

論文内容の要旨

論文題目 人工環境下における培養神経回路の形成と活動計測

氏名 後藤美穂

第1章では本研究の背景と目的について述べる。本研究では、神経ネットワークが発達する過程における神経ネットワーク構造の違いとネットワーク全体の活動の変化を調べることを目的としている。神経ネットワークの発達過程においては、ネットワーク構造が時期を追って変化することが知られている。そこで、はじめに神経回路が発達する過程で発生する自発活動を経時的に観測し、Avalancheの時間発展を解析することによりネットワーク構造の違いとネットワーク活動との関係性を調べた。Avalancheは*in vitro*系で広く観測されているが、経時変化を追って解析した報告はまだない。Avalancheの発生確率をAvalancheの規模（観測された電極数やバースト発火の継続時間など）に対して両対数グラフにプロットしたとき、Avalancheのグラフが指数則に従えば、その状態は臨界状態にあるということが知られている。ネットワークの状態が臨界状態にあるとき、神経発火は局所的な領域で消滅するだけであったり、全領域で発火する場合だけであったりするのではなく、局所的なものから大域的な発火までほど良い情報伝達機能を持つネットワークとなると考えられる。したがって、Avalancheの確率分布の傾きや形状を経時的に追って解析することにより、ネットワークが如何にして臨界状態に達するか、またネットワークの成長ステージやそれらの間の遷移を検出する1つの指標となることが期待される。

さらに、より直接的に構造と活動の関係性を調べるためには、構造を制御した回路網を用いて活動を調べることが有用である。構造とネットワーク全体の活動との関係性について、構造を制

御しない分散培養のネットワークと数個～100 個程度の細胞クラスタが結合したネットワークでその活動の違いを報告した例 (Idelson et al., 2010) や、脳内のネットワーク構造モデルからシミュレーションを行い、その結果クラスター同士がやり取りしているという報告 (Izhikevich et al., 2004) がある。しかしながら、試料作製の難しさから細胞ネットワークレベルで実験を行い、活動の詳細を調べた例は少なく、構造が活動に与える影響について得られている知見はほとんどない。これに必要なパターンニング技術は近年の著しい発達を遂げており、パターンニング培養を行うことで実現できる。しかし、既存のパターンニング技術はマスク作製やエッチングのためのリソグラフィ技術が必要となるため、作業する上で煩雑な面が多く、汎用性が低い。そこでまず、これを改良するためにマスク作製を必要としない簡便なパターンニング技術の開発を行い、これを細胞外電位を多点同時に計測する MEA 計測技術と組み合わせることにより、より簡便に様々な構造のネットワークにおける電気活動を計測し解析することができる。

第 2 章では、本研究で新たに開発した培養神経ネットワークのパターンニング技術について述べる。培養下の神経ネットワークをパターンニングする技術についてはこれまでも様々な方法が開発されてきたが、これらは2種類の観点からのものに大別される。1つは、成長円錐の走化性に関する研究のように、生体内での神経ネットワークの形成プロセスを実験的に検証することを目的とする基礎生物学的観点からの研究であり、もう1つは、実験材料としてできるだけシンプルな神経ネットワークを得ること、さらに、その計測のために設計された電気計測デバイスと位置を合わせて神経ネットワークを作らせることを目的とする研究である。本研究はこれらのうちの後者に位置づけられるものである。

第 3 章では、第 2 章において筆者が提案したマイクロピペット描画法を用いて形成した培養神経回路網における電気活動計測を目的とする。培養神経回路網に対する電気計測システムとしてここでは微小電極アレイ基板 (MEA; microelectrode array) 計測システムを用い、マイクロピペット描画法と組み合わせた実験系の構築及び電気活動計測を行った。MEA 計測システムにおける細胞外電位計測では計測される電気活動の振幅やその精度が細胞-電極の位置関係や界面状態に大きく依存することが知られており (Stett et al, 1997), 培養皿底面と培養神経回路網との間に細胞非接着性のアガロースゲル層を形成するマイクロピペット描画法においては MEA 計測システムによる電気活動計測が困難となる事態が予想される。これまでも MEA 計測システムとハイドロゲルを用いたパターンニング手法とを組み合わせた実験例が報告されているが、これらの報告ではレーザー集束加熱 (Suzuki et al., 2004) や薬物処理 (Tamai et al, 2007) により電極付近のゲル層を除去することで細胞パターンニングと細胞電気活動計測を実現しており、筆者の目指すパターンニング基板作製プロセスとは逆行するものである。そこで本章では、MEA 上においてアガロースゲル層を介した神経細胞電気活動計測を可能とするためのマイクロピペット描画法の改良とアガロースゲル層膜厚の最適化を行い、また実際にゲル層を介して計測される電気活動が通常状態と同等の S/N 比及び信号の特徴を得られることを確認した。

第4章では、神経ネットワークにおける電気活動の統計的解析について述べる。MEAを用いた神経ネットワークの電気活動計測において、一連の発火が同期、あるいは伝搬によって複数の電極に渡って見られることがあるが、その現象の示す統計則を **Neuronal Avalanche** と呼ぶ。1回の **Avalanche** に関与した電極数とその発生率を両対数グラフにプロットすると直線で表せる (Beggs, 2003)。このことから、**Neuronal Avalanche** は指数則に則っており、伝搬係数が **critical point** になる値へ向かって自動的に調整される現象 (**Auto tuning**) が起きていると考えられる。よって、発達過程において **Neuronal Avalanche** の傾向推移を観測することにより、神経回路網の成熟度を推定することができる。培養神経細胞の活動を長期的に MEA によって解析することで、ネットワークの発達にともなう自己組織化臨界現象形成過程を詳細に解明することができると考えられる。しかしながら、従来の研究では成熟後の神経細胞ネットワークについて計測を行ったものが主流であり、長期的な変化を追った研究はない。そこで本研究では、インキュベータ内で長期間の神経活動を定期的に計測し神経雪崩の確率分布を両対数でプロットした後に、その傾き（臨界指数）と R^2 値によって臨界現象の特性を評価した。

第5章では、本研究の結論と今後の課題について述べる。本研究でははじめに、神経ネットワークの構造と活動の関係性を調べるため新規の簡便な細胞パターンニング技術である「マイクロピペット描画法」の開発を行った。この手法は、特別な微細加工機器設備を使用せずに、標準的な生理学研究室の実験設備だけを用いて培養神経ネットワークのパターンニングが可能であり、基板の光学特性や材料の化学特性によらず幅広い基板・材料への適用が可能であると考えられる。本技術の加工特性と細胞パターンニング性能を評価した結果について述べた。

次に、上で述べたパターンニング手法を MEA を用いた細胞外電位の多点同時計測と組み合わせることにより、様々な構造のネットワークにおける電気活動を計測し解析することを目指した。まずアガロースゲル層上に形成したマイクロパターン培養神経回路網からの電気活動計測が可能であるか検討し、 $5\ \mu\text{m}$ 程度の厚さのアガロースゲル層であれば細胞外電気記録においても神経細胞活動を安定的に取得できることを確認した。

さらに、神経ネットワークが発達する過程における神経ネットワーク構造の違いとネットワーク全体の活動の変化を調べることを目的として、自己組織化臨界現象の指標の1つである **Avalanche** 現象に着目してその時間発展を解析した。培養日数ごとに **Avalanche** の発生確率を発火電極数に対してプロットし、両対数プロットの R^2 値と傾きを評価した。その結果以下の点が明らかになった。まず、培養初期段階では確率分布はべき型を示さず、ネットワークは臨界状態には至っていないことが分かった。特に、この時期のグラフの形状は、Pasquale らが発火時刻をランダム化して得た **Avalanche** 確率分布によく似ているため、初期状態では局所的な発火に留まり遠くへ広がるようなネットワーク経路はまだ出来上がっていないことが推測された。培養時期の経過とともに指数の値や分布の形状がどのように変化するかについて示せたことは、今後のネットワーク構造とネットワーク機能の関係性の解明の大きな手掛かりとなるため有用な結果を得た。

と言える。これらの知見は従来から知られている抑制性神経細胞の発現、アストロサイトによるカルシウムウェーブの発生などの時期と一致しているため、これらの現象が自己組織化臨界現象形成に大きく影響を与えていることが示されたと言える。