

多電極アレイと免疫蛍光イメージングによる 培養ニューラルネットワーク時空間ダイナミクスの 計測および解析

学位論文内容の要旨

近年、fMRI などのイメージング法の発展によりヒトの脳に関する研究が進んでいる。また、分子生物学的な研究により、行動や記憶・学習に関連する脳内タンパクが特定され、脳機能との関連が議論されている。一方、脳はニューロンと呼ばれる神経細胞のネットワークを基盤としており、脳機能を理解するためにはニューラルネットワークを対象とした研究が必要不可欠である。ニューラルネットワークに関する研究は、これまで主に個体や脳のスライス標本を対象にインパルス多点計測が行われてきた。これらの計測結果により、複数のニューロンが同期して活動する「同期バースト」が脳の機能において重要な役割を果たしていることが注目されている。しかしながら、個体や脳スライス標本を対象にした計測法では、組織に損傷を与えてしまうため、発生初期から連続的にかつ長期的に測定することが不可能である。これらの問題は、生体外で培養したニューラルネットワークを研究対象とすることにより解決できる。適切な培養環境を維持することにより、ニューロンは数カ月から数年のオーダーで生存し続けるため、ばらばらの状態からネットワークを形成し、発達・成熟に至るまでの過程を連続的に観察することが可能である。近年、この培養ニューラルネットワークにおいて生じるインパルスを計測するための手法として、多電極アレイによる計測法が用いられるようになり、培養系においても個体と同様に同期バーストが生じることが明らかとなってきた。多電極アレイによるインパルスの時間情報に着目した研究が進められる一方で、ネットワーク構造、すなわち空間情報に着目した研究はほとんど行われていない。ニューラルネットワークのダイナミクスを解明するためには、多電極アレイによるインパルスの多点計測に加えて、空間情報の計測も併せて行うことが必要である。ニューロンにはその構造ごとに特異的なタンパクが発現しており、このタンパクを抗体および蛍光色素で標識する免疫蛍光染色によるイメージングが空間情報の計測に有効である。

以上を背景として、本論文では多電極アレイ法と免疫蛍光染色法による培養ニューラルネットワークの時空間ダイナミクスの計測および解析を目的とし、以下の三つの研究を行った。第一に、培養したニューロンのネットワークに対して、インパルス列(時間情報)とネットワーク構造(空間情報)を長期に渡って計測するためのシステムを構築した。第二に、多電極アレイ上の培養ニューラルネットワークに対して免疫蛍光染色を行うことにより、同期バーストに必要なネットワークのサイズに下限があるか否かを検証した。第三に、培養ニューラルネットワークが発達・成長する過

程において、ニューロン間の接点であるシナプスに着目し、興奮性・抑制性シナプスの発現量を長期に渡り計測し、電気的活動との比較を行った。

本論文は全 6 章から構成されている。

第 1 章では、本研究の背景および目的を述べる。

第 2 章では、脳・神経科学の現状について解説する。まずミクロな視点に立ち、脳の基本素子であるニューロンの構造について分子・細胞レベルから概説した後、マクロな視点から脳の解剖学的構造とその発生について述べる。次に、脳の機能について、主にニューラルネットワークを対象とした研究の現状に触れ、本研究が対象とする培養ニューラルネットワークについて述べる。最後に、多電極アレイを用いた研究の現状と問題点について説明する。

第 3 章では、培養ニューラルネットワークの時空間ダイナミクスを計測するために構築した実験システムについて説明する。ばらばらの単体ニューロンがネットワークを形成し、発達・成熟に至る過程を長期的に計測するために、多電極アレイをベースとした並列計測系を新たに構築する。さらに、免疫蛍光染色によるイメージング法を適用することにより、多電極アレイ上におけるネットワーク構成要素の配置・局在の同定法を確立する。最後に、構築したシステムを用いたインパルス伝搬経路の同定法について述べる。

第 4 章では、第 3 章で構築したシステムを用いた計測および解析を行うことにより、同期バースト現象が生じるために必要なニューロン数に下限があることを実験的に示す。異なる初期密度でニューロンを分散培養し、1 カ月超に渡る多電極アレイを用いたインパルス多点計測を行うことにより、一定密度以下では同期バーストが発生しないことを明らかにする。さらに、免疫蛍光染色法によるイメージング結果から、同様に一定密度以下ではネットワークが形成されないことを示す。インパルス計測結果および免疫蛍光イメージング結果を統合することにより、同期バーストは一定の数のニューロンが生存している条件下で初めて生じる現象であることを明らかにする。

第 5 章では、培養したニューロンがネットワークを形成する過程に焦点を当てる。1 カ月超の培養において、多電極アレイを用いて電気的活動を計測することにより、発火率・同期バースト率ともに初期の増加後飽和傾向があることを示す。さらに同培養期間において、ネットワーク構成要素のうちニューロンおよび興奮性・抑制性シナプスの免疫蛍光染色によるイメージングを行い、これら構成要素の密度変化を定量的に計測する。ニューロン密度が減少する一方で、興奮性・抑制性シナプスは初期の増加後、飽和傾向があることを明らかにする。これらの結果から、同期バーストがシナプス密度と関係性があることを示す。

最後に第 6 章では、本研究で得られた結果についてまとめ、その考察と今後の展望について述べる。

本研究では、培養ニューラルネットワークに対して、多電極アレイによるインパルス多点計測法と免疫蛍光染色によるイメージングを併用し、長期間計測およびデータ解析を行うことにより新たな知見を得た。本研究で得られた結果をもとにして、脳神経系機能の基本メカニズムの解明および工学への応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 郷 原 一 壽
副 査 教 授 折 原 宏
副 査 准教授 内 田 努
副 査 教 授 大 橋 俊 朗

学 位 論 文 題 名

多電極アレイと免疫蛍光イメージングによる 培養ニューラルネットワーク時空間ダイナミクスの 計測および解析

近年、fMRI などのイメージング法の発展によりヒトの脳に関する研究が進んでいる。また、分子生物学的な研究により、行動や記憶・学習に関連する脳内タンパクが特定され、脳機能との関連が議論されている。一方、脳はニューロンと呼ばれる神経細胞のネットワークを基盤としており、脳機能を理解するためにはニューラルネットワークを対象とした研究が必要不可欠である。ニューラルネットワークに関する研究は、これまで主に個体や脳のスライス標本を対象にインパルス多点計測が行われてきた。これらの計測結果により、複数のニューロンが同期して活動する「同期バースト」が脳の機能において重要な役割を果たしていることが注目されている。しかしながら、個体や脳スライス標本を対象にした計測法では、組織に損傷を与えてしまうため、発生初期から連続的にかつ長期的に測定することが不可能である。これらの問題は、生体外で培養したニューラルネットワークを研究対象とすることにより解決できる。適切な培養環境を維持することにより、ニューロンは数カ月から数年のオーダーで生存し続けるため、ばらばらの状態からネットワークを形成し、発達・成熟に至るまでの過程を連続的に観察することが可能である。近年、この培養ニューラルネットワークにおいて生じるインパルスを計測するための手法として、多電極アレイによる計測法が用いられるようになり、培養系においても個体と同様に同期バーストが生じることが明らかになってきた。多電極アレイによるインパルスの時間情報に着目した研究が進められる一方で、ネットワーク構造、すなわち空間情報に着目した研究はほとんど行われていない。ニューラルネットワークのダイナミクスを解明するためには、多電極アレイによるインパルスの多点計測に加えて、空間情報の計測も併せて行うことが必要である。ニューロンにはその構造ごとに特異的なタンパクが発現しており、このタンパクを抗体および蛍光色素で標識する免疫蛍光染色によるイメージングが空間情報の計測に有効である。

以上を背景として、本論文では多電極アレイ法と免疫蛍光染色法による培養ニューラルネットワークの時空間ダイナミクスの計測および解析を目的とし、以下の三つの研究を行った。第一に、

培養したニューロンのネットワークに対して、インパルス列(時間情報)とネットワーク構造(空間情報)を長期に渡って計測するためのシステムを構築した。第二に、多電極アレイ上の培養ニューラルネットワークに対して免疫蛍光染色を行うことにより、同期バーストに必要なネットワークのサイズに下限があるか否かを検証した。第三に、培養ニューラルネットワークが発達・成長する過程において、ニューロン間の接点であるシナプスに着目し、興奮性・抑制性シナプスの発現量を長期に渡り計測し、電気的活動との比較を行った。

本論文は全6章から構成されている。

第1章では、本研究の背景および目的を述べる。

第2章では、脳・神経科学の現状について解説する。まずミクロな視点に立ち、脳の基本素子であるニューロンの構造について分子・細胞レベルから概説した後、マクロな視点から脳の解剖学的構造とその発生について述べる。次に、脳の機能について、主にニューラルネットワークを対象とした研究の現状に触れ、本研究が対象とする培養ニューラルネットワークについて述べる。最後に、多電極アレイを用いた研究の現状と問題点について説明する。

第3章では、培養ニューラルネットワークの時空間ダイナミクスを計測するために構築した実験システムについて説明する。ばらばらの単体ニューロンがネットワークを形成し、発達・成熟に至る過程を長期的に計測するために、多電極アレイをベースとした並列計測系を新たに構築する。さらに、免疫蛍光染色によるイメージング法を適用することにより、多電極アレイ上におけるネットワーク構成要素の配置・局在の同定法を確立する。最後に、構築したシステムを用いたインパルス伝搬経路の同定法について述べる。

第4章では、第3章で構築したシステムを用いた計測および解析を行うことにより、同期バースト現象が生じるために必要なニューロン数に下限があることを実験的に示す。異なる初期密度でニューロンを分散培養し、1カ月超に渡る多電極アレイを用いたインパルス多点計測を行うことにより、一定密度以下では同期バーストが発生しないことを明らかにする。さらに、免疫蛍光染色法によるイメージング結果から、同様に一定密度以下ではネットワークが形成されないことを示す。インパルス計測結果および免疫蛍光イメージング結果を統合することにより、同期バーストは一定の数のニューロンが生存している条件下で初めて生じる現象であることを明らかにする。

第5章では、培養したニューロンがネットワークを形成する過程に焦点を当てる。1カ月超の培養において、多電極アレイを用いて電気的活動を計測することにより、発火率・同期バースト率ともに初期の増加後飽和傾向があることを示す。さらに同培養期間において、ネットワーク構成要素のうちニューロンおよび興奮性・抑制性シナプスの免疫蛍光染色によるイメージングを行い、これら構成要素の密度変化を定量的に計測する。ニューロン密度が減少する一方で、興奮性・抑制性シナプスは初期の増加後、飽和傾向があることを明らかにする。これらの結果から、同期バーストがシナプス密度と関係性があることを示す。

最後に第6章では、本研究で得られた結果についてまとめ、その考察と今後の展望について述べている。

これを要するに、本研究では培養ニューラルネットワークに対して、多電極アレイによるインパルス多点計測法と免疫蛍光染色によるイメージングを併用し、長期間計測およびデータ解析を行うことにより新たな知見を得たものであり、応用物理学に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士(工学)の学位を授与される資格あるものと認める。