

脳回路の3次元再構成技術と機能計測

3D reconstruction of neuronal network and functional measurement

○ 鈴木郁郎 (東京工科大学)、小田原あおい (東京工科大学)、福田真生 (東京工科大学)、天野翔太 (東京工科大学)、萩原詩穂 (東京工科大学)、後藤正男 (東京工科大学)

Ikuro SUZUKI, Aoi ODAWARA, Mao FUKUDA, Shota AMANO, Shiho HAGIWARA, Masao GOTOH, Tokyo University of Technology

**Abstract:** We have developed the 2D and 3D reconstruction techniques of neuronal network, the carbon nano tube multi-electrode arrays for real-time measurements of neurotransmitter and the simulation techniques of neuronal network by spot heating. Reconstruction techniques are (1) neuron patterning methods using chemical inkjet printer, (2) the collagen gel photo-thermal etching method, (3) controlling the orientation of collagen fibers, (4) micro fabrication of biocompatible materials using excimer laser. The advantages of these methods are that it allows control of the cell numbers and the position of synaptic connections during cultivation and that control of cell position and direction of neurite in 3D. Using these methods, we have constructed the 3D neuronal network model with multiple layers, and confirmed the function of it by Ca<sup>2+</sup> imaging. These techniques can potentially be used for regenerative medicine and development of drug screening model, as well as research in basic neural biology.

**Key Words:** Neuronal network, 3D reconstruction, Collagen gel, 1064nm laser, Carbon nano tube, Multi-electrode arrays

1. はじめに

細胞の空間配置を制御する細胞アレイチップは、生体分子との相互作用解析や細胞間相互作用解析などの基礎研究への応用および幹細胞の効率的培養法や創薬スクリーニング技術などの医学創薬分野への応用が期待されている。また、細胞から組織モデルを人工的に再構成する技術は、将来の再生医療技術や医薬品開発の評価モデルとしての応用が期待されている。本研究では、生体組織の中でも最も再構成することが難しいとされている脳組織に着目し、神経ネットワークの細胞数制御技術および脳神経回路機能で重要となる情報の伝達方向 (神経突起の伸長方向) を3次元で制御した培養技術の開発を行った。また、神経回路機能で重要となる神経伝達物質のリアルタイム計測を目指したカーボンナノチューブ微小多電極アレイチップの開発、および任意の神経細胞を自在に刺激できるレーザー局所熱刺激法を開発した。

2. 方法

2-1 ケミカルインクジェットプリンターを用いた 2D・3D 神経回路の再構成技術

神経回路の再構成技術としてピコリットルで制御できるケミカルインクジェットプリンター (CHIP-1000, shimazu) を用いた。2次元でのパターンニングは、神経細胞の接着基質である poly-D-lysine 100pL を細胞非接着基質であるア

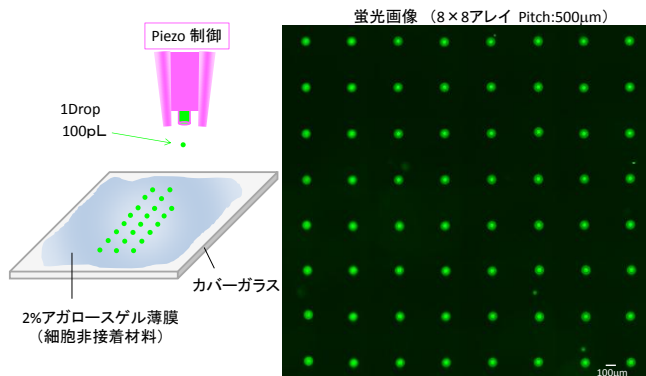


Fig. 1 Alexa488 のケミカルインクジェットプリンティング

ガロースゲル上にプリンティングした。また、3次元立体組織を構築するために、コラーゲンゲルにRat海馬初代培養細胞の懸濁液を混ぜ、細胞内包型カプセルを作製した。

2-2 コラーゲンゲルレーザー加工技術による 2D・3D 神経回路の制御技術

細胞数や異種細胞の細胞間相互作用を2Dおよび3Dで制御した神経回路の再構成技術として、コラーゲンゲルレーザー加工技術による培養法を開発した。ITOガラス上にコラーゲンゲル (Rat tail collagen type I) をコートし、細胞周りのコラーゲンゲルを1064nmレーザー照射により融解することで細胞数を制御した。細胞播種後に任意の細胞を選んで細胞数を制御できる点と神経突起の伸長方向を培養中に誘導できる点が本技術の特徴である。

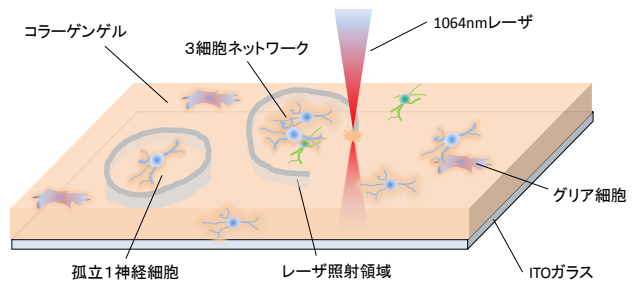


Fig. 2 コラーゲンゲルレーザー加工による細胞数制御技術

2-3 コラーゲンゲル繊維の配向技術を用いた神経組織の3D再構成技術

細胞体の空間配置と神経突起の伸長方向を3次元で制御する培養技術として、コラーゲン繊維配向技術を開発した。コラーゲン繊維の方向に沿って神経突起の伸長方向を誘導させる技術である。細胞体の空間配置は、PDMSマイクロチャンバにより制御し、3次元細胞体層を作製した。細胞接着後、PDMSシートを剥がし、コラーゲン繊維の配向技術と組み合わせることで、多層構造を持った3次元脳回路モデルを構築した。

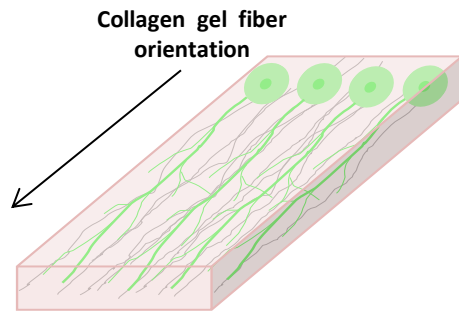


Fig. 3 コラーゲンゲルレーザー加工による細胞数制御技術

#### 2-4 エキシマレーザー加工技術を用いた神経回路の3D再構成技術

生体適合性材料の中に意図した形状に細胞を埋め込む技術としてエキシマレーザーを用いた細胞の3次元空間配置技術を開発した。エキシマレーザーは、ガラスなどの硬い材料を3次元加工できる特徴を持つ。ここでは、材料としてコラーゲンファイバーを用いて、細胞体の位置と神経突起の伸長方向をZ軸に制御した培養法を試みた。エキシマレーザーによるコラーゲンファイバーの最小加工幅は約5 $\mu\text{m}$ であった。

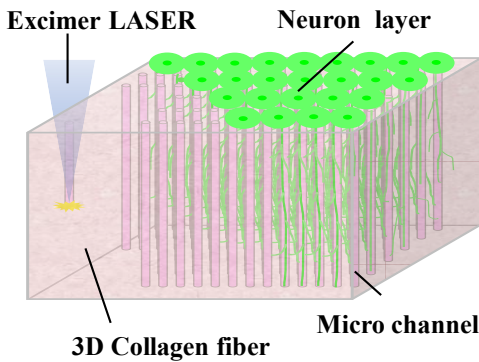


Fig. 4 エキシマレーザーを用いた3次元加工技術

#### 2-5 カーボンナノチューブ微小多電極アレイを用いた神経伝達物質計測

神経細胞から放出される神経伝達物質を非侵襲に長期間計測する技術として、高導電性および吸着物質特異的な反応を示すカーボンナノチューブ (CNT) を電極材料として微小多電極アレイチップを開発した。カーボンナノチューブは強い凝集特性を持ち、分散化がボトルネックとなっていたが、分散化法と電気メッキ条件を検討したことにより直径20 $\mu\text{m}$ ~50 $\mu\text{m}$ の微小電極が作製できた。作製したCNT多電極アレイ基板の電極表面の構造評価を電子顕微鏡で行い、神経伝達物質の感度特性を電気化学測定(サイクリックボルタメトリー法)にて評価した。

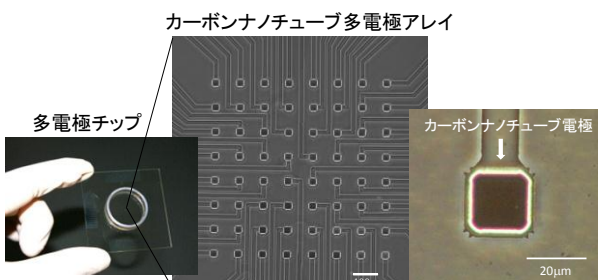


Fig. 5 カーボンナノチューブ多電極アレイチップ

#### 2-6 レーザ局所熱刺激による神経細胞刺激技術

神経細胞を刺激する技術としてケイジド化合物などを用いた光刺激や微小電極を用いた電気刺激があるが、ここでは新しい刺激法として熱によって神経細胞を刺激する技術を開発した。局所的に熱を発生させるために、レーザー吸収素材であるITOガラス上に神経ネットワークを培養し、1064nmレーザーを照射した。レーザー照射による神経細胞の誘発応答を評価するためにCa<sup>2+</sup>インジケータであるOregon green 488 BAPTAを用いたCa<sup>2+</sup>イメージング法と神経ネットワークの応答を多点で計測できる多電極アレイ細胞電位計測法を用いた。

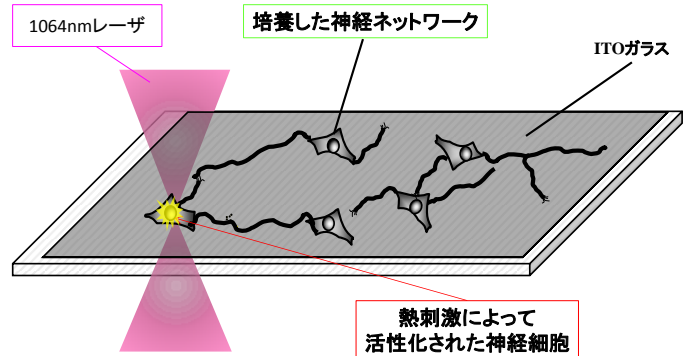


Fig. 6 レーザ局所加熱による神経細胞刺激技術

#### 2-7 細胞培養

ラット胎児 (E18) から海馬神経細胞および大脳皮質細胞を採取し、neurobasal Medium (Invitrogen)、B27 Supplement (Invitrogen) 培地、CO<sub>2</sub>5%37°C下で培養を行った。

### 3. 結果

#### 3-1 インクジェットプリンティングを用いた神経ネットワーク培養

アガロースゲル上に poly-D-lysine 100pL をドットプリンティングした結果、直径100 $\mu\text{m}$ でリジンコートされていることがわかった。海馬神経細胞を播種した結果、リジンコート領域のみに1細胞単位でマイクロネットワークが構築されている様子が観察され、シナプス形成も確認された (Fig. 7)。また、1細胞培養では、リジンコート領域の淵に沿って神経突起が伸長し、自己ループ (Autapse) を形成している様子が高い頻度で観察された。

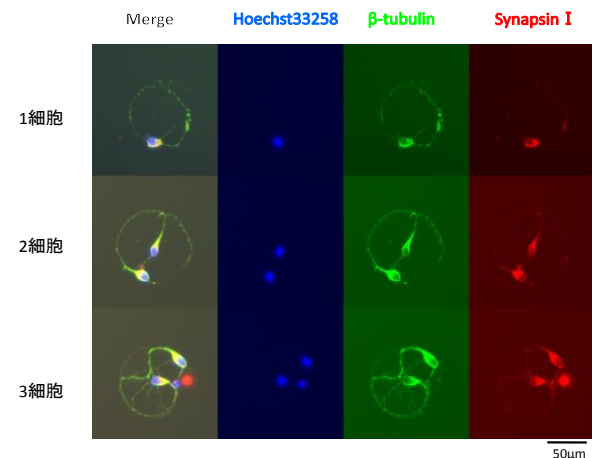


Fig. 7 1細胞レベルマイクロネットワークアレイ

3次元再構成技術として、コラーゲンゲルに細胞を内包させたカプセルのプリンティングに成功した。

### 3-2 コラーゲンゲルレーザ加工による細胞数制御

細胞播種後に任意の細胞を選択し、レーザ加工を施した結果、細胞数を制御した培養に成功した。抗体免疫染色法を行った結果、レーザ加工した部分のみ Collagen gel が排除されていることが観察され、周りのネットワークと結合することなく隔離培養されていた。また、3次元ゲル内に立体的に培養されていることが確認された。更に、培養中に神経突起の伸長エリアを制御することで特定の箇所でのシナプス結合させるができた。Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った結果、1細胞レベルのネットワーク（1細胞～5細胞ネットワーク）においても機能を有していることが確認できた。

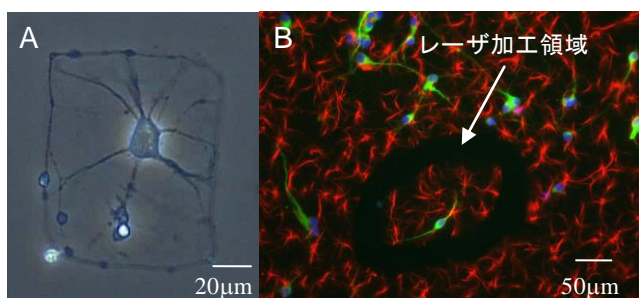


Fig. 8 1細胞レベルマイクロネットワークアレイ  
A：隔離した1細胞培養の位相差像、B：免疫化学染色 (Red:anti-collagen type I, Green:MAP2, Blue:Hoechst33258)

### 3-3 PDMS マイクロ加工技術とコラーゲン繊維配向技術を用いた3D脳回路モデルの構築

PDMS マイクロ加工技術とコラーゲン繊維の配向技術を用いた結果、細胞体の位置と突起の伸長方向を1方向に制御した3次元脳回路モデルの構築に成功した (Fig. 9)。また、細胞体層を多層にすることで、多層脳回路モデルの構築および大脳皮質の6層構造を再現したモデルの構築に成功した。多層構造の機能評価として Ca<sup>2+</sup>イメージングを行った結果、層間を活動電位が伝播している様子が確認できた。また、多電極アレイ基板上に3次元層構造を構築した結果、各層から活動電位が取得され、層間の遅延時間が20ms程度であったことからシナプス伝達による伝播であることが確認できた。

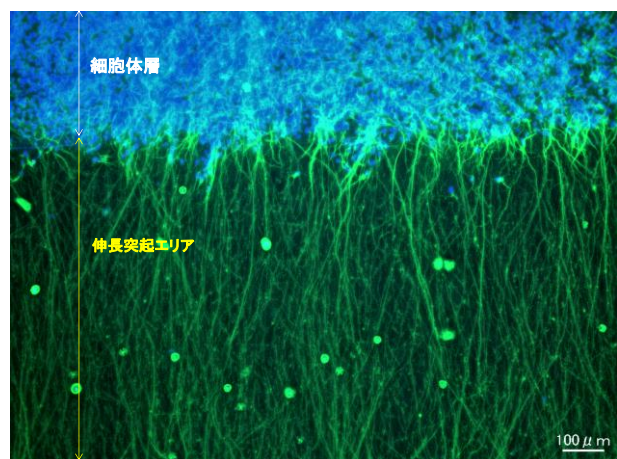


Fig. 9 細胞体位置と神経突起伸長方向を制御した3D脳回路モデル

### 3-4 エキシマレーザ加工技術を用いた神経細胞の埋め込み

コラーゲンファイバー表面に細胞非接着基質でポリエチレングリコール (PEG) をコートすることで、エキシマレーザ加工領域のみに神経細胞を培養することに成功した。ま

た、細胞が接着できるマイクロチャンネル内に50µm間隔でZ軸加工することによって神経突起の誘導を行った (Fig. 10A)。電子顕微鏡で観察した結果、作製したZ軸ホールに神経突起が落ち込んでいる様子 (Fig. 10C) および加工領域のみに細胞が落ち込んでいる様子 (Fig. 10B) が観察された。

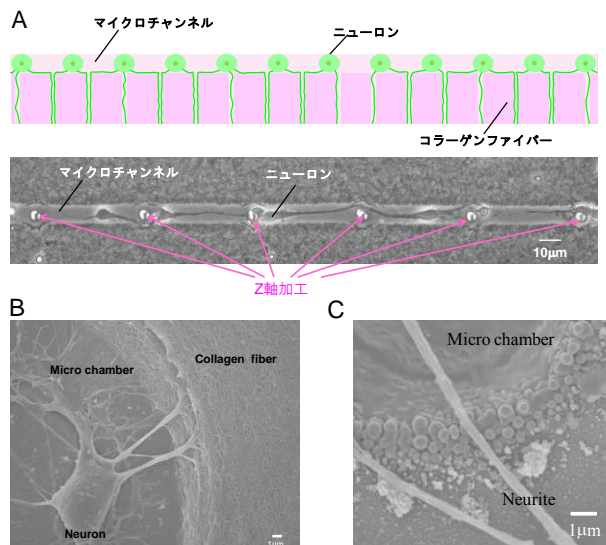


Fig. 10 エキシマレーザ加工による神経細胞の埋め込み  
A：模式図とマイクロチャンネル内の神経回路パターンニング、B：加工領域のみに培養されている神経細胞のSEM画像、C：Z軸加工領域に落ち込んでいる神経突起

### 3-5 カーボンナノチューブ多電極アレイ基板の開発

単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブ共に電着法によりITO電極上にメッキすることに成功した。Fig. 11は作製した単層カーボンナノチューブ電極の位相差像と電子顕微鏡画像である。約100nmの粒状の凝集体が形成されている様子が観察され、このような表面構造は、電気メッキ条件によって異なることがわかった。

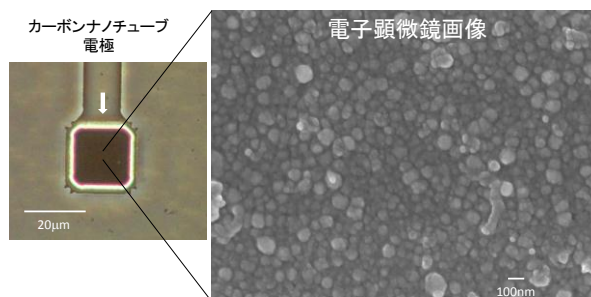


Fig. 11 カーボンナノチューブ微小電極

次に、作製した微小CNT電極の神経伝達物質に対する感度を評価するために、電気化学測定を行った。図12Aはアセチルコリン10nMによるサイクリックボルタンメトリー (CV) の結果を示している。0.4V付近にピーク電流が観察された。図12Bは従来の白金黒電極の結果を示している。濃度によらずピーク電流は検出されることがわかった。このことから、作製した微小カーボンナノチューブ電極は神経伝達物質に対して優れた電気化学特性を持つことがわかった。また、ドーパミン、グルタミン酸、ノルアドレナリンにおいても10nMの低濃度でピーク電流が観察されたことから、細胞から放出される神経伝達物質をリアルタイムで計測できる可能性が示唆された。

の基礎研究や薬剤評価モデルや移植技術などの医学薬学分野への応用が期待できる。

#### 4-2 神経伝達物質のリアルタイム計測を目指した CNT 多電極アレイ基板の開発

カーボンナノチューブを用いた微小多電極アレイ基板の開発に成功し、10nM の濃度において CNT 電極特異的にピーク電流が検出されることがわかった。これらの結果は、神経機能で重要となる神経伝達物質をリアルタイムで計測できる可能性を示唆しており、これまでになかった新しい計測技術として多に発展が期待できる。今後、ピーク電流が検出される酸化電位に固定して、細胞から放出される神経伝達物質を計測する予定である。

#### 4-3 局所熱刺激による神経細胞刺激技術の開発

従来の光、電気刺激ではなく、熱によって任意の神経細胞を刺激する技術を開発した。任意の細胞および任意のシナプスを簡単に刺激する新しい方法および3次元脳回路を非侵襲に刺激する方法として発展が期待される。

#### 5. 謝辞

本研究の一部は、カシオ科学振興財団の研究助成により行われた。

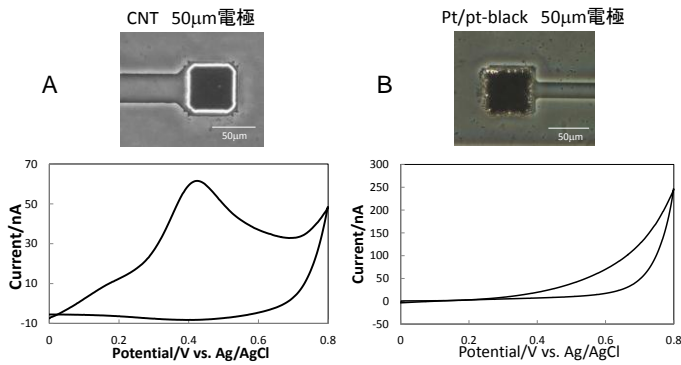


Fig. 12 アセチルコリン 10nM の CV 測定

A : CNT 電極、B : 白金黒電極

#### 3-6 レーザ局所加熱による神経ネットワークの誘発応答

1064nm レーザ照射による神経細胞の誘発応答を  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法により観察した。ITO ガラスに照射するレーザパワーを計測したところ、8.27mW で神経細胞が刺激できることがわかった。Fig.13 はレーザ照射によって神経ネットワークが  $\text{Ca}^{2+}$  オシレーションしている様子である。レーザ照射位置周辺の神経細胞が照射直後に応答し、その後ネットワーク全体に活動が伝播している様子を示している。更に、多電極アレイ基板に培養した神経ネットワークにレーザ照射した結果、照射後に活動電位が発生している様子が観察された。これらの結果から、局所的な熱によって任意の神経細胞を刺激できることがわかった。

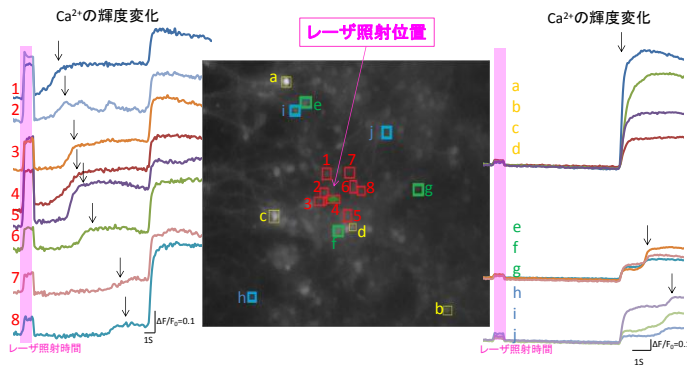


Fig. 13 レーザ局所熱刺激による神経ネットワークの誘発応答 ( $\text{Ca}^{2+}$  イメージング)

### 4. まとめ

#### 4-1 脳回路の3次元再構成技術の開発

神経回路を2次元および3次元で再構成する技術として、①ケミカルインクジェットプリンターを用いた細胞プリンティング技術、②コラーゲンゲルレーザ加工による細胞数制御および神経突起の伸長方向制御技術、③コラーゲンゲル繊維の配向技術を用いた神経突起の3次元伸長方向制御技術および多層脳回路モデルの構築技術、④エキシマレーザ加工技術による生体適合性材料内への細胞埋め込み技術を開発した。コラーゲンレーザ加工技術は、細胞播種後に任意の細胞を選んでパターンニングできる点と培養中にネットワークパターンを変化させることができる点が特徴である。また、コラーゲンゲル繊維の配向技術は、脳回路で重要となる情報の伝播方向を3次元で制御した培養技術および生体脳構造を模倣する技術として発展が期待できる。エキシマレーザ加工技術は、硬い生体材料を微細加工できる利点があるため、細胞と生体適合性材料を組み合わせた組織モデルの新しい展開が期待できると考えている。これら開発した技術を更に発展すれば、細胞間相互作用解析など