

培養神経回路のシングルセル 解析用マイクロデバイス

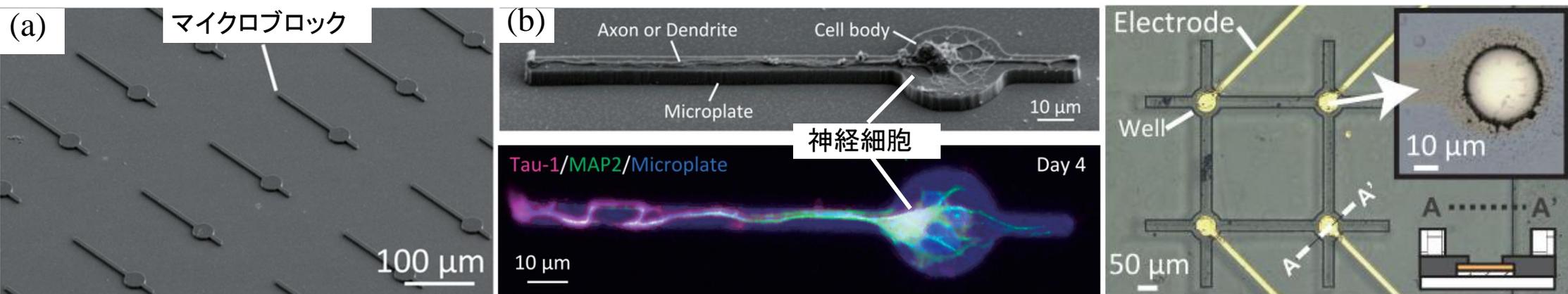
中央大学 工学部 電気電子情報通信工学科
助教 吉田 昭太郎

2020年 8月 31日

新技術の概要

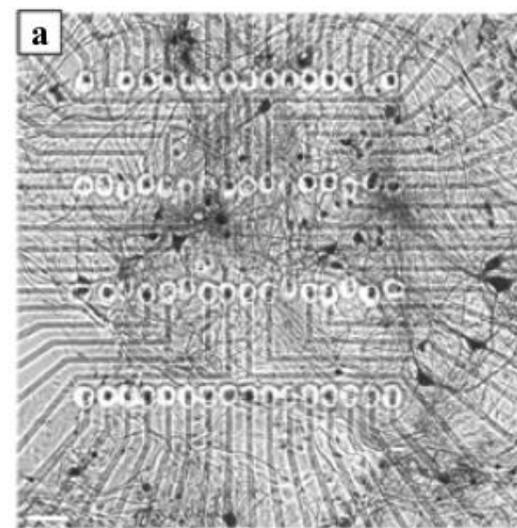
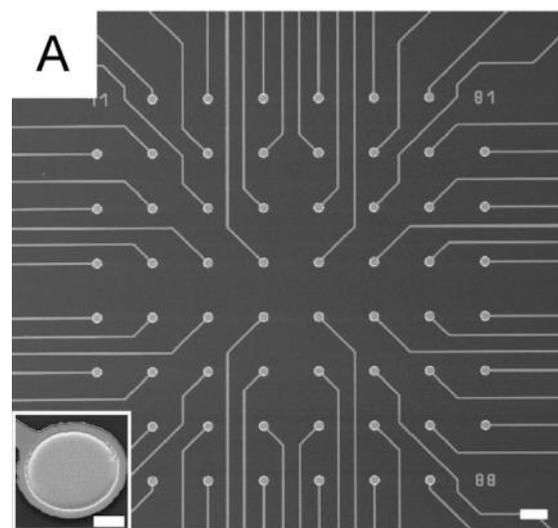
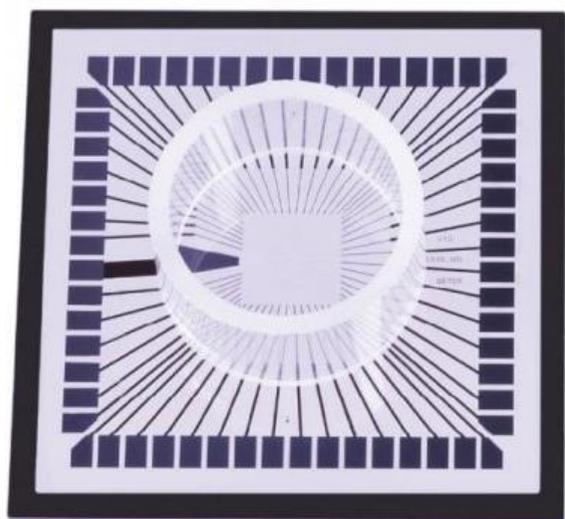
- 神経系の細胞を1細胞ずつ形態制御しながら培養可能な可動式マイクロアレイデバイスに、神経活動を計測するマイクロ電極システムを統合したシングル解析用マイクロデバイスを開発
- 従来は培養後に動かせなかった神経細胞を単一細胞ごとに任意の場所に再配置して神経回路を構築し解析が可能

→用途：神経生理・薬理作用の解析用ツール



従来技術とその問題点 (神経回路の解析用ツール)

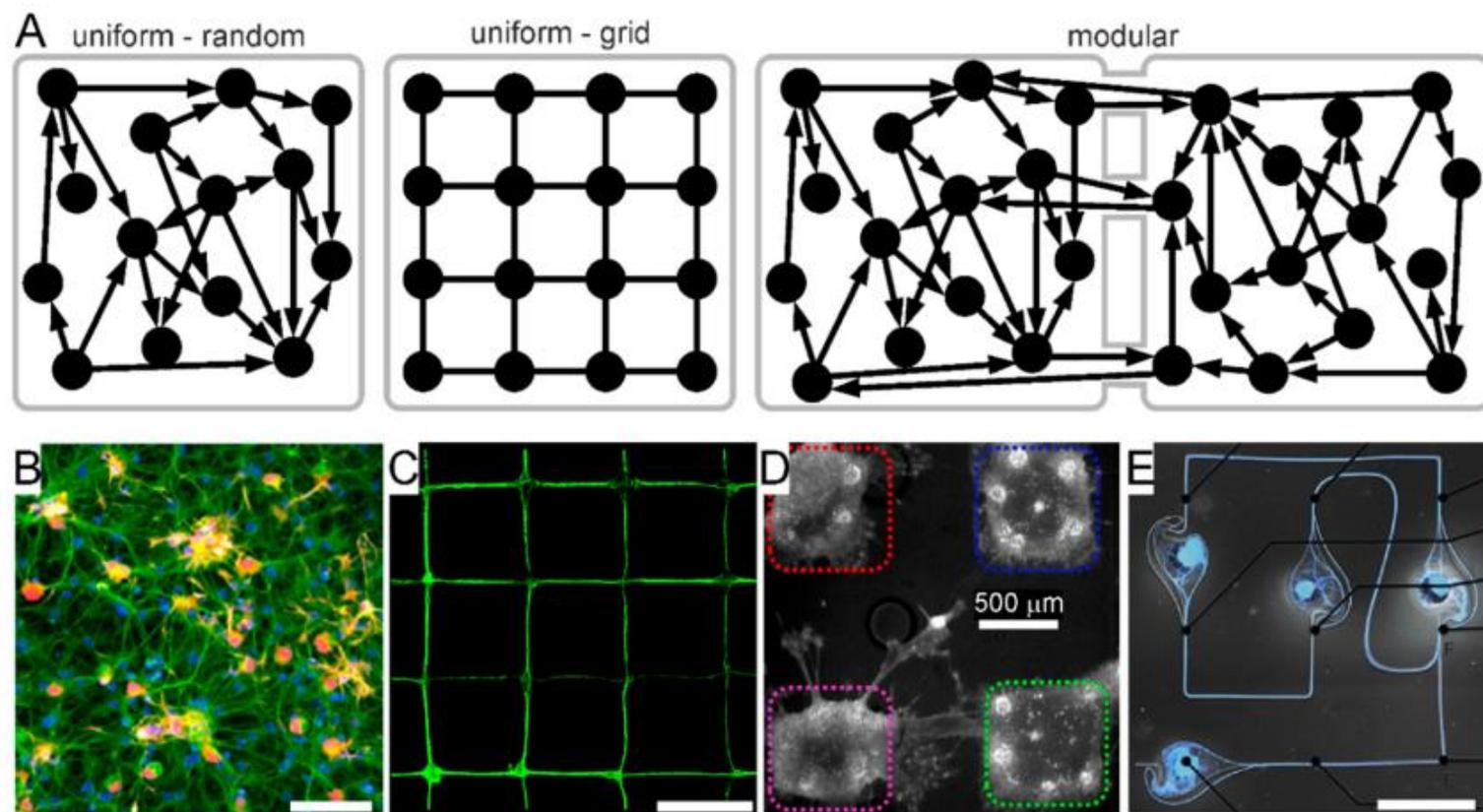
- 既に実用化されているものとしてマイクロ電極アレイ(Micro Electrode Array, MEA)があり、神経回路を培養すると細胞集団の電気的活動をマルチチャンネルで計測することが可能
- 一方、1電極と1細胞が対応しているわけではなく、形成される神経回路の構造もランダムなため、回路の構造と機能に関する解析は困難



従来技術とその問題点

(神経回路の1細胞レベル形態制御)

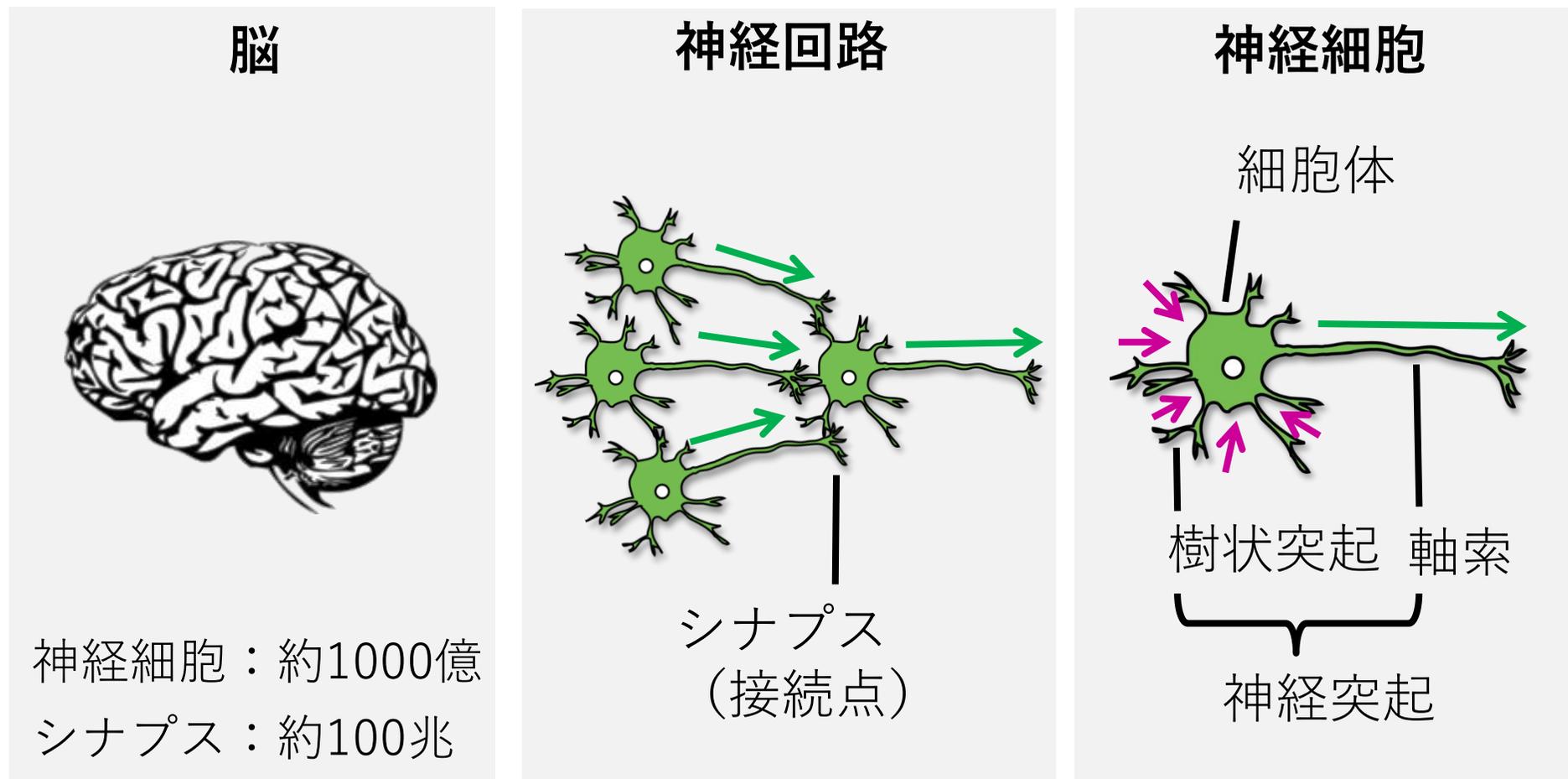
- バイオマイクロリソグラフィ技術により細胞接着性分子のパターンを構築し、その上で培養することで神経細胞を1細胞レベルの高解像度で形態制御する手法が研究されてきた
- しかしながら細胞成長のランダム性により複数細胞の回路全体の構造を制御するのは困難



従来技術とその問題点

(神経回路の1細胞レベル形態制御)

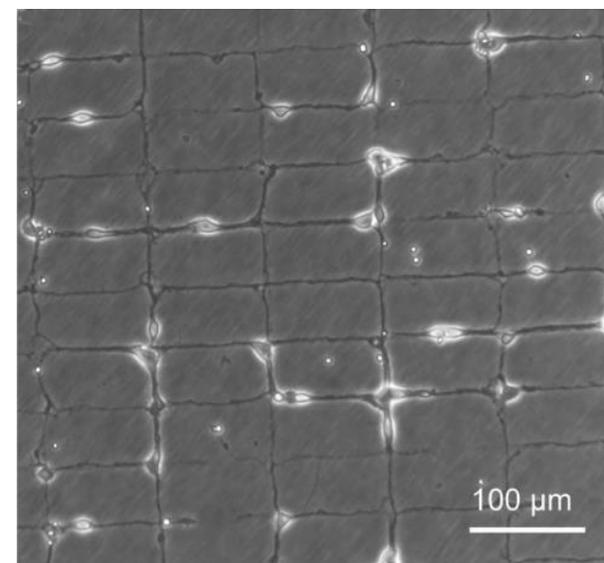
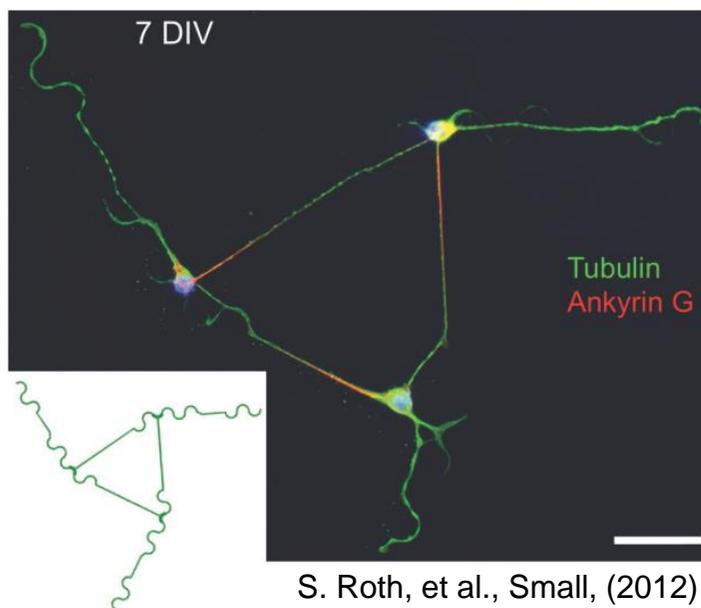
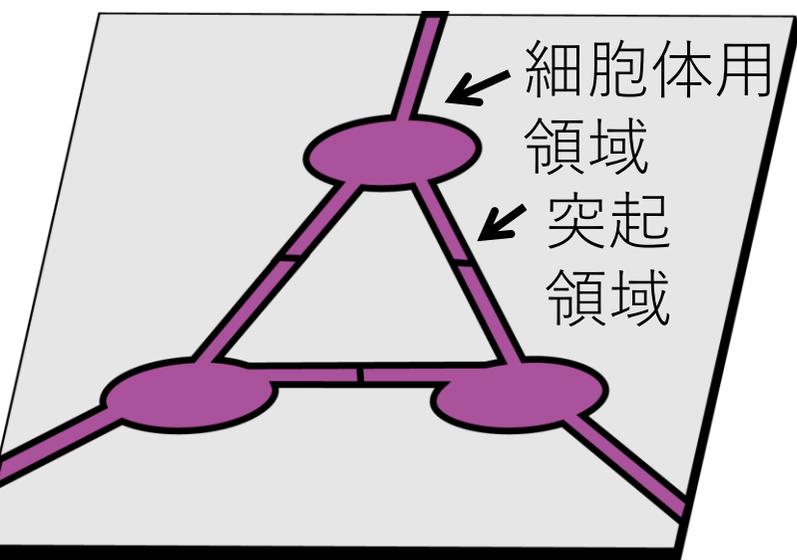
- 脳を構成する神経回路は神経細胞という1単位の素子がつながりあった構造であり、その回路の分化・成長・接続・損傷・回復や薬剤に対する反応を調べるのが重要→1細胞単位での構造制御が必要



従来技術とその問題点

(神経回路の1細胞レベル形態制御)

- 細胞接着性分子を1細胞の大きさ(細胞体:約10 μm , 突起:約1 μm)にパターンし、その上に神経細胞を播種すると、細胞体と突起の形(長さ・角度・本数)を別々に制御しながら成長させることが出来る
- 一方で、1細胞あたりの制御成功率は低い(数%~数十%)ため、複数細胞を制御しようとするのはほぼ不可能である(1細胞あたり10%だとすると3細胞でも0.1%の成功率)

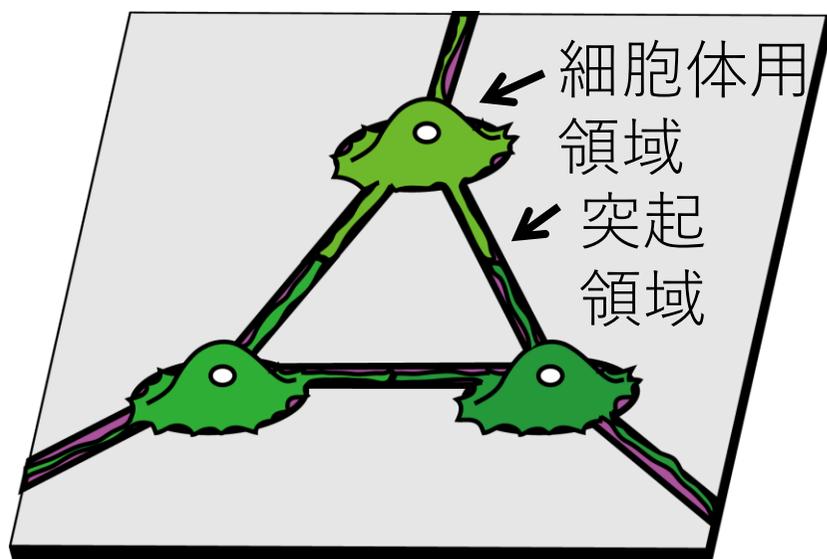


従来技術とその問題点

(神経回路の1細胞レベル形態制御)

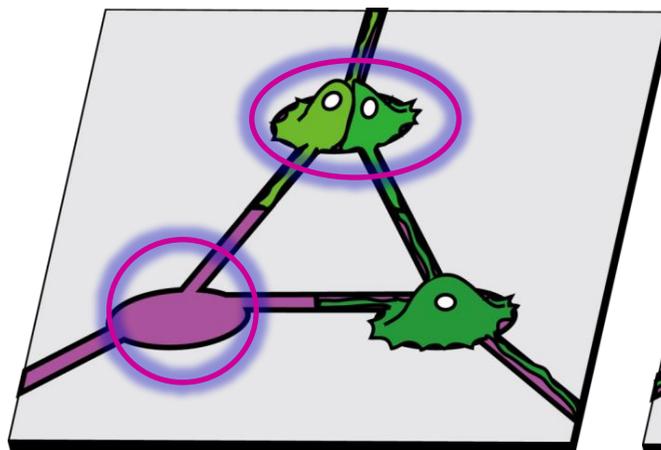
- 理想的には細胞体用のパターンに細胞体、突起用のパターンに突起が成長してほしい
- が、現実には、どこかの細胞体用パターンに細胞体が0個もしくは2個以上つく、あるいは突起用のパターンに突起が伸長しない、といった回路の欠落が起こってしまう

理想（回路制御成功）

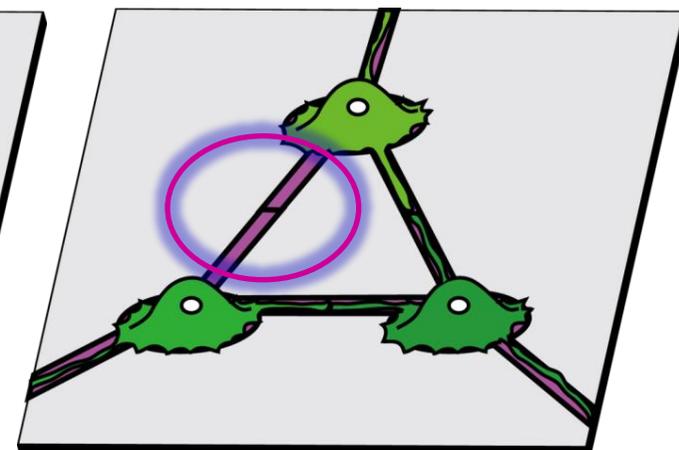


現実（回路のどこかが欠落する）

細胞体が1つ接着するかは細胞次第



突起が伸びるかは細胞次第



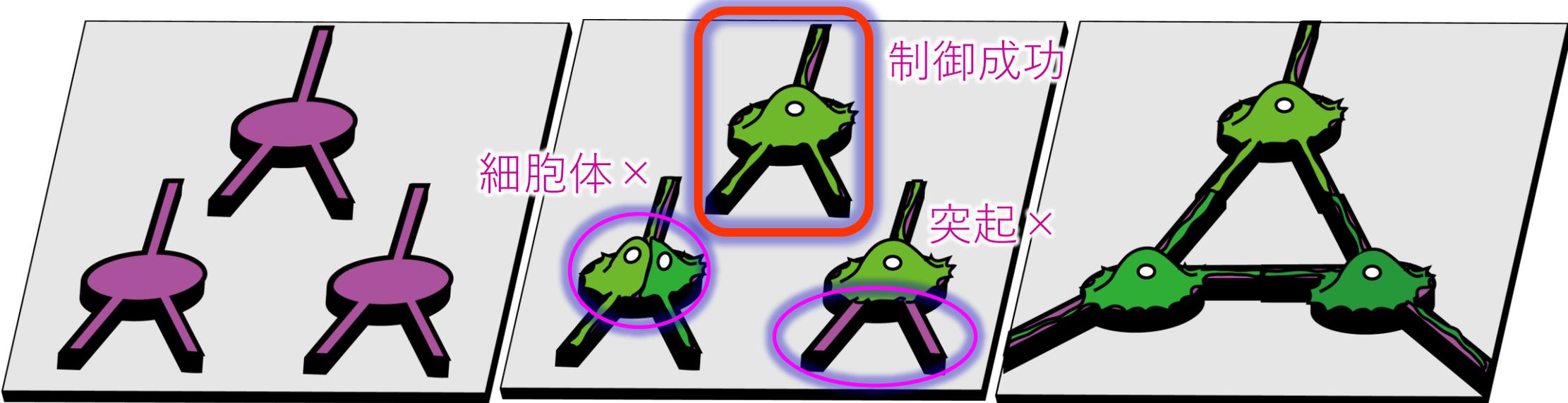
新技術の特徴・従来技術との比較

- 新技術では、パターンをブロック状にして「可動化」することで、任意の細胞が接着したブロックを「選別・回収・移動」することを可能にし、形態制御が成功した細胞を集めて回路を組むことができる
- これによって、従来では不可能であった、複数細胞からなる神経回路の構造の制御を可能にした

可動マイクロブロックアレイ

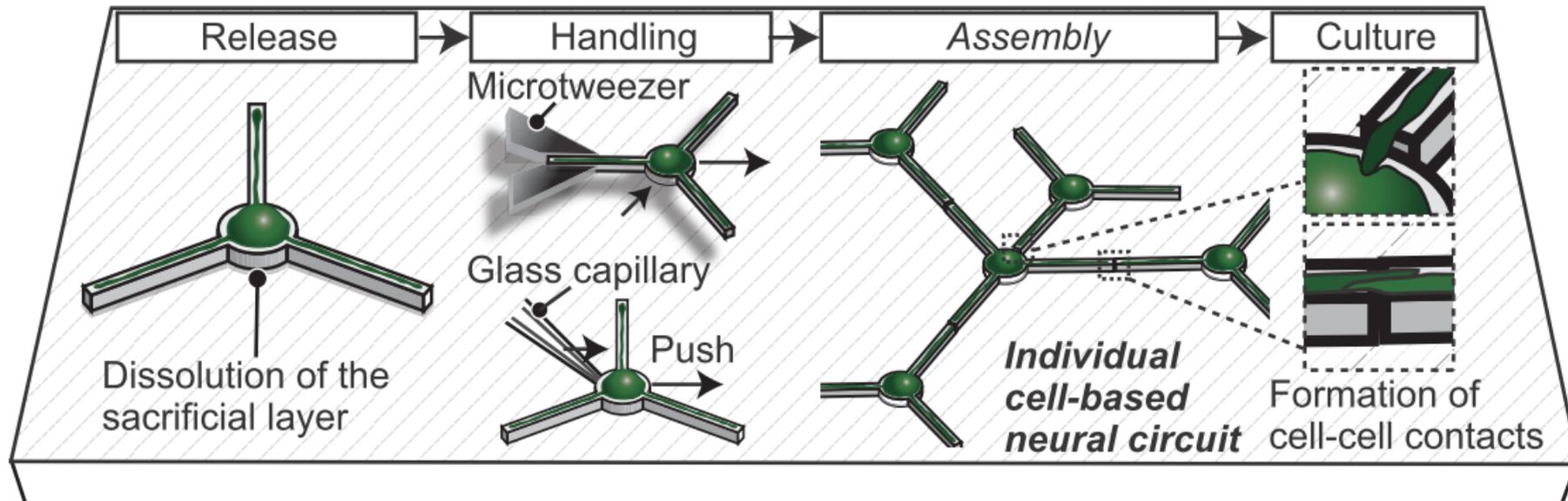
選別・回収・移動

成功した細胞で回路を組む



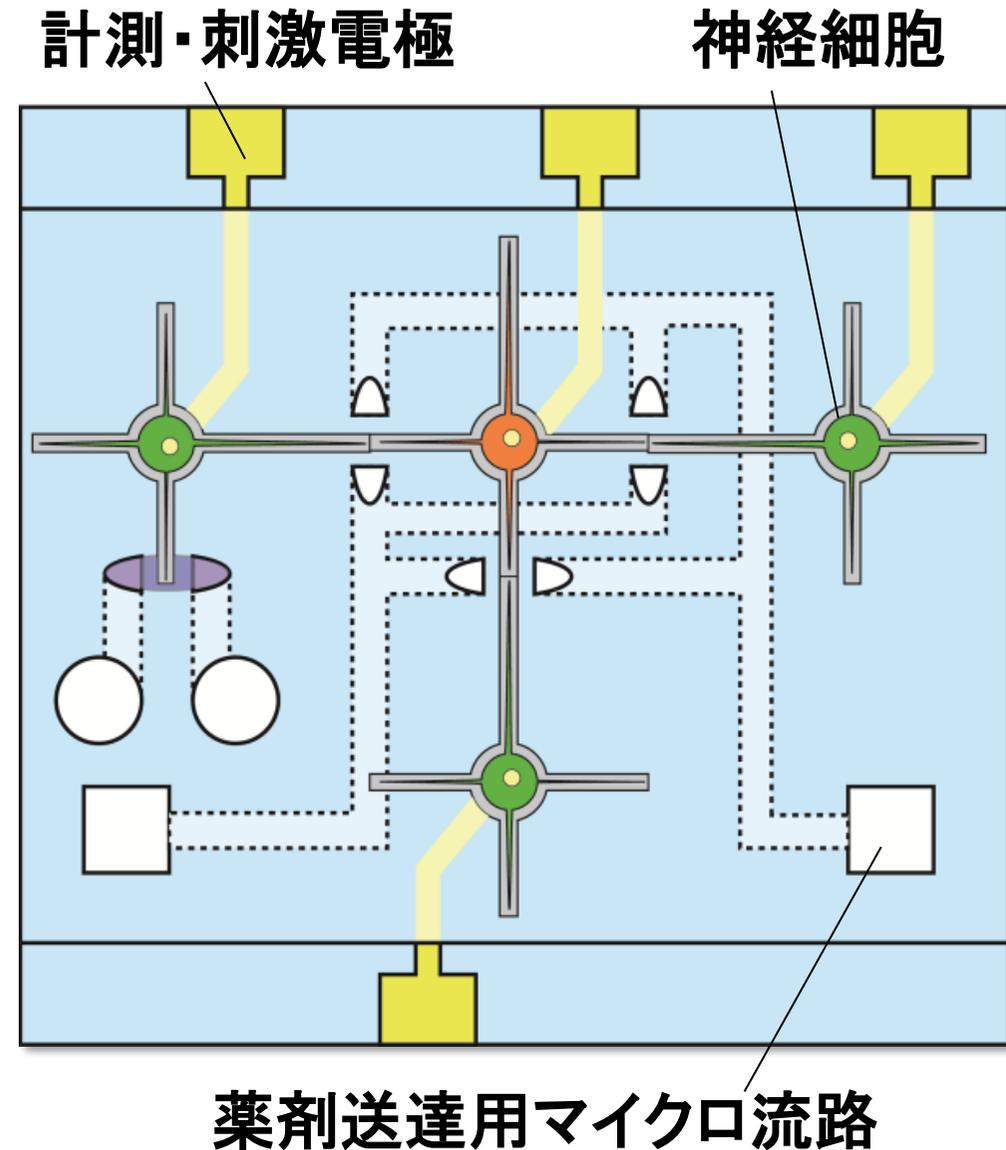
新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、神経細胞の位置を培養中に変更することが出来ず複数細胞からなる回路の構造を制御できない、という点を改良することに成功した
- 神経細胞は接着状態から剥がして移動させると死んでしまう性質を持つが、本技術によってはじめて可動化することに成功した
- 本技術の適用により、1細胞単位で構造を制御した神経回路の分化・成長・接続・損傷・回復や薬剤に対する反応の解析が可能になると期待される。



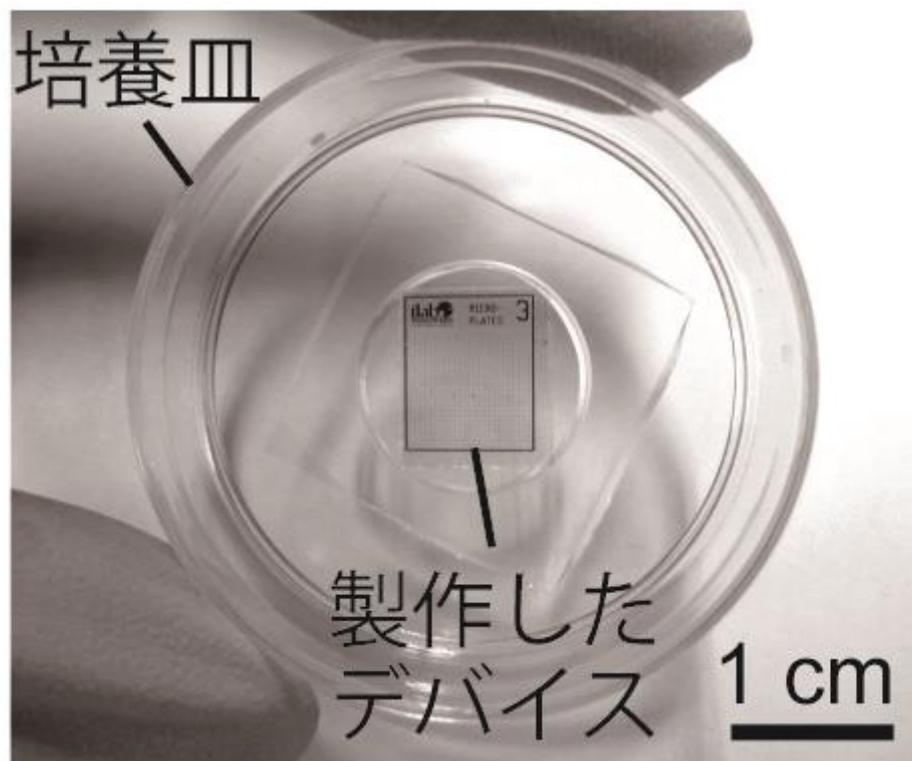
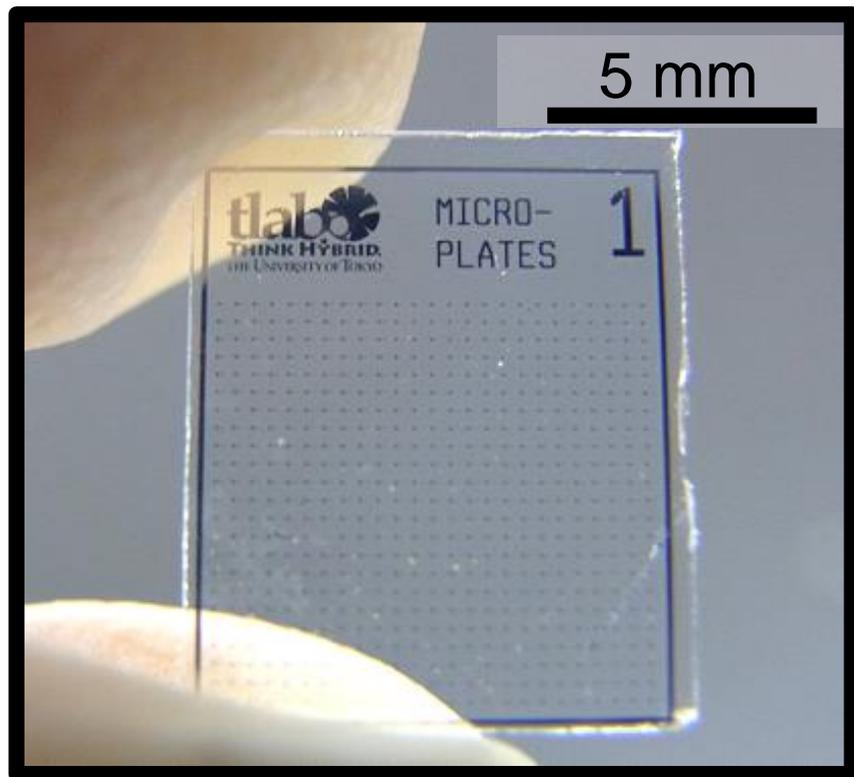
新技術の特徴・従来技術との比較

- 本技術では併せて、神経回路の活動を計測するための電氣的・電氣化学的センサとしてのマイクロ電極を統合し、さらに薬剤送達用のマイクロ流路を組み込むことで、神経回路の設計・構築とその動態解析が可能になる
- 望みの特性を持った細胞を選別し、細胞間相互作用を解析したり、センサとの距離を調節することで測定の感度を上げるなど、**柔軟に様々なアッセイ系を組むことが可能になる**



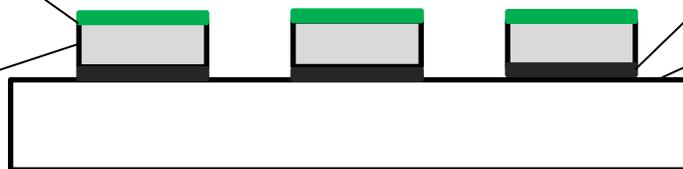
製作したマイクロブロックアレイ

- 神経細胞の大きさの微細なマイクロブロックアレイを製作
- 犠牲層を溶かすと可動化し、個別に操作可能になる



IV型コラーゲン/ラミニン
などの細胞接着性分子

マイクロブロックアレイ
(パリレン)

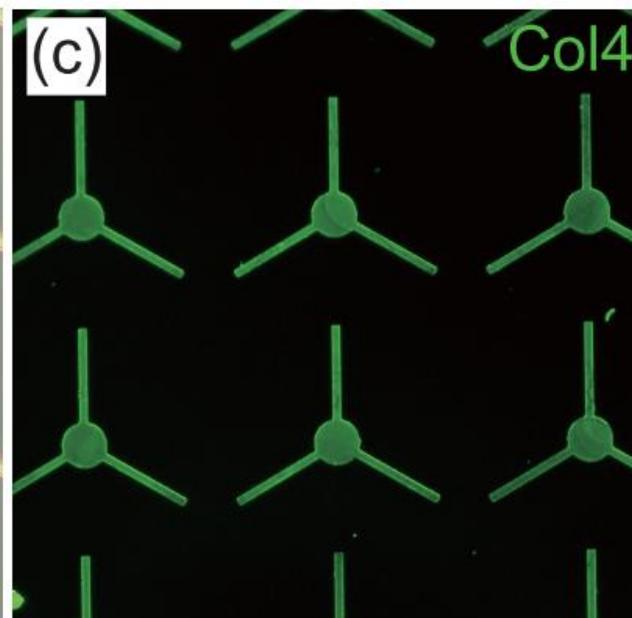
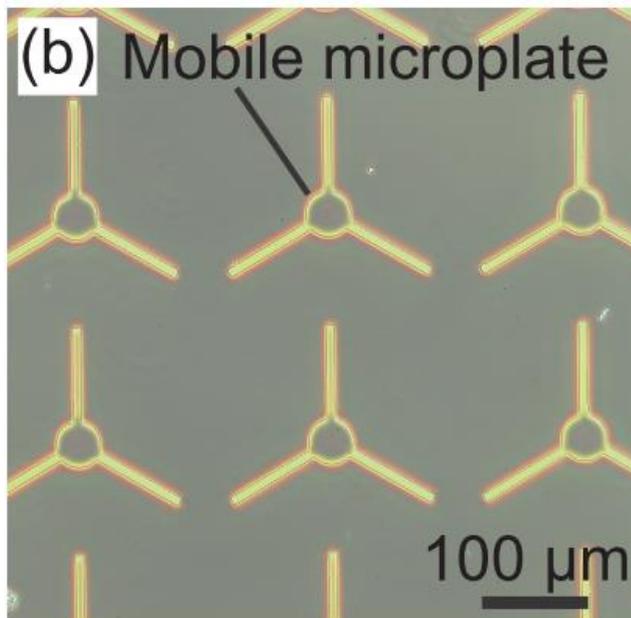
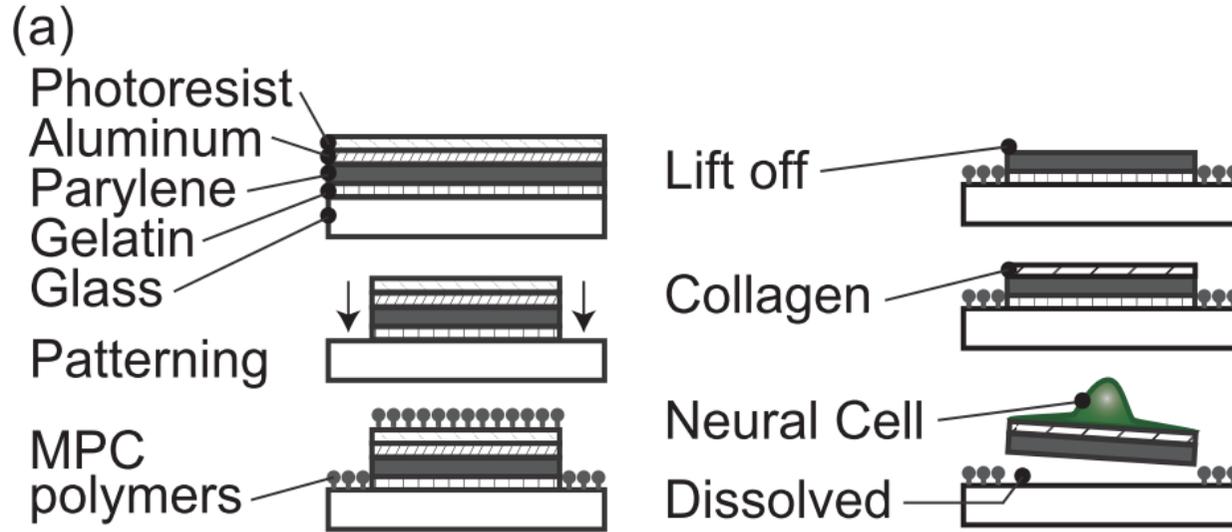


ゼラチンなどの犠牲層

MPCポリマーなどの
細胞非接着性分子

製作したマイクロブロックアレイ

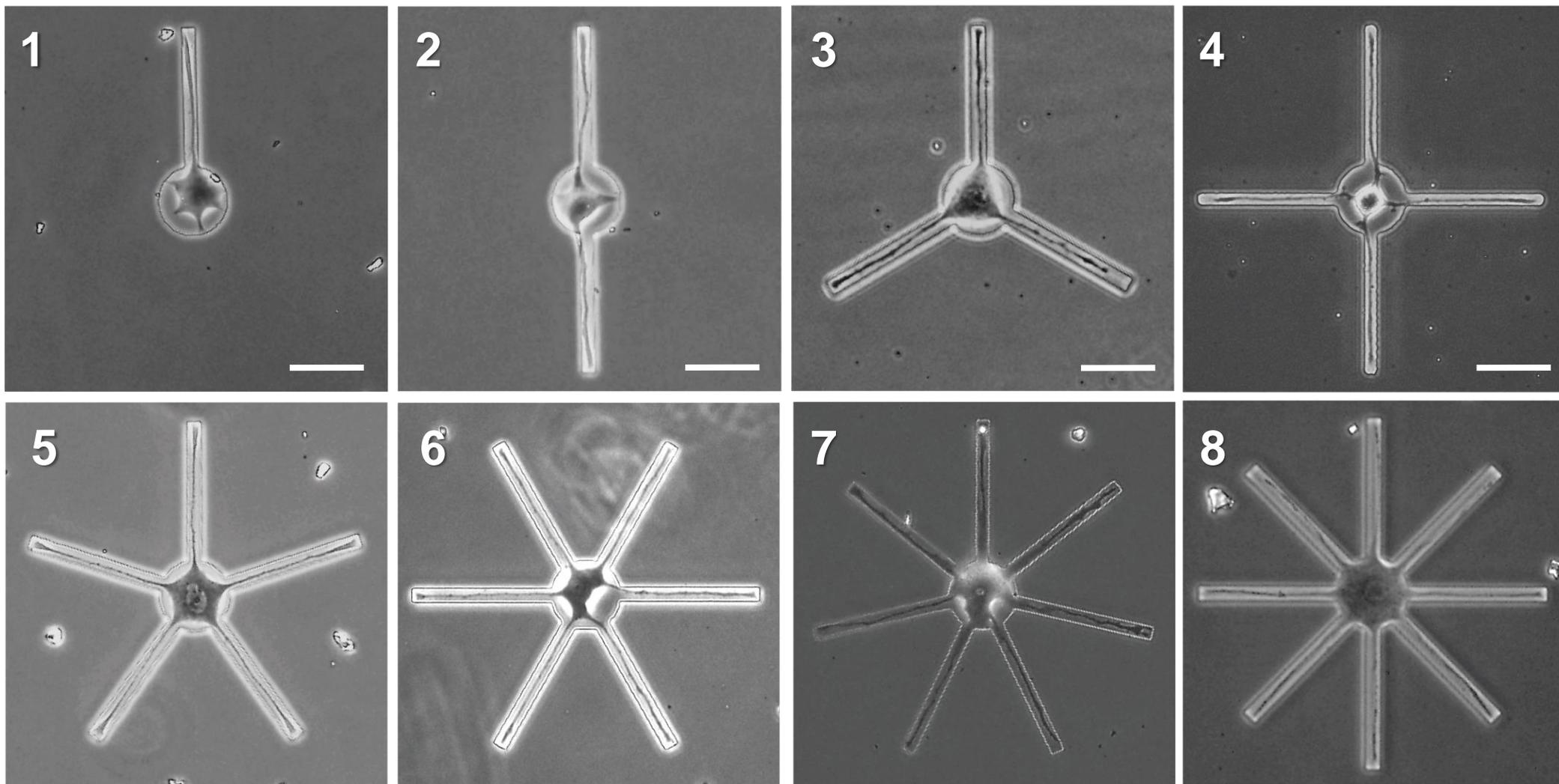
- フトリソグラフィ技術(バイオMEMS技術)を用いて製作
- ブロック上に選択的に細胞接着分子を塗布する



Anti-Col4
Immunostaining
of the device

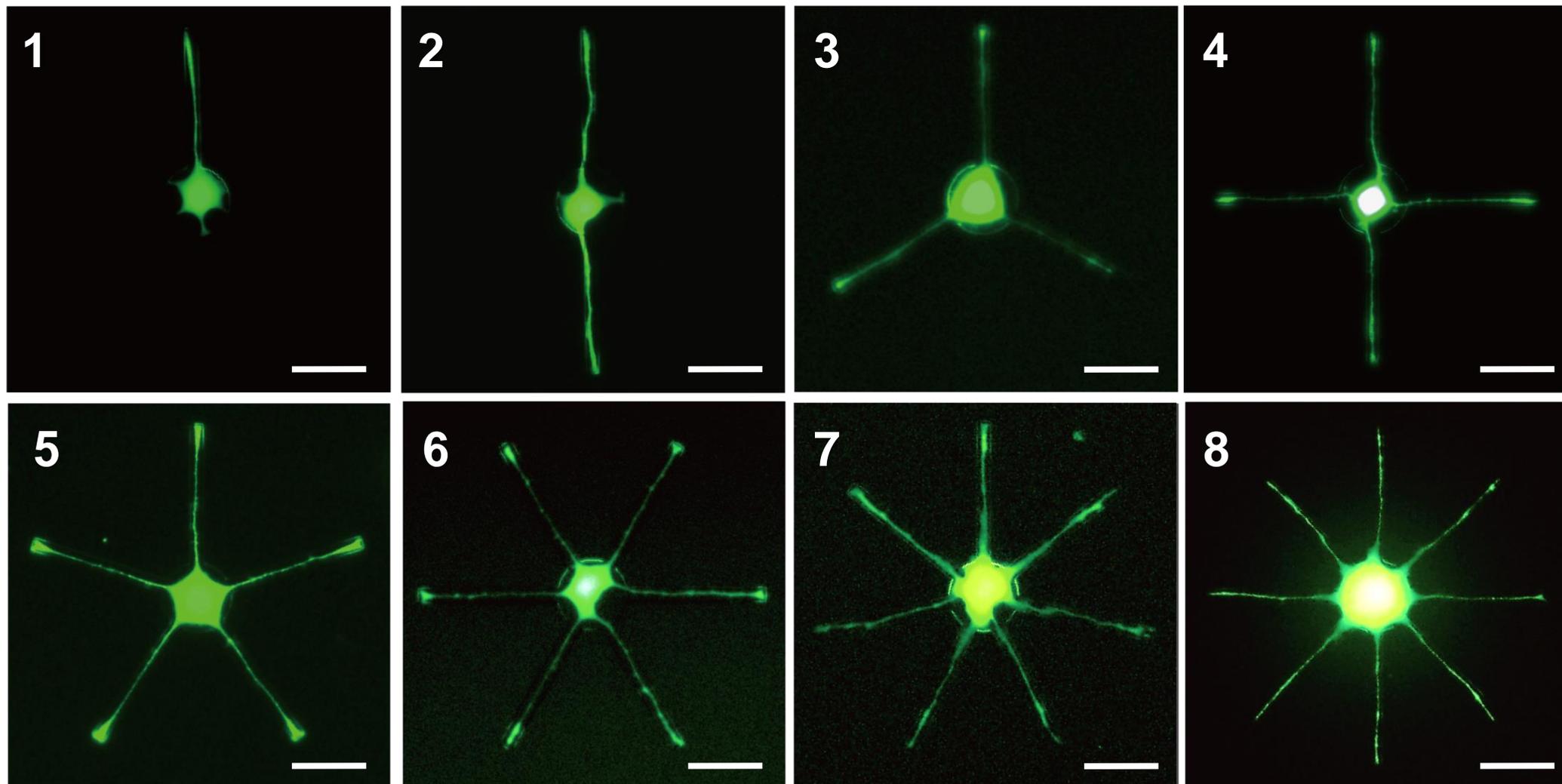
マイクロブロックアレイによる神経形態制御

- 細胞体領域1つに、突起領域を1~8本作成可能
- その上に神経細胞を形態制御した状態で接着させることができた



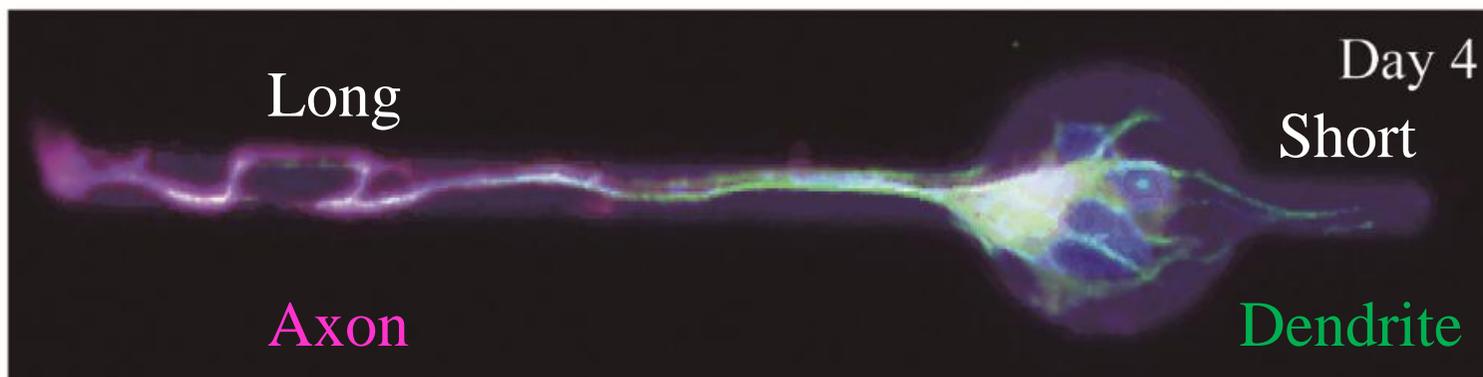
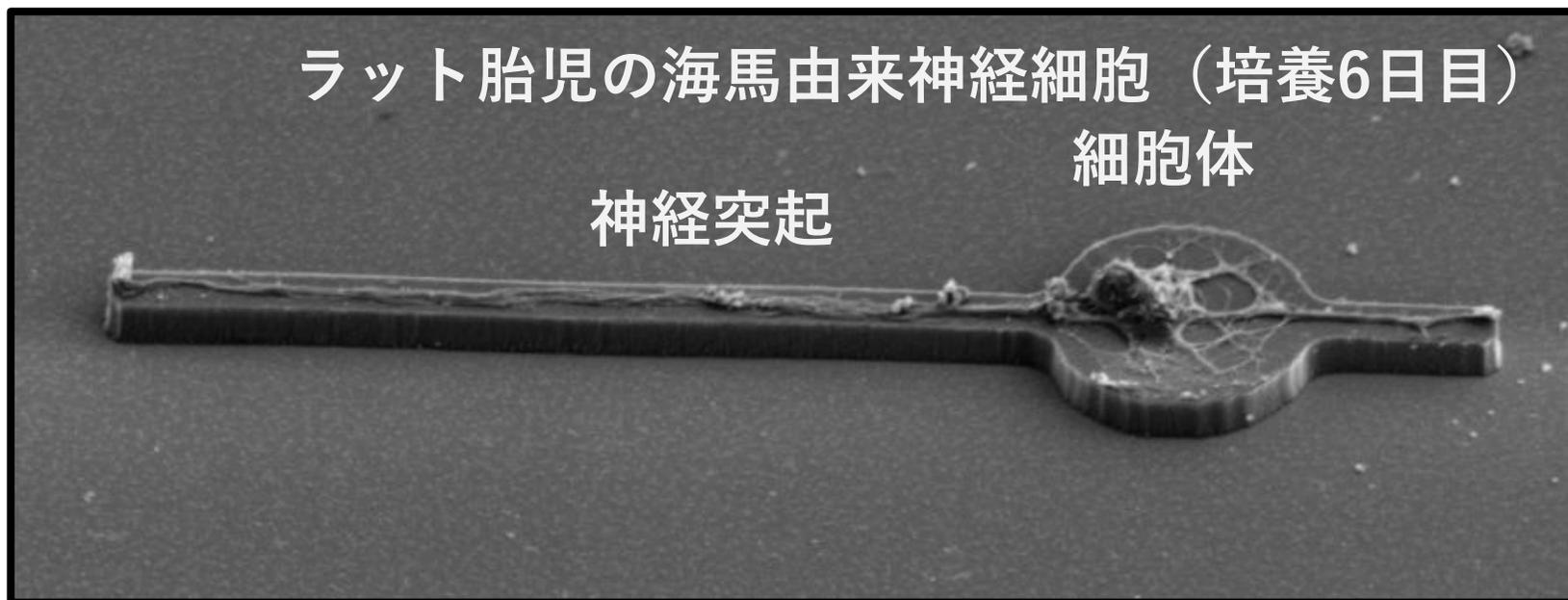
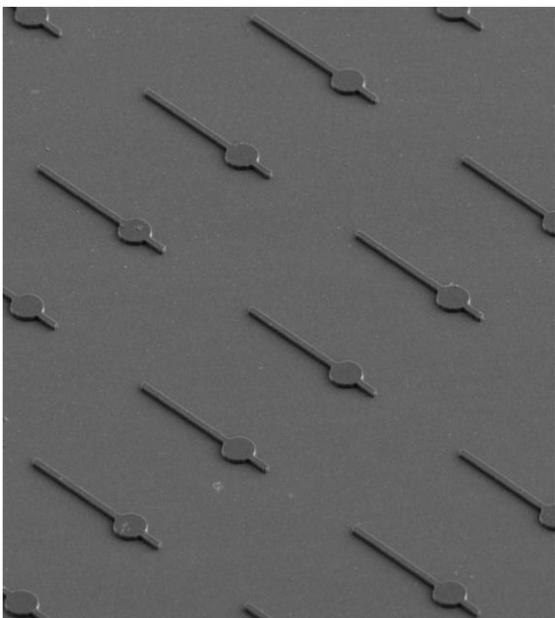
マイクロブロックアレイによる神経形態制御

- 細胞体領域1つに、突起領域を1~8本作成可能
- その上に神経細胞を形態制御した状態で接着させることができた



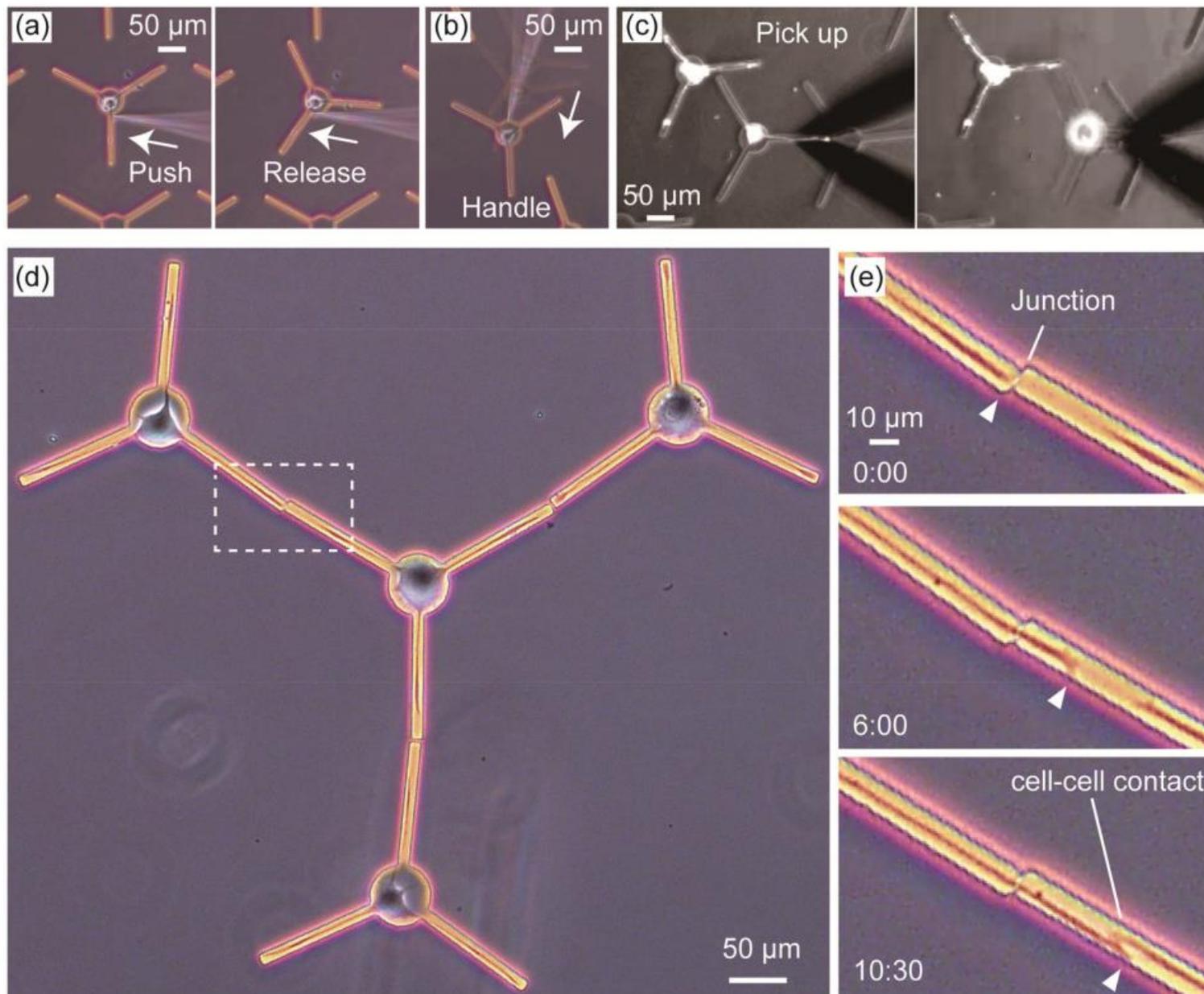
マイクロブロックアレイによる神経形態制御

- 樹状突起(情報入力)と軸索(情報出力)を、ブロックの形状(短い・長い)によって制御可能である
- 回路における素子の入出力の向きを制御できる



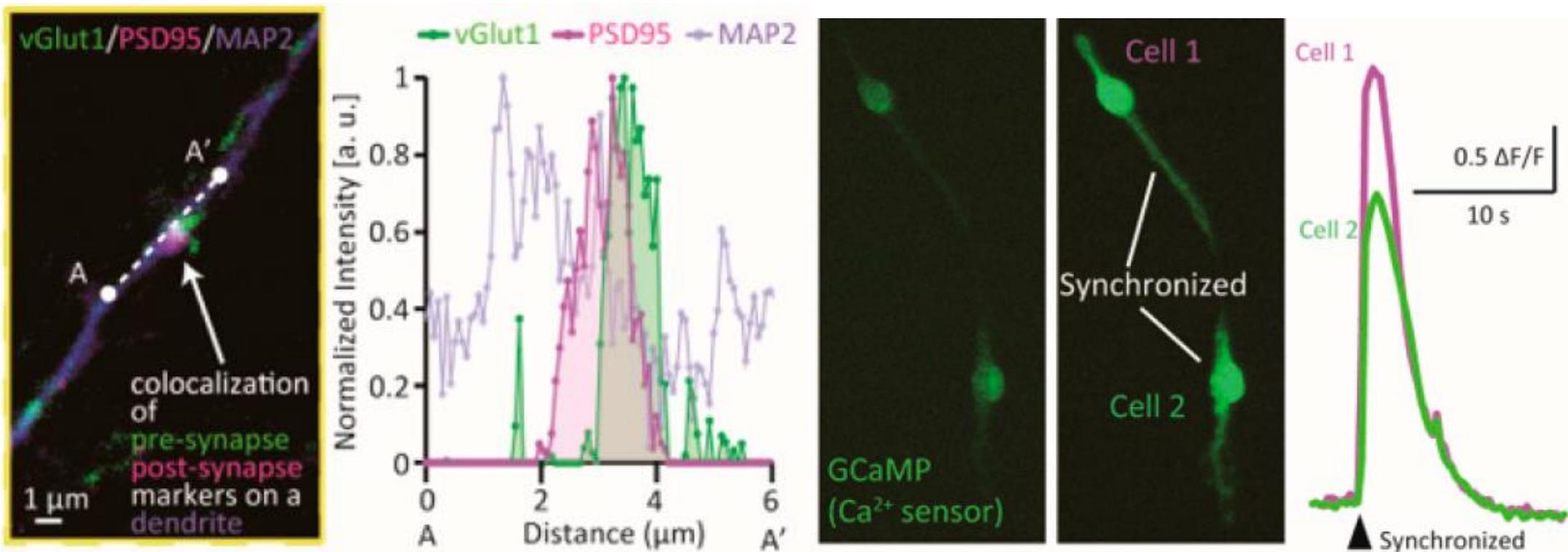
マイクロブロックアレイを用いた神経回路構築

- 細胞が接着したブロックを動かして回路を組むことが可能である



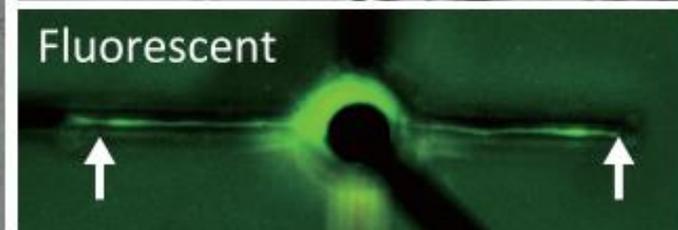
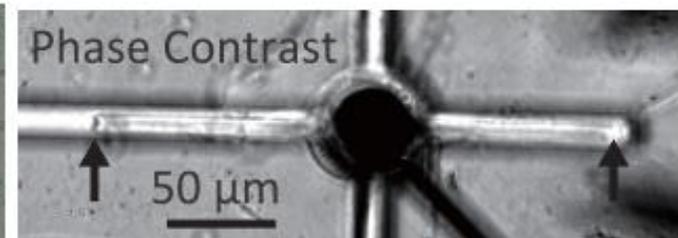
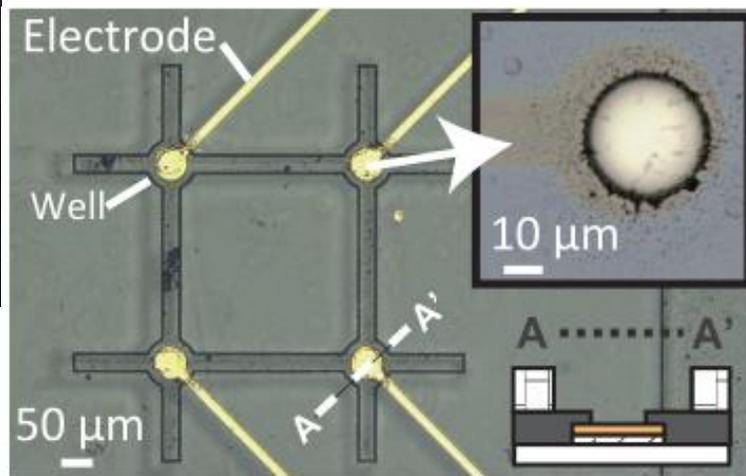
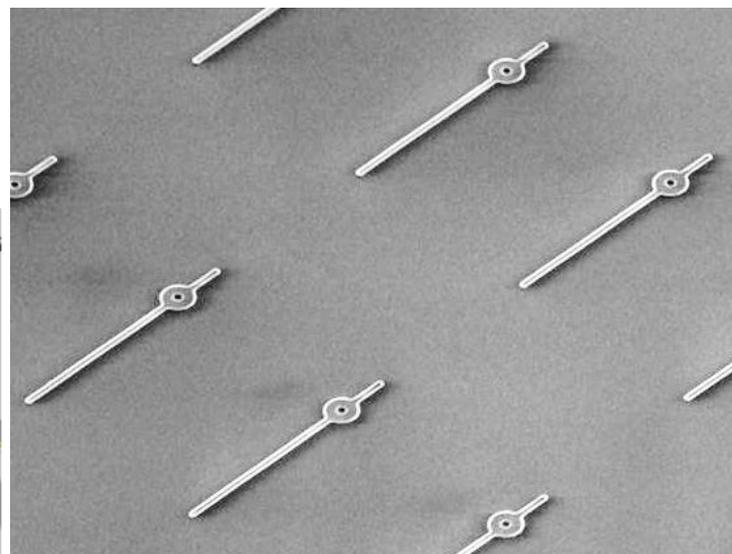
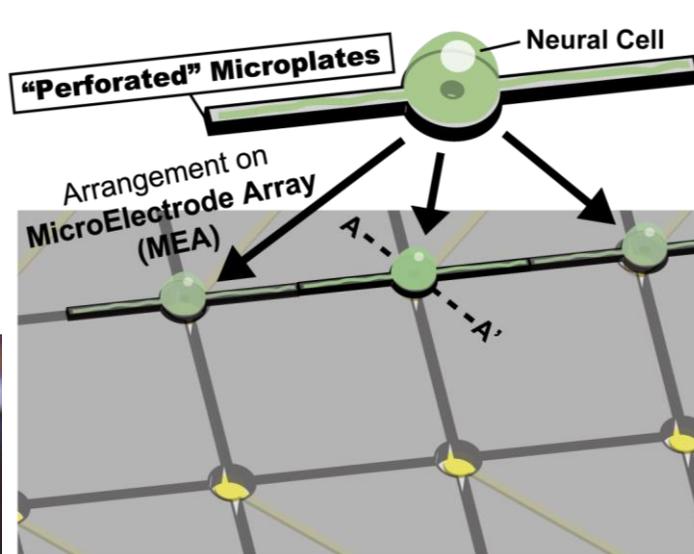
マイクロブロックアレイを用いた神経回路解析

- 神経細胞間に機能的なシナプスが発現するかを解析可能
 - 免疫染色によるシナプス関連タンパク質の発現解析
 - 細胞内カルシウムイメージングによる神経情報伝達の解析
- その他にも、神経細胞を形態制御して可動化することによる新しい解析系を組むことができると期待できる

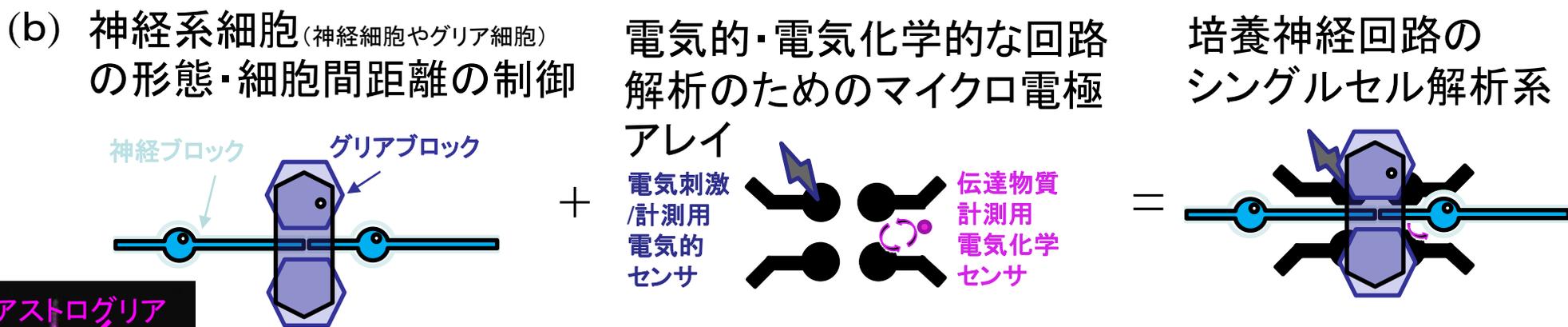
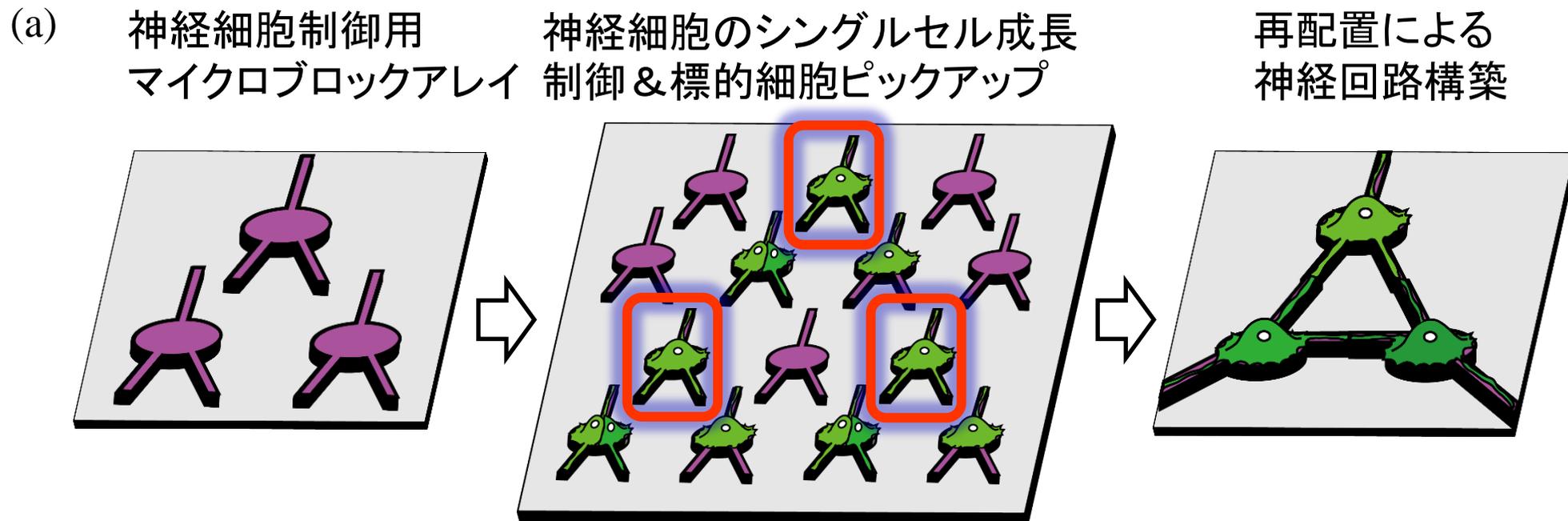


マイクロ電極などの解析システムの統合

- 電氣的・電氣化学的解析のためのマイクロ電極アレイや、薬剤アッセイのためのマイクロ流路などを統合することで、神経回路の解析システムを構築することが可能になる



本技術のまとめ



マイクロブロックの形状を変えれば様々な種類の神経系の細胞に適用可能になると期待できる

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、神経回路に対する薬理作用の解析に適用することで、再現性の高い創薬スクリーニングが行えるメリットが大きいと考えられる。
- 上記以外に、神経細胞の分化・生存・伸長・シナプス形成と除去・損傷と回復・細胞間相互作用に関するアッセイキットとして利用可能になることも期待される。
- iPS細胞由来神経細胞を用いて脳組織を構築する再生医療の分野に展開することも可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 現在、本技術によって1細胞レベルの高解像度で神経回路を構築でき、またその解析が可能であるところまで開発済み。しかし、電極やマイクロ流路との統合の点が未解決である。
- 今後、統合した解析環境を用いた実験データを取得し、薬理作用解析に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、安価な材料・製造方法によるデバイスの構築技術を確立する必要もあり。

企業への期待

- 薬剤スクリーニング系として確立するための条件設定のために、神経活動を記録する電極システムや神経回路の薬理作用解析を行っている企業との共同研究を希望。
- 大学などにおける神経回路の研究用ツールとして用いられる可能性があることから、神経科学実験におけるニーズ調査や製品化のための安価な材料による作成技術の開発や価格検討のためにメーカーとの共同研究を希望。

本技術に関する論文

1. **Shotaro Yoshida**, Midori Kato-Negishi, Shoji Takeuchi, “Assembly and Connection of Micropatterned Single Neurons for Neuronal Network Formation”, *Micromachines*, 9(5), 235 (2018).
2. **Shotaro Yoshida**, Tetsuhiko F. Teshima, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Shoji Takeuchi, “Mobile Microplates for Morphological Control and Assembly of Individual Neural Cells”, *Advanced Healthcare Materials*, 5(4), 415 – 420 (2016).
3. **Shotaro Yoshida**, Koji Sato, Shoji Takeuchi, “Assembly of neural cell-laden microplates on a microfabricated breadboard”, *Proc. In IEEE 27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, (2014).

など

本技術に関する知的財産権

中央大学研究推進支援本部・産学連携部局の支援を受け取得予定

産学連携の経歴

- 2016年-2017年 東大にて企業1社との共同研究実施
- 2018年-2020年 東北大にて企業3社との共同研究実施

お問い合わせ先

中央大学

研究推進支援本部 産学連携担当URA

工藤謙一

福井 智一

Tel: 03-3817-1674

Fax: 03-3817-1677

Email: ksanren-grp@g.chuo-u.ac.jp