた。孤立培養している状態で、カルシウムイオンを周辺に暴露させることで軸索伸張した神経細胞を一細胞単位で回収する事に成功した。また、回収した細胞は再培養が可能であった。

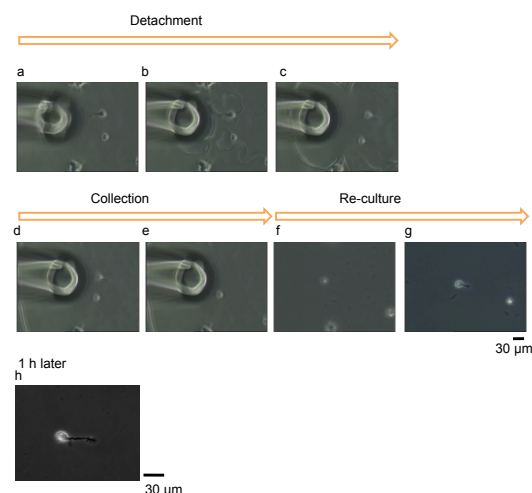


図1. 海馬初代培養をアルギン酸上で孤立培養した後、回収・再培養の様子。孤立神経細胞を回収後、再培養一時間後にはすでに神経突起を伸張している様子を確認できる。

次に細胞外電位を測定した上で細胞回収する技術の開発を試みた。多電極上にアルギン酸シートを施した上で神経細胞の電位計測は信号が弱く検出に困難があったため、細胞外電位をより強く発する心筋細胞にて同様の実験を行った。その結果、特定の心筋細胞の細胞外電位をアルギン酸シート状で確認し、回収も成功した。

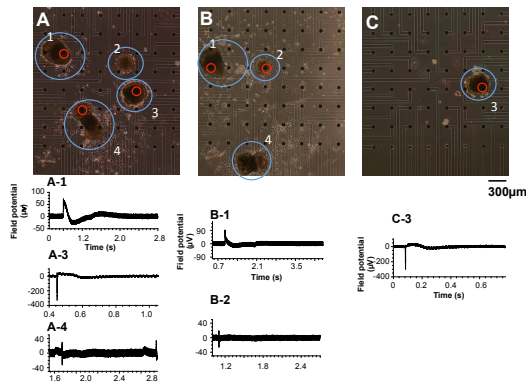


図 2. 心筋細胞を電位計測した後、再回収する様子。(A) 細胞外電位計測チップ上に薄膜アルギン酸シート処理を施し、その上に心筋細胞塊を 4 つ乗せ培養した図、(B): (A) の塊のうち、3 番のみを回収した図、(C): (A) の 3 の細胞塊を再培養し細胞外電位を測定した結果。回収前と回収後を比べ電位波形のパターンが変化していないことが確認された。

さらに回収後もその波形は変わらなかったことから再回収行程で細胞への影響がないことも同時に確認した。

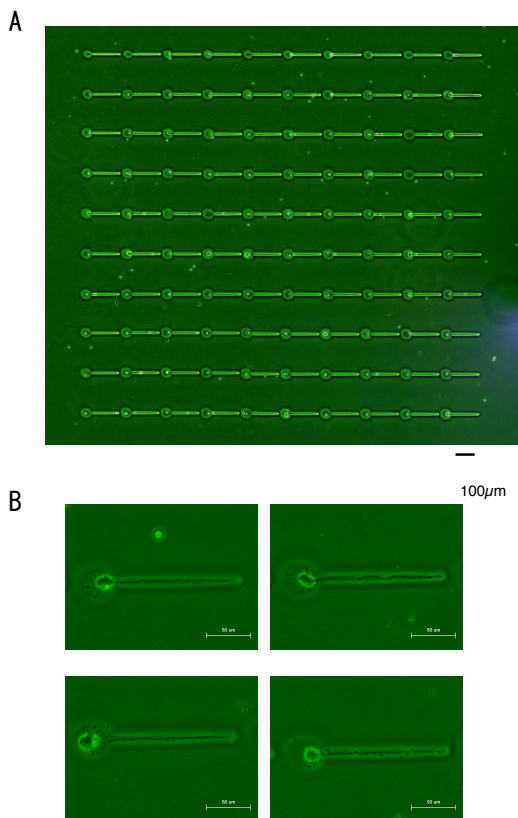


図 3 海馬神経細胞の再回収後の細胞をアガ

ロースマイクロ加工したチャンバーに一細胞毎に配置した図。A は全体図、B は拡大図。神経細胞がマクロ加工されたチャンバーの中で軸索を伸ばしている様子が確認できる。

これらの結果から、本手法は一旦初代培養を回収し、神経細胞の形状を確認した後で回収し再利用する技術でありこれまでにない技術である。本手法と神経細胞のネットワークパターンを自在に操作する事が出来るアガロスマイクロ加工技術を組み合わせることで神経細胞ネットワークの基本的な動作原理を検証出来る可能性が高まった。

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)

1. Terazono H, Kim H, Hayashi M, Hattori A, Nomura F, Kaneko T, Yasuda K. *A non-destructive culturing and cell sorting method for cardiomyocytes and neurons using a double alginate layer*, PLoS One. 7(8): e42485, (2012) 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Akihiro Hattori, Tomoyuki Kaneko, Kenji Yasuda, *Toward Quasi-In Vivo from In Vitro Assay (V): Noninvasive Precise Purification of Ventricular Cells from Mixture of Differentiated Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Using Spot Digestion of Double Alginate Layers on a Multielectrode Array Chip*, Safety Pharmacology Society (SPS2012) (2012. 10. 1-4) Phoenix convention center, Arizona, USA
2. 寺菌英之、金賢徹、服部明弘、野村典正、金子智行、安田賢二、*A Non-destructive Culturing and Cell Sorting Method for Cardiomyocytes and Neurons Using an Alginate Layer*, 第50回日本生物物理学会年会 (2012. 9. 22-24) 名古屋大学
3. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Masahito Hayashi, Akihiro Hattori, Hiroyuki Takei, Kenji Yasuda *CONSTRUCTION AND ANALYSIS OF AN ARTIFICIAL NEURONAL NETWORK USING A NEURON-COLLECTING, MICRO-PATTERNING METHOD BASED ON A MULTI-ELECTRODE ARRAY SYSTEM* NCTA2011 (2011.10.24-26) Université Paris-Est Créteil (UPEC), Paris, France

4. **Hideyuki Terazono**, Hyonchol Kim, Masahito Hayashi, Akihiro Hattori, Kenji Yasuda, *Construction of an artificial neuronal network and electrophysiological measurement with a selective collection method of cultured primary neurons*, 第34回日本神経科学大会 (2011.9.14-17) パシフィコ横浜

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：1 細胞レベルからの培養細胞の非侵襲的剥離回収装置および方法

発明者：安田 賢二、**寺菌 英之**、服部 明弘

権利者：神奈川県科学技術アカデミー・東京医科歯科大学・株式会社オンチップ・セラミクスコンソーシアム

種類：特願

番号：2010-031219

出願年月日：2010. 2. 16

国内外の別：国内、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺菌 英之 (TERAZONO HIDEYUKI)

公益財団法人 神奈川県科学技術アカデミー・オンチップ・セラミクスプロジェクト・研究員

研究者番号：30398143