

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650058

研究課題名(和文)新規細胞選別技術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)Development a cell selection method and analysis of cell-cell communication using a microfabrication technique

研究代表者

寺園 英之(Terazono, Hideyuki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：30398143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：実際の細胞を使い人工的神経細胞回路を構築することで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「神経細胞特異的表面結合性DNAアプタマーの作製技術」、「神経発火を指標とした一細胞回収技術」、「アガロースマイクロ加工技術を用いた細胞配置技術」の3つの技術開発を軸に人工神経回路の作製を目指した。結果としてモデル細胞を利用して神経細胞特異的表面結合性DNAアプタマーの作製に成功した。また、特定の細胞を回収し神経ネットワークを作製する事でネットワーク構造依存的な発火パターンを示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Three techniques, a microprocessing-assisted cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment method, a single cell collection method by measuring firing rate of neuron and a micro-patterning using an agarose microfabrication technique, were developed to clarify the fundamental mechanism of the neuronal network. As the results, single strand DNA aptamers that bind cell surfaces was able to be collected by a modified aptamer selection method. Moreover, I clarified a network structure-dependent firing pattern by constructing several neuronal networks using single cell collection method and the microfabrication technique.

研究分野：生物物理

キーワード：神経ネットワーク 人工神経細胞回路 マイクロファブリケーション技術

### 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、神経細胞の分散培養系、脳組織の急性スライス実験系、MRI や脳波など脳全体の *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。理由の一つとして形成される神経ネットワーク複雑過ぎることがある。この問題を解決するために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「アガロースマイクロ加工技術」と呼ぶ世界初の技術を開発してきた。この技術を用いて実際の神経細胞を特定の位置に配置し配線をつなげるように情報伝達の方法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。一方この技術の課題として目的の生理機能を持った神経細胞、例えば興奮性と抑制性神経等の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、特定の細胞を選別し伝達方向・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「神経細胞特異的表面結合性 DNA アプタマーの作製技術」、「神経発火を指標とした一細胞回収技術」、「アガロースマイクロ加工技術を用いた細胞配置技術」の3つの技術開発を軸に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、神経回路の基本動作原理、情報処理機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

神経細胞表面特異的結合性アプタマーの開発

海馬初代神経細胞の細胞表面に結合する DNA アプタマーの作製を行い、特定の神経細胞を回収する技術の開発を行う。方法として cell-SELEX 法と呼ばれる DNA アプタマーの選別方法に独自の手法を加えた方法(特許申請済)にて細胞選別を行う。まず、4 の 40 乗種類の DNA アプタマーライブラリと呼ばれる試

薬を細胞と反応させ結合した物を回収する。これを 10 回ほど繰り返すことで神経細胞表面に結合しやすい DNA アプタマーを選別する。通常の cell-SELEX を行う場合、細胞を磨り潰して精製を行うため細胞内部のタンパク質に結合するアプタマーを精製する危険性がある。解決する手段として、細胞を磨り潰さず、タンパク質分解酵素であるトリプシンを用いて細胞表面のタンパク質のみを分解する事で細胞表面のみに結合する DNA アプタマーの精製を試みる。さらに、通常、精製されたアプタマーのシークエンスはコンピテントセルを用いたサブクローニングで行うが、本申請内容では次世代シークエンスサービスを利用することで網羅的にアプタマー配列を解析する事を検討している。

次に、海馬初代神経細胞を形態学的・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。方法として、細胞外電位を多チャンネル同時に記録できるチップ上にイオンの有無でゾル-ゲル相転移を起こすアルギン酸をチップ上にコーティングすることで解決を試みる。課題として細胞外電位を測定する際、アルギン酸カルシウム層の厚さが問題に可能性がある。我々はこの技術課題を克服するために半導体分野で使用され、高分子の厚さをマイクロメートル単位でコントロールすることが可能なスピントーターと呼ばれる装置を導入し検討を行う。細胞電位記録装置は 5 $\mu$ m 程度離れた箇所でも微弱ながら測定することが可能である。そのため、現状のアルギン酸シートの作製方法においても測定可能であるが、より、信号強度を高めるためアルギン酸シートを限界まで薄く作製し信号をより検出しやすい条件を行う事を目標にする。細胞外電位を測定することにより、発火頻度やパターンを確認する事で区別を行う。

開発した細胞選別技術を用いて初代海馬神経細胞を用いてアルギン酸カルシウムシート処理を施した培養シャーレで神経を培養後、軸索伸展・信号検出が認められた段階で EDTA により剥離・回収し、その後の再培養できるか技術の確立を目標とする。

その後、特定の形態、生理学的特徴を持つ神経細胞を選択後、アガロースマイクロ加工を施した培養シャーレに再配置することで、人工的な神経細胞回路ネットワークの構築を目指す。

形態学的・電気生理学的アプローチにより細胞を選別後、神経ネットワーク構築を行う。方法としては赤外集束光によるマイクロ加

工を施した培養シャーレに選別した細胞を一細胞ずつ配置する。また、マイクロ加工する培養シャーレは、多電極細胞外電気記録装置上に加工する事により、パターンニングされた神経細胞を同時に記録する予定である。シャーレに施された多電極は電位記録以外に電極上の細胞を刺激することも可能であるため、自発発火による神経伝達以外に外部から自在に電気刺激を加えることで神経発火パターンがどの様に变化するか計測する。

作製する神経細胞回路としてまず、一つの神経細胞に対し、神経発火頻度の異なる2種類の神経細胞を入力させ、入力を受けた細胞がどの様に応答するか検討を行う。その際、入力神経の片方に対し、高頻度刺激を与えることで与えなかった方からの入力との情報伝達の違いを検討する。これにより、未だ世界中で確認されていない神経ネットワーク内部での過疎的变化について検証を行う。次に、興奮性・抑制性神経をつなぎ合わせたシンプルな神経ネットワークモデルを作製する。それにより、興奮性細胞入力のみで構成される神経ネットワークと興奮性・抑制性で構成される神経ネットワークの違いを検証することで、生理学的な意義を明らかにしていく。その後、徐々に複雑なモデル系を構築していく予定である。これにより、基本演算モジュールの可能性を検討する予定である。

#### 4. 研究成果

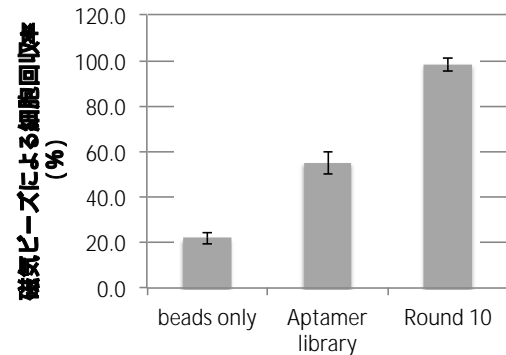
##### 細胞表面結合性アプタマーの開発

細胞表面結合性 DNA アプタマーの開発を進めるにあたり、最終ターゲットとなる初代神経細胞は様々な種類が混在するため、ある程度均質な性質を持つ細胞株を用いて研究を進めた。対象としてはヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。

まずは Cell-SELEX 中に細胞内容物に DNA アプタマーが結合し細胞表面結合性 DNA アプタマーの回収が困難になることを防ぐ目的で細胞生存率を保持したまま DNA アプタマーを回収できる条件を検討した。タンパク分解酵素の処理時間を調整することで細胞生存率を保持したままの DNA アプタマーを回収する条件を見つけた。この Cell-SELEX を改良した独自の手法を用いて、モデル細胞である HUVEC に対し cell-SELEX を実施した。

アプタマーライブラリを細胞と反応させ、その後結合したアプタマーを回収し、PCR にてクローンを増幅する作業を1ラウンドとして合計10ラウンドを繰り返した。Cell-SELEX 後、ラウンド10のアプタマーの5'末端に磁

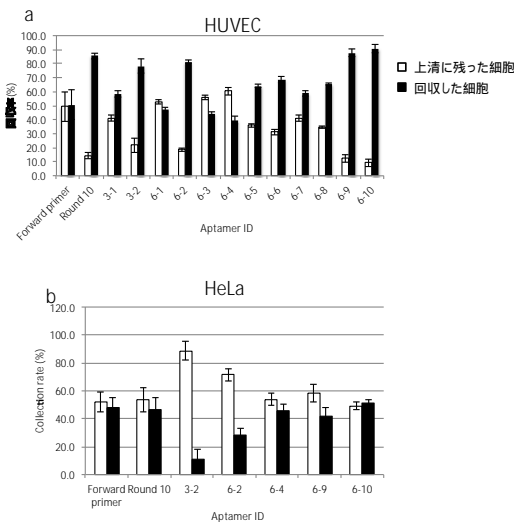
気ビーズ標識を施し細胞と HUVEC と反応させることで回収できるか確認した。その結果、ラウンド10のプロープは cell-SELEX を行う前のアプタマーライブラリと比較して顕著に細胞を回収する事に成功した。



さらに、各ラウンドで得られたアプタマーライブラリに対し次世代シーケンス解析を行った。その結果、ラウンドを重ねることで回収されるアプタマー配列の相同性が高くなっていくことが確認できた。また、配列のうち97%以上を相同性とする配列でクラスタリングを行った結果、5ラウンドからクラスタリングできる配列の増加が認められ、およそ9-10ラウンドでクラスタリングできる配列が定常状態になる事も確認できた。ラウンド10でクラスタリングした配列から代表配列を選定し、選定した配列を元に系統樹を作成した結果、およそ8系統の配列に絞られることが明らかになった。そこで、解析情報を元に複数の代表配列候補の5'末端を磁気ビーズに結合させた標識プロープを作製した後、磁気ビーズ回収法にてアプタマーの細胞表面標識が可能か確認を行った。しかしながら次世代シーケンスから得られたアプタマーはほとんど細胞表面への結合が認められなかった。

そこで、新たな手法として、ラウンド10アプタマーを磁気ビーズ標識し、一旦細胞を磁気ビーズで標識した後、顕微鏡下でビーズが結合している細胞を一つ一つ回収する新規のマイクロマニピュレーションを開発し、回収した細胞から標識しているアプタマーを同定した。最終的に12種類のアプタマー配列を同定し、それぞれに対して細胞標識能を検討した結果、7種類のアプタマーがラウンド10アプタマーと同程度あるいはそれ以上の結合能を示した。そのうち結合能が高いアプタマー5種類を選定し、HeLa細胞に対し同様の処理を行った結果、どのタイプもコントロールと同程度の結合能しかし召さず、

HUVEC 特異的な DNA アプタマーの精製に成功したことを証明した。



これにより、我々が開発した方法は生細胞の表面特異的な DNA アプタマーを回収できる事を明らかにした。

このように、マイクロマニピュレーション法を用いた新規アプタマー精製は当初問題となっていた様々な種類が混在する初代神経細胞にも適用できる可能性が高く、現在は初代神経細胞に対して表面特異的な DNA アプタマーの作製を行っている。

次に、海馬初代神経細胞を形態学的・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に関して、スピニングを用いて細胞外電位アレイディッシュ上に薄膜アルギン酸をコーティングし、その上に培養した神経細胞から信号を得ることに成功した。また、アルギン酸ディッシュに細胞接着基質をコーティングする事により、通常細胞接着率が低いアルギン酸上に神経細胞を培養する技術も構築した。さらに本技術を応用することで、これまで難しかった神経細胞シートの作製にも成功している。細胞シートは先行研究で温度応答性高分子(NIPAAm)を用いた心筋細胞シートで成果が上げられているが、NIPAAmには神経細胞の接着率が非常に低く、シートを形成しない問題があった。新たにアルギン酸を利用した神経細胞シート作製技術は基材の温度管理も必要なく非常に簡便に作製する事ができる。この技術を用いて3枚の神経細胞シートを作製後、重ね合わせることで層構造を持たせた人工神経細胞組織の作製に成功した。また、重ね合わせた神経細胞シートはそれぞれ同期することも確認した。本技術はこれまで未踏領域で

ある中枢神経系の再生に役立つ研究に発展する可能性が高い。

最後に構築してきた技術を元に人工的な神経回路を構築し、人工神経ネットワークの機能解析を行った。

選別した神経細胞をアガロース加工にて2種類のネットワークパターンを多電極アレイチップ上に作製し、細胞を配置・電位計測を行った。直線上に配置した神経はどの電極からも同期した信号を検出し、高頻度刺激を行った後、刺激前とは異なるパターンの同期発火が確認できた。また、もう一つのパターンとして、4つの細胞の神経伝達が循環するようなパターンを作製し高頻度刺激を行ったところ、一つの細胞から持続的な神経活動を記録することに成功した。

これにより、ネットワークパターンを人工的に作る事により、異なる神経活動を作製する可能性を見いだすことができた。

本申請課題により、多くの技術開発をする事に成功した。今後はより発展的な研究を進めることでより、神経細胞ネットワークの動作原理の理解に努める。

#### 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. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Fumimasa Nomura, and Kenji Yasuda, Development of a microprocessing-assisted cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment method for human umbilical vein endothelial cells. Jpn. J. App. Phys. in press.

[学会発表](計 7件)

1. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Fumimasa Nomura, Kenji Yasuda, Fabrication and functional evaluation of "neuronal sheet" using calcium alginate gel., 第53回日本生物物理学会年会, 金沢, 2015,
2. 寺園 英之, 野村 典正, 服部 明弘, 金 賢徹, 安田 賢二, 新規神経シート作製技術の開発と神経ネットワーク間のコミュニケーション解析, 第38回日本神経科学大会, 神戸, 2015,
3. Hideyuki Terazono, Fumimasa Nomura, Akihiro Hattori, Kenji Yasuda, Constructive approach to understand neuronal communication by controlling spatial patterns using microprocessing and cell-sheet technique. 2015 The Bridging Biomedical Worlds From Neural Circuitry to Neurotechnology, 東京, 2015,
4. 寺園 英之, 野村 典正, 安田 賢二, 神

経細胞シート構築技術の開発と神経ネットワーク間コミュニケーションの電気生理学的解析, 生命動態システム科学四拠点・CREST・PREST 合同シンポジウム, 京都, 2015,

5. 寺園 英之, 野村 典正, 服部 明弘, 金 賢徹, 安田 賢二, オンチップ人工神経回路作製技術の開発と電気生理学的計測, 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014,
6. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Kenji Matsuura, Hiroyuki Takei, Akihiro Hattori, Kenji Yasuda, Electrophysiological Analysis of Single Neurons in Genetically Micropatterned Constructive Neuronal Networks, 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC2014), 2014,
7. Hideyuki Terazono, Hyonchol Kim, Akihiro Hattori, Fumimasa Nomura, Tomoyo Hamada1, Kenji Yasuda, Toward Quasi-In Vivo from In Vitro Assay (IV): Fabrication of Direction-Controlled Artificial Neuronal Networks Using Agarose-Microetching Method and Single-Cell-Electrodes for Quantitative Evaluation of Neuropsychiatric Disorders, Safety Pharmacology Society 13th Annual Meeting, 2013,

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺園 英之 (TERAZONO, Hideyuki)  
東京医科歯科大学 生体材料工学研究所・助教  
研究者番号：30398143

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：