

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23680050

研究課題名(和文)高密度CMOS電極による培養神経回路のネットワーク構造の解明

研究課題名(英文)High-dense CMOS electrode array to investigate neuronal network in culture

研究代表者

高橋 宏知(Takahashi, Hirokazu)

東京大学・先端科学技術研究センター・講師

研究者番号：90361518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞の分散培養系を対象として、1.8 mm角の計測領域に、11,011個の電極を有するCMOSアレイにより、培養神経ネットワークの形状と活動の関係を調べた。軸索に沿って伝播する活動電位の速度は、細胞内で大きくばらついており、軸索が太い部分では速く、細い部分では遅かった。また、ネットワークが成熟した後でも、発火頻度の低い神経細胞は活発に移動していることがわかった。さらに、軸索刺激に対する神経活動パターンから、ネットワークの機能結合を可視化し、ネットワークの可塑性を定量化する手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The network configuration and activities in dissociated cultures of neurons were investigated using high-density CMOS microelectrode array with 11,011 recording sites within 1.8 x 1.8 mm<sup>2</sup>. Our data demonstrated that the conduction velocity of action potential along an axon varies within an identical cell; the velocity was high at thick parts of axon, while low at thin parts. We also demonstrated that low-firing-rate neurons migrate actively. Furthermore, spatio-temporal patterns evoked by single axon stimulation were proved useful to quantify the functional connectivity and plasticity within the network.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学

キーワード：神経細胞 脳 ネットワーク 培養 電極 CMOS 可塑性 神経回路

1. 研究開始当初の背景

ラットの胎児の脳から神経細胞を取り出し、培地上に播種すると、各細胞は互いにシナプス結合を形成し、自己組織的にネットワークを形成する。この神経細胞の分散培養系は、外部からの繰り返し刺激に対して、豊かな可塑性も示す。したがって、このような培養神経回路は、神経ネットワークの形成過程を考察するモデルとして、また、記憶や学習のメカニズムを考察するモデルとして注目されている。

脳の情報処理において、個々の神経細胞ではなく、神経細胞集団としての情報表現が重要であることは疑いない。その基盤は、言うまでもなく神経ネットワークの構造である。そのような構造を明らかにするためには、どの細胞とどの細胞が、どの程度強く結合しているかを調べる手法が必要になる。神経細胞間の機能結合の推定手法として、様々な手法が提案されているが、その妥当性の検証は十分ではない。分散培養系の実験研究から、複雑ネットワーク分野や理論脳科学分野などの理論分野、さらにはリハビリ治療や創薬など医学分野へと広範な波及効果を期待するためには、神経回路の詳細なダイナミクスを実験的に定量化していく手法の確立が欠かせない。

2. 研究の目的

胚齢 18 日目のウイスター・ラットの胎児の大脳皮質から作成した初代分散培養を実験試料とした。この試料は、播種後 1 週間くらいから神経活動を発生し始め、その後、数か月以上にわたり活動を続ける。

神経回路の詳細なダイナミクスを明らかにするために、次世代の生理実験のツールとして、高密度 CMOS アレイが注目されている。本研究は、培養神経ネットワークを実験対象として、同ネットワーク内を行き交う神経信号を高密度 CMOS 電極アレイで捉え、ネットワーク構造を可視化する。さらに、確立した手法を利用して、神経ネットワークの時空間的な神経活動の可塑性の規則を明らかにする。

3. 研究の方法

計測には、高密度 CMOS 電極アレイを用いる(図 1)。同アレイは、1.8 mm 角の計測領域に、11,011 個の電極を有する。各電極の直径は 7  $\mu\text{m}$ 、電極間距離は 17  $\mu\text{m}$ 、サンプリング周波数は 20 kHz と、計測の時空間分解能は極めて高い。神経細胞の直径は数 10  $\mu\text{m}$  と CMOS アレイの電極間距離と同等なため、複数の電極で 1 細胞を計測できる。また、直径 1  $\mu\text{m}$  程度の軸索を伝播する神経信号の様子も捉えることができる。細胞数を電極数(1 万個)以内に制限すれば、原理的には、計測領域内のすべての細胞から計測できる。この CMOS アレイは、スイスの ETH の研究協力者 Andreas Hierlemann 教授により、

化学センサーとして開発された。研究代表者は、2008 年 9 月から同教授と共同研究を開始し、神経回路の実験手法としての確立を目指し、デバイスの提供を受けてきた。

4. 研究成果

(1) 活動電位の伝播の可視化

電気的な計測手法により、活動電位が軸索に沿って伝播する様子を可視化することに世界で初めて成功した。軸索を伝播する活動電位は、信号強度が非常に微弱なため、電極を用いた細胞外からの計測対象にはなりえなかった。しかし、本研究では電極を用いて神経細胞に電気刺激を加えることで、再現性高く活動電位を発生させることができた。これによって、電気刺激直後の神経活動を何度も計測し、それらを平均して信号を取り出した(図 2)。

軸索内の活動電位の伝播速度を実測したところ、0.2~1.5 m/s だった。伝播速度は、

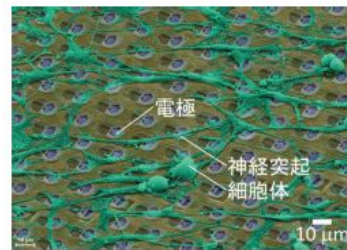


図1 電極アレイ上で神経細胞を培養した試料の電子顕微鏡像(ETH より写真提供)。電極間隔は約18  $\mu\text{m}$ 。

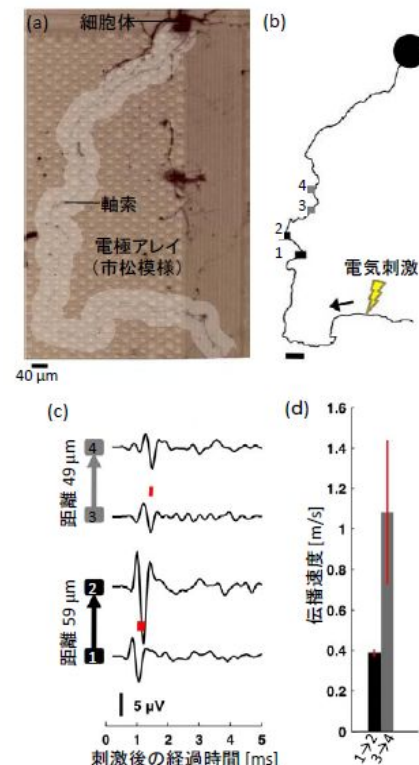


図2 活動電位の伝播速度。(a) CMOS電極アレイ上に蛍光標識された神経細胞。市松模様は電極パターンを示す。このアレイの電極直径は8  $\mu\text{m}$ 、電極間距離は最小で18  $\mu\text{m}$ 。(b) 軸索上を伝播する活動電位の伝播速度の実測。(c) 活動電位の波形。(d) 活動電位の伝播速度の実測値。

同じ軸索内でも場所ごとに大きく異なり，細胞体付近の太い部分では，軸索末端の細い部分よりも平均で 3.7 倍程度も速いことがわかった．さらに，長期間の計測を試みたところ，軸索の同じ部位でも，日によって活動電位の伝播速度が変化することがわかった．また，活動電位の伝播速度は，薬理刺激でも変化することも示した．

これらの結果から，軸索は，電気回路のような単なるケーブルではないことがわかる．活動電位の伝播速度のばらつきや変化は，軸索が能動的な素子として脳内の情報処理に大きな影響を及ぼしていることを強く示唆する．

## (2) 細胞位置の同定

分散培養神経細胞の神経回路網の電気生理学的な活動パターンの研究は，これまで多数報告されている．しかし，生体内や組織切片での研究に比べ，分散培養系では，興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を単一細胞レベルで識別して行われた神経回路網の研究は少ない．

そこで，高密度 CMOS アレイで計測した活動電位の波形を比較し，その細胞が興奮性か抑制性かを識別することを試みた．具体的には，MAP2 (microtubule-associated protein 2) と GABA (gamma-aminobutyric acid) を免

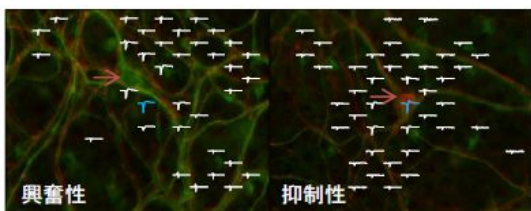


図3 興奮性と抑制性細胞の細胞体付近から得た神経信号

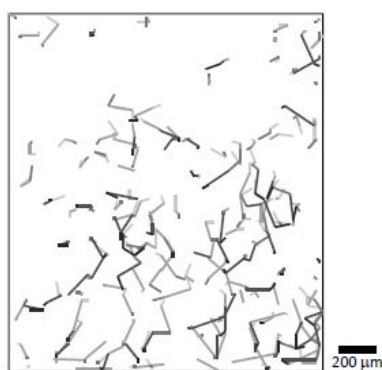


図4 神経信号から推定した細胞移動. 計測期間は，播種後26日(淡)から40日(濃)．

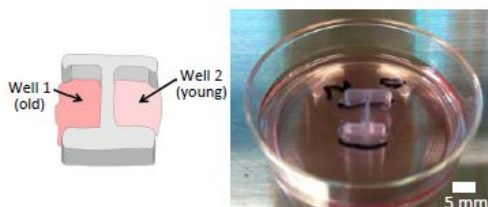


図5 H型セパレータを用いた成熟細胞と幼若細胞の共培養

疫抗体染色した細胞で興奮性と抑制性を識別したうえで，高密度 CMOS アレイで測定した活動電位の波形に，興奮性細胞と抑制性細胞の差異があるかを調べた(図3)．

その結果，生体内や組織切片を用いた先行研究でも報告されているように，分散培養系の CMOS アレイによる計測でも，抑制性神経細胞では，活動電位の波形の時間変化は，興奮性神経細胞よりも速いことがわかった．ROC の AUC を指標にしたところ，興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を 0.9 程度の精度で識別できることが示された．

## (3) 細胞移動

神経活動パターンは，神経ネットワークの形状に依存している．したがって，神経活動パターンの可塑性は，ネットワーク形状の変化も伴うはずである．その端的な例として，神経細胞の新生に関わる現象が挙げられる．神経細胞の新生は，個体の発生期においてだけでなく，成体においても認められ，新生した神経細胞は，既存の神経回路に取り込まれる．このような神経新生を伴うネットワークの変化は，認知・記憶機能に重要な役割を担っている可能性がある．しかし，従来の電気生理学的手法やイメージング手法では，長期間に渡り，細胞の移動を観察しながら，個々の細胞の活動を計測することは難しかった．本実験では，CMOS アレイを用いて，個々の細胞体位置を同定しながら，培養神経ネットワークの経時的な変化を調べた(図4)．

高密度 CMOS アレイを用いて，成熟した神経細胞の移動距離と活動の関係性を調べた．その結果，成熟した分散培養系でも，神経細胞は1日当たり  $3.0 \pm 1.5 \mu\text{m}$  移動することがわかった．また，神経細胞の移動距離と活動の変化には負の相関があること，すなわち，低発火頻度の神経細胞が活発に移動することがわかった．

H 型セパレータを用いて，幼若神経細胞と成熟神経細胞を共培養した(図5)．その結果，幼若神経細胞は成熟神経細胞よりも活発に移動していることがわかった．このような移動は，幼若神経細胞が成熟神経細胞と機能的な結合を形成するうえで，重要な役割を担っていると考えられる．

これらの結果は，発火頻度の低い神経細胞は活発に移動しながら，神経回路内での役割を獲得していくことを示唆する．

ただし，本実験だけでは，神経細胞の活動と移動との因果関係は明らかではない．因果関係として，第一に，発火頻度の高い神経細胞は，周囲の神経細胞と多く結合しているため，神経突起の張力によって，細胞移動が拘束された可能性が考えられる．逆に，発火頻度の低い神経細胞は，周囲の神経細胞とあまり結合を共有していないため，容易に移動できる．第二に，神経系の恒常性が考えられる．すなわち，神経細胞が恒常的に発火頻度を一定以上に保ちネットワーク内での役割を獲

得しようとしているとすれば、神経細胞は発火頻度を高められる場所に移動するはずである。これらの可能性を検証するために、培地組成を変えてウェル全体の発火頻度を調整した条件や、神経細胞を刺激し、強制的に発火頻度を上げた条件で、移動量を定量化する必要がある。

#### (4) 機能結合の可視化とその可塑性

軸索の電気刺激で誘発された活動から機能結合を推定する手法を試み(図6), 同手法による推定と自発活動による推定とを比較・評価した。まず, 自発活動パターンから機能結合を推定する手法として, 条件付発火確率(Conditional Firing Probability; CFP)と移動エントロピー(Transfer Entropy; TE)を用い, 両手法を比較した。次に, CFPを用いて, 自発活動パターンと微小電気刺激による誘発活動パターンから機能結合をそれぞれ推定し, 両者を評価する。さらに, 20 Hzの高頻度刺激(テタナス刺激)で神経回路に可塑性を誘導し, その可塑性を調べる手法として, 自発・誘発活動パターンに基づく推定を比較した。

自発発火パターンから, 条件付き発火確率(CFP)と推定と移動エントロピー(TE)を用いて機能結合を推定したところ, 両者の機能結合のスピアマン順位相関係数は0.9程度( $p < 0.001$ )と, 同等の機能ネットワークが推定された。

しかし, CFPを用いて, 刺激誘発パターンと自発発火パターンの機能結合を比較したところ, スピアマン順位相関係数は0.4以下と, 両者の相関関係は必ずしも高くはなかった。また, 前シナプスニューロンの発火後に後シナプスニューロンが発火する確率は, 刺激誘発パターンでは自発発火パターンよりも, 10倍以上小さかった。さらに, 自発発火パターンから判別した機能結合の有無と刺激誘発パターンから判別した機能結合の有無を比較したところ, 前者の真陽性が約7割のときに偽陽性が3割程度 ROCのAUCは0.8程度だった。これらの結果から, 自発発火パターンによる推定は機能結合を過大評価す

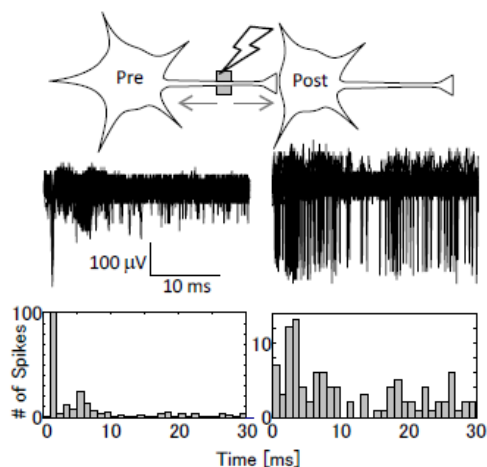


図6 軸索の電気刺激で細胞ペアの機能結合強度を推定

ることがわかった。

テタナス刺激の前後で, 刺激誘発パターンのCFPの変化を調べたところ 刺激前後のCFPは, スピアマン順位相関係数で-0.61と有意な負の相関が認められた ( $p < 0.001$ ) (図7)。また, テタナス刺激前に結合ありと判別した機能結合は刺激後に減弱し, 逆に, 刺激前に結合なしと判別した機能結合は刺激後に増強した。これらの結果は, 単一の軸索へのテタナス刺激は, ネットワーク内の機能結合を平均化することを示唆する。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

DJ Bakkum, U Frey, M Radivojevic, TL Russell, J Müller, M Fiscella, H Takahashi, A Hierlemann: "Tracking axonal action potential propagation on a high-density microelectrode array across hundreds of sites." *Nature Communications* 4: Art. No. 2181 (12 pp), 2013 (doi: 10.1038/ncomms3181)

H Takahashi, 他: "Light-addressed single-neuron stimulation in dissociated neuronal cultures with sparse expression of ChR2." *Biosystems* 107 (2): pp. 106-112, 2012 (doi: 10.1016/j.biosystems.2011.10.002)

大川知, ..., 高橋宏知: 「成熟した培養神経回路のネットワーク形状と活動の経時変化」, 電気学会論文誌 C 電子情報システム部門誌 134 (3): pp. 338-344, 2014 (doi: 10.1541/ieejieiss.134.338)

[学会発表](計16件)

三田毅, ..., 高橋宏知: 「高密度 CMOS アレイ上の分散培養系の自発および誘発神経活動パターンに基づく機能ネットワークの推定」, 電気学会研究会 (東京, 2014年3月21日)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.brain.rcast.u-tokyo.ac.jp/~takahashi/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 宏知 (TAKAHASHI, Hirokazu)

東京大学・

先端科学技術研究センター・講師

研究者番号: 90361518