

博士論文

マイクロデバイスを利用した分化誘導神経系
発達・機能発現過程の評価

榛葉 健太

目次

第 1 章 序論	1
1-1 はじめに	2
1-2 研究背景	3
1-2-1 幹細胞	3
1-2-2 神経発生と多能性幹細胞の分化誘導の関係	8
1-2-3 再生医療における治療のステップと課題	13
1-2-4 課題解決に向けた工学技術の応用の可能性	17
1-3 本研究の目的	22
1-4 本論文の構成	23
第 2 章 物理的刺激を用いたヒト iPS 細胞の分化誘導手法の開発	25
2-1 緒言	26
2-2 細胞内 Ca^{2+} 濃度変動と細胞周期	28
2-2-1 細胞内 Ca^{2+}	28
2-2-2 細胞周期	30
2-3 研究方法	33
2-3-1 細胞培養	33
2-3-2 アルカリフォスファターゼ染色	40
2-3-3 免疫組織化学染色法	41
2-3-4 Ca imaging	43
2-3-5 遺伝子発現評価	47
2-4 分化過程および分化細胞の評価	51
2-4-1 未分化性の確認	51
2-4-2 分化のタイムコース	53
2-4-3 分化した細胞種	57
2-5 Ca 変動の評価	63
2-5-1 分化過程における Ca 変動のパターン	63
2-5-2 未分化 iPS 細胞における Ca 変動と細胞周期の関係	67
2-6 電気刺激が iPS 細胞の分化方向に与える影響	79
2-6-1 電気刺激による iPS 細胞の Ca 変動の誘発	79
2-6-2 電気刺激後の分化方向の変化	67
2-7 考察	87
2-7-1 発生過程と多能性幹細胞の神経分化過程の対応	87
2-7-2 分化過程における Ca 変動の変化	88

2-7-3 画像解析を用いた細胞周期の推定手法.....	89
2-7-4 Ca 振動と細胞周期の関係.....	90
2-7-5 電気刺激が Ca 変動を誘発する機序.....	90
2-7-6 電気刺激が分化方向に影響を与える機序.....	91
2-7-7 物理的刺激を用いた細胞内シグナル制御の可能性.....	92
2-7-8 設定した要件の達成度.....	93
2-7-9 本研究で得られた結果の新規性.....	94
2-8 まとめ.....	95
第3章 発達過程における神経回路網レベルでの機能評価手法の構築	97
3-1 緒言.....	98
3-2 培養神経回路網を用いた先行研究.....	99
3-2-1 マウスおよびラット神経回路網を用いた研究.....	99
3-2-2 ヒト神経細胞を用いた研究.....	102
3-3 研究手法.....	103
3-3-1 微細加工.....	103
3-3-2 細胞培養.....	109
3-3-3 免疫組織化学染色.....	110
3-3-4 活動計測およびデータ解析.....	111
3-4 免疫組織化学染色によるヒト iPS 細胞由来神経細胞の可視化.....	114
3-4-1 神経分化過程におけるタンパク質の発現.....	114
3-4-2 長期培養後のヒト iPS 細胞由来神経系細胞の形態.....	119
3-4-3 神経細胞の神経伝達物質の特定.....	122
3-5 コーティング条件の検討.....	124
3-6 発達段階における自発活動パターンの変化.....	128
3-6-1 長期培養に伴う形態の変化.....	128
3-6-2 計測された波形と活動パターンの推移.....	131
3-6-3 発達に伴う同期バーストの変化.....	136
3-7 考察.....	139
3-7-1 発達過程における活動変化の要因.....	139
3-7-2 マウスやラットを用いた研究との対応.....	140
3-7-3 微小トンネルを用いた手法の優位性と限界.....	141
3-7-4 神経細胞の種類と評価方法.....	142
3-7-5 設定した要件の達成度.....	143
3-7-6 本研究で得られた結果の新規性.....	144
3-8 まとめ.....	145

第4章 発達過程における細胞内機能発現の評価手法の開発	147
4-1 緒言	148
4-2 研究手法	149
4-2-1 培養デバイス	149
4-2-2 細胞培養	150
4-2-3 活動計測	150
4-2-4 活動伝導の検出	151
4-2-5 バースト活動に伴う伝導時間の変化	154
4-2-6 電気刺激と刺激応答の検出	155
4-2-7 自発活動と誘発応答の比較	157
4-3 自発活動に応じた活動伝導の変化	158
4-3-1 微小トンネル内への軸索の伸長と、活動の伝導	158
4-3-2 スパイクソーティングの精度と用いた電極数	160
4-3-3 自発活動から検出された活動の伝導	161
4-3-4 バースト活動における活動伝導の変化	162
4-3-5 発達過程における活動パターンおよび伝導の変化	165
4-4 電気刺激を用いた伝導特性の評価	166
4-4-1 バースト活動に伴う伝導時間の増加	166
4-4-2 電気刺激に対する軸索の応答と刺激電圧の変化による影響	168
4-4-3 刺激の影響からの回復時間	170
4-4-4 刺激頻度と伝導特性変化の関係	172
4-4-5 自発的な伝導時間変化と刺激による変化の関係	175
4-5 ヒト iPS 細胞由来神経細胞の軸索における活動伝導	178
4-5-1 自発活動による評価	178
4-5-2 電気刺激を用いた伝導時間の評価	180
4-6 考察	183
4-6-1 軸索の伝導計測に微小トンネルを用いる利点	183
4-6-2 計測された軸索の伝導速度	184
4-6-3 伝導時間の変化が発生する機序	185
4-6-4 誘発応答の信号源	186
4-6-5 刺激からの回復に要する時間	186
4-6-6 高頻度刺激における振幅の変化	187
4-6-7 刺激頻度依存性の伝導時間の増加	188
4-6-8 自発的な変化と刺激による影響の関係	188
4-6-9 活動伝導を指標とした分化誘導神経細胞の評価の可能性	189
4-6-10 生体内における h 電流の役割とスパイクタイミングの重要性	189

4-6-11 設定した要件の達成度	190
4-6-12 本研究で得られた結果の新規性	191
4-7 まとめ	192
第5章 神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築	193
5-1 緒言	194
5-2 P19 細胞の基本的性質	195
5-3 実験手法	196
5-3-1 微細加工	196
5-3-2 細胞培養	197
5-3-3 染色方法	200
5-3-4 Calcein 染色	200
5-3-5 GFP の観察	201
5-3-6 活動計測と解析手法	201
5-4 P19 細胞由来神経細胞を用いた手法の評価	202
5-4-1 Calcein 染色による形態的結合の確認	202
5-4-2 免疫組織化学染色による形態的結合の確認	204
5-4-3 細胞種の変更による伝導の比率の変化	206
5-4-4 細胞種の違いによる伝導時間の違い	210
5-4-5 発達に伴う P19-neuron の CX 神経回路網への統合	211
5-5 マウス iPS 細胞由来神経細胞の宿主神経回路網への統合	212
5-5-1 AP 染色および GFP の観察によるマウス iPS 細胞の可視化	212
5-5-2 凝集状態 miPS-neuron の培養条件	213
5-5-3 単離状態のマウス iPS 細胞由来神経細胞を用いた共培養	215
5-5-4 凝集塊状のマウス iPS 細胞由来神経細胞を用いた共培養	218
5-6 考察	225
5-6-1 クラスタの数から結合を評価する優位性	225
5-6-2 伝導方向を指標とした細胞種の判別法の信頼性	226
5-6-3 微小トンネル内に伸長した神経突起の可視化	226
5-6-4 発達過程におけるクラスタ数の変化および活動パターン	227
5-6-5 CX と P19-neuron の間の伝導時間の違い	228
5-6-6 miPS と CX の結合過程	228
5-6-7 P19-neuron と miPS-neuron の性質の違い	229
5-6-8 要件に対する考察	230
5-6-9 得られた結果の新規性	231
5-7 まとめ	232

第 6 章 結論	233
6-1 結論	234
6-2 展望	238
謝辞	241
参考文献	243
業績	267
付録	275

略語一覧

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
2-ME	2-mercaptoethanol
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANR	anterior neural ridge
AP	alkaline phosphatase, アルカリフォスファターゼ
APV	(2R)-amino-5-phosphonovaleric acid
B3T	beta 3 tubulin
bFGF	basic fibroblast growth factor, 塩基性線維芽細胞増殖因子
BMP	bone morphogenetic protein, 骨形成タンパク質
BrdU	bromodeoxyuridine, ブロモデオキシウリジン
BSA	bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン
[Ca ²⁺] _i	細胞内 Ca ²⁺ 濃度
CCD	charge coupled device
CDX	caudal type homeobox
CICR	Ca ²⁺ induced Ca ²⁺ release
ChAT	choline acetyltransferase
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CPN	callosal projection neuron
CR 細胞	Cajal-Retzius 細胞
CThPN	corticothalamic projection neuron
CTK 溶液	collagenase trypsin KSR 溶液
CX	cortical neuron, 大脳皮質神経細胞
cyc	cyclopamine
DAG	diacylglycerol
DAI	days after induction
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBH	dopamine beta decarboxylase
DCX	doublecortin
DIC	days in co-culture
DIV	days <i>in vitro</i>
Dkk	Dickkopf
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle's medium/ Nutrient F-12 Ham
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid

EB	embryoid body, 胚様体
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ER	endoplasmic reticulum, 小胞体
ES 細胞	embryonic stem cell, 胚性幹細胞
EToS	Efficient Technology of Spike Sorting
FBS	Fetal bovine serum
FoxG	forkhead box G
FP	floor plate
Fucci	fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator
GABA	γ -Aminobutyric acid
GFAP	glia fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein, 緑色蛍光タンパク質
GN	granular neuron
Gsh	GS Homeobox
HCN	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated
HLA	human leukocyte antigen, ヒト白血球型抗原
HMDS	hexamethyldisilazane, 1,1,1,3,3,3 ヘキサメチルジシラザン
hiPS-neuron	human iPS cell-derived neuron, ヒト iPS 細胞由来神経系細胞
hPSC medium	human pluripotent stem cell medium, ヒト多能性幹細胞用培地
IBI	inter burst interval
IICR	IP ₃ induced Ca ²⁺ release
IP	intermediate progenitor
IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate
IP ₃ R	inositol 1,4,5-triphosphate receptor
iPS 細胞	induced pluripotent stem cell, 人工多能性幹細胞
ITO	indium-tin-oxide, 酸化インジウムスズ
Klf	Kruppel-like factor
KSR	knock-out serum replacement
LGE	lateral ganglionic eminence
LIF	leukemia inhibitory factor, 白血病抑制因子
MAP2	microtubule-associated protein 2
MEA	microelectrode array, 微小電極アレイ
MGE	medial ganglionic eminence
MHB	midbrain-hindbrain boundary
miPS-neuron	mouse induced pluripotent stem cell-derived neuron
MMC	mitomycin C

mRNA	messenger ribonucleic acid
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
NEAA	non-essential amino acid
NE 細胞	neuroepithelial cell, 神経上皮細胞
NF medium	neural freezing medium
NI medium	neural induction medium
Nkx2.1	NK2 homeobox 1
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NM medium	neural maintenance medium
Nnat	neuronatin
Oct	octamer-binding transcription factor
OPC	oligodendrocyte precursor cell, オリゴデンドロサイト前駆細胞
oRG	outer radial glia
P19-neuron	P19 cell-derived neuron
PAX6	paired box 6
PBS	phosphate buffered saline
PDMS	polydimethylsiloxane, ポリジメチルシロキサン
PEI	polyethyleneimine
PFA	paraformaldehyde パラホルムアルデヒド
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PLC	phospholipase C
PLO	poly L ornithine
PMCA	plasma membrane Ca ²⁺ ATPase
PSC	pluripotent stem cell, 多能性幹細胞
PSC-neuron	pluripotent stem cell-derived neuron, 多能性幹細胞由来神経細胞
pur	purmorphamine
RA	retinoic acid, レチノイン酸
RG	radial glia, 放射状グリア
RPE 細胞	retinal pigment epithelium cell, 網膜色素上皮細胞
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RyR	ryanodine receptor
SCPN	subcerebral projection neurons
SERCA	sarcoendoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
shh	sonic hedgehog
SNL-CM	SNL cell conditioned medium
SOCC	store operated Ca ²⁺ channel, ストア作動性 Ca ²⁺ チャネル

Sox2	sex determining region Y-box 2
SP	sub-plate
std-MEA	standard MEA
SYN	synapsin I
TGF	transforming growth factor, トランスフォーミング増殖因子
TPH	tryptophan hydroxylase
TTX	tetrodotoxin
VGCC	voltage-gated calcium channel, 電位依存性 Ca^{2+} チャネル
VZ	ventricular zone, 脳室帯

第 1 章

序論

1-1 はじめに

神経系細胞を用いた再生医療では、多能性幹細胞から分化誘導した神経系細胞を患部に移植することにより、失った機能の回復や疾患の根治を目指す。中枢神経系の神経細胞は再生能力が低いため、疾患により失った神経細胞が自発的に補填される可能性は低い。従来の中枢神経疾患に対する治療法では、薬剤の投与により病態の進行を抑制することやリハビリテーションにより疾患で失った機能を別の領域で代替することが意図されていたが、疾患の根治は困難であった。一方、再生医療では、新たな神経系細胞を移植することにより、移植細胞が放出する成長因子による内在性細胞の機能改善 [Hampton 2010] や神経細胞の補填による機能の回復 [Ben-Hur 2010] が意図される。期待される治療効果から、再生医療が中枢神経系の疾患に対する根治療法となることが期待されている。

再生医療の実現に向けて、安全性の高い多能性幹細胞の樹立 [Okita 2008; Yu 2009]、遺伝子発現解析による分化誘導手法の最適化 [Maroof 2013]、および疾患モデル動物の樹立 [Okada 2005] といった生物学分野の手法を駆使した研究が盛んに行われている。しかし、幹細胞の精密な分化誘導法の開発、分化した細胞の機能評価手法の開発、および移植を模倣した実験系の構築といった課題は、従来の生物学分野の手法のみによっては解決できないと考えられる。上記の課題に対しては、制御性に優れた物理的刺激、長期的な電位計測、およびマイクロ加工などに代表される工学分野の技術を応用することが有効であると考えられる。そこで、本研究では、再生医療の実現に向けた課題に対して、工学技術を積極的に応用する。

本章では、本論文において基礎となる事項をまとめた後、研究の目的を述べる。最初に、幹細胞の性質および神経系細胞への分化誘導法について概説する。次に、再生医療が実現した際の治療の流れと、それぞれのステップにおける課題について述べる。さらに、課題解決に有効と考えられる工学技術と、開発すべきシステムの要求仕様についてまとめる。最後に、研究の目的を述べ、本論文の構成をまとめる。

1-2 研究背景

1-2-1 幹細胞

本項では、幹細胞の基本的性質について述べる。最初に、幹細胞の定義について説明した後、幹細胞の分類法について述べる。続いて、再生医療への応用が期待される 3 種類の幹細胞について、それぞれの特性と医療応用への課題を概説する。

幹細胞とは、多分化能と自己複製能を併せ持つ細胞として定義される細胞種の総称である [日本再生医療学会 2012]。多分化能とは、複数の種類の細胞へと分化する能力のことである。ここでいう多分化能とは、胚葉を超えた分化能を示す多能性とは区別される。また、自己複製能とは、多分化能を維持したまま細胞分裂を行う能力のことである。幹細胞の分裂様式には、対称分裂と非対称分裂の 2 通りが存在する [中内 2013]。対称分裂とは、1 つの細胞が、2 つの同じ種類の娘細胞へと分裂する様式である。神経発生の例では、1 つの神経幹細胞が 2 つの神経幹細胞へと分裂する。非対称分裂とは、1 つの細胞が分裂した後、一方の娘細胞は幹細胞として維持され、他方の娘細胞は分化する様式である。神経発生の例では、1 つの神経幹細胞が細胞分裂し、一方は神経幹細胞として維持され、他方は神経細胞へと分化する。

幹細胞の分類法には、分化能を指標とした分類法と、存在する時期を指標とした分類法の 2 種類がある [日本再生医療学会 2012]。最初に、分化能を指標とした分類法について説明する。幹細胞の性質は、分化できる細胞の種類によって以下の 4 つに分けられる [日本再生医療学会 2012]。1 つ目は、全能性 (totipotency) である。全能性は、個体を形成する全ての細胞種へと分化可能であり、自立的に完全な個体を形成可能であることと定義される。受精卵と分裂数回までの胚が全能性を持つ。2 つ目は、多能性 (pluripotency) である。多能性を持つ幹細胞は、外胚葉や中胚葉といった複数の胚葉に属する細胞種へと分化でき、個体を形成する全ての細胞種へと分化可能である。多能性には、狭義と広義の 2 種類の定義が存在する [日本再生医療学会 2012]。狭義の定義は、多能性幹細胞を胚に移植することによって形成されたキメラに、移植細胞由来の組織が三胚葉全てにおいて見られることである。しかし、ヒト多能性幹細胞については、キメラ形成が禁止されているため、狭義の定義を満たすことの確認はできない。そこで、広義の定義として、三胚葉全ての系統の細胞に分化できることという基準が制定されている。また、胚性幹 (embryonic stem; ES) 細胞や人工多能性幹 (induced pluripotent stem; iPS) 細胞も、多能性幹細胞に分類される。3 つ目は、複能性 (multipotency) である。個体を形成する全ての細胞種へは分化できないが、複数の種類の細胞へと分化できる能力と定義される。日本語訳される場合に、多能性とされる場合があるが、pluripotency と multipotency は区別される。また、幹細胞の定義として先述した多分化能も、複能性のことを指す。複能性を持つ幹細胞の例として、神経幹細胞や造血幹細胞といった細胞が挙げられる。4 つ目は、単能性 (unipotency) である。単一の種類の細

胞へと終末分化できる能力と定義される。しかし、単能性を持つ幹細胞は、前述の幹細胞の定義に入らないため、前駆細胞と呼んで区別することもある。骨格筋幹細胞や神経前駆細胞が、単能性を持つ細胞の例である。

もう 1 つの分類法は、存在する時期を指標とした分類法である。本分類法における多能性幹細胞は、前述の多能性以上の分化能を持つ細胞であり、一般的には胚発生において現れる幹細胞を指す。組織幹細胞は、体性幹細胞とも呼ばれ、胚発生が終了した後も体内に残り、生体内の恒常性の維持に貢献する細胞種である。以下に、多能性幹細胞の例として ES 細胞および iPS 細胞を、組織幹細胞の例として神経幹細胞を挙げ、それぞれの細胞種の概要と、再生医療の実現に向けた課題および解決方策について説明する。図 1-1 に、それぞれの細胞種の関係を示す。

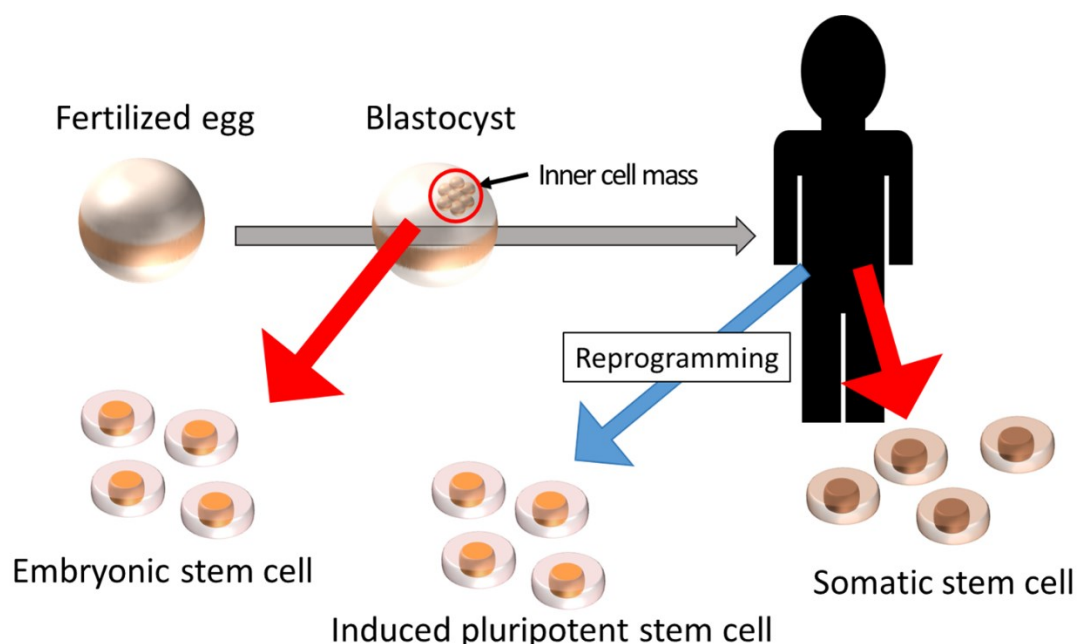


図 1-1 幹細胞の関係。受精 7 日後の受精卵 (fertilized egg) である胚盤胞 (blastocyst) から樹立された多能性幹細胞が、ES 細胞 (embryonic stem cell) である。分化後の組織から、初期化 (reprogramming) と呼ばれる手法を用いて樹立された多能性幹細胞が、iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) である。また、発生期以降に体内に残っている幹細胞が、組織幹細胞 (somatic stem cell) である。

a) ES 細胞

ES 細胞は、胚発生において胚盤胞 (blastocyst) と呼ばれる段階の胚から、内部細胞塊 (inner cell mass) という部分の細胞を採取し、Feeder 細胞上で培養することで得られる。胚盤胞は、マウスでは受精後 3 日程度、ヒトでは 7 日程度の時期に見られる。1981 年に Evans らによってマウス ES 細胞が樹立され [Evans 1981]、1998 年に Thomson らによってヒト ES 細胞が樹立された [Thomson 1998]。また、あらかじめ細胞核を取り除いておいた未受精卵に体細胞の細胞核を移植し、培養することで、体細胞の遺伝情報を持った胚盤胞が作製される。上記の手法は、体細胞核移植と呼ばれ、体細胞核移植による胚盤胞からでも ES 細胞が樹立できることが知られている [Tachibana 2013]。体細胞核移植により樹立された株は、体細胞由来の遺伝情報を有するため、患者の体細胞の細胞核を用いて樹立した ES 細胞を移植した場合、免疫型の不一致による拒絶反応が起こらないと考えられており、医療応用が期待されている。

ES 細胞の未分化状態を維持するための手法として、マウス胎児線維芽細胞や STO 細胞株といった Feeder 細胞との共培養が広く用いられている。また、未分化状態を維持するためには、マウス ES 細胞には白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor; LIF) を、ヒト ES 細胞には塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; bFGF) を培養液に添加する必要がある [中内 2013]。両者が必要とする因子の違いは、両者の未分化状態の違いに由来することも知られている [Greber 2010]。先行研究では、ヒト ES 細胞はマウス ES 細胞と比較して分化が進んだ状態であり、マウスでは着床後の胚盤胞から樹立されたエピブラスト幹細胞がヒト ES 細胞と同様の特徴を有していると報告されている [Najm 2011]。ヒト ES 細胞とマウス ES 細胞が持つ多能性は区別され、マウス ES 細胞はナイーブ状態、ヒト ES 細胞はプライム状態と呼ばれる。

再生医療への応用が期待されるものの、ES 細胞には 4 つの問題点が存在する。1 つ目は、樹立する際に受精卵である胚盤胞を破壊する点である。胚盤胞を壊すことは生命を殺すことと同義であると考えられ、倫理的な面から使用が制限される可能性が高い。しかし、近年では、8 細胞期程度の胚の 1 つの割球から ES 細胞を樹立する方法が報告され [Chung 2008]、胚を壊さずに ES 細胞を樹立することが可能になった。2 つ目は、免疫型の不一致による拒絶反応である。受精卵から樹立された ES 細胞を治療に用いた場合、免疫型が患者と違うことから拒絶反応が起こる可能性が高い。拒絶反応の問題は、体細胞核移植を用いることで解決可能である。しかし、体細胞核移植を用いて樹立された ES 細胞は、次の 3 つ目の問題点を有する。3 つ目の問題点は、体細胞核移植を行うためには高い品質の未受精卵が必要とされ [Tachibana 2013]、1 つの ES 細胞の樹立に多くの未受精卵を使用する点である。受精卵から ES 細胞を樹立するためには、不妊治療などで生じた余剰胚が用いられる。しかし、体細胞核移植による ES 細胞を医療応用するためには、多くの未受精卵を収集する必要がある、困難であると考えられている。4 つ目は、造腫瘍性である。移植に用いる細胞の中に未分化状態の多能性幹細胞が混入すると、移植した先で奇形腫を形成する可能性がある。

b) iPS 細胞

iPS 細胞とは、転写因子を体細胞に導入し分化状態を初期化することによって樹立される多能性幹細胞を指す。2006 年に、*octamer-binding transcription factor (Oct) 3*, *Kruppel-like factor (Klf) 4*, *c-Myc* および *sex determining region Y-box (Sox) 2* という 4 つの因子を導入することでマウス iPS 細胞が樹立された [Takahashi 2006]。さらに、2007 年には、Takahashi らと Yu らの 2 つのグループから、ヒト iPS 細胞の樹立に成功したという報告がなされた [Takahashi 2007; Yu 2007]。どちらのグループで樹立された細胞も同様の性質を有するものの、初期化時に用いられた因子には、Takahashi らはマウス iPS 細胞を樹立した際と同様の因子を使用したのに対して、Yu らは *c-Myc* と *Klf4* の代わりに *Nanog* と *Lin26* を用いたという違いがあった。iPS 細胞は、治療に必要な患者の細胞から樹立できる点や、樹立に受精卵を必要としない点から、ES 細胞における医療応用への課題を解決可能であるとして期待が集まっている。

臨床応用に向けた課題は、以下の 4 つであると考えられている。1 つ目は、iPS 細胞を樹立する際に、ウイルスベクターを用いるため、ウイルス由来の遺伝情報が iPS 細胞の deoxyribonucleic acid (DNA) に組み込まれることである。ただし、最近では、DNA への組み込みが起らない手法 [Yu 2009]、ウイルスベクターではなくプラスミドベクターを用いた手法 [Okita 2008]、および小分子化合物のみを用いた樹立法 [Hou 2013] といった方法が発表され、ウイルスの使用や遺伝情報の書き換えが必要ではなくなっている。2 つ目は、移植のための iPS 細胞をあらかじめ準備しておく方法についてである。ヒト iPS 細胞の樹立には数週間が必要であり、目的とした細胞への分化誘導にも同様の時間が必要とされるため、疾患や事故などにより必要となった後に、患者から iPS 細胞を樹立することは現実的ではない。そこで、あらかじめ様々な人から収集した細胞から iPS 細胞を樹立し、貯蔵しておく必要があると考えられている。また、移植時に様々な免疫型を有する患者に適用できるように、移植の適用範囲が広い免疫型を有する人からの細胞の収集が求められている。3 つ目は、初期化前の情報の保存や初期化による遺伝子発現の変化である。iPS 細胞は、体細胞を初期化することにより樹立されるため、初期化前の細胞の影響と見られる転写因子の発現を示すことが報告されている [Ghosh 2010]。さらに、分化運命の傾向が、初期化前の細胞種に依存する場合があることも知られている [Hu 2010b]。また、初期化前の細胞種に依存しない、ES 細胞との遺伝子発現パターンの違いも報告されており [Chin 2009]、初期化を行ったことがもたらす影響の評価は課題の 1 つである。4 つ目は、ES 細胞の項で述べた造腫瘍性である。ES 細胞の場合と同様に、未分化状態の iPS 細胞が移植細胞に混入すると、移植先で奇形腫を形成する可能性がある。

c) 組織幹細胞

組織幹細胞は、発生期以降も体内に残る幹細胞を指す。例として、神経系における神経幹細胞が挙げられる。神経幹細胞は、神経細胞、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの3種類に分化可能な細胞である。ヒトの成体脳における神経幹細胞は、Eriksson らによって海馬において初めて存在が実証された [Eriksson 1998]。組織幹細胞は、分化する細胞種が限られているため、多能性幹細胞のように移植後に腫瘍を形成するリスクが少ない。また、移植すれば障害が起きた場所まで移動する能力を持つため、扱いが容易である点も重要である。しかし、重要な課題として、患者より採取する際に侵襲性が高いことが挙げられる。また、患者以外から採取する場合は、ES 細胞の場合と同様に免疫系による拒絶反応の問題が存在する。さらに、多能性幹細胞と比較して増殖能が低いことから、十分な数まで増殖させるためには長い時間を要することも問題とされている。

1-2-2 神経発生と多能性幹細胞の分化誘導の関係

本項では、多能性幹細胞が神経分化する過程について概説する。一般に、多能性幹細胞の神経分化方法は、胚発生を模擬することによって開発される。そこで、最初に神経発生、なかでも本研究で扱う大脳皮質神経細胞の発生過程について述べる。次に、多能性幹細胞の神経分化誘導について、大脳皮質神経細胞への分化誘導を例に説明する。

a) 神経発生

胚発生において原腸形成期に三胚葉が形成されるが、外胚葉においてはオーガナイザー部から放出される *noggin* や *chordin* が骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein; BMP) 4 阻害因子として働き、神経誘導が起こる [宮田 2013]。図 1-2 に前後軸および背腹軸の決定に寄与する因子の勾配を示す。神経誘導により形成された神経板において、周囲の誘導因子の濃度に従って前後軸が決定される。尾側になる領域には、*Wnt*、*FGF* およびレチノイン酸 (retinoic acid; RA) が発現し、分化方向を尾側に誘導する [Gaspard 2010]。反対に、吻側領域には *Wnt* 阻害因子である *Dickkopf* (*Dkk*) が発現し、分化方向の尾側化を抑制する。また、同時期に最も腹側の領域にある底板から *sonic hedgehog* (*Shh*) が放出され腹側から背側にかけて濃度勾配が形成される。また、背側から腹側にかけては *Wnt* および BMP の濃度勾配が形成される。以上の相補的な濃度勾配により、背腹軸が決定される。その後、神経板が湾曲し神経管が形成される時期に、神経管の前方に前脳胞が形成される。前脳胞は、終脳胞および間脳胞へと変化する。終脳胞からは大脳が形成され、間脳胞からは視床や視床下部などが形成される。

大脳皮質の特徴である 6 層構造は、神経細胞が産生される時期において、産生された神経細胞が *inside-out* と呼ばれる様式で配置されることで形成される [Cooper 2008]。以下に、大脳皮質で産生された神経細胞が移動する様式について概説する。図 1-3 に、産生された神経細胞が配置される順序を示す。大脳皮質の発生初期には、脳室帯 (ventricular zone; VZ) と呼ばれる領域に神経幹細胞が多く存在する。神経幹細胞は放射状グリアとも呼ばれ、脳表面に向かう長い突起と脳室帯に接触する短い突起を有することが特徴である。最初に神経幹細胞より分化した神経細胞は、プレプレートと呼ばれる層を形成する。続いて生まれた神経細胞は、神経幹細胞の突起に沿って脳表面方向に移動し、プレプレートを 2 つに分割する位置で移動を終え、第 6 層を形成する。以降、二分されたプレプレートのうち、脳表面側は辺縁帯と呼ばれ、脳の深層側はサブプレート (sub-plate; SP) と呼ばれる。辺縁帯には、Cajal-Retzius (CR) 細胞と呼ばれる細胞が多く存在する。CR 細胞は、層形成において重要な *Reelin* と呼ばれる因子を放出する。その後に産生された神経細胞は、神経幹細胞の突起に沿って脳表面方向に移動し、第 6 層の神経細胞と辺縁帯の間で移動を終え、第 5 層を形成する。同様にして、大脳皮質の層構造は、第 1 層を除いて内側から外側に向かって形成される。層形成が終わった後に、辺縁帯は第 1 層になり、SP は消滅する。また、大脳皮

質の γ -アミノ酪酸 (γ -Aminobutyric acid; GABA) 作動性神経細胞の多くは、終脳腹側で産生され、脳表面に対して接線方向に移動し、大脳皮質の神経回路を形成する。

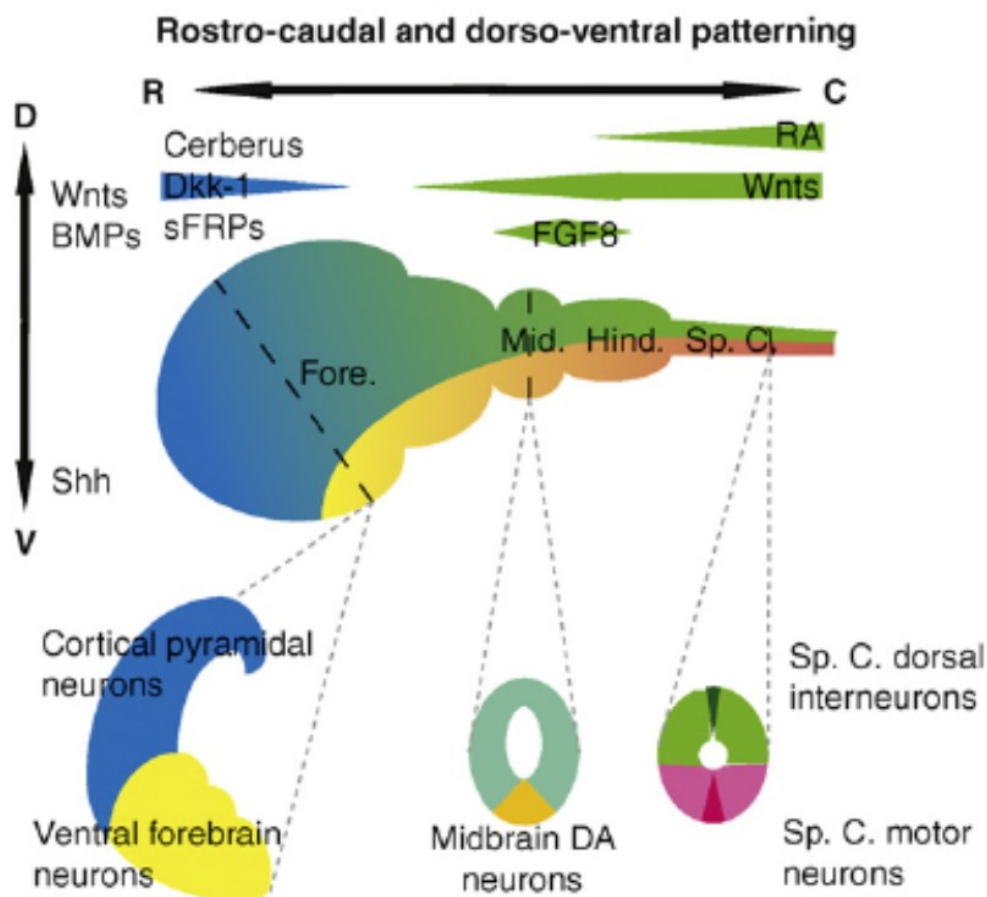


図 1-2 神経発生における誘導因子の濃度勾配 [Gaspard 2010 改変]. 背側 (dorsal; D) および腹側 (ventral; V) の細胞は、それぞれ Wnt と BMP, および Shh によって誘導される. 一方、吻側 (rostral; R) および尾側 (caudal; C) の細胞は、それぞれ Dkk-1, およびレチノイン酸 (retinoic acid; RA) と Wnt によって誘導される. 神経管の最も吻側は前脳 (forebrain; Fore.), 尾側は脊髄 (spinal cord; Sp. C.) を形成する. また、FGF8 の濃度が高い領域が境界となり、中脳 (midbrain; Mid.) および後脳 (hind brain; Hind.) が形成される. 大脳皮質の錐体細胞 (cortical pyramidal neuron) は背側前脳の細胞である.

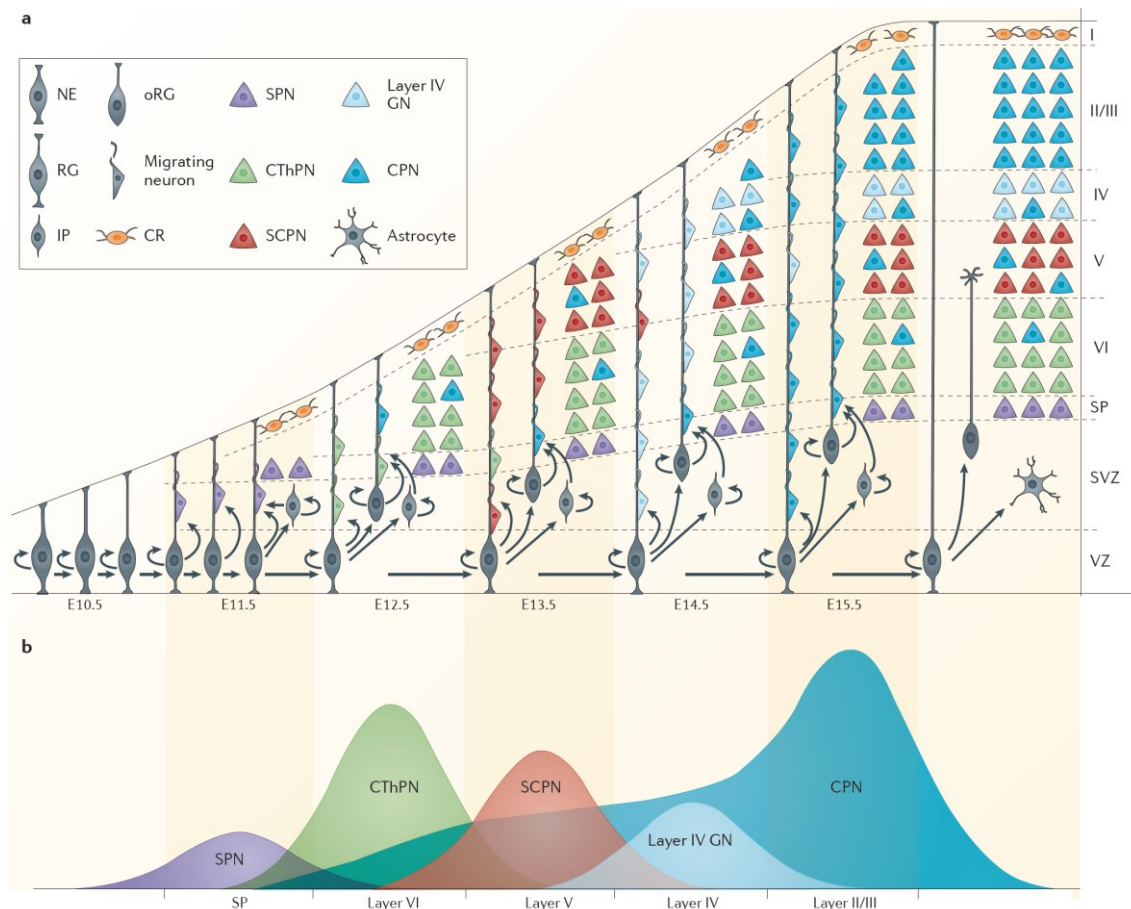


図 1-3 大脳皮質の 6 層構造の形成過程 [Greig 2013]. a: 神経新生のタイムコース. マウスでは, 胎齢 11.5 日 (embryonic day 11.5; E11.5) までに脳室帯 (ventricular zone; VZ) に存在する神経上皮細胞 (neuroepithelial cell; NE) が放射状グリア (radial glia; RG) に分化し, RG から神経細胞が産生され始める. また, 同時期に脳室下帯 (sub-ventricular zone; SVZ) を形成する intermediate progenitor (IP) および outer RG (oRG) の新生が始まる. 最初にサブプレート (sub-plate; SP) の神経細胞, および Cajal-Retzius (CR) 細胞を含む辺縁帯の細胞が産生される. 続いて, 第 6 層 (layer VI) を形成する corticothalamic projection neuron (CThPN) が産生される. 次に, 第 5 層 (layer V) を形成する subcerebral projection neurons (SCP) が産生される. さらに, 第 4 層 (layer IV) および第 2/3 層 (layer II/III) を形成する, それぞれ layer IV granular neuron (GN) および callosal projection neuron (CPN) の新生が起こる. 辺縁帯の細胞は, 第 1 層 (layer I) を形成する.

b: 形成される神経細胞の種類と細胞数. それぞれのピークの高さは形成される神経細胞の数を表す.

b) 多能性幹細胞からの神経分化誘導

多能性幹細胞を特定の種類の神経細胞へ分化誘導する場合、神経外胚葉への分化誘導、前後軸の決定、および背腹軸の決定の3つのステップが必要となる。以下に、それぞれのステップについて説明する。

1つ目のステップは、神経外胚葉への分化誘導である。胚発生の過程において、外胚葉はBMP4により皮膚へと分化誘導される。一方、BMP4が阻害された場合、つまり外部からの因子が働かない場合は、神経系細胞へと分化する [宮田 2013]。生体外 (*in vitro*) の研究においても、外部からの因子がない場合、多能性幹細胞は前脳の神経系の細胞に分化することがわかっている [Gaspard 2008]。ヒト多能性幹細胞からの神経分化誘導を行った先行研究では、浮遊培養環境での胚様体形成 [Maroof 2013] や接着培養 [Shi 2012b] が用いられているが、いずれも上記の発生過程を模擬することにより行われる。図 1-4 に、神経発生と多能性幹細胞からの神経分化誘導の関係を示す。多能性幹細胞の神経分化誘導は、外部因子を添加しない条件、もしくは BMP, Activin/Nodal, トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor; TGF) β および Wnt のうちの1つもしくは複数のシグナル経路を阻害することで行われる [Chambers 2009]。Activin/Nodal が中内胚葉、BMP が栄養外胚葉や神経系以外の外胚葉への誘導剤となるため [Chambers 2009]、それぞれの経路への分化を阻害している。

2つ目のステップは、前後軸の決定である。前後軸は、Wnt や RA の濃度勾配によって決定される。大脳皮質は神経管の最も吻側から形成されるため、因子を添加しない条件 [Shi 2012a, b]、もしくは尾側への誘導因子の阻害剤を用いて分化誘導される [Maroof 2013]。

3つ目のステップは、背腹軸の決定である。神経発生において大脳皮質のグルタミン酸作動性神経細胞は背側から、GABA 作動性神経細胞は腹側から産生される [Maroof 2010; Maroof 2013]。また、神経発生と同様に、背腹軸は Wnt と Shh の相補的な濃度勾配により決定される。そこで、多能性幹細胞からの神経分化誘導でも、Wnt や Shh といったシグナルの調節により背腹軸の制御を行う [Li 2009]。マウスの場合、内在性の Shh 活性が高いことから、誘導因子を添加しない条件で GABA 作動性神経細胞に多く分化することが知られている [Gaspard 2008]。一方、ヒトの場合はマウスほど内在性 Shh 活性が高くなく、誘導因子を添加しない条件で背側のグルタミン酸作動性神経細胞へと分化する [Li 2009]。

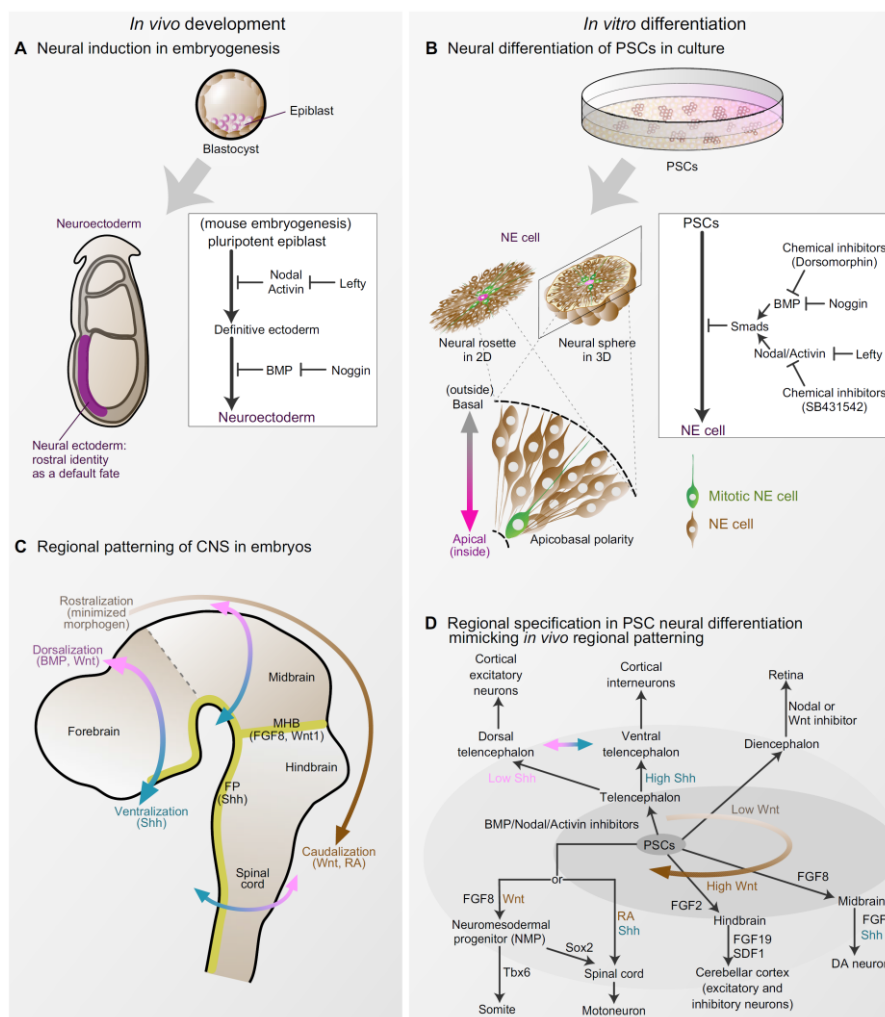


図 1-4 神経発生と多能性幹細胞からの分化誘導の関係 [Suzuki 2015]. A: 胚発生における神経系細胞への分化. Lefty および noggin により, それぞれ Nodal/Activin および BMP シグナルが阻害され, 神経外胚葉 (neuroectoderm) が誘導される. B: 培養系での神経分化. 多能性幹細胞 (pluripotent stem cell; PSC) の培養液に, lefty および noggin, もしくは同様の働きを有する小分子化合物を添加し, 神経上皮細胞 (neuroepithelial cells; NE cell) を分化誘導する. C: 神経発生における特定の細胞種への分化. BMP および Wnt は, 背側化 (dorsalization) を誘導する. 一方, floor plate (FP) の細胞から放出される Shh は, 腹側化 (ventralization) を誘導する. また, Wnt もしくは RA の濃度が高い領域では, 尾側化 (caudalization) が誘導される. 上記の因子が存在しない領域 (minimized morphogen) では, 吻側化 (rostralization) が進む. FGF8 の濃度が高い場所に, midbrain-hindbrain boundary (MHB) と呼ばれる中脳と後脳の境界が形成される. D: 培養系における特定の細胞種への分化誘導. 神経発生を模擬したシグナルを作用させることにより, 特定の領域に存在する神経系細胞へと分化誘導する. Shh の濃度により背腹軸を決定する (青色および赤色の矢印). また, Wnt シグナルにより前後軸を決定する (茶色の矢印).

1-2-3 再生医療における治療のステップと課題

本項では、iPS 細胞を利用した再生医療が実現した際の、治療の流れについて述べる。治療は、図 1-5 に示すように、iPS 細胞の樹立・収集、分化誘導、機能評価、および移植の 4 つのステップから構成される。以下に、それぞれのステップについて、概要、関連する研究、および課題を述べる。

a) iPS 細胞の樹立と収集

最初のステップは、iPS 細胞の樹立と収集である。本ステップでは、転写因子により体細胞を初期化し iPS 細胞を樹立する。その後、樹立した iPS 細胞を凍結保存し、収集する。本ステップで重要な点は、移植に適用できる品質の iPS 細胞の樹立と、適用範囲が広い iPS 細胞の収集である。1 点目の、移植に適用できる品質の iPS 細胞の樹立については、ウイルスの遺伝子の組み込みや初期化による遺伝子変異を防ぐために、プラスミドベクターを用いた手法 [Okita 2008] や小分子化合物のみを用いた手法 [Hou 2013] が開発された。

2 点目の iPS 細胞の収集については、iPS 細胞バンクを作るためのプロジェクトが進行中である。当初、免疫系による拒絶反応を避けるために、患者由来の iPS 細胞を用いることが期待されていた。しかし、iPS 細胞は樹立するまでに数週間を要するため、進行性の疾患や外傷といった治療に急を要する疾患には、自己 iPS 細胞は利用できない。そこで、あらかじめ iPS 細胞を樹立し凍結保存しておき、治療に必要となった際に解凍して利用できるように、iPS 細胞バンクプロジェクトが進められている [Turner 2013]。特に、免疫型の違いによる拒絶反応の問題を解決するために、多くの患者に適合する可能性が高い免疫型を有する人から細胞を収集し、iPS 細胞が樹立されている。移植における免疫拒絶反応の程度は、ヒト白血球型抗原 (human leukocyte antigen; HLA) と呼ばれる型によって決定される。HLA が、父親もしくは母親由来の型の一方とでも一致していれば、拒絶反応は軽減される。また、一定の確率で、HLA の遺伝子座がホモタイプである場合が存在する。HLA がホモタイプのヒトから樹立した iPS 細胞を用いることで、片方が一致した患者に対する移植が比較的軽度の拒絶反応のみで可能となる。Nakajima らは、75 種類の HLA がホモタイプの ES 細胞を貯蔵できれば、日本の人口の 80% に対しての移植が可能であることを報告した [Nakajima 2007]。iPS 細胞においても同様であり、Okita らは HLA がホモタイプの iPS 細胞を 2 株樹立している [Okita 2011]。

b) 分化誘導

2 つ目のステップは、iPS 細胞の分化誘導である。移植に用いるためには、高品質な細胞が必要であり、特定の細胞種への精密な分化誘導法が研究されている。特に、医療用途であるため、目的とした種類の細胞への分化効率が低いことに加えて、未分化細胞が混入していないことが必要である。現在の分化誘導手法として、浮遊培養による胚様体 (embryoid

body; EB) の形成および培養液への誘導因子の添加が挙げられる。発生の過程を模擬することにより、大脳皮質の興奮性神経細胞 [Shi 2012b] と抑制性神経細胞 [Maroof 2013]、海馬の神経細胞 [Yu 2014]、脊髄の運動神経細胞 [Hu 2009] および中脳のドーパミン作動性神経細胞 [Perrier 2004] といった様々な細胞種への分化誘導法が開発された。iPS 細胞には株による分化効率の違いがあるため [Hu 2010b]、移植可能な品質での分化誘導には、株ごとの分化誘導条件の最適化が必要である。分化誘導条件の最適化にあたって、神経分化過程には複数の **critical period** が存在するため [Lupo 2014]、誘導因子の添加を特定の時間窓で行うことが重要である。しかし、現存の手法である培養液への誘導因子の添加を、精密に制御された時間窓で行うことは困難である。また、複数の条件を網羅的に行うためには多大なコストがかかるため、医療応用を考えた場合、現実的ではない。そこで、制御性に優れ、一度に多くの条件検討が可能な分化誘導手法の開発が重要である。

c) 機能評価

3 つ目のステップは、機能評価である。移植細胞は、細胞種の確認のためのタンパク質や遺伝子発現の評価に加えて、移植後に果たすべき機能についても評価される必要がある。最初に臨床研究において行われた機能評価の例について述べ、次に中枢神経細胞の機能評価における課題について述べる。2014 年から始まった臨床研究において、移植に用いられたヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮 (**retinal pigment epithelium; RPE**) 細胞は、質、量、安全性および安定性の観点から、タンパク質発現、遺伝子型、および細胞の機能について評価された [滲出型加齢黄斑変性の臨床研究; Kamao 2014]。RPE 細胞の機能評価においては、タイトジャンクションの形成、色素上皮由来因子や血管内皮細胞増殖因子といった成長因子の放出、および食作用が重視された。

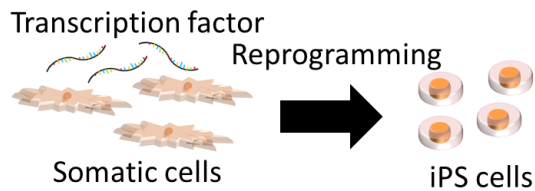
中枢神経系において移植した神経細胞が獲得すべき機能は、周囲の神経細胞と協調動作し、脳の機能を維持することである。現在、多能性幹細胞由来神経細胞 (**pluripotent stem cell-derived neuron; PSC-neuron**) の機能評価には、パッチクランプ法を用いた電気生理学的手法や、免疫組織化学染色法を用いた分子生物学的手法が広く用いられている。しかし、パッチクランプ法については細胞への侵襲性の高さから、免疫組織化学染色法については細胞に対する化学的な固定の必要性から、長期間の連続的な評価は困難である。PSC-neuron は成熟に長い時間を要することが知られており [Shi 2012b]、従来の手法を用いた場合、成熟過程の各段階において機能評価するためには多くの試料が必要とされる。また、緑色蛍光タンパク質 (**green fluorescent protein; GFP**) を用いることで、固定せずに特定のタンパク質の発現を評価できるが、遺伝子導入を行う必要があり、移植用途の細胞に適用することは望ましくない。さらに、周囲の神経細胞との協調動作という観点からは、これまで行われてきた分子レベルでの評価に加えて、神経回路網レベルでの機能評価も行う必要がある。以上より、分子レベルおよび神経回路網レベルの両方において、長期間にわたる機能評価を行うための手法の開発が重要である。

d) 移植

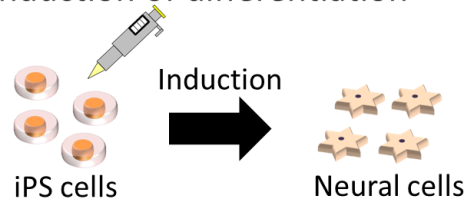
4つ目のステップは、移植である。重要な点として、時期、部位、方法、細胞数、および補助的な治療が挙げられる。最初に、臨床応用が進んだ例について述べ、次に補助的な治療の必要性和課題について述べる。ヒト ES 細胞由来オリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell; OPC) を用いた治験では、亜急性期の脊髄損傷を対象として、損傷部位に対して単一細胞に分散した状態で、 2.0×10^6 個の OPC が移植された [ClinicalTrial.gov NCT01217008]。OPC の治験は安全性の評価が主目的とされるフェーズ I の段階であったため、移植細胞数が 2.0×10^6 であったが、実際の治療時にはより多数の細胞が移植されると考えられる。また、前述のヒト iPS 細胞由来 RPE 細胞移植の例では、患者の網膜色素上皮組織を除去した後に、細胞シートの状態で RPE 細胞が移植された [滲出型加齢黄斑変性の臨床研究]。以上のように、移植細胞に関してのみを考慮した場合でも、細胞数、移植方法、および細胞の形態など最適化すべきパラメータが多く存在する。

さらに、治療効率を向上させる目的で、細胞を患部に移植することに加えて補助的な治療を行うことが有効であると考えられている。マウス脊髄の損傷部位に神経幹細胞を移植した研究からは、脊髄損傷直後の急性期においては、損傷部位の周囲から放出される炎症性サイトカインにより、神経幹細胞の分化方向がアストロサイトに傾くことが報告されている [Okada 2005]。移植細胞がアストロサイトに分化すると、神経細胞を補填する目的で神経幹細胞を移植したとしても、効果は期待できない。しかし、Abematsu らは、神経幹細胞の移植と同時にバルプロ酸という物質を損傷部位に投与することで、神経幹細胞の神経細胞への分化を促進できることを報告した [Abematsu 2010]。以上のように、移植先の環境は、通常の *in vitro* での分化誘導とは異なることが想定され、細胞の移植と同時に薬剤等による補助が必要となることが考えられる。また、移植した神経幹細胞が神経細胞に分化したとしても、移植細胞がホスト回路網に結合したことにより、ホスト回路網の活動を変化させ、機能の面で予期しない結果を導く可能性がある。したがって、想定される環境を実現した上で、神経細胞の活動を指標として移植細胞とホスト細胞の関係を評価することが重要であると考えられる。しかし、実験動物の生体内 (*in vivo*) では、移植細胞とホスト回路網を区別しながら長期的に活動を評価することは困難である。

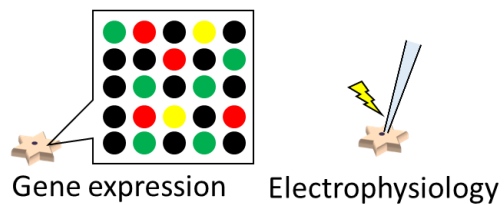
1. Generation of iPS cells



2. Induction of differentiation



3. Functional evaluation



4. Transplantation

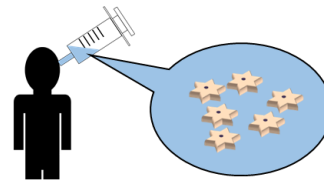


図 1-5 再生医療における治療のステップ. 1 つ目のステップでは, 転写因子 (transcription factor) を用いて体細胞 (somatic cell) を iPS 細胞に初期化 (reprogramming) する. 2 つ目のステップでは, iPS 細胞を神経系細胞 (neural cell) に分化誘導 (induction) する. 3 つ目のステップでは, 分化誘導した細胞を, 分子生物学的手法や電気生理学的手法を用いて機能評価する. 4 つ目のステップでは, iPS 細胞から分化誘導した細胞を患部に移植する.

1-2-4 課題解決に向けた工学技術の応用の可能性

工学技術を応用し、生物・医療分野の課題を解決した例が報告されている。本項では、最初に、微小電極アレイ (microelectrode array; MEA) およびマイクロ構造物についての背景を述べる。続いて、前述の課題と対応させながら、工学技術の応用が神経再生医療の実現に向けた課題を解決できる可能性とシステムの要求仕様について述べる。

現在まで、神経回路網の活動を計測する目的で MEA が広く用いられている。MEA は、培養皿の底面に複数の電極を集積化した計測デバイスであり、細胞を培養した状態で複数の電極から細胞外電位を計測可能である。神経細胞を対象とした研究としては、カタツムリの脳の神経節細胞を対象として MEA による活動計測を行った例が最初の報告である [Gross 1979]。ラットの神経細胞に対しては、1980 年の Pine による報告が初めてである [Pine 1980]。以来、MEA を用いた神経回路網レベルでの機能評価は、マウスやラットから採取した神経細胞を対象として行われている [Kamioka 1996; Mukai 2003]。PSC-neuron を対象とした研究としては、マウス ES 細胞由来の神経細胞 [Ban 2007] や、ヒト iPS 細胞由来神経細胞 [Odawara 2014] の活動を計測した例が報告されている。また、複数の電極から活動が計測できるという利点を活かし、神経回路網レベルでの活動評価が行われている。先行研究からは、同期バーストと呼ばれる神経回路網全体が同期して高頻度の発火を示す現象が報告されている [Kamioka 1996]。複数の神経細胞の同期活動は脳機能の基盤であるため、MEA は神経回路網の機能評価という点で適した計測デバイスであると考えられる。実際に、神経回路網レベルでのシナプス可塑性 [Jimbo 1999]、情報処理 [Bonifazi 2005]、およびパターン認識 [Ruaro 2005] などを対象とした研究が行われている。さらに、近年、高密度に電極を配置した MEA を用いた研究も行われている [Ito 2014]。

細胞の形態を制御する目的で、立体的な構造物が用いられている。初期の研究として、培養チャンバを用いて、神経突起に対する nerve growth factor の影響を評価した例が挙げられる (図 1-6) [Campenot 1977]。細胞体と軸索を分離するための構造物は、開発した研究者の名前から Campenot チャンバと呼ばれることがある。Taylor らは、シリコンゴムの原料であるポリジメチルシロキサン (polydimethylsiloxane; PDMS) で作製した培養チャンバを用いて、微小トンネル内に伸長した軸索における messenger ribonucleic acid (mRNA) の局在を示した (図 1-7) [Taylor 2005]。Taylor らの報告以来、PDMS を用いて作製した微小トンネルは、シナプスに対する薬理刺激 [Taylor 2010]、および軸索の損傷についての研究 [Habibey 2015] など、軸索を対象とした研究に広く用いられている。また、複数の培養区画を微小トンネルで繋ぐことにより、複数の種類の神経細胞を、それぞれ別の培養区画内で培養可能である。上記の利点を活かし、PSC-neuron のモデル細胞と生体由来の神経細胞 [Takayama 2012]、神経細胞とグリア細胞 [Park 2009]、海馬の歯状回と CA1 の神経細胞 [Brewer 2013]、および大脳皮質と視床の神経細胞 [Kanagasabapathi 2011] などにおいて、細胞間の相互作用が評価されている。さらに、近年、微小トンネル内に電極を配置することにより、軸索を伝導する活動が計測可能であることが報告された [Dworak 2009]。

a) 制御性に優れ、複数の条件検討が容易な分化誘導手法の開発

制御性に優れ、一度に複数の条件を検討可能な分化誘導手法が必要であることを述べた。制御性については、従来手法とは異なる種類の刺激を用いることで解決可能である。電気刺激や磁気刺激といった物理的刺激は、制御性に優れており、精密な時間窓で刺激を印加可能である。先行研究では、物理的刺激により培養神経回路網の形状 [Jun 2007]、自発活動 [Goel 2013]、および遺伝子発現 [Stock 2012] といった特性を制御できることが報告されている。さらに、物理的刺激がヒト ES 細胞の骨分化を誘導することや [Woo 2009]、マウス ES 細胞の分化運命の決定に影響を与えること [Yamada 2007] も報告されており、細胞分化の制御においても有効であると考えられる。物理的刺激はさらに、刺激回路の工夫により、同時に複数の条件を検討可能である。したがって、物理的刺激を用いることで、新たな分化誘導手法が開発できると考えられる。

以上から、制御性に優れ、複数の条件検討が容易な分化誘導を実現するためのシステムに求められる要求仕様は、制御性の高い刺激が可能であること、刺激の短期的および長期的な応答を評価できること、および培養細胞に悪影響を与えないことの 3 点であると考えられる。

b) PSC-neuron の発達過程における、神経回路網レベルでの機能評価手法の開発

PSC-neuron の機能を、神経回路網レベルで長期間評価できる手法が必要であることを述べた。MEA を用いることで、PSC-neuron の神経回路網レベルでの活動を評価できる。また、長期間の評価においては、幹細胞および前駆細胞の増殖や、培養表面と細胞の接着性の変化により、神経回路網の構造が変化する可能性がある。PSC-neuron のモデル細胞を用いた研究からは、長期培養により細胞が凝集することが報告されている [Takayama 2011]。従来の MEA では、神経回路網の構造変化により信号源である細胞と電極の距離が変化し、計測結果に影響を与える可能性がある。そこで、マイクロ加工技術を用いて信号源を電極上に固定することで、長期間にわたって、より安定した活動計測が可能になると考えられる。

以上から、発達過程における神経回路網レベルでの機能評価を実現するための要求仕様は、多点の同時計測が可能であること、および長期間にわたり安定して計測できることの 2 点であると考えられる。

c) PSC-neuron の機能発現を長期的に評価できる手法の開発

移植に向けた PSC-neuron の機能評価には、遺伝子改変手法を用いずに、分子レベルで長期間評価する手法が必要であることを述べた。前述の通り、微小トンネル内に電極を配置することにより、神経細胞の軸索を伝導する活動を計測できる。同一の軸索を伝導する活動を、2 点の電極から計測することで、伝導速度を計算することが可能である。微小トンネル内には、通常は細胞体が進入しないことが報告されている [Taylor 2005]。したがって、微

小トンネル内における電極から計測されたシグナルの信号源は、オリゴデンドロサイトが髄鞘を形成していない状態の軸索（無髄線維）であると考えられる。無髄線維における伝導速度は、軸索の直径やイオンチャネルの密度といった特性に依存するため、伝導速度の評価により分子レベルでの機能発現を評価できる可能性がある。以上から、MEA およびマイクロ加工技術の利用により、PSC-neuron の機能を、分子レベルで長期間にわたり評価するための手法が開発できると考えられる。

以上から、分子レベルでの長期評価が可能なシステムの要求仕様は、タンパク質の発現が反映された情報を計測できること、長期間にわたり安定して計測できること、および遺伝子改変を行う必要がないことの3点であると考えられる。

d) 神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築

移植において想定される環境を模擬した上で、移植細胞とホスト細胞の結合過程を評価するための実験系が必要であることを述べた。実験動物を用いた方法では、移植細胞とホスト細胞の長期的な計測は困難であるが、マイクロ加工技術により実現できる。移植細胞とホスト細胞を独立した区画で培養するためには、Takayama らと同様の手法を用いて PSC-neuron と初代培養神経細胞の共培養を行うことで [Takayama 2012]、神経系細胞の移植を模擬できると考えられる。さらに、微小トンネル内に配置した電極から活動計測を行い、微小トンネルを通過した軸索の本数を数えることで、結合過程を定量的に評価できる。

以上から、神経系細胞の移植を模擬した実験系の要求仕様は、結合過程を定量的に評価できること、移植細胞とホスト細胞の活動を区別して計測できること、および長期的に計測できることの3点であると考えられる。

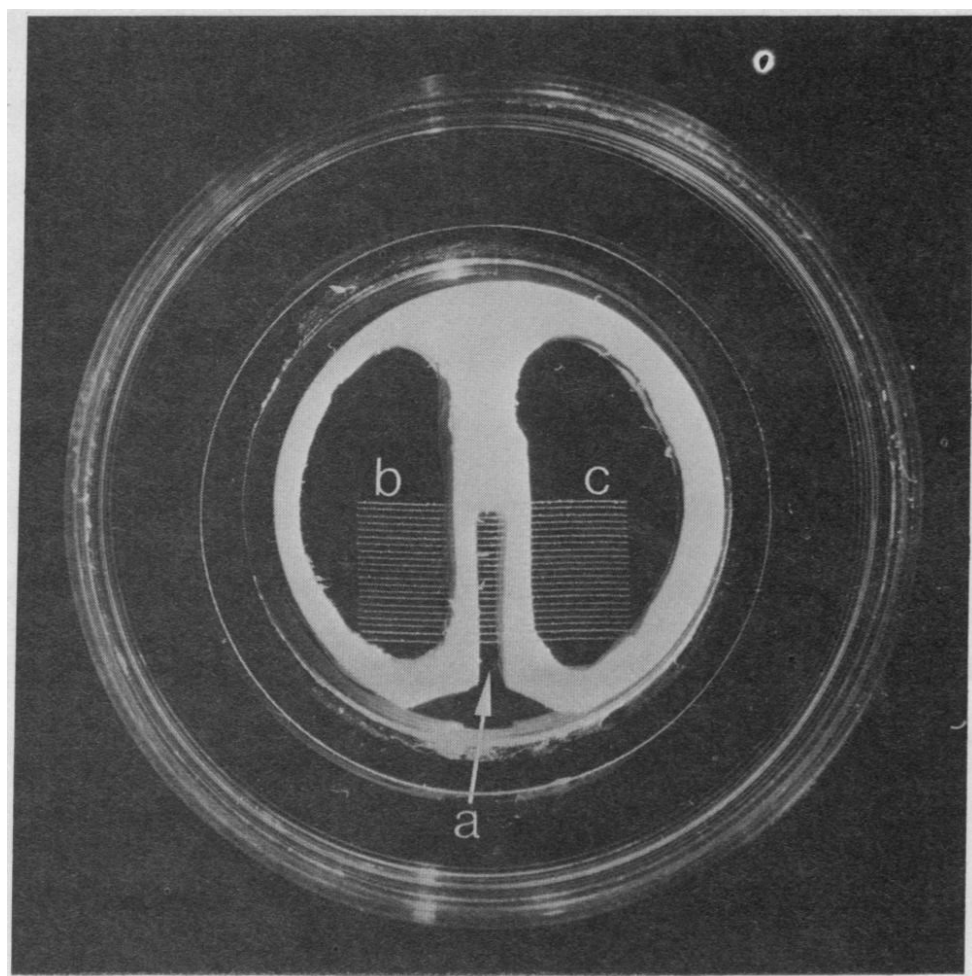


図 1-6 Campenot チャンバ [Campenot 1977]. 培養皿の底面に水平方向の溝が形成してあり，テフロン製の構造物により培養区画が 3 つに区分されている．区画 a に播種された神経細胞の軸索は，溝と構造物の隙間を通り，区画 b および区画 c に伸長できる．区画 b のみに **nerve growth factor** を添加した際の，区画 b と区画 c における軸索の形態の違いが評価された．

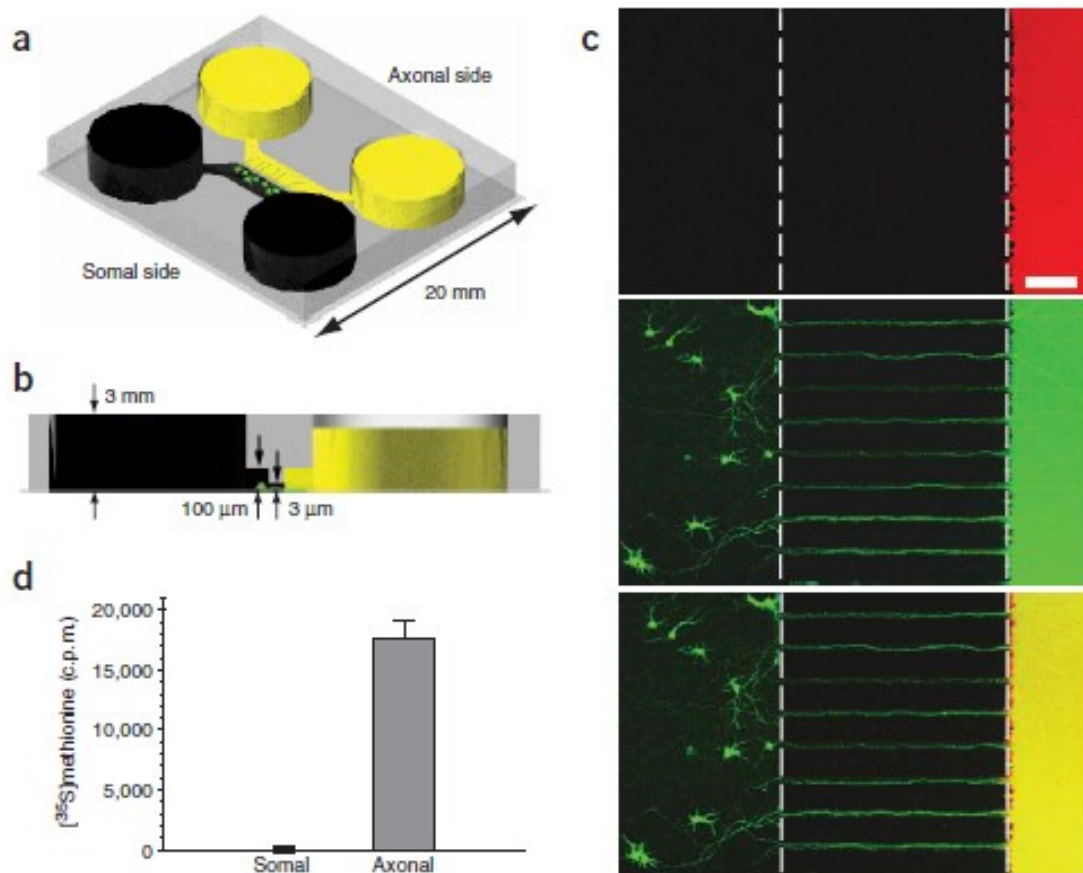


図 1-7 Taylor らのチャンバ [Taylor 2005]. (a) 模式図. 神経細胞を細胞体側 (somal side) に播種し, 軸索側 (axonal side) における軸索の様子を観察できる. (b) 断面図. 微小トンネルの高さは $3\ \mu\text{m}$ であり, 神経細胞の細胞体は進入できないが, 軸索は伸長可能である. (c) 色素を用いたチャンバの評価. 赤色の色素により, 軸索側と細胞体側の環境が分離できたことが確認された (top panel). 緑色の色素を軸索側から, 軸索に取り込ませ, 細胞体を逆行的に染色した (middle panel). Top panel と middle panel の合成画像 (bottom panel). (d) 軸索を ^{35}S で標識した結果. 軸索側のみから高い信号が検出された.

1-3 本研究の目的

前節までで、神経再生医療の実現には、分化誘導方法、回路網レベルの機能評価、細胞内における機能発現の評価、および移植細胞とホスト細胞の結合過程評価において、課題があることを述べた。その後、課題解決には、工学的アプローチが有効である可能性を示し、各課題についてシステムの要求仕様を述べた。以上を踏まえ、本研究では、神経再生医療の実現に向けて、幹細胞から神経系細胞までの分化過程、神経系細胞の発達過程、および幹細胞由来の神経組織とホスト組織の統合過程について、工学的アプローチから評価および制御を行う技術を提供することを目的とした。目的達成に向けて、以下の4点を検討した。

1) ヒト iPS 細胞における Ca 変動の可視化と電気刺激が分化方向に与える影響の評価

物理的刺激による分化誘導を実現するために、刺激で直接的に制御する対象の候補である細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の評価、および電気刺激が分化方向に与える影響の評価を行う。最初に、未分化状態および神経分化過程のヒト iPS 細胞から $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を計測する。次に、未分化状態のヒト iPS 細胞における $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と細胞周期の関係を評価する。最後に、未分化状態のヒト iPS 細胞に対して電気刺激を印加し、刺激による Ca 変動、および分化方向への影響を評価する。

2) 発達段階に依存したヒト iPS 細胞由来神経細胞の活動パターンの評価

ヒト iPS 細胞から分化誘導した大脳皮質神経細胞を MEA 上で培養し、自発活動を指標として発達過程を評価する。また、マイクロ加工技術を用いることで、多くの電極から安定して活動を計測可能であることを示す。

3) 活動パターンに依存した神経細胞内信号伝播の変化の評価

生体由来の神経細胞の軸索では、自発活動に応じて伝導速度が変化することを示す。また、軸索に対して様々な頻度で電気刺激を印加することで、伝導速度が刺激の頻度依存性を有することを示す。さらに、自発的な伝導速度の変化と刺激によって誘発された変化を比較し、発達に伴い伝導速度の変化率が変化することを示す。最後に、同様の手法をヒト iPS 細胞由来神経細胞に適用し、軸索からの活動計測が細胞の機能発現を評価するための手法として応用できるかを考察する。

4) PSC-neuron - 初代培養神経細胞の結合形成に伴う同期活動変化の評価

マイクロ加工技術を用いて作製したデバイスを用いて、PSC-neuron と初代培養神経細胞の機能的結合の形成過程を評価する。最初に、PSC-neuron のモデル細胞として、P19 細胞由来の神経細胞を用いて、手法の有効性を評価する。次に、マウス iPS 細胞より分化誘導した神経細胞と、初代培養神経細胞をデバイス内で共培養し、両者の間に信号の伝播が観測されることを示す。

1-4 本論文の構成

本論文は、全 6 章から構成される。第 2 章から第 5 章の内容を表 1-1 にまとめる。

第 1 章では、最初に、幹細胞の基本的な性質、神経発生と分化誘導の関係、および再生医療における治療のステップと実現に向けた課題について概説した。さらに、課題解決に対する工学的アプローチの有効性および開発するシステムの要求仕様をまとめた。以上の背景を基に、本論文の目的を述べた後、本論文の構成について述べた。

第 2 章では、ヒト iPS 細胞の神経分化過程における $[Ca^{2+}]_i$ の変動と、電気刺激が分化方向に与える影響を評価した結果について述べる。最初に、タンパク質と mRNA の発現量を評価し、大脳皮質背側への神経分化が起こることを示す。次に、分化過程において Ca imaging を行い、分化途中の段階において Ca 変動を観測する。続いて、未分化のヒト iPS 細胞において、Ca 変動の頻度と細胞周期の関係を評価する。最後に、未分化状態のヒト iPS 細胞に対して電気刺激を印加し、分化方向の変化を mRNA の発現量から評価する。

第 3 章では、ヒト iPS 細胞由来の大脳皮質神経細胞の発達過程における活動の変化を評価する。従来の MEA および微小トンネルを有する計測デバイスを用いて、神経回路網レベルの活動である同期バーストの、発達に伴う変化を評価する。

第 4 章では、神経回路網の活動パターンに依存した細胞内信号伝播の変化について評価する。最初に、マウス大脳皮質神経細胞 (cortical neuron; CX) の自発活動を計測し、高頻度の発火であるバースト活動に伴う、軸索を伝導する活動の伝導速度の変化を評価する。次に、ラット CX の軸索に対して電気刺激を印加し、刺激頻度に依存した伝導速度の低下を計測する。さらに、自発的な伝導時間変化と、刺激によって誘発された変化を比較し、発達に伴う伝導時間変化率の変化を評価する。最後に、ヒト iPS 細胞由来 CX の自発活動から、マウス CX と同様にバースト活動に応じた伝導速度の低下が起こることを示す。

第 5 章では、分化誘導神経細胞と初代培養神経細胞の結合過程を評価する。最初に、マウス CX と P19 細胞由来の神経細胞を共培養し、微小トンネルから軸索を伝導する活動を検出することで、両者の結合過程を評価する。次に、マウス CX とマウス iPS 細胞由来神経細胞 (mouse induced pluripotent stem cell-derived neuron; miPS-neuron) を共培養し、形態および自発活動を評価する。

第 6 章では、本研究において得られた知見をまとめる。さらに、今後検討すべき課題についてもまとめる。

表 1-1 本論文の構成

	第2章	第3章	第4章	第5章
ステップ	分化誘導	機能評価		移植
課題	高い制御性 ハイスループット	回路網レベル	分子レベル	移植を模擬した系 相互作用を評価
要求仕様	刺激を印加可能 応答が評価可能 細胞への適合性	発達過程 神経回路網 多点計測 長期の安定性	発達過程 分子レベル 発現を反映した情報 長期の安定性 遺伝子変化が不要	評価の定量性 異種の細胞を区別 長期計測
検討項目	細胞内Ca ²⁺ の計測 電気刺激の影響	成熟過程の評価 デバイスの安定性	軸索の伝導時間 ヒトiPS細胞に応用	共培養系の評価 miPS細胞に応用

第 2 章

物理的刺激を用いたヒト iPS 細胞の 分化誘導手法の開発

2-1 緒言

本章では、物理的刺激を用いてヒト多能性幹細胞を高効率で神経系細胞に分化誘導する手法の構築を目指す。1章で述べた通り、本手法の要求仕様は、制御性の高い刺激が可能であること、刺激の短期的および長期的な応答を評価できること、および培養細胞に対する毒性が低いことの3点である。以下に、それぞれの要求仕様を満たすための方法と、ヒト iPS 細胞において Ca 変動を評価する必要性、および本章の目的を述べる。

1点目の制御性の高い刺激方法については、電気刺激を用いることが有効であると考えられる。マウス ES 細胞の EB に電気刺激を印加すると、 Ca^{2+} が細胞内に流入し、分化運命が神経系に決定されることが報告されており [Yamada 2007]、分化の制御という目的に対して適切であると考えられる。また、前述の先行研究では EB に対して刺激を印加したが、EB はサイズにより分化方向が変化すること [Hwang 2009]、および EB のサイズをそろえるためには培養操作が煩雑になることから、接着培養の状態では刺激することが望ましい。接着状態の細胞を刺激するためには、刺激電極を培養底面に配置することが有効である。

2点目の要求仕様は、刺激の短期的および長期的な応答を評価できることである。長期的な応答については、細胞から RNA を抽出し、遺伝子発現量を評価することで評価できる。また、短期的な応答については、電気刺激によりマウス ES 細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇したという報告より [Yamada 2007]、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を評価することが適切であると考えられる。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は Ca imaging と呼ばれる方法を用いて計測される。Ca imaging を行うためには、培養底面の光透過性が高い必要がある。光透過性については、培養デバイスの素材に透明導電性材料である酸化インジウムスズ (indium-tin-oxide; ITO) を用いることで解決可能である。そこで、本研究では、電気刺激デバイスに ITO を蒸着した基板を用いることとした。

3点目は、培養細胞に対する毒性が低いことである。先行研究では、ITO 製の MEA で神経細胞を20日以上培養した例が報告されており [Mukai 2003]、ITO は細胞に対する毒性が低く、刺激デバイスの材料として適切であると考えられる。以上から、ITO 基板を用いて作製した刺激デバイス上で、未分化状態の iPS 細胞を培養し、電気刺激による Ca 変動と分化方向の変化を評価することが有効である。

刺激のプロトコルを考案する上では、刺激により誘導される細胞内シグナルについての知見が不可欠である。刺激により細胞内に流入すると考えられる Ca^{2+} は、様々なシグナルの上流に位置し、分化方向に対して直接的および間接的に作用する可能性がある。直接的な作用の例としては、BMP4 の阻害による神経系への運命決定の誘導が挙げられる [Lin 2010]。また、間接的な作用の例としては、分化方向の決定に重要な役割を果たす細胞周期 [Pauklin 2013] を介した作用が考えられる [Kapur 2007]。物理的刺激による制御を行うためには、まず刺激を印加しない状態で、未分化状態と分化初期においてどのようなパターンの Ca 変動が起こるかについての知見を得る必要がある。しかし、現在、未分化状態および神経系細胞への分化途中のヒト多能性幹細胞について、Ca 変動を評価した研究は報告されていない。

そこで、本章では、物理的刺激によりヒト iPS 細胞を高効率で神経系細胞へ分化誘導する手法の開発を目的とし、未分化状態および分化初期のヒト iPS 細胞において起こる Ca 変動の可視化、および電気刺激が未分化状態のヒト iPS 細胞の分化方向に与える影響の評価を行う。最初に、ヒト iPS 細胞を前脳背側の神経系細胞に分化誘導し、遺伝子発現およびタンパク質の発現を指標として、目的とした種類の神経系細胞に分化誘導できたことを確認する。次に、神経系細胞への分化初期の段階において Ca imaging を行い、 $[Ca^{2+}]_i$ の変動パターンの可視化、および細胞周期のステージと Ca 変動の関係の評価を行う。最後に、未分化状態のヒト iPS 細胞に対して電気刺激を印加し、刺激によって誘発される Ca 変動、および分化方向の変化を評価する。

2-2 細胞内 Ca^{2+} 濃度変動と細胞周期

2-2-1 細胞内 Ca^{2+}

本項では、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇する機序について説明する。最初に、主に外部からの Ca^{2+} 流入に寄与するチャネルについて述べる。次に、小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) から Ca^{2+} が放出される機序について述べる。また、図 2-1 に本研究と関連する主要な Ca^{2+} 経路について示す。

Ca^{2+} は、主にイオンチャネルを介して細胞外から細胞内へ流入する。代表的な Ca^{2+} の透過性が高いイオンチャネルには、電位依存性 Ca^{2+} チャネル (voltage-gated calcium channel; VGCC)、イオンチャネル型受容体およびストア作動性 Ca^{2+} チャネル (store operated Ca^{2+} channel; SOCC) がある [山本 2012]。VGCC は、膜電位の変化により開口するイオンチャネルである。SOCC は ER などから Ca^{2+} が放出された状態が長時間続くと開口するイオンチャネルである。通常、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) の働きにより、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は細胞外と比較して低いため、イオンチャネルの開口により Ca^{2+} が細胞内へ流入する。

Ca^{2+} の ER からの放出は、主に 2 種類の受容体を介して起こる [Verkhratsky 1996]。1 つ目は、inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) に反応し Ca^{2+} を放出する IP_3 receptor (IP_3R) である。 IP_3R に IP_3 が結合した後の ER から Ca^{2+} の放出は、 IP_3 induced Ca^{2+} release (IICR) と呼ばれる。細胞内の IP_3 は、主に代謝型受容体の働きによって活性化された phospholipase C (PLC) が phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) を diacylglycerol (DAG) および IP_3 へ分解することによって産生される。2 つ目は、Ryanodine 受容体 (ryanodine receptor; RyR) である。RyR に Ca^{2+} が作用したときに、ER からの Ca^{2+} の放出が起こる。上記の現象は、 Ca^{2+} induced Ca^{2+} release (CICR) と呼ばれる。ER から Ca^{2+} が放出された場合、細胞内の Ca^{2+} は、sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) を介して、再度 ER に取り込まれる。細胞内の Ca^{2+} は、plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA) の働きにより、細胞外へ排出される。

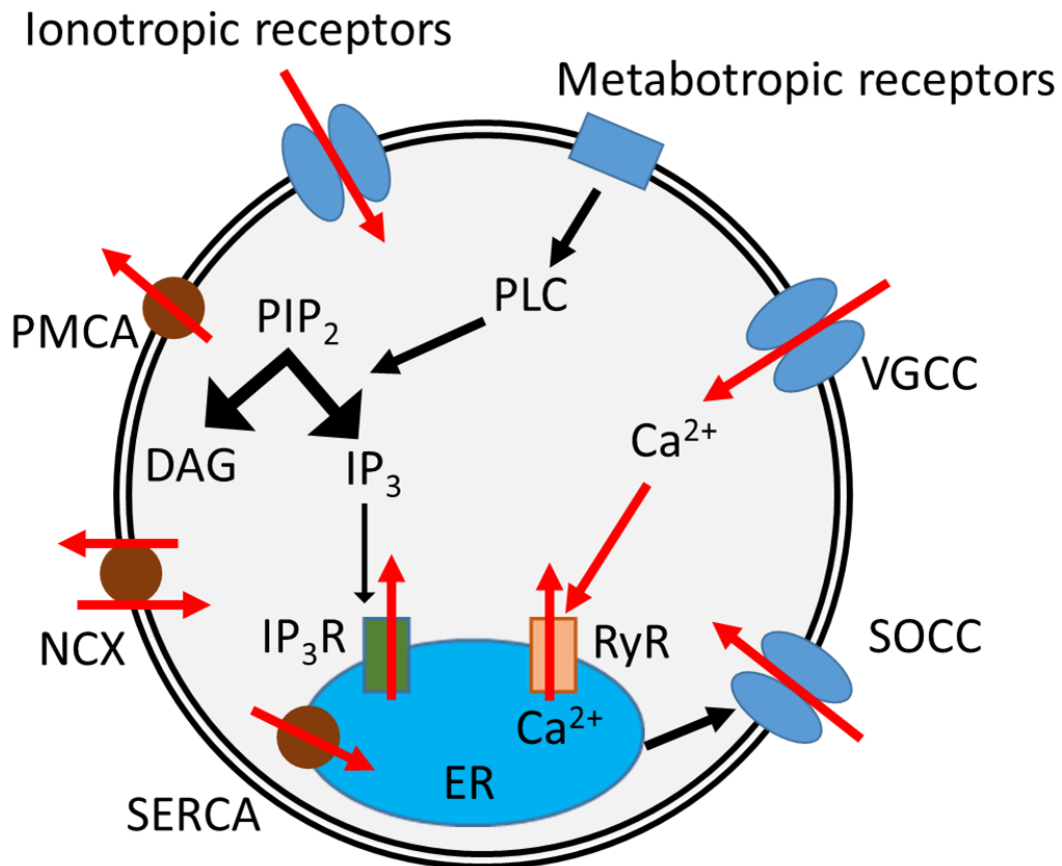


図 2-1 主要な Ca^{2+} の経路. 細胞内外の Ca^{2+} のバランスは $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) により維持されている. Ca^{2+} は, 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (voltage-gated calcium channel; VGCC) やイオンチャンネル型受容体を介して細胞内へ流入する. 細胞内に存在する小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) は, inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) に反応し Ca^{2+} を放出する IP_3 receptor (IP_3R), および Ca^{2+} に反応し Ca^{2+} を放出する ryanodine receptor (RyR) を有する. IP_3R による Ca^{2+} の放出は IP_3 induced Ca^{2+} release (IICR) と呼ばれ, Ca^{2+} と RyR の結合による Ca^{2+} の放出は Ca^{2+} induced Ca^{2+} release (CICR) と呼ばれる. Ca^{2+} は, sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) を介して ER に取り込まれる. 細胞内における IP_3 の合成は, 代謝型受容体とリガンドの結合による phospholipase C (PLC) の活性化, および PLC による phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) の diacylglycerol (DAG) および IP_3 への分解という過程を経る. また, ER が枯渇した状態が続いた場合, store operated Ca^{2+} channel (SOCC) が開き, 細胞内に Ca^{2+} が流入する. また, 細胞内の Ca^{2+} は, plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA) の働きにより, 細胞外へ排出される. 図中の赤色の矢印は Ca^{2+} の流れを示す. また, 黒色の矢印は, その他の物質の流れを示す.

2-2-2 細胞周期

本項では、細胞周期について述べる。最初に、細胞周期の進行について概説した後、先行研究において用いられている細胞周期の解析法について述べる。

細胞周期のステージには、細胞が分裂 (mitosis) する時期である M 期、DNA の合成 (synthesis) を行う時期である S 期、および細胞周期進行の準備を行う時期である G1 期と G2 期がある [山本 2012]。また、分裂が止まった細胞は、G0 期と呼ばれる細胞周期から外れたステージに存在する。細胞の分裂時には、G1 期、S 期、G2 期および M 期の順に細胞周期が進行し、1 つの細胞が 2 つに分裂する。なお、S 期において DNA の合成が起こり、G2 期および M 期には細胞内の DNA の量が通常の 2 倍になる。

細胞周期の解析法には、DNA 量を評価する方法とタンパク質を標識する方法の 2 通りがある。DNA 量を評価する方法では、通常はフローサイトメトリーが用いられる。G0/G1 期の細胞の DNA 量を 1 とした場合、G2/M 期には DNA 量は 2 であり、S 期には 1 から 2 の間の値となる。したがって、DNA 染色を行い、輝度値を指標としてヒストグラムを作成すると、図 2-2 に示すように G0/G1 期と G2/M 期を示す 2 つのピークを有する。その後、ヒストグラムの形状から、各ステージの割合を評価する。また、タンパク質を標識する方法は、Sakaue-Sawano らによって開発された fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) と呼ばれる手法が広く用いられている [Sakaue-Sawano 2008]。図 2-3 に示すように、遺伝子改変により、G1 期に赤色、S 期から M 期までに緑色の蛍光を発するため、蛍光波長から個々の細胞の細胞周期のステージを評価可能である。近年、Fucci は、培養細胞の細胞周期解析に広く適用されている [Coronado 2012; Singh 2013]。

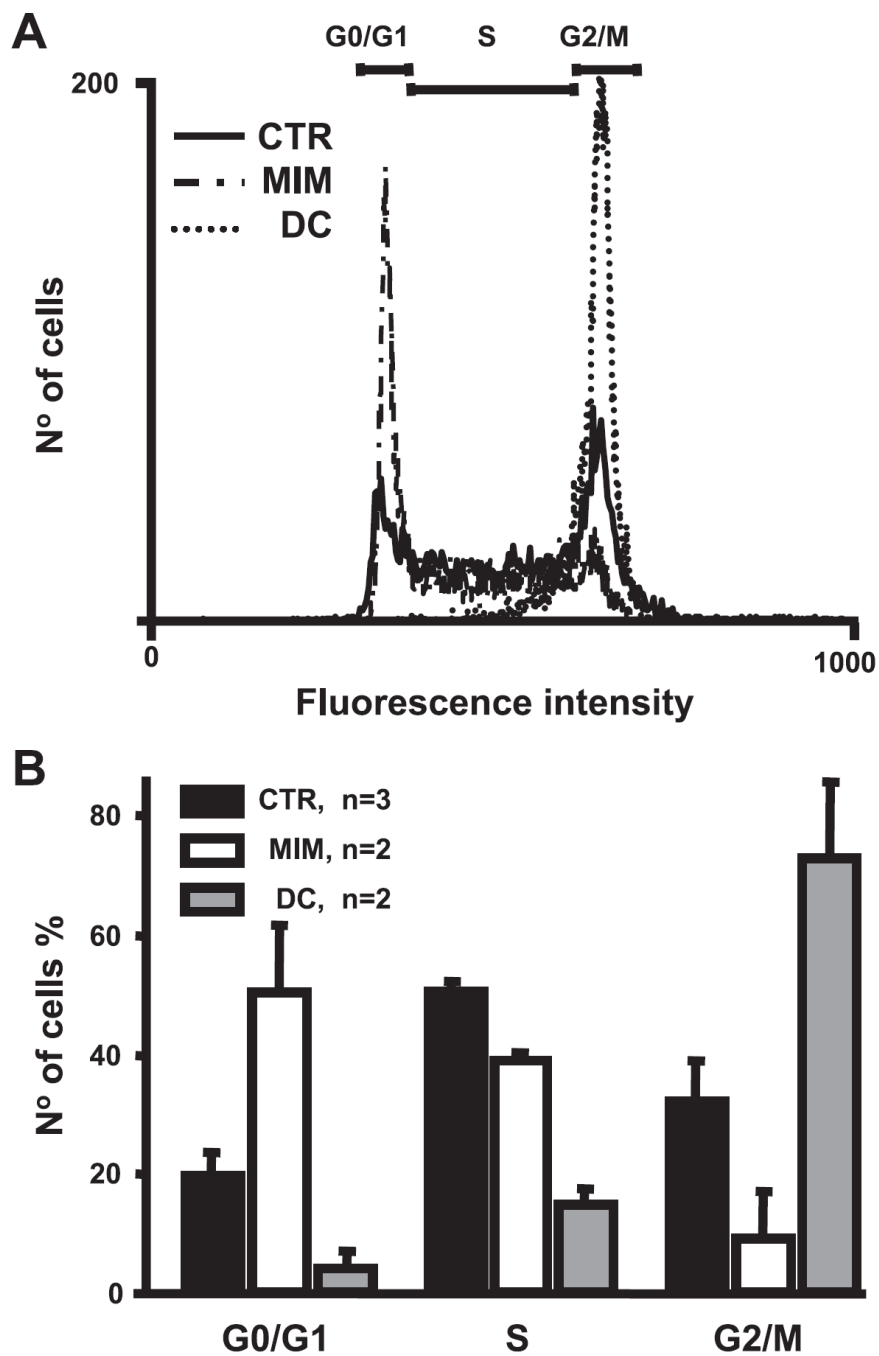


図 2-2 フローサイトメトリーによる細胞周期解析 [Kapur 2007 改変]. (A) 輝度値のヒストグラム. (B) 薬剤による細胞周期の制御. Mimosine (MIM) を添加した場合に G0/G1 期の細胞の割合が上昇した. 一方, demecolcine (DC) を添加した場合, G2/M 期の細胞の割合が上昇した. CTR, Control.

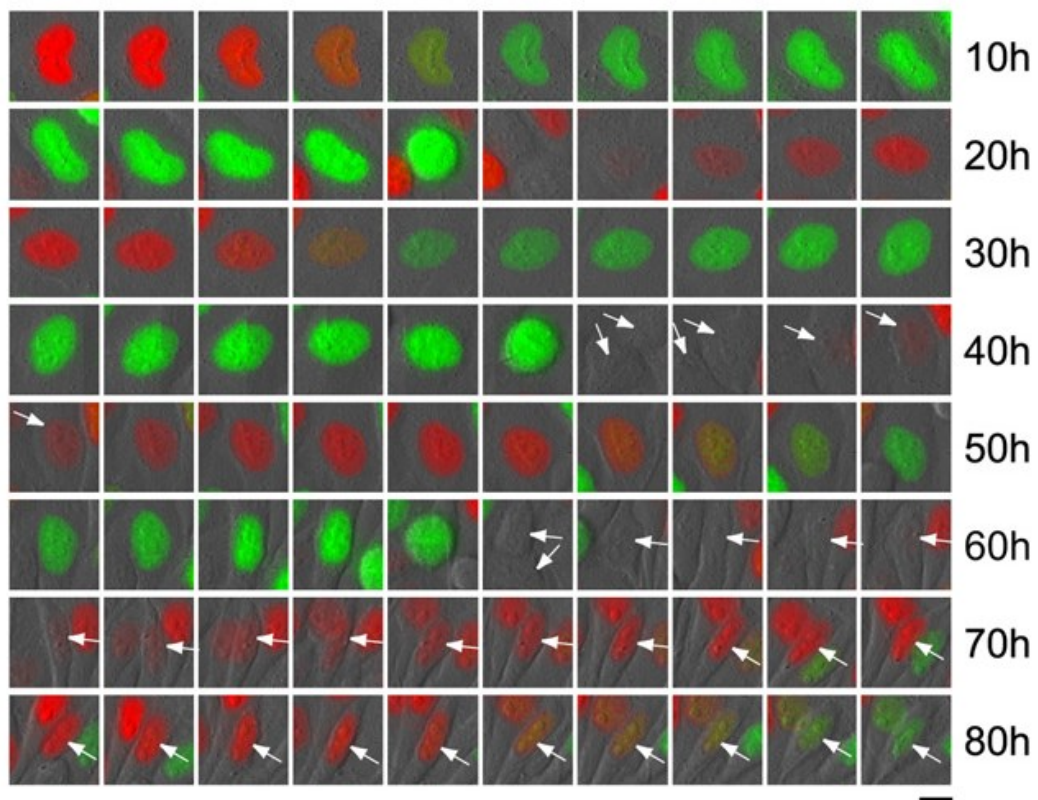


図 2-3 Fucci を用いた細胞周期解析 [Sakaue-Sawano 2008 改変]. G1 期に細胞核内に蓄積する Cdt1 に、赤色の蛍光を発するタンパク質を融合させた. 同様に、S/G2 期に蓄積する geminin に、緑色の蛍光タンパク質を融合させた. 結果、蛍光観察により、それぞれの細胞において、細胞周期を評価可能となった.

2-3 研究方法

2-3-1 細胞培養

本項では、細胞培養の方法について述べる。最初に、培養液および試薬の組成を述べた後、Feeder 細胞の準備、ヒト iPS 細胞の維持培養および分化誘導の手順を述べる。試料は全て CO₂ 濃度 5%, 37°C および水蒸気飽和状態の CO₂ インキュベータ (Espec) 内で培養した。

培養液および試薬の調製方法

- ヒト多能性幹細胞用培地 (human pluripotent stem cell medium; hPSC medium)
Dulbecco's Modified Eagle's medium/ Nutrient F-12 Ham (DMEM/F12; D6421, Sigma)
+ 20% v/v knock-out serum replacement (KSR; Life Technologies)
1% v/v Non-Essential Amino Acid (NEAA; M7145-100ml, Sigma)
2 mM L-glutamine (25030-081, Life Technologies)
0.1 mM 2-mercaptoethanol (2-ME; M6250-100ML, Sigma)
4 ng/ml bFGF (ReproCELL)
- Feeder 培地
DMEM with pyruvate and GlutaMAX (Life Technologies)
+ 10% v/v Fetal bovine serum (FBS; コスモバイオ)
100 U/ml-100 mg/ml penicillin-streptomycin (pe-st; Life Technologies)
- Feeder 凍結培地
Feeder 培地
+ 10% v/v dimethyl sulfoxide (DMSO; Wako)
- B27 medium
Neurobasal medium (Life Technologies)
+ ×1 B27 supplement (Life Technologies)
2 mM GlutaMAX (Life Technologies)
100 U/ml-100 mg/ml pe-st
- N2 medium
DMEM/F12 with GlutaMAX (Life Technologies)
+ ×1 N2 supplement (Life Technologies)
1% v/v NEAA
0.1 mM 2-ME
5 µg/ml Insulin (Sigma)

- ・神経系細胞維持培地 (neural maintenance medium; NM medium)

B27 medium と N2 medium を体積比 1 対 1 で混合し調整した.

- ・神経系細胞分化誘導培地 (neural induction medium; NI medium)

NM medium

+ 10 μ M SB431542 (ReproCELL)

+ 1 μ M dorsomorphin (Abcam)

- ・ヒト iPS 細胞凍結溶液 (DAP213 溶液)

6 ml 程度の hPSC medium に 0.59 g acetamide (Sigma) を溶かし, メッシュサイズ 0.22 μ m のシリンジフィルタ (sartorius) を用いて濾過滅菌した. 次に, 1.42 ml DMSO および 2.2 ml propylene glycol を加え, 混和した. さらに, 溶液の総量が 10 ml となるまで hPSC medium を加えた. 1 ml ずつバイアルに分注し, -80°C で保管した.

- ・ヒト iPS 細胞継代用酵素溶液 (collagenase trypsin KSR 溶液; CTK 溶液)

20 ml KSR, 0.1 g collagenase (Wako), 10 ml 2.5% trypsin, および 100 mM CaCl_2 を Phosphate buffered saline (PBS; Sigma) に溶かし, 合計量を 100 ml に合わせた. 0.22 μ m シリンジフィルタを通して滅菌後, -20°C で保存した.

- ・神経系細胞凍結溶液 (neural freezing medium; NF medium)

NM medium

+ 10% v/v DMSO

+ 20 ng/ml bFGF

- ・SNL 細胞馴化培地 (SNL cell conditioned medium; SNL-CM)

0.1% w/v ゼラチン溶液 (Wako) を用いてインキュベータ内で 30 分間以上静置した培養皿に, 後述の方法で増殖阻害処理をした SNL76/7 細胞 (コスモバイオ) を 4.0×10^4 cells/cm² の細胞密度で播種し, Feeder 培地で培養した. 24 時間後, Feeder 培地を除去し, 37°C に加温した PBS で 1 回洗浄した後, bFGF を添加していない hPSC medium を加えた. 24 時間毎に培養液を回収し, 新しい hPSC medium に全量交換した. 回収した培養液は, 0.22 μ m のシリンジフィルタを通し滅菌した後, -80°C で保存した.

- ・HEPES buffer

milliQ 水に, 148 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM Glucose, および 10 mM HEPES を溶かした後, 1 N NaOH を用いて pH 7.2 に調整した.

Feeder 細胞の準備

Feeder 培地を用いて, SNL76/7 細胞をゼラチンコート済み培養皿で培養した. 図 2-4 に, SNL76/7 細胞の代表的な位相差顕微鏡像を示す. SNL76/7 細胞は, 3 日ごとに, 0.25% trypsin EDTA (Life Technologies) を用いて, 新しいゼラチンコート済み培養皿に 16 倍の比率で継代した. Feeder 細胞として用いる際は, SNL76/7 細胞の細胞分裂を mitomycin C (MMC) により阻害した. SNL76/7 細胞が培養皿底面を 90%程度覆った状態になった後, 12 $\mu\text{g/ml}$ MMC (Wako) を培養液に加え, インキュベータ内で 2 時間 15 分間培養した. 37°Cに加温した PBS で 2 回洗浄した後, 0.25% trypsin-EDTA を用いて細胞を単離した. 以降, MMC 処理後の SNL76/7 細胞を Feeder 細胞と呼ぶ. MMC 処理後に直接培養皿に播種する場合は, ゼラチンコート済みの 60 mm dish に 6.0×10^5 cells を播種した. 凍結保存する場合は, Feeder 凍結培地に 5.0×10^6 cells/ml で懸濁し, -80°C で凍結した. 凍結保存した Feeder 細胞を用いる際は, 37°Cで 1 分間加温することで解凍し, 10 倍量の Feeder 培地で希釈し, 遠心操作により DMSO を除去した後に, ゼラチンコート済みの 60 mm dish に 6.0×10^5 cells を播種した.

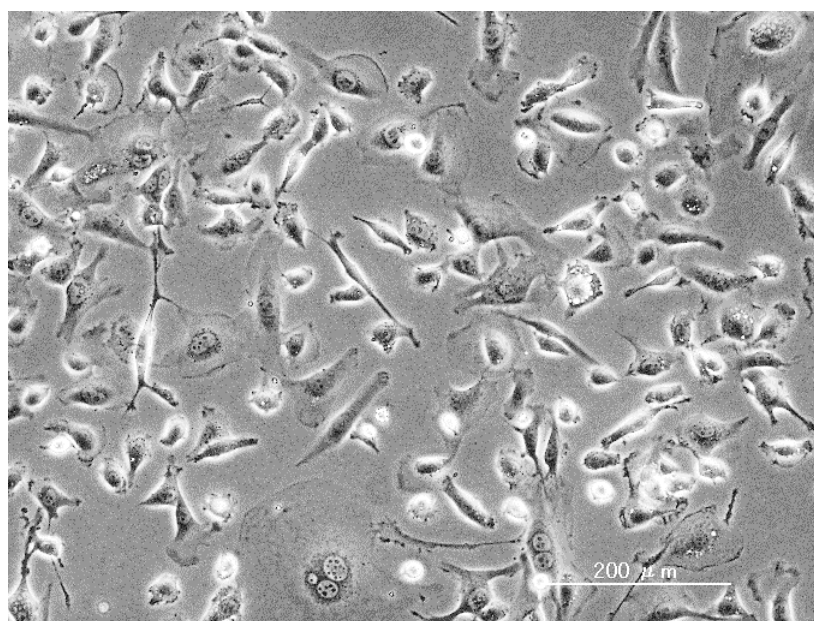


図 2-4 SNL76/7 細胞

ヒト iPS 細胞の維持培養

ヒト iPS 細胞は、理化学研究所からの提供を受け、Takahashi らが樹立した 201B7 株を使用した [Takahashi 2007]. ヒト iPS 細胞の未分化状態を維持する際は、中村らの手法を基に、Feeder 細胞上で培養し、5 日毎に継代操作を行った [中村 2012]. 図 2-5 に維持培養中のヒト iPS 細胞を示す. 継代操作時は、最初に自発的に分化したコロニー (図 2-5B) を 200 μ l ピペットのチップで取り除いた後、PBS で 1 回洗浄した. CTK 溶液 1 ml を加えインキュベータで 7 分間静置した. 底面から剥離した Feeder 細胞を吸引除去した後、5 ml hPSC medium を加えた. 5 ml ピペットを用いて水流をあて、物理的にコロニーを底面から剥離させた. 15 ml 遠沈管にコロニーを回収した後 5 分間静置し、コロニーを沈ませた. 上澄みを除去した後、1 ml hPSC medium を加えた. 1 ml ピペットで 3 回ピペッティングを行い、コロニーを物理的に分散した. あらかじめ播種しておいた Feeder 細胞の培地を吸引除去し、PBS で 1 回洗浄した後、4 ml の hPSC medium を加えた. 懸濁したヒト iPS 細胞を、Feeder 細胞上に継代比率 $\times 2 \sim \times 6$ で播種した.

ヒト iPS 細胞を凍結保存する際は、継代操作と同様の手順でコロニーを 15 ml 遠沈管に回収した後、1000 rpm で 3 分間遠心処理を行った. 上澄みを吸引除去した後、氷上で細胞を冷却した. 次に、あらかじめ氷上で冷却しておいた DAP213 溶液 200 μ l で細胞塊を懸濁し、凍結バイアルに移した. 凍結バイアルを液体窒素中に入れ、細胞を急速凍結した. 凍結したヒト iPS 細胞は、液体窒素中で保存した.

凍結保存したヒト iPS 細胞を解凍する際は、凍結バイアル内に 37 $^{\circ}$ C に加温した 1 ml hPSC medium を入れピペッティングすることで細胞を解凍した. 続いて、凍結バイアル内の溶液を 9 ml の hPSC medium に入れた. 1000 rpm で 3 分間の遠心処理により細胞塊を沈ませた後、上澄みを吸引除去した. 4 ml の hPSC medium で細胞塊を懸濁し、Feeder 細胞の培地を PBS で 1 回洗浄した後、ヒト iPS 細胞を Feeder 細胞上に播種した.

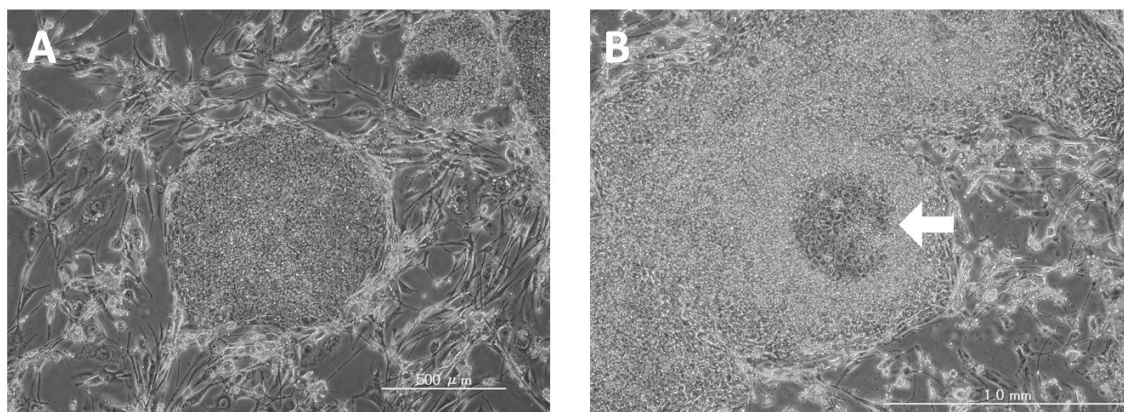


図 2-5 維持培養中のヒト iPS 細胞. A ヒト iPS 細胞. 中央の円形の構造が、ヒト iPS 細胞が形成したコロニーである. B 状態が悪化したコロニー. コロニー中央の細胞密度が低下した部分に、自発的に分化した細胞が観察される (白い矢印).

分化誘導方法

ヒト iPS 細胞を大脳皮質の神経細胞へと分化誘導した。図 2-6 に分化誘導の手順の概要を示す。分化誘導は、分化誘導用 monolayer の準備、神経上皮細胞への誘導および神経幹細胞への誘導の手順で行った。以下に、それぞれの手順の詳細を示す。また、本論文では、培養液を NI medium に置換した日を分化誘導 0 日目 (days after induction; DAI) と定義した。なお、誘導因子を用いた分化方向の操作実験を行った際は、5 μ M IWP2 (ReproCELL), 1.5 μ M Purmorphamine (pur; Wako), および 1 μ M Cyclopamine (cyc; Wako) を用いた。

分化誘導用 monolayer の準備は、Tomishima の手法を基に行った [Tomishima 2013]。継代時と同様の手順で分化コロニーを除去した後、1 ml Accutase (Innovative Cell Technologies) を培養皿に入れ、インキュベータで 30 分間静置した。ピペッティングにより細胞を単離した後、細胞を 15 ml 遠沈管に回収した。遠心操作 (1000 rpm, 5 分間) 後に上澄みを除去し、5 ml の hPSC medium で懸濁した。さらに、同様の洗浄操作をもう 1 回繰り返した。続いて、10 μ M Y-27632 (Wako) を含む hPSC medium 10 ml に懸濁し、ゼラチンコート済みの 100 mm dish に加えた後、インキュベータ内で 30 分間静置した。一般に、ヒト iPS 細胞と比較して Feeder 細胞の方が底面への接着性が高いため、上記の操作により懸濁液中のヒト iPS 細胞の比率が上昇する。培養液中に浮遊している細胞を回収し、遠心操作 (1000 rpm, 5 分間) 後、10 μ M Y-27632 および 10 ng/ml bFGF を含む SNL-CM で懸濁した。Ca²⁺および Mg²⁺を含む PBS で 50 倍希釈した CELLstart (Life Technologies) を 37°C, 2 時間の条件でコートした培養皿に、懸濁した細胞を 1.0×10^3 cells/mm² で播種した。顕微鏡により毎日観察し、底面を細胞が全て覆った状態になるまで培養した。培地は、10 ng/ml bFGF を含む SNL-CM を用いて、24 時間毎に全量を交換した。

ヒト iPS 細胞が底面を覆ったことが確認できた日から、神経上皮細胞への分化誘導を開始した。図 2-7 に、ヒト iPS 細胞が底面を覆う前後の状態を示す。神経上皮細胞への分化誘導以降は、Shi らの手法を基に行った [Shi 2012a]。37°C に加温した PBS を用いて試料を 1 回洗浄し、培養液を NI medium に置換した。次の継代まで、24 時間毎に、培養液を NI medium で全量交換した。先行研究より、iPS 細胞が神経上皮細胞に分化すると、細胞質に対する細胞核の面積比が低下することが知られている [Shi 2012a, b]。また、本手法では、8 DAI から 12 DAI の間に神経上皮細胞への分化が終了することが報告されている [Shi 2012a]。そこで、培地交換の際に顕微鏡観察を行い、形態変化が観察された後に継代操作を行った。図 2-8 に形態が変化する前後の細胞を示す。

形態変化が観察された後に、継代操作および神経前駆細胞への誘導操作を行った。継代前に、PBS で 20 μ g/ml に希釈した laminin (Life Technologies) を入れた状態でインキュベータ内に 4 時間静置し、培養皿をコーティングした。試料に、最終濃度 1 mg/ml となるように Dispase (Life Technologies) を添加し、インキュベータ内に 3 分間静置した。ピペッティングにより細胞を複数の細胞塊に分離した後、15 ml 遠沈管に回収した。10 ml の NM medium により 2 回洗浄した後、NI medium に細胞塊の状態に懸濁した。細胞塊を laminin

コート済み培養皿に継代比率×3 で播種した．継代 1 日後に培養液を NM medium で全量交換した．以降，培養液は NM medium を用いて，2 日毎に全量交換した．なお，15 DAI から 19 DAI までの間は，神経幹細胞の増殖を促進する目的で，20 ng/ml bFGF を培養液に添加した．19 DAI に，同様の手順で Dispase を用いた継代操作を行い，新しい laminin コート済み培養皿に継代比率×3 で播種した．

突起を持った細胞が凝集塊周囲に多く観察された後に，細胞を単離しての継代操作を行った．図 2-9 に，凝集塊の周囲に観察された突起を有する細胞を示す．試料の培養液を吸引除去し，35 mm 培養皿 1 枚当たりに対して 1 ml 程度の Accutase を加え，インキュベータで 10 分間静置した．ピペッティングにより細胞を単離し，15 ml 遠沈管に回収した．NM medium で Accutase を 5 倍程度に希釈した後，1000 rpm で 5 分間の遠心操作を行った．上澄みを吸引除去し，NM medium を用いて細胞を懸濁した．細胞は，laminin コート済み培養皿に 5.0×10^3 cells/mm² の細胞密度で播種した．また，一部の細胞は，NF medium を用いて 2.0×10^6 cells/ml の濃度で懸濁した後，1 ml ずつ凍結バイアルに分注し，-80℃で凍結保存した．本研究では，25 DAI から 27 DAI の間に継代操作および凍結操作を行った．

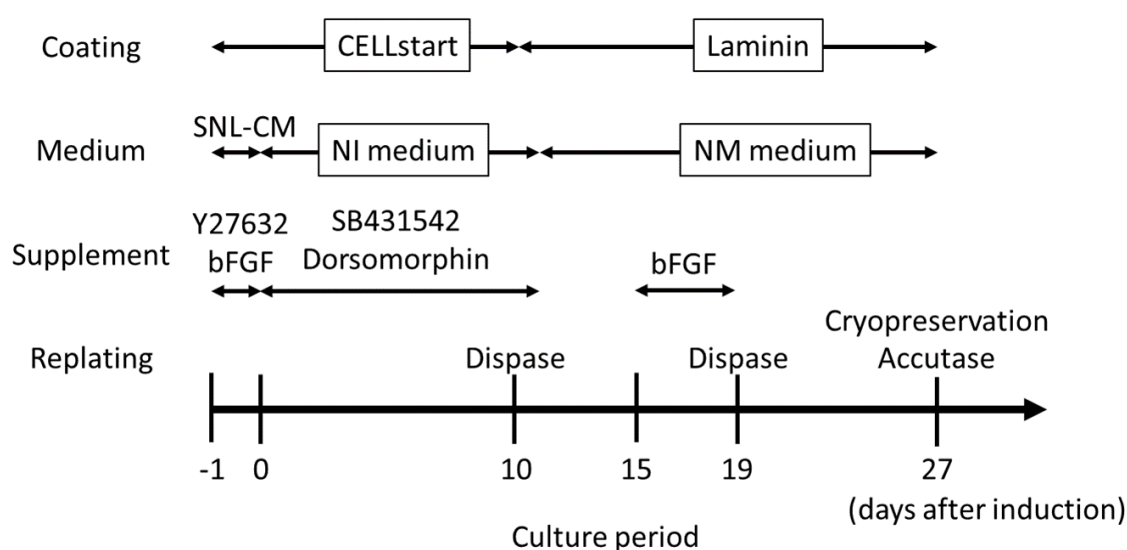


図 2-6 分化誘導手順と用いた試薬．

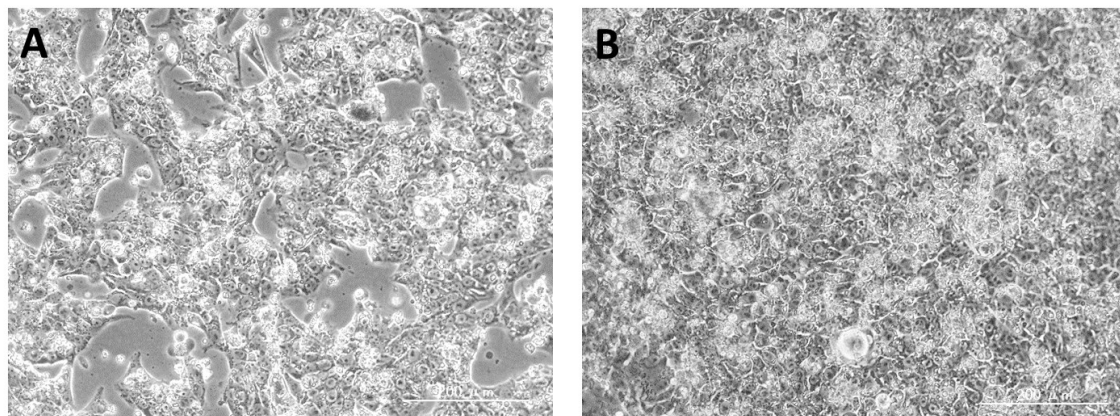


図 2-7 分化誘導用のヒト iPS 細胞 monolayer. 底面を覆う前には，細胞の隙間から培養皿底面が見られた (A). A, 播種 1 日後; B, 播種 2 日後.

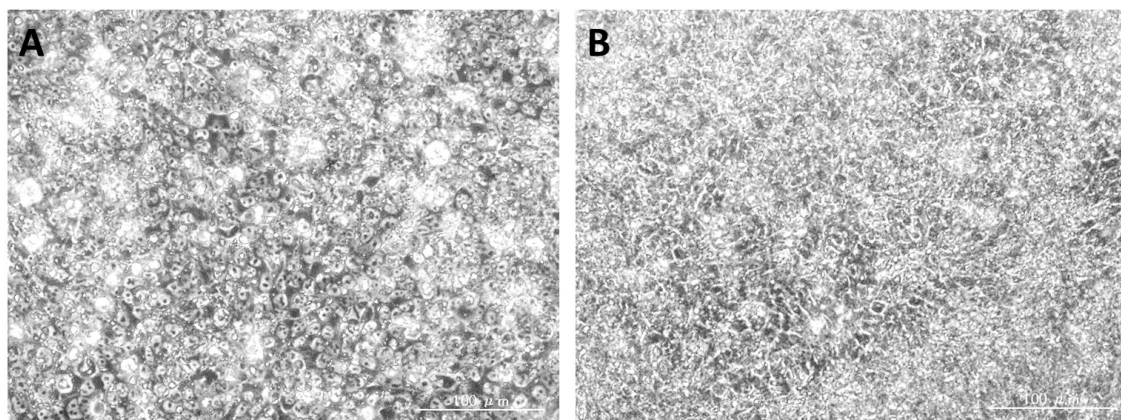


図 2-8 分化誘導後に形態が変化する前後の細胞. 形態変化前は，細胞内に円形の細胞核が観察された (A). また，細胞質に対する細胞核の比率が高く，細胞核内に核小体が観察された. 形態変化後は，細胞質に対する細胞核の比が低下した (B). さらに，細胞間の境界が明確に観察されるようになった. A, 播種 4 日後; B, 播種 10 日後.

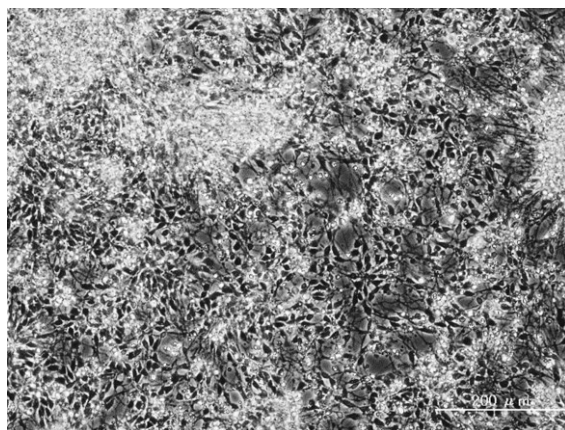


図 2-9 分化誘導 27 日後における突起を有する細胞.

2-3-2 アルカリフォスファターゼ染色

未分化状態の多能性幹細胞は、アルカリフォスファターゼ (Alkaline Phosphatase, AP) と呼ばれる酵素の活性を持つことが広く知られている。本研究では、実験に用いた iPS 細胞が AP 活性を有することを確認するために、AP 染色を行った。以下に、AP 染色の手順を示す。

最初に、25 mM NaCl, 25 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Sigma) および 12.5 mM MgCl₂ を溶かした milliQ 水を、pH 9.5 に調節し、AP 染色用 Buffer (AP Buffer) を調製した。次に、AP Buffer に 337.5 µg/ml Nitrotetrazolium Blue chloride (Sigma) および 175 µg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt (Sigma) を溶かし、発色液を調製した。試料の培地を吸引除去した後、AP Buffer を用いて 2 回洗浄した。試料に発色液を加え、室温で 5 分間程度静置し、発色させた。PBS で 2 回洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde; PFA; 和光純薬) を用いて、室温、30 分間の条件で固定した。試料を PBS で洗浄した後、倒立顕微鏡 (IX-71; オリンパス) を用いて観察した。

2-3-3 免疫組織化学染色法

ヒト iPS 細胞由来の細胞に発現したタンパク質を評価するために、免疫組織化学染色法を用いた。本項では、通常の免疫組織化学染色法の実験手順、S 期の細胞の同定に用いた染色法の実験手順および画像の取得方法について述べる。実験に用いた一次抗体は表 2-1 に示す。また、蛍光観察に用いたミラーユニットは、表 2-2 に示す。

最初に、試料の培養液を吸引除去した後、37℃に加温した 4% PFA を加え、室温で 30 分間静置し、固定処理を行った。固定後、PFA を PBS で 1 回洗浄した。続いて、0.25% Triton X-100 (Calbiochem) および 4% w/v Block Ace (大日本住友) を含む PBS に溶液を置換し、4℃で 3 時間の条件で細胞膜の可溶化およびブロッキングを行った。次に、一次抗体を 0.4% Block Ace/PBS で希釈した一次抗体液で、試料の溶液を置換し、4℃で一晩反応させた。試料の一次抗体液を吸引除去し、PBS を加えて 5 分間室温で静置した。上記の洗浄操作を、さらに 2 回繰り返した。洗浄後、×500 Goat Alexa Fluor 546 anti-rabbit IgG antibody (Molecular probes), ×500 Goat Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG antibody (Molecular probes) および 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; sigma) を含む 0.4% Block Ace/PBS で溶液を置換し、4℃で 4-8 時間反応させた。最後に、PBS を用いた洗浄操作を 3 回行った。

S 期の細胞の同定には、ブロモデオキシウリジン (Bromodeoxyuridine; BrdU) を用いた。BrdU は S 期の細胞の DNA に取り込まれるため、短時間の BrdU 暴露後に抗 BrdU 抗体を用いた染色を行うことで S 期の細胞のみを特異的に標識可能である。以下に、BrdU を用いた染色の手順を示す。最初に、試料の培養液に 15 μM BrdU (Sigma) を添加し、インキュベータ内で 30 分間静置した。続いて、前述の方法で PFA 固定および細胞膜の可溶化を行った。次に、溶液を 1N 塩酸に置換しインキュベータで 1 時間静置することで、DNA の変性処理を行った。pH 8.0 に調製した 0.1 M Borate buffer を用いて塩酸を中和した後、PBS を用いて洗浄した。その後、前述の手順でブロッキング処理を行い、最後に抗体を反応させた。

蛍光観察には、冷却 Charge coupled device (CCD) カメラ (C8800-21C; 浜松ホトニクス) を搭載した倒立顕微鏡システム (IX-71; オリンパス) を使用した。図 2-10 に、計測装置の概観および光学系の模式図を示す。蛍光画像は 500 pixel × 500 pixel のサイズで取得し、1 pixel あたり 12 bit のデータを取得した。

表 2-1 第 2 章において用いた一次抗体

Name	Expression	Isotype	Dilution	Source
PAX6	Cortical and thalamic progenitors	Rabbit IgG	1:1000	Abcam
Nkx2.1	Ventral forebrain progenitors	Mouse IgG	1:1000	Abcam
Nestin	Neural progenitors	Rabbit IgG	1:1000	Sigma
BrdU	S-phase cells	Mouse IgG	1:400	Sigma
Nanog	Pluripotent stem cells	Rabbit IgG	1:300	ReproCELL

表 2-2 ミラーユニット

Name	Excitation filter	Emission filter	Dichroic mirror	Source
U-MWU2	330-385	420-	400	Olympus
U-MNIBA3	460-495	510-550	505	Olympus
U-MWIG3	530-550	575-	570	Olympus

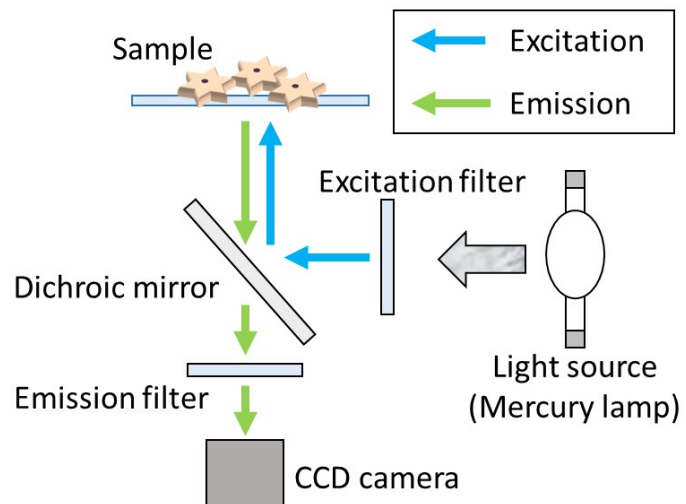


図 2-10 計測装置の概観と光学系の模式図．水銀灯の照射光の波長を，励起フィルタにより励起光の帯域のみに制限する．ダイクロイックミラーは，励起光は反射するが，蛍光は透過する．吸収フィルタにより，蛍光の波長のみを透過させる．

2-3-4 Ca imaging

[Ca²⁺]_iの変動を評価する目的で、Ca imaging を行った。以下に、Ca imaging の手順および画像解析の手順を示す。なお、本研究では、[Ca²⁺]_iが変化する現象を Ca 変動、Ca 変動が周期的に連続して起こる現象を Ca 振動、および Ca 変動が複数の細胞に伝播する現象を Ca wave と定義した。

最初に、計測を行う試料の培養液を半量程度回収した。次に、Fluo-8 AM (Dojindo), Pluronic F-127 (PCI) および Hoechst 33342 (Dojindo) を、それぞれ最終濃度 2.5 μM, 0.01%および 5 μg/ml となるように、回収した培養液を用いて希釈した。試料の残りの培養液を吸引除去した後、Fluo-8 AM が入った溶液と交換し、インキュベータで 30 分間静置した。37°Cに加温した HEPES Buffer で 2 回洗浄した後、試料の溶液を HEPES Buffer に置換し、さらにインキュベータで 15 分間静置した。試料をステージインキュベータ内にセットし、計測を行った。計測には、顕微鏡, 冷却 CCD カメラ, 共焦点スキャナユニット (CSU-X1; 横河電機) およびレーザー光源から構成されるシステムを用いた (図 2-11)。一般的に、Ca imaging では、色素の細胞外への排出や励起光の照射により、輝度値が減少していく退色と呼ばれる現象が観察される。共焦点スキャナユニットを用いることで、試料の退色の影響を低減できる。画像は、露光時間を 2.5 秒とし、3 秒毎に 300 回、15 分間取得した。1 枚の画像は、前項と同様に、サイズ 500 pixel × 500 pixel, 1 pixel あたり 12 bit のデータを取得した。励起光には波長 488 nm のレーザーを、出力 10 mW で使用した。また、計測中は、ステージインキュベータ (東海ヒット) を用いて試料周囲の環境を、37°C, 水蒸気飽和状態に維持した。Ca imaging 終了後に、同視野において、Hoechst により染色した細胞核の画像を取得した。

画像解析の際は、個々の細胞の認識、輝度値の取得、および Ca 変動の検出の手順で行った。図 2-12 および図 2-13 に手順の概要を示す。最初に、核染色画像から個々の細胞を検出した。細胞の認識には、Carpenter らが開発したフリーのソフトウェアである CellProfiler を用いた [Carpenter 2006; Kamentsky 2011]。以下に、細胞の認識手法の概要を示す。核染色画像 (図 2-12A) を 20 pixel × 20 pixel に分割し、Otsu method を用いてそれぞれの区画において Hoechst 陽性の画素を検出した。次に、直径 8 pixels の LoG filter を用いて画像を平滑化した後に、輝度値のピークを検出しそれぞれの細胞核 (図 2-12B) とした。複数の細胞核が重複している領域については、Water shed method を用いて重なった細胞核を分割した。なお、検出した細胞核のうち、直径が 7 pixel から 15 pixel であり、画像の端部に接触していない細胞核 (図 2-12C において、緑色で囲まれた細胞核) のみを以降の解析で用いた。続いて、検出した細胞核に最大 10 pixel までの膨張処理を施し、細胞体の領域とした (図 2-12E)。次に、Ca imaging の輝度値を取得した。各画像において細胞体の領域の平均値を個々の細胞の代表値とした。最後に、取得した輝度値から Ca 変動を示すピークを検出した。各細胞について、輝度値を最低値で正規化し、Ca 変動は最低輝度値に対する割合で表示した。退色の影響を低減するために、視野内の全画素の平均値を個々の細胞の輝度

値から引くことでベースラインを補正した。次に、5 点の移動平均によりノイズを低減した後、1 点前の輝度値との差分をとった。平均値を合わせた上で、全細胞の輝度値の差分から標準偏差を算出し、標準偏差の 2 倍をピーク検出の閾値とした。最後に、それぞれの細胞から閾値を超えた正のピークを検出し、Ca 変動とみなした。

Hoechst の影響を評価する目的で、細胞核の情報を利用せずに Ca 変動を評価した際は、最初に画像を 10 pixel×10 pixel の区画に分割した。次に、区画ごとに、前述の手法を用いて Ca 変動を検出した。最後に、検出された Ca 変動の回数でヒストグラムを作成し、Hoechst の取り込みが Ca 変動の回数に与える影響を評価した。

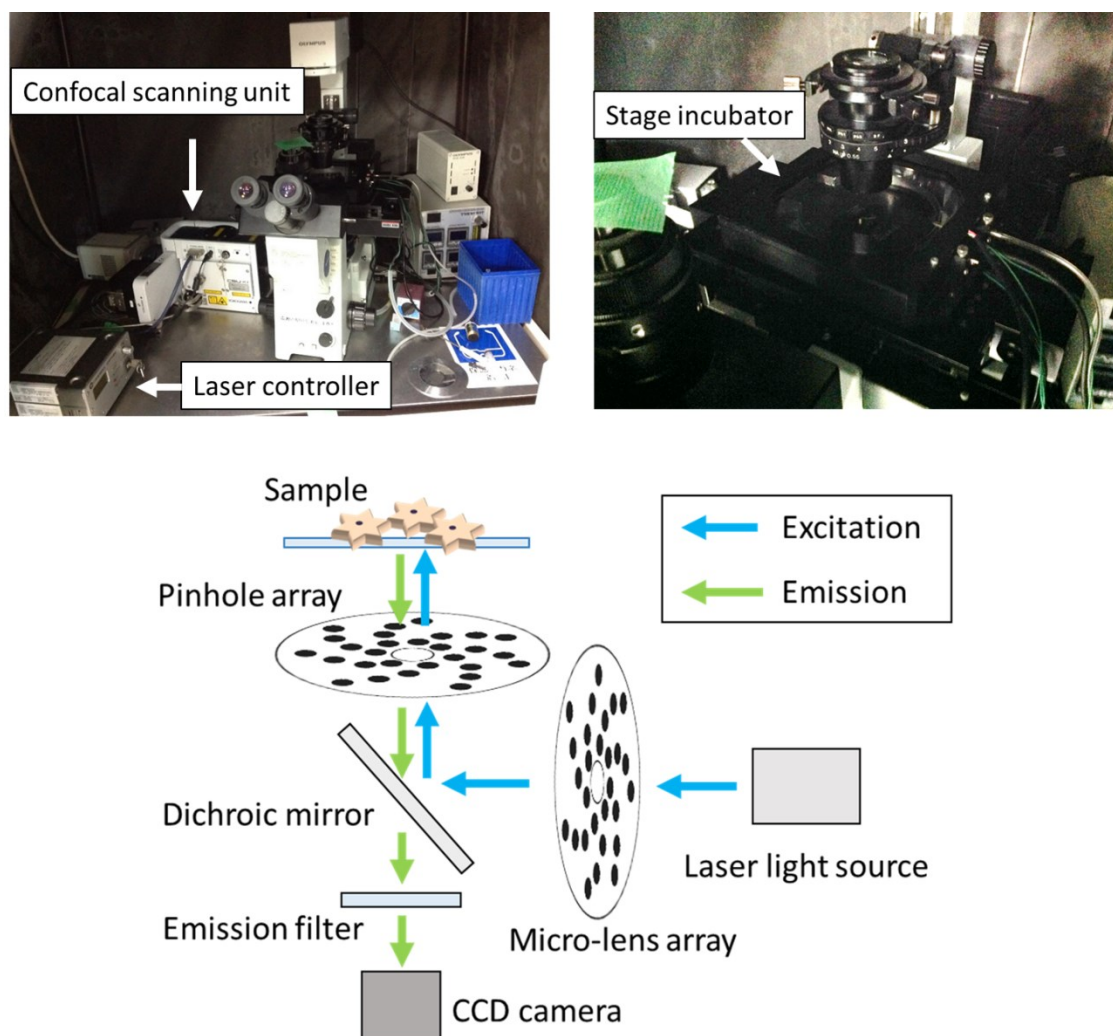


図 2-11 Ca imaging に用いた計測システム。上段：システムの概観。試料周囲の温度を制御するために、ステージインキュベータを用いた（上段右図）。下段：計測に用いた光学系。レーザー光源から放出された励起光が、マイクロレンズアレイにより複数に分割される。励起光は、ピンホールアレイを通して試料に照射される。励起光は、ダイクロイックミラーおよび吸収フィルタを通して CCD カメラにより検出される。

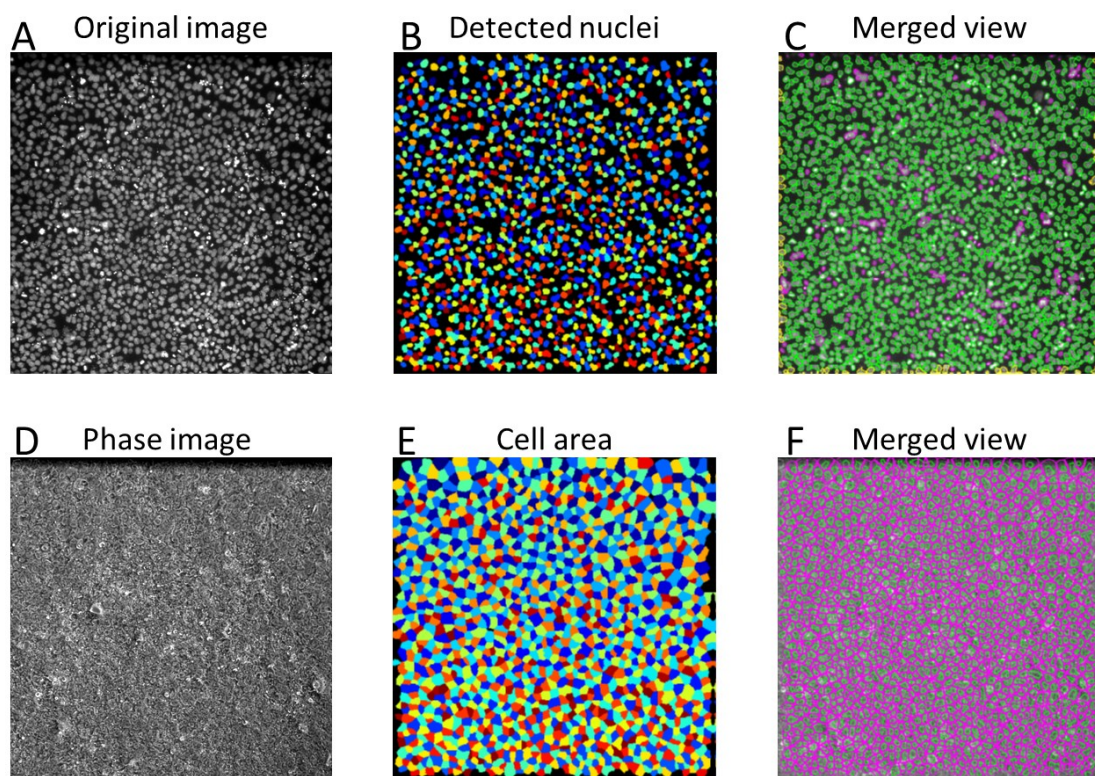


図 2-12 個々の細胞の検出方法. 核染色の画像 (A) から細胞核の領域 (B) を検出する. 核染色の画像と細胞核の領域の重ね併せ画像 (C). 同じ視野の位相差顕微鏡画像 (D). 細胞核の領域に対して膨張処理を施し, 細胞体の領域と定義する (E). D と E の重ね併せ画像 (F).

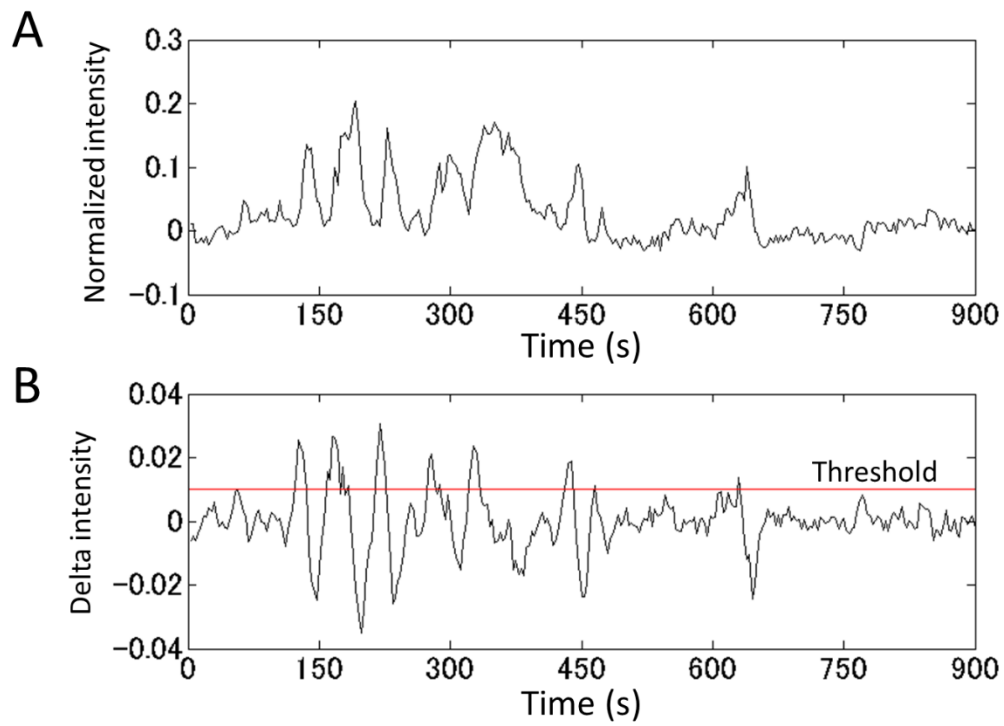


図 2-13 Ca 変動の検出方法. ある細胞の輝度値の変動 (A) と, 輝度値の差分 (B). 赤い線は, 活動検出の閾値である標準偏差の 2 倍の値を示す.

2-3-5 遺伝子発現評価

細胞集団の mRNA の発現量を評価するために、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った。実験は、RNA の抽出、RNA から cDNA の逆転写、および PCR 反応の 3 ステップから構成される。以下に、それぞれのステップの詳細を示す。また、対象とした遺伝子、プライマーの配列および出典を表 2-3 に示す。なお、全てのプライマーは、非特異的増幅が生じないことを確認した後に実験に用いた。対象遺伝子を強く発現した試料が得られたプライマーについては、検量線を用いた増幅効率の確認を行ってから実験に用いた。増幅効率の確認には対象遺伝子を強く発現した試料が必要とされる。全ての試料において弱い発現しか示さなかった *Brachyury*, *SOX17* および *caudal type homeobox (CDX) 2* については、理想的な増幅が起こったと仮定して評価を行った。増幅効率を評価したプライマーの、増幅効率および R² 値を表 2-4 に示す。

RNA の抽出には、NucleoSpin RNA キット (Macherey-Nagel) を用いた。最初に、試料の培養液を除去した後、1% v/v 2-ME を添加した RA1 溶液を加え、細胞を溶解した。RA1 溶液は主にグアニジンチオシアネートから構成され、還元剤と組み合わせて用いることで RNase の働きを抑制しながら細胞を溶解可能である。続いて、NucleoSpin Filter を通し、溶液内の固形物を除外した。さらに、等量の 70% エタノールを混合し、溶液の粘性を低下させた。溶液を NucleoSpin RNA Column に通し、DNA および RNA をカラムに吸着させた。Membrane desalting buffer をカラムに通し、塩をカラムから除外した。rDNase を reaction buffer で希釈した後、カラムに添加し、室温で 15 分間反応させた。RAW2 溶液を用いて、カラムの DNase を洗浄した。さらに、RA3 溶液を用いてカラムを 2 回洗浄した。最後に、RNase free water を用いて、カラムに吸着した RNA を溶出させた。カラムに溶液を通す際は、高速遠心機 (Hitachi) を用いて 11000 rpm で遠心操作を行った。

RNA の逆転写には、ReverTra Ace with gDNA remover キット (東洋紡) を用いた。また、逆転写前に NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) を用いて、RNA の品質および濃度の評価を行い、RNA の 260/280 値が 2.0 以上の試料を用いた。最初に、RNA を 65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で冷却した。次に、×4 DN Master mix, RNA サンプルおよび水を混合し、37°C で 5 分間インキュベートした。最後に、溶液に×5 RT Master mix を加えて混和した後、37°C で 15 分間、50°C で 5 分間、および 98°C で 5 分間の条件でインキュベートした。逆転写済みの cDNA は、1 ヶ月以内で使用する場合は 4°C で保管し、長期の保存は -20°C で行った。逆転写において、温度を維持する操作はサーマルサイクラー (BC-1000; Bio-Rad) を用いて行った。

PCR 反応には、Thunderbird SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いた。最初に、DNA テンプレート、Master Mix, ROX dye およびプライマーを混合した。DNA テンプレートは全体の 10% の量となるように添加した。また、プライマーは 300 nM の濃度で添加した。次に、48 ウェル PCR プレート (Illumina) に 10 µl/well で溶液をロードした。続いて、プレートに、サーマルシーリングフィルム (Illumina) を圧着させた。プレートをスピンドウン

し、気泡を除去した後、Eco Real Time PCR システム (Illumina) にプレートを設定した。手技によるばらつきを補正する目的で、1つのサンプルにつき3wellずつ反応を行い、平均値を試料の代表値として用いた。また、サンプル調整時にコンタミネーションが起きなかったことを確認する目的で、サンプルを除いた条件でも反応を行った。PCR 反応の制御および解析には Eco Software (Illumina) および EcoStudy software (Illumina) を用いた。PCR 反応のために、最初に 95°C で 1 分間の酵素の活性化処理を行い、次に 95°C 15 秒間と 60°C 30 秒間からなるサイクルを 40 回繰り返した。最後に融解曲線分析を行った。条件間での比較を行うために、サンプルごとに内在性コントロールである GAPDH の Ct 値で補正を行った。各条件について、独立した 3 サンプルを用いた。

表 2-3 プライマーのリスト

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplicon size (bp)	Reference
<i>GAPDH</i>	TTGAGGTCAATGAAGGGGTC	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	117	Kirkeby 2012
<i>Oct ¾</i>	CCGAAAGAGAAAGCGAACCAG	AGAACCACACTCGGACCACATC	149	Hou 2013
<i>PAX6</i>	GCCCTCACAACACCTACAG	TCATAACTCCGCCCATTCAC	149	Yu 2014
<i>FoxG1</i>	TGGCCCATGTGCGCCCTTCCT	GCCGACGTGGTGCCGTTGTA	77	Hou 2013
<i>Nkx2.1</i>	AGGGCGGGGCACAGATTGGA	GCTGGCAGAGTGTGCCCAGA	88	Kirkeby 2012
<i>Meis2</i>	CCAGGGGACTACGTTTCTCA	TAACATTGTGGGGCTCTGTG	219	Hou 2013
<i>Brachyury</i>	ATGACAATTGGTCCAGCCTT	CGTTGCTCACAGACCACAG	117	Ozair 2013
<i>SOX17</i>	GGCGCAGCAGAATCCAGA	CCACGACTTGCCCAGCAT	61	Ozair 2013
<i>CDX2</i>	AGCCAAGTGAAAACCAGGAC	TCCTCCGGATGGTGATGTAG	112	Yang 2015

表 2-4 プライマーの増幅効率

Gene	Efficiency (%)	R2
<i>GAPDH</i>	96.96	0.999
<i>Oct ¾</i>	87.89	0.998
<i>PAX6</i>	99.95	0.994
<i>FoxG1</i>	97.93	0.999
<i>Nkx2.1</i>	112.15	0.977
<i>Meis2</i>	77.6	0.992

2-3-6 iPS 細胞に対する電気刺激

電気刺激が iPS 細胞の分化方向に与える影響を評価する目的で、電気刺激を行った。刺激のために、透明導電性材料である ITO を蒸着したガラス基板を用いた。本項では、最初に ITO 基板を用いた刺激デバイスの作製方法、およびコーティング方法について述べる。次に、刺激装置の構成および刺激波形について述べる。最後に、iPS 細胞の分化方向を評価するための培養および刺激条件について述べる。

刺激デバイスは、ITO 基板にガラスリングおよび銅線を接着することで作製した。図 2-14 に刺激デバイスを示す。ITO 基板 (CBC オプテクス) を洗浄した後、内径 18 mm, 外形 22 mm のガラスリングを、基板に接着させた。主剤と硬化剤を重量比 10 対 1 で混合した二液型 RTV ゴム (KE-103; 信越シリコン) を用いて、80°C に設定したホットプレート上で 1 時間静置することで硬化させ、ガラスリングと基板を接着させた。次に、導電性ペースト (Dotite FC-415; 藤倉化成) を用いて、銅線と ITO 基板を接着させた。Dotite は、150°C に設定したホットプレート上で 1 時間静置することで硬化させた。ITO 基板上に付着したタンパク質を除去する目的で、塩基性洗剤 (コンタミノン LS-II; 和光純薬) を用いて基板を洗浄した。続いて、コンタミネーションを防止する目的で、作製した電気刺激デバイスを 70% エタノールで洗浄した。次に、エタノールを除去するために、milliQ 水で 3 回洗浄した。最後に、0.1% ゼラチン溶液を添加しインキュベータ内で 1 晩静置することでコーティングを施した。また、刺激の局在性を評価するための実験では、培養底面の一部のみに ITO が蒸着された基板を用いた。

刺激デバイスの底面の電極から、電気刺激装置 (SEN-8203; 日本光電) およびアイソレータ (SS203J; 日本光電) を用いて、定電圧刺激を印加した。電気刺激実験の概要を図 2-15 に示す。刺激パルスには、各極の持続時間が 10 ms の双極性パルスを用い、刺激強度を 1-3 V とした。また、刺激を印加する際は、培養液面にコイル状に加工した白金線を留置し、対向電極とした。

iPS 細胞の分化方向に電気刺激が与える影響を評価する目的で、培養中の iPS 細胞に電気刺激を印加した。継代日を 0 日目として、3 日目までは通常の培養条件で培養した。3 日目から 6 日目までは、自発的な分化を促進させる目的で、培養液から bFGF を除去した。6 日目において RNA を抽出し、遺伝子発現量を評価した。電気刺激のパターンとして、慢性的に刺激を印加した条件 (chronic), および急激に刺激を印加した条件 (acute) の 2 通りの刺激パターンを用いた。Chronic では、3 日目から 6 日目まで、1 時間ごとに 1 回ずつ刺激を印加した。Acute では、培養 3 日目の培地交換の前に、5 回の刺激を 1 分間隔で印加した。また、対照群 (control) として、刺激を印加しない群も用意した。

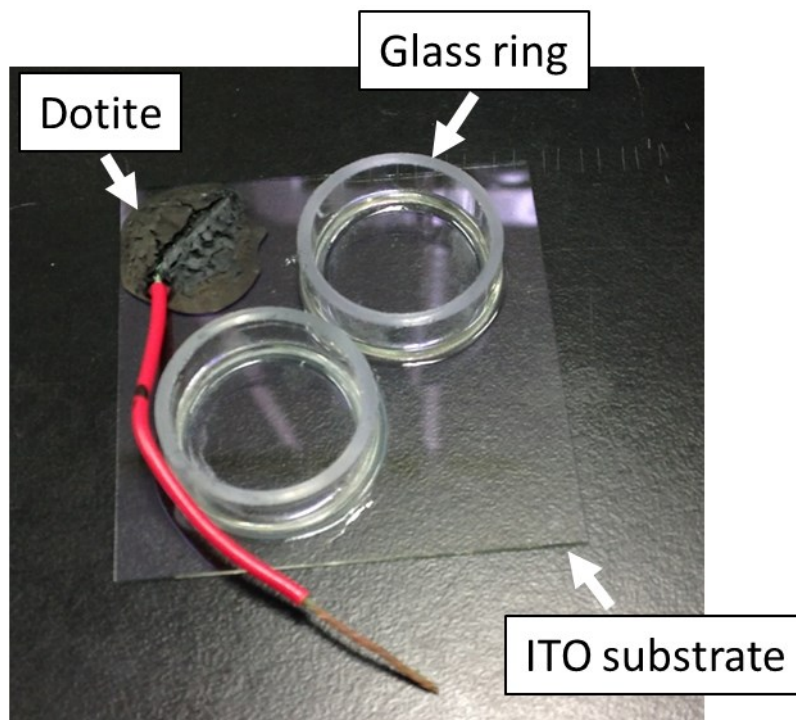


図 2-14 電気刺激デバイス．透明導電性材料である ITO 上に，ガラスリングおよび銅線を接着した．

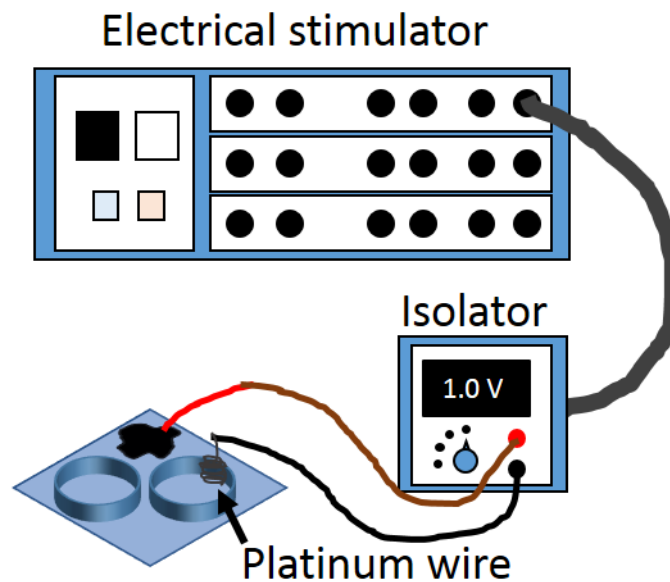


図 2-15 電気刺激実験の概要．ITO 基板上で培養した iPS 細胞に対し，電気刺激装置およびアイソレータから電気刺激を印加した．対向電極として，培養液面に留置した白金線を用いた．

2-4 分化過程および分化細胞の評価

ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導実験において重要な点は、用いた iPS 細胞が未分化状態を維持していること、および分化誘導時に目的とした細胞種に分化していることである。本節では、AP 染色および免疫組織化学染色を用いて未分化性を、免疫組織化学染色および PCR 法を用いて分化した細胞種の評価を行った。以下に、未分化性、分化の時間経過、および分化後の細胞種について評価した結果を示す。

2-4-1 未分化性の確認

ヒト iPS 細胞は、Feeder 細胞上でコロニーを形成させた状態で維持培養した。3 つの独立した培養皿において、それぞれ無作為に選んだ 10 個ずつのコロニーのサイズを計測したところ、5 日後にはコロニーの直径が 1 mm 程度となった。多くの細胞は、多能性幹細胞に特徴的な、細胞質に対する細胞核の割合が高い形状を維持した。また、継代 4 日後程度から、一部のコロニーの中心部付近において、自発的に分化した様子が観察された。培養中のヒト iPS 細胞の多くが未分化状態を維持していることを確認する目的で、AP 染色および免疫組織化学染色を行った。代表的な AP 染色および免疫組織化学染色の結果を図 2-16 に示す。AP 染色では、コロニーの部分のみが青紫色に染色されており、コロニー内の細胞が AP 活性を保持していたことが示された (図 2-16A)。また、多能性幹細胞マーカーとして用いられる nanog タンパク質に対する抗体を用いた免疫組織化学染色の結果より、コロニー内の多くの細胞が nanog 陽性 (緑色) であり、未分化状態が維持されていたことが示された (図 2-16B)。さらに、同時に S 期の細胞のみを BrdU を用いて特異的に染色したところ、半数程度の細胞が BrdU 陽性 (赤色) であった。以上より、本研究において培養したヒト iPS 細胞は、多くのコロニーにおいて未分化状態を維持していたことが示唆された。

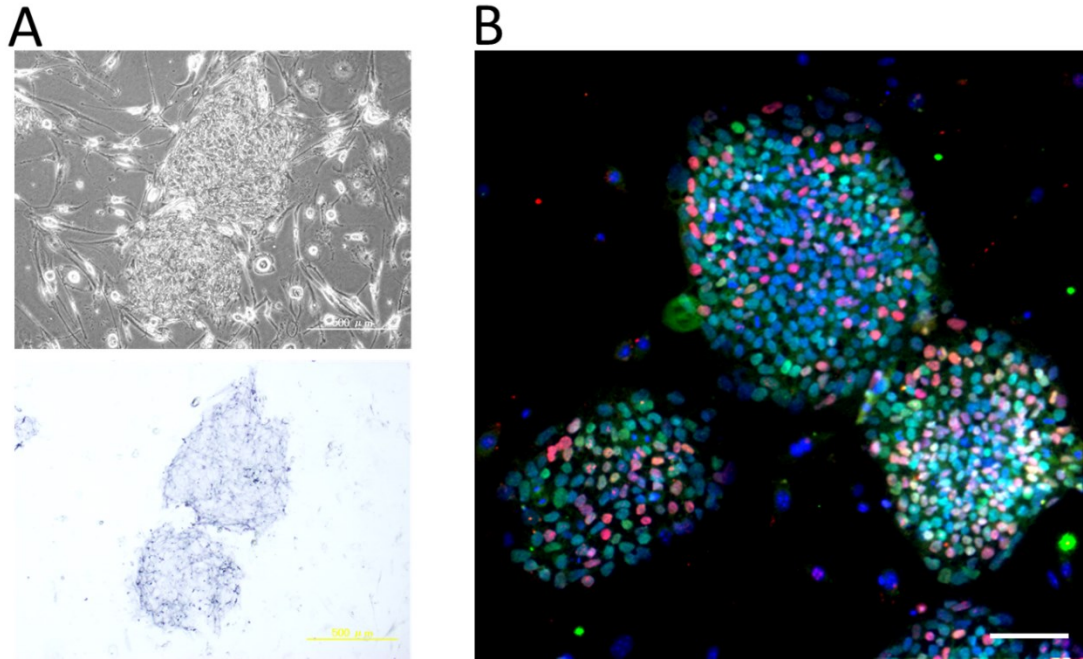


図 2-16 未分化状態の iPS 細胞のコロニー. (A) 位相差顕微鏡画像 (上) と AP 染色画像 (下). 下図で青紫色の部分, 多能性幹細胞を示す陽性部位. (B) 免疫組織化学染色法を用いた未分化状態の確認. 多能性幹細胞のマーカーである Nanog (緑色), および S 期の細胞を示す BrdU (赤色) に対する抗体を用いて染色を行った. また, 細胞核は DAPI を用いて染色した (青色). スケールバーは 100 μm .

2-4-2 分化のタイムコース

未分化状態のヒト iPS 細胞が、神経上皮細胞を経由して神経幹細胞へと分化する過程を、形態の変化および mRNA の発現から評価した。

位相差顕微鏡を用いて、分化誘導から細胞の形態を観察した。図 2-17 に結果を示す。3 DAI では、iPS 細胞特有の形状を示したが、6 DAI には細胞の密度が高くなり細胞核が不明瞭となった。10 DAI に継代操作を行ったところ、1 日後 (11 DAI) には凝集塊が培養皿底面に生着し、端部の細胞が放射状に遊走した。さらに培養を続けたところ、15 DAI で細胞が放射状に配列した構造を形成した。上記の放射状構造は、先行研究において *rosette* と呼ばれており、神経系の細胞に分化したことを示すマーカーとして用いられている [Shi 2012b]。bFGF を投与した後、*rosette* の数が増加し、19 DAI には複数の *rosette* を含むコロニーが見られるようになった。19 DAI で細胞を単離し継代したところ、23 DAI には再び *rosette* を形成した様子が観察された。また、20 DAI から、突起状の構造を持つ細胞が観察された。27 DAI には、多くの細胞が突起を有する状態となり、*rosette* の数が減少した。

神経系細胞への分化過程を評価する目的で、0 DAI から 12 DAI まで 3 日ごとに細胞の RNA を抽出し、未分化マーカー *Oct3/4*、前脳マーカー *forkhead box G (FoxG) 1*、および神経上皮細胞マーカー *paired box (PAX) 6* の mRNA について、発現量を評価した。図 2-18 および図 2-19 に結果を示す。全ての結果は、分化誘導開始直前の発現量を基に正規化して表示した。また、コロニーの状態で維持培養している iPS 細胞からも RNA を抽出し、評価を行った。*FoxG1* は、維持培養時は発現量が高かったが、分化誘導開始後に発現量が減少した後、日数の経過とともに上昇し、12 DAI には 326 ± 37 倍 (mean \pm SD, $n = 3$) となった。また、維持培養時は、0 DAI と比較して 20.7 ± 8.6 倍 (mean \pm SD, $n = 3$) の発現量であった。*PAX6* は 3 DAI には 800 倍以上の発現量に変化した。*Oct3/4* は、分化誘導を始めてから発現量が単調に減少し、12 DAI には 0.0026 ± 0.0008 倍 (mean \pm SD, $n = 3$) となった。以上は、日数の経過に伴って未分化細胞が減少し、前脳の神経上皮細胞が増加したことを示し、分化誘導に用いた手法が目的通り機能したことを示唆する。

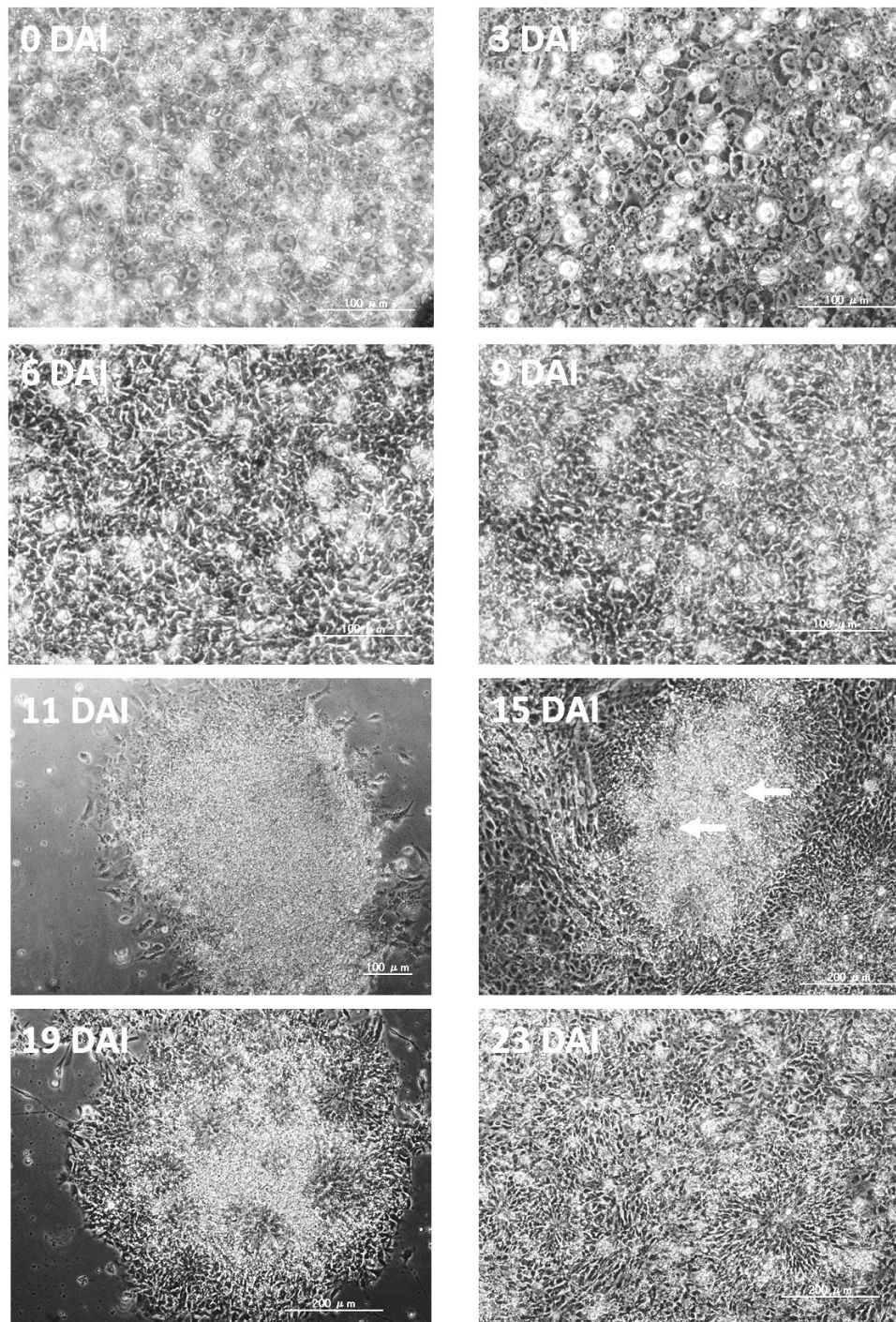


図 2-17 ヒト iPS 細胞から神経系細胞への分化過程. 分化誘導 3 日後では, 未分化状態と同様に細胞体に対する細胞核の比率が高い形状を維持していた. 6 日目には細胞核の比率が小さくなった. 9 日目には細胞の密度が上昇した. 10 日目に継代を行い, 継代 1 日後である 11 日目には細胞の凝集塊が底面に生着し, 複数の細胞が周囲に遊走する様子が観察された. 15 日目には rosette が形成された (矢印). 19 DAI には多数の rosette が観察された. 20 日目以降, 突起様の構造を有する細胞が観察された. DAI, days after induction.

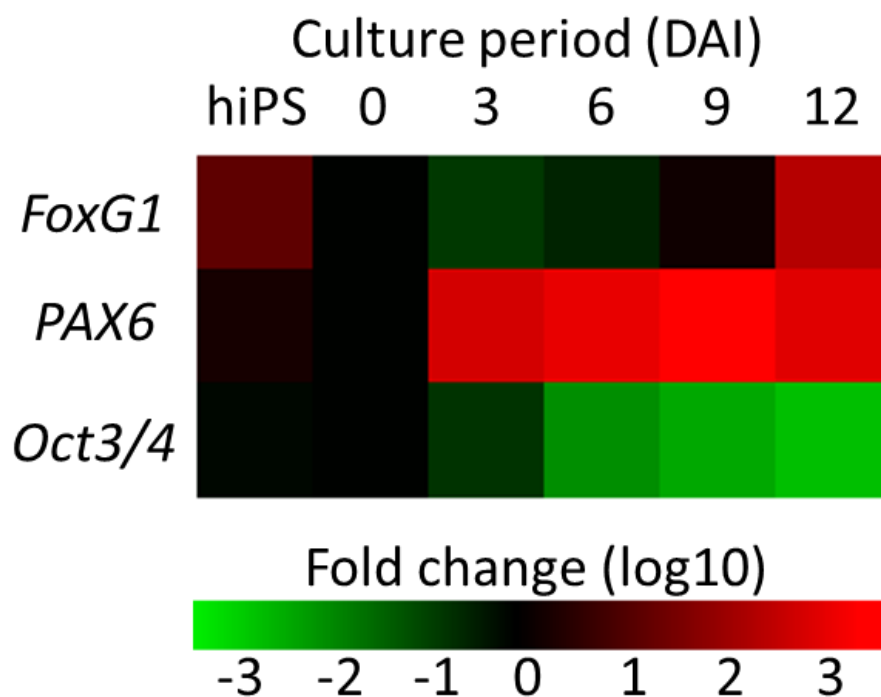


図 2-18 分化過程における遺伝子発現変化. 前脳マーカー *FoxG1*, 神経上皮マーカー *PAX6*, および未分化マーカー *Oct3/4* について, 遺伝子発現量を評価した. 分化誘導後に, *FoxG1* および *PAX6* の発現量は上昇したのに対し, *Oct3/4* の発現量は低下した. hiPS は, 維持培養の状態における発現量であり, 0 day after induction (DAI) は分化誘導用に CELLstart 上で培養した状態における発現量である.

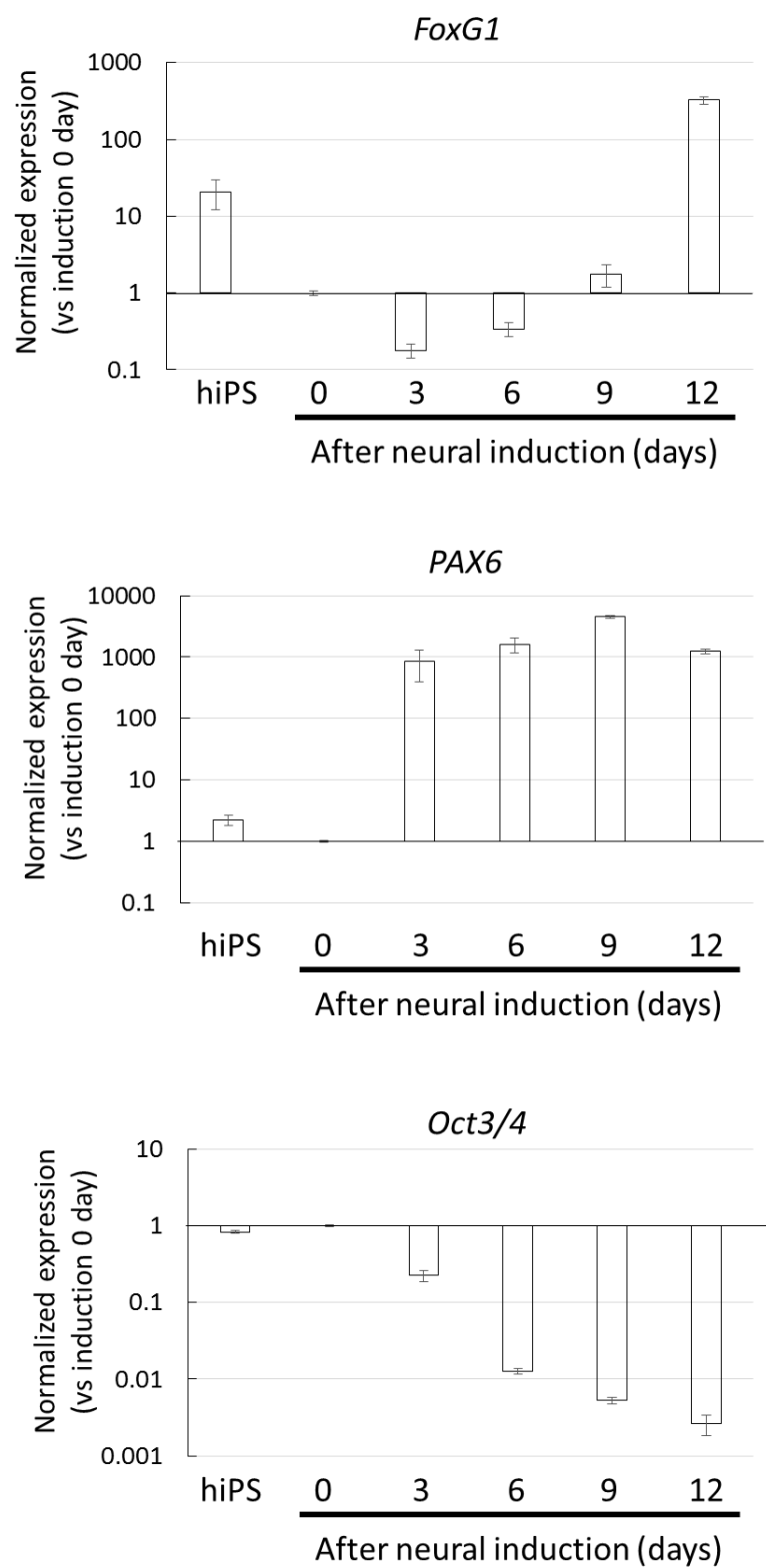


図 2-19 遺伝子の発現量の変化. 図 2-18 に示したそれぞれの遺伝子について表示. $n = 3$, mean \pm SD.

2-4-3 分化した細胞種

本手法では、iPS 細胞が発生と同様の順序で神経系細胞へと分化することが想定される。前述の通り、神経発生においては、前後軸および背腹軸の決定が起こる。そこで、神経上皮細胞に薬剤を添加し、分化方向を制御する実験を行った。最初に、分化初期の薬剤添加により、前後軸の制御実験を行い、PCR 法を用いて様々な領域の神経系細胞のマーカーとして用いられるタンパク質をコードする mRNA の発現量を評価した。次に、12 DAI まで control の条件で培養し、継代操作後から背腹軸を制御する因子である Wnt シグナルと Shh シグナルに関連する薬剤を添加した。20 DAI において PFA を用いて固定した後に、免疫組織化学染色法を用いて細胞の種類を評価した。

初期の神経上皮細胞が有する吻側と尾側への分化能を確認するために、分化誘導途中の細胞に誘導因子を添加した。図 2-20 に実験の概要を示す。また、図 2-21 および図 2-22 に結果を示す。IWP2 を用いて Wnt を阻害した条件では、*FoxG1* の発現が上昇した。一方、pur を用いて Shh シグナルを働かせることにより、*FoxG1* の発現量が減少した。Wnt の抑制によって分化方向が吻側に寄ることについては、複数の報告があり、先行研究の結果と一致する [Gaspard 2008; Li 2009]。また、Shh は、Dkk1 を低下させることにより、分化方向を尾側に制御することが報告されており [Fasano 2010]、本結果は妥当であると考えられる。また、Pur のみを添加した条件では、medial ganglionic eminence (MGE) マーカーである *NK2 homeobox 1 (Nkx2.1)* の発現量が上昇した。しかし、IWP2 と pur を両方添加した場合、*Nkx2.1* の発現量が顕著に低下した。また、背側前駆細胞のマーカーである *PAX6* と、lateral ganglionic eminence (LGE) マーカーである *Meis2* の発現量は、control の条件が最大となった。以上から、分化途中の神経外胚葉の細胞は、吻側への分化能を持つことが示された。一方、control の条件にさらに薬剤を添加し、吻側かつ背側や腹側の細胞への選択的な分化誘導を目指す場合には、薬剤の濃度や添加するタイミング等、より詳細な条件の検討が必要であることも示唆された。

分化後期の神経上皮細胞が背側および腹側への分化能を持つことを確認する目的で、12 DAI に継代操作を行った後、培養液にパターンニング因子を添加した。なお、神経幹細胞の増殖を促進する目的で、16 DAI から 18 DAI までは bFGF を添加した。図 2-23 に実験の概要を示す。パターンニング因子として、cyc、IWP2 および pur を用いた。パターンニング因子は、12 DAI に継代操作を行った直後から、20 DAI に固定するまでの間添加した。図 2-24 に、各条件で培養した細胞の代表的な染色画像を示す。背側に分化誘導した条件および control では、PAX6 陽性（赤色）の細胞の割合が多く、Nkx2.1 陽性（緑色）の細胞の数は少なかった。一方、腹側に分化誘導した条件では、PAX6 が細胞核に局在している細胞は少なく、Nkx2.1 陽性の細胞が多く存在した。定量的に評価する目的で、各マーカーが陽性の細胞を数えた。結果を図 2-25 に示す。Cyc による背側誘導条件および control では、PAX6 陽性の細胞がそれぞれ 90% および 96% となり、多くの細胞が背側の形質を獲得したことが示された。また、pur により腹側誘導した細胞では、Nkx2.1 陽性の細胞の割合が 46% とな

り，他の条件と比較して多くの細胞が腹側の形質を得たことが示された．したがって，ヒト iPS 細胞がパターンニング因子を添加しない条件では背側の神経上皮細胞に分化したこと，および 12 DAI において腹側の細胞への分化能を有していたことが示された．先行研究では，ヒト多能性幹細胞を前脳の細胞に分化誘導した場合，腹側への誘導因子を添加しない限り，大多数が背側の細胞に分化することが示されており [Shi 2012b]，本結果と一致する．以上から，ヒト iPS 細胞を，目的とした細胞種である神経上皮細胞へと分化誘導できたことが示唆された．

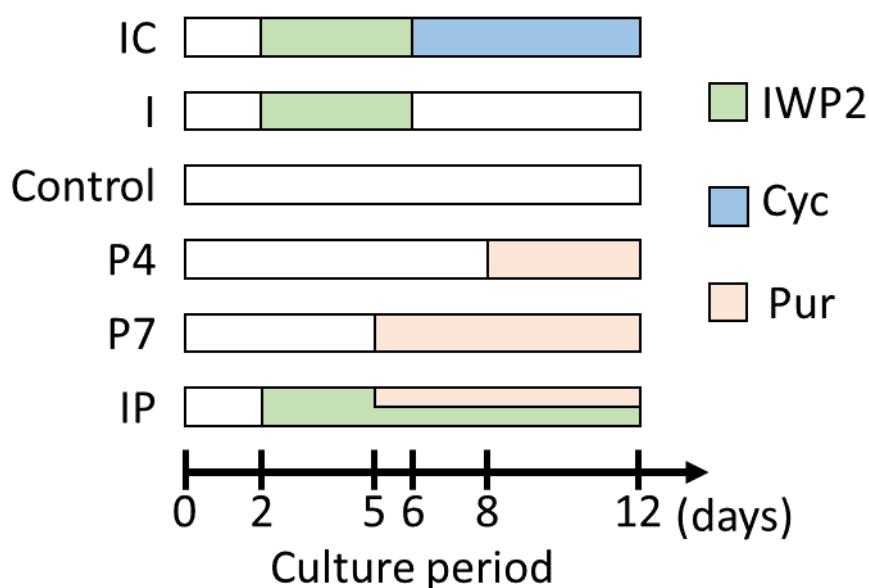


図 2-20 前後軸の操作実験の概要．全ての条件に共通して，神経系細胞へと分化誘導する目的で，SB431542 および dorsomorphin を添加した．IC, IWP2 と cyc を添加；I, IWP2 を添加；P4, pur を 8 日目から 4 日間添加；P7, pur を 5 日目から 7 日間添加；IP, IWP2 および pur を添加．

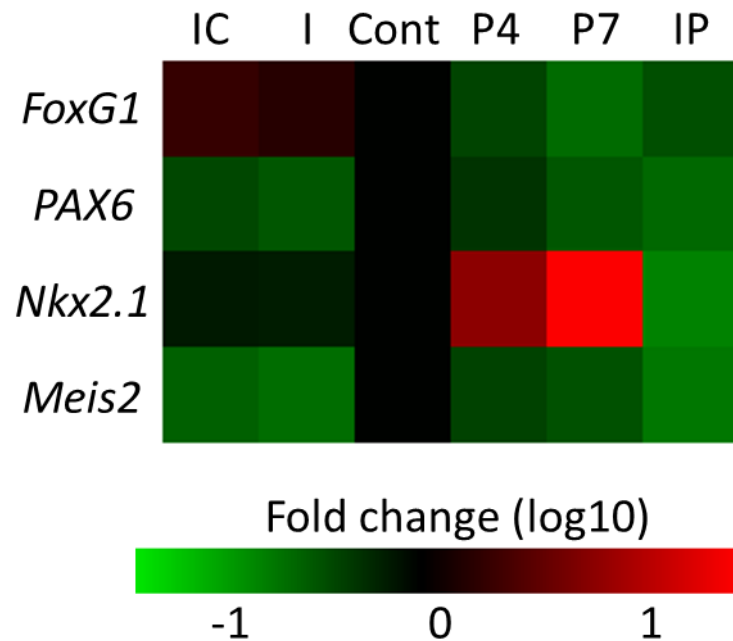


図 2-21 薬剤添加による分化方向の変化. 前脳マーカー *FoxG1*, 神経上皮マーカー *PAX6*, medial ganglionic eminence マーカー *Nkx2.1*, および lateral ganglionic eminence マーカー *Meis2* を評価の対象とした. 図 2-20 に示した分化誘導の条件を用いた.

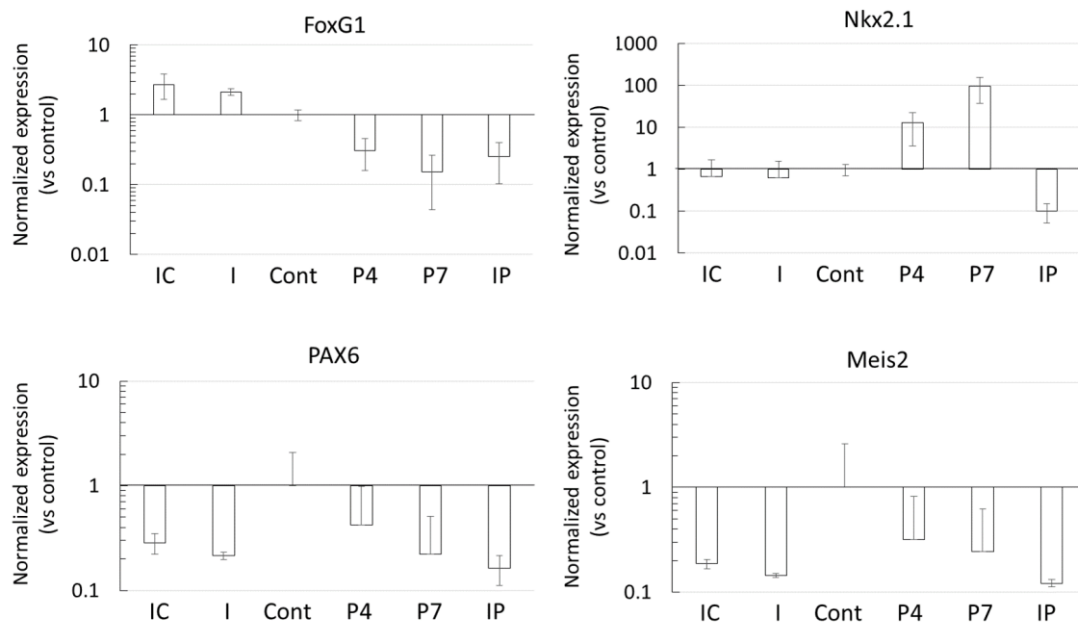


図 2-22 薬剤添加による遺伝子発現変化. 図 2-21 に示したそれぞれの遺伝子について表示した. 図 2-20 に示した分化誘導の条件を用いた. $n = 3$, mean \pm SD.

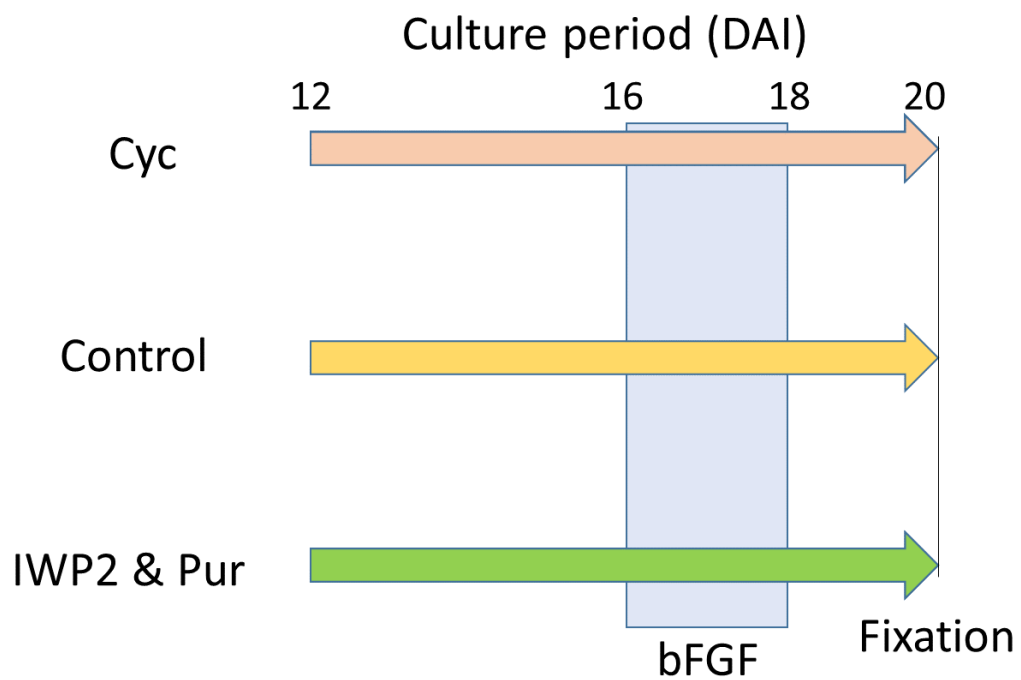


図 2-23 背腹軸の調節実験の概要. 12 日目まで通常の条件で分化誘導し, 12 日目の継代後に 3 種類の条件で培養した. 20 日目に固定し, 免疫組織化学染色法を用いて評価した. また, 神経幹細胞の増殖を促進する目的で, 16 日目から 18 日目までは bFGF を添加した. DAI, days after induction.

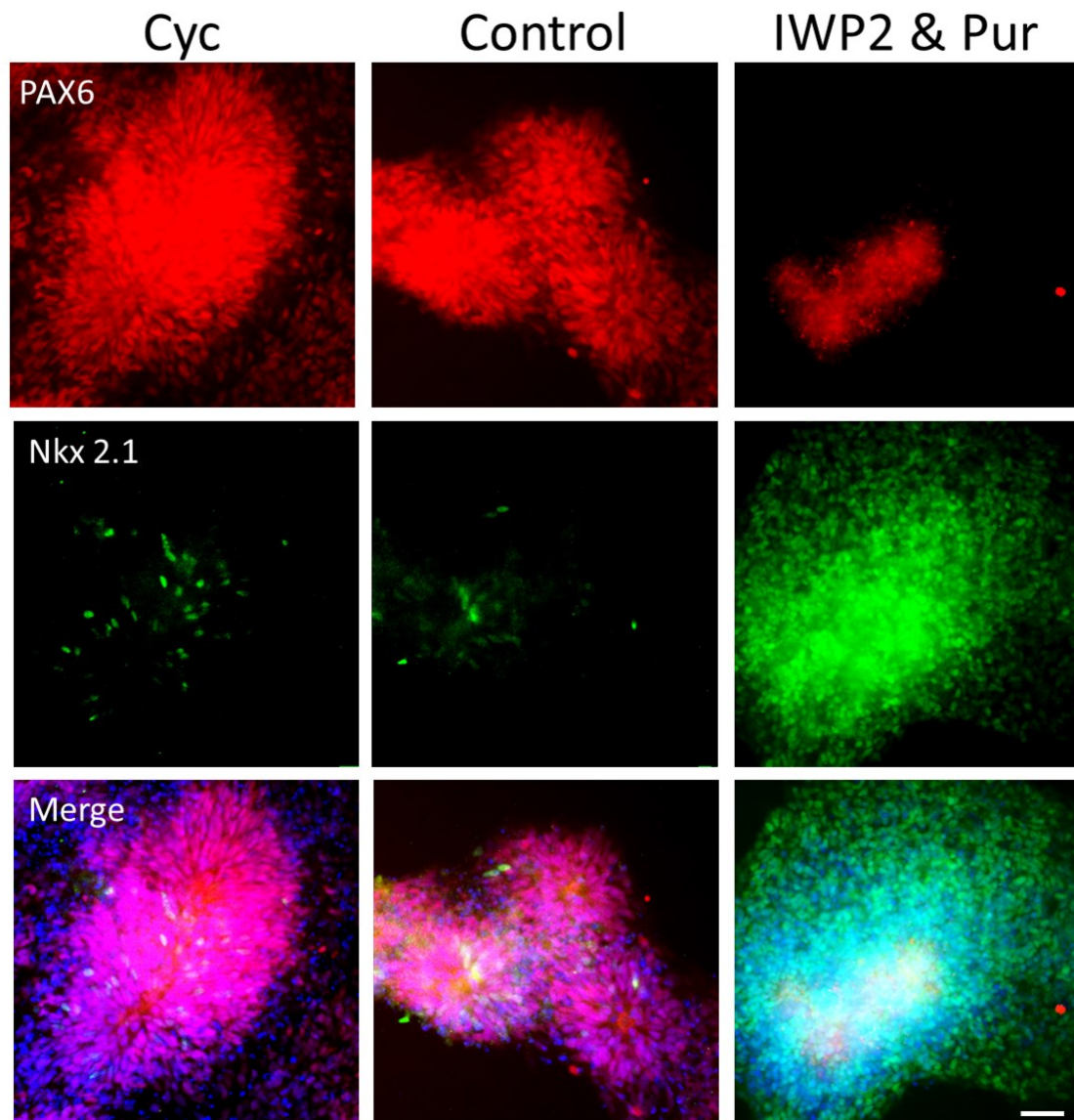


図 2-24 因子の添加による背腹軸の調節. 分化した神経系細胞の背腹軸を評価するために, 背側マーカー PAX6 (赤色) および腹側マーカー Nkx2.1 (緑色) を標識した. 細胞核を DAPI (青色) により染色した. IWP2 および pur を添加した条件では, Nkx2.1 を発現した細胞が多かった. 一方, その他の条件では, PAX6 を発現した細胞の比率が高かった. 図 2-23 に示した条件を用いて分化誘導し, 20 日目に固定した. スケールバーは 50 μm .

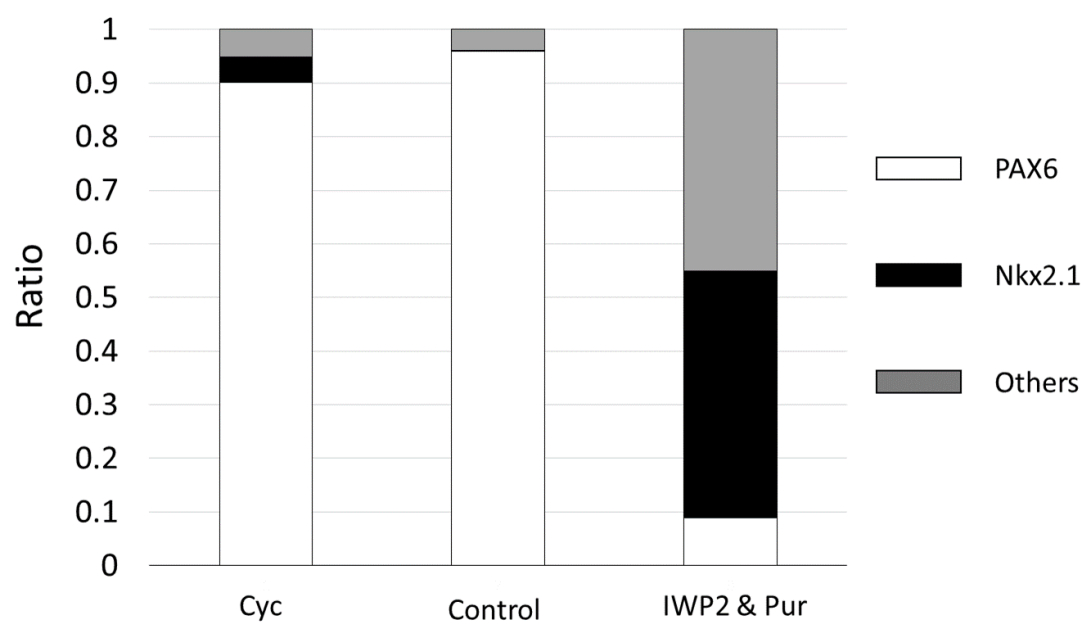


図 2-25 背腹軸に関する細胞種の存在比率. 図 2-24 に示した細胞のうち, PAX6 および Nkx2.1 を発現した細胞を数えた. それぞれの条件について, 700 個以上の細胞を数えた.

2-5 Ca 変動の評価

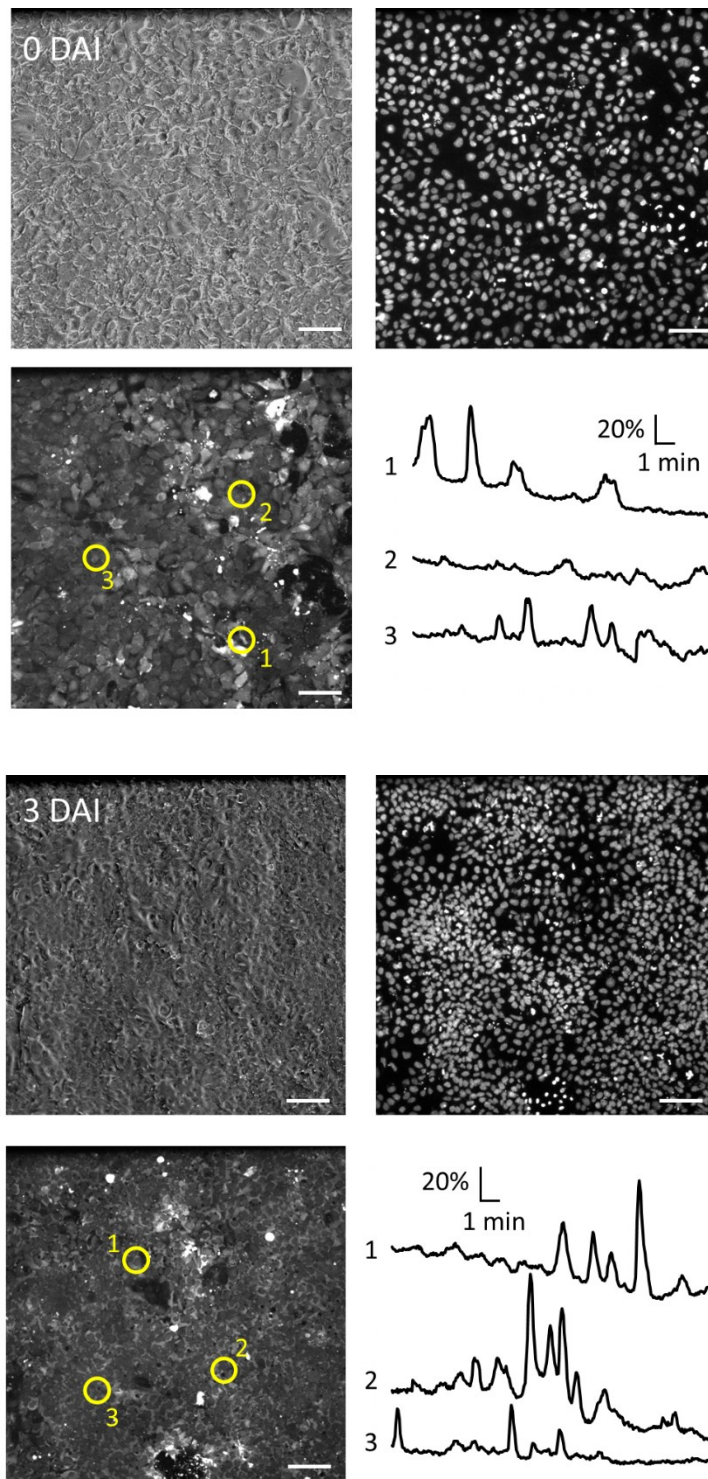
物理的刺激を用いた多能性幹細胞の精密な分化誘導法に関する知見を得るために、ヒト iPS 細胞が神経系細胞に分化する過程において観察される Ca 変動を計測し、細胞周期との関連性を評価した。最初に、ヒト iPS 細胞から神経上皮細胞への分化過程において経時的に Ca imaging を行い、時間経過による活動パターンの変化を可視化した。さらに、神経分化過程において観測される特徴的な活動パターンである Ca wave について、関与する受容体を評価した。最後に、未分化状態のヒト iPS 細胞における Ca 変動と細胞周期との関係性を評価した。

2-5-1 分化過程における Ca 変動のパターン

ヒト iPS 細胞の Ca 変動を 0 DAI から 9 DAI まで 3 日ごとに計測した。図 2-26 に各時期における計測結果を示す。左上および右上の画像は、それぞれ位相差顕微鏡画像および同じ視野において撮影した核染色画像を示す。また、左下および右下は、輝度値を取得した位置および輝度値の変動の波形を示す。細胞核染色の画像より、培養日数の経過に伴い細胞密度が増加したことが示された。また、0 DAI においては、画像中の多くの細胞に焦点が合った状態であったが、6 DAI からは焦点が合わない細胞が増えたことより、細胞が多層の構造を形成したことが示唆された。以上から、6 DAI 以降の試料では細胞核染色により個々の細胞を識別することが困難であると考え、個々の細胞レベルでの評価は行わなかった。

0 DAI においては、個々の細胞が独立に Ca 変動を示した。3 DAI には、Ca 変動の頻度が高くなった。また、一部の領域では Ca wave が観察された。6 DAI には、3 DAI までの傾向とは異なり、個々の細胞での活動は少なくなり、多くの領域で Ca wave が観察された。図 2-27 に代表的な Ca wave の伝播の様子を示す。計測した試料では、15 分間の計測期間に 24 ± 8 回 (mean \pm SD, $n = 3$) の Ca wave が起こった。また、各試料について 10 回ずつ Ca wave を抽出し評価したところ、1 回の Ca wave は、 26 ± 9 秒間 (mean \pm SD, $n = 3$) 持続し、 $4900 \pm 1700 \mu\text{m}^2$ (mean \pm SD, $n = 3$) の領域内で伝播が観測された。9 DAI では、顕著な活動を示す細胞はほとんど観察されなかった。

Ca wave の伝播に関与する受容体を評価するために、6 DAI の試料に対して ER に存在する受容体の阻害剤、および IP_3 産生の阻害剤を添加した。10 μM の ryanodine を用いて RyR を阻害した場合においても、4 試料中 3 試料で Ca wave が観測された。一方、2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) を用いて IP_3R を阻害した場合、3 試料全てで Ca wave が観測されなかった。また、control として HEPES Buffer を添加した場合、実験を行った 2 試料の両方で Ca wave が観測された。以上は、Ca wave の伝播に細胞内の IP_3R を介した IICR が関与していることを示唆している。



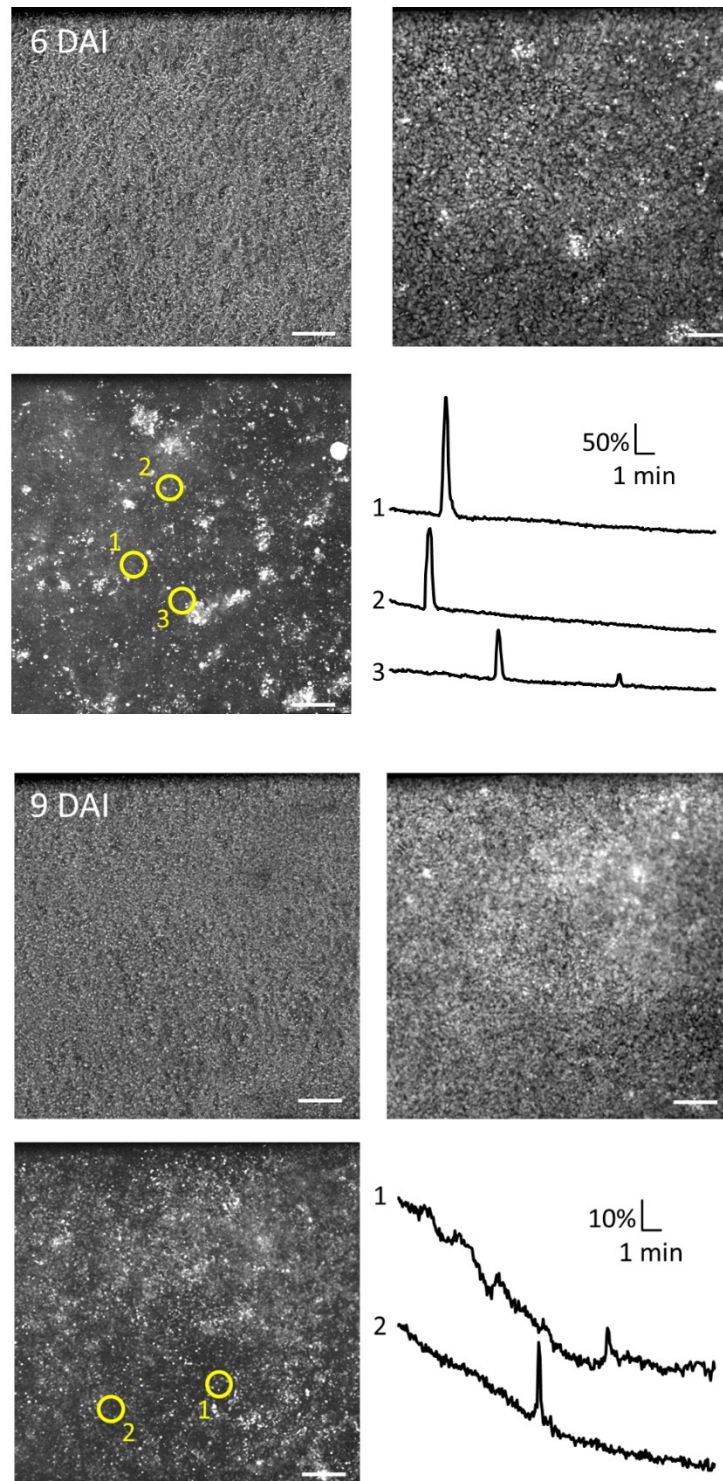
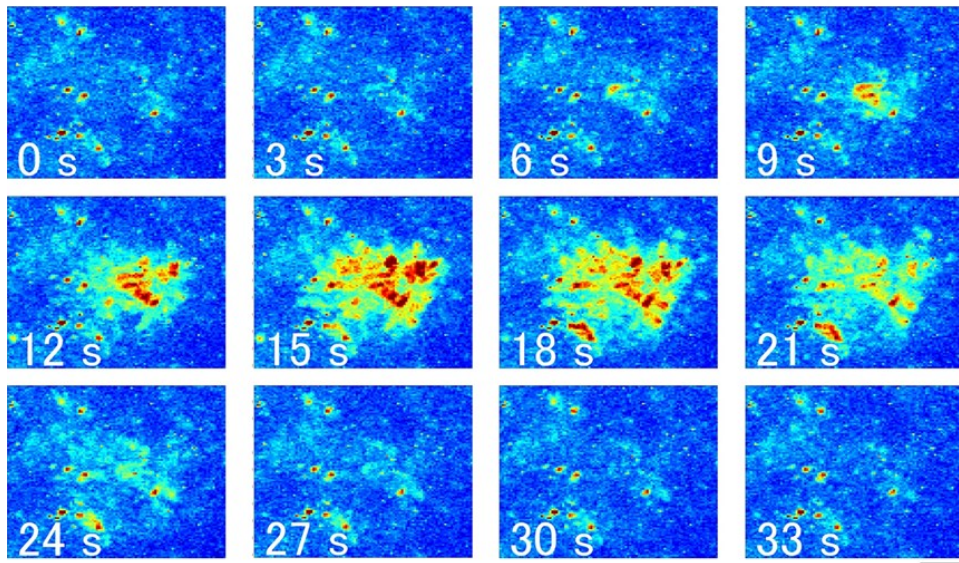


図 2-26 分化過程における Ca 変動のパターン. 位相差顕微鏡画像 (左上). Hoechst による核染色の画像 (右上). Ca imaging の代表的な視野 (左下). 代表的な Ca 変動 (右下). 0 DAI および 3 DAI においては, 複数回の Ca 変動が観察された. 日数の経過とともに, 細胞の密度が増加した. スケールバーは 100 μm . DAI, days after induction.

Control



+ Ryanodine

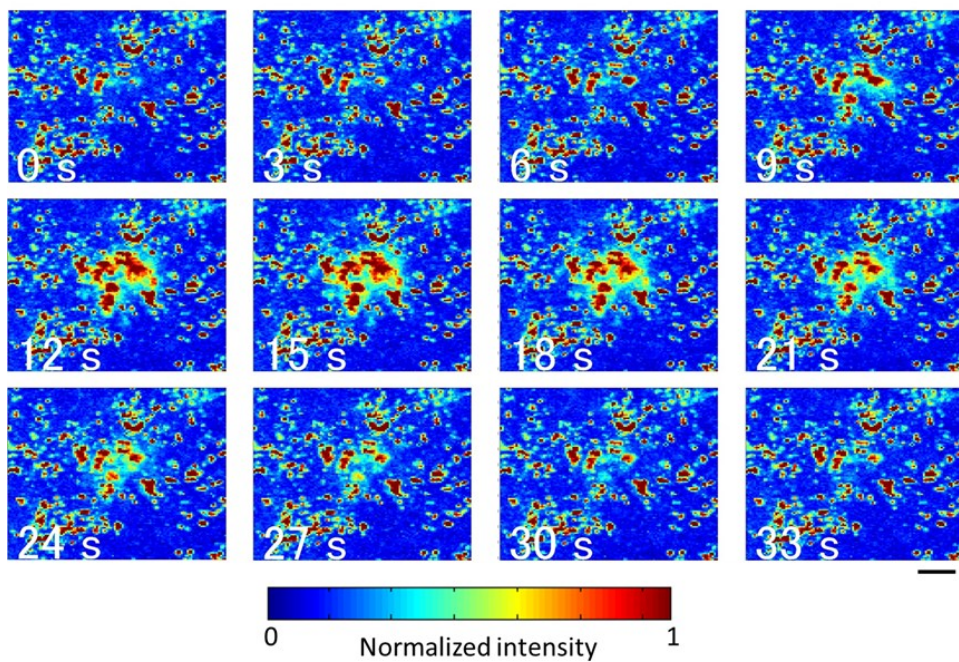


図 2-27 Ca wave の様子. 6 日目において, Ca wave が観察された. Ryanodine の存在下でも Ca wave は観察された. スケールバーは 10 μm .

2-5-2 未分化 iPS 細胞における Ca 変動と細胞周期の関係

Ca 変動と細胞周期の関係を評価するために, Ca 変動の検出と細胞周期の推定を行った. Ca imaging を行った細胞から細胞周期のステージの情報を取得するためには, Hoechst を用いた核染色の画像のみから細胞周期の推定を行う必要がある. また, Hoechst を取り込むことにより, Ca 変動の特性が変化することは望ましくない. そこで, 最初に, 2 つの予備実験を行った. 1 つ目の予備実験として, 従来手法である BrdU 染色と比較し, 核染色画像から推定した細胞周期の情報の信頼性を評価した. 2 つ目の予備実験として, Hoechst を添加した細胞と未添加の細胞を比較し, Hoechst の取り込みが Ca 変動の回数に与える影響を評価した. 次に, Ca imaging を行い, Ca 変動の特性を評価した. 最後に, Ca imaging を行った細胞の細胞周期を推定し, 細胞周期のステージと Ca 変動の関係を評価した.

BrdU を用いた細胞周期解析

新たに合成された DNA に取り込まれる BrdU を用いて S 期の細胞を標識し, 核染色画像のみからの細胞周期推定法の有効性を示した. 図 2-28 に, 継代 4 日後のヒト iPS 細胞の染色画像を示す. BrdU 陽性の細胞 (赤色) が S 期の細胞を示す. 画像解析を用いて個々の細胞を識別し, BrdU の輝度値および DAPI 染色の輝度値を指標としてプロットした. 結果を図 2-29 に示す. BrdU および DAPI の輝度値を指標として, 混合ガウス分布を用いたクラスタリングを行った. 図 2-30 に, 図 2-28 に示した試料の BrdU の輝度値のヒストグラムを示す. 図 2-30B は推定した混合ガウス分布であり, BrdU 陽性の分散の大きな分布と, BrdU 陰性の分散の小さな分布がフィッティングできたことが示された. 推定した 2 つの分布から, それぞれの分布に含まれる確率が等しくなる輝度値を閾値として決定した. 閾値を基に BrdU を指標として分別を行い, BrdU 陽性細胞を S 期の細胞とみなした. さらに, BrdU 陰性であった細胞を DAPI の輝度値を基に 2 つのクラスタに分別した. 図 2-31 に, 同じ試料における DAPI の輝度値のヒストグラムを示す. 図 2-31A および B は, それぞれ全細胞および BrdU 陰性細胞のヒストグラムである. 図 2-31C より, BrdU 陽性細胞をあらかじめ除外することで, 2 つの分布の分離が容易になることが示された. BrdU を指標としたクラスタリングと同様の手順で 2 つの群に分別し, 輝度値が相対的に低い群を G0 期および G1 期, 高い群を G2 および M 期とみなした. クラスタリング後の各ステージの細胞の比率を図 2-32 に示す. G0/G1 期, S 期および G2/M 期の群は, それぞれ $26 \pm 8\%$, $49 \pm 3\%$ および $25 \pm 6\%$ (mean \pm SD, $n = 21$) となった.

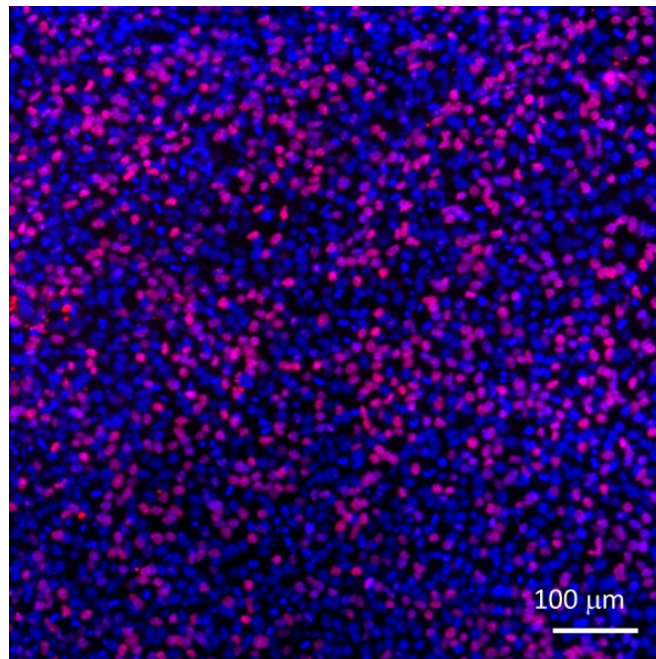


図 2-28 代表的な BrdU 染色画像. 継代 4 日後に, BrdU を用いて S 期の細胞 (赤色) を標識した. 細胞核は, DAPI を用いて染色した (青色).

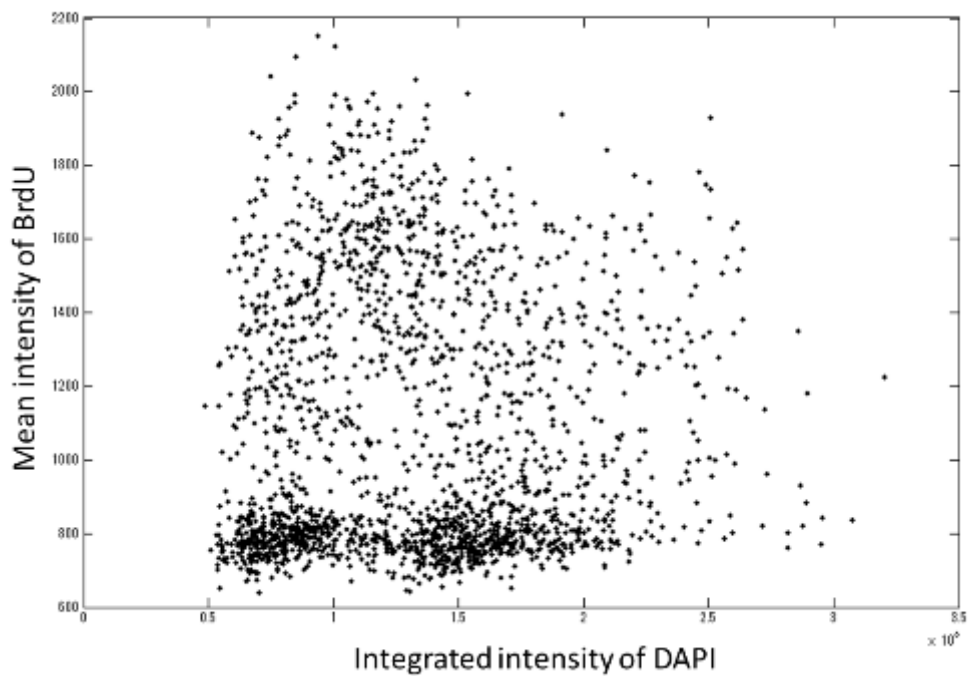


図 2-29 DAPI の輝度値に対する BrdU の輝度値. BrdU および DAPI の輝度値として, それぞれ細胞内の平均輝度値および輝度の合計値を用いた.

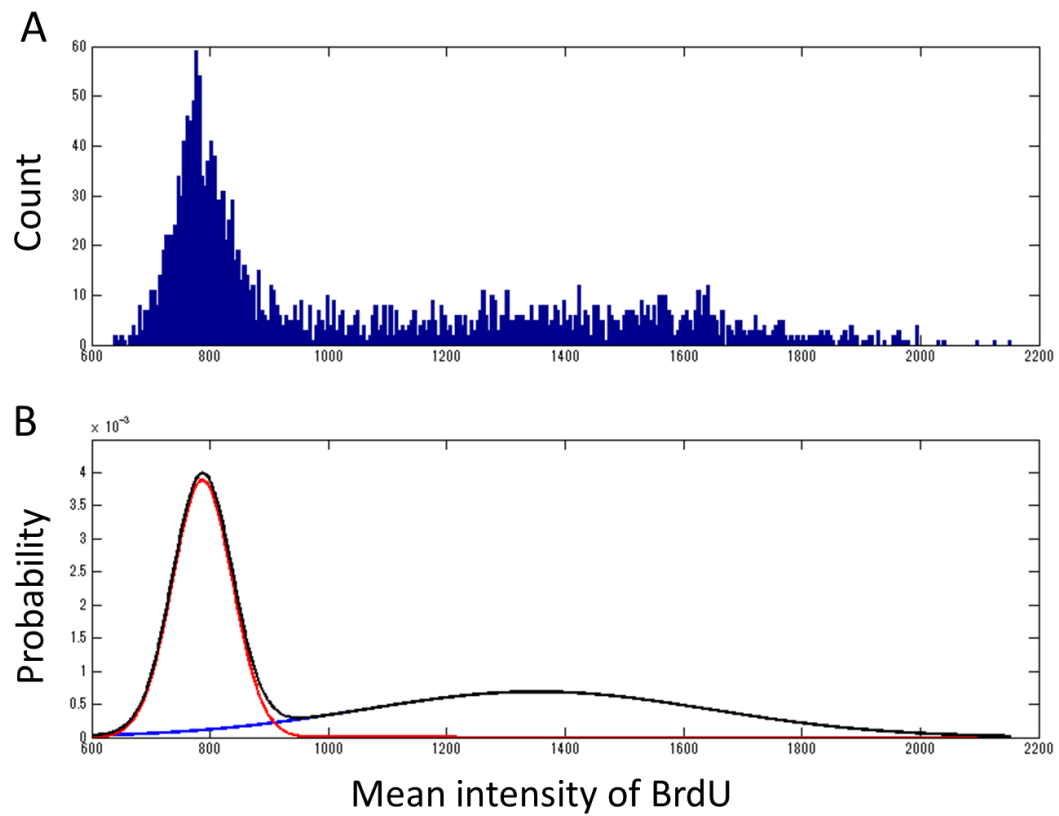


図 2-30 BrdU のヒストグラムと混合ガウス分布. (A) BrdU のヒストグラム. (B) 混合ガウス分布. BrdU の分布から, 陽性 (青色) および陰性 (赤色) の 2 つの分布を推定した. BrdU 陽性の細胞が S 期の細胞であると考えられる. 黒色は, 全細胞の分布.

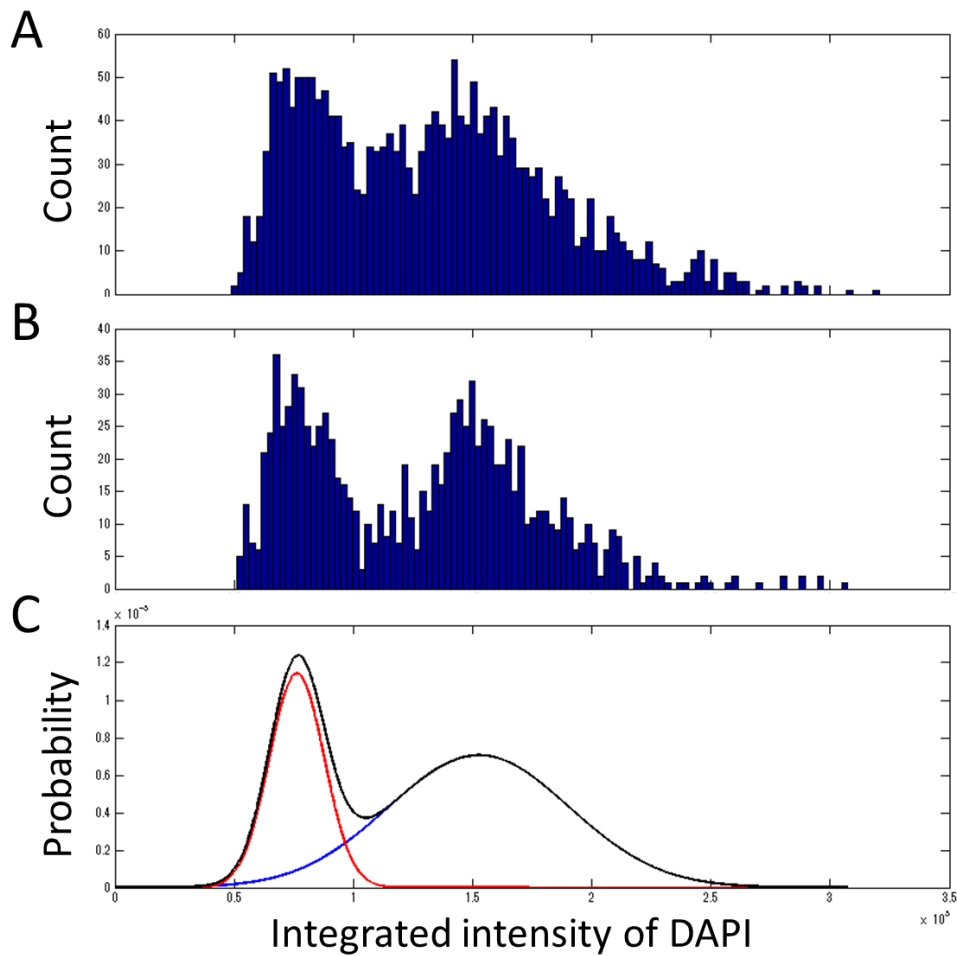


図2-31 DAPIのヒストグラムと混合ガウス分布.(A) 全細胞での, DAPIのヒストグラム. (B) BrdU 陽性細胞を除去した後のヒストグラム. BrdU 陽性細胞を除去することで, 分布が2つに分かれた. (C) BrdU 陽性細胞除去後のヒストグラムにフィッティングした混合ガウス分布. DAPIの輝度値が高い分布 (G2/M 期; 青色) と低い分布 (G0/G1 期; 赤色) に分かれている.

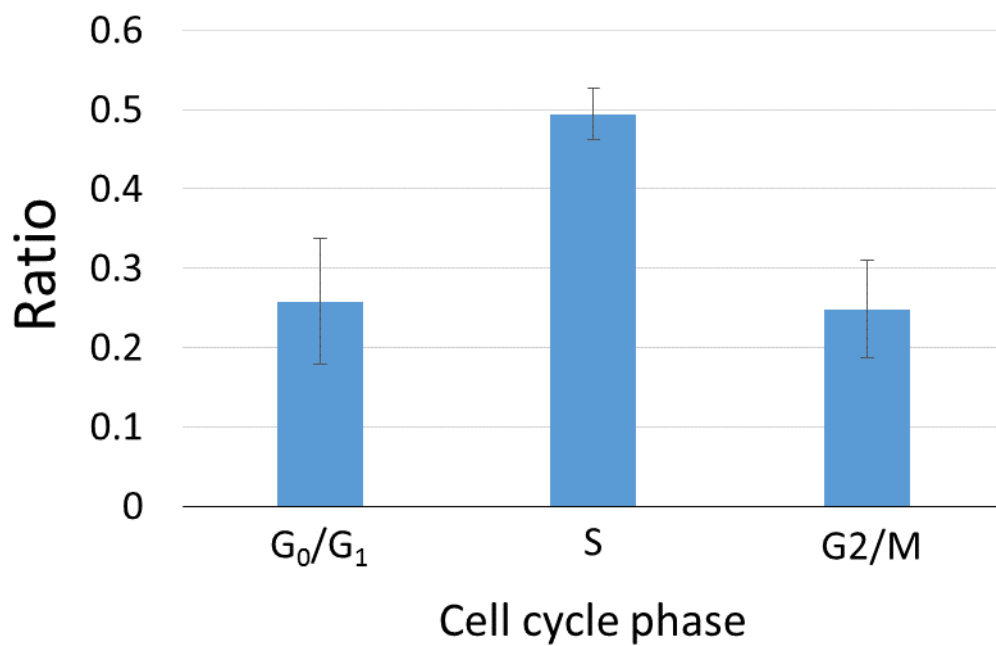


図 2-32 ヒト iPS 細胞における細胞周期の比率. BrdU を用いて細胞周期を推定した. G₀/G₁ 期, S 期および G₂/M 期の細胞は, それぞれ $26 \pm 8\%$, $49 \pm 3\%$ および $25 \pm 6\%$ となった. Mean \pm SD, $n = 21$.

核染色画像による細胞周期解析

核染色画像のみを用いて細胞周期の推定を行った。図 2-33 に、核染色画像のヒストグラムと、推定した混合ガウス分布を示す。G0/G1 期、G2/M 期およびその他の 3 つの群に分別する目的で、3 つのガウス分布の混合モデルを用いた。赤色および青色で示した分布が、それぞれ G0/G1 期および G2/M 期の分布を示す。緑色の分布で表される群のピークの位置は、試料によって G2/M 期のピークと比較して高い値と低い値を示す場合の両方があったため、最初に最小の値にピークを持つ分布を G0/G1 期の分布とみなし、ピークの位置が G0/G1 期のピークの 2 倍に近い位置にある分布を G2/M 期の分布とみなした。次に、G0/G1 期および G2/M 期のピークの位置を基にヒストグラムを 5 つに区切った。区画 1 および 5 は、それぞれ G0/G1 期のピーク以下および G2/M 期のピーク以上の領域とした。区画 2 から 4 については、G0/G1 期のピークと G2/M 期のピークの間を 3 等分し、輝度の低い方から区画 2 から 4 までに分割した。図 2-34 に分割した区画と、BrdU 染色を用いて評価した細胞周期の関係を示す。区画 1 に分類された細胞のうち $61 \pm 5\%$ (mean \pm SD, $n = 21$) が G0/G1 期の細胞であった。また、区画 3 のうち $67 \pm 7\%$ (mean \pm SD, $n = 21$) は S 期の細胞となった。区画 5 は $56 \pm 8\%$ (mean \pm SD, $n = 21$) が G2/M 期の細胞となった。以上より、核染色画像を用いることで特定のステージの細胞を抽出できることが示された。

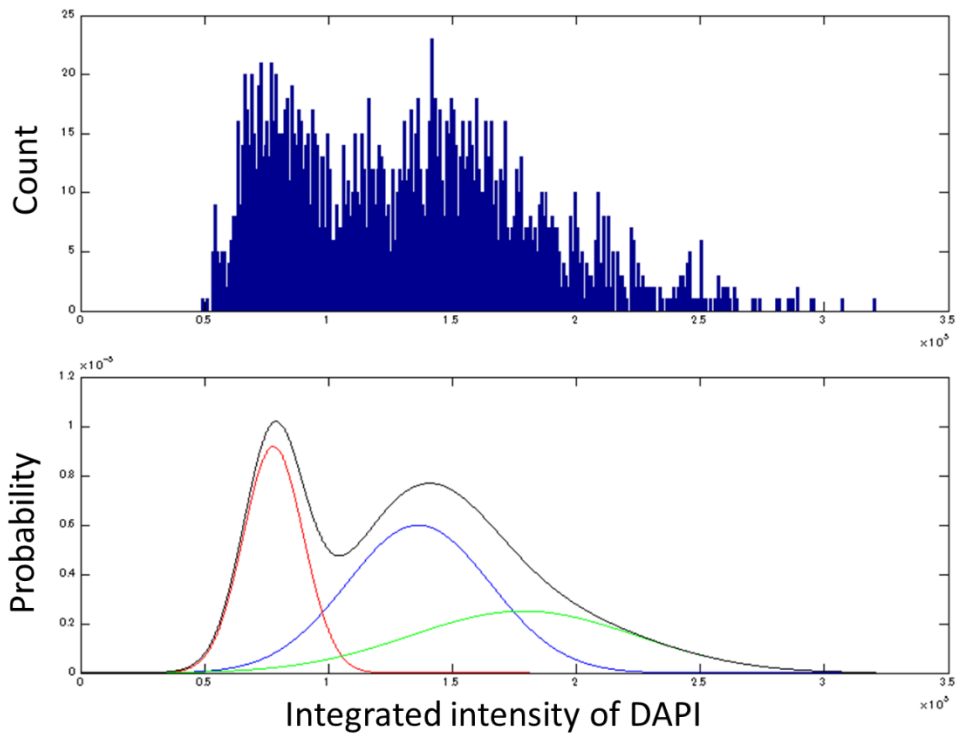


図 2-33 DAPI のヒストグラムからの細胞周期解析. (A) DAPI のヒストグラム. (B) フィッティングした混合ガウス分布. ピークの輝度値が 1 対 2 となるよう 2 つの分布を選択し, それぞれ G0/G1 期 (赤色) および G2/M 期 (青色) の分布とした.

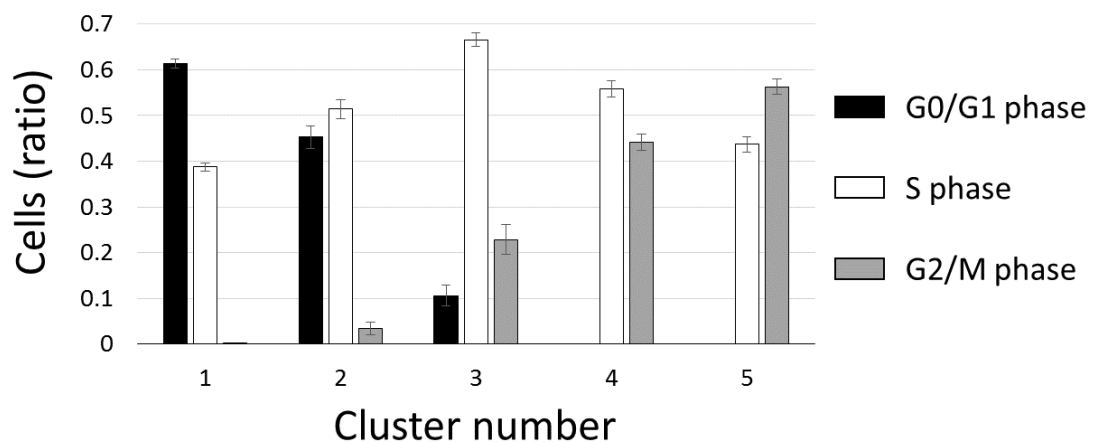


図 2-34 クラスタと細胞周期の関係. 混合ガウス分布を基に 5 つの群に区画化した. BrdU を用いて推定した細胞周期と対応させ, 各群に含まれる細胞周期の割合を評価した. 区画 1 および区画 5 には, それぞれ G0/G1 期 $61 \pm 5\%$ および G2/M 期 $56 \pm 8\%$ となった. Mean \pm SD, $n = 21$.

Hoechst を添加した影響の評価

Hoechst の取り込みが Ca 変動に与える影響を評価した。Hoechst を添加した試料、および添加していない試料から Ca 変動を検出した。それぞれの区画における Ca 変動の回数の累積ヒストグラムを図 2-35 に示す。Hoechst 有の条件（青色; $n = 25000$ segments from 10 samples）および Hoechst 無の条件（赤色; $n = 10000$ segments from 4 samples）から作成した分布は、同様の形状を示し、統計的に分離できなかった ($p > 0.1$; Kolmogorov–Smirnov test)。以上の結果は、Hoechst の取り込みが、Ca 変動の回数に顕著な影響を与えないことを示す。

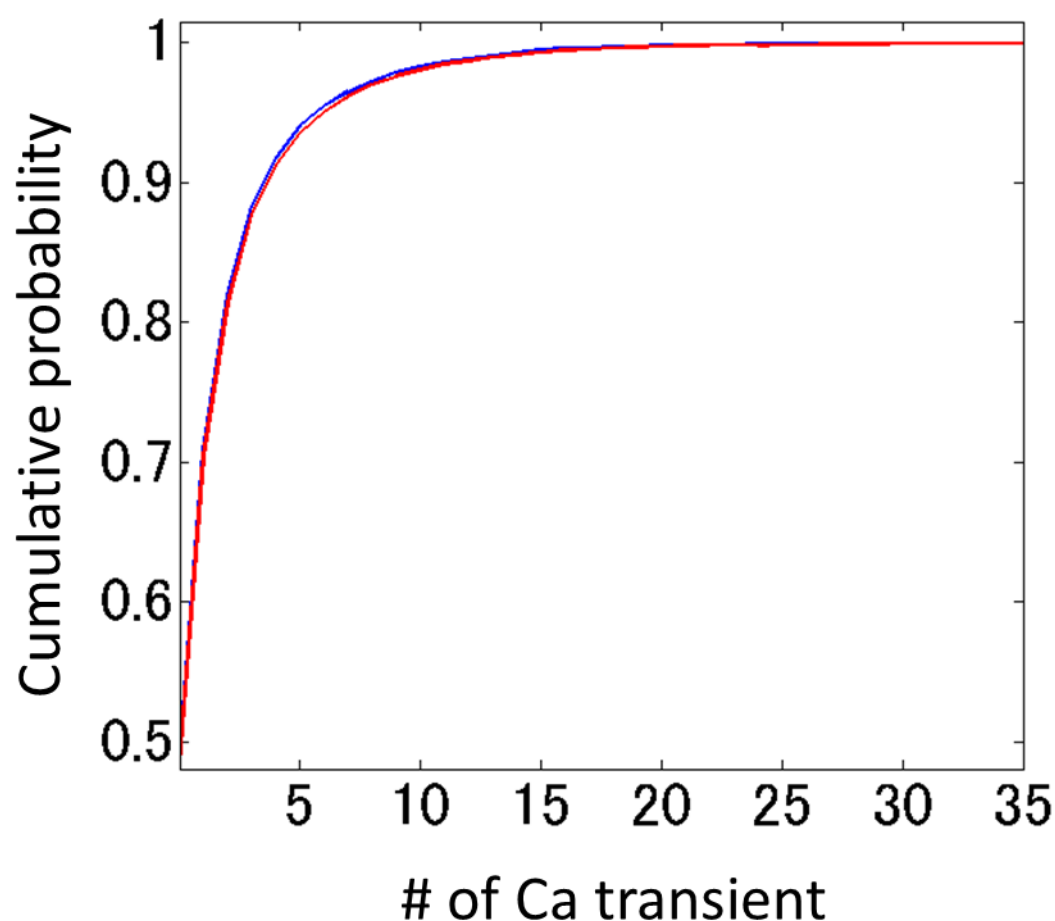


図 2-35 Hoechst の添加による Ca 変動への影響。Hoechst 有（青色）と Hoechst 無（赤色）では、分布が同様の形状を示した。 $p > 0.1$; Kolmogorov–Smirnov test; Hoechst 有, $n = 25000$ segments from 10 samples; Hoechst 無, $n = 10000$ segments from 4 samples。

細胞内 Ca 変動と細胞周期の関係

継代後 4 日目のヒト iPS 細胞に Fluo-8 をロードし、Ca 変動を可視化した。さらに、前述の細胞核の識別法と併せて個々の細胞における Ca 変動を評価した。図 2-36 に、代表的な Ca 変動を示す。複数の細胞が同期して Ca 変動を示す様子は観察されず、個々の細胞が独立に Ca 変動を示すことが示唆された。さらに、Ca 変動を視野内の全ての細胞から検出した結果を図 2-36 下段に示す。Ca 変動は $47 \pm 15\%$ (mean \pm SD) の細胞で観察され、活動が検出された細胞は 1 分間当たり平均 0.16 ± 0.04 回 (mean \pm SD) の頻度で変動を示した。Ca 濃度変動が発生する機序を評価する目的で、ER に存在する受容体の阻害剤を用いた。図 2-37 に、Ca 濃度変動の発生頻度の時間推移を示す。Control の条件では単調に低下したのに対し、途中で薬剤を投与した場合、薬剤添加から 90 秒間程度、一過性の頻度の上昇が観察された。PBS のみを添加した場合でも一過性の上昇は観察されたため、薬剤による影響ではなく、液体を添加したことによる物理的な作用や液面の揺らぎによる輝度の変化が原因であると考えられる。そこで、薬剤添加の影響を除外する目的で、薬剤添加後 90 秒以降のデータを評価に用いた。2APB を添加した場合には、薬剤添加から 3 分間後まで頻度が上昇し、その後の頻度が低下傾向を示した。また、U73122 および Ryanodine を添加した際は、活動の頻度が減少する傾向が観察された。定量的に評価するために、添加前後の活動の比を指標として、各条件を評価した。結果を図 2-38 に示す。結果、control ($n = 22$) と U73122 ($n = 5$) の間に有意な差が検出された ($p < 0.01$, Welch's t test with Bonferroni correction)。以上から、iPS 細胞は、IP₃ を用いて Ca 変動を生じさせていることが示唆された。

Ca 変動と細胞周期の関係を評価した。図 2-39 に核染色画像から分類した区画と Ca 濃度変動の頻度の関係を示す。活動が観察されなかった細胞の割合は、M 期の細胞が多い区画において多く、G1 期の細胞の割合が高い集団において少なかった。また、0.2 spikes/min 以上の頻度で Ca 濃度変動が検出された細胞の割合は、活動が検出されなかった細胞の割合とは逆の傾向を示した。

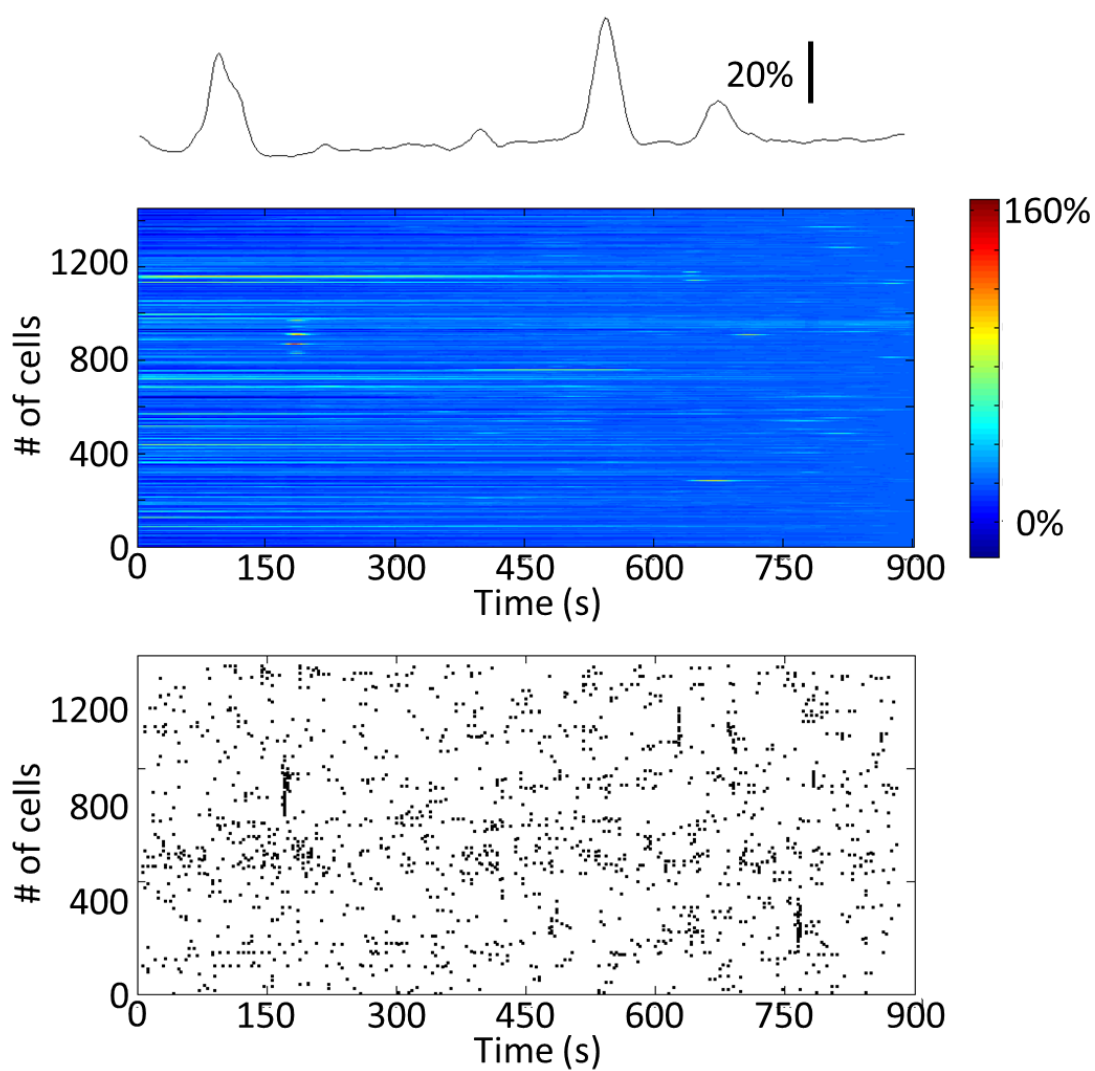


図 2-36 Ca 変動の検出結果. 代表的な細胞の輝度値の変化 (上段). 全細胞における輝度値の変化 (中段). 輝度値から活動を検出した結果 (下段).

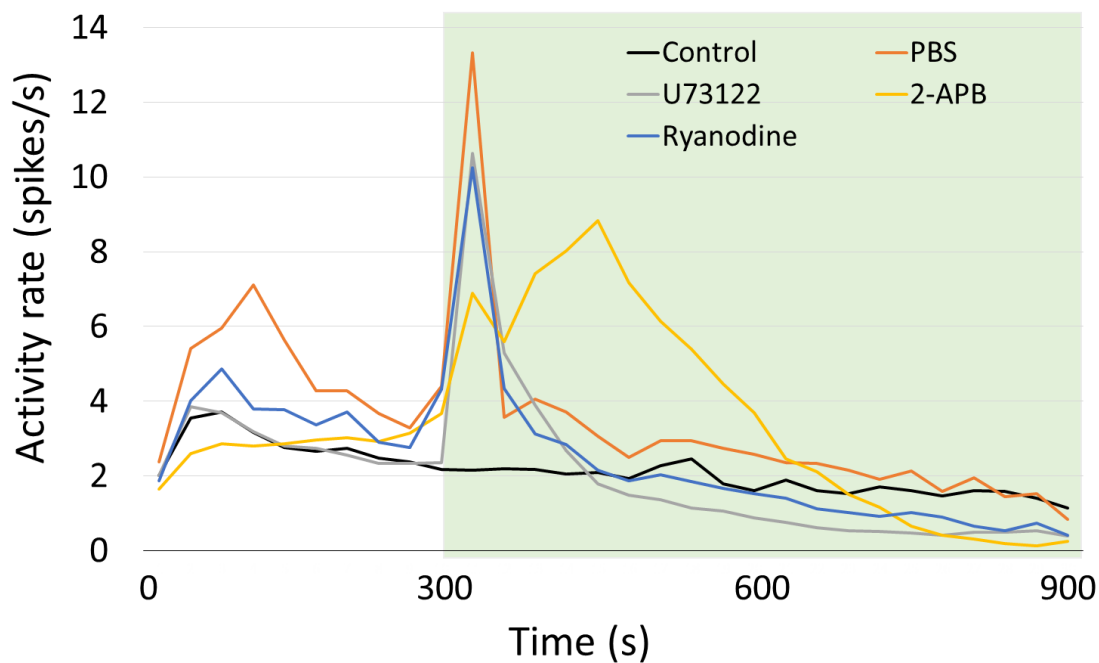


図 2-37 頻度の変化. 各ビンにおける頻度を条件内で平均して表示した. 薬剤が存在する時間を緑色で示した. U73122 添加後に活動頻度が低下する傾向が見られた. 2-APB を添加した際には, 一度活動頻度が上昇した後に, 活動頻度が低下した.

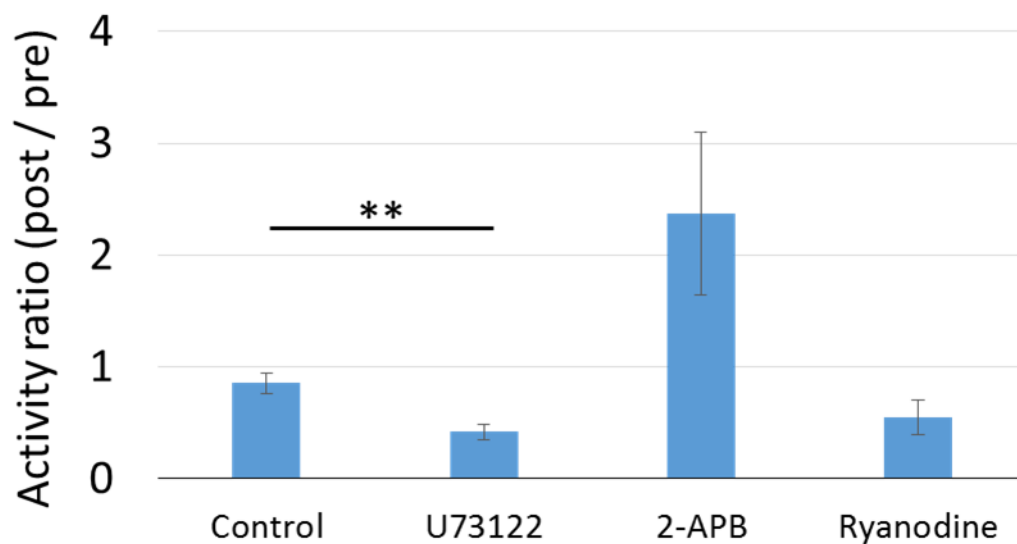


図 2-38 薬剤の添加による活動数の変化. 薬剤添加前の活動頻度を基に, 添加 90 秒後からの活動頻度を正規化した. U73122 を添加した場合, 活動頻度が有意に低下した. **, $p < 0.01$; Welch's t test with Bonferroni correction. Mean \pm SE; $n = 22$ at control, $n = 5$ at U73122 and 2-APB, $n = 4$ at Ryanodine.

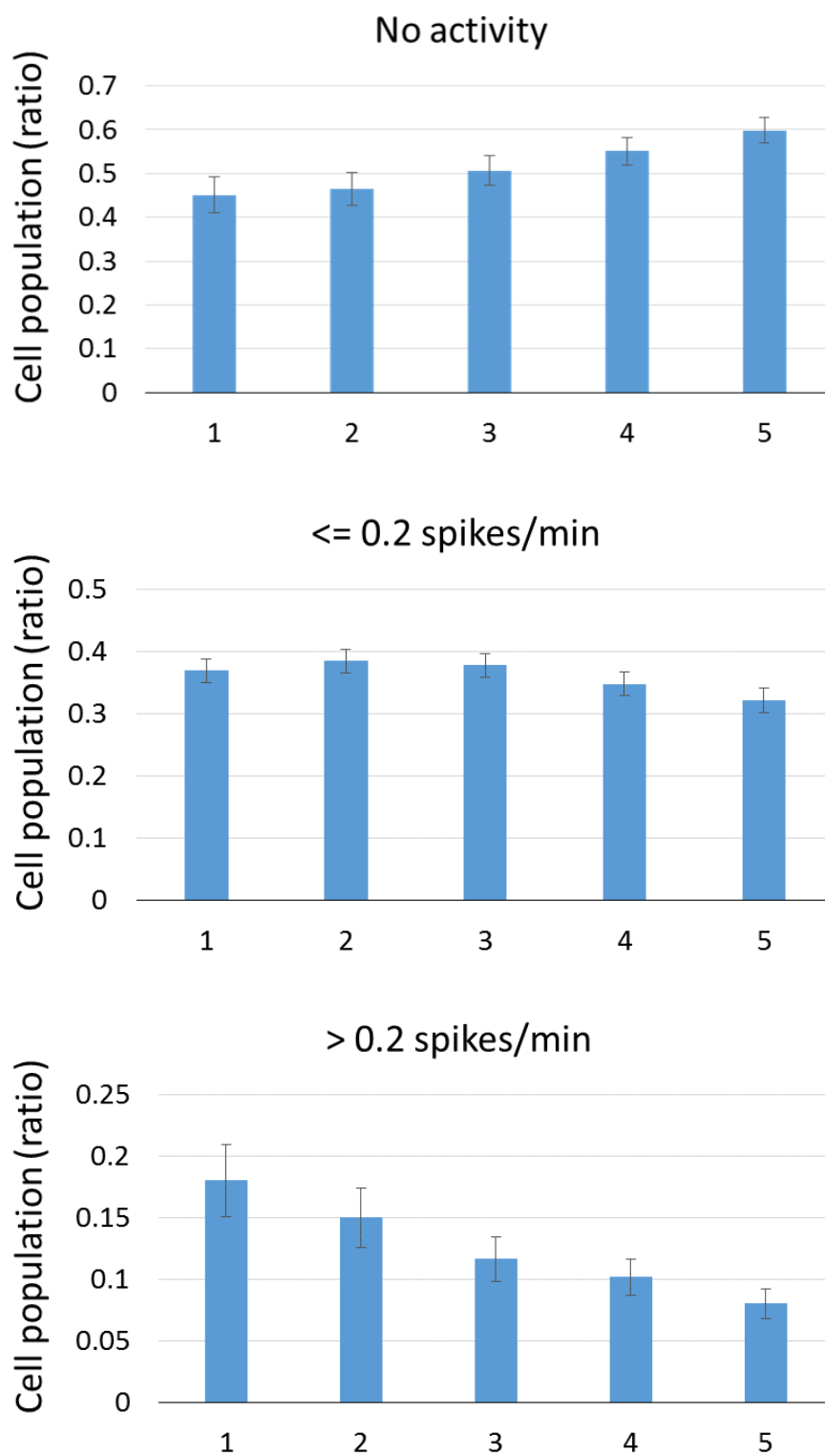


図 2-39 細胞内 Ca 変動と細胞周期の関係. Hoechst の画像から区画化した群において, Ca 変動が観察された細胞の割合を評価した. Mean \pm SE, $n = 22$.

2-6 電気刺激が iPS 細胞の分化方向に与える影響

電気刺激が iPS 細胞の分化方向に与える影響を評価した。最初に、電気刺激に対して iPS 細胞が応答したことを、Ca imaging を用いて評価した。次に、電気刺激を印加した状態で iPS 細胞を培養し、RT-PCR 法を用いて自発的な分化の方向を評価した。

2-6-1 電気刺激による iPS 細胞の Ca 変動の誘発

電気刺激に対して iPS 細胞が応答したことを確認するために、Ca imaging を行った。さらに、電気刺激に対して誘発される Ca 変動の発生機序を評価する目的で、薬剤を添加した条件でも同様の実験を行った。本項では、薬剤を添加しない条件での結果を示した後に、それぞれの薬剤を添加した条件において観察された Ca 変動について述べる。

ITO 基板上で培養した iPS 細胞に電気刺激を印加したところ、 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。図 2-40 に、電気刺激に対する iPS 細胞の誘発応答を示す。多くの領域で、次の刺激との間隔である 1 分以内に輝度値が刺激前の値まで低下する様子が観察された。また、応答を示した部分から Ca wave が観察された。刺激に対して応答する部分は、位相差顕微鏡で観察したところ、細胞密度が高い傾向にあった。また、刺激によって誘発された Ca 変動は、自発的に観察された Ca 変動と比較して、振幅が大きい傾向があった。

刺激に対する $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が、細胞外からの Ca^{2+} 流入によることを確認する目的で、刺激中に ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) を添加した。図 2-41 に結果を示す。EGTA を添加したところ、iPS 細胞が刺激に対して応答しなくなった。したがって、刺激によって起こる Ca 変動においては、細胞外からの Ca^{2+} の流入が重要であることが示された。

電気刺激に対する誘発応答は、T 型 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} 流入が原因であるという仮説を立て、刺激中に阻害剤である Ni^{2+} を添加した。図 2-42 に、 $150\ \mu M\ Ni^{2+}$ の存在下での誘発応答を示す。 Ni^{2+} 添加前から刺激に応答した細胞#1 と細胞#2 では、添加後にも刺激に対する誘発応答が観察された。また、応答の振幅やタイムコースにも顕著な変化は観察されなかった。したがって、電気刺激に対する誘発応答は、T 型 Ca^{2+} チャンネルに依存しないことが示された。

刺激に対する誘発応答の機序としては、電気刺激の直接的な影響と、周囲の細胞からの Ca^{2+} の流入という間接的な影響の 2 つが考えられる。そこで、電極の範囲を限定した刺激デバイスを用いて iPS 細胞を電気刺激した。図 2-43 に、底面の一部から刺激を印加した際の誘発応答を示す。図 2-43 左の赤い線で囲まれた部分が刺激電極である。刺激電極上に存在する細胞#2 は、刺激に対して再現性高く応答を示した。一方、電極から離れた位置に存在する細胞#1 は、刺激に対して応答を示さなかった。また、電極の周囲にある細胞#3 および細胞#4 については、応答を示す再現性が細胞#2 と比較して低く、刺激から誘発応答までに時間を要した。以上の結果は、細胞#3 および細胞#4 の応答は、周囲の細胞において起こった $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が伝播したことに起因することを示す。したがって、誘発応答の機序として、細胞#2 において観察された刺激の直接的な影響と、細胞#3 および細胞#4 において

観察された間接的な影響の両方が存在することが示された。

電極周囲の細胞において観察された刺激からの遅れを持った誘発応答について、CICRの寄与を評価するために、刺激中に RyR の阻害剤である ryanodine を添加した。結果を図 2-44 に示す。電極上に位置する細胞#1 および電極周囲の細胞#3 の両方で、ryanodine 添加後も誘発応答が観察された。以上の結果は、CICR が働かない場合においても、電極周囲の細胞が応答可能であることを示す。したがって、細胞#3 に代表される電極周囲の細胞においては、電極上の細胞から流入した Ca^{2+} が Ca 変動として観測されたことが示唆された。

以上の結果をまとめると、電気刺激に対する iPS 細胞の応答は、まず電極上の細胞において細胞外からの Ca^{2+} の流入があり、周囲の細胞にも流入した Ca^{2+} が伝播することが示された。また、電極上の細胞の Ca^{2+} 流入には、T 型 Ca^{2+} チャンネルが関与しないことが示された。

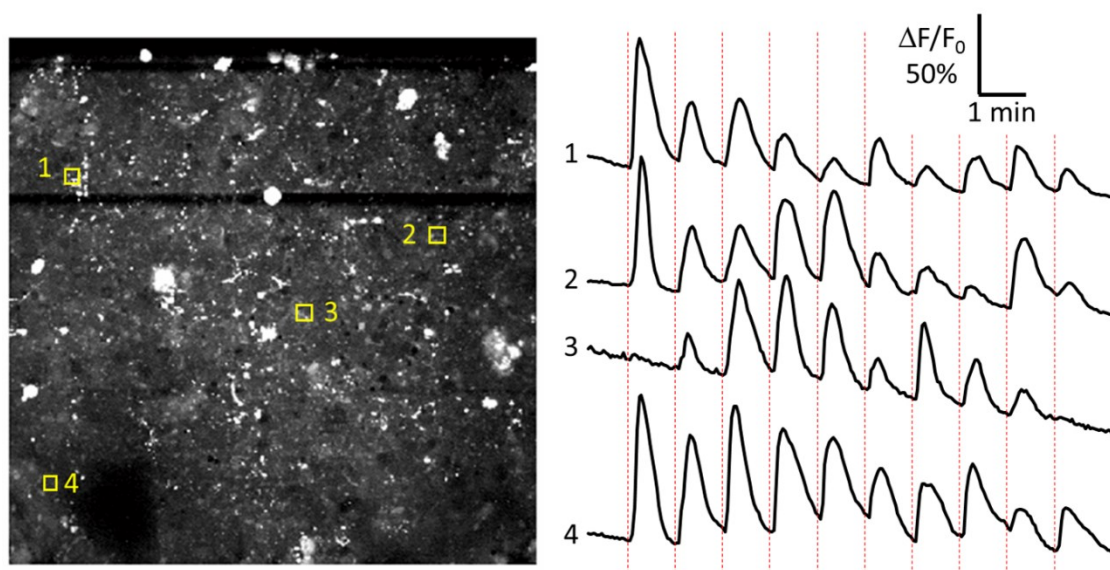


図 2-40 電気刺激に対する iPS 細胞の応答. 電気刺激後に、Ca 変動が観察された。電気刺激を印加した時刻を赤い破線で示す。右図の Ca 波形の番号は、左図の細胞の位置に対応する。

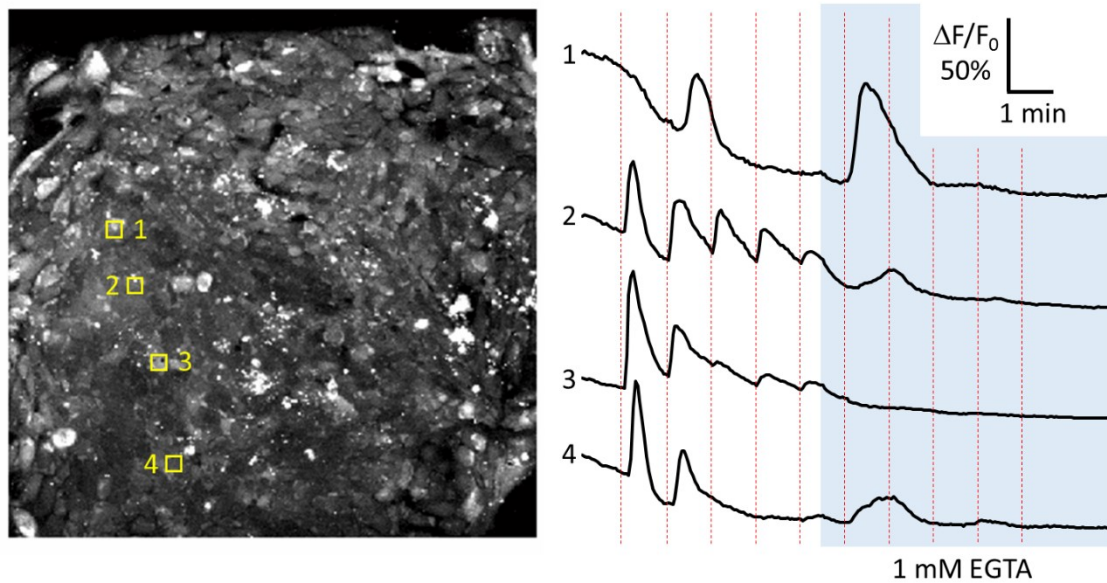


図 2-41 細胞外の Ca^{2+} を除去した影響. EGTA を添加し細胞外の Ca^{2+} を除去すると, 刺激に対する誘発応答が観察されなくなった. 電気刺激を印加した時刻を赤い破線で示す. また, EGTA を添加した後を, 青色で示す. なお, 細胞#1 は, 刺激に応答しなかった細胞である.

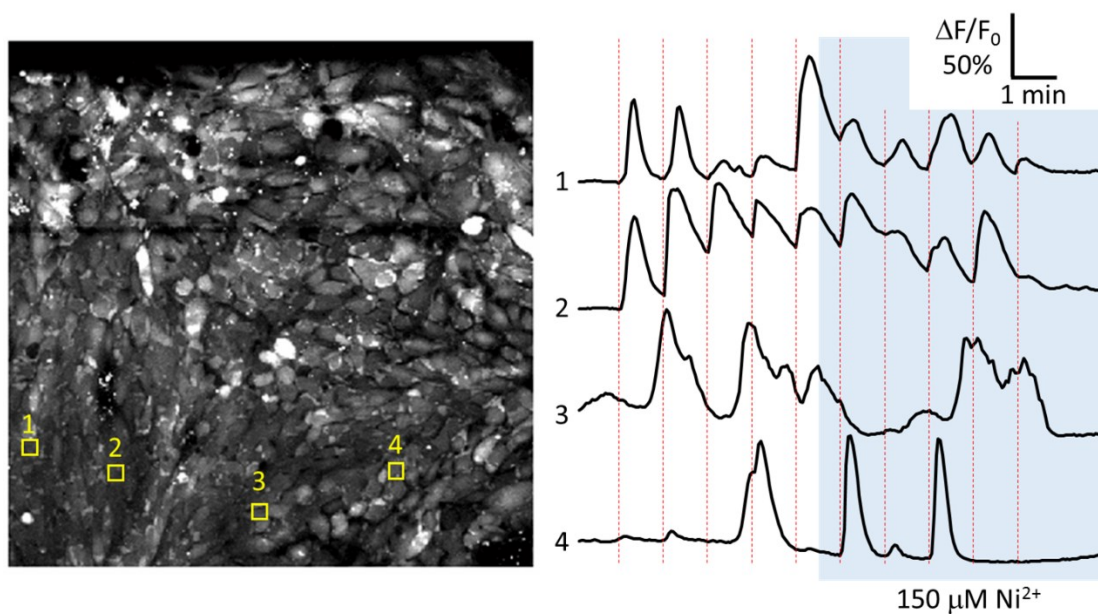


図 2-42 T 型 Ca^{2+} チャンネルを阻害した影響. $150 \mu\text{M Ni}^{2+}$ を添加し, T 型 Ca^{2+} チャンネルを阻害した場合でも, 誘発応答が観察された. 細胞#1 と細胞#2 が, Ni^{2+} 添加前から刺激に対して応答した細胞である. 刺激を印加した時刻を赤い破線で示す. また, Ni^{2+} 添加後を青色で示す.

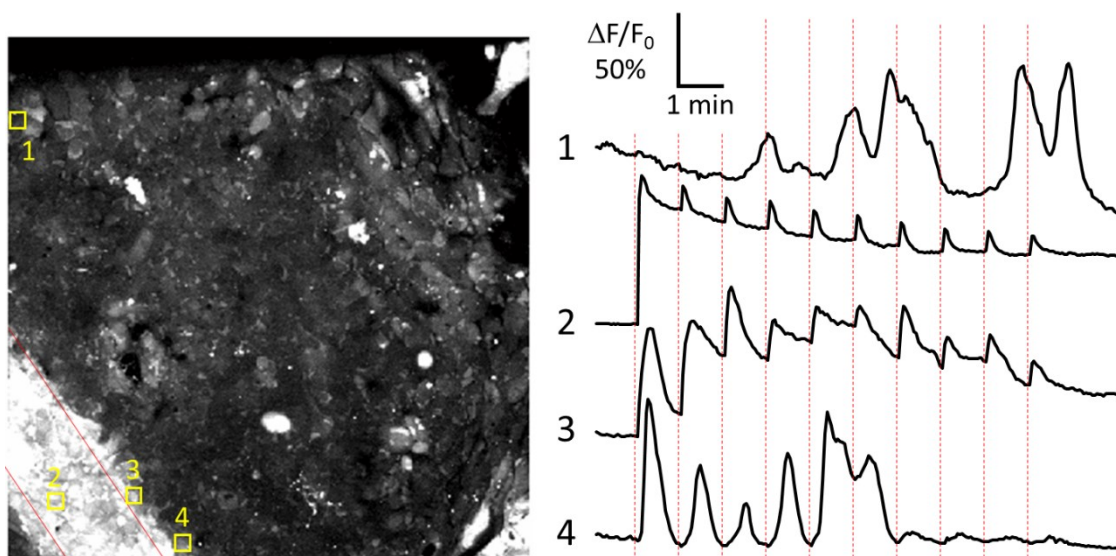


図 2-43 刺激の局在性. 底面の一部（左図 赤線の間）に配置した電極から電気刺激を印加した. 電極上の細胞は再現性の高い誘発応答を示した（細胞#2）. また，電極の周囲の細胞も刺激に応答した（細胞#3 および細胞#4）. 一方，電極から離れた位置に存在した細胞は，刺激に応答しなかった（細胞#1）. 刺激を印加した時刻を赤い破線で示す.

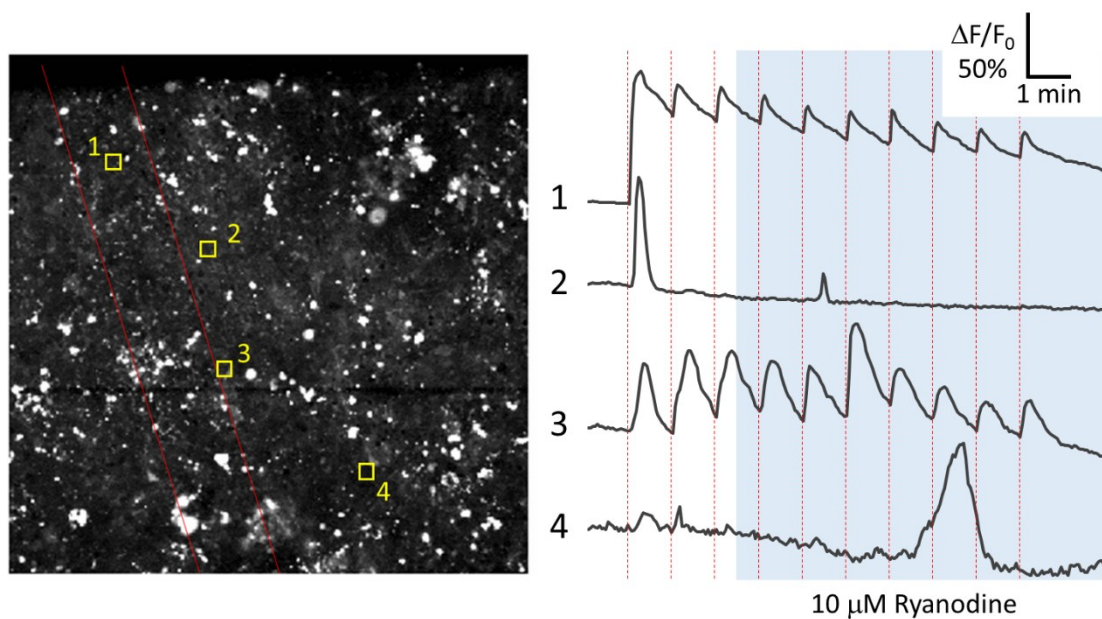


図 2-44 Ryanodine 受容体の影響の評価. 誘発応答に対する CICR の関与を評価する目的で，10 μM ryanodine を添加した. 電極上に存在する細胞は，ryanodine の添加後も刺激後に誘発応答を示した（細胞#1 および細胞#3）. したがって，電極上の細胞が示す誘発応答には CICR が寄与しないことが示された. 電極の位置は，左図の 2 本の赤線の間である. また，刺激を印加した時刻を，赤い破線で示す. Ryanodine 添加後の時間は，青色で示す.

2-6-2 電気刺激後の分化方向の変化

iPS 細胞を培養しながら電気刺激し、遺伝子発現量を評価した。最初に、継代 6 日目において、位相差顕微鏡を用いて形態を観察した。図 2-45 に、継代 6 日目における代表的な位相差顕微鏡像を示す。非刺激群 (control)、継代 3 日目に刺激した群 (acute)、および慢性的に電気刺激を印加した群 (chronic) の全てで、未分化状態の iPS 細胞において特徴的な、細胞核：細胞質の比が高い形状が観察された。また、いずれの試料においても、顕著な細胞死は観察されなかった。以上より、本研究で用いた条件においては、電気刺激によって細胞死が誘発されないことが示された。

続いて、各試料から RNA を抽出し、遺伝子発現量を評価した。図 2-46 に、各試料における発現量の概要を示す。Chronic 群では、*PAX6* および *Brachyury* の発現量が高く、*CDX2* の発現量が低い傾向が観察された。一方、acute 群では、*CDX2* および *SOX17* の発現量が低い傾向が観察された。また、*CDX2* や *SOX17* の発現量には、同じ条件で刺激をした場合でも、試料間の差が大きかった。図 2-47 に、未分化マーカー *Oct3/4* および栄養外胚葉マーカー *CDX2* の発現量を示す。*Oct3/4* の発現量は、acute 群と比較して chronic 群が優位に多かった ($p < 0.05$, Student's *t* test)。また、図 2-48 に、分化マーカーとして用いた遺伝子の発現量を示す。外胚葉マーカー *PAX6* の発現量は、control 群および acute 群と比較して、chronic 群が有意に多かった ($p < 0.01$, Student's *t* test)。中胚葉マーカー *Brachyury* の発現量は、chronic 群が多い傾向にあった。内胚葉マーカー *SOX17* の発現量は、chronic 群と比較して acute 群が優位に低かった ($p < 0.01$, Student's *t* test)。以上から、電気刺激が iPS 細胞の分化方向に影響を与えたことが示された。また、刺激条件の違いにより、電気刺激の影響は異なることが示唆された。

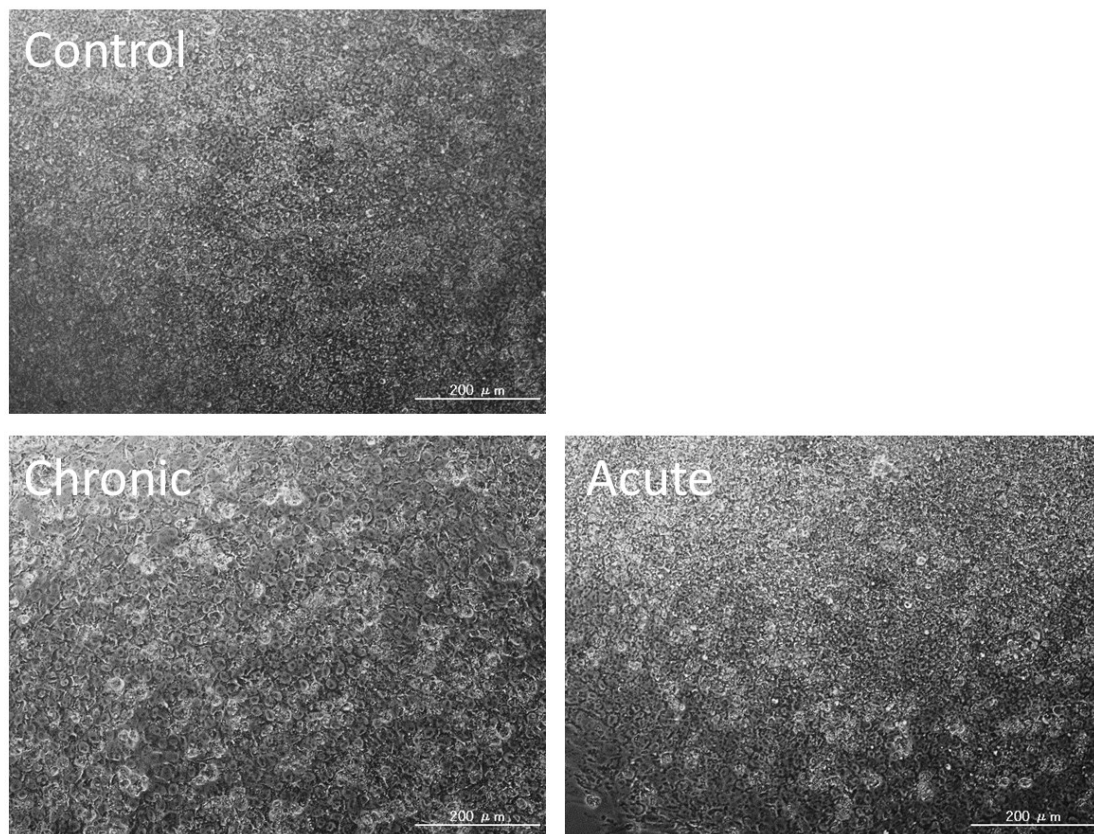


図 2-45 刺激後の iPS 細胞の形態. RNA を抽出する直前の細胞の形態を示す. 刺激を印加した場合においても, 顕著な細胞死は確認されなかった. また, 細胞の形態は, 典型的な iPS 細胞の形態であった.

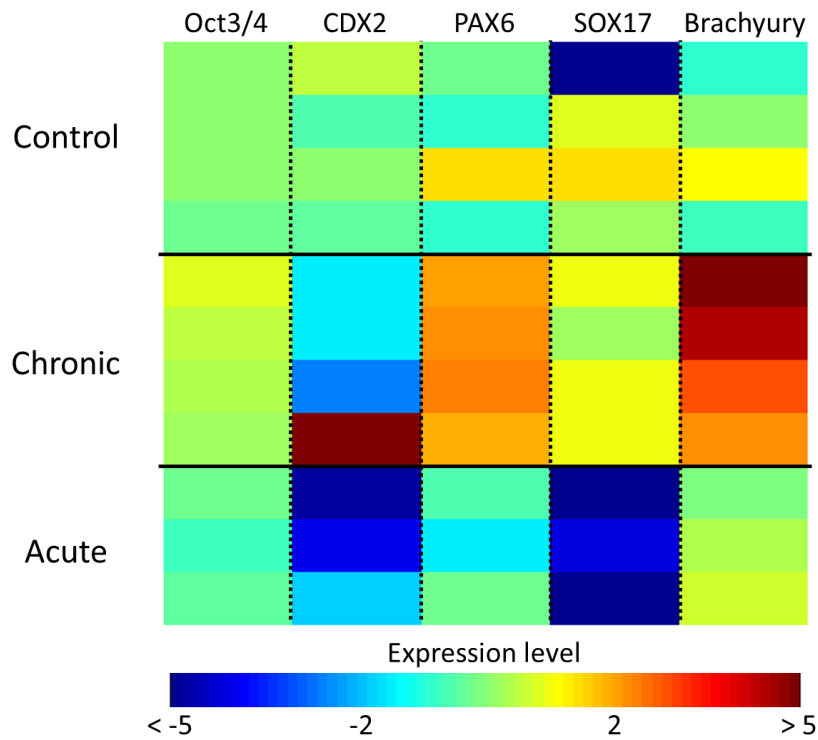


図 2-46 刺激後の遺伝子発現変化の概要. 慢性的に刺激を印加した群 (chronic)では, *PAX6* および *Brachyury* の発現量が上昇した. 一方, 継代 3 日後のみに刺激を印加した群 (acute) では, *CDX2* および *SOX17* の発現量が低下した. それぞれの遺伝子について, control の平均値を基準として正規化して表示した.

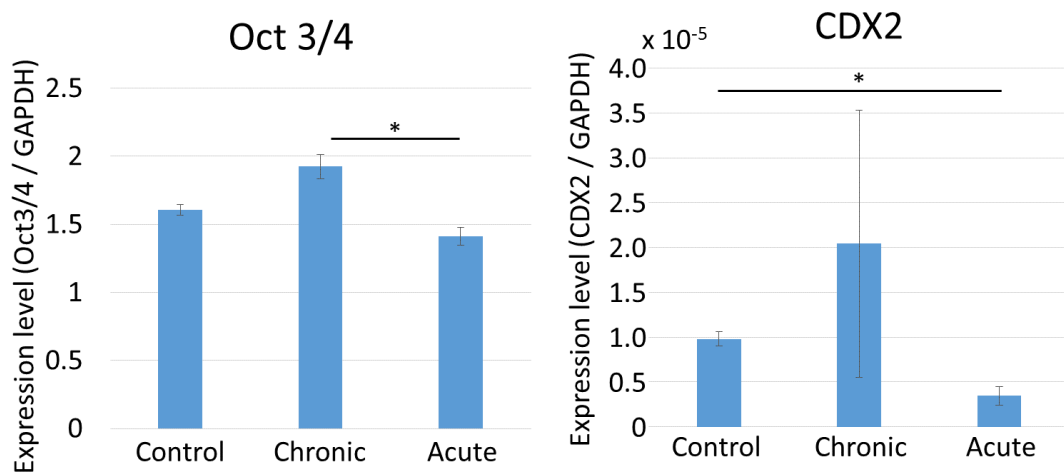


図 2-47 未分化および栄養外胚葉マーカーの遺伝子発現量の変化. 未分化マーカー *Oct3/4* の発現量は, 継代 3 日目のみ刺激を印加した群 (acute) と比較して, 持続的に刺激した群 (chronic) が有意に多かった. 栄養外胚葉マーカー *CDX2* の発現量は, 非刺激群 (control) の方が acute 群と比較して有意に多かった. Mean \pm SD; $n = 3$ for acute, $n = 4$ for control and chronic. *, $p < 0.05$, Student's t test with Bonferroni correction.

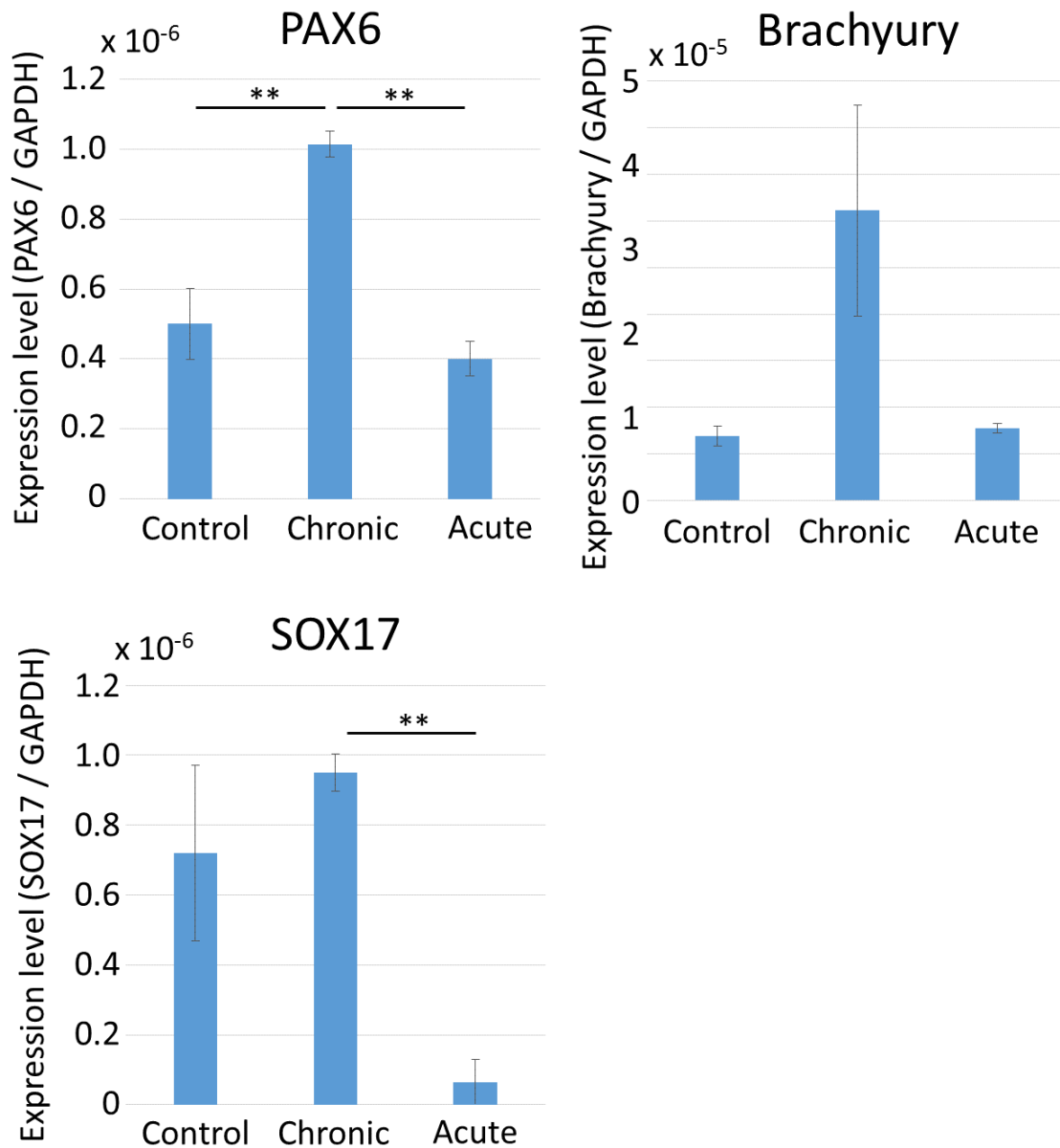


図 2-48 分化マーカーの発現量の変化. 外胚葉マーカー *PAX6* の発現量は, 非刺激群 (control) および継代 3 日目において刺激した群 (acute) と比較して, 刺激を印加し続けた群 (chronic) が有意に多かった. 中胚葉マーカー *Brachyury* の発現量は, chronic 群が多い傾向にあった. 内胚葉マーカー *SOX17* の発現量は, chronic 群と比較して acute 群が優位に低かった. Mean \pm SD; $n = 3$ for acute, $n = 4$ for control and chronic. **, $p < 0.01$, Student's t test with Bonferroni correction.

2-7 考察

2-7-1 発生過程と多能性幹細胞の神経分化過程の対応

本項では、神経発生過程と比較しながら、分化過程における *PAX6*, *FoxG1* および *Oct3/4* の発現量の変化について考察する。最初に、*PAX6* と *FoxG1* について、神経発生過程における発現量の変化と機能について述べる。次に、遺伝子発現量の変化から、本研究で用いた iPS 細胞が神経系細胞に分化した過程について考察する。

PAX6 は、マウスでは胎齢 8 日から神経板を形成する細胞において発現し、胎齢 10 日では発現領域が、前脳、後脳および脊髄に限局される [Inoue 2000]。前脳では、神経細胞が産生される領域である脳室帯の細胞の多くが *PAX6* を発現することが報告されている [Osumi 2008]。また、*PAX6* が欠損したマウスでは細胞周期が短くなり、神経細胞マーカーが早期から観察されることから、*PAX6* は神経発生の開始時期を制御する機能を有することが示唆されている [Estivill-Torrus 2002]。さらに、背腹軸の決定においては、GS Homeobox (*Gsh*) 2 と呼ばれる転写因子と相補的に発現し、*PAX6* が背側の領域決定に寄与することが報告されている [Yun 2001]。

FoxG1 は、マウスでは胎齢 9 日目に、神経板の前端部である anterior neural ridge (ANR) から放出される FGF8 によって発現が誘導される [Shimamura 1997; Hebert 2008]。また、大脳皮質上層の神経細胞を産生するために、*FoxG1* が下層の神経細胞の産生を抑制することが報告されており、適正な大脳皮質の 6 層構造の形成に重要であることが知られている [Hanashima 2004; Toma 2014]。

本研究において、*PAX6* の発現量は、3 DAI には分化誘導前と比較して 800 倍以上となり、6 DAI 以降は 1000 倍以上となった。ヒト ES 細胞を神経系の細胞に分化誘導した場合、2 日目から 4 日目の間に *PAX6* を発現する細胞の割合が上昇することが知られており [Surmacz 2012]、本研究の結果と一致する。*FoxG1* の発現量は、3 DAI に最低となった後上昇傾向を示し、12 DAI においては分化誘導前の 300 倍以上となった。先行研究では、*FoxG1* の発現量が分化誘導 8 日目および 12 日目に 10 倍程度まで上昇したことが示されている [van de Leemput 2014]。本研究では、12 DAI における発現量が先行研究と比較して多かった一方、上昇する時期が遅かった。先行研究と本研究では異なる分化誘導法を用いており、*FoxG1* の発現量および発現時期の違いは、分化誘導の手法が原因であると考えられる。先行研究と発現開始時期に違いはあるものの、*FoxG1* の発現量が上昇したことから、iPS 細胞が前脳の神経系細胞に分化したことが示唆された。*Oct3/4* の発現量は、分化誘導後に日数の経過とともに減少した。ヒト ES 細胞の神経分化過程において、*PAX6* の発現量が上昇するにつれて *Oct3/4* の発現量が低下することが知られており [Surmacz 2012]、本研究の結果と一致する。以上から、本研究では、3 DAI では iPS 細胞と分化途中の神経外胚葉細胞が混在した状態であり、日数の経過とともに分化が進み未分化状態の iPS 細胞の割合が減少したと考えられる。また、*FoxG1* の発現量上昇の時期より、前脳の神経上皮細胞としての形質を獲得したのは 12 DAI であったと考えられる。

2-7-2 分化過程における Ca 変動の変化

神経分化過程において Ca imaging を行ったところ、3 DAI には分化誘導前と比較して Ca 変動を示す細胞の割合が上昇した。また、6 DAI には Ca wave が観測された。本項では、最初に Ca 変動を示す細胞の割合が変化した理由について考察する。次に、Ca wave の意義について、放射状グリアを例に挙げ、考察する。

3 DAI において Ca 変動を示す細胞の割合が上昇した理由は、分化運命の決定時に、細胞周期が一時的に G1 期で停止したことであると考えられる。上記の根拠として、G1 期の細胞の割合、および細胞周期と Ca 変動の関係という 2 点が挙げられる。まず、遺伝子発現評価の結果より、3 DAI では未分化細胞と神経外胚葉細胞が混在していたことが示唆されており、分化運命の決定期であったと考えられる。ヒト ES 細胞を用いた先行研究では、G1 期には高い分化傾向を示すこと、および分化開始前に細胞周期が G1 期で一時的に停止することが報告されている [Sela 2012]。したがって、分化運命決定期の細胞を多く含む 3 DAI の細胞集団では、G1 期の細胞の割合が高かったことが示唆される。また、マウス ES 細胞では、細胞周期が G1 期および S 期の細胞において Ca 振動が起こることが報告されている [Kapur 2007]。先行研究においてヒト多能性幹細胞の細胞周期と Ca 変動の関係を評価した例は無いが、本研究において G2/M 期の細胞の割合が多い区画の細胞集団では Ca 変動を示す細胞の割合が有意に低かった。本結果は、ヒト iPS 細胞においても、マウス ES 細胞と同様に G1 期から S 期で Ca 変動を示す細胞の割合が上昇することを示唆する。したがって、以上の 3 DAI における細胞集団の G1 期の割合、および細胞周期と Ca 変動に関する考察より、3 DAI において Ca 変動を示す細胞の割合が上昇した理由が分化運命の決定に伴う細胞周期の G1 期での停止であることが示唆された。

6 DAI において、計測した試料全てで Ca wave が観測された。Ryanodine を添加した場合には Ca wave が観測され、2-APB を添加した場合に観測されなかったことから、IP₃ 受容体が Ca wave に寄与することが示された。マウス ES 細胞から神経系細胞への分化過程では、ギャップ結合を形成するチャネルタンパク質である Connexin 43 が発現することが報告されており [Parekkadan 2008]、ヒト iPS 細胞からの分化においても同様であると考えられる。Connexin の発現により細胞間でギャップ結合が形成されることで、細胞間での IP₃ や Ca²⁺ の伝播が可能となる。本研究で観測された Ca wave は、ギャップ結合を介して伝播したと考えられる。

遺伝子発現評価の結果から、6 DAI では神経上皮細胞まで分化が進んでいないことが示されており、神経外胚葉に属する細胞が多く存在したと考えられる。*Xenopus* の神経発生においては、外胚葉吻側部において Ca wave が起こり、Ca wave の発生を阻害すると神経系が正常に発達しないことが報告されている [Leclerc 2000]。マウスやヒトにおいて神経外胚葉の段階での Ca wave の発生の報告は存在しない。しかし、Parekkadan らにより Connexin 43 の発現抑制が神経外胚葉への分化を阻害することが報告されている [Parekkadan 2008]。Connexin 43 の発現抑制は Ca wave 発生を阻害するため、前述の神

神経外胚葉への分化阻害に Ca wave が関与していた可能性がある。また、神経外胚葉の細胞より分化が進んだ放射状グリアでは、Ca wave により細胞内で DNA の合成が始まることが報告されており [Weissman 2004]、初期の神経分化過程においても細胞の機能に影響を与えるシグナルとして働いている可能性がある。

2-7-3 画像解析を用いた細胞周期の推定手法

本研究では、Chen らの手法を基に、画像解析を行うことで細胞周期の推定を行った [Chen 2013]。本項では、最初に、細胞周期が揃った細胞集団の情報を得るという目的に対して、先行研究と比較して本手法がより有効である点について述べる。次に、細胞周期の解析法について、従来手法との比較を行う。

核染色画像のみから細胞周期を解析した結果を、BrdU 染色を用いた場合と比較したところ、G0/G1 期、S 期および G2/M 期の細胞が、それぞれ 61%、67%および 56%の割合で含まれる細胞集団を得られたことが示された。先行研究では、細胞周期のある段階の細胞集団を集める場合、薬剤を用いて細胞周期を停止させるという方法が用いられている [Becker 2006; Kapur 2007; Ghule 2011]。マウス ES 細胞を用いた先行研究では、G0/G1 期および G2/M 期で細胞周期を停止させた場合に、それぞれ 50%および 80%程度の割合で目的とした周期の細胞を得られたことが報告されている [Kapur 2007]。また、培養液からの血清の除外により細胞周期が G0/G1 期で停止することも知られており、マウス ES 細胞では 72%の細胞が G0/G1 期で停止したことが報告されている [Zhang 2005]。先行研究との比較より、単一の段階の細胞集団を得ることが目的である場合は、細胞周期を停止させた方が高精度であると考えられる。しかし、薬剤の添加や血清の除外は細胞に障害を与える可能性があり、細胞が通常の培養条件とは異なった状態となることが考えられる。また、本手法では、単一の培養環境から、G0/G1 期、S 期および G2/M 期のそれぞれの細胞集団の情報を得ることができる。以上から、培養条件を変化させることが好ましくない場合や、単一の条件において細胞周期間の比較を行うことが目的である場合には、本手法が有効であることが示唆される。

細胞周期の解析法としては、前述の通り、フローサイトメトリーを用いる手法と、細胞周期のステージの指標となるタンパク質を発現させる手法が用いられている。一般に、フローサイトメトリーでは、数万個程度の細胞からデータを読み取る。本手法では、対物レンズを 10 倍に設定した場合では、1000 個から 2000 個の細胞から情報を取得した。したがって、ヒストグラムの形状は、従来手法の方が正確であると考えられる。一方、本手法の利点は、接着培養の状態のままで情報を取得できる点であると考えられる。Chen らは、本手法と同様の手法を用いて細胞周期の進行に伴う細胞核の形状の変化を評価した [Chen 2013]。また、本研究では Ca 変動と細胞周期の関係を評価した。細胞核の形状や Ca 変動は、接着培養の状態でなければ取得が困難な情報である。したがって、本手法を用いる利点は、より多

様な種類の情報を取得できる点である。また、Fucci を用いることでも、接着状態の細胞の細胞周期を高精度に解析可能である。しかし、Fucci は、観察のために 2 つの波長の励起光を照射する必要がある。したがって、Ca imaging との併用はできない。以上より、本研究の目的に対しては、核染色と Ca imaging の組み合わせが最適であったことが示唆される。

2-7-4 Ca 振動と細胞周期の関係

本研究では、画像解析による細胞周期解析と Ca imaging を用いて、接着状態の iPS 細胞の細胞周期と Ca 変動の関係を評価した。Ca 変動に関与すると考えられる経路の阻害剤を添加した結果、U73122 の添加によって IP₃ の産生を阻害した場合に Ca 変動の頻度が有意に低下した。さらに、G0/G1 期を多く含む区画では Ca 変動を示す細胞の割合が多いことが示された。マウス ES 細胞では、G1 期および S 期の細胞が Ca 振動を示し、細胞周期特異的な Ca 変動の原因として、細胞周期のステージに依存した IP₃ 受容体の感受性の変化、および細胞周期進行に伴う細胞内 IP₃ 濃度の変動が挙げられている [Kapur 2007]。本結果では、G2/M 期の細胞の割合が高い区画において Ca 変動を示す細胞が少なく、得られた結果については先行研究と一致する。また、U73122 を用いて IP₃ の産生を阻害した場合に、Ca 変動の頻度が減少した。以上より、ヒト iPS 細胞においても、マウス ES 細胞と同様の機序で、細胞周期特異的に Ca 変動が発生したことが示唆される。今後、U73122 の存在下で細胞周期と Ca 変動の関係を評価することで、IP₃ の濃度変化や受容体の感受性の変化が、今回観察された細胞周期の特異性に関与していたかを直接評価可能である。

2-7-5 電気刺激が Ca 変動を誘発する機序

未分化状態のヒト iPS 細胞に電気刺激を印加したところ、Ca 変動が誘発された。また、Ca 変動には細胞外からの Ca²⁺の流入が重要であること、および T 型 Ca²⁺チャネル阻害下でも Ca²⁺流入が起こることが示された。先行研究では、ヒト ES 細胞およびマウス ES 細胞 [Wang 2005]、およびヒト iPS 細胞 [Jiang 2010] には、機能的な VGCC が発現していないことが報告されている。一方、マウス ES 細胞には、機能的な SOCC が発現しており、マウス ES 細胞が Ca²⁺を細胞外から取り込むためには、SOCC からの Ca²⁺流入が重要な経路であることが報告されている [Wong 2012]。以上から、本研究で観察された刺激による Ca²⁺流入が、VGCC 以外の経路を介していたことが示唆される。

一方、VGCC を発現しない細胞においても、高エネルギーの電気刺激をナノ秒オーダーで印加することにより、細胞内 ER からの流出により [Ca²⁺]_i が上昇したことが報告されている [White 2004; Vernier 2003]。また、遺伝子導入などに用いられる手法である電気穿孔法では、マイクロ秒オーダーの刺激により細胞膜に微小な穴を形成する。本研究では、先行研究と比較して刺激強度が低く、持続時間が長いミリ秒オーダーの刺激パラメータを用い

たが、刺激による Ca 変動の機序として、ER からの Ca 流出や細胞膜の穿孔の可能性も検討する必要があると考えられる。ER からの Ca 流出が起こったことを評価するためには、thapsigargin を用いて、ER に Ca^{2+} を取り込む SERCA を阻害した状態での刺激実験が適している。また、細胞膜穿孔の評価には、細胞膜が穿孔された後にのみ取り込まれる色素 propidium iodide を用いることが有効である。

2-7-6 電気刺激が分化方向に影響を与える機序

未分化状態のヒト iPS 細胞に対して、底面の電極より慢性的に刺激を印加した結果、刺激していない試料と比較して、*PAX6* の発現量が上昇した。したがって、電気刺激により、自発分化の方向が、神経外胚葉へと傾いたことが示唆された。先行研究では、マウス ES 細胞の EB に対して電気刺激することで、 Ca^{2+} の流入を介したシグナルにより神経系へと分化運命が決定することが知られている [Yamada 2007]。本研究においても、同様の分化傾向を得たことから、ヒトにおいてもマウスと同様の機序が種を越えて保存されていることが示唆された。神経外胚葉への分化方向の変化は、neuronatin (Nnat) と呼ばれるタンパク質の働きが一因であると考えられる。Nnat は、マウス ES 細胞の神経分化過程では、未分化状態から分化後まで、全ての段階において発現していることが知られている [Lin 2010]。Nnat は、特に初期の神経上皮細胞において強く発現し、神経細胞へと分化の段階が進むにつれて発現量が減少する。Nnat は、ER の膜タンパク質であり、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇に反応して BMP4 を抑制し神経分化を誘導する。Nnat の発現を抑制すると神経分化効率が低下するため、Nnat を介した Ca^{2+} のシグナルが神経分化に重要であると考えられている。以上から、電気刺激を用いて細胞内への Ca^{2+} 流入を起こすことにより、Nnat を介して BMP4 を抑制可能であることが示唆される。今後は、BMP4 に関連する遺伝子の発現量の評価や、関連するシグナル経路を阻害する実験を行うことで、Nnat の関与を検証できる。

3 日目において刺激を印加することで、6 日目における *CDX2* の発現量が非刺激群と比較して有意に低かった。*CDX2* は、栄養外胚葉に発現することで知られており、強制発現させることで、ES 細胞が栄養外胚葉を形成する幹細胞である trophoctoderm stem cell に分化することが報告されている [Niwa 2005]。また、*Brachyury* の発現上昇が *CDX2* の発現を誘導することが知られている [Bemardo 2011]。*CDX2* の発現量が低いことは、栄養外胚葉への分化傾向が低いことを示しており、3 日目における電気刺激が栄養外胚葉への分化傾向を抑制したことが示唆された。

慢性的に刺激した chronic 群と、3 日目のみ刺激を印加した acute 群を比較した結果、*Oct3/4*、*PAX6* および *SOX17* において、chronic 群の方が、発現量が有意に多かった。未分化マーカーである *Oct3/4* と、分化マーカーとして用いた *PAX6* および *SOX17* の、両方の発現量が多いことは、意図しない結果となった。本結果を正確に解釈するためには、評価対象の遺伝子を追加し同様の実験を行ったり、全遺伝子の発現量を評価可能な DNA マイク

ロアレイを用いたりし、分化した細胞種を詳細に評価することが有効である。また、刺激後の経過時間と分化傾向の関係の評価を行うことで、細胞内のシグナル伝達経路のうち、刺激による分化方向の変化と関連がある経路を特定できる。

2-7-7 物理的刺激を用いた細胞内シグナル制御の可能性

開発した電気刺激デバイスを用いることにより、高い刺激強度を用いた場合、Ca wave を誘発できることが示唆された。本研究で用いた強度では、細胞への障害が強く、2 回目以降の刺激に対して細胞が応答できなくなった。しかし、刺激強度を適切に調節することにより、意図したタイミングで Ca wave を誘発できると考えられる。放射状グリアは、Ca wave をスイッチとして、DNA 合成を始めることが報告されている [Weissman 2004]。また、Ca wave が細胞間の遺伝子発現や分化を調節するためのシグナルであることも報告されている [Leclerc 2000; Weissman 2004]。本デバイスを用いることで、Ca wave の発生と細胞内シグナルの関係を評価できると考えられる。

間葉系幹細胞由来の神経前駆細胞では、増殖において Ca 振動の維持が重要であること、および IP₃R や RyR に作用する薬剤を用いて Ca 変動の頻度を上昇させることにより細胞の増殖率や神経細胞への分化効率が上昇することが報告されている [Resende 2010a, b]。電気刺激により誘発された Ca 変動の周期は、1 分程度であることが示された。マウス ES 細胞の Ca 振動は数十秒程度の周期を持つことが知られており [Kapur 2007]、連続的な刺激により同様の周期の Ca 振動を誘発できると考えられる。以上から、本デバイスを用いることで、人為的な Ca 振動を誘発可能であることが示唆される。

以上より、Ca wave および Ca 振動という、Ca²⁺が効率的に細胞内シグナル伝達に影響を与える機構を人為的に再現できることが示唆された。本デバイスを用いることにより、Ca シグナルに関する研究に貢献できると考えられる。また、*Xenopus* の神経発生においては Ca wave の発生が重要であることが報告されているように [Leclerc 2000]、生体内の Ca シグナルは細胞分化においても重要なシグナルである。今後、未分化状態および分化途中の iPS 細胞に対して、電気刺激により生体内において起こるパターン of Ca 変動を誘発することにより、分化運命の決定や分化効率の向上につながると考えられる。

2-7-8 設定した要件の達成度

本章では、制御性の高い刺激が可能であること、刺激の短期的および長期的な応答を評価できること、および培養細胞に対する毒性が低いことの 3 点をシステムの要求仕様として設定した。以下に、それぞれの要件について考察する。

1 つ目は、刺激の制御性が高いことである。従来の薬理刺激では、薬剤の添加のタイミングは制御しやすいが、薬剤の影響を除くためには培養液を置換する必要があった。それに対して、電気刺激を用いることで任意のタイミングで刺激できる。本章では、3 日目において刺激を印加した群と、3 日目から 6 日目まで慢性的に刺激した群では、遺伝子発現に違いがあることを示した。薬理刺激の場合、慢性的に刺激することは容易であるが、電気刺激のように短時間の刺激を行うことは困難である。また、電気刺激の場合、刺激を終えた後の時間を正確に計測可能であり、刺激後の経時的な変化の評価が容易である。刺激強度については、薬理刺激の場合、薬剤の濃度を制御できる。一方、電気刺激では、刺激電圧のみではなく、刺激の頻度やパルスの持続時間といったパラメータを制御できる。本研究で用いた刺激電圧および刺激頻度では細胞死が誘発されなかったことから、より強い刺激も可能であると考えられる。今回は、慢性刺激として 1 時間に 1 回刺激を印加したが、今後、刺激頻度を調整することにより、細胞内への Ca^{2+} の流入の頻度の変化が細胞分化に与える影響を評価できる。以上から、電気刺激を用いることで、刺激の制御性が高いという要件を満足できたことが示された。

2 つ目は、刺激の短期的および長期的な応答を評価できることである。本研究では、短期的な影響として Ca 変動を評価した。刺激電極に ITO を用いることで、Ca imaging により、Ca 変動を評価できた。結果、電気刺激により、意図したタイミングで Ca 変動を誘発できることが示された。したがって、短期的な応答が評価できたと考えられる。また、長期的な応答評価として、未分化および分化マーカーの遺伝子を対象として遺伝子発現量の変化を評価した。結果、電気刺激がヒト iPS 細胞の分化方向に影響を与えること、および刺激プロトコルにより与える影響が異なる可能性があることが示された。したがって、長期的な影響が評価できたと考えられる。以上から、Ca imaging および PCR 法により、それぞれ短期的および長期的な応答を評価でき、設定した要件を満たしたことが示された。

3 つ目は、細胞に対する毒性が低いことである。ITO を用いることで、ヒト iPS 細胞を 6 日間培養できた。また、位相差顕微鏡による観察の結果、顕著な細胞死は確認されなかった。以上から、底面に接着した細胞については、維持可能であることが示された。一方、初期の生着率が通常の培養皿と比較して低かったため、コーティング条件や前処理の方法を検討する必要があることが示唆された。以上から、接着率が通常の培養皿と比較すると低いものの、接着した細胞を維持培養する上では細胞毒性が低いことが示された。したがって、設定した要件を満たしたことが示された。

2-7-9 本研究で得られた結果の新規性

本節では、本研究によって得られた結果が有する新規性についてまとめる。

1 つ目は、ヒト iPS 細胞において起こる Ca 変動について、細胞周期のステージとの関係を示した点である。先行研究において、マウス ES 細胞では示されていたものの [Kapur 2007]、マウスとヒトの多能性幹細胞では特性が異なるため、本研究において初めてヒトでの特性を示したことは重要である。本成果は、Ca imaging と同じ視野における細胞核の染色画像のみから細胞周期を推定可能になったことで初めて得られた。

2 つ目は、ヒト iPS 細胞の神経分化過程において、Ca 変動のパターンが変化することを示した点である。これまで、ヒト iPS 細胞の神経分化過程において、経時的に Ca imaging を行った報告はない。Ca²⁺は、細胞内シグナルにおいて重要な役割を持ち、神経分化においても同様である。

3 つ目は、電気刺激によりヒト iPS 細胞の Ca 変動を誘発できることを示した点である。マウス ES 細胞の EB に対して電気刺激を行った研究は存在するが [Yamada 2007]、接着培養の状態のヒト多能性幹細胞については初めての報告である。本成果により、維持培養状態のヒト iPS 細胞においても、電気刺激による Ca 変動の制御ができる可能性が示された。

4 つ目は、未分化状態のヒト iPS 細胞に対して慢性的な電気刺激を印加することで、遺伝子発現が変化することを示した点である。発現が上昇した *PAX6* は、神経分化のマーカーであり、先行研究の報告と矛盾がない点 [Lin 2010]も、重要な点である。

2-8 まとめ

本章の目的は、物理的刺激によりヒト iPS 細胞を高効率で神経系細胞へ分化誘導する手法の開発であった。以下に、神経系細胞への分化途中の細胞における Ca 変動の評価、未分化細胞における細胞周期のステージと Ca 変動の関係の評価、および電気刺激がヒト iPS 細胞の分化方向に与える影響の評価から得られた知見についてまとめる。

前脳背側の神経系細胞への分化過程において Ca imaging を行った結果、分化誘導前および 3 DAI では、個々の細胞が独立に Ca 変動を示す様子が観察された。6 DAI においては、個々の細胞の Ca 変動ではなく、Ca wave の発生が観察された。RyR の阻害下においても Ca wave が発生したこと、および IP₃R の阻害下で Ca wave が発生しなかったことから、IP₃R を介した IICR が Ca wave の伝播に重要であることが示された。以上から、ヒト多能性幹細胞が神経分化過程において Ca 変動のパターンを変化させることが示唆された。

未分化状態のヒト iPS 細胞に対して、核染色画像を用いた細胞周期解析と Ca imaging を行った。結果、G2/M 期の細胞の割合が高い区画においては、Ca 変動を示す細胞の割合が有意に低かった。また、未分化状態の iPS 細胞において発生する Ca 変動は、IP₃ の産生を阻害する U73122 の添加により発生頻度が有意に低下した。以上から、ヒト多能性幹細胞においても、Ca 変動の発生と細胞周期のステージに関係があることが示された。

ヒト iPS 細胞に対して電気刺激を行い、短期的な応答および長期的な応答を、それぞれ Ca imaging および PCR 法により評価した。結果、電気刺激によりヒト iPS 細胞の Ca 変動が誘発されることが示された。Ca 変動には、細胞外からの Ca²⁺の流入が重要であり、T 型 Ca²⁺チャネルには依存しなかった。また、慢性的に刺激を印加した場合、3 日後に *PAX6* の発現量が上昇したことが示された。3 日目のみに刺激した場合は、*Oct3/4*、*CDX2* および *SOX17* の発現量が低下した。

上記の知見が得られたことから、本章の目的である物理的刺激によりヒト iPS 細胞を高効率で神経系細胞へ分化誘導する手法の開発について、刺激デバイスの開発と有効性の評価までは達成できたと考えられる。今後、刺激が遺伝子発現を誘導する機序の解明や、特定の細胞種に分化誘導する際の刺激パラメータの最適化を行うことで、物理的刺激によりヒト iPS 細胞を高効率で神経系細胞へ分化誘導する手法の開発が達成できると考えられる。

第 3 章

発達過程における神経回路網レベル での機能評価手法の構築

3-1 緒言

本章では、発達段階に依存したヒト iPS 細胞由来神経系細胞 (human iPS cell-derived neuron; hiPS-neuron) の回路網レベルの活動パターンを評価する。回路網レベルで hiPS-neuron の活動を長期評価するためには、多点の同時計測が可能であること、および長期間にわたり安定して計測できることが要求仕様であると考えられる。

多点の同時計測が可能であることについては、MEA を用いることで満たすことができる。現在、マウスやラットから採取した神経細胞を対象として、神経回路網の活動パターンの評価が行われている [Kamioka 1996; Mukai 2003]。また、マウス ES 細胞から分化誘導した神経細胞においても、MEA 上で機能的な神経回路網を形成することが報告されている [Ban 2007]。hiPS-neuron についても、Odawara らが回路網レベルでの活動計測に成功している [Odawara 2014]。以上より、本研究においても、MEA を用いて hiPS-neuron が形成した神経回路網の活動を評価できると考えられる。また、回路網レベルの活動の評価指標として、同期バーストと呼ばれる現象が用いられている [van Pelt 2004]。興奮性と抑制性の神経細胞の比率を変更すると回路網の活動パターンが変化することからも [Lombardi 2012]、神経回路網の特性をよく反映していると考えられており、神経回路網の発達過程の評価のための指標として適切であると考えられる。

長期間にわたり安定して計測できるという仕様を満たすかについて評価するためには、hiPS-neuron の成熟に要する期間に関する知見が必要である。マウスやラットの神経細胞を用いた研究では、培養 4 週目から 5 週目において活動が安定することから、神経回路網が成熟に要する時間が 1 ヶ月程度であると考えられている [Kamioka 1996; Chiappalone 2006]。一方、ヒト細胞では、マウスと比較して機能の発達や分化に長い時間を要することが報告されており [Shi 2012a, b]、マウスやラットとは異なった時間経過で神経回路網の活動が安定すると考えられる。しかし、現在、同期バーストを指標として hiPS-neuron が形成した神経回路網の発達過程を評価した研究は存在しない。研究が行われていない要因の 1 つとして、技術的な課題が挙げられる。PSC-neuron を培養した場合、培養日数の経過に伴い、凝集塊を形成することが報告されている [Takayama 2011]。形成された凝集塊は試料の移動や培地交換の際に培養底面から剥離しやすく、信号源である細胞が電極上から移動することにより活動が計測できなくなることが考えられる。

そこで、本章では、発達段階に依存した hiPS-neuron の活動パターンの評価を目的とし、2 種類のデバイスで hiPS-neuron の活動計測を行う。1 つ目は従来の MEA であり、2 つ目はマイクロ加工技術により作製した立体的な構造を有する MEA である。後者は、微小トンネル構造により、神経細胞の軸索を電極上に固定することができる。活動の信号源となる軸索を電極上に固定することにより、計測の安定性が上昇すると考えられる。上記 2 種類のデバイス上で hiPS-neuron を培養し、同期バーストを指標として神経回路網の発達過程を評価する。

3-2 培養神経回路網を用いた先行研究

3-2-1 マウスおよびラット神経回路網を用いた研究

長期計測が可能であるという MEA の利点から、培養神経回路網の発達過程を神経回路網の活動パターンの変化から評価した例が多く報告されている [Kamioka 1996; Mukai 2003; Sun 2010]. 本項では、最初に培養神経回路網における特徴的な活動パターンである同期バーストを指標として、神経回路網の発達過程を評価した研究について述べる. 次に、神経回路網の活動パターンの変化に伴うタンパク質の発現量の変化を評価した研究について述べる.

培養神経回路網では、一般に、培養開始後 3 日目 (*days in vitro*; DIV) 程度から自発活動が計測され始める. 5 DIV 程度からは、複数の電極で同時に活動の頻度が上昇する現象である同期バーストが観察され始め、培養日数の経過とともに同期バーストに関与する電極数が上昇する [Kamioka 1996]. Mukai らは、14 DIV に一時的に活動の頻度が低下することを報告している [Mukai 2003]. 一方、Wagenaar らは、発火パターンを指標として同期バーストをクラスタリングし、10 DIV から 15 DIV において、複数の同期バーストから形成される複雑な活動パターンである *super burst* が発生したことを報告した (図 3-1 B6 および B7) [Wagenaar 2006]. 2 週目から 3 週目においては、Chiappalone らが、同期バースト内における活動パターンが変化したことを報告している [Chiappalone 2006]. さらに、Kamioka らは、5 週目以降、神経回路網が複雑な活動パターンを示すことを報告した [Kamioka 1996]. 研究グループにより、培養条件や MEA の電極パターンの違いなどから結果に差はあるものの、おおむね神経回路網の発達に伴い、同期バースト間の間隔である *inter burst interval* (IBI) および持続時間が減少することが報告されている [Mukai 2003; van Pelt 2004; Wagenaar 2006]. また、神経回路網の活動における同期バーストの支配率を示す *Burst index* は、発達に伴い上昇することが報告されている [Wagenaar 2006; Sun 2010].

神経回路網における活動パターンの変化と細胞内のタンパク質の発現の関係性も評価されている. Ito らは、回路網の形成過程において免疫組織化学染色法を用いてシナプスの個数を評価した (図 3-2) [Ito 2013]. 結果、シナプス数の増加と、同期バーストや全体の発火頻度の変化が見られるタイムコースが、類似していたことが示された.

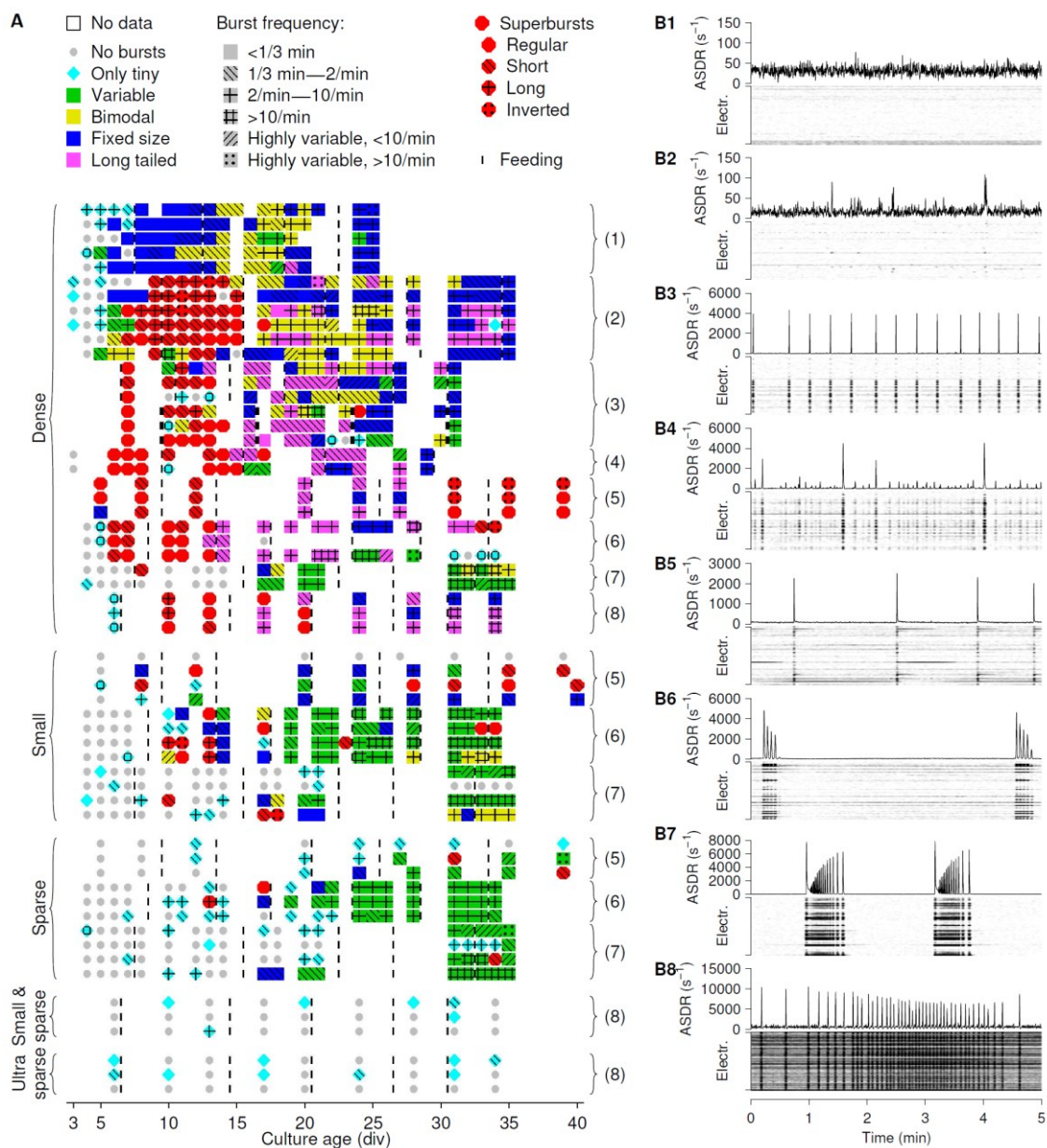


図 3-1 同期バーストのクラスタリング [Wagenaar 2006]. 複数の条件で神経細胞を播種し、活動を記録した。同期バーストは、特に高密度に細胞を播種した試料で検出された。さらに、活動のパターンを基にクラスタリングした結果、培養日数の経過に伴い、活動パターンが変化する傾向が観察された。同期バーストは、複数の電極で同期したタイミングで活動が検出される現象である (B3 から B8)。バーストが複数連なった活動パターンは、super burst と呼ばれる (B6 および B7)。

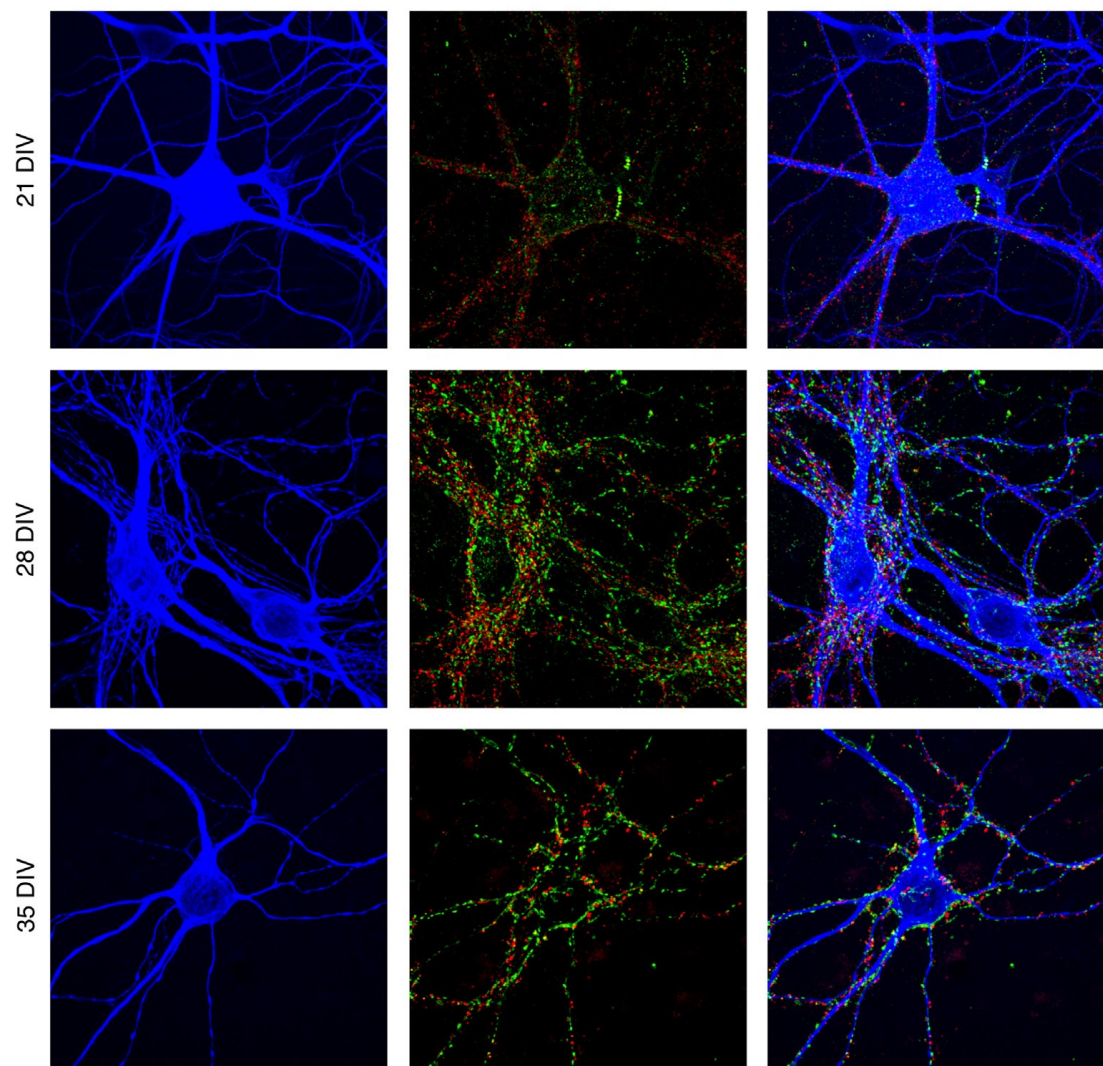


図 3-2 発達過程におけるシナプスの数の変化 [Ito 2013 改変]. 細胞体および樹状突起を染色し（青色），形成されたシナプスの数を評価した．興奮性シナプス（赤色）および抑制性シナプス（緑色）の数を評価した結果，培養日数の経過に伴いシナプスの数が増加することが示された．

3-2-2 ヒト神経細胞を用いた研究

ヒト神経細胞を用いることで、長期間持続する神経系細胞の新生、神経細胞集団を構成する複雑な神経細胞の種類、および長時間を要する成熟過程といった、マウスやラットでは再現できない特性を評価できると考えられている。本項では、ヒト胎児より採取した神経細胞、およびヒト多能性幹細胞より分化誘導した神経細胞を対象として、MEAを用いて活動計測をした例について述べる。

Napoli らは、16 から 18 週目のヒト胎児より採取した神経細胞を MEA 上で培養し、活動の変化過程を評価した [Napoli 2015]。結果、ラットでは 10 DIV 未満から活動が計測されるのに対して、ヒトでは活動が計測できるまでに 30 日以上を要したことが示された。また、70 日目まで培養を行っても、ヒト細胞から同期バーストが観測されなかったことを報告した。

ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞より分化誘導した神経細胞を MEA 上で培養した例も報告されている。Odawara らは、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を様々な条件で培養し、ラットアストロサイトと共培養した条件が長期培養に最適だったことを報告した [Odawara 2014]。さらに、MEA を用いた活動計測からは、3 ヶ月以上培養することで同期バーストを観察できたことを示した。また、ヒト ES 細胞から分化誘導した神経細胞を MEA 上で培養し、水俣病の原因物質として知られるメチル水銀の影響を評価した例が報告されている [Yla-Outinen 2010]。

3-3 研究手法

3-3-1 微細加工

本項では、微小電極アレイおよび PDMS 構造物の作製方法について述べる。最初に本章で用いた計測デバイスの構造について説明した後、フォトマスク、MEA および PDMS 構造物の作製方法について述べる。

計測デバイスの構造

本章では、2 種類の電極パターンの MEA を用いた。1 つ目は、先行研究において広く用いられているパターンと同様に、電極がアレイ状に配列したパターンである [Odawara 2014; Wagenaar 2005]。本研究では、64 点の電極が 8 行 8 列のアレイ状に配列されたパターンを用いた。電極の配置と寸法を図 3-3 に示す。電極のサイズは $50\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ }\mu\text{m}$ であり、電極中心間隔は $250\text{ }\mu\text{m}$ に設計した。2 つ目は、1 つの刺激用電極と 62 点の計測用電極を配置したパターンである。電極の配置および PDMS 構造物の形状を図 3-4 に示す。PDMS 構造物と組み合わせることで 50 本の微小トンネル内から活動を計測可能な構造となっている。刺激電極のサイズは $30\text{ }\mu\text{m} \times 7550\text{ }\mu\text{m}$ であり、微小トンネルの端部から $150\text{ }\mu\text{m}$ の位置に配置した。計測用電極は幅 $30\text{ }\mu\text{m}$ 、高さ $90\text{ }\mu\text{m}$ であり、50 点の計測電極は刺激電極から $800\text{ }\mu\text{m}$ の位置に配置した。また、50 本のうち 12 本の微小トンネル内には、刺激電極から $200\text{ }\mu\text{m}$ の位置に計測電極が配置されており、軸索を伝導する活動を記録可能である。今後、刺激電極の近くに配置した計測電極を E_{near} 、遠くに配置した計測電極を E_{far} と呼ぶ。1 つの微小トンネルは幅 $30\text{ }\mu\text{m}$ 、長さ $1120\text{ }\mu\text{m}$ 、高さ $5\text{ }\mu\text{m}$ であり、トンネル間の間隔は $120\text{ }\mu\text{m}$ に設定した。大脳皮質の神経細胞の軸索において、順行性と逆行性の伝導の間で伝導速度の違いがあったことが示されている [Bakkum 2013]。したがって、軸索の特性を計測する場合には、軸索の伸長方向をそろえることが望ましいと考えられる。また、軸索から計測されるシグナルは細胞体付近のシグナルと比較して、振幅が 10 分の 1 未満であることが報告されている [Bakkum 2013]。したがって、細胞体からのシグナルに合わせた設定で、両者のシグナルを計測した場合、低い SN 比のため軸索からのシグナルの評価が困難になる可能性がある。そこで、計測電極付近には細胞体が存在しないことが望ましいと考えた。以上を考慮し、本研究では、計測電極側の微小トンネルの端部には返しを配置し、刺激電極側にはテーパーを配置した。以降、前者のパターンを通常の MEA (standard MEA; std-MEA) と呼び、後者のパターンを axon MEA と呼ぶ。

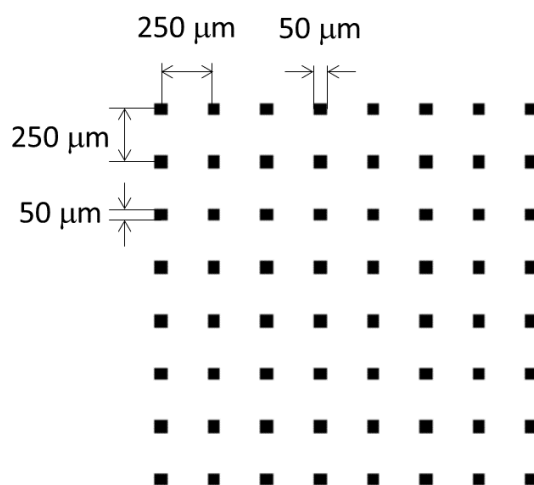


図 3-3 standard MEA の電極パターン. 電極が 8 行 8 列に 64 点配列された形状を用いた. それぞれの電極は $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ とし, 電極の中心間隔は $250\ \mu\text{m}$ に設定した.

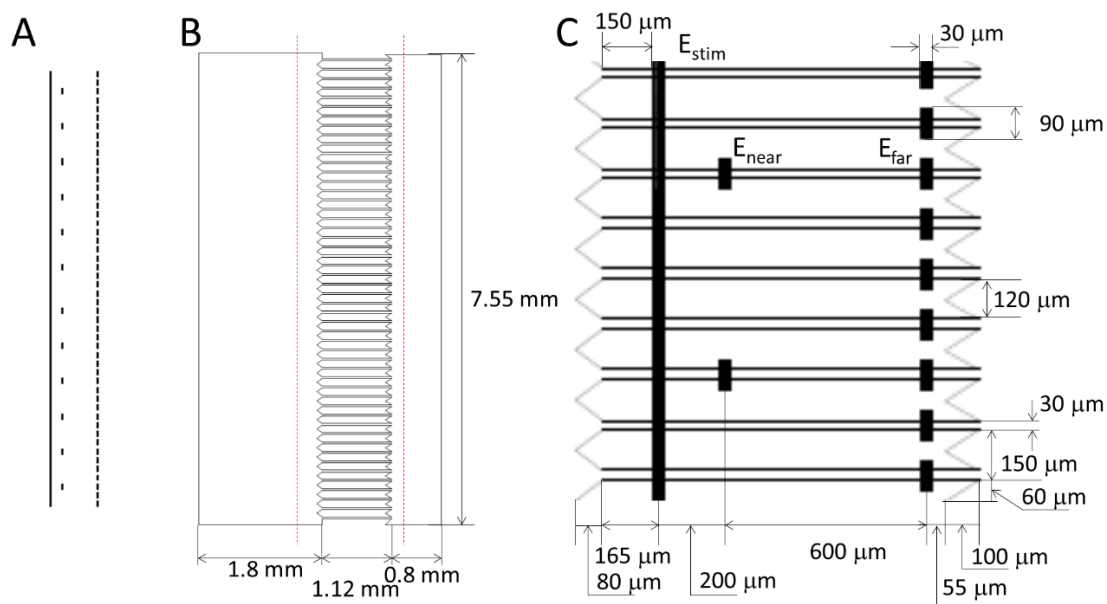


図 3-4 axon MEA の電極配置および PDMS 構造物の形状. (A) axon MEA に用いた電極のパターン. 左側の列は刺激用の電極であり, その他の電極は計測用の電極である. (B) PDMS 構造物の形状. 平行に配置した 50 本の微小トンネルがあり, 両端から神経細胞が軸索を伸長できる構造となっている. PDMS 構造物は, 赤色で示した線で切り出した. (C) 微小トンネルおよび電極の拡大図. 計測電極は 1 本の微小トンネルに 1 点ずつ配置した. また, 12 本の微小トンネルには 2 点の電極を配置した. 微小トンネルの左側端部は, 神経突起が伸長しやすいようにテーパ構造とした. 一方, 右側端部には返しを設置した.

フォトマスクの作製

OHP シートからマスクを作製する手順の概要を図 3-5 に示す。CAD ソフトウェアである AutoCAD (Autodesk) を用いて、MEA および PDMS 構造物のパターンを作成した。熱転写型プリンタ (MD-5500; アルプス電気) を用いて、パターンを OHP シート (アルプス電気) に印刷した。簡易マスク作製機 (MM-505; ナノテック) を用いて、OHP シートのパターンをエマルジョン乾板 (HRP-SN-2; コニカミノルタ) に、露光時間 2 秒の条件で縮小投影した。露光後、milliQ 水で 5 倍希釈した現像液 (CDH-100; コニカミノルタ) の中で 4 分間現像した。次に、milliQ 水で 2 倍希釈した固定液 (CFL-881; コニカミノルタ) の中に 4 分間浸し、パターンを定着させた。最後に、温水および milliQ 水ですすいだ。フォトマスクの作製は、エマルジョン乾板が感光することを防ぐために、暗室中で行った。

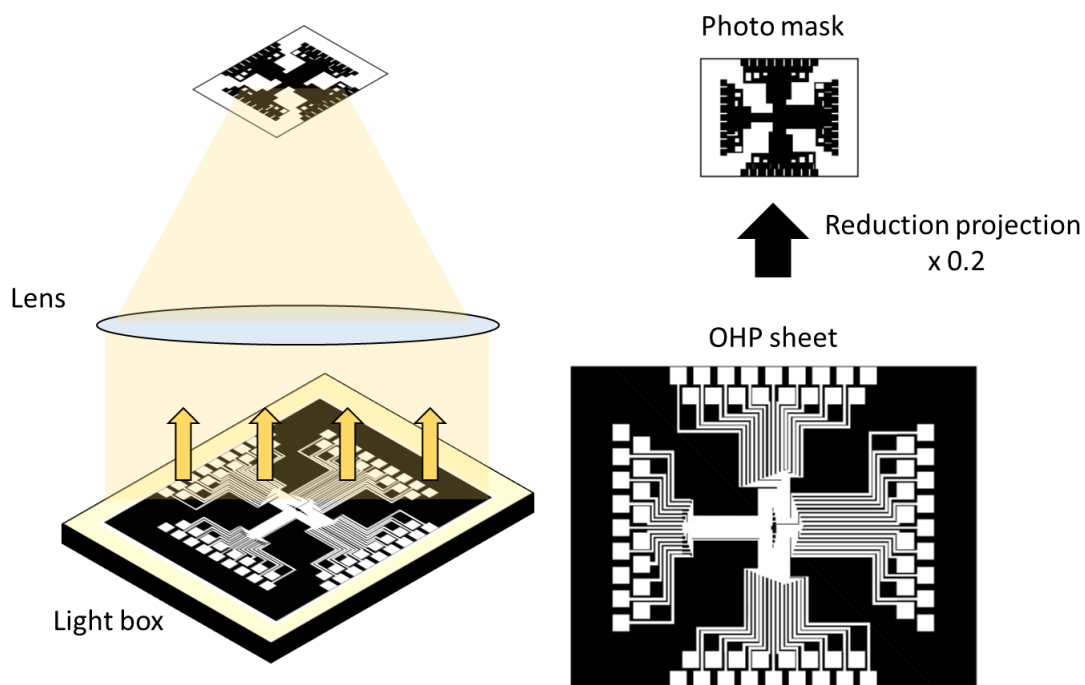


図 3-5 フォトマスク作製手順の概要。OHP シートに印刷したパターンを、レンズを通してフォトマスクに 0.2 倍で縮小投影した。

微小電極アレイの作製

MEA は、ITO を蒸着したガラス基板をエッチングすることで作製した。本作製手順は、エッチングによる回路の形成、絶縁膜の塗布、ガラスリングの接着および白金黒の析出から構成される。作製手順の概要を図 3-6 に示す。

ITO 基板 (CBC オプテクス) を洗浄した後、0.5 M 水酸化ナトリウムの中で 90 分間超音波洗浄した。ITO 基板は、milliQ 水によりすすいだ後、150°C に設定したホットプレート上で乾燥させた。次に、OFPR 800LB 23cp (東京応化工業) を 4500 rpm 30 秒間の条件でスピコートし、110°C に設定したホットプレート上で 90 秒間ベイクした。UV 硬化装置 (HLR100T-2; ミズカプランニング) を用いて、回路パターンが形成されたフォトマスクを通して、紫外線を 10 秒間照射した。基板を 90 秒間程度 NMD-3 (東京応化工業) に浸漬し現像した後、milliQ 水を用いて洗浄した。洗浄後、140°C に設定したホットプレート上で 5 分間ハードベイクした。40°C に加温した ITO-02N (関東化学) 中で 5 分間超音波洗浄し、エッチングを行った。最後にアセトンを用いて OFPR を除去した。

前述の手順で洗浄した基板に、1,1,1,3,3,3 ヘキサメチルジシラザン (hexamethyldisilazane; HMDS; 関東化学) を 4500 rpm 30 秒間の条件でスピコートし、110°C に設定したホットプレート上で 90 秒間ベイクした。基板を室温まで冷やした後、同様の条件で OFPR を塗付し、ベイクを行った。次に、ITO 基板に、マスクアライナ (PEM-800; ユニオン光学) を用いてフォトマスクを位置決めし、紫外線を 20 秒間照射した。その後、同様の手順で現像およびハードベイクを行った。

ガラスリングの接着は、2-3-6 で述べた方法で行った。内径 18 mm、外形 22 mm のガラスリングを、主剤と硬化剤を重量比 10 対 1 で混合した二液型 RTV ゴム (KE-103; 信越シリコン) を用いて、基板に接着させた。

電極の接液面積を上昇させインピーダンスを低下させる目的で、電極上に白金黒を析出させた。白金黒の析出は、白金イオンが含まれた溶液をガラスリング内に入れ、MEA 計測刺激システムから、電圧 1.2 V、パルス幅 10 ms の双極性パルスを印加することで行った。白金黒を析出させることにより、電極インピーダンスは 1 kHz で、200 k Ω 程度となった。

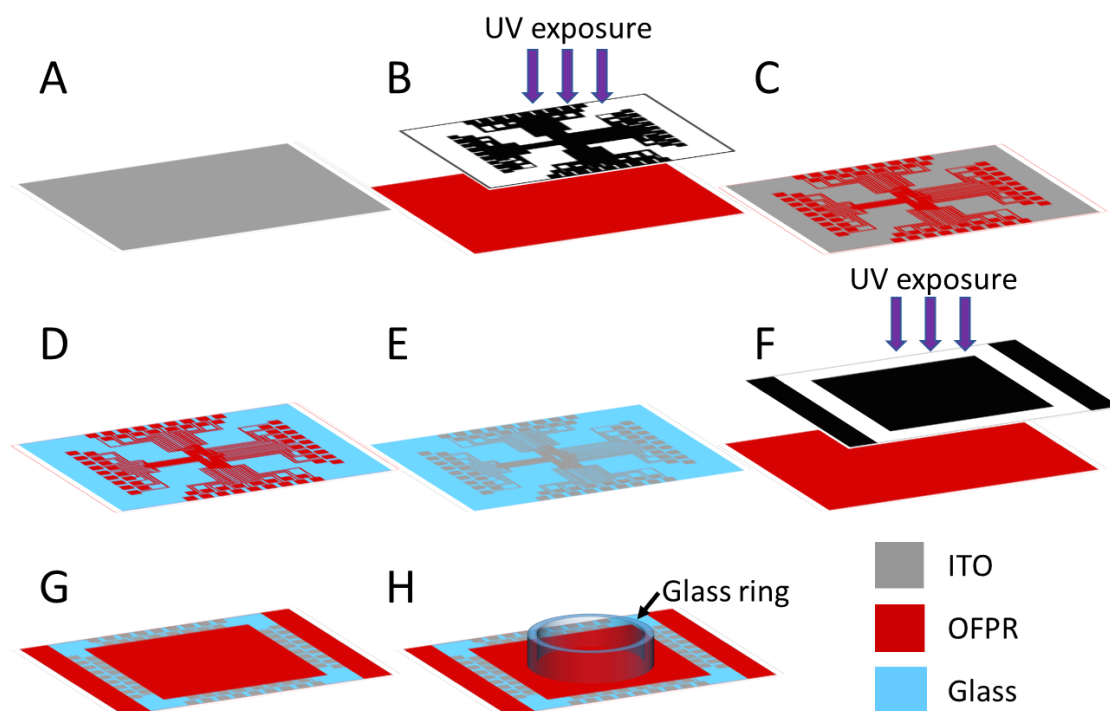


図 3-6 MEA 作製手順の概要. ITO (灰色) を蒸着したガラス基板 (A) に, OFPR (赤色) をスピコートし, フォトマスクを介して紫外線を露光した (B). 専用の現像液で現像することで, 回路のパターンを ITO 上に転写した (C). エッチング液を用いて, ITO をエッチングし, 回路のパターンを形成した (D). アセトンを用いて, OFPR を溶かした (E). さらに, OFPR をスピコートし, 電極のパターンを有するフォトマスクを介して紫外線を露光した (F). 現像し, 電極および外部のパッドを形成した (G). 培養区画となるガラスリングを接着した (H).

PDMS 構造物の作製

PDMS 構造物は、最初に鋳型を作製し、鋳型に PDMS を流し込み硬化させることで作製した。鋳型は、トンネル構造を構築するための第 1 段階と、培養領域を構築するための第 2 段階の 2 ステップの手順を用いて作製した。以下に、鋳型の作製および PDMS 構造物の作製について説明する。図 3-7 に手順の概要を示す。

シリコンウェハに、プラズマクリーナ (Harrick Plasma) を用いて大気プラズマを照射した。次に、MEA 作製時と同様の条件で HMDS のスピコートおよびベイクを行った。シリコンウェハに SU-8 3005 (MicroChem) を 4500 rpm 30 秒間の条件でスピコートした後、95℃に設定したホットプレートで 3 分間ベイクした。次に、UV 硬化装置を用いて、フォトマスクを通して紫外線を照射した。65℃ 1 分間、95℃ 3 分間のポストベイク後、SU-8 専用の現像液である SU-8 Developer (MicroChem) に 3 分間浸漬し現像した。さらに、同様のプラズマ処理および HMDS 塗布を行った後、SU-8 3050 (MicroChem) を 1000 rpm 1 分間の条件でスピコートした。95℃のホットプレートで 45 分間ベイクした後、フォトマスクの位置あわせを行い、UV 硬化装置を用いて UV を照射した。65℃ 1 分間、95℃ 10 分間のポストベイク後に、SU-8 Developer に 15 分間浸漬し、現像した。最後に 150℃のホットプレート上で 40 分間ベイクし、SU-8 構造物とシリコンウェハの接着性を向上させた。

SU-8 を用いて作製した鋳型に、主剤と硬化剤を重量比 10 対 1 で混合した PDMS (Silpot 184; Dow Corning Toray) を流し込み、80℃に設定したホットプレートで 1 時間ベイクし硬化させた。PDMS を鋳型から取り外し、手術用メスおよびバイオプシーパンチを用いて成型した。切り出した PDMS 構造物は、付着したほこりを除去するために、70% エタノールで洗浄した後、MEA および培養皿に貼り付けた。

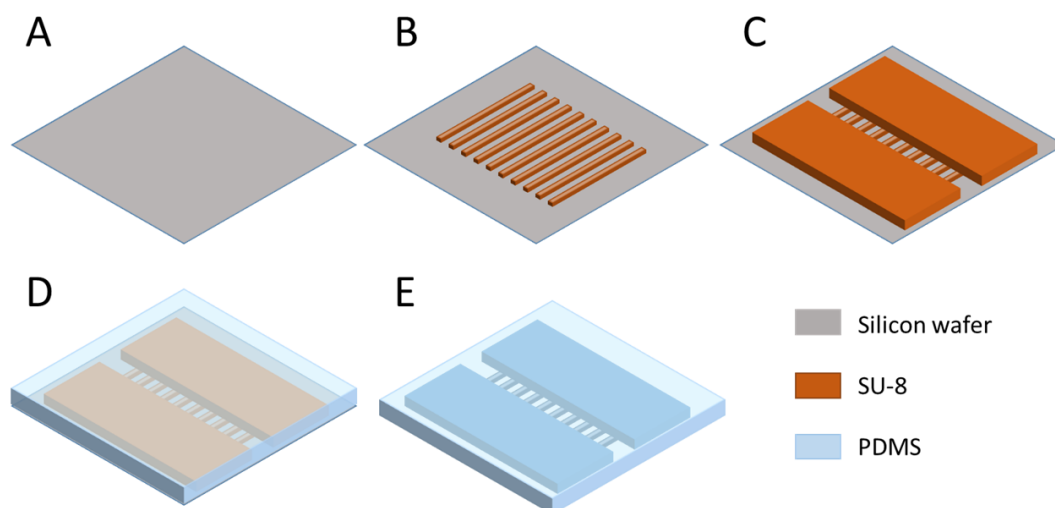


図 3-7 PDMS 構造物の作製手順の概要。シリコンウェハ (A) に SU-8 を用いて、微小トンネルの構造 (B) および培養区画の構造 (C) を形成した。PDMS を流し込み、硬化した (D)。SU-8 製の鋳型から PDMS を取り外した (E)。

3-3-2 細胞培養

第 2 章で説明した方法を用いて、ヒト iPS 細胞を神経系の細胞に分化誘導した。第 3 章では、27 DAI で凍結した hiPS-neuron を用いた。凍結バイアルを 37℃ の恒温槽に 1 分間浸け解凍した後、NM medium で 10 倍希釈した。1000 rpm 3 分間の条件で遠心した後、5 ml の NM medium で懸濁した。hiPS-neuron は、 5.0×10^2 cells/mm² の細胞密度で、0.01% Poly-L-ornithine および 20 µg/ml laminin でコートした培養皿もしくは MEA に播種した。

微小な構造物の内部にコーティング液を満たす目的で、真空ポンプを用いた減圧法が用いられている [Nevill 2011]。本研究でも、微小トンネル内部のコーティングには減圧法を用いた。最初に、減圧チャンバ内に PDMS 構造物を配置した MEA を入れ、15 分間減圧した。MEA を減圧チャンバから取り出した後、コーティング液を添加した。内部の空気が抜けた状態の PDMS が再度空気を内部に取り込むことで、微小トンネル内の気圧が低くなり、コーティング液が微小トンネル内に吸引された。微小トンネル内を含めた MEA 全体がコーティング液に接した状態で、インキュベータ内に 4 時間静置し、laminin をコートした。また、PDMS に laminin が吸着することを防ぐためにブロッキング処理を行う場合は、最初に PDMS 構造物を培養皿に貼り付けた。減圧法を用いて 3% w/v ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA; Wako) を微小トンネル内に満たし、インキュベータで 2 時間静置しコーティングを行った。最後に、milliQ 水を用いて PDMS 構造物を洗浄した後、MEA に貼り付けた。

3-3-3 免疫組織化学染色

第 2 章と同様の手法を用いて免疫組織化学染色を行い，細胞内に発現しているタンパク質を可視化した．本章で用いた一次抗体のリストは，表 3-1 に示す．また，特定のタンパク質が発現している細胞の割合を評価した場合は，各条件について，1 つの試料から 700 個以上の Beta 3 Tubulin (B3T) 陽性細胞を目視で数えた．

表 3-1 第 3 章で用いた一次抗体

Name	Expression	Isotype	Dilution	Source
Beta 3 Tubulin (B3T)	Neural cytoskeleton	Mouse IgG	1:500	Sigma
B3T	Neural cytoskeleton	Rabbit IgG	1:500	Abcam
Doublecortin (DCX)	Immature neurons	Rabbit IgG	1:500	Sigma
Nestin	Neural progenitors	Rabbit IgG	1:1000	Sigma
GABA	GABAergic neurons	Rabbit IgG	1:1000	Sigma
Tryptophan hydroxylase (TPH)	Serotonergic neuron	Mouse IgG	1:250	Sigma
Dopamine beta-hydroxylase (DBH)	Noradrenergic neurons	Rabbit IgG	1:250	Immunostar
Choline acetyltransferase (ChAT)	Cholinergic neurons	Rabbit IgG	1:200	Abcam
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Radial glia and astrocytes	Mouse IgG	1:500	Abcam
GFAP	Radial glia and astrocytes	Rabbit IgG	1:200	Abcam
Microtubule associated protein 2 (MAP2)	Dendrite and soma	Mouse IgG	1:500	Abcam

3-3-4 活動計測およびデータ解析

発達に伴う神経回路網の活動パターンを評価するために、自発活動計測を行った。計測には、Jimbo らが開発した MEA 計測刺激システムを用いた [Jimbo 2003]。計測システムおよび信号の流れを図 3-8 に示す。以下に、計測方法およびデータ解析手法について述べる。

コイル状に加工した白金線を参照電極とし、培養液内に留置した。参照電極に対する計測電極付近の電位差を計測することで、細胞外電位計測を行った。計測された生データを、最初にプリアンプを通して 20 倍に増幅した。その後、100-2000 Hz のバンドパスフィルタを通し、メインアンプを用いてさらに増幅した。増幅率は、std-MEA を用いた計測時は 500 倍、axon MEA を用いた計測時は 250 倍とした。シグナルは、A/D 変換ボード (PCI-MIO-16C; National Instruments) を用いて量子化分解能 12 bit で変換しハードディスクに記録した。なお、サンプリング周波数は、std-MEA を用いた計測時は 25 kHz、axon MEA を用いた計測時は 50 kHz とした。試料をインキュベータから計測システム内に移動させた影響を除外するために、試料の移動後 10 分間はシステム内で静置してから計測を行った。1 つの試料につき 20 分間のデータを記録した。計測時は、試料周囲を CO₂ 5%、温度 37°C に維持した。std-MEA については 50 DAI から、axon MEA については 60 DAI から 10 日毎に活動計測を行った。

得られたデータから、電極毎に全データの標準偏差の 5 倍を閾値とし、閾値を超えた負のピークを検出した。また、1 つの活動の多重検出を防止するために、最小スパイク間隔を 1 ms に設定し、最小スパイク間隔内で複数のピークが検出された場合、絶対値が最大のスパイクのみを検出した。0.5 spikes/s 以上の頻度で活動が検出された電極を有効な電極 (active electrode) と定義し、以降の解析では active electrode が 2 電極以上の試料を用いた。また、解析には、active electrode から検出されたスパイクのみを用いた。神経回路網全体で発火頻度が上昇する発火パターンが周期的に観察された試料については、以下に示す方法で同期バーストを検出し、発火パターンの解析を行った。

同期バーストが観測された試料については、van Pelt らの手法を一部改変してバースト検出を行った [van Pelt 2004]。ヒト ES 細胞由来神経回路網の発火パターンが培養日数に応じて大きく変化することが報告されているため [Kapucu 2012]、バースト検出の閾値は後述する方法で試料毎に動的に決定した。また、一般的な初代培養細胞の培養系と比較して active electrode の数が少なく、先行研究の条件ではバースト検出が不可能であったため、ビン幅を 100 ms に設定した。手法の概要を図 3-9 に示す。最初に、active electrode から検出された全てのスパイクを 100 ms のビンに区切った。次に、ビン毎にスパイク数とスパイクが検出された電極数の積をとり、product とした。ここで、 i 番目のビンの product を $product_i$ とあらわすと、 $product_i = spike\ number_i \times active\ electrode_i$ である。product が閾値を超えた場合に同期バーストを検出した。閾値は、試料内の全 product の 95 パーセントイルおよび 5 のうち、値が大きな方に設定した。同期バーストの開始時刻および終了時刻は product の値が閾値の 20%未満になった時点とした。さらに、200 ms 以内に複数の同期

バーストが検出された場合，同一の同期バーストとみなして結合した．また，持続時間が 200 ms 以下の同期バーストは解析から除外した．同期バースト検出後に，1 分間あたりの同期バースト数 (Burst rate)，持続時間，IBI，および Burstiness を算出した．Burstiness は神経回路網の発火に対して同期バーストがどの程度支配的であるかを表す指標であり，Chiappalone の手法を参考に [Chiappalone 2006]，全スパイク数に対する同期バーストに含まれるスパイク数の比とした．

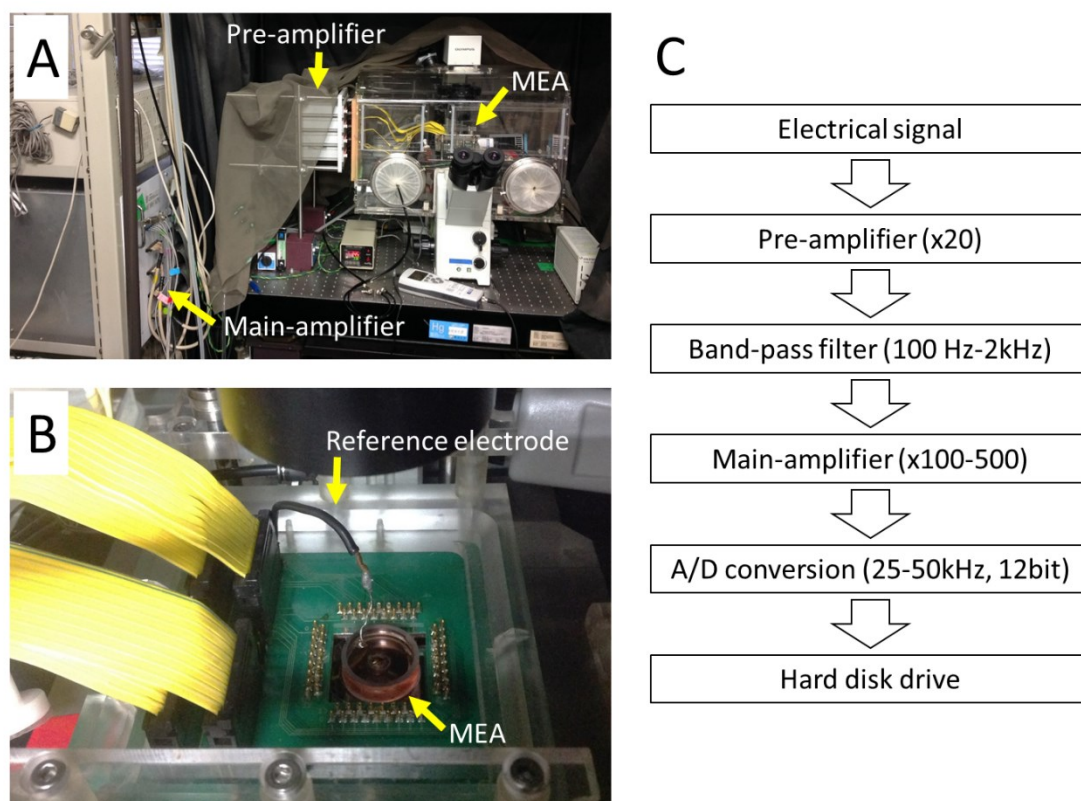


図 3-8 MEA 計測システムの概要と信号の流れ. (A) 概観. MEA から計測されたシグナルが，プリアンプおよびメインアンプを通し増幅される. (B) MEA 部分の拡大図. 培養液内に留置した参照電極と底面に配置した計測電極との電位差を計測する. (C) 計測された信号の流れ.

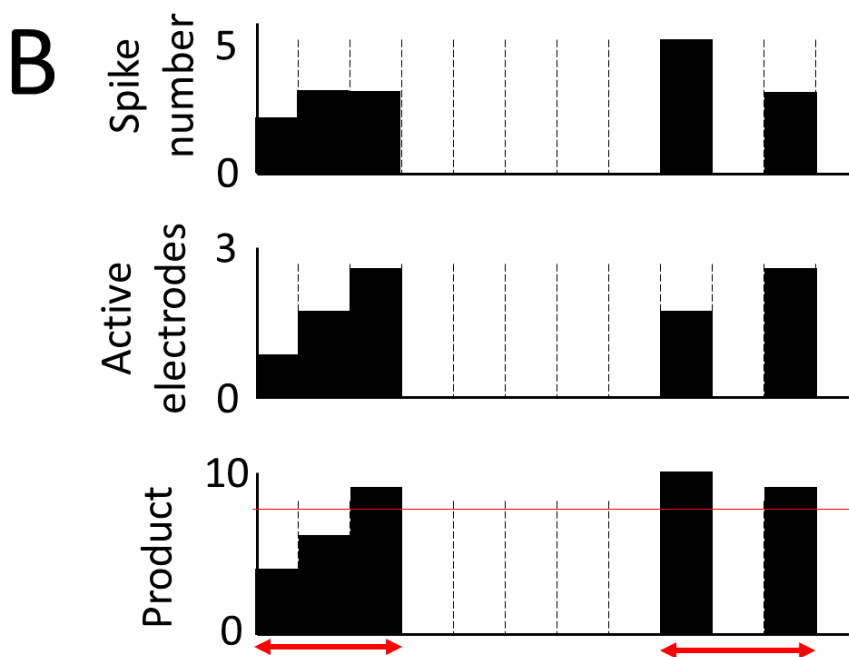
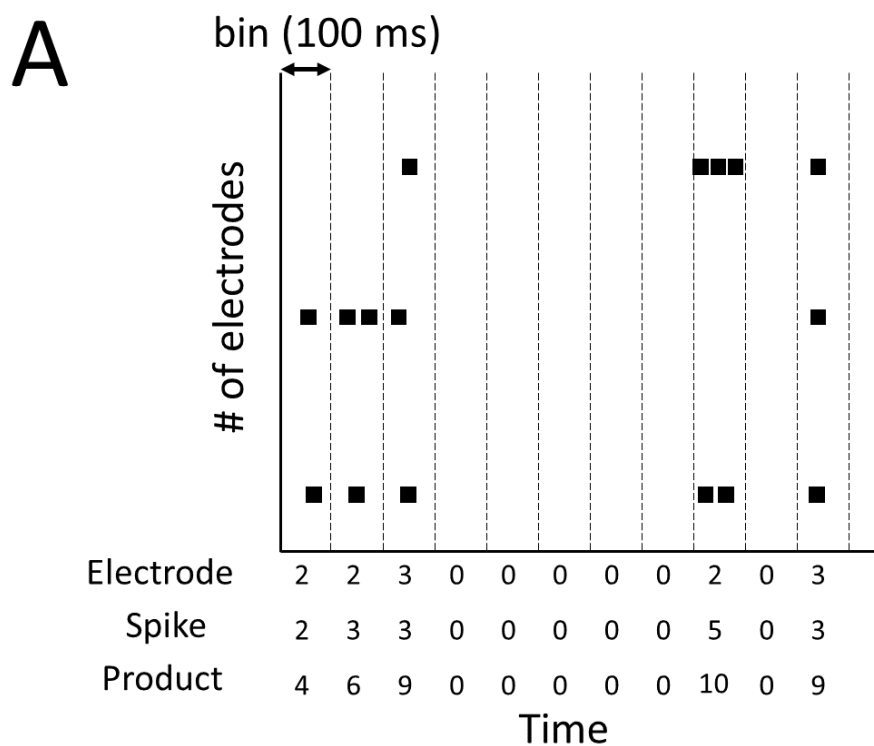


図 3-9 バースト検出の手順. (A) ラスタプロット. 活動を 100 ms のビンで区切り, それぞれのビンにおいて, 活動の総数および電極数を算出する. (B) Product の計算法. それぞれのビンにおいて, スパイク数と電極数を掛け合わせ, product を計算する. 赤い線を閾値とした場合に検出される同期バーストを, 赤い矢印で示す.

3-4 免疫組織化学染色によるヒト iPS 細胞由来神経細胞の可視化

3-4-1 神経分化過程におけるタンパク質の発現

神経分化過程では、神経幹細胞および神経前駆細胞を経て神経細胞へと分化する。本研究で用いた細胞集団が、分化過程において現れる細胞種を含んでいることを確認するために、免疫組織化学染色法を用いて特定のタンパク質を標識した。最初に、神経細胞が盛んに新生される時期である 41 DAI から 60 DAI において試料を固定し、神経幹細胞、放射状グリア、神経細胞および未熟な神経細胞の存在を示した。以下に、神経細胞と神経幹細胞、神経幹細胞と放射状グリア、未熟な神経細胞、および神経細胞とアストロサイトを染色した結果について述べる。なお、それぞれの図において、右側の図は高倍率の対物レンズを用いて取得した画像である。

図 3-10 は、41 DAI および 55 DAI において、B3T および Nestin に対する抗体を用いて標識した画像である。41 DAI では、多くの細胞が Nestin 陽性（赤色）であり、rosette の周囲に B3T 陽性（緑色）の細胞が観察された。一方、55 DAI では、一部に Nestin 陽性細胞が多い領域が存在したが、41 DAI と比較して多くの細胞が B3T 陽性であった。以上は、日数の経過に伴って神経細胞への分化が進んだことを示唆している。

60 DAI において、アストロサイトや放射状グリアに発現する glia fibrillary acidic protein (GFAP)、および Nestin に対する抗体を用いて標識した画像を図 3-11 に示す。Nestin 陽性（赤色）の細胞が多く見られる領域のうち、一部の領域において、Nestin および GFAP（緑色）の両方を発現した細胞が存在した。上記の領域において、Nestin 陽性/GFAP 陰性細胞の多くがアメーバ状の形状をしていたのに対して、Nestin 陽性/GFAP 陽性細胞は単極性もしくは双極性の形状を有していた。Nestin および GFAP を発現し、双極性の形状を有する細胞として、放射状グリアが挙げられる。以下の 3 点の理由から、今回観測された細胞は、放射状グリアである可能性が高いと考えられる。1 点目は、分化誘導手法に大脳皮質の神経細胞への誘導法を用いている点である。2 点目は、試料を固定した時期が神経新生初期のタイミングであり、神経幹細胞が残っている可能性が高い点である。3 点目は、放射状グリア以外の GFAP を発現する細胞種であるアストロサイトの細胞数が、60 日目では少ない点である [Shi 2012b]。以上より、本研究において用いた細胞集団には、放射状グリアが含まれていたことが示唆された。

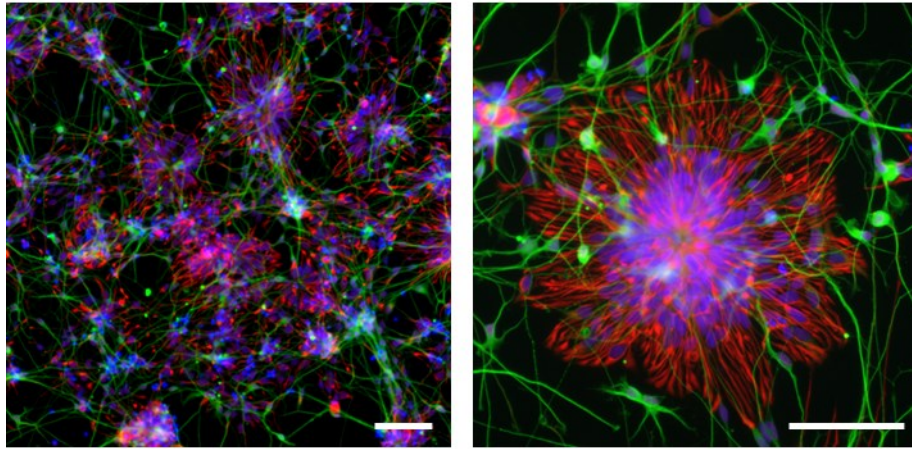
幼若な神経細胞に発現する doublecortin (DCX) に対する抗体を用いて、神経細胞集団中の未成熟な神経細胞を標識した結果を図 3-12 に示す。60 DAI において、神経回路網の中に、DCX 陽性細胞（赤色）が存在したことが観察された。また、多数の細胞が形成した凝集塊の内部および周囲から特に強いシグナルが得られたことから、凝集塊から神経細胞が新生し周囲に遊走したことが示唆された。

ヒト iPS 細胞由来の神経系細胞がアストロサイトに分化したことを確認するために、137 DAI に試料を固定し、GFAP および B3T に対する免疫組織化学染色を行った。代表的な染色画像を図 3-13 に示す。GFAP 抗体により標識された細胞（赤色）は、複数の突起を有し、

突起の長さは長いもので 900 μm を超えた。先行研究では、ヒトのアストロサイトでは、げっ歯類のアストロサイトと比較して、突起部まで含めた直径が 2.5 倍、突起の本数が 10 倍以上であることが報告されており [Oberheim 2009]、長い突起を有したという本結果と一致する。また、アストロサイトと同様に GFAP を発現する放射状グリアは、神経発生においては初期に現れる細胞である。先行研究では、分化誘導の初期に出現した放射状グリアが維持される期間は評価されていない。しかし、分化誘導した神経系細胞の分化が生体内の神経発生と同様のタイムコースで進むことが報告されており [Shi 2012b]、生体内における放射状グリアは第 2 層の神経細胞へと分化した後には存在しなくなる [Greig 2013]。また、ヒトの神経発生では、神経細胞が産生される期間は 70 日間程度であることが知られている [Caviness 1995]。したがって、GFAP 陽性細胞が放射状グリアであった可能性は低いと考えられる。以上より、ヒト iPS 細胞の一部がアストロサイトに分化したことが示唆された。

染色結果をまとめると、ヒト iPS 細胞が、放射状グリアおよび神経前駆細胞を経由し、神経細胞に分化したことが示唆された。また、細胞集団内には、アストロサイトへの分化能を有する神経幹細胞が存在したことが示唆された。2 章の結果と併せると、本手法によりヒト iPS 細胞が、神経発生において現れる細胞種を経由して、中枢神経系の神経細胞へと分化したことが確認された。

41 DAI



55 DAI

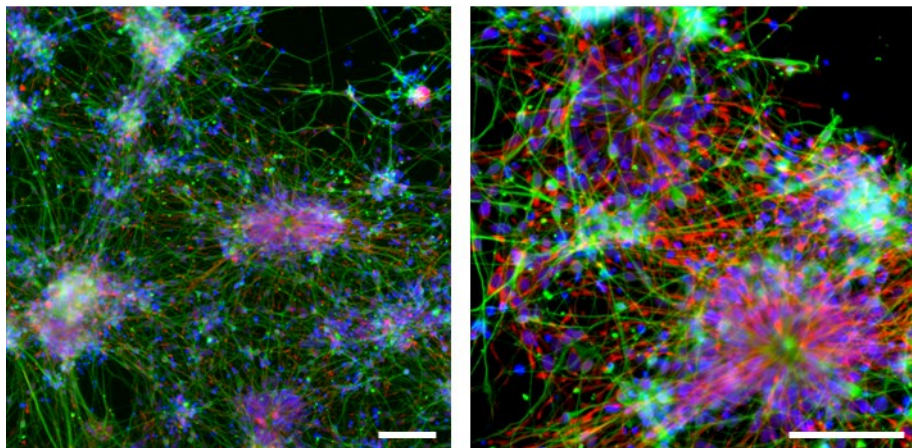


図 3-10 培養日数の違いによる神経系細胞の形態の違い。神経細胞および神経幹細胞を、それぞれ B3T (緑色) および Nestin (赤色) に対する抗体を用いて標識した。細胞核は、DAPI (青色) を用いて標識した。41 days after induction (DAI) と比較して、55 DAI の方が、神経細胞の数が増加した。上段右図は、神経幹細胞が形成した放射状構造である rosette の典型例である。スケールバーは 100 μm 。

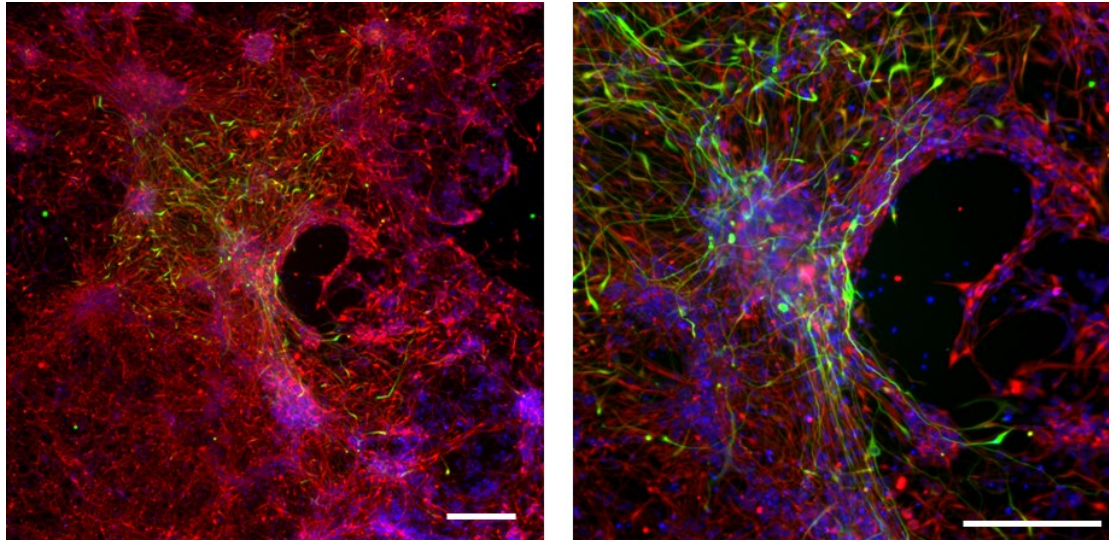


図 3-11 早期に観察された GFAP 陽性細胞. 分化誘導 60 日目において, GFAP (緑色) および Nestin (赤色) を標識した. 右図は, 左図の拡大図. 細胞核は, DAPI (青色) を用いて標識した. GFAP および Nestin が共局在した細胞は, 放射状グリアであると考えられる. スケールバーは 100 μm .

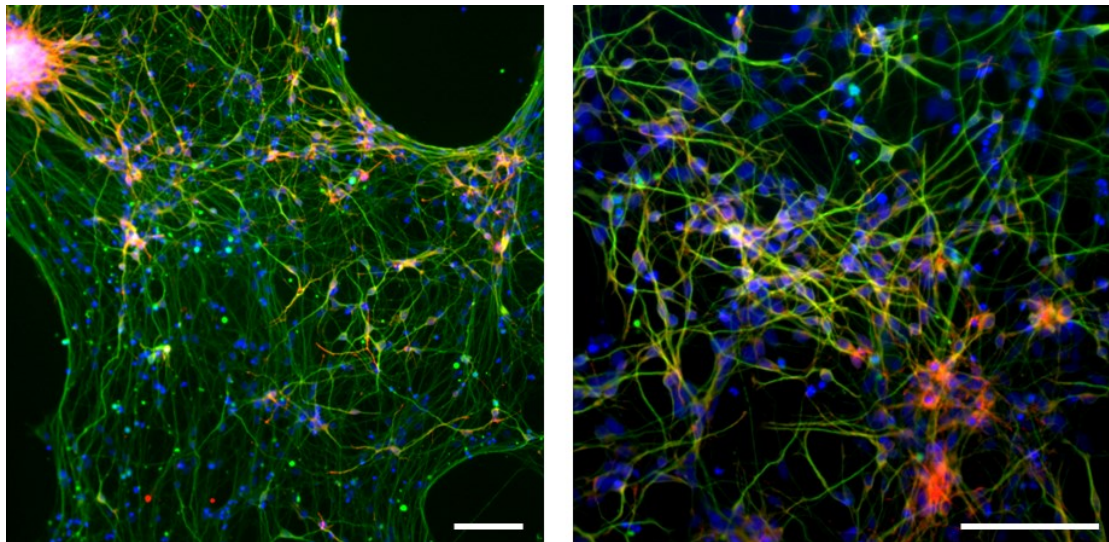


図 3-12 DCX 陽性神経細胞. 幼若な神経細胞に発現する DCX (赤色) および, 神経細胞に発現する B3T (緑色) を標識した. 細胞核は, DAPI (青色) を用いて標識した. 分化誘導 60 日後において, 幼若な神経細胞が存在したことが確認された. また, 細胞凝集塊の周囲で強い DCX のシグナルが観察された. スケールバーは 100 μm .

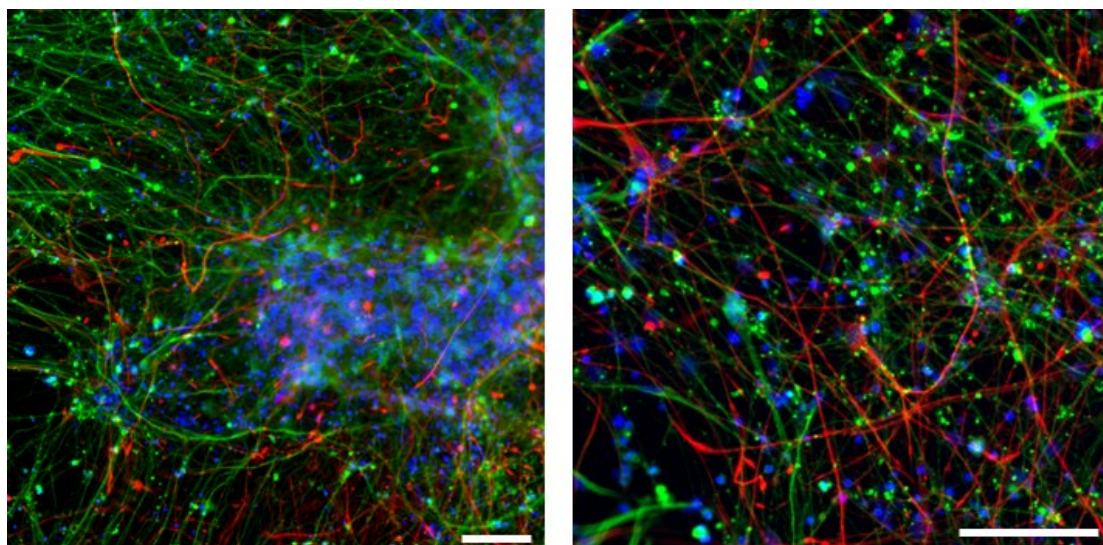


図 3-13 分化誘導 137 日目における GFAP 陽性細胞. GFAP (赤色) および B3T (緑色) を標識した. 細胞核は, DAPI (青色) を用いて標識した. アストロサイトが存在したことが示された. スケールバーは 100 μm .

3-4-2 長期培養後のヒト iPS 細胞由来神経系細胞の形態

長期培養後のヒト iPS 細胞由来の神経系細胞を可視化する目的で、免疫組織化学染色法を用いた。330 日間の培養を行ったところ、細胞が凝集塊を形成し、一部の凝集塊が底面から剥離した。底面から剥離した細胞は、本手法で評価することができない。また、本研究で用いた落射型の蛍光顕微鏡では、凝集塊内部を観察することは困難である。以上から、主に、凝集塊を形成せずに、単層に近い構造を有していた領域を観察した。本項では、神経細胞の形態、幼若な神経細胞、GABA 作動性神経細胞、およびアストロサイトについて述べる。

神経細胞を、細胞骨格全体を標識可能な B3T 抗体、および樹状突起と細胞体を標識する microtubule-associated protein 2 (MAP2) 抗体を用いて可視化した。図 3-14 に、代表的な結果を示す。細胞密度が低い領域では、個々の神経細胞が神経突起を伸長する様子が観察された。また、凝集塊は、多くの B3T 陽性の神経突起から構成されていた。凝集塊の内部では、MAP2 を強く発現した神経細胞が、多くの樹状突起を周囲に伸長した様子が観察された。

幼若な神経細胞および GABA 作動性神経細胞の存在を確認する目的で、それぞれ DCX および GABA に対して特異的に反応する抗体を用いて細胞を標識した。図 3-15 に、結果を示す。330 DAI においても、60 DAI と比較すると存在比率は小さいものの、DCX 陽性の神経細胞が存在した (図 3-15A)。また、一部の神経細胞が GABA を発現した様子が観察された (図 3-15B)。

アストロサイトへの分化を確認する目的で、抗 GFAP 抗体を用いてアストロサイトを標識した。図 3-16 に、結果を示す。330 DAI において、アストロサイトが複数の突起を有していた。また、60 DAI において観察された形状と比較すると、面積が大きく、突起の本数が多い傾向があった。以上は、330 DAI においてアストロサイトが成熟していたことを示唆する。また、前述の通り、神経系における GFAP 陽性の細胞として、アストロサイトのほかに、放射状グリアが挙げられる。そこで、330 DAI において観察された GFAP 陽性の細胞がアストロサイトであることを確認する目的で、放射状グリアを含む神経幹細胞のマーカーである Nestin に対する抗体と、抗 GFAP 抗体を用いて多重染色を行った。図 3-16B に結果を示す。GFAP および Nestin が陽性の部分を、それぞれ緑色および赤色で示す。GFAP 陽性の細胞の突起は、ほとんどが Nestin 陰性であった。したがって、330 DAI において観察された GFAP 陽性の細胞は、放射状グリアではなく、アストロサイトであったことが示された。

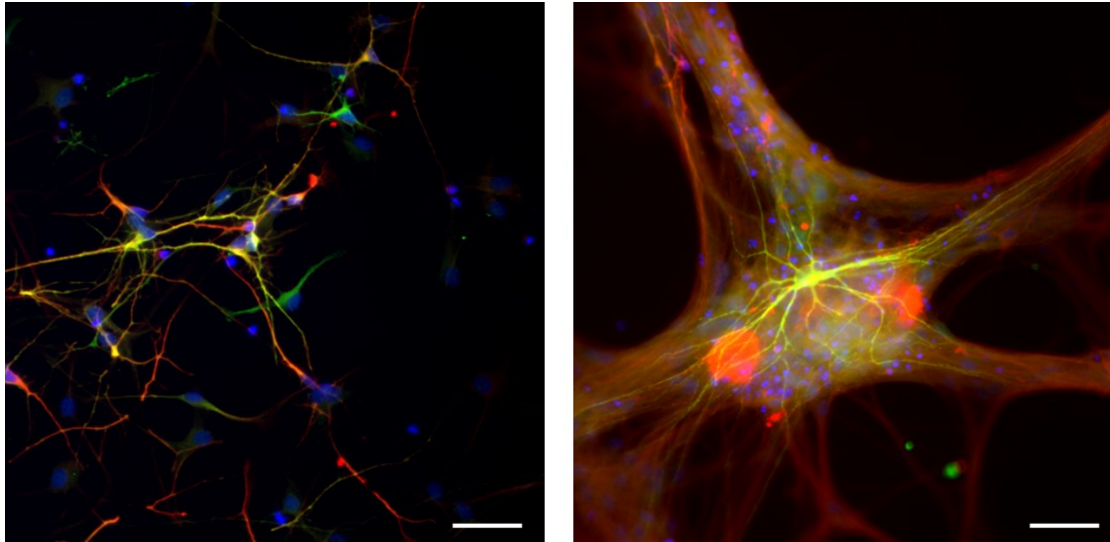


図 3-14 分化誘導 330 日目における神経細胞の形態. 抗 B3T 抗体および抗 MAP2 抗体を用いて, それぞれ神経細胞の細胞骨格 (赤色) および樹状突起と細胞体 (緑色) を標識した. 細胞核は, DAPI を用いて標識した (青色). 凝集塊の中に, MAP2 を強く発現した細胞が観察された (右図). スケールバーは 50 μm .

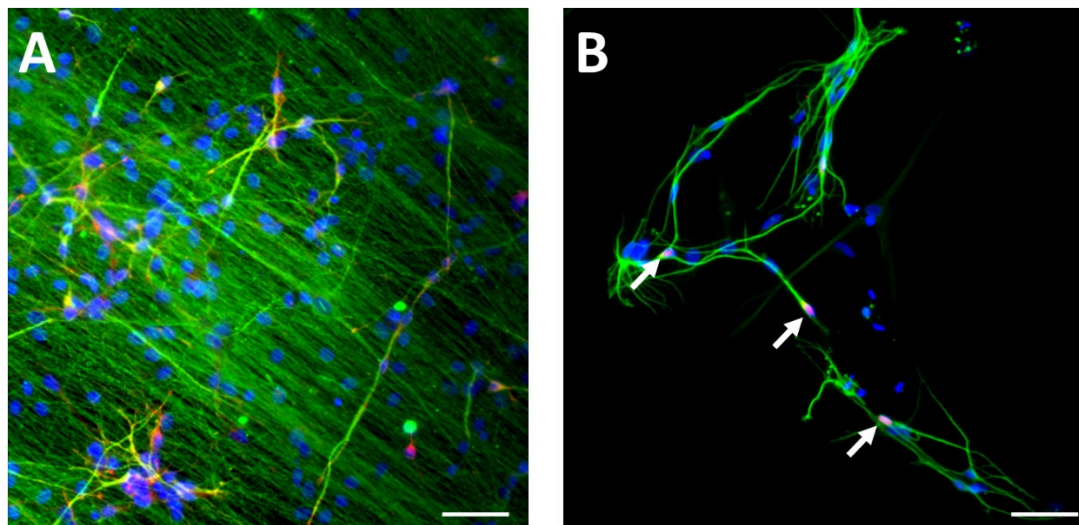
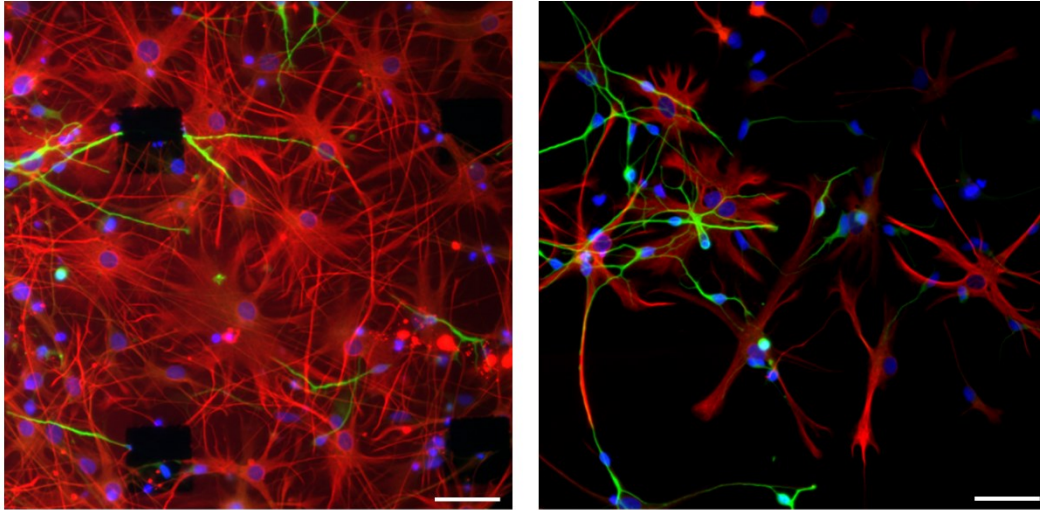


図 3-15 幼若な神経細胞と GABA 作動性神経細胞. (A) 幼若な神経細胞. 抗 DCX 抗体を用いて, 幼若な神経細胞を標識した (赤色). 330 日目においても DCX 陽性の神経細胞が存在したが, 60 日目と比較して割合は小さい傾向にあった. (B) GABA 作動性神経細胞. 抗 GABA 抗体を用いて GABA 作動性神経細胞を標識した (赤色). 神経細胞は, 抗 B3T 抗体を用いて標識した (緑色). また, 細胞核は, DAPI を用いて標識した (青色). スケールバーは 50 μm .

A



B

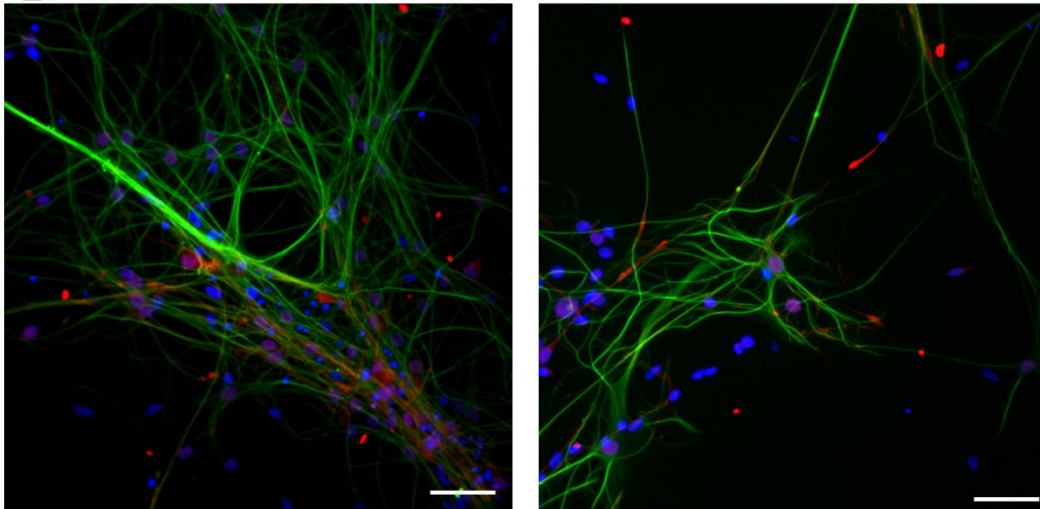


図 3-16 分化誘導 330 日目におけるアストロサイトの形態. (A) 神経細胞およびアストロサイト. 抗 B3T 抗体および抗 GFAP 抗体を用いて, それぞれ神経細胞 (緑色) およびアストロサイト (赤色) を標識した. アストロサイトは, 多数の突起を有した. (B) GFAP および Nestin に対する染色. 抗 GFAP 抗体 (緑色) および抗 Nestin 抗体 (赤色) を用いて, 細胞を標識した. GFAP 陽性のアストロサイトの突起には, Nestin が局在しない様子が観察された. 細胞核は, DAPI (青色) を用いて標識した. スケールバーは 50 μm .

3-4-3 神経細胞の神経伝達物質の特定

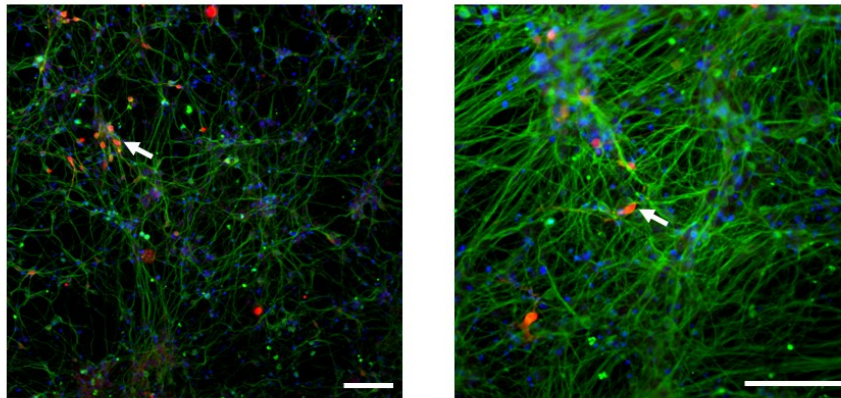
分化誘導した神経細胞の種類を評価するために、神経伝達物質のマーカーとなる抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。先行研究では、本手法を用いることで大多数の神経細胞がグルタミン酸作動性神経細胞へ分化することが報告されている [Shi 2012b]。通常、グルタミン酸作動性神経細胞の特定には、グルタミン酸トランスポーターである vGlut1 というタンパク質に対する抗体が用いられる [Gaspard 2008; Tornero 2013]。しかし、vGlut1 は、神経突起、特にシナプス前部に発現するため、密に培養された細胞の個数を数える用途には適していない。また、個々の細胞の識別のために培養細胞の密度を変えることは、細胞の分化過程に影響を与える可能性があるため、望ましくない。以上を踏まえ、本節では、グルタミン酸以外の神経伝達物質を放出する神経細胞を標識し、神経細胞集団内における比率を評価した。具体的には、60 DAI において試料を固定し、GABA、セロトニン、ノルアドレナリンおよびアセチルコリン作動性神経細胞の比率を評価した。

表 3-2 に細胞種の比率を示す。また、図 3-17 に、それぞれの種類の神経細胞を標識した代表的な染色画像を示す。図中の白い矢印で示した神経細胞が、それぞれのマーカーが陽性の細胞（赤色）である。緑色で示した B3T 陽性の神経細胞に対する比率を算出したところ、GABA 作動性神経細胞が 6.66% であり、その他の神経細胞は 2% 未満となった。また、ドーパミン作動性神経細胞を分化誘導するためには、FGF8 および shh を用いて中脳腹側の神経系細胞に分化誘導する必要がある [Perrier 2004]。したがって、FGF8 および shh を用いていない本研究の分化誘導条件では、ドーパミン作動性神経細胞に分化した細胞は少ないと考えられる。以上から、本手法を用いて分化誘導した神経細胞は、90% 以上がグルタミン酸作動性神経細胞であることが示唆された。

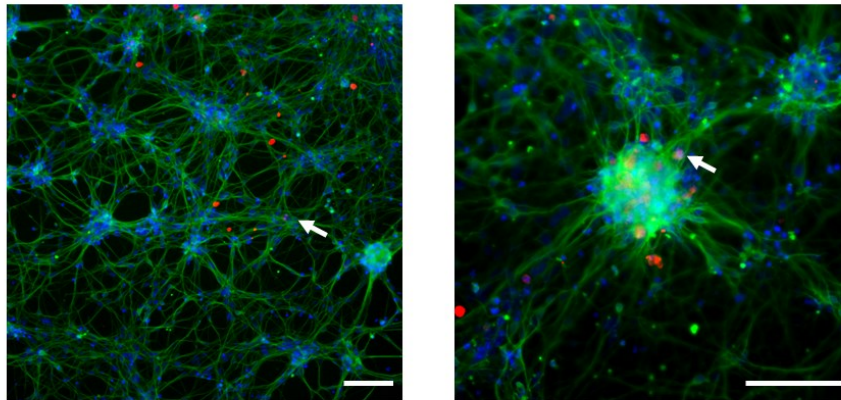
表 3-2 細胞集団に含まれる神経細胞種の割合

	Antigen	Positive cells (%)	Cell number (cell ⁺ / B3T ⁺ cells)
GABA	GABA	6.66	73 / 1096
Acetyl choline	Choline acetyl transferase	1.31	14 / 1069
Noradrenaline	Dopamine beta decarboxylase	1.00	7 / 700
Serotonin	Tryptophan hydroxylase	0.10	1 / 1022

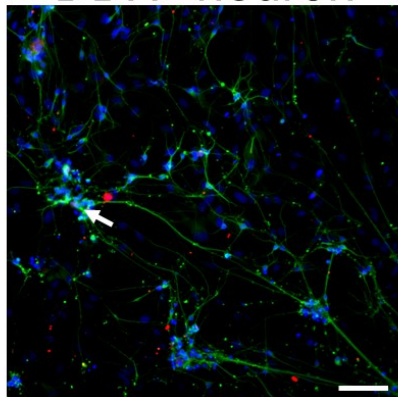
GABA⁺ neuron



ChAT⁺ neuron



DBH⁺ neuron



TPH⁺ neuron

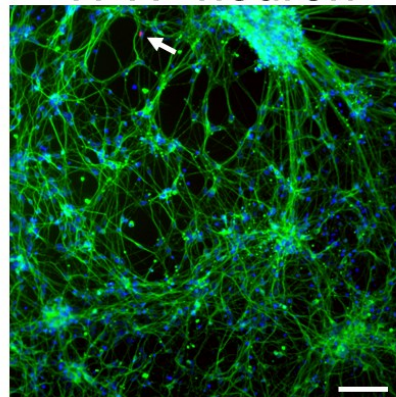


図 3-17 ヒト iPS 細胞由来神経細胞の神経伝達物質. それぞれの神経伝達物質に特異的な抗原 (赤色) を対象として, 分化誘導 60 日目に試料を固定し標識した. また, 神経細胞を, B3T 抗体を用いて標識した (緑色). 白矢印は, それぞれの神経伝達物質を有する細胞. ChAT, choline acetyltransferase; DBH, dopamine beta decarboxylase; TPH, tryptophan hydroxylase. 細胞核は, DAPI (青色) を用いて標識した. スケールバーは 100 μm .

3-5 コーティング条件の検討

hiPS-neuron の長期培養を行うにあたり、MEA および微小トンネルのコーティング条件を検討した。最初に、MEA の再使用が hiPS-neuron の生着に与える影響を評価した。続いて、hiPS-neuron が微小トンネル内に軸索を伸長するための、適切なコーティング法を検討した。

一般に MEA は、実験に使用した後、trypsin などの酵素を用いて細胞を培養表面から剥離させることで、再使用が可能である。培養表面の条件が変わることにより、場合によっては未使用の MEA と比較して、細胞の生着率が向上する場合がある。本節では、最初に MEA の再使用が、hiPS-neuron に与える影響を評価した。図 3-18 に、同じ条件でコーティングを行った再使用 MEA、未使用 MEA および細胞培養用培養皿を用いて、hiPS-neuron を培養した結果を示す。再使用 MEA では、細胞の増殖率が低く、白い矢印で示す死細胞が顕著に増加した。理由として、MEA に残存したタンパク質により、laminin をコート可能な面積が減少したことが挙げられる。神経幹細胞の自己複製には、laminin と integrin $\beta 1$ の結合による mitogen-activated protein kinase の活性化が重要であることが報告されている [Campos 2004]。したがって、底面に付着した laminin の量が少ないことは、hiPS-neuron の生着率や増殖率を低下させる原因となる可能性がある。残存したタンパク質を除去するためには、Wright らが行ったようにプラズマの照射が必要であると考えられるが [Wright 2008]、OFPR や白金黒を変性させる可能性がある。以上から、本研究では、MEA に hiPS-neuron を播種する際は、毎回未使用の MEA を実験に用いた。

本研究では、真空ポンプを用いて減圧することで、微小トンネル内のコーティングを行った。先行研究においてタンパク質を表面に吸着させスタンプとして用いられているように [Scholl 2001]、PDMS はタンパク質の吸着性が高いことで知られている。そのため、微小トンネル内をコートする場合、天井部分や壁面にも laminin が付着することが予想される。したがって、培養底面と同様の手順では適切にコーティングできない可能性がある。そこで、BSA を用いて PDMS の表面のブロッキング処理を行った。BSA によるブロッキング処理を行うことで、PDMS の天井部分や壁面に BSA が吸着される。BSA を吸着させることにより laminin が PDMS に吸着されることを防いだ。さらに、様々な濃度の laminin を用いて、コーティング液の違いが神経細胞の突起伸長に与える影響を評価した。コーティング条件の評価指標として、微小トンネル内に進入した神経細胞および神経突起の数を用いた。50 DAI における代表的な染色画像を図 3-19 に示す。また、コーティング条件と微小トンネル内に進入した神経細胞および神経突起の数の関係を図 3-20 に示す。BSA 処理済の PDMS 構造物を用いた場合の方が多くの神経突起が微小トンネル内に伸長したことが示された。また、laminin の濃度は、通常のコーティング液の 2 倍である 40 $\mu\text{g/ml}$ の条件が最も突起の伸長を促進することが示された。さらに、通常の条件である BSA 処理なし 20 $\mu\text{g/ml}$ laminin を用いた条件 (control) と、比較した条件の中では最も優れていた BSA 処理および 40 $\mu\text{g/ml}$ laminin を用いた条件 (modified method) で axon MEA をコートし、hiPS-

neuron を培養した. Control では 91 DAI, modified method では 90 DAI において活動計測を行い, active electrode 数および平均発火数を比較した. 結果を図 3-21 に示す. Active electrode 数は, control では 1.8 ± 0.9 , modified method を用いた場合には 40 ± 1 となり, modified method の方が有意に多くなった ($p < 0.001$). また, 発火頻度についても, control では 0.89 ± 0.40 spike/s, modified method は 4.4 ± 0.8 spike/s となり, modified method の方が有意に高くなった ($p < 0.01$). 2 つの手法で発火頻度が異なった理由としては, modified method の方が微小トンネル内に伸長した軸索の数が多く, 多数の細胞の活動を計測したためであると考えられる. 以上の結果から, 以降の実験において微小トンネルを持つデバイスをコートする場合, modified method を用いた.

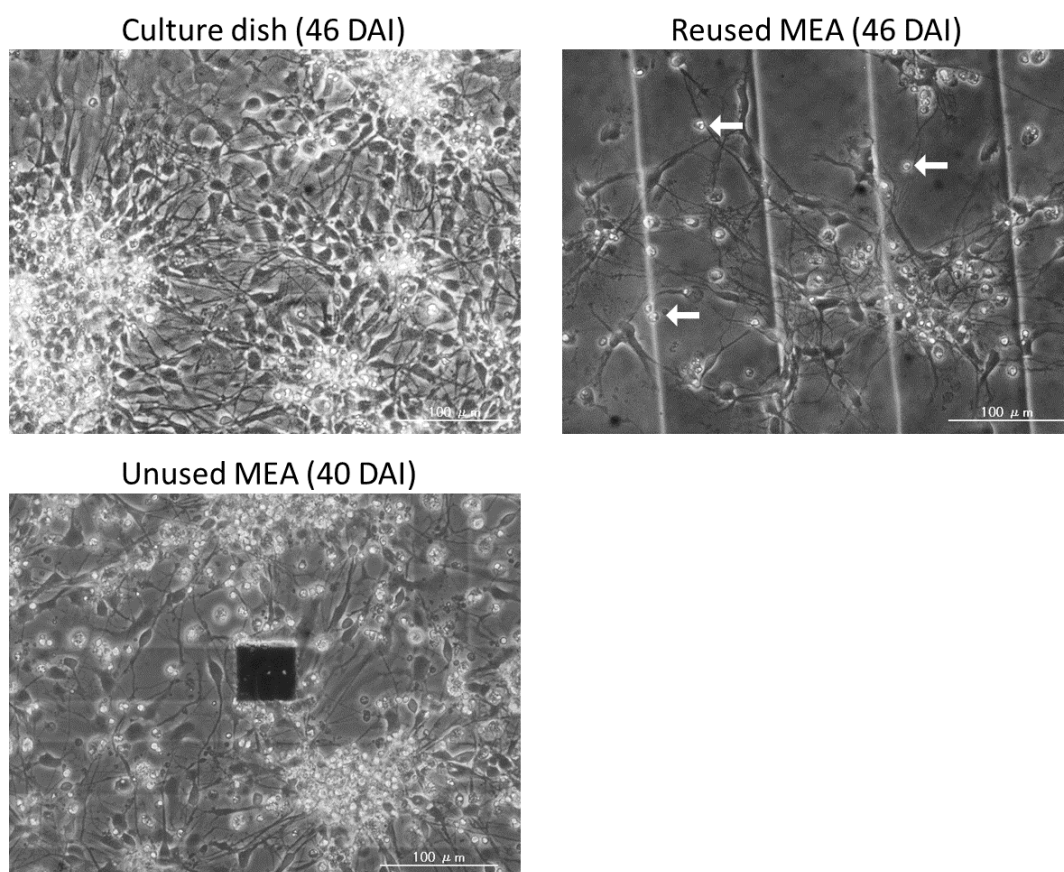


図 3-18 MEA の再利用が細胞の増殖に与える影響. 一度細胞を培養した MEA と比較して, 未使用 MEA で培養した場合, 細胞が多く増殖した. また, 通常の培養皿で培養した場合は, MEA と比較して, より多くの細胞が観察された. 白い矢印は, 死細胞を示す. DAI, days after induction.

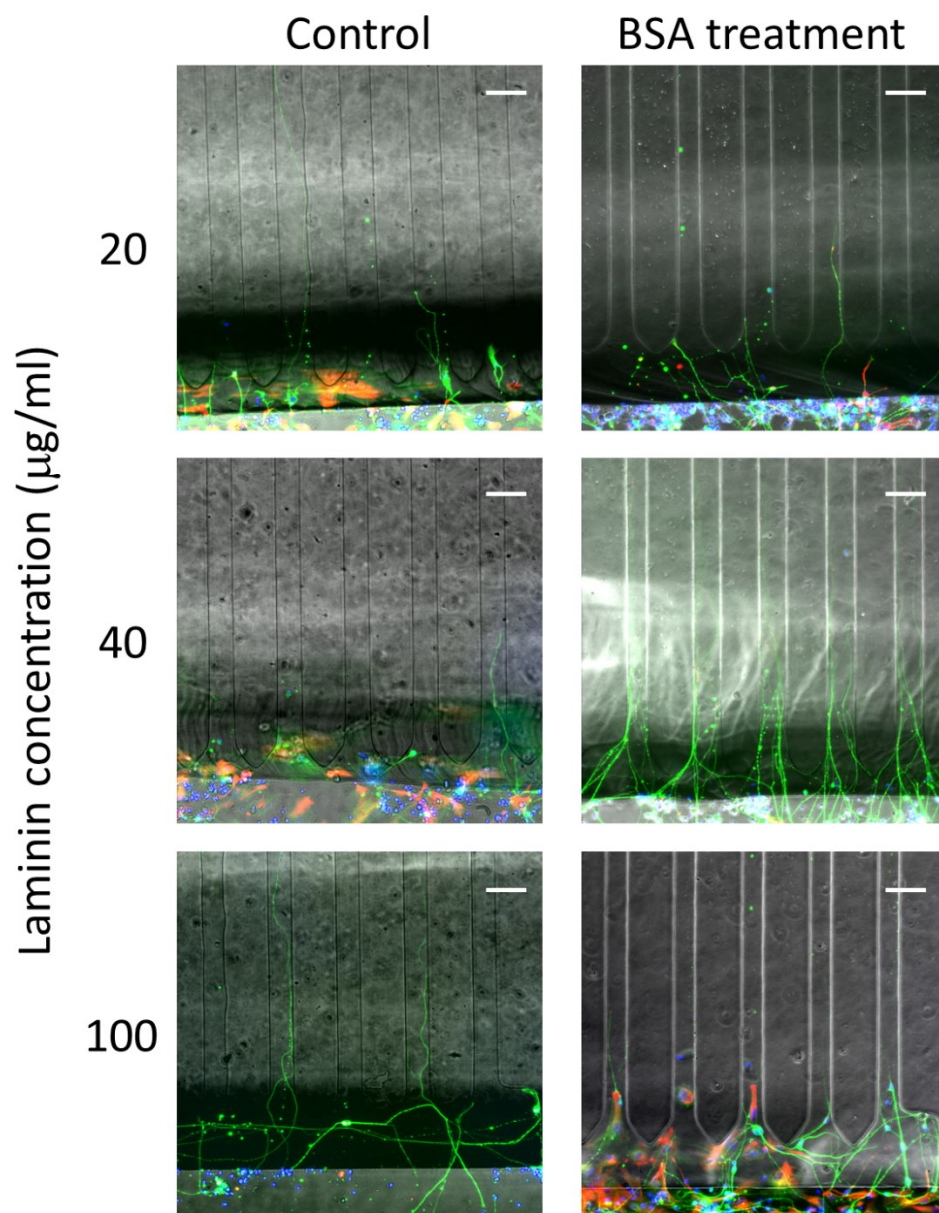


図 3-19 様々なコーティング条件における微小トンネル付近の様子。神経細胞および神経幹細胞を、それぞれ B3T (緑色) および Nestin (赤色) に対する抗体を用いて標識した。細胞核は、DAPI (青色) を用いて標識した。Laminin の濃度および bovine serum albumin (BSA) 処理の有無により、微小トンネル内に伸長する神経突起の数に違いがあった。スケールバーは 100 μm 。

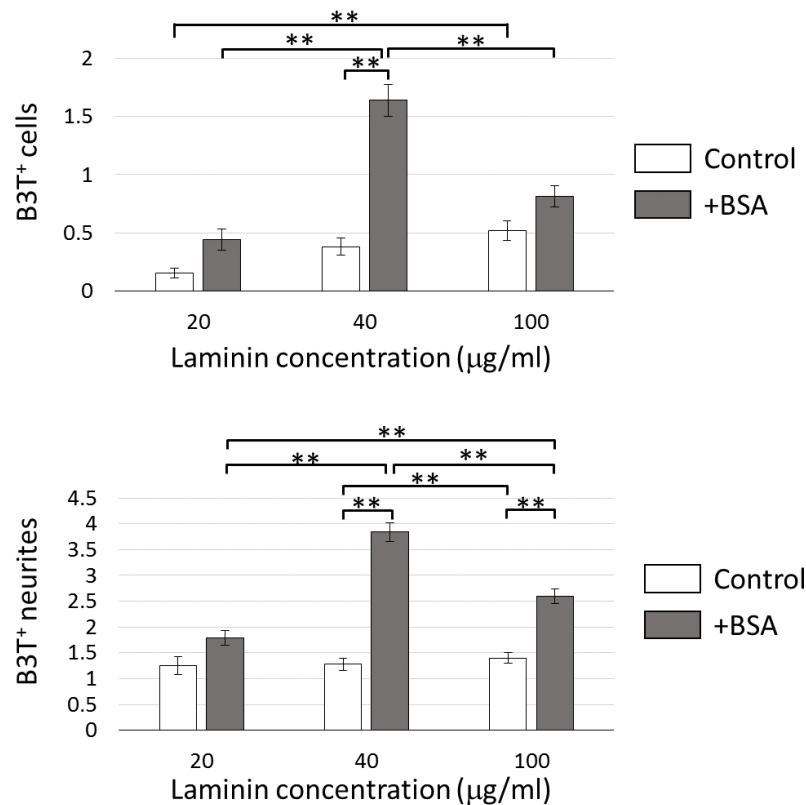


図 3-20 微小トンネル内の神経細胞および突起の数. B3T により標識された細胞および神経突起の数を評価した. 結果, 40 µg/ml laminin および bovine serum albumin (BSA) により処理した条件において, 最も細胞および神経突起の数が多かった. Mean ± SE; $n = 100$; **, $p < 0.01$ Welch's t test with Bonferroni correction.

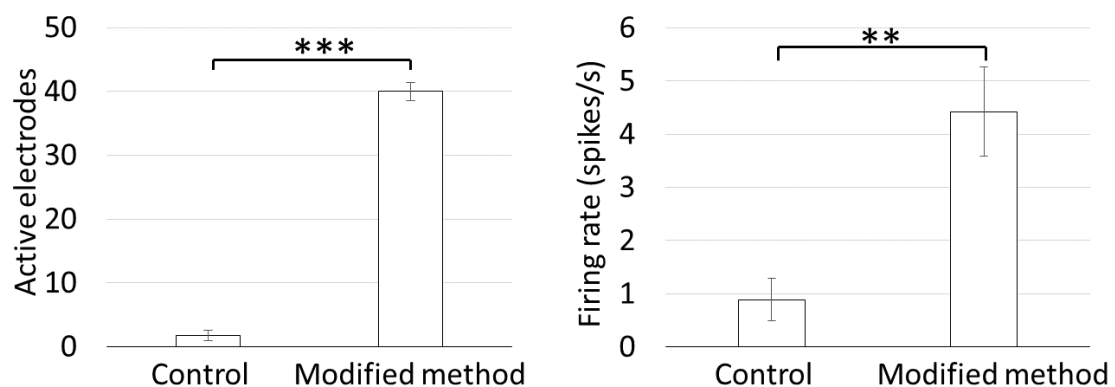


図 3-21 コーティングと計測される信号の関係. コーティング条件の違いによる, 活動計測の効率を評価した. 結果, modified method の方が, 活動が検出された電極数が多く, 発火頻度も高かった. Mean ± SE; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; Welch's t test; control, $n = 4$; modified method, $n = 6$.

3-6 発達段階における自発活動パターンの変化

hiPS-neuron の発達に伴う活動パターンの変化を評価する目的で, std-MEA および axon MEA を用いて自発活動を計測した. std-MEA については 50 DAI より活動を計測した. また, axon MEA については, 60 DAI において多くの神経突起が微小トンネル内に伸長したことを確認できたため, 60 DAI から活動を計測した. 以下に, 位相差顕微鏡を用いた形態観察の結果, 計測された活動パターンの推移, および同期バーストの特性の変化について述べる.

3-6-1 長期培養に伴う形態の変化

様々な培養日数における, MEA 上の hiPS-neuron の位相差顕微鏡写真を図 3-22 に示す. 25 DAI に MEA に播種したところ, 26 DAI には底面に生着した様子が観察された. さらに, 培養日数の経過に伴い増殖し, 突起を伸長する様子が観察された. 61 DAI には, 多くの電極上を細胞体や神経突起が覆った. さらに培養を続けたところ, 200 DAI 程度から細胞が凝集塊を形成していく様子が観察された. また, 260 DAI には, 一部の MEA で, 凝集塊が底面から剥離し浮遊している様子が観察された.

代表的な微小トンネル内の位相差顕微鏡写真を図 3-23 に示す. axon MEA 上で hiPS-neuron を培養したところ, 39 DAI には神経突起や細胞が微小トンネル内に存在する様子が観察された. 培養日数の経過とともに微小トンネル内に伸長した神経突起の数が増加した. また, 90 DAI には微小トンネル内の神経突起が束になる様子も観察された.

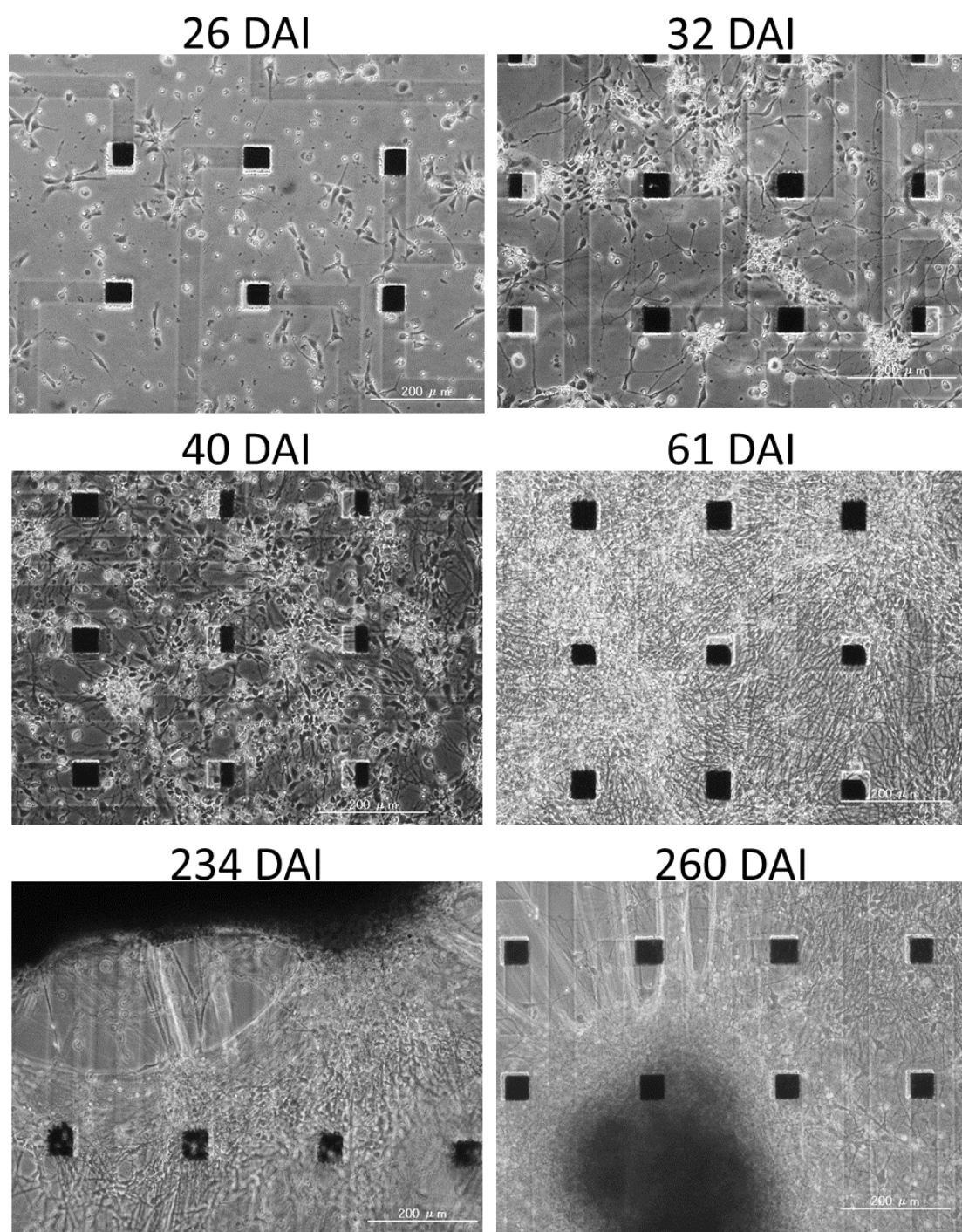


図 3-22 MEA 上の hiPS-neuron の形態. DAI, days after induction.

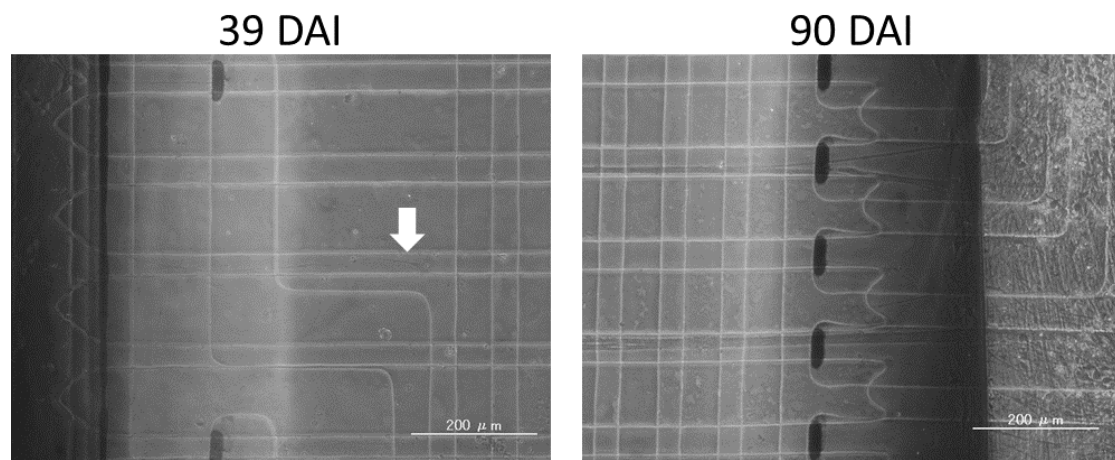


図 3-23 微小トンネル内の神経突起. 39 days after induction (DAI) には微小トンネル内に神経突起が伸長した様子が観察された (白い矢印). 90 DAI には, 微小トンネル内の軸索が束になる様子が観察された.

3-6-2 計測された波形と活動パターンの推移

hiPS-neuron の自発活動を, std-MEA については 50 DAI より, axon MEA については 60 DAI より, 10 日毎に計測した. それぞれの MEA を用いて計測した代表的な活動の波形およびラスタプロットを図 3-24 および図 3-25 に示す. std-MEA を用いた場合, 数点の電極から活動が計測され, 振幅は 10-20 μV 程度であった. 一方, axon MEA を用いた場合は, std-MEA を用いた場合と比較して, 多くの電極からより多くのスパイクが観察された. また, 計測された活動の振幅も std-MEA と比較して大きい傾向にあった.

活動が計測された電極を示す active electrode 数の推移を図 3-26 に示す. 赤色および青色の線は, それぞれ std-MEA および axon MEA を用いて計測した結果である. std-MEA では, 活動が計測された試料において, 全ての計測日を通して 5-6 点程度の電極から活動が記録された. 一方, axon MEA を用いた場合には, 60 DAI においては 25.3 ± 4.7 点であったが, 70 DAI 以降は多くの計測日において 35 点以上の電極から活動が検出された. 以上から, std-MEA と比較して, axon MEA を用いた場合に多くの電極から活動を計測できることが示された.

発火頻度の推移を図 3-27 に示す. std-MEA を用いた場合, 発火頻度は, 50 DAI から 80 DAI まで上昇した後, 230 DAI まで 2 spike/s 程度で安定した. 230 DAI からは, 再び発火頻度の上昇が見られたが, 試料間のばらつきが大きかった. その後, 280 DAI からは発火頻度が低下した. 一方, axon MEA を用いた場合, 270 DAI まで発火頻度が上昇傾向を示したが, 280 DAI で低下した.

次に, 培養日数の経過に伴う発火パターンの推移を評価した. 試料の発火パターンを, 1) 同期バースト, 2) 同期バーストは観察されなかったが active electrode が 2 点以上, および 3) active electrode が 2 点未満, の 3 つのグループに分類した. 各計測日における各活動パターンが記録された試料の数を図 3-28 に示す. std-MEA では 10 試料, axon MEA では 6 試料について計測を行った. std-MEA を用いた場合, 50 DAI では, 10 試料中 2 試料からのみ活動が検出されたが, 60 DAI には 7 試料, 70 DAI には全ての試料から活動が計測された. また, 230 DAI から活動が計測できた試料の数が減少する傾向が見られた. 活動パターンに着目すると, 同期バーストは 70 DAI から計測され, 同期バーストを示す試料の割合が 100 DAI まで上昇した. 一方, axon MEA を用いた場合, 計測を開始した 60 DAI から 290 DAI まで全ての試料において活動が検出された. 60 DAI において同期バーストを示す試料は存在しなかったが, 70 DAI においては全ての試料から同期バーストが観察された. 80 DAI から 100 DAI までの間, 同期バーストを示す試料の数が減少したが, 110 DAI 以降は全ての試料において同期バーストが観察された.

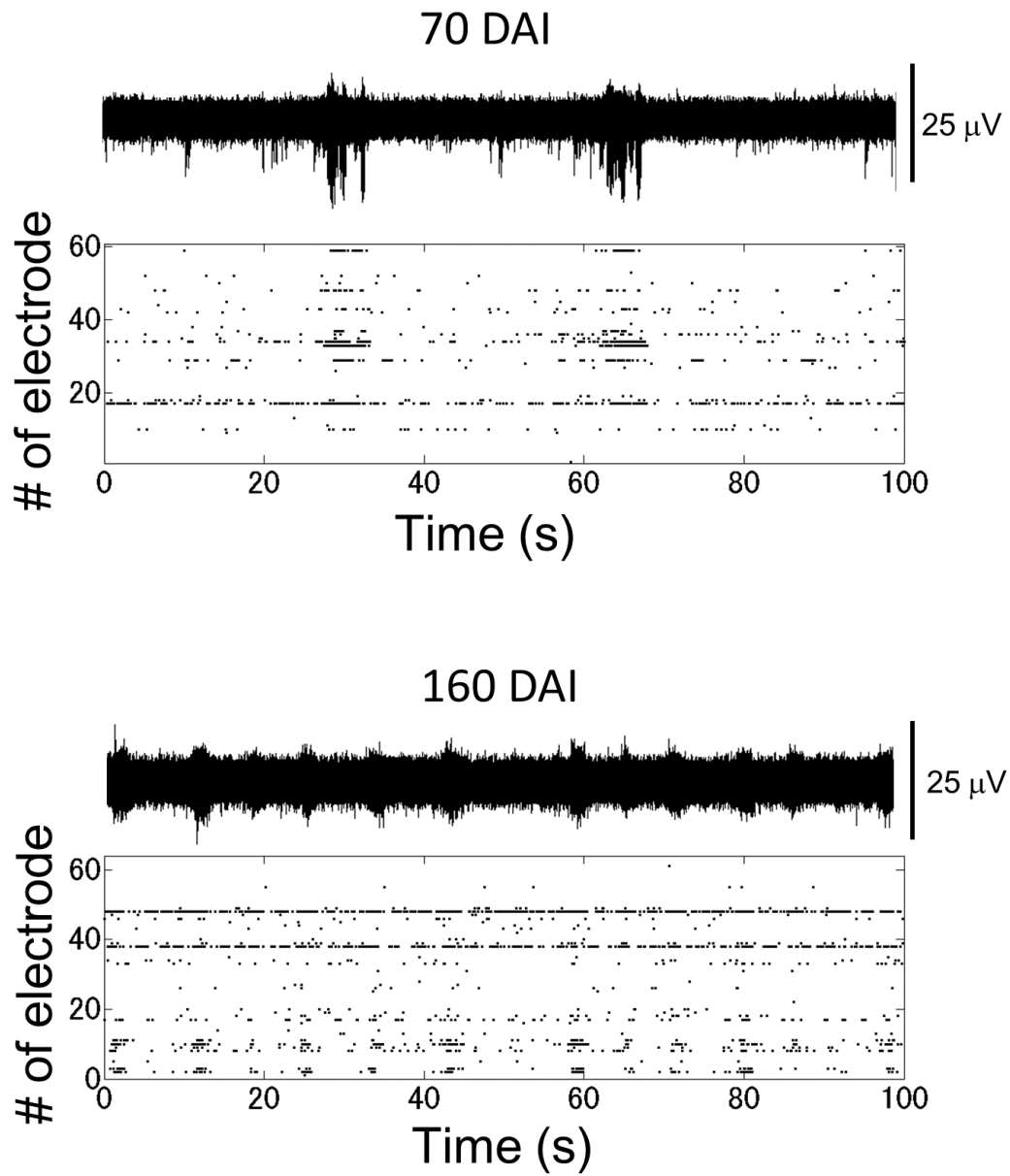


図 3-24 計測された波形およびラスタプロット. 活動は 5 点程度の電極から計測され, 計測されたシグナルの振幅は数十 μV 程度であった. DAI, days after induction.

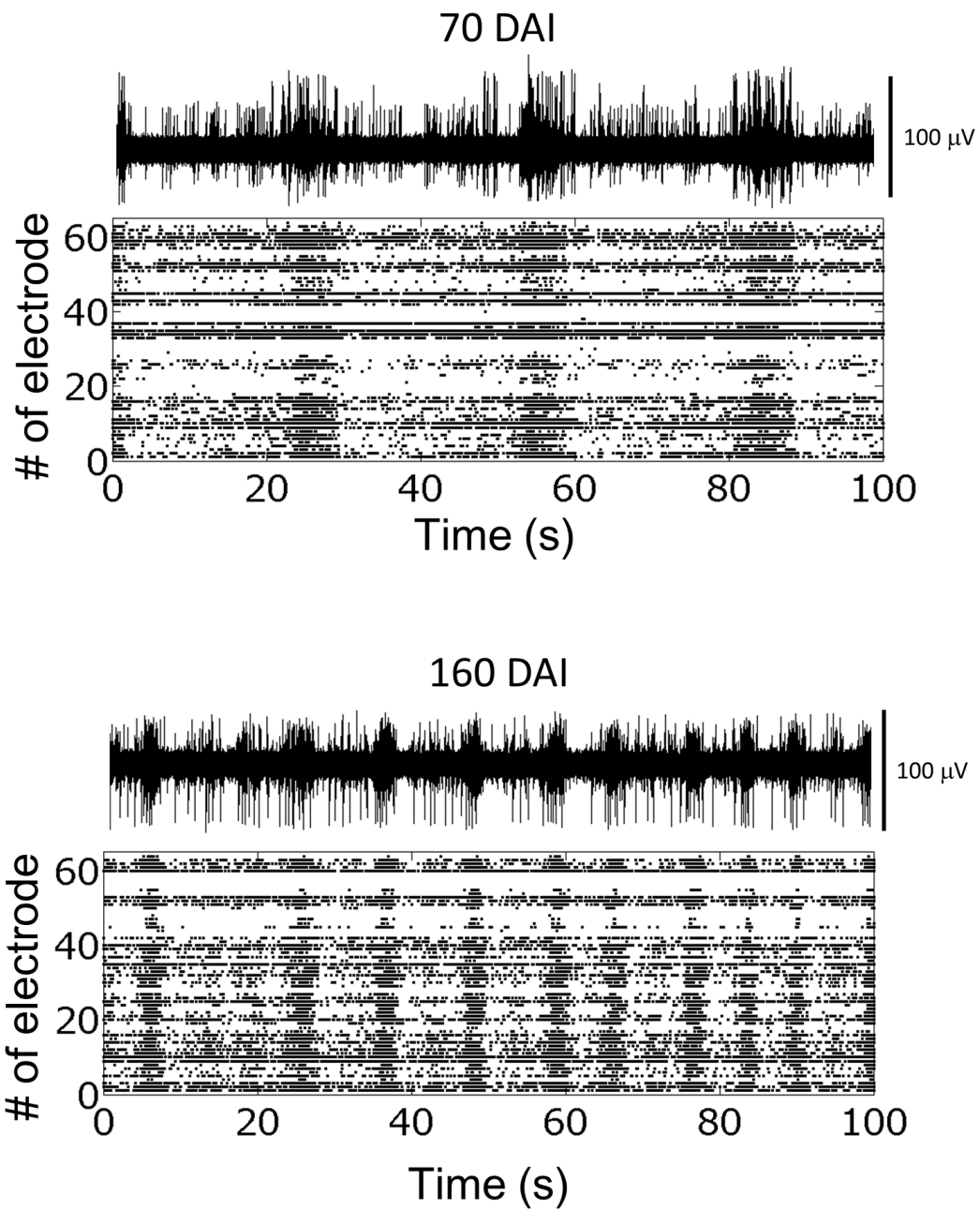


図 3-25 axon MEA を用いて計測された波形とラスタプロット. standard MEA を用いた場合と比較して, 多くの電極から, 大きな振幅を有するシグナルを計測した. DAI, days after induction.

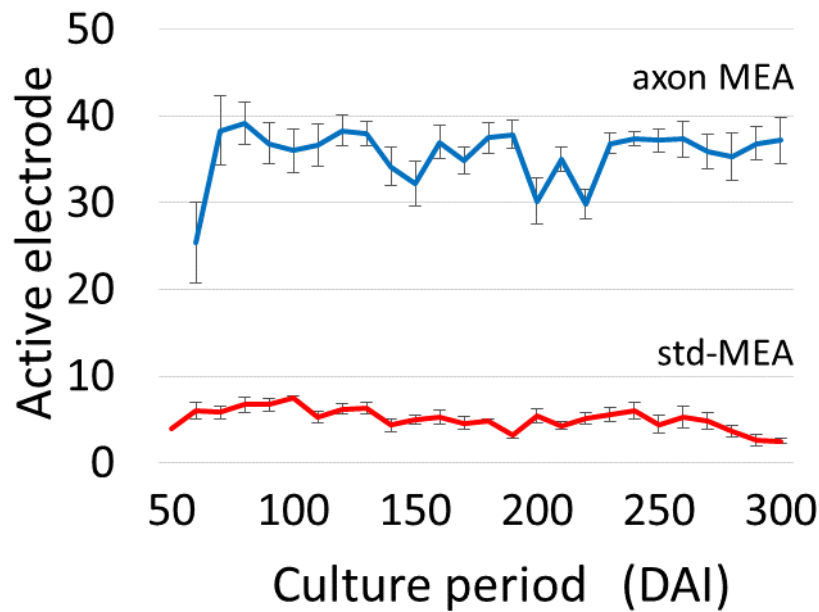


図 3-26 活動が計測された電極数の推移. 0.5 spike/s 以上でスパイクが検出された電極を active electrode と定義した. standard MEA (std-MEA) を用いた場合, 5 点程度の電極から活動が検出された. 一方, axon MEA は多くの計測日で, 35 点以上の電極から活動が検出された. DAI, days after induction; mean \pm SE.

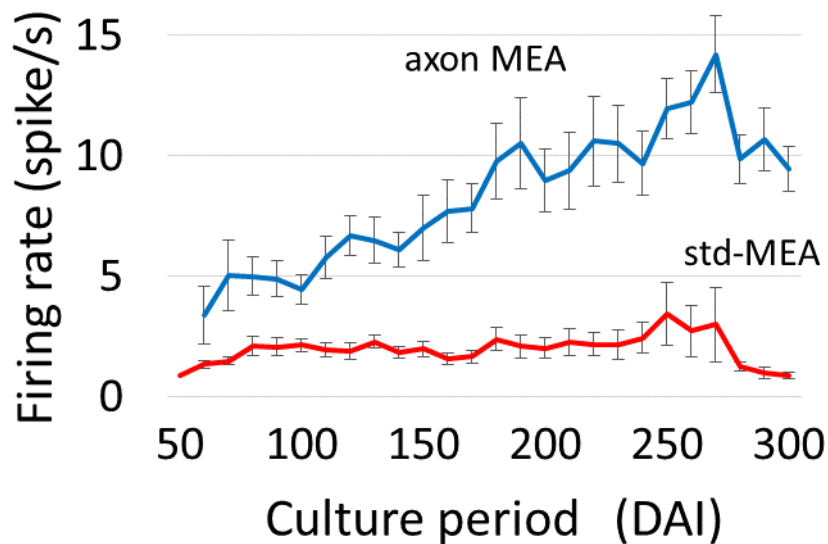


図 3-27 発火頻度の推移. standard MEA (std-MEA)では, 240 days after induction (DAI) まで 2 spike/s 程度の発火頻度が維持され, 280 DAI からは低下した. 一方, axon MEA では, 270 DAI まで発火頻度が上昇傾向を示した. Mean \pm SE.

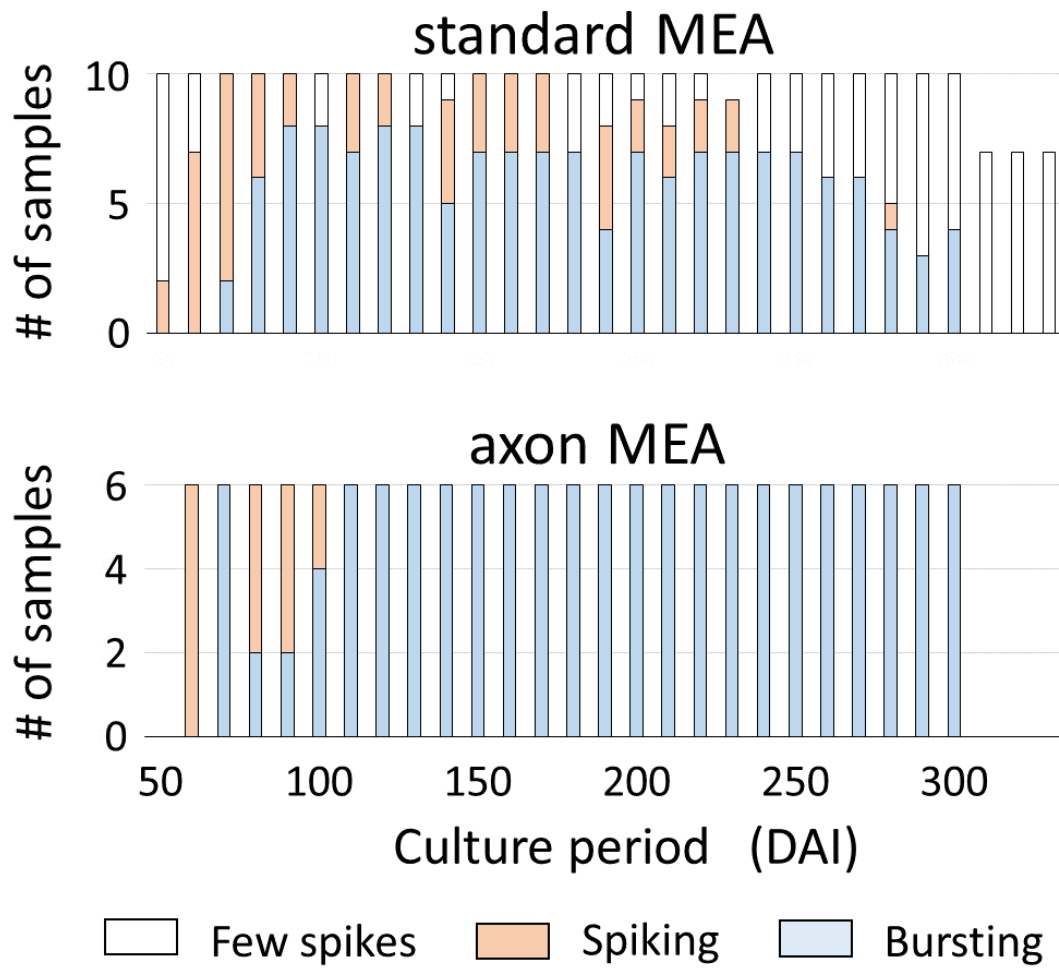


図 3-28 活動パターンの推移. standard MEA を用いた場合, 分化誘導 230 日目 (days after induction; DAI) から, 活動が計測された試料数が減少し, 310 DAI 以降は活動が検出されなかった. 一方, axon MEA を用いた場合, 300 DAI までは, 全ての試料で活動を計測でき, 活動パターンも同期バーストを示した.

3-6-3 発達に伴う同期バーストの変化

同期バーストを示した試料について、同期バーストの特徴量として **Burst rate**、持続時間、**IBI** および **Burstiness** を算出した。以下に、培養日数の経過に伴う、それぞれの特徴量の変化について述べる。なお、290 DAI 以降では、std-MEA を用いた場合、スパイク数が減少し同期バーストの検出が困難になったため、280 DAI までのデータを表示した。

Burst rate の変化を図 3-29 に示す。std-MEA では、270 DAI までは上昇する傾向を示したが、270 DAI 以降は低下した。一方、axon MEA では、250 DAI までは 5 burst/min 程度の値となったが、それ以降は上昇した。**Burst rate** は、280 DAI までは std-MEA の方が大きな値となった。

持続時間の変化を図 3-30 に示す。std-MEA を用いた場合、培養日数に伴って低下する傾向を示し、210 DAI 以降は 1 秒未満となった。axon MEA についても、130 DAI 以降は低下傾向を示した。持続時間の値は、計測期間を通して axon MEA の方が大きかった。

IBI の変化を図 3-31 に示す。どちらの MEA を用いた場合でも、70 DAI において 20 秒以上という大きな値をとった。std-MEA を用いた場合は、10 試料中 2 試料で同期バーストが検出され、それぞれの平均 **IBI** は 17.8 秒および 22.9 秒であった。一方、axon MEA では、6 試料全てで 20 秒程度の **IBI** を有する同期バーストが検出された。それ以降は、std-MEA で低下傾向を示したのに対して、axon MEA では、150 DAI から 250 DAI まで 10 秒以上となった。

Burstiness の変化を図 3-32 に示す。std-MEA では、100 DAI まで一度減少傾向を示した後、上昇傾向を示し、0.7 程度の値となった。一方、axon MEA では、130 DAI まで上昇した後、160 DAI まで低下した。その後は、300 DAI まで上昇傾向を示した。

以上をまとめると、どちらの MEA においても、70 DAI において特徴的な周期の長い同期バーストが観察された。また、70 DAI 以降は、培養日数の経過に伴い、持続時間および **IBI** が減少していくことから周期の短い活動が起こるようになったことが示された。axon MEA を用いた場合、260 DAI において、**burst rate**、持続時間および **IBI** が変化する様子が観察された。また、**Burst rate**、持続時間、および **IBI** については、270 DAI から 300 DAI までは顕著な変化を示さなかった。

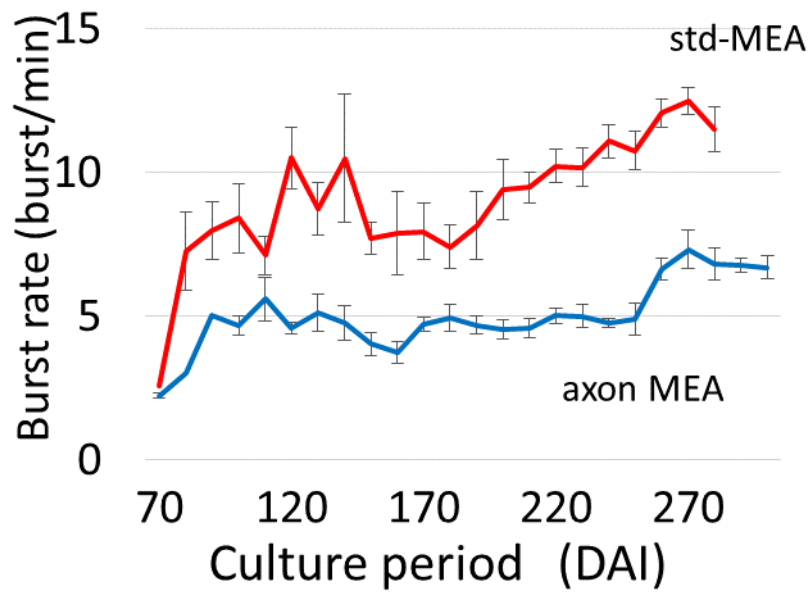


図 3-29 Burst rate の推移. 培養日数の経過とともに, Burst rate が上昇する傾向を示した. DAI, days after induction; std-MEA, standard MEA; mean \pm SE.

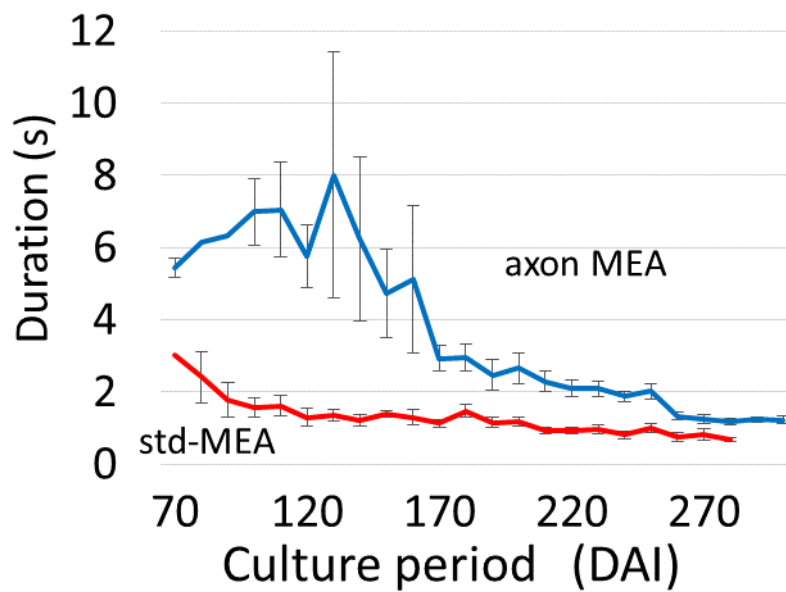


図 3-30 同期バーストの持続時間の推移. 培養日数の経過とともに, 低下する傾向を示した. DAI, days after induction; std-MEA, standard MEA; mean \pm SE.

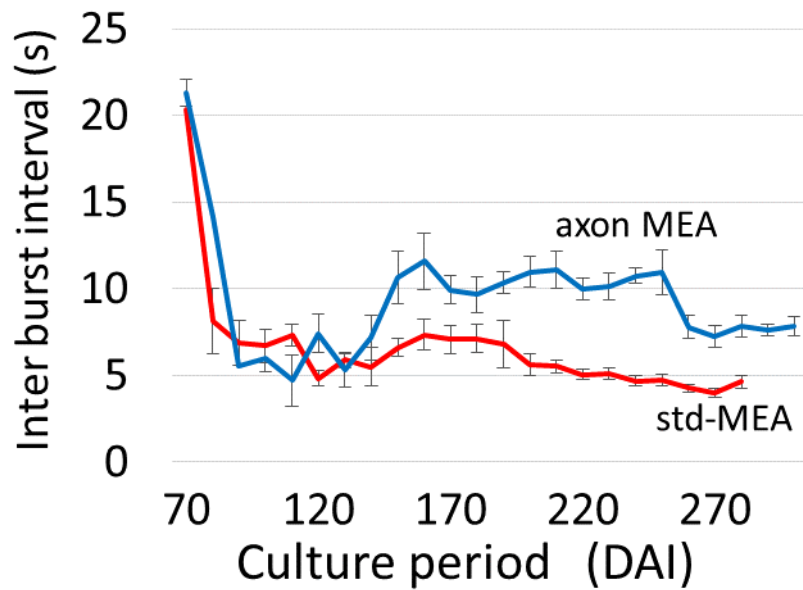


図 3-31 同期バースト間の間隔の推移. どちらの MEA を用いた場合でも, 分化誘導 70 日目 (days after induction; DAI) において, 20 秒を超えた. std-MEA, standard MEA; mean \pm SE.

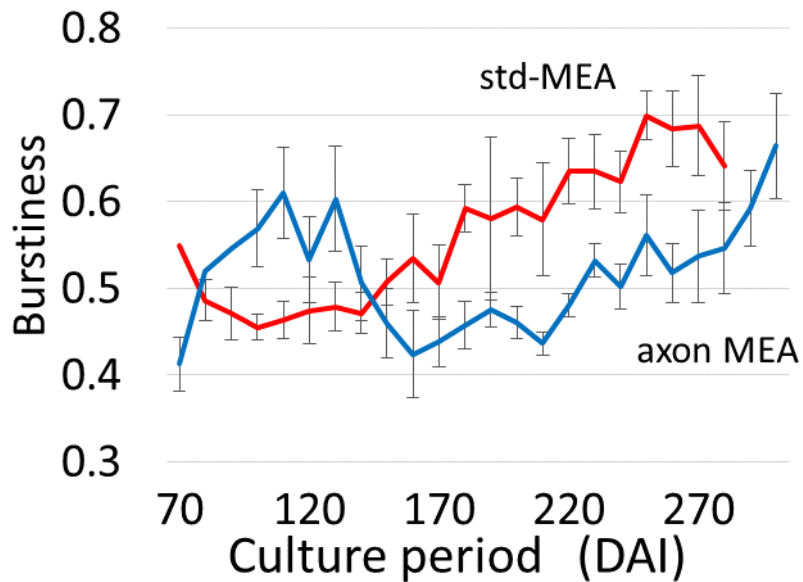


図 3-32 Burstiness の推移. 全スパイク数に対する同期バースト内のスパイク数の割合を Burstiness とした. 通常の MEA (standard MEA; std-MEA) を用いた場合は, 100 days after induction (DAI) から, 上昇傾向を示した. 一方, axon MEA を用いた場合は, 160 DAI から上昇傾向を示した. Mean \pm SE.

3-7 考察

3-7-1 発達過程における活動変化の要因

std-MEA を用いて 50 DAI から 330 DAI まで, axon MEA を用いて 60 DAI から 300 DAI まで活動計測を行った. 結果, 70 DAI において, IBI が 20 秒以上の同期バーストが観測された. また, 培養日数の経過に伴い, 同期バーストの持続時間と IBI が低下傾向を示し, バースト率と **Burstiness** は上昇傾向を示した. 本項では, 70 DAI において 80 DAI 以降と比較して長い周期の同期バーストが観測された理由, および発達に伴い活動が変化した理由について考察する.

50 DAI から 70 DAI まで活動が計測される試料数が増加した. 同様の手法でヒト ES 細胞を分化誘導した先行研究においても, 80 DAI 程度から自発活動を示したことが報告されており [Shi 2012b], 活動が計測され始める時期は一致していると考えられる. また, 先行研究より, 自発活動を示し始める時期にシナプスが形成されることが報告されている [Shi 2012a]. 以上より, 70 DAI は, 本研究においてもシナプス形成期であったと考えられる. 未成熟な神経細胞は, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 型受容体よりも N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 型受容体を多く発現することが知られている [Pickard 2000]. 一般に, NMDA 型受容体は AMPA 型受容体と比較して, 遅い時定数を有するものの, 活性化したときの Ca^{2+} の流入量が多いことが知られている. したがって, NMDA 型受容体が支配的な場合, 神経細胞において持続時間の長い興奮が生じやすいことが考えられる. 以上より, 受容体の比率が, 持続時間および IBI が長い同期バーストの原因であったことが考えられる. 今後, **Ca imaging** と MEA 計測を併用し, 同期バースト発生時における Ca^{2+} 流入を可視化することで, 本現象の詳細な評価が可能である.

培養日数の経過に伴い, 同期バーストの特徴が変化した. 培養日数の経過に伴う変化として, 神経細胞の新生, グリア細胞の影響およびシナプスの数の変化について考察する. 本研究と同様の手法を用いてヒト ES 細胞を分化誘導した先行研究では, 100 DAI 以降まで神経細胞の新生が起こること, および 50 DAI 以降に新生した神経細胞は大脳皮質上層の特性を持つことが示されている [Shi 2012b]. また, 本研究と同様の手法を用いた先行研究からは, 15 週経過後にも, 未成熟な神経細胞と成熟した神経細胞が混在した状態であることが示されている [Kirwan 2015]. 以上より, 本研究で用いた神経回路網では, 持続的な神経新生が起こり, 常に未熟な神経細胞が存在する状態であると考えられる. また, 新生する神経細胞の種類が, ある時期を境に下層から上層の神経細胞へと切り替わると考えられる. また, 今回の条件では, アストロサイトは 50 DAI 以降から観測され, 日数の経過に伴い数が増加することが示されており [Shi 2012a], 計測期間中もアストロサイトの数が増加したことが示唆される. 神経細胞の活動とアストロサイトの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変動の関係は, 神経回路網の成熟の段階によって変化することが報告されており [Takayama 2009], アストロサイトの数の増加が神経回路網の活動に影響を与える可能性があると考えられる. また, 個々の神経細胞が形成するシナプスの数も培養日数の経過に伴い変化すると考えられる. Ito らは, マウ

ス大脳皮質の神経細胞について、シナプスの数の変化が神経細胞の活動の変化と相関することを報告しており [Ito 2013], 本研究で用いたヒト iPS 細胞由来の神経回路網においてもシナプスの数の変化に伴い神経回路網の活動パターンが変化する可能性がある。以上のように、神経回路網の活動パターンの変化を引き起こす要因として、様々な現象が挙げられる。今後、免疫組織化学染色法を用いて新生神経細胞、アストロサイトおよびシナプスの可視化をすることで、シナプス数と活動の関係を評価できる。また、Ca imaging と活動計測を併用することで、アストロサイトにおける Ca 変動と神経細胞の活動の関係を評価できる。以上の実験を通して、各要因が神経細胞の活動変化に与える影響を評価していくことが肝要であると考えられる。

3-7-2 マウスやラットを用いた研究との対応

発達の過程において、持続時間および IBI が低下傾向を、バースト率と **Burstiness** が上昇傾向を示した。3-2 において述べた通り、MEA を用いて、マウスやラットの神経細胞が形成した神経回路網の発達過程を評価した先行研究においても、同様の傾向が報告されている [Mukai 2003; van Pelt 2004; Wagenaar 2006; Sun 2010]。本項では、げっ歯類神経細胞を用いた先行研究と本研究が同様の傾向を示したことについて、細胞集団における興奮性と抑制性神経細胞の比率、および新生した神経細胞の割合から考察する。

培養したラットの神経細胞において、神経幹細胞が増殖するためには **bFGF** の添加が必要であることが報告されている [Brewer 1999]。ラットやマウスの神経細胞を用いた先行研究では、培養液に **bFGF** が含まれていない。したがって、神経細胞の新生は起こらなかったことが示唆される。一方、本研究で用いた条件では 100 DAI 程度まで神経新生が起こることが報告されている [Shi 2012a, b]。以上より、げっ歯類神経細胞を用いた先行研究とヒト神経細胞を用いた本研究では、細胞集団における新生神経細胞の比率が異なると考えられる。未成熟な神経細胞は、発火の特性やシナプス可塑性の閾値が成熟した神経細胞と異なることが報告されている [Ge 2007; Clelland 2009]。また、成熟した神経細胞から構成される神経回路網に、新しく神経細胞を播種すると、神経回路網がより若い時期の活動に類似した活動パターンを示したことが報告されている [Stephens 2012]。したがって、未成熟な神経細胞を含む神経回路網では、成熟細胞のみが形成した神経回路網と異なる活動を示すことが考えられる。しかし、発達に伴う同期バーストの変化は成熟細胞のみからなる神経回路網と同様の傾向を示した。今後、増殖細胞のマーカーとして用いられる **BrdU** を用いた染色と活動計測を併用することで、新生神経細胞による神経回路網の活動への寄与を評価可能であると考えられる。

3-7-3 微小トンネルを用いた手法の優位性と限界

微小トンネル内に配置した電極から活動を計測することで、std-MEA と比較して多くの電極から活動が計測できることが示された。また、計測される活動の数も、計測期間を通して多かった。さらに、std-MEA では、290 DAI 以降に安定して同期バーストが検出されなかったが、axon MEA では少なくとも 300 DAI まで同期バーストが検出できることが示された。本項では、微小トンネルから活動を計測する利点および不利な点について述べる。

微小トンネル内から活動計測する手法の利点は、計測対象である軸索の位置が電極上に固定される点、および計測される活動の振幅が大きい点である。ES 細胞や iPS 細胞から分化誘導した神経系細胞の細胞集団は多数の神経幹細胞や神経前駆細胞を含むことが知られている [Illes 2009; Shi 2012b]。神経幹細胞や神経前駆細胞は増殖能および移動能を有するため [Stephen 2012]、細胞の増殖や移動が神経細胞と電極の接触状態を変化させると考えられる。細胞外電位の振幅は電極と信号源の間の接触状態および距離に依存するため [Stett 1997; Claverol-Tinture 2002]、細胞の移動や増殖は活動を計測可能な電極の数を変化させる可能性がある。一方、微小トンネルを用いることで信号源である軸索が電極上に固定されるため、細胞の増殖や移動の影響が小さいと考えられる。また、微小トンネル内から計測された活動電位は、微小トンネルにより参照電極と計測電極間のインピーダンスが高くなり、電流源である軸索からのイオン電流が計測電極に流れやすくなるため、大きな振幅を有することが知られている [Pan 2013; Wang 2012]。

本手法は、微小トンネル内を伸長した軸索から活動を計測するために、計測対象が制限される可能性がある。大脳皮質の神経細胞には、周囲の神経細胞とのみ結合を形成する神経細胞、および視床や脊髄へ軸索を投射する神経細胞の両方が存在する。生体外においても、生体内において有する性質を維持すると仮定すると、前者は軸索の伸長距離が短いため微小トンネルを通過できないが、後者は軸索の伸長距離が長いため微小トンネルを通過できると考えられる。したがって、微小トンネル内から計測を行った場合、活動を計測可能な神経細胞が後者の投射型神経細胞のみになる可能性がある。また、微小トンネルに複数の軸索が伸長すると、新生の時期が遅い神経細胞の軸索が微小トンネルに進入できない可能性がある。以上より、計測対象となる神経細胞の種類に偏りが生じる可能性があることが本手法の不利な点である。今後、神経細胞を、大脳皮質の deep layer および upper layer といったサブタイプ毎に染め分け、それぞれのサブタイプの神経細胞が微小トンネル内に軸索を伸長する割合を評価することが重要であると考えられる。また、播種時に、半数の微小トンネルをヒアルロン酸ゲルで封入しておき、新生の時期が遅い神経細胞が軸索を伸長し始めるタイミングで、ゲルを酵素分解することも、有効な手法であると考えられる。

3-7-4 神経細胞の種類と評価方法

本研究では、ヒト iPS 細胞を前脳背側の脳皮質神経細胞に分化誘導した。脳皮質神経細胞を選択した理由は、以下の 3 点である。1 点目は、先行研究でマウスやラットから採取した脳皮質神経細胞の分散培養系が広く用いられており、得られた結果の比較が容易な点である。先行研究では、線条体や脳基底核といった部位のスライス切片から活動を計測し、評価した例も存在する [Fino 2008; Chu 2012]。しかし、ヒト iPS 細胞から分化誘導した場合には、多くの場合分散培養系となるため、計測した活動パターンを直接比較することは困難である。2 点目は、脳皮質は皮質内で神経回路網を形成するため、回路網内での結合や神経回路網レベルでの活動を評価することの重要性が高いと考えたためである。3 点目としては、脳皮質神経細胞の神経細胞の多くはグルタミン酸作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞であり、培養神経回路網の細胞間の結合が興奮と抑制で形成されるシンプルな系となることが予想されたためである。

脳皮質の神経回路網の活動パターンを評価する場合、神経回路網の活動パターンとして同期バーストを選択したことは適切であったと考えられる。しかし、今後、脳皮質以外の部位の神経細胞を分化誘導し、活動から発達過程を評価する場合、細胞の種類に応じた評価手法を考案する必要があると考えられる。以下に、線条体、および脊髄の運動ニューロンを例に、評価手法について述べる。線条体は、99%以上の神経細胞が GABA 作動性神経細胞である [Kreitzer 2008]。したがって、神経回路網を形成した場合、興奮性の結合によって発生する同期活動が計測されるとは考えにくい。そこで、2 つの培養区画を有する PDMS 構造物を用いて、脳皮質などの部位と結合を形成させ、他の部位に与える影響から発達過程を評価することが有効であると考えられる。また、運動ニューロンは、筋細胞と神経筋接合と呼ばれる結合を形成することが特徴である [Li 2005]。そこで、同様に PDMS 構造物を用いることで、筋細胞との結合の形成や、運動ニューロンの活動誘起による筋細胞の収縮が評価指標となると考えられる。

3-7-5 設定した要件に対する達成度

本章では、多点の同時計測が可能であること、および長期間にわたり安定して計測できることを要求仕様として設定した。以下に、それぞれの要求仕様について考察する。

1 つ目は、多点の同時計測が可能であることである。std-MEA については、290 DAI まで active electrode が 5 点程度であったこと、および 300 DAI には 3 点程度となり、310 DAI 以降計測ができなくなった。5 点程度の電極では、評価指標として用いた同期バーストを安定して検出することは困難である。一方、axon MEA については、計測期間を通して active electrode が 35 点程度であった。30 点以上の電極から活動が計測できれば、同期バーストを十分に検出可能である。以上から、axon MEA については、多点の同時計測が可能であったことが示された。

2 つ目は、長期間にわたり安定して計測できることである。本研究における長期間の定義は、神経回路網の成熟に要する期間とした。axon MEA を用いて活動パターンを評価した結果、300 DAI では神経回路網の活動が安定したと判断することはできなかった。したがって、長期間という点については、要件を満足したかを判断することはできない。しかし、std-MEA では活動が計測された試料数が 230 DAI から減少したのに対して、axon MEA では 300 DAI まで計測を行った全ての試料で活動が検出された。本結果は、std-MEA と比較して、axon MEA の方が長期間の計測に適していることを示している。また、安定した計測については、前述の活動が計測された試料数の変遷、および active electrode 数の推移より、axon MEA を用いることで、300 DAI まで安定して計測できることが示された。以上から、axon MEA を用いた場合に、std-MEA と比較して長期間にわたり安定して計測できたことが示され、要件を一部満たしたことが示された。今後、活動計測を継続し、活動パターンが安定する培養日数を特定することが重要である。

3-7-6 本研究で得られた結果の新規性

本項では、本研究で得られた結果が有する新規性について考察する。

1 つ目は、微小トンネルに軸索を効率よく伸長させるための条件を特定した点である。これまで、マウスおよびラットの神経細胞を培養し、軸索を微小トンネル内に伸長させた研究においては、特別なコーティングは行われていなかった [Taylor 2005; Dworak 2009]。一方、hiPS-neuron を用いた場合、通常のコーティング条件では、微小トンネル内に伸長した軸索の本数が少なかった。本章では、BSA による前処理と濃度の高い laminin 溶液を用いることで、hiPS-neuron の軸索が効率的に微小トンネル内に伸長することを示した。本成果は、ヒト神経細胞の軸索の特性を評価するうえで重要な手法であると考えられる。

2 つ目は、ヒト神経細胞の発達過程を示した点である。マウスやラットの神経細胞を用いた場合、一ヶ月程度で神経回路網の活動パターンが安定することが報告されている [Kamioka 1996; Mukai 2003; Sun 2010]。一方、ヒト神経細胞を長期間培養し、活動パターンを指標として発達過程を評価した研究は存在しない。本章では、200 日以上計測を行い、ヒト神経細胞の神経回路網の活動パターンが安定するためには、少なくとも分化誘導から 250 日以上を要するという知見を得た。今後、活動計測を継続することで、神経回路網の活動パターンが安定する時期を特定できると考えられる。成熟に要する期間は、安定した神経回路網を用いる必要がある研究にとって不可欠な知見であり、重要性が高いと考えられる。

3 つ目は、微小トンネル内に配置した電極から活動計測を行うことで、効率的に活動を計測できることを示した点である。マウスやラットの神経回路網と違い、ヒト由来の神経回路網では神経幹細胞が維持される期間が長く、神経回路網の形態変化が起こると考えられる。神経回路網の形態変化は、active electrode 数の減少を引き起こす可能性があり、計測の安定性を低下させる。std-MEA を用いた場合、active electrode 数は少なく、培養日数の経過に伴い活動が計測できた試料数が減少した。一方、axon MEA を用いた場合、計測の安定性が高いことが示された。

3-8 まとめ

本章の目的は、発達段階に依存した hiPS-neuron の活動パターンの評価であった。目的達成に向けて、std-MEA を用いた活動パターンの評価、および提案手法である axon MEA を用いた活動パターンの評価を行った。以下に、それぞれの実験から得られた知見をまとめる。

ヒト iPS 細胞から分化誘導した大脳皮質神経細胞を MEA 上で培養し、50 DAI から 330 DAI まで 10 日毎に自発活動を計測した。結果、70 DAI において長い持続時間と IBI を有する活動パターンが観測された。また、日数の経過に伴い、同期バーストの持続時間と IBI が低下傾向を示し、バースト率と Burstiness は上昇傾向を示した。230 DAI から活動が検出された試料数が減少し、310 DAI 以降は全ての試料で活動が検出されなかった。

axon MEA 上でヒト iPS 細胞由来神経細胞を培養したところ、コーティング条件に応じて、微小トンネル内へ伸長した軸索の数に有意な差が観察された。微小トンネル内に軸索が伸長したと考えられる 60 DAI から 10 日毎に自発活動を計測したところ、70 DAI において、std-MEA を用いて観察されたパターンと同様の長い IBI を有する同期バーストが、全ての試料で観察された。活動パターンの解析から、同期バーストの特徴の変化が std-MEA に類似していたことが示唆された。さらに、axon MEA を用いることで、std-MEA と比較して多くの電極から、長期間にわたり活動を計測できることが示された。

以上の知見が得られたことから、本章で目的として設定した、発達段階に依存したヒト iPS 細胞由来神経細胞の活動パターンの評価を行うための手法の開発に成功したと考えられる。一方、ヒト神経細胞の活動が安定するまでに要する期間については、計測した 300 DAI までのデータからは明らかにすることができなかった。今後、axon MEA を用いた計測を継続して行い、burstiness の変化が見られなくなるまでに要する期間を評価することが重要である。

第 4 章

発達過程における細胞内機能発現の 評価手法の開発

4-1 緒言

本章では、PSC-neuron の細胞内機能発現を長期的に取得できる手法の開発に向けて、軸索を伝導する活動の計測を行う。タンパク質レベルでの長期評価が可能なシステムの要求仕様は、タンパク質の発現が反映された情報を計測できること、長期間にわたり安定して計測できること、および遺伝子改変を行う必要がないことの 3 点であると考えられる。

タンパク質の発現が反映された情報を計測することについては、軸索を伝導する活動を計測することにより取得できると考えられる。通常、MEA を用いて計測したデータからは、神経細胞の発火時刻の情報のみを取得する場合が多い。近年、微小トンネル内に複数点の電極を配置することで、軸索を伝導する活動を計測できることが報告された [Dworak 2009]。軸索における伝導を計測することで、発火時刻の情報に加えて、伝導時間と方向の情報を取得できる。髄鞘が形成されていない場合、伝導時間は軸索の直径やイオンチャネルの密度に応じて決定されるため、細胞内のタンパク質発現を反映する可能性がある。

長期間の安定した計測に関する要求仕様については、第 3 章と同様に、微小トンネル構造を用いることで満たすことができる。

遺伝子改変を行う必要がないことについても、軸索における伝導の計測からタンパク質発現の情報を取得できれば解決可能である。対象となるタンパク質としては、イオンチャネルの 1 種である hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) チャネルを構成するタンパク質である HCN1 が挙げられる。軸索における伝導時間は、連続的な電気刺激により変化することが報告されている [Raastad 2003]。また、伝導時間変化の一因が軸索細胞膜の過分極であり、軸索に発現した HCN チャネルを流れるイオン電流である h 電流が変化を抑制することも報告されている [Soleng 2003]。さらに、HCN チャネルを構成するタンパク質の 1 つである HCN1 の発現量は発達過程において変化することが知られている [Bender 2007]。以上より、軸索における伝導時間の変化と、HCN チャネルをはじめとしたイオンチャネルの発現量の関係性が明らかになれば、伝導時間の変化を指標として細胞内のタンパク質の発現状態を評価できる可能性があると考えられる。

本章では、PSC-neuron の細胞内機能発現の過程を長期的に取得できる手法の開発を目的とした。目的を達成するために、以下の 3 つの実験を行う。1 つ目の実験として、マウス CX において、自発活動における発火頻度の上昇に応じて軸索を伝導する活動の伝導時間が増加することを確認する。2 つ目の実験として、軸索に対して電気刺激を印加し、伝導時間の変化が刺激の頻度に依存することを示す。h 電流の阻害剤である ZD7288 の存在下でも同様の実験を行い、h 電流が CX の軸索における伝導時間変化を抑制することを確認する。さらに、自発的に起こった伝導時間の上昇と、刺激により誘発された伝導時間の上昇の関係を評価する。3 つ目の実験として、hiPS-neuron においても、自発活動からの伝導検出手法を適用し、軸索の伝導時間が PSC-neuron の評価指標となる可能性を示す。なお、軸索における HCN の発現量を、従来手法を用いて評価することは、付録 1 に示した通り困難であった。

4-2 研究手法

4-2-1 培養デバイス

本章では、2種類の培養デバイスを用いた。1つ目は3章で用いた axon MEA であり、軸索に電気刺激を印加し、刺激応答を計測する目的で用いた。2つ目は、図 4-1 に示したリング状の PDMS 構造物を利用した計測デバイスである。PDMS のリングは、内径 5 mm、外形 7 mm であり、内側と外側でそれぞれ異なる種類の細胞が培養可能である (図 4-1A)。リング内外は放射状に配置した 36 本の微小トンネルで連絡している。微小トンネルは、長さ 750 μm 、幅 30 μm 、高さ 5 μm である。電極の配置および微小トンネルと電極の関係を、それぞれ図 4-1B および C に示す。36 本の微小トンネルのうち 18 本には、300 μm 間隔で 3 点の電極が配置されており、微小トンネル内に伸長した軸索から活動伝導を計測可能である。今後、微小トンネル内に配置した電極を、内側の培養区画に近い電極からそれぞれ E_{in} 、 E_{center} および E_{out} と呼ぶ。なお、リング状 PDMS を配置したデバイスについては、今後 ring MEA と呼ぶ。両デバイスは、3章において述べた方法を用いて作製した。

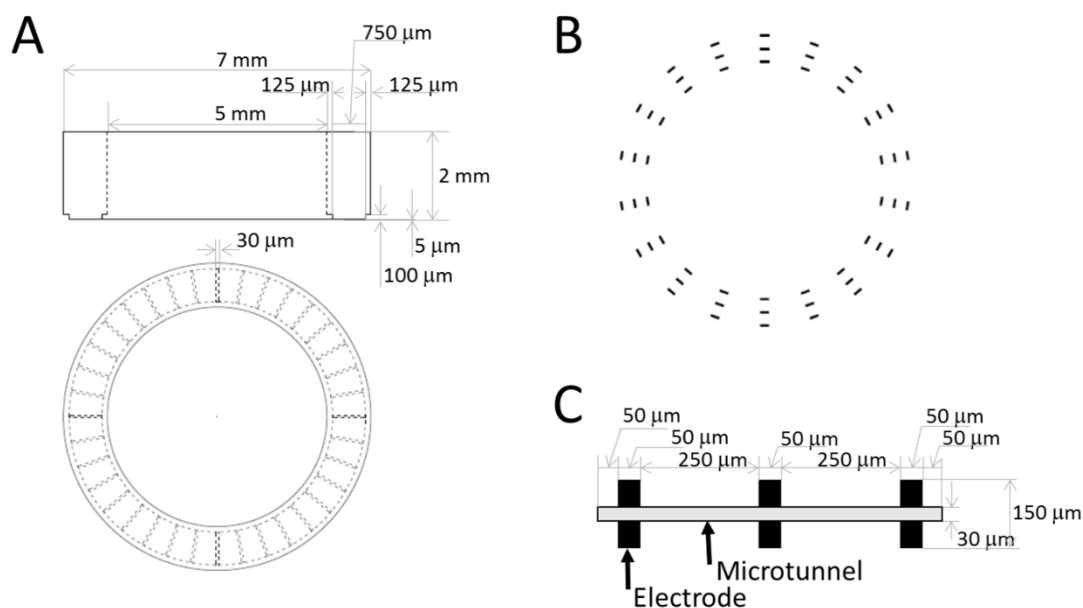


図 4-1 リング状 PDMS の構造と電極配置. (A) PDMS 構造物の設計図. 内径 5 mm、外形 7 mm の PDMS 構造物に、微小トンネルを放射状に 36 本配置した。微小トンネルは、長さ 750 μm 、幅 30 μm 、高さ 5 μm とした。(B) 電極の配置図。18 本の微小トンネルに、電極を 3 点ずつ配置した。(C) 微小トンネルと電極の配置図。3 点の電極を中心間隔 300 μm で配置した。

4-2-2 細胞培養

初代培養細胞

本実験は、東京大学動物実験委員会の許可 (C-12-02, KA-14-2) を受けた上で、東京大学動物実験実施マニュアルに従って行った。また、培養液の組成は 2 章に記した通りである。本章において記録したデータのうち、ring MEA を用いて計測したデータは、第 5 章において共培養を行ったデータとの比較に用いる。そこで、共培養を行う細胞の動物種に合わせるために、マウスから採取した細胞を用いた。また、一般に、マウスと比較して、ラットの方が胎児のサイズが大きく、解剖操作が容易である。そこで、動物種を合わせる必要がない場合、ラットから採取した細胞を用いた。

胎齢 16 日の ICR mouse (Charles River)、もしくは胎齢 18 日の Wistar rat (Charles River) から大脳皮質組織を剖出し、酵素処理により単離した。マウス胎児の場合は、0.25% trypsin (Life Technologies) を用いて 37°C で 20 分間処理した。ラット胎児の場合は、0.5% trypsin を用いて 37°C で 17 分間処理した。酵素処理後に、Feeder 培地を用いて 4 回洗浄することで酵素の働きを止めた。次に、ピペッティングにより細胞を単離した後、40 μm セルストレーナ (BD) を通した。ピペッティングの際、マウス胎児にのみ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase (Sigma) を加えた。培養液を B27 medium に置換し、 $5.0 \times 10^3 \text{ cells}/\text{mm}^2$ の細胞密度で、あらかじめ 0.1% Polyethyleneimine (PEI; Sigma) および 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ laminin でコートしたデバイス内に播種した。播種から最初の培地交換までは、細胞の生着を促進する目的で、B-27 medium 内で大脳皮質神経細胞を培養した上澄みを培養液の半量加えた。axon MEA を用いた実験についてはラット CX を用い、ring MEA を用いた実験についてはマウス CX を用いた。試料は、操作時以外は CO_2 インキュベータ内に静置し、培養液は 2 日毎に半量を交換した。

ヒト iPS 細胞由来神経細胞

第 2 章において述べた手法を用いて、hiPS-neuron を培養した。

4-2-3 活動計測

活動計測には、3 章において述べた方法と同じ手法を用いた。なお、A/D 変換時のサンプリング周波数は 50 kHz とした。axon MEA を用いた計測には、28 日以上培養した試料を用いた。また、ring MEA 内で培養した試料については、5 DIV から 5 日毎に計測を行った。hiPS-neuron についてのデータは、3 章で述べた方法を用いて取得した。電気活動を解析したデータは、特に示さない限り $\text{mean} \pm \text{SD}$ で示した。

4-2-4 活動伝導の検出

1本の微小トンネルには複数の軸索が伸張するため、計測される活動も複数の軸索からのシグナルが混在した状態である。そこで、スパイクソーティングを行い、計測されたデータから個々の軸索を伝導した活動を分別した。通常のMEA計測では、1つの神経細胞の活動は1点の電極から計測されるため、1点の電極のデータを基にクラスタリングが行われる。一方、微小トンネル内に配置した電極から1本の軸索を伝導した活動電位を計測した場合、3点の電極から伝導の向きに応じて時間差を持った活動が計測されることが想定される。また、軸索を伝導する活動は、複数回の活動において再現性の高い伝導時間を持つことが報告されている [Bakkum 2013]。以上より、微小トンネル内に配置した3点の電極から計測されたデータを用いることで、1点の電極を用いた場合と比較して効率よくスパイクソーティングを行うことができると考えた。そこで、本研究では、Takekawaらが開発したスパイクソーティング用のソフトウェアである Efficient Technology of Spike Sorting (EToS) を基に [Takekawa 2010]、軸索からの活動をソーティングする状況に合わせて改良を行った。活動伝導の検出の手順は、データの抽出、EToSを用いたスパイクソーティング、およびスパイク時間差のばらつきを指標とした伝導の検出から構成される。スパイク検出からクラスタリングまでの概要は、図4-2に示す通りである。また、axon MEAを用いて計測したデータを分別する場合は、1つの微小トンネルに配置された電極が2点である点を考慮し、手法を一部改変した。最後に、特徴量抽出に利用した電極数と分別精度の関係性の評価方法について述べる。

E_{center} から、全計測データの標準偏差の5倍を閾値として、閾値を超えた負のピークを神経細胞のスパイクとして検出した。次に、 E_{center} から検出されたそれぞれのスパイクについて、全ての電極からスパイク時刻周囲のデータを抽出した。データは、スパイク時刻を中心に、1つの電極あたり151点、3電極で計453点を抽出した。なお、抽出したデータの長さは、微小トンネルに配置した電極から計測される活動の波形 [Pan 2013]、CXの無髄神経細胞の軸索の伝導速度 [Raastad 2003; Dworak 2009; Bakkum 2013]、および本デバイスの電極間の距離 (300 μm) を基に決定した。

続いて、スパイクソーティングを行った。最初に、抽出した453点のデータをWavelet変換した。Wavelet変換には、Cohen-Daubechies-Feauveau 9/7 waveletを用いた。続いて、データをフィッティングした分布が多峰性を持ち、分散の大きい8次元を主成分分析により抽出した。さらに、変分ベイズ法およびStudent's t 混合モデルを用いたアルゴリズムによって、スパイクをクラスタに分別した。Wavelet変換からクラスタリングまでの操作には、TakekawaらのEToSソフトウェアを用いた [Takekawa 2010; Takekawa 2012]。

活動伝導が含まれるクラスタを選出するために、Bakkumらが開発した手法を一部改変し用いた [Bakkum 2008]。最初に、 E_{center} のスパイク時刻の前後8msにおいて、 E_{out} および E_{in} からピーク検出を行った。ピーク検出には、 E_{center} の閾値を用いた。その後、40 μs のビン幅を用いて、 E_{center} のスパイク時刻に対する時間差のヒストグラムを作成した。クラス

タ内に活動伝導が含まれている場合、ヒストグラムに急峻なピークが見られるため、以下の手順でヒストグラムのピークを検出した。図 4-3 にヒストグラムを利用した伝導検出の概要を示す。最初に、カーネルサイズ 31 のガウシアンカーネルを用いてヒストグラムを平滑化した。次に、ヒストグラム内の全ての正および負のピークを検出し、伝導検出に用いる閾値を、それぞれの負のピークから計算した。閾値は、ヒストグラムの i 番目の負のピークを $valey_i$ とおくと、 $threshold_i = 2 \times valey_i + 0.5$ とした。正のピークが、両端の負のピークから算出した閾値を超えた場合にヒストグラムに伝導が含まれているとみなした。 E_{out} および E_{in} の両方のヒストグラムからピークが検出された場合のみ、クラスタが伝導を含むとみなした。1 つのヒストグラムから複数のピークが検出された場合、全てのピークの組み合わせの中から、含まれるスパイク数が最大となるピークの組を選出した。また、組み合わせの中に、0.5 を超えるピークの組が複数存在した場合、1 回の活動を多重検出している可能性が高いとみなし、クラスタを以降の解析から除外した。また、Bakkum らは、軸索を伝導する活動電位の伝導速度を計算し、500 μm 程度の長さでは変化量が最大 50%程度であったことを報告している [Bakkum 2013]。そこで、伝導に含まれるスパイクのうち、 $E_{out} - E_{center}$ 間の伝導時間と、 $E_{in} - E_{center}$ 間の伝導時間の比が 0.5-2 の間に収まらないものは、伝導ではない可能性が高いとみなし、クラスタから除外した。

特徴量の抽出に用いた電極数が分別精度に与える影響を評価する目的で、2 点のトンネルから記録したデータを組み合わせた試験用データの分別精度を評価した。最初に、有効な活動が計測された微小トンネルから、ランダムに 2 本の微小トンネルを選択し、それぞれ T_i , T_j とした。 T_i の 10 分間のデータの後ろに T_j から記録された 10 分間のデータを直列につなげた。次に、前述の手順でピーク検出およびスパイクソーティングを行った。ソーティング後、それぞれのクラスタについて、 T_i のスパイクが 50%以上含まれる場合は、クラスタ内の T_i のスパイクを正解、 T_j のスパイクを不正解とみなした。分別精度は、全スパイク数に対する正解数の比と定義した。全クラスタについて正解と不正解を数えあげ、分別精度を計算した。同様の試行を、選択した微小トンネルのペアが重複しないように、各条件について 250 回ずつ繰り返した。また、評価用データには、15 DIV において計測したデータを用いた。

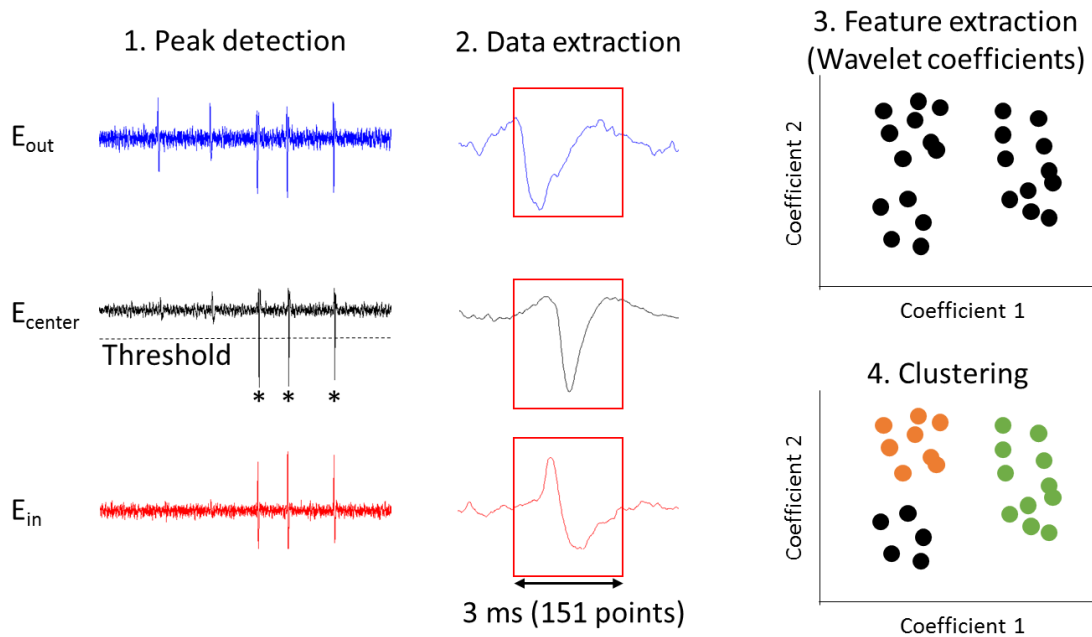


図 4-2 スパイク検出からクラスタリングまでの概要. 最初に, 微小トンネルの中心に配置した電極 (E_{center}) から, 標準偏差の 5 倍を閾値として負のピークを検出した (ステップ 1). 次に, それぞれのスパイクについて, 全電極からスパイクの波形を抽出した (ステップ 2). データを Wavelet 変換した後, 主成分分析により分散の大きい 8 次元 (wavelet coefficients) を抽出した (ステップ 3). 最後に, 変分ベイズ法により, クラスタリングを行った (ステップ 4).

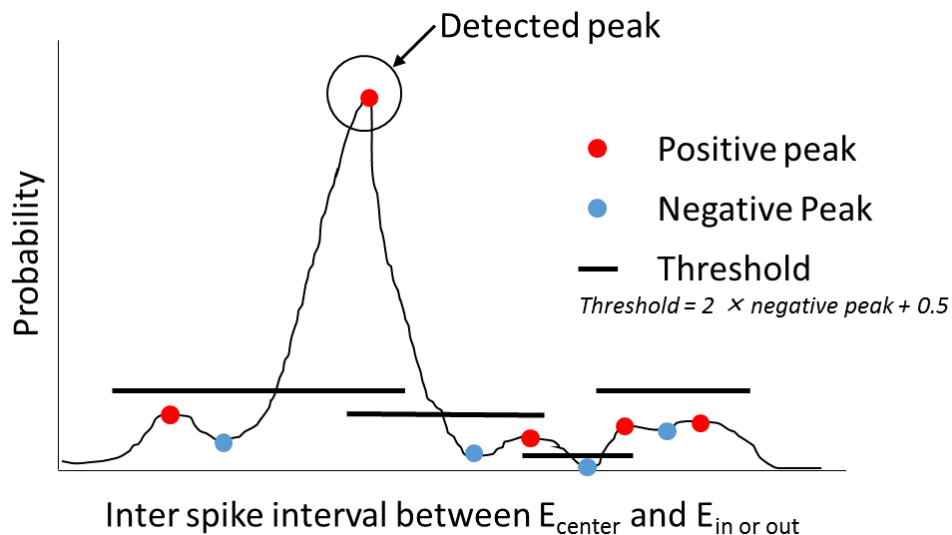


図 4-3 ヒストグラムを利用した伝導検出の概要. 微小トンネル毎に, E_{center} とその他の電極で, スパイク間隔のヒストグラムを作成した. 平滑化後に, ヒストグラムの正と負のピークを全て検出した. 正のピークが, 両端の負のピークから計算した閾値を超えた場合に, クラスタに軸索を伝導する活動が含まれているとみなした.

4-2-5 バースト活動に伴う伝導時間の変化

自発的な高頻度発火に伴う伝導時間の変化を評価する目的で、自発活動からバースト活動を検出し、伝導時間の変化を評価した。本章では、1つの電極においてスパイク間隔が500 ms 以内で5発以上のスパイクが連続して起こった活動をバースト活動と定義した。上記の基準は、伝導時間を変化させるためには1 Hz 以上での発火が必要であるという知見に基づいて決定した [Soleng 2003]。さらに、伝導時間変化率をバースト活動の最初と最後のスパイクの伝導時間の比と定義し、全クラスタでの変化の傾向を評価した。伝導時間が増加した時に、伝導時間変化率は1 以上となる。

4-2-6 電気刺激と刺激応答の検出

軸索における活動依存性の伝導特性の変化を評価する目的で、連続的な刺激を軸索に対して印加し、活動の振幅および伝導時間を計測した。最初に、様々な電圧で刺激を印加し、応答の変化を評価した。次に、2種類の実験を行い、前の刺激の影響から回復するまで要する時間、および刺激頻度と伝導特性の変化の関係性を評価した。以下に、用いた電気刺激のパターン、および解析方法について示す。

図 4-4 に連続刺激のパターンを示す。連続刺激として、振幅 1 V、パルス幅 100 μ s の双極性パルスを 200 回連続して印加した。回復時間の評価に用いた刺激パターンは、100 Hz の連続刺激が 2 セットと recovery period から構成される。Recovery period は、1 秒から 100 秒まで変化させた。それぞれの条件について、前の刺激の影響が残らないと考えられる 120 秒間の間隔で 5 セット行った。次に、刺激頻度依存性の変化を評価するために、2, 5, 10, 20, 50 および 100 Hz の頻度で連続刺激を印加した。連続刺激間の間隔は、前の実験において評価した回復時間の結果を基に、50 秒間に設定した。それぞれの条件について、5 セットずつ行った。

記録されたデータから刺激時刻を抽出し、刺激後 12 ms のデータを解析に用いた。最初に、刺激の応答波形を、刺激番号毎にセット間で平均した。次に、波形から閾値を超えた負のピークを検出した。一般に連続刺激に伴い応答の振幅が低下するため、1 番目の刺激に対する応答の振幅が小さかった場合、途中でピークが検出されなくなる。そこで、十分に振幅が大きいと考えられる -300μ V を閾値として設定した。刺激時刻とピーク時刻の時間差を活動電位の伝導に要した時間とみなした。同一の微小トンネルに配置した 2 点の電極から活動を検出する際は、刺激に対する応答が検出された時刻が、刺激電極から遠い電極の方が早い場合は解析から除外した。また、回復時間を評価するための指標には、1 セット目と 2 セット目の連続刺激に対する応答時間の比 delay ratio を用いた。ここで、 k セット目 ($k=1, 2$) の連続刺激のうち、 i 番目 ($i=1, 2, \dots, 200$) の刺激に対する応答時間を $delay_{i,k}$ とすると、 $delay\ ratio_i = delay_{i,2} / delay_{i,1}$ である。刺激頻度と応答時間の関係性の評価の指標には、1 番目の刺激応答時間で正規化した相対応答時間 relative delay を用いた。ここで、 i 番目の刺激に対する応答時間を $delay_i$ とすると、 $relative\ delay_i = delay_i / delay_1$ である。

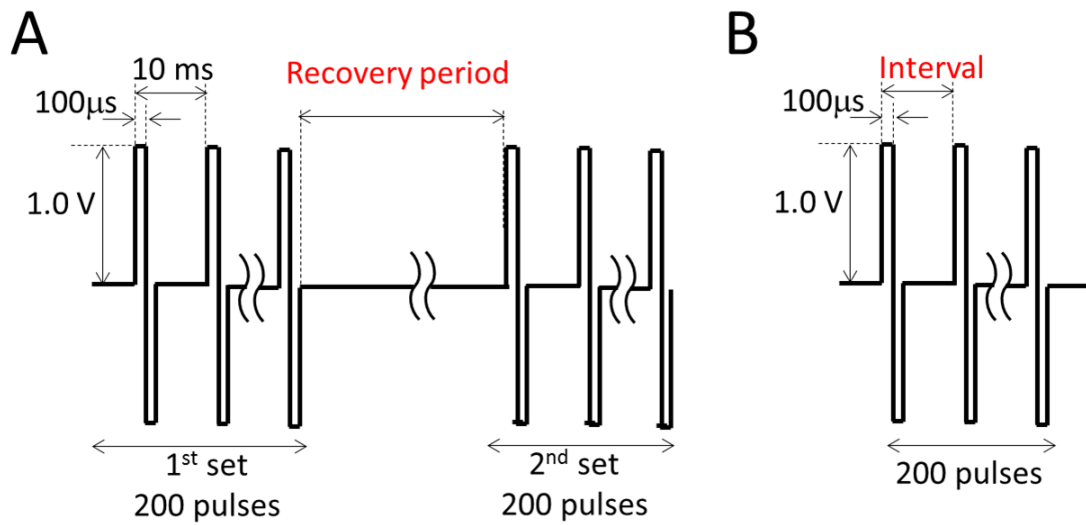


図 4-4 連続刺激のパターン [Shimba 2016]. (A) 回復時間の評価に用いた刺激パターン. 刺激は, 1st セットと 2nd セットから構成される. セット間の間隔である **recovery period** を変化させ, セット間で計測された誘発応答を比較することで, 刺激の影響から回復するまでに要する時間を評価した. (B) 刺激頻度依存性の評価に用いた刺激パターン. 刺激の間隔である **interval** を変化させ, 様々な頻度の刺激に対する誘発応答を評価した.

4-2-7 自発活動と誘発応答の比較

自発活動による伝導時間の変化と、刺激によって引き起こされる伝導時間の変化を比較するために、自発活動の値を基に、刺激のデータから伝導時間変化を推定した。最初に、それぞれのクラスタについて、バースト内の平均発火率、バースト内の平均スパイク数、および平均伝導時間変化を算出した。続いて、刺激のデータから推定伝導時間変化率を算出した。図 4-5 に、平均スパイク数 5.1, 平均発火頻度 15 spike/s であった場合の例を示す。最初に、平均スパイク数を整数値に直した。例では、平均スパイク数を整数値 5 とした。次に、平均発火率と近い頻度で刺激したデータを、加重平均し伝導時間変化率を推定した。例では、平均発火数が 15 spike/s であるため、10 Hz および 20 Hz で刺激した場合の伝導時間変化率を平均した。

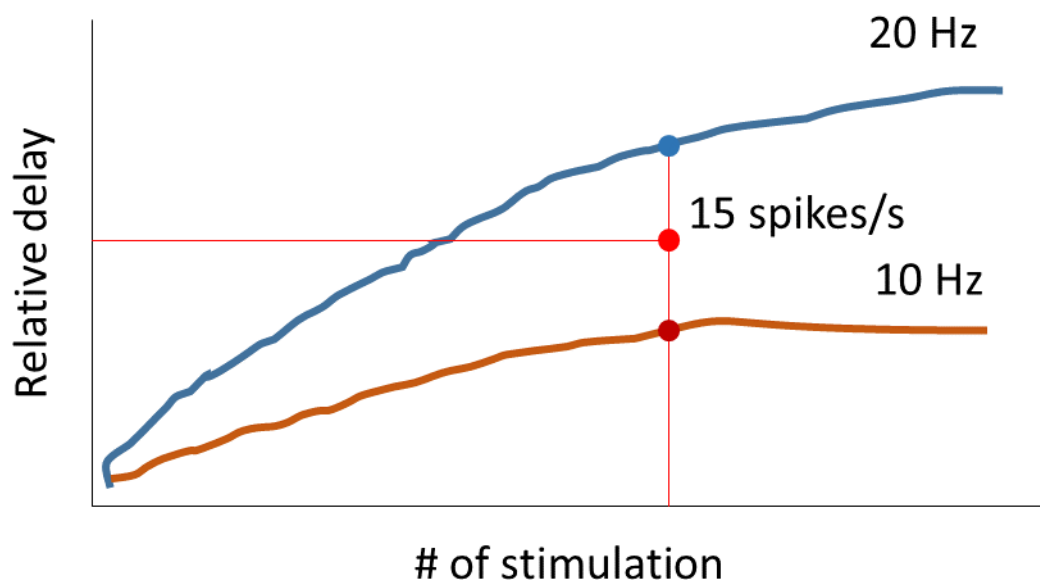


図 4-5 伝導時間変化率の推定例。平均発火率が 15 spike/s であった場合は、10 Hz および 20 Hz で刺激したデータの値を平均した。

4-3 自発活動に応じた活動伝導の変化

本節では、自発的な高頻度発火に伴う、軸索を伝わる活動の伝導速度の変化について述べる。最初に免疫組織化学染色を用いて微小トンネル内の軸索を可視化する。次に、微小トンネル内からの計測に合わせて条件を変化させることで、スパイクソーティングの精度が向上したことを示す。さらに、改善したスパイクソーティング手法を用いて、実際に軸索を伝う活動を検出し、バースト活動に伴い軸索の伝導速度が低下したことを示す。最後に、発火パターンおよび伝導速度の変化率が神経回路網の発達に伴い変化したことを示す。

4-3-1 微小トンネル内への軸索の伸長と、活動の伝導

マウス CX を ring MEA 内で培養した。最初に、外側の培養区画のみにマウス CX を播種し、B3T 抗体を用いて、微小トンネル内に神経突起が伸長する様子を可視化した。微小トンネル内に伸長した神経突起の代表的な画像を図 4-6 に示す。神経突起は、2 DIV から微小トンネル内に伸長を始め、4 DIV で内側の培養区画まで到達した。また、10 DIV において、微小トンネル内に配置した電極から計測された代表的な波形を図 4-7 に示す。図中の赤色、黒色および青色の線は、それぞれ E_{in} 、 E_{center} および E_{out} より計測されたデータを示す。各電極から検出されたスパイク時刻の順序から伝導の方向を推定した。図中のアスタリスク (*) は、 E_{out} から E_{in} の順番でスパイクが検出された内向きの伝導、十字 (+) は外向きの伝導を示す。同一の微小トンネルから内向きと外向きの両方向の伝導が検出された。

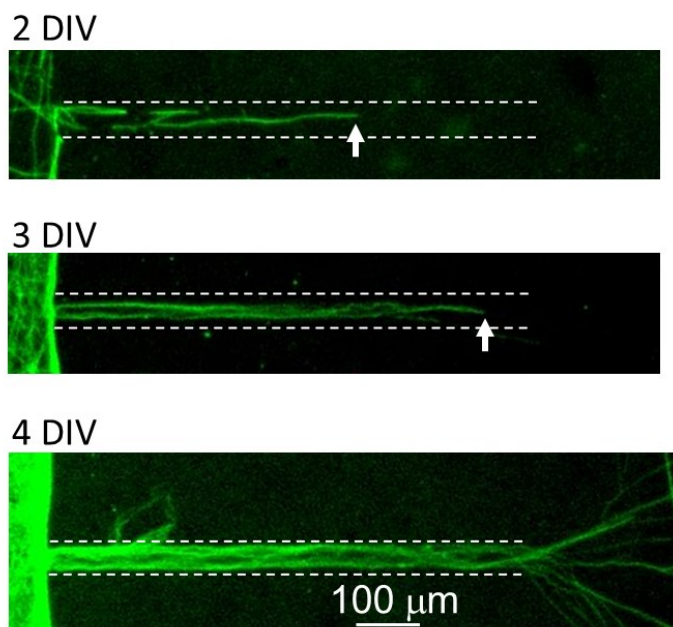


図 4-6 神経突起の伸長過程 [Shimba 2015a 改変]。神経細胞に発現する B3T を標識し、軸索の伸長距離を評価した。培養 4 日目 (days *in vitro*; DIV) に、多くの微小トンネルを軸索が通過した。微小トンネルの位置を白い破線で示す。また、2 DIV および 3 DIV における軸索の先端を矢印で示す。

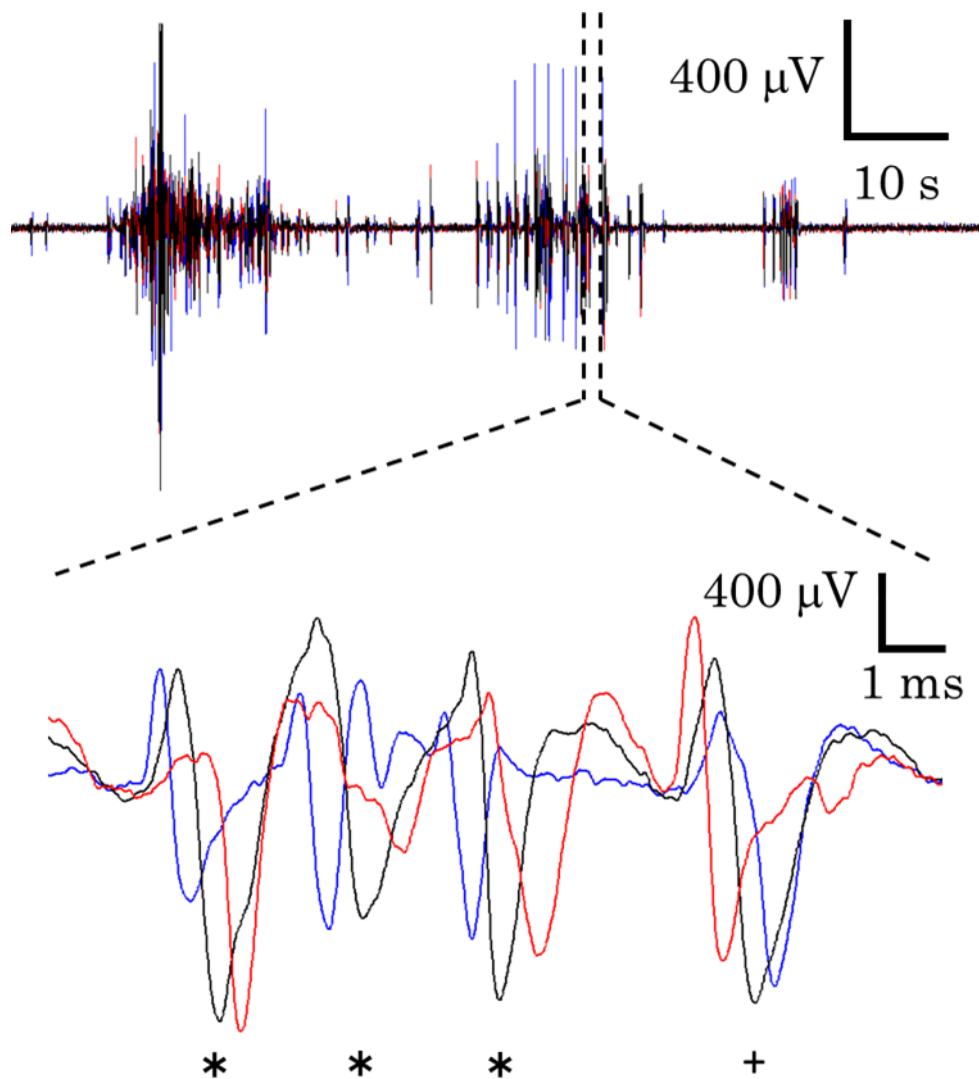


図 4-7 代表的な波形 [Shimba 2015a 改変]. 赤色, 黒色および青色の線は, それぞれ E_{in} , E_{center} および E_{out} より計測されたデータを示す. 図に示した微小トンネルからは, 内向き (*) と外向き (+) の伝導が計測された.

4-3-2 スパイクソーティングの精度と用いた電極数

スパイクソーティングに用いた電極の組み合わせと分別精度の関係性を評価する目的で、様々な電極の組み合わせについてソーティングを行った。図 4-8 に、用いた電極と分別精度の関係性を示す。最も精度が高かった条件は、微小トンネル内に配置した 3 点全ての電極を用いた時で、精度は 0.87 となった。次に精度が高かった条件は、 E_{in} と E_{out} のデータを用いた場合であった。ピーク検出には E_{center} のデータを用いており、本条件は 3 点全てのデータを用いた条件に近い条件でソーティングを行うことができたため精度が高かったと考えられる。また、分別精度が最低となったのは、 E_{center} のみのデータを用いた条件であり、0.79 となった。以上の結果を基に、以降の解析においては、3 点全てのデータを用いてスパイクソーティングを行った。

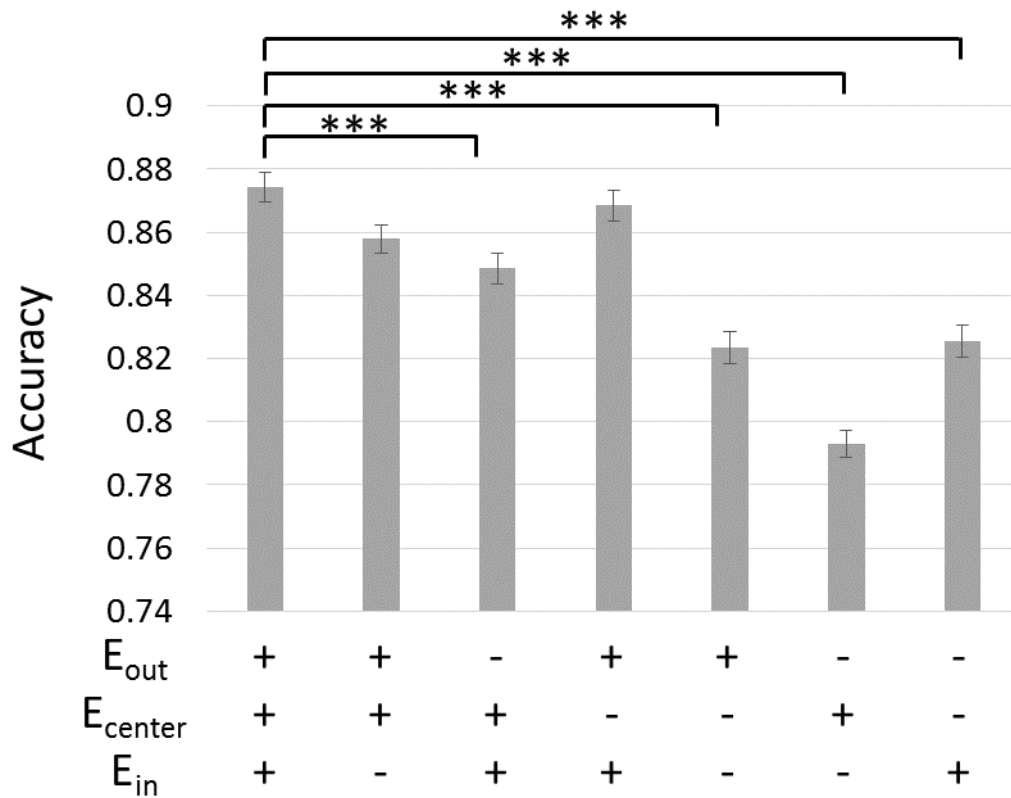


図 4-8 用いるデータのセットと分別精度の関係 [Shimba 2015a]. 微小トンネル内に配置した全ての電極を用いた場合に、分別精度が最大となった。また、 E_{center} のみを用いた場合に、分別精度が最低となった。***, $p < 0.005$; Welch's t test, $n = 250$, mean \pm SE.

4-3-3 自発活動から検出された活動の伝導

スパイクソーティングを行い、混在したシグナルを複数のクラスタに分別した。本研究では、各クラスタは個々の軸索を、クラスタ内の各スパイクは軸索における伝導を表すとみなした。E_{in}とE_{out}でのスパイク時刻差は、5 DIVで 2.19 ± 0.45 ms, 20 DIVで 2.12 ± 0.59 msであった。また、電極間距離の600 μ mおよび標準偏差を基に伝導速度を算出すると、5 DIVで0.23 - 0.34 m/s, 20 DIVで0.22 - 0.39 m/sとなった。10 DIVおよび20 DIVにおける発火パターンの代表例を図4-9に示す。赤色および青色は、それぞれ内向きおよび外向きの伝導を示す。10 DIVでは、8試料中5試料において、複数の同期バーストが連なった発火パターンが観察された(図4-9A)。また、連なったバーストのうち最後の1回は、10秒間以上持続する傾向があった。長い同期バーストでは、外向きと内向きの伝導が交互に表れる様子が観察された。一方、20 DIVでは、10秒以上の同期バーストは観察されず、発火の順序は主に内向き伝導が起こった後に外向き伝導が起こる傾向が見られた(図4-9B)。

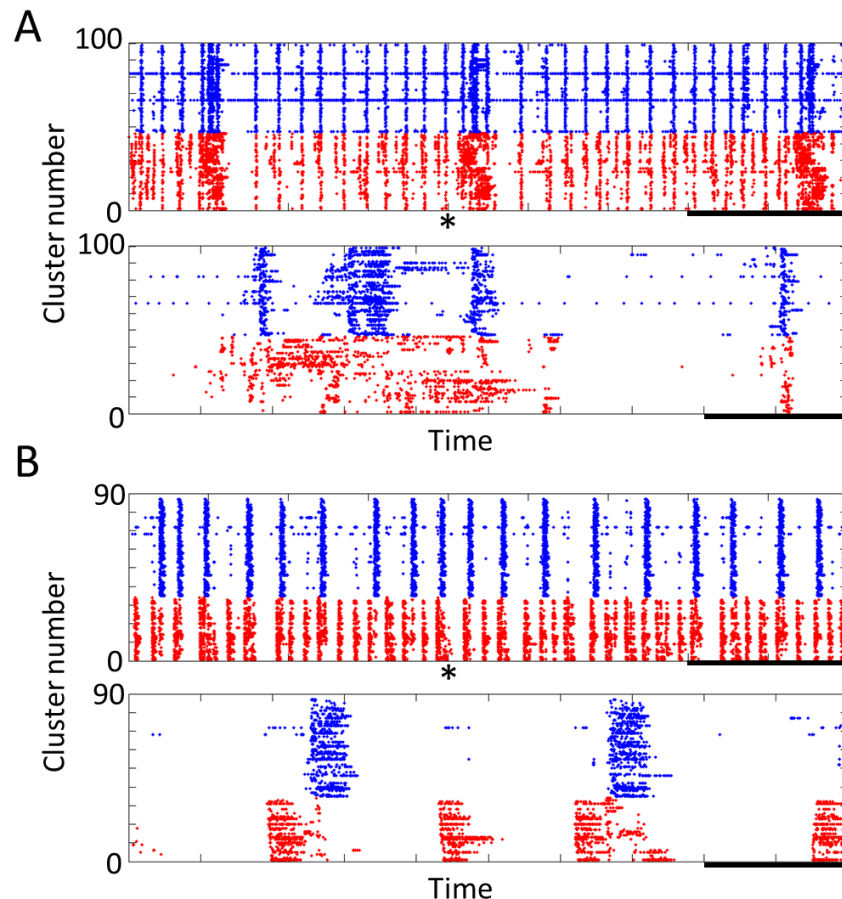


図4-9 活動のパターン [Shimba 2015a]. 培養10日目 (days *in vitro*; DIV; A) および20 DIV (B) における代表的な活動パターン。赤色および青色は、それぞれ内向きおよび外向きの伝導を示す。下図は、アスタリスク (*) で示した位置の拡大図。Scale bars; upper panels, 100 s; lower panels, 10 s.

4-3-4 バースト活動における活動伝導の変化

各クラスタにおいて発火頻度が一時的に上昇する現象であるバースト活動を検出し、バースト活動内における伝導時間の変化を評価した。最初に、1つのクラスタにおける代表的な伝導時間の変化について評価した後に、試料内の全クラスタにおいて評価した。図 4-10 にバースト活動内の伝導時間の変化を示す。図 4-10A は、あるバースト活動におけるスパイクを抽出し、 E_{in} からスパイクが検出された時刻を基準に E_{in} (灰色) および E_{out} (黒) の波形を示した図である。赤線はバースト内の最初のスパイクにおいて E_{out} から活動が検出された時刻、赤い十字はそれぞれのスパイクにおいて E_{out} から活動が検出された時刻を示す。バースト内において E_{out} のスパイクが検出された時刻が右にシフトしていく様子が観察された。以上の結果は、バースト活動において伝導時間が増加したことを示唆する。代表的なバースト活動内における伝導時間の変化を図 4-10B に示す。図に示した例では、バーストの開始時刻を基準としたスパイク時刻と活動の伝導時間に正の相関が見られた ($r = 0.802$, $p < 0.0001$)。また、バースト内の最初のスパイクと比較して、最後のスパイクでは伝導時間が 8.0%増加した。続いて、1つの試料内の全クラスタにおける伝導時間の変化を可視化する目的で、伝導時間の変化率を評価した。クラスタ毎の平均値のヒストグラムを図 4-9C に示す。図中の破線は、変化率が 1 の位置を示す。図に示した試料では、80%のクラスタで伝導時間の増加が見られた。10 DIV において計測した 8 試料では、 $79.4 \pm 3.6\%$ のクラスタで伝導時間が増加した。また、一部のクラスタでは、図 4-11 に示すように、バースト内においてスパイク幅が増加した。図 4-11A に示した例における、スパイク時刻と平均振幅の 50%の位置におけるスパイク幅との関係を図 4-11B に示す。なお、図 4-11A 中のアスタリスク (*) で示した位置が振幅の 50%の位置である。スパイク時刻とスパイク幅には、正の相関が見られた ($r = 0.599$, $p < 0.001$)。

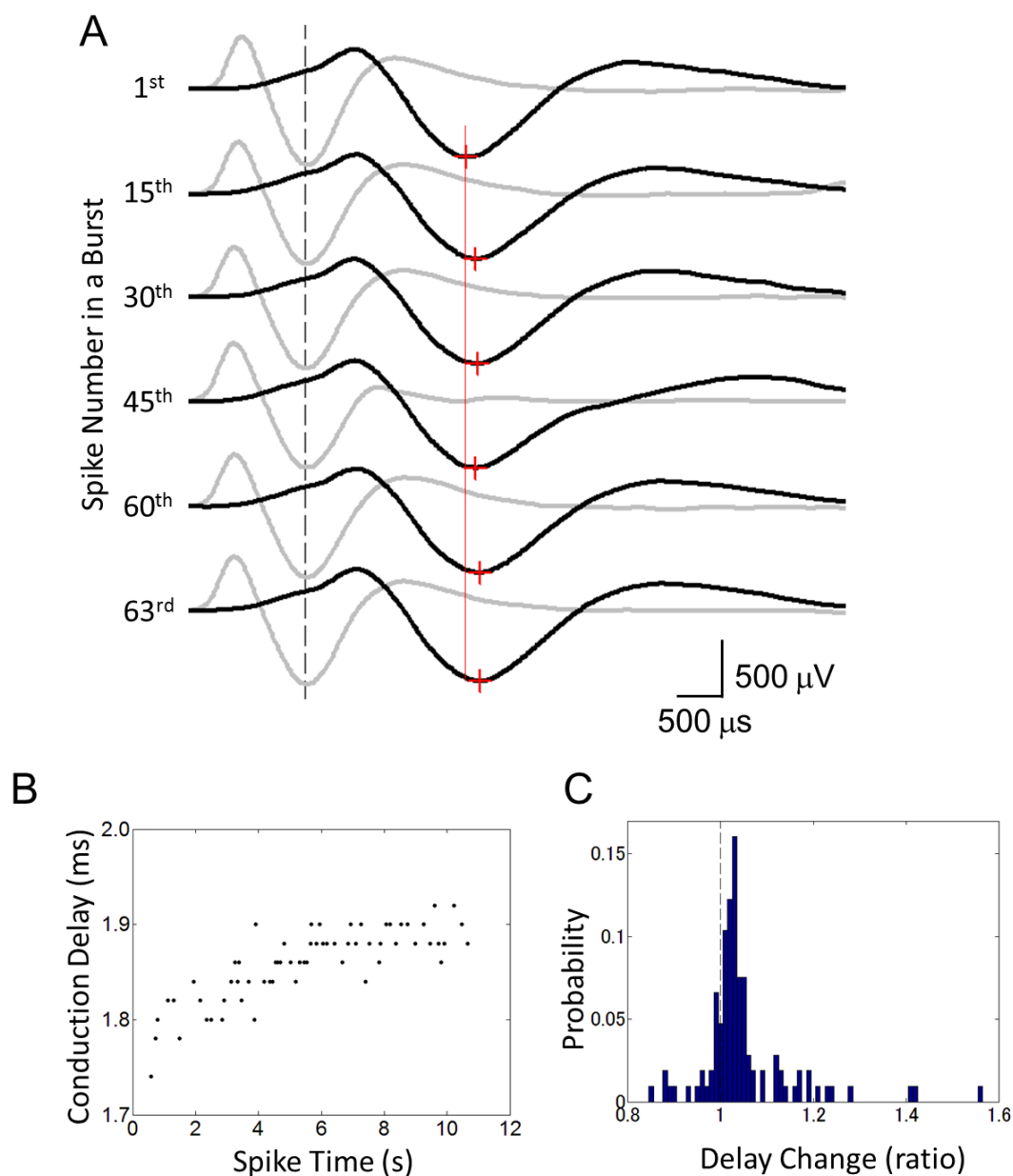


図 4-10 バースト活動に伴う活動伝導時間の変化 [Shimba 2015a 改変]. (A) バースト活動における代表的なスパイク波形. E_{in} (灰色) のスパイク時刻を基準 (黒い破線) として表示した. E_{out} (黒色) のスパイク時刻 (赤い十字) が, バースト内での最初のスパイク時刻 (赤線) と比較して, 右側にシフトしていく様子が観察される. (B) バースト活動における伝導時間の変化. スパイク時刻と活動の伝導時間に正の相関が見られた ($r = 0.802$, $p < 0.0001$). (C) 全クラスターの伝導時間変化率のヒストグラム. 80%のクラスターで伝導時間の増加が見られた.

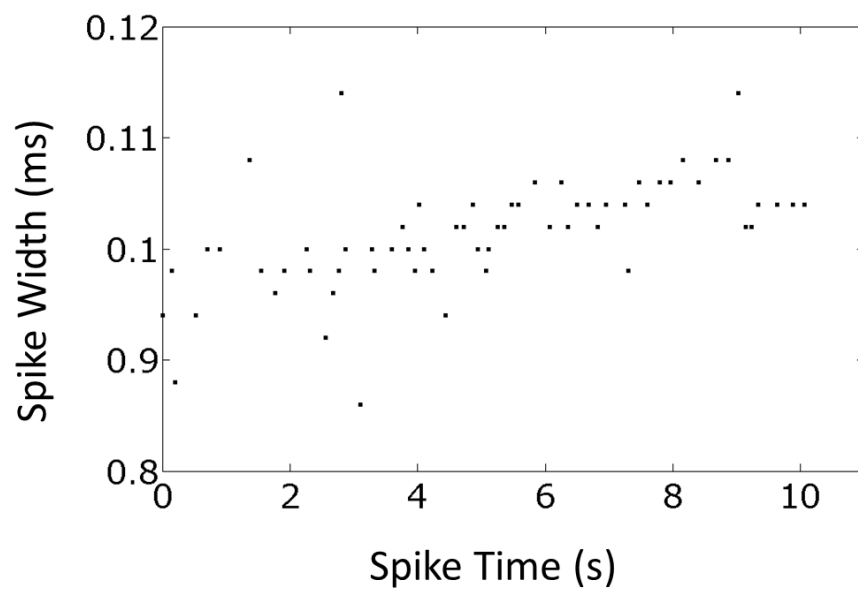
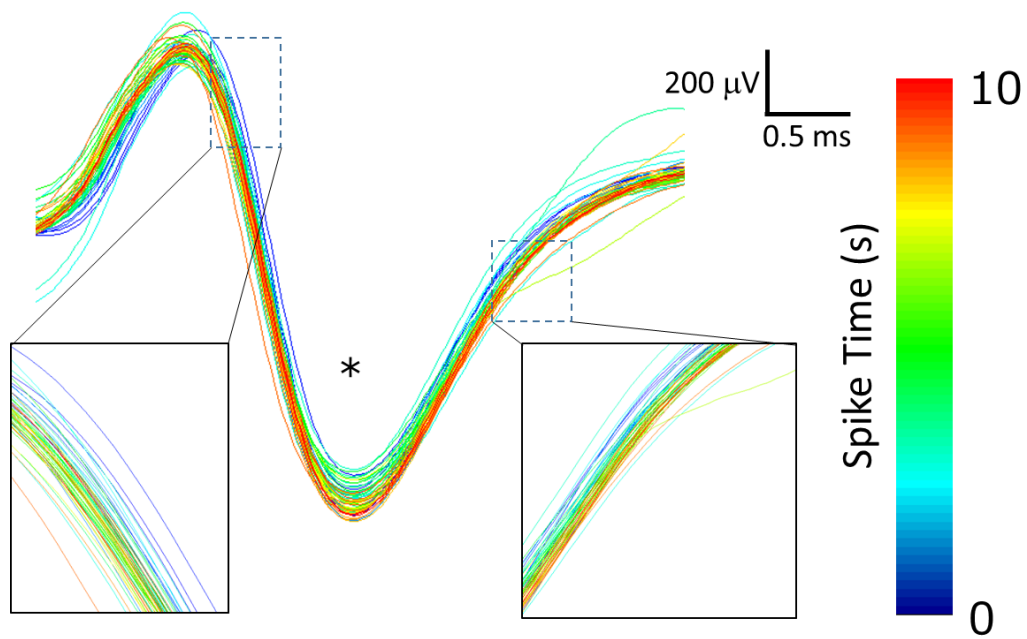


図 4-11 バースト活動に伴うスパイク波形の変化 [Shimba 2015a 改変]. 上段：バースト内でのスパイク波形の変化. 下段：アスタリスク (*) で示した振幅におけるスパイク幅の変化. スパイク時刻とスパイク幅には、正の相関が見られた ($r = 0.599$, $p < 0.001$).

4-3-5 発達過程における活動パターンおよび伝導の変化

発達過程における変化を評価する目的で、5 DIV から 20 DIV まで 5 日毎に自発活動を記録した。図 4-12 に培養日数と各指標の関係を示す。バーストの持続時間は、培養日数の増加に伴って上昇した。特に、5 DIV とその他の培養日数の間で有意な差が検出された ($p < 0.05$)。また、1 回のバースト内におけるスパイク数は顕著な変化を示さなかった。上記 2 つの特性の変化に伴い、バースト内における発火頻度は培養日数の増加に伴って低下した。10 DIV と 5 DIV および 20 DIV ($p < 0.05$)、および 5 DIV と 20 DIV ($p < 0.01$) において有意な差が検出された。また、伝導時間の増加率は培養日数の増加に伴い低下した。

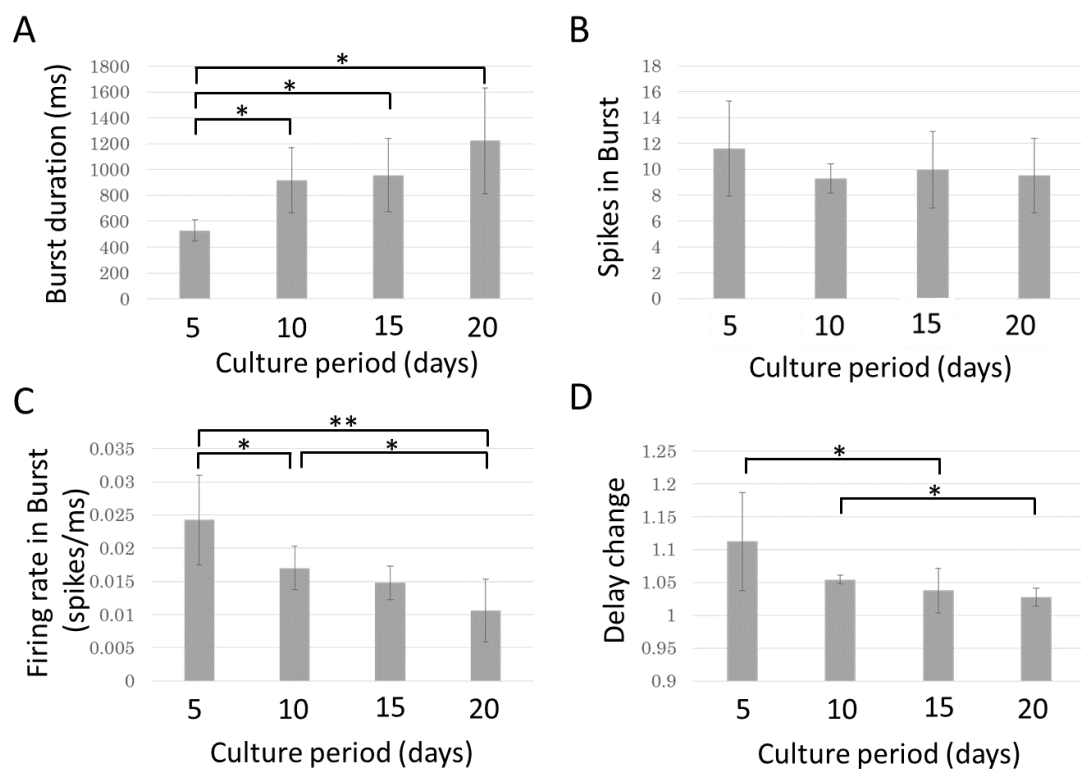


図 4-12 培養日数と活動パターンの関係 [Shimba 2015a 改変]。バースト活動の持続時間 (A) は、培養日数の経過とともに増加した。バースト活動内のスパイク数 (B) は、顕著な変化を示さなかった。バースト活動内の発火頻度 (C) は、培養日数の経過とともに低下した。伝導時間の変化率 (D) は、培養日数の経過とともに低下した。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; paired t test with Bonferroni correction, $n = 8$, mean \pm SD.

4-4 電気刺激を用いた伝導特性の評価

本節では、連続刺激を印加し、刺激頻度と軸索における伝導特性の変化の関係を評価した結果について述べる。最初に、axon MEA を用いた計測においても自発活動により伝導時間が増加することを確認する。次に、様々な電圧で電気刺激を印加し、刺激応答が複数の軸索の活動の重ね合わせとなっていることを確認する。さらに、2セットの連続刺激を様々な間隔で印加し、刺激の影響から回復するまでに要する時間について評価した結果を示す。最後に、様々な刺激頻度で電気刺激を印加することによって得た、刺激頻度と伝導特性の変化の関係について述べる。本節では、axon MEA 上でラット CX を培養し、活動を計測した。

4-4-1 バースト活動に伴う伝導時間の増加

axon MEA を用いて 27 DIV のラット CX から自発活動を計測した。代表的な活動の波形を図 4-13 に示す。スパイクソーティングを用いて、活動を分別したところ、 23 ± 12 のクラスタが検出された。図 4-14 に、伝導時間および変化率のヒストグラムを示す。全てのクラスタの平均伝導時間は、 0.81 ± 0.51 ms であり、電極間が $600 \mu\text{m}$ であることを考慮すると伝導速度は $0.45 - 2.0$ m/s となった。また、刺激電極側からの軸索の伸長を促進するためにテーパーを設けたものの、刺激電極側から計測電極側への伝導が検出されたクラスタは全体の 40% となった。さらに、6 試料から検出した 185 のクラスタについて、バースト活動に伴う伝導時間の変化を評価した。変化率の平均値は 1.34 ± 0.61 となり、78.9% のクラスタで変化率が 1 より大きな値をとった。以上から、axon MEA を用いた場合でも、自発的なバースト活動に伴う伝導時間の増加が起こることが示唆された。

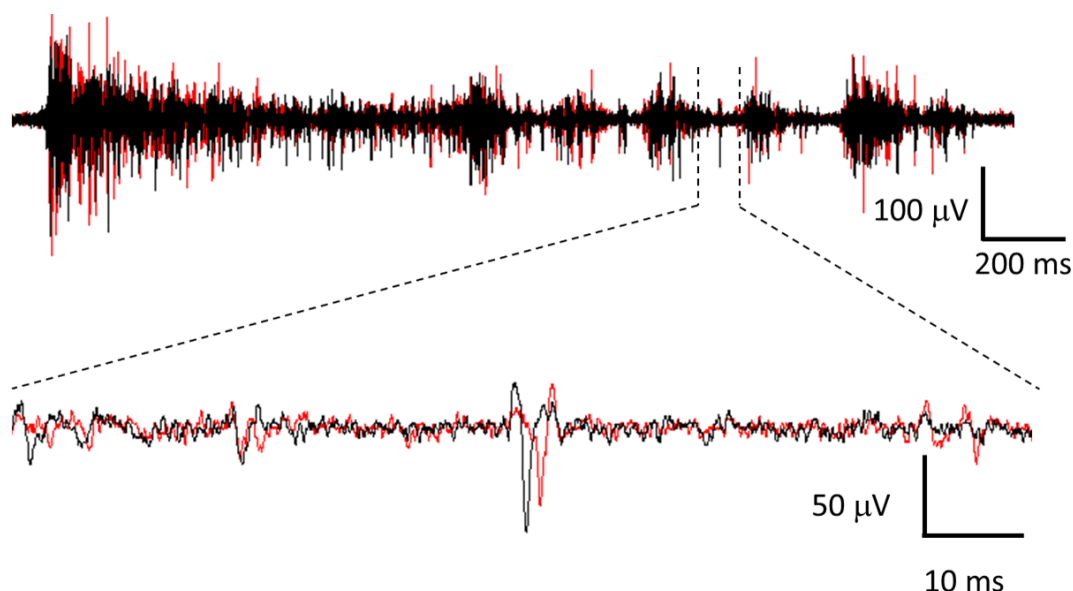


図 4-13 axon MEA から計測された活動。赤色および黒色は、それぞれ E_{far} および E_{near} から計測された波形を示す。

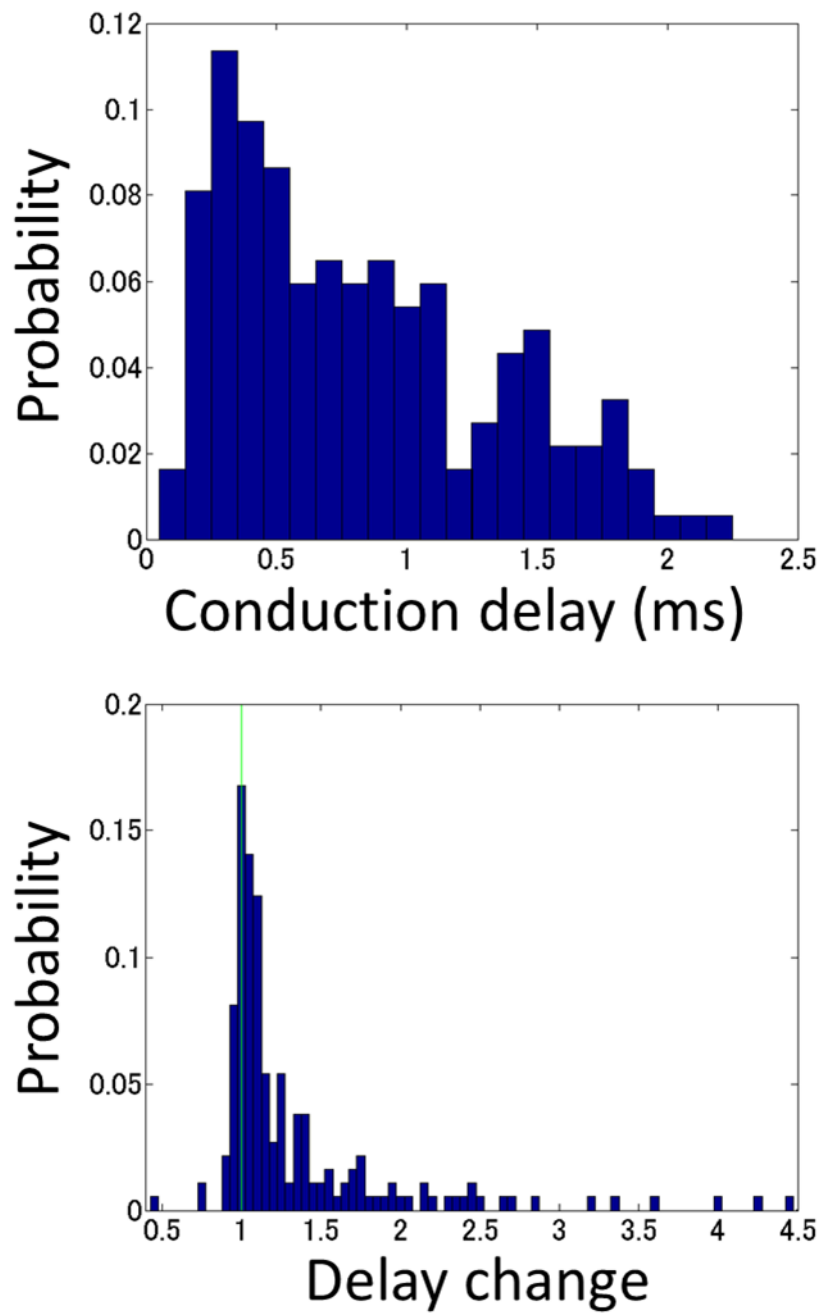


図 4-14 ラット CX の伝導時間および変化率. 伝導時間は, 0.81 ± 0.51 ms (mean \pm SD) となった. また, 伝導時間の変化率は, 78.9%のクラスターで 1 より大きな値となった. 下図の緑線は, 伝導時間が変化しなかったことを示す.

4-4-2 電気刺激に対する軸索の応答と刺激電圧の変化による影響

刺激電極から軸索に 1 V の電圧で電気刺激を印加し、計測用電極より応答を計測した。 E_{near} では刺激から 1.61 ± 0.13 ms ($n = 29$ microtunnels) でスパイクが検出された。刺激電極との距離である $200\text{ }\mu\text{m}$ を考慮すると、伝導速度は $0.11 - 0.14$ m/s となった。また、 E_{far} では、 2.62 ± 0.36 ms ($n = 163$ microtunnels) でスパイクが検出された。刺激電極との距離である $800\text{ }\mu\text{m}$ から伝導速度を計算すると $0.29 - 0.35$ m/s となった。同一の微小トンネル内に配置した 2 点の計測電極からスパイクの時刻差を計算したところ、 1.07 ± 0.41 ms ($n = 29$ microtunnels) となり、伝導速度を計算すると $0.40 - 0.91$ m/s であった。以上より、微小トンネル内における電極の位置により、伝導速度が異なる値をとることが示唆された。そこで、axon MEA を用いた計測では、伝導時間の比を指標とした。

次に、 $0.05 - 1.00$ V までの電圧で軸索に対して電気刺激を印加した。それぞれの電圧を用いた場合の代表的な応答波形を図 4-15A に示す。また、図 4-15B に、それぞれの応答波形について、 0.05 V 低い強度での刺激に対する応答との差分をとった波形を示す。差分の波形からは、スパイク状の波形が観察された。電極の増加とともに、応答の振幅が増加する傾向が観察された。 1.0 V で刺激した場合に活動が検出された微小トンネルから活動計測を行い、刺激電圧と応答の関係を評価した ($n = 158$ microtunnels from 8 samples)。図 4-16 に結果を示す。応答は電圧が 0.3 V の時に初めて検出され、電圧が増加するに従って応答が検出される割合が増加した。また、刺激の誘発応答は、 1.0 V の誘発応答の振幅で正規化した場合、刺激電圧の増加に伴って応答の振幅が増加する傾向が見られた。次に、計測されたシグナルについて、電圧間での差分を算出した。結果、ピーク時刻の異なるスパイク状の波形が複数観察された。

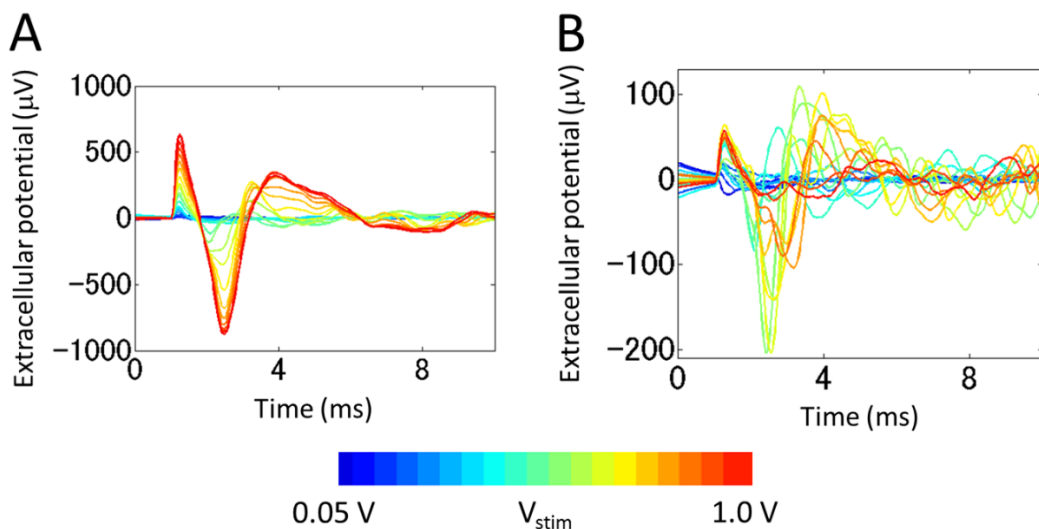


図 4-15 刺激電圧の変化と応答波形の関係。(A) 様々な刺激電圧における誘発応答の波形。刺激電圧の上昇に伴い、誘発応答の振幅の絶対値が上昇した。(B) 刺激電圧間での波形の差分。スパイク状の波形が観察された。

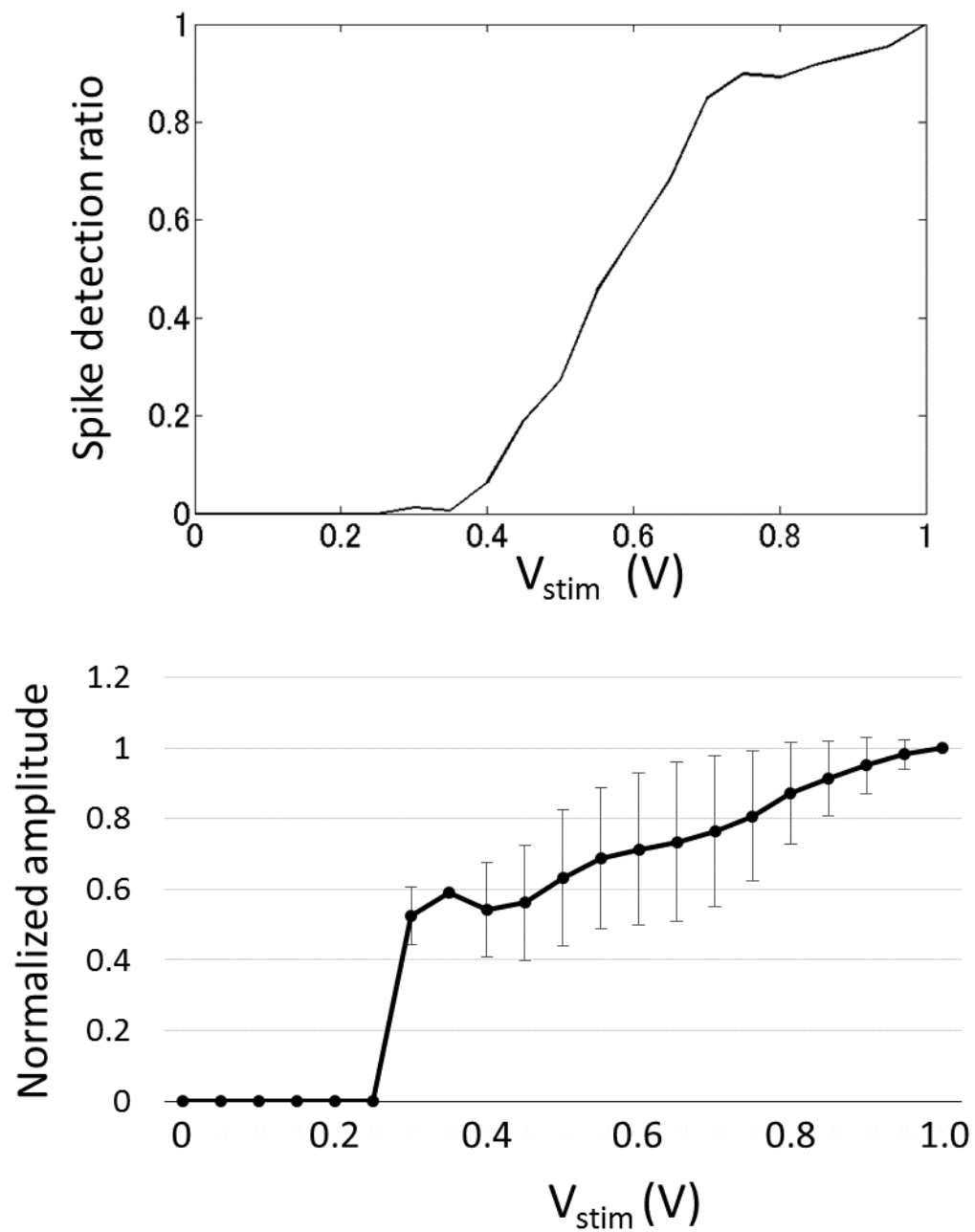


図 4-16 刺激電圧とスパイク検出率および振幅の関係. 上段: スパイクが検出された割合. スパイクは, 刺激電圧が 0.3 V 以上となった場合に検出された. 下段: 刺激電圧と振幅の関係. 刺激電圧の上昇に伴い, 振幅の絶対値が上昇した. Mean \pm SD; V_{stim} , 刺激電圧.

4-4-3 刺激の影響からの回復時間

刺激からの回復時間を評価する目的で、様々な回復時間を設けて、100 Hz で 2 セットの連続刺激を与えた。図 4-17 に、1 セット目、および様々な回復時間後の 2 セット目の代表的な波形を示す。回復時間を 1 s に設定した場合、1 番目の刺激に対しては応答を示したが、2 番目以降は顕著な誘発応答が観測されなかった。一方、回復時間を 10 s 以上に設定した場合、連続刺激に対して応答を示した。次に、誘発応答を定量的に評価するために、1 セット目と 2 セット目の応答時間の比である *delay ratio* を計算した。図 4-18 に、回復時間を変化させた時の、1 番目、10 番目、および 50 番目の刺激に対する *delay ratio* を示す。回復時間が 10 s 以下の場合、誘発応答の振幅の急激な低下からスパイク検出が困難となり、微小トンネル毎に *delay ratio* のばらつきが大きかった。Delay ratio は、10 s の時に 1.12 ± 0.04 、20 s のときに 1.04 ± 0.02 と、回復時間の増加に伴い 1.00 に近づいた ($n = 100$ microtunnels)。さらに、回復時間を 100 s に設定すると *delay ratio* は 1.00 ± 0.01 となり、100 s 間のインターバルにより前の刺激の影響が残らないことが示された。また、試行の回数は少ないものの、50 s のインターバルを設けた予備実験でも刺激の影響が残らないことが示されたため、以降の実験ではセット間の間隔を 50 s に設定した。

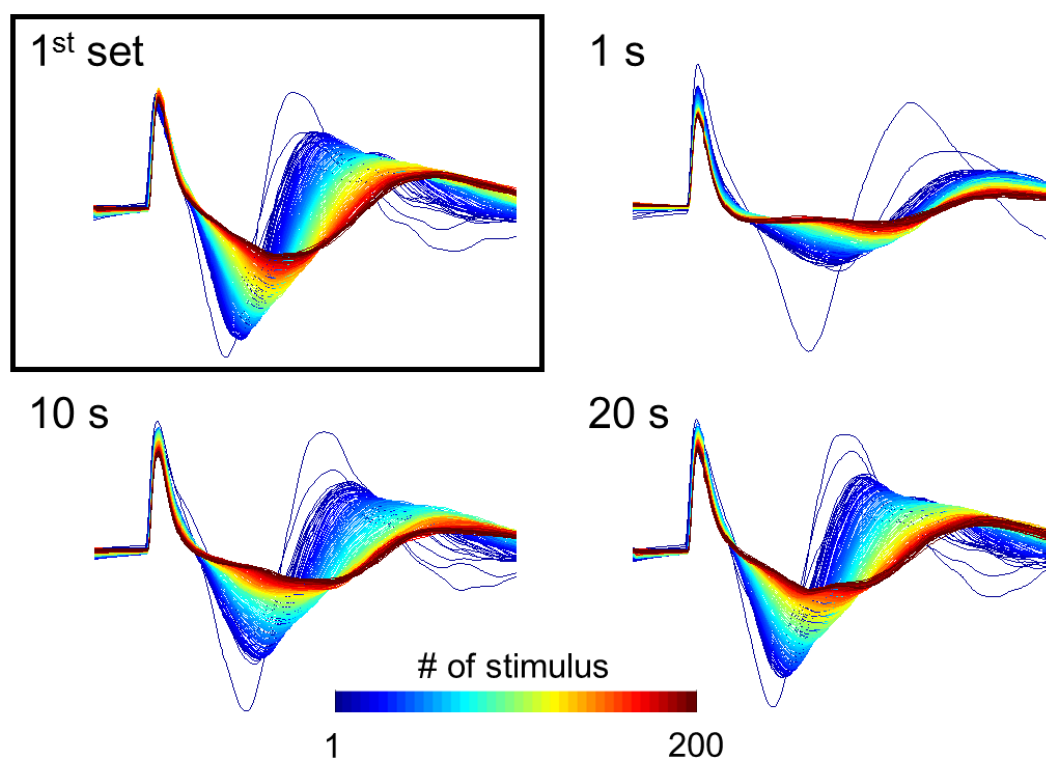


図 4-17 Recovery period に応じて計測された応答波形 [Shimba 2016]. 200 回の連続刺激を 2 セット印加した。刺激の影響から回復するための時間 (recovery period) に応じて、2 セット目の刺激の形状は異なった。左上：1 セット目の誘発応答の波形。各波形の左上に recovery period として設定した値を示す。

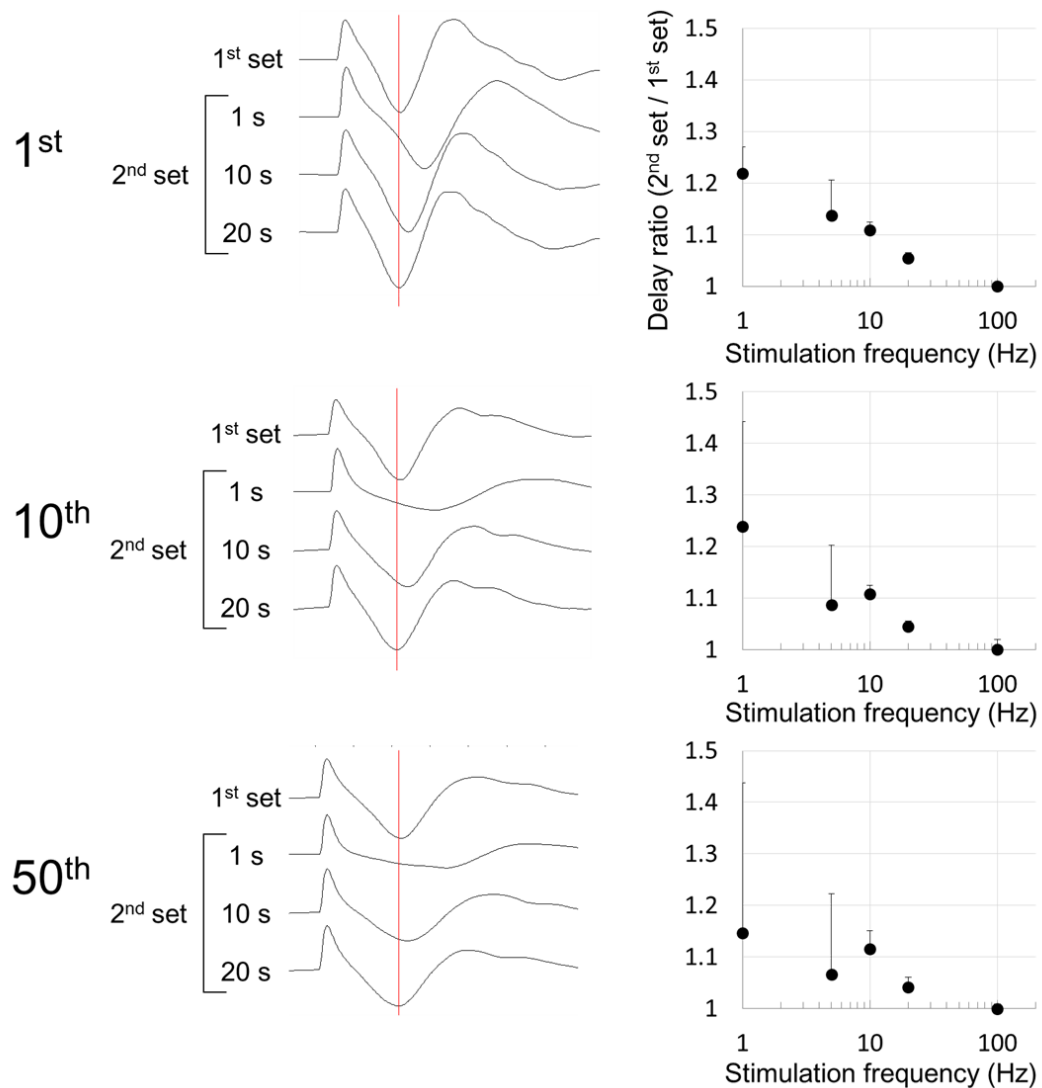


図 4-18 刺激から回復までに要する時間 [Shimba 2016]. 左図：1 回目，10 回目および 50 回目の刺激に対する誘発応答の波形．右図：各刺激回数における，1 セット目を基準とした 2 セット目の伝導時間．Recovery period の間に 1 セット目の刺激に対する影響から回復した場合には，値は 1 となる．

4-4-4 刺激頻度と伝導特性変化の関係

刺激頻度を変化させ、伝導特性の変化を評価した。さらに、h 電流の阻害薬である ZD7288 の存在下でも同様の実験を行い、h 電流が連続刺激に与える効果も併せて評価した。各条件において解析に用いた微小トンネルの数を、表 4-1 に示した。図 4-19 に、様々な頻度で印加した電気刺激に対する代表的な誘発応答の波形を示す。ZD7288 の存在下では、顕著な振幅の低下と伝導時間の上昇が観察されたことより、h 電流が連続刺激の影響を補償していたことが示唆された。図 4-20 に、刺激回数と伝導時間の変化の関係を示す。伝導時間の変化は、各条件における平均値を示す。振幅は、2 番目の刺激に対して急激に低下した後上昇し、10 Hz 以上で刺激した場合には再度低下する傾向を示した。刺激頻度が 5 Hz 以下であった場合、一定の値をとった。刺激頻度を 2 Hz に設定した場合、200 回目の刺激で、ZD7288 の存在下では relative delay が 1.21 ± 0.09 まで増加したのに対して、非存在下では 1.07 ± 0.05 であった。5 Hz 以上の頻度で刺激を印加した場合、relative delay は刺激に伴って単調に上昇した。また、各刺激頻度の間を補完した結果を図 4-21 に示す。Control の条件で、刺激頻度が 10 Hz の周囲の領域において、刺激頻度が上昇した場合でも、relative delay が上昇しない箇所が観察された。定量的な評価を行う目的で、10, 20 および 50 番目の刺激に対する relative delay を抽出した (図 4-22)。20 Hz で刺激を印加した場合、5 Hz および 10 Hz で刺激した場合と比較して、10 回目と 20 回目の刺激において、relative delay が有意に小さかった ($p < 0.01$, $n = 81$ microtunnels)。5 Hz と 20 Hz で刺激を印加した誘発応答を比較すると、75 回目の刺激まで 5 Hz で刺激を印加した場合の方が大きな変化を示した。ZD7288 を添加すると、本傾向は消失し、刺激頻度が高い方がより大きな変化を示した。

表 4-1 解析に用いた微小トンネルの数

	Stimulation frequency (Hz)					
	2	5	10	20	50	100
Control	85	82	81	81	81	49
ZD7288	72	70	70	66	65	64

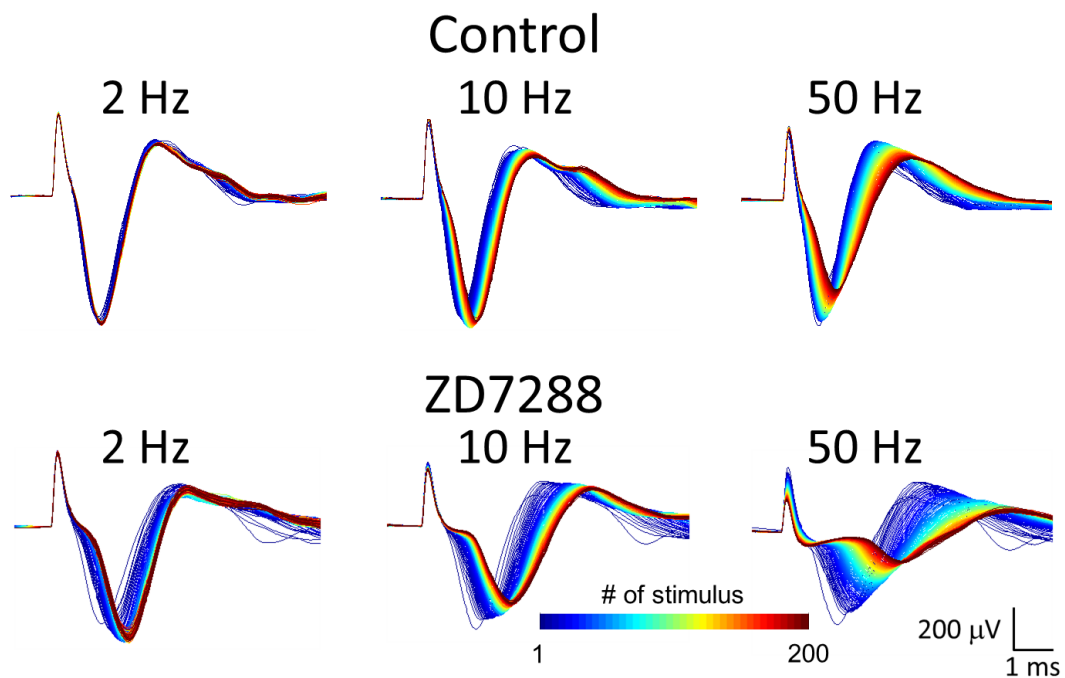


図 4-19 刺激頻度の違いによる応答波形の変化 [Shimba 2016]. 刺激の頻度に応じて，誘発応答の波形が変化した．また，h 電流の阻害剤である ZD7288 の存在下では，ピーク時刻および振幅が顕著に変化した．

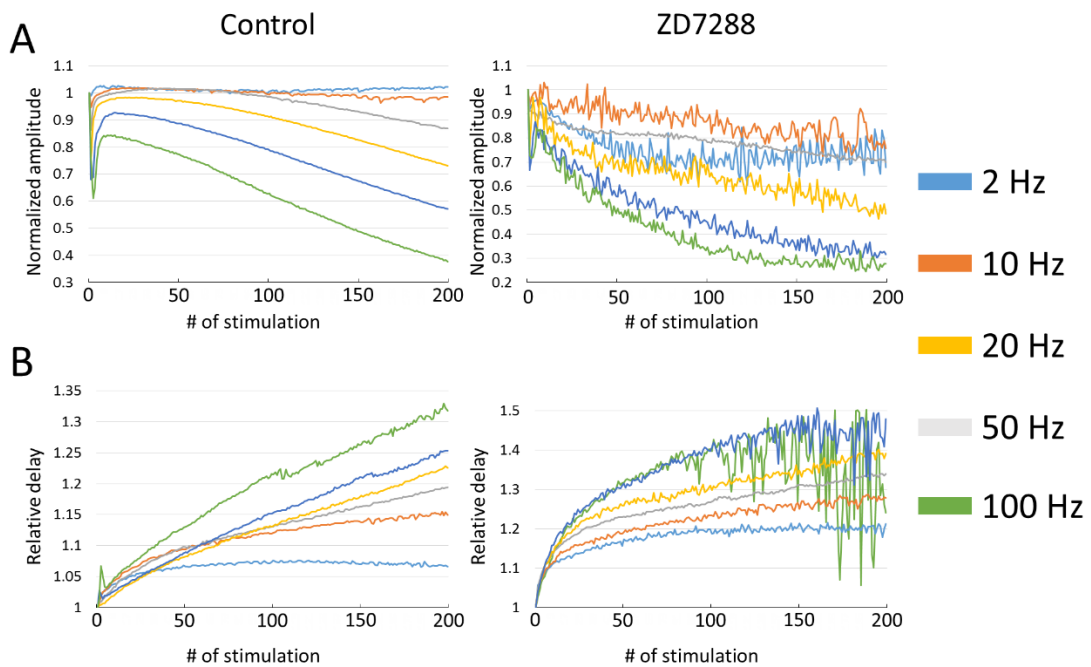


図 4-20 連続刺激による振幅および伝導時間の変化. (A) 刺激による振幅の変化. (B) 刺激による伝導時間の変化.

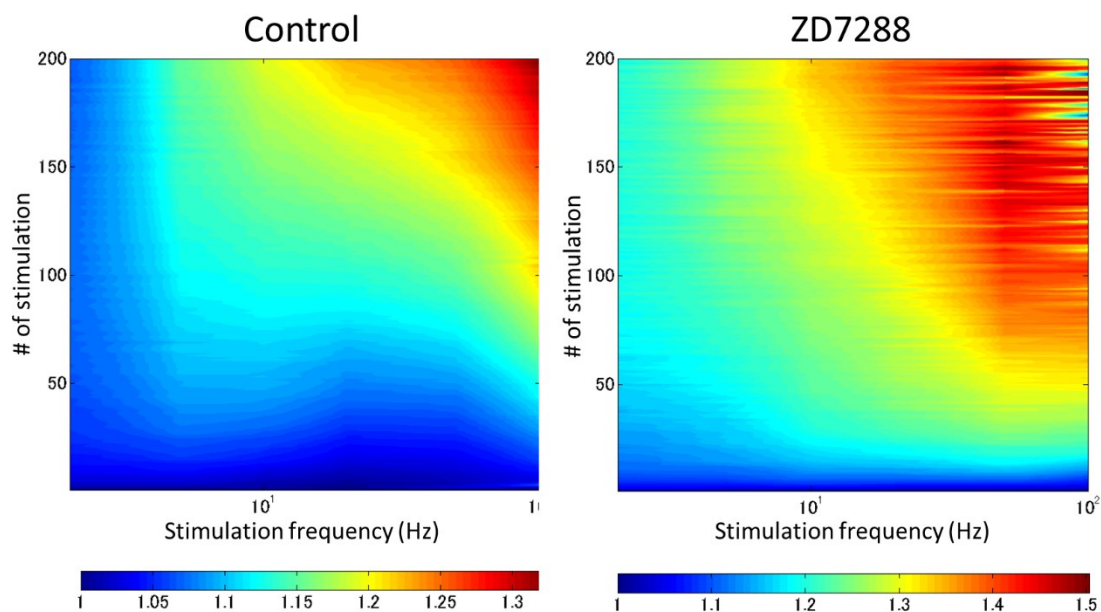


図 4-21 刺激頻度と伝導時間の変化率の関係 [Shimba 2016]. Control の条件では、およそ 80 回目の刺激まで、刺激頻度が 10 Hz の場合に、より低い刺激頻度の場合と比較して、伝導時間の変化率が低かった。

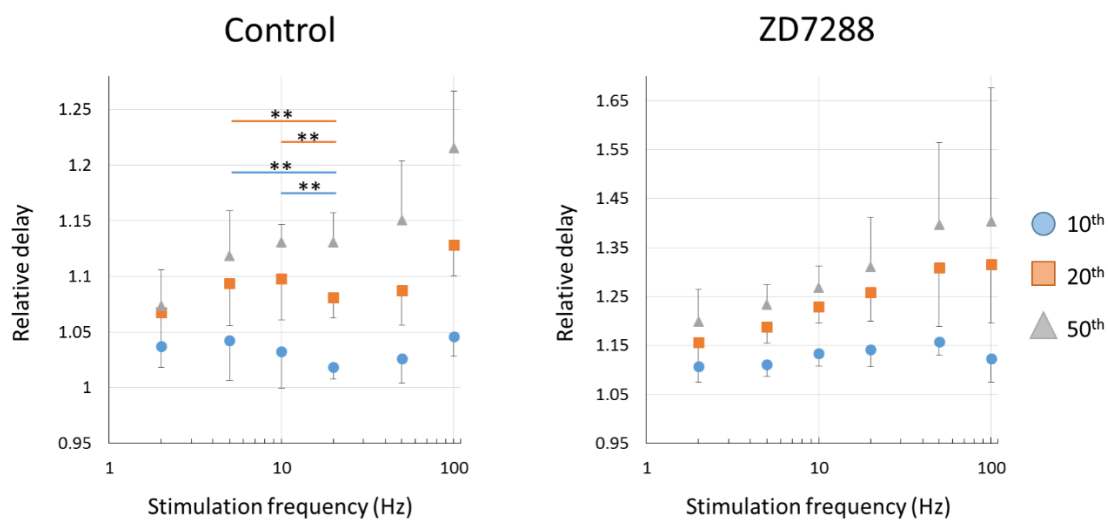


図 4-22 刺激頻度依存性と刺激回数の関係 [Shimba 2016 改変]. 10 回目、20 回目および 50 回目の刺激に対する伝導時間の刺激頻度依存性をプロットした。エラーバーは標準誤差を示す。

4-4-5 自発的な伝導時間変化と刺激による変化の関係

自発的なバースト活動による伝導時間の変化と、刺激により誘発された変化の関係を評価するために、自発活動のパラメータから、同じ条件で軸索を刺激した場合に想定される伝導時間変化率を推定した。図 4-23 に、それぞれの培養日数における、自発活動による伝導時間変化率と推定した伝導時間の変化率の関係を示す。5 DIV には、自発活動による変化率の方が有意に大きかった ($p < 0.001$, Wilcoxon signed-rank test)。一方、10 DIV 以降は、刺激による伝導時間の変化率の方が有意に大きかった ($p < 0.05$ for 10 DIV; $p < 0.001$ for 15 and 20 DIV; Wilcoxon signed-rank test)。次に、刺激と自発による伝導時間変化率の比を算出した。図 4-24 に、それぞれの培養日数における伝導時間変化率の比を示す。5 DIV においては、 1.07 ± 0.15 であったが、培養日数の経過とともに低下傾向を示した。15 DIV および 20 DIV では、それぞれ 1.00 ± 0.1 および 1.00 ± 0.07 となり、自発活動による変化率と刺激により想定される変化率が同程度となったことが示された。以上から、培養日数の経過に伴い、伝導時間の変化率が低下することが示唆された。

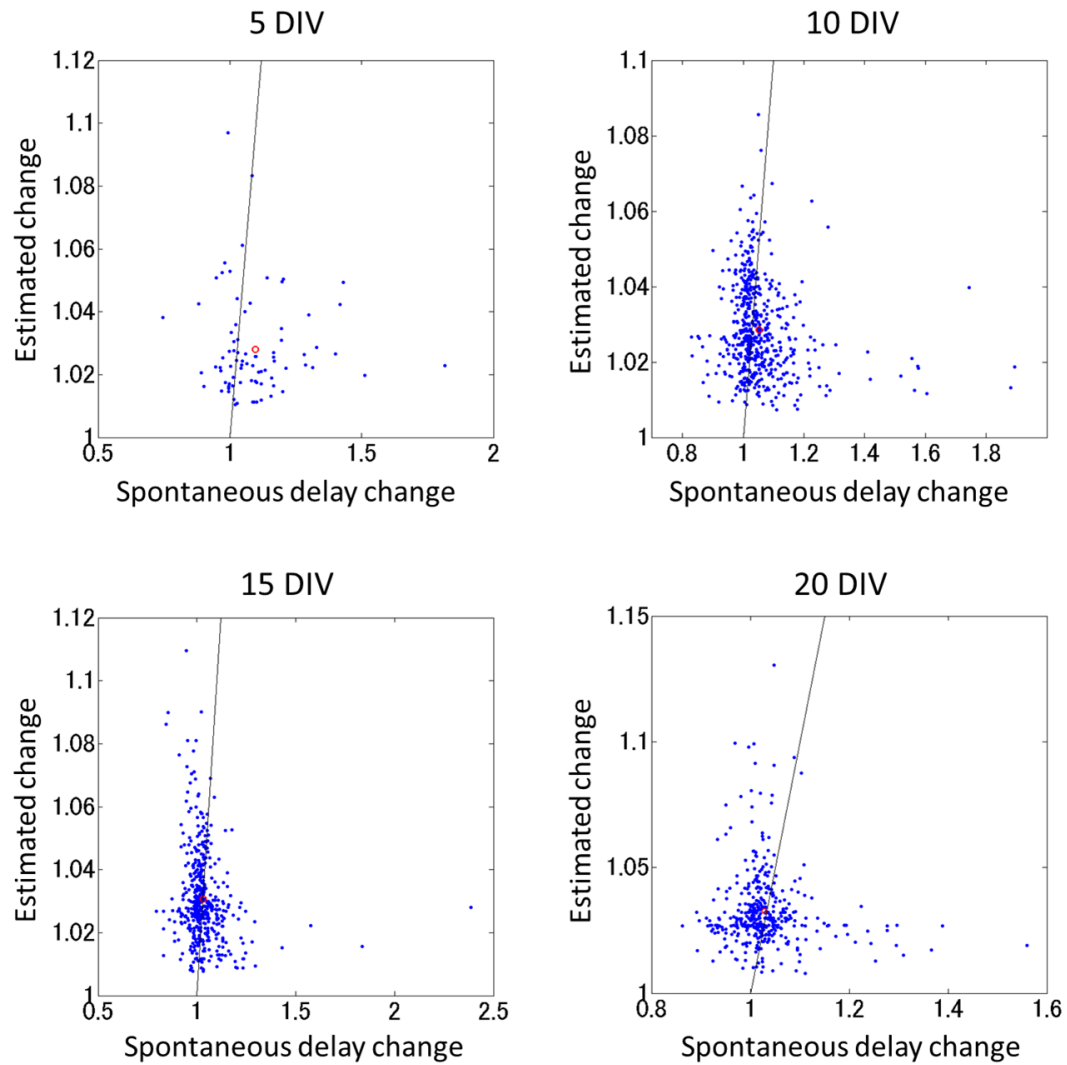


図 4-23 自発的な伝導時間の変化と刺激による変化の関係. 自発活動のパラメータから, 刺激した場合に想定される伝導時間の変化を推定した. 培養 5 日目 (days *in vitro*; DIV) では, 自発的な変化の方が大きかった ($p < 0.001$, Wilcoxon signed-rank test). 一方, 10 DIV 以降は, 推定値の方が大きな値となった ($p < 0.05$ for 10 DIV; $p < 0.001$ for 15 and 20 DIV; Wilcoxon signed-rank test). 赤い丸は, 平均値を示す. 黒い線は $y = x$ の直線を示し, 黒線より右下に位置する場合は, 自発的な変化が大きいことを示す.

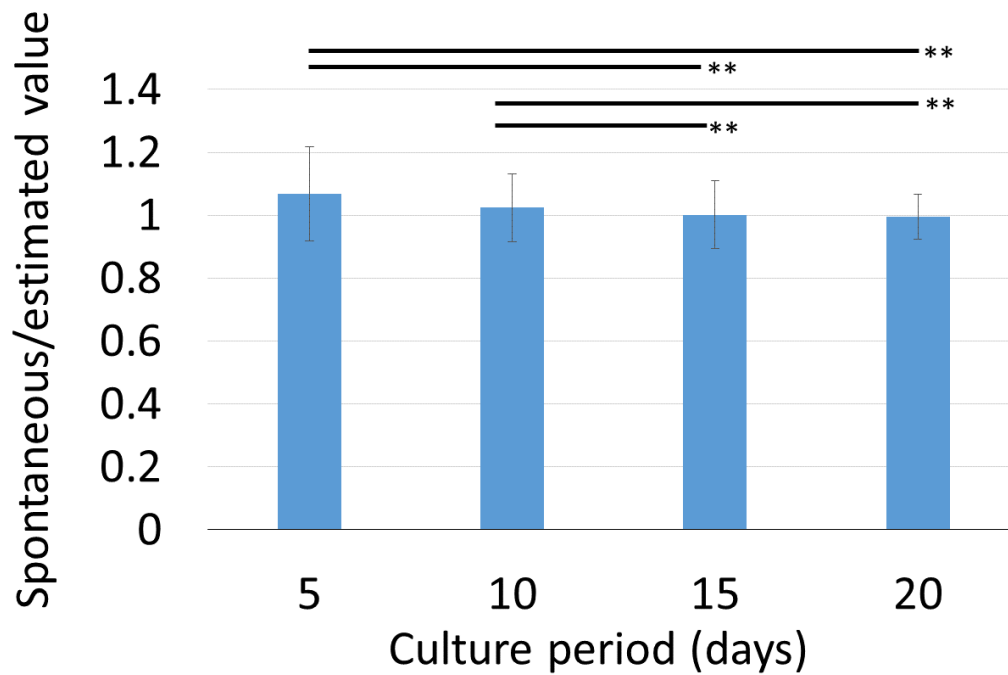


図 4-24 推定した伝導時間変化に対する自発的な伝導時間変化. 培養日数の経過に伴い, 値が低下した. 15 日および 20 日では, それぞれ 1.00 ± 0.1 および 1.00 ± 0.07 となり, 自発的な変化と推定値が同程度の値となったことが示された. **, $p < 0.01$; Welch's t test with Bonferroni correction; $n = 82$ at 5 days *in vitro* (DIV), $n = 547$ at 10 DIV, $n = 464$ at 15 DIV; $n = 411$ at 20 DIV; mean \pm SD.

4-5 ヒト iPS 細胞由来神経細胞の軸索における活動伝導

4-5-1 自発活動による評価

ヒト iPS 細胞由来神経細胞を axon MEA 上で培養し，活動計測を行った．70 DAI における代表的な波形を図 4-25 に示す．バースト活動内で，同一の微小トンネルに配置した電極から，2 つの連なったスパイクが検出された．さらに，スパイクソーティングを用いて，計測した信号から活動電位の伝導を検出した．計測期間を通して，活動伝導であると考えられるクラスタが検出された．培養日数と伝導時間の関係を図 4-26 に示す．伝導時間は，0.5 ms から 1 ms 程度の値をとり，同じデバイスを用いてラット CX を計測した結果である 0.81 ± 0.51 ms と同程度の値となった．続いて，バースト活動内における伝導時間の変化を評価した．図 4-27 に，各計測日における伝導時間変化率を示す．ほとんどの計測日において平均値は 1 を超えた．ラット CX の伝導時間変化率である 1.34 ± 0.61 と比較すると，hiPS-neuron の伝導時間変化率の平均値は低い値をとった．

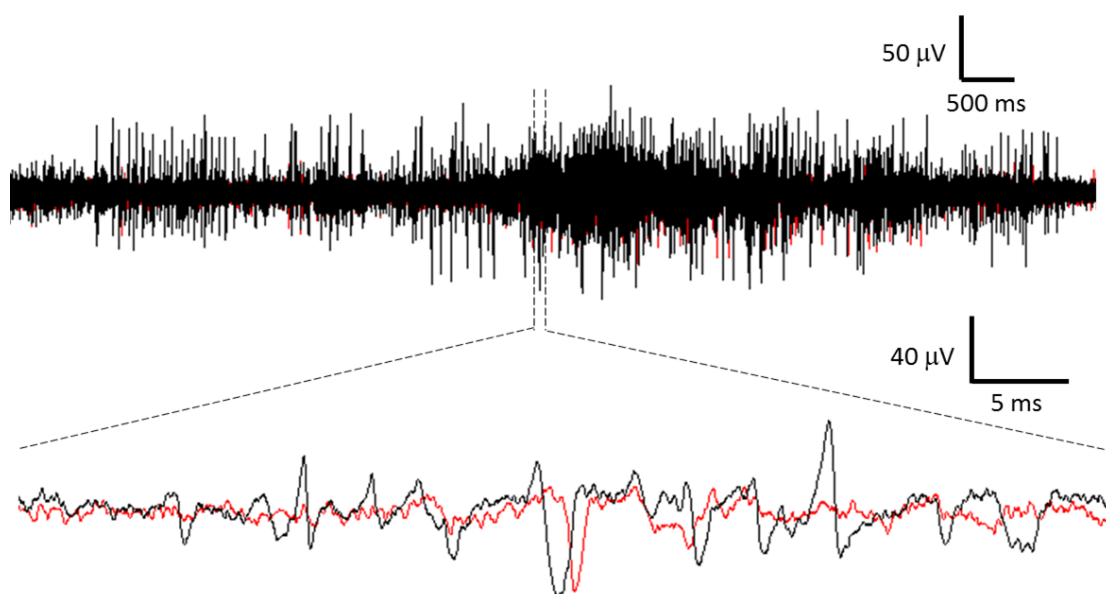


図 4-25 hiPS-neuron から計測した自発活動．70 days after induction における活動を示した．黒色および赤色は，それぞれ E_{far} および E_{near} から計測された波形を示す．

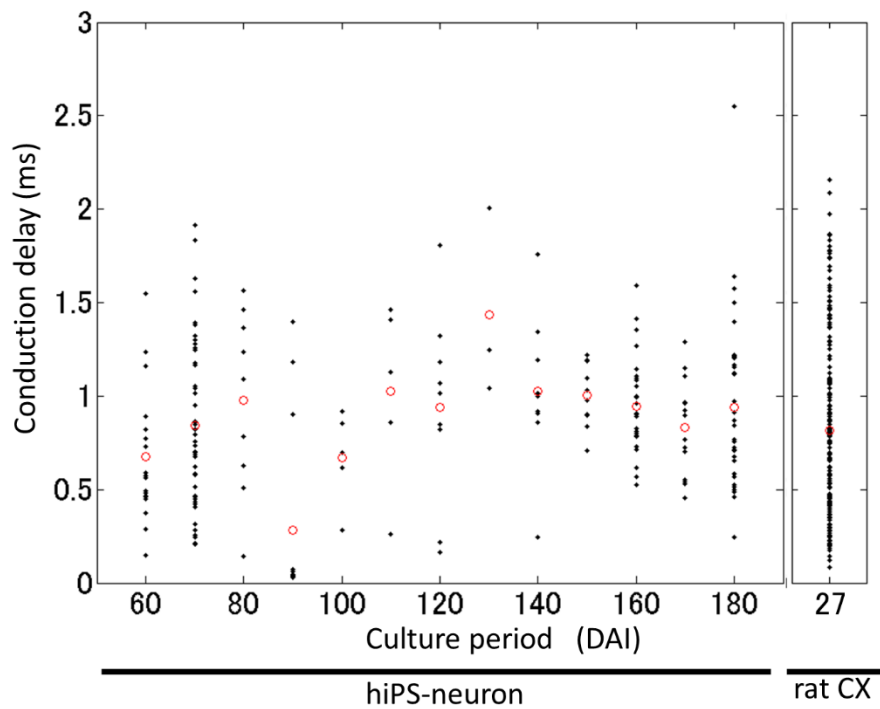


図 4-26 hiPS-neuron の伝導時間. 赤い丸は平均値を示す. 比較のために, ラット CX の伝導時間を示した. DAI, days after induction.

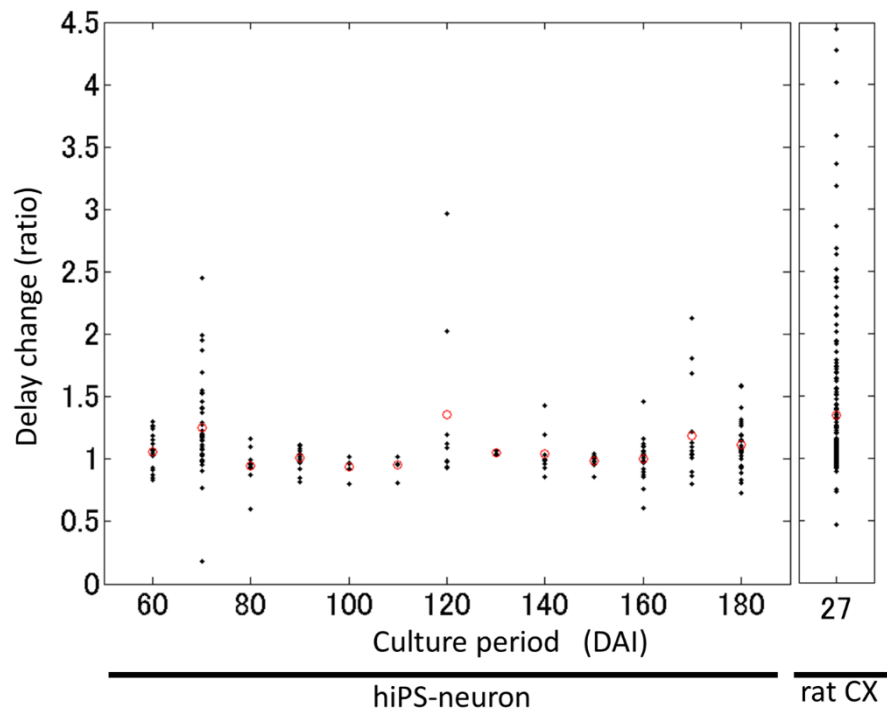


図 4-27 hiPS-neuron の伝導時間変化率. 赤い丸は, 平均値を示す. hiPS-neuron の伝導時間の変化率は, ラット CX と比較して低い傾向にあった. DAI, days after induction.

4-5-2 電気刺激を用いた伝導時間の評価

hiPS-neuron の発達による伝導時間の変化を評価するために、 E_{stim} より電気刺激を印加した。図 4-28 に、170 DAI における代表的な誘発応答の波形を示す。0.5 V から 1.0 V までは 0.01 V 刻みで電圧を変化させながら刺激したところ、刺激電圧により誘発応答の波形が変化した。刺激電圧の上昇により応答した細胞数が増加したことが誘発応答の変化の原因であると考え、応答波形の差分を計算した。結果、誘発応答の差分の波形に、神経細胞のスパイクと同様に負のピークが観察された。以上から、差分の波形には、誘発応答の波形と比較して、少数の神経細胞の伝導の情報が含まれると考えられる。次に、培養日数の違いによる伝導時間の変化を評価した。図 4-29 に、培養日数と、0.5 V および 1.0 V で刺激した場合の伝導時間の関係を示す。0.5 V で刺激した場合、170 DAI における伝導時間が 280 DAI と比較して有意に長かった ($p < 0.05$)。一方、1.0 V で刺激した場合、いずれの培養日数においても、伝導時間は 2.7 ms 程度となった。さらに、差分の波形からピーク検出を行い、0.5 V から 1.0 V の間に応答の閾値を有すると考えられる細胞の伝導時間を評価した。図 4-30 に、それぞれの培養日数における伝導時間を示す。220 DAI では、その他の培養日数と比較して有意に伝導時間が短かった ($p < 0.05$ versus 170 DAI; $p < 0.01$ versus 110 and 280 DAI)。また、1 本の微小トンネルから検出されたピークの数、110 DAI で 11.0 ± 1.3 , 170 DAI で 5.8 ± 1.1 , 220 DAI で 6.2 ± 1.2 , および 270 DAI で 5.4 ± 1.6 となった (mean \pm SE)。

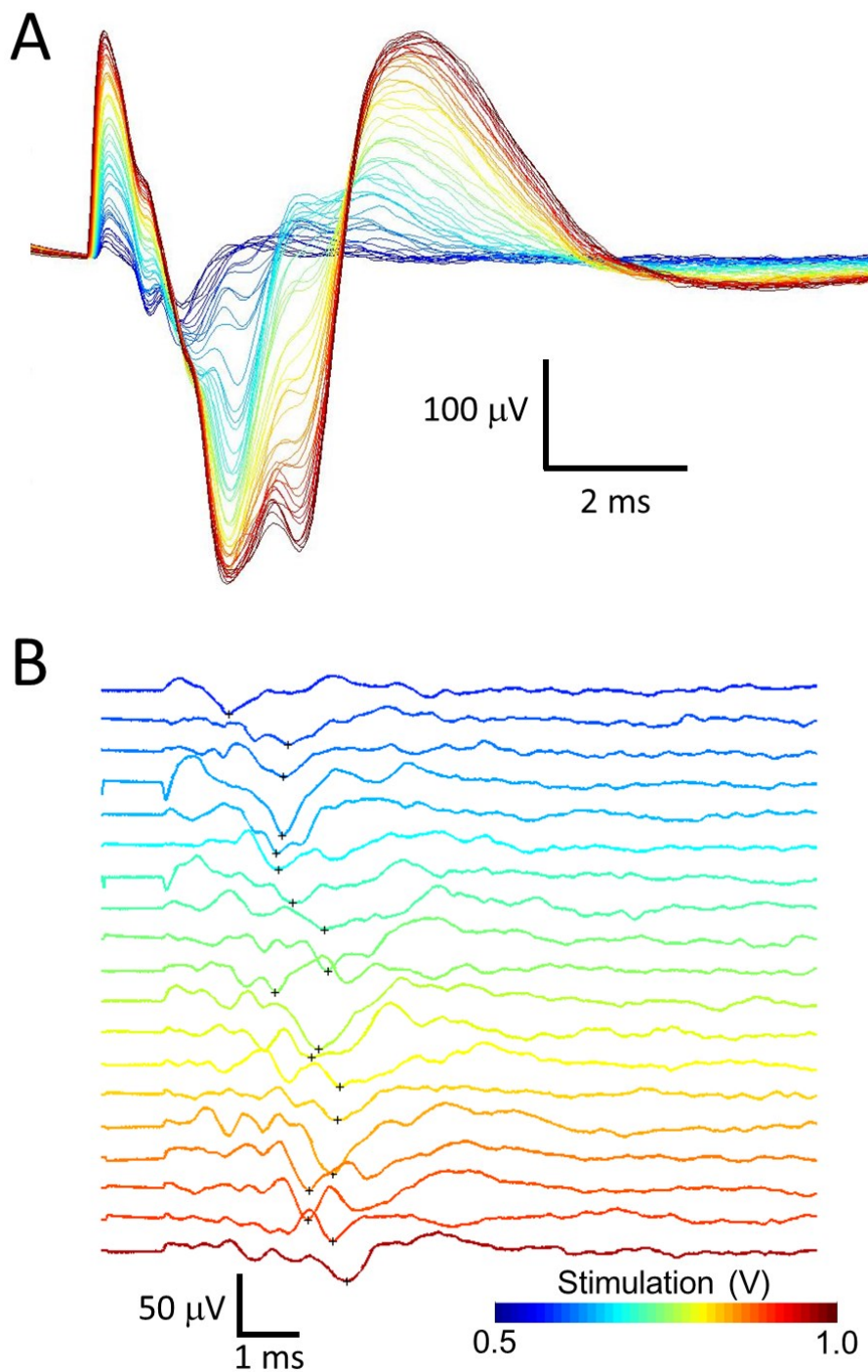


図 4-28 刺激電圧の上昇による誘発応答の波形の変化. (A) 誘発応答の波形. 刺激電圧が上昇すると, 振幅が大きくなり, 負のピークの時刻が変化した. (B) 隣接する刺激電圧との差分の波形. 差分の波形に負のピークが検出された場合のみプロットした. 十字 (+) でピークの時刻を示す.

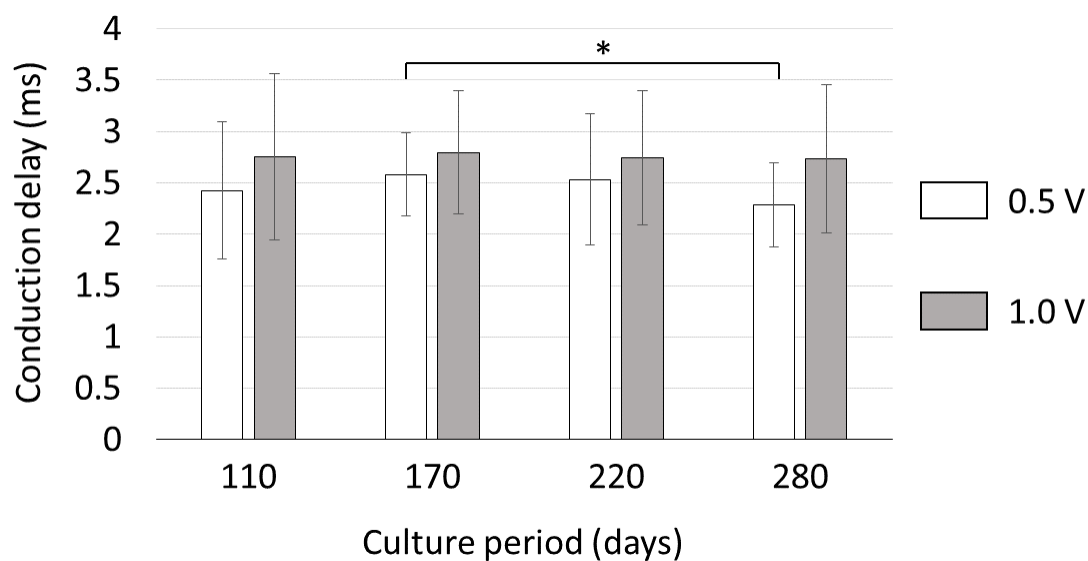


図 4-29 刺激電圧と伝導時間の関係. 0.5 V で刺激した場合, 1.0 V で刺激した場合と比較して, 伝導時間が短い傾向があった. また, 0.5 V で刺激した場合, 170 days after induction (DAI) における伝導時間が, 280 DAI と比較して有意に長かった. 一方, 1.0 V で刺激した場合, 培養日数によらず同程度の値をとった. *, $p < 0.05$; Mann-Whitney U test with Bonferroni correction; mean \pm SD.

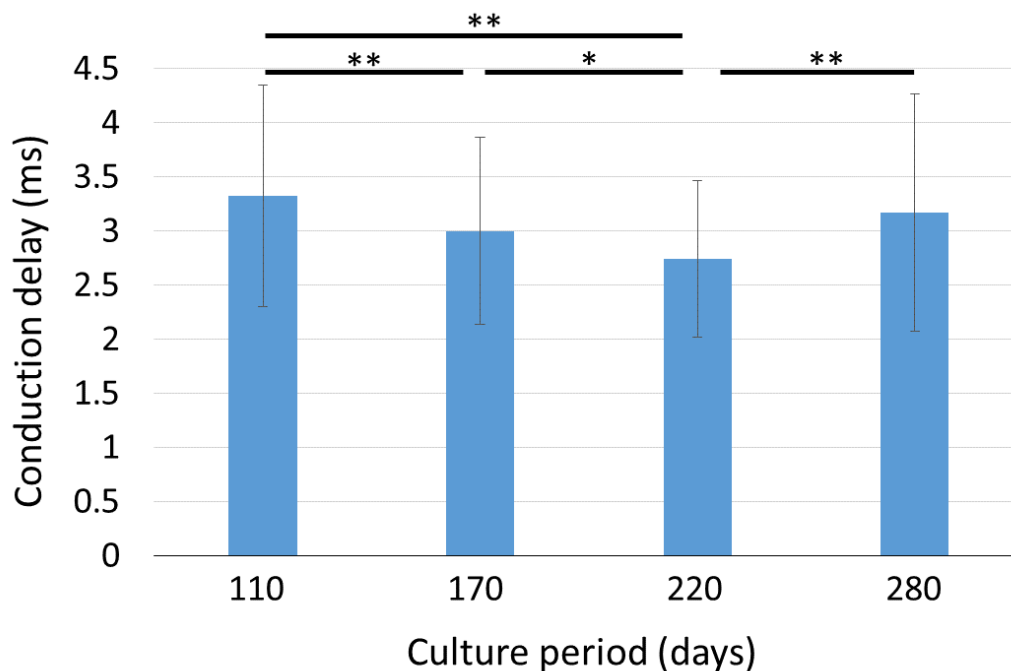


図 4-30 誘発応答の差分から検出した伝導時間. 220 日目が最も伝導に要する時間が短かった. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; Mann-Whitney U test with Bonferroni correction; mean \pm SD.

4-6 考察

4-6-1 軸索の伝導計測に微小トンネルを用いる利点

本研究では、軸索を伝導する活動を計測する目的で、微小トンネル内に配置した電極から活動計測を行った。一方、先行研究では、ガラスピペット電極や高密度 MEA が用いられている。以下に、それぞれの手法の概要を述べた後、本手法を用いるメリットについて述べる。

ガラスピペット電極を用いた計測手法は、ピペット内に軸索の一部を吸引する方法、および軸索にガラスピペット電極を接触させる方法がある。前者の手法では、脂溶性色素を用いて軸索を染色した後、顕微鏡下でピペットを近づけ、先端に軸索の一部を吸引して細胞外電位を計測する [Raastad 2003]。後者の手法では、最初に細胞体にパッチクランプ電極を刺入し、蛍光色素を細胞内に注入する。その後、蛍光顕微鏡下で、蛍光標識したガラスピペット電極を軸索に接触させ計測する [Sasaki 2012]。ガラスピペット電極を用いた手法の利点は、1本の軸索の信号を計測でき、データの信頼性が高い点である。一方、デメリットは、同時に複数の軸索から活動を計測できない点、およびガラスピペットの操作に高い技術が要求される点である。Sasaki らの論文では、安定した信号の計測には 2-3 ヶ月の練習が必要であり、熟練者で 1 日 4 本の軸索を計測できると記述されている [Sasaki 2012]。

高密度 MEA を用いた手法では、最初に、走査的に全体を刺激し、細胞体が存在する領域を特定する。その後、細胞体に複数回の刺激を印加し、刺激時刻を基準として信号を平均することでノイズを除去し、軸索の信号を検出する [Bakkum 2013]。メリットは、複数の細胞の信号を計測できる点である。また、軸索の複数の点から活動を計測できるため、細胞体側や先端側といった軸索の区画間における伝導速度の違いを評価できる。一方、デメリットは、個々の細胞を認識するためには低い細胞密度で培養する必要がある、高密度で培養した研究との比較が困難である点である。また、軸索を伝導する自発活動は SN 比が低いため、評価が困難である。

本研究で用いた微小トンネルを用いた手法には、3つの利点がある。1点目は、軸索の位置が計測電極および刺激電極上に固定される点である。したがって、ピペット電極の操作や走査的な刺激による細胞体の位置の同定が不要である。2点目は、同時に複数の軸索のシグナルを計測可能である点である。それぞれの微小トンネルからは複数の軸索のシグナルが計測されるため、スパイクソーティングを用いることで、同時に複数の軸索を評価できる。3点目は、軸索のシグナルを取得する際に電気刺激を印加する必要がない点である。微小トンネル内から計測されるシグナルは SN 比が高いことが報告されており [Pan 2014]、刺激時刻を基準としてシグナルを平均する必要が無く、自発活動の評価が可能である。一方、デメリットは、分別した個々の軸索の信頼性がスパイクソーティングの精度に強く依存する点である。また、電気刺激を印加する際は、複数の軸索を同時に発火させる点に注意する必要がある。以上より、本研究においては、自発活動の評価する場合はスパイクソーティングに高い精度が期待でき、電気刺激を印加する場合は個々の軸索のシグナルを計測する必要が無かったため、本手法が最適であると判断した。

4-6-2 計測された軸索の伝導速度

本項では、ring MEA および axon MEA を用いて計測した軸索の伝導速度を、先行研究で報告されている伝導速度と比較し、相違点について原因を考察する。

本研究では、マウスおよびラットの CX を培養し、軸索を伝導する活動を評価した。先行研究では、マウス大脳皮質神経細胞の無髄軸索の伝導速度は 0.3 m/s 程度であったと報告されている [Shlosberg 2008; Lewandowska 2015]。また、ラット海馬の顆粒細胞を用いた研究では、0.36 m/s と報告されている [Chida 2014]。本研究において、ring MEA を用いた自発活動計測では、伝導速度は 0.22 - 0.39 m/s となった。また、axon MEA を用いて E_{far} から刺激応答を計測した場合、伝導速度は 0.29 - 0.35 m/s となった。以上の 2 つの実験では、先行研究で計測された伝導速度と同様の値となった。一方、axon MEA を用いて自発活動を計測した場合は、 E_{near} と E_{far} の間で計測した場合は 0.45 - 2.0 m/s となった。また、刺激応答でも刺激電極と E_{near} の間では 0.11 - 0.14 m/s となった。刺激電極と E_{near} の間および E_{near} と E_{far} の間の伝導時間の和は平均値で 2.42 ms となり、刺激電極から E_{far} までの刺激応答の値である 2.62 ms に近い値となることから、計測区間によって異なった伝導時間が検出される可能性が示唆された。

計測区間によって伝導時間が異なる理由として、軸索が有する特性、ミエリン鞘が形成されていた可能性、および計測デバイスの特性の 3 点が考えられる。1 点目の軸索の特性については、500 μ m 程度の区間では軸索の伝導速度の変化率は 2 倍未満であることが報告されている [Bakkum 2013]。したがって、4 倍程度の変化率を示した本現象の原因である可能性は低いと考えられる。2 点目は、微小トンネル内のオリゴデンドロサイトがミエリン鞘を形成し、跳躍伝導が起こった可能性である。培養液に添加した B27 supplement は、細胞培養系におけるミエリン鞘形成に必要な因子である triiodothyronine を含んでいる [Pang 2012]。しかし、微小トンネル内に侵入した細胞の数は少なく、全体の平均値に影響を与える頻度でミエリン鞘が形成された可能性は低いと考えられる。3 点目は、計測デバイスの特性である。細胞外電位は、電極周囲に存在する信号源からの信号の重ね合わせである。簡易化のため微小トンネルの幅および高さを見捨て、長さ方向のみを考えた場合、微小トンネル端部に配置した電極と参照電極の間のインピーダンスは、一方が微小トンネルを経由した値であり、他方は通常の培養区画と同様の値となる。インピーダンスの違いは活動波形の振幅に影響を与えるため、端部の電極は微小トンネル側の信号の影響を強く受ける。シミュレーションを用いた研究では、微小トンネルの幅および高さや、電極と微小トンネル端部の間の距離に応じて波形が変化することが報告されている [Wang 2012]。以上から、微小トンネル内の電極の位置が計測される波形に影響を与え、伝導時間の違いとなって結果に現れたことが示唆される。上記 3 点の理由を踏まえると、デバイスの形状が計測結果に影響を与えた可能性が高いと考えられる。したがって、計測されたデータを取り扱う際は、異なるデバイス間での比較ではなく、同様の条件における相対値として比較を行うことが重要である。また、微小トンネル内の電極の配置について検討することが肝要である。電極配置の

検討には、実際に複数の電極を微小トンネル内に配置する実験および等価回路モデルを利用した数値シミュレーションを併用することが望ましい。

4-6-3 伝導時間の変化が発生する機序

本研究では、複数の軸索から計測したシグナルを個々のクラスタに分別することで、自発活動においても伝導時間の変化が起こることを示した。先行研究では電気刺激を用いて伝導時間の変化を起こしており [Bakkum 2013; Soleng 2003; Raastad 2003], 自発活動からの伝導時間の変化を計測した例は存在しなかった。本研究により、電気刺激が伝導時間の変化を誘発するための必要条件ではないことが示され、軸索における活動伝導の調節が生体内で神経細胞の自発発火により起こっている可能性が示唆された。

高頻度発火により自発活動の伝導時間が増加した理由として、以下の2つが挙げられる。1点目は、連続的な発火により細胞内の Na^+ 濃度が上昇し、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase が活性化することである。 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase は、1回毎に3個の Na^+ を細胞外に、2個の K^+ を細胞内に輸送する。したがって、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase が強く活性化されると膜電位が過分極する。軸索の膜電位の過分極により伝導速度が低下することは、先行研究において議論されており [Chida 2014; Raastad 2003], 本研究でも同様の機序により伝導時間の増加が起こった可能性が高いと考えられる。

2点目は、微小トンネルを用いたことによる影響である。微小トンネル内には多くの軸索が伸長しているため、同期バーストにおいて複数の軸索を同時に活動が伝導すると、細胞外 K^+ 濃度が上昇することが考えられる。細胞外 K^+ 濃度の上昇は、 Na^+ チャネルの不活性化を引き起こすため、伝導に寄与する Na^+ チャネルの密度の低下が伝導速度の低下を引き起こした可能性がある。また、低濃度での tetrodotoxin (TTX) 添加により Na^+ チャネルを阻害すると伝導速度が低下することが報告されており、 Na^+ チャネルの密度が伝導速度の維持に重要であることが示唆されている [Chida 2014]。しかし、以下の理由から、中枢神経系の神経細胞の伝導時間の変化には、細胞外 K^+ 濃度の上昇による寄与は少ないと考えられる。細胞外 K^+ 濃度の上昇による不活性化が強く引き起こされるチャネルは、Nav1.8 に代表される slow-inactivating Na^+ チャネルであることが知られている [De Col 2008; De Col 2012]。また、末梢神経系の神経細胞が発現する Na^+ チャネルは slow-inactivating Na^+ チャネルが支配的であるが、中枢神経系の神経細胞は Nav1.2, Nav1.3 および Nav1.6 といった fast-inactivating Na^+ チャネルが支配的であることが報告されている [Trimmer 2004]。以上から、微小トンネルの構造により細胞外 K^+ 濃度の上昇が起きたと仮定しても、fast-inactivating Na^+ チャネルが支配的である中枢神経系の神経細胞の伝導時間には大きな影響を与えなかった可能性が高い。

以上より、本研究において自発的なバースト活動により引き起こされた伝導時間の増加は、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase の活性化による軸索の膜電位の過分極が原因であると考えられる。検

証には、細胞膜の過分極を補償する働きを持つ h 電流の阻害剤である ZD7288 を用いた実験が適している。

4-6-4 誘発応答の信号源

axon MEA の微小トンネル内に伸長した軸索に様々な電圧の刺激を印加したところ、誘発応答の波形は三相性の形状を有した。また、刺激の電圧が増加するにつれ、信号が検出される割合が上昇し、振幅の絶対値が上昇した。さらに、刺激した電圧間で応答波形の差分を計算すると、三相性を有するスパイク状の波形が観察された。通常、単一の神経細胞の活動電位は悉無律に従い、刺激強度を上昇させても活動電位の形状は変化しない。細胞外電位の形状は細胞内電位によって決まるため [Matthews 1991]、活動電位の形状が変化しない限り細胞外電位の形状も変化しない。したがって、本研究で刺激電圧に応じて誘発応答の形状が変化した理由は、計測した波形が、微小トンネル内に伸長した複数の軸索の誘発応答の重ね合わせであったためであると考えられる。誘発応答の振幅の上昇は、刺激電圧の増加に伴い応答する軸索の数が増えたことで説明できる。また、刺激電圧間で誘発応答の差分を計算した際に、ピーク時刻の異なる三相性の波形が観察されたことも、上記の理由を支持する。以上より、axon MEA を用いた電気刺激の実験では、複数の軸索の誘発応答が加算された信号を計測したことが示唆された。

4-6-5 刺激からの回復に要する時間

本研究では、100 Hz で 200 回の刺激を行った場合、刺激の影響からの回復に 50 s を要するという結果を得た。誘発応答と自発活動を単純に比較することは困難であるが、高頻度発火からの回復時間は、自発活動の場合は同期バースト間の間隔である IBI に相当する。先行研究では、IBI が数秒から 30 秒程度の値となることが示されている [Wagenaar 2006; Chiappalone 2006]。先行研究の IBI と比較して、今回の結果が大きな値となったのは、刺激頻度および回数が通常の同期バーストと比較して大きいことが原因であると考えられる。今後、刺激頻度や刺激回数を変化させながら、網羅的に実験を行うことで、より生理学的な条件に近い回復時間の評価が可能である。

4-6-6 高頻度刺激における振幅の変化

10 Hz 以上の頻度で連続刺激を印加したところ、刺激に伴い応答の波形の振幅が小さくなる傾向が観察された。また、5 Hz の刺激を印加した際は、振幅の変化はほとんど見られず、伝導時間の増加のみが観察された。一方、2 Hz の頻度で刺激したところ、刺激後に振幅が上昇する傾向が見られた。本項では、刺激により振幅の変化が発生した機序について考察する。

先行研究において、連続的な電気刺激を行い、ガラスピペット電極を用いて単一の軸索から計測を行った場合、振幅の変化ではなく、悉無律に従い活動の伝導が起らない現象である **conduction failure** が生じることが報告されている [Raastad 2003]。したがって、前項での議論を踏まえると、振幅の減少は、単一の微小トンネルから複数の軸索の誘発応答を計測したことが原因であることが示唆される。特に、理由として、以下の 2 つの現象が挙げられる。1 つ目は、個々の軸索の特性にばらつきがあることである。軸索の伝導に影響を与えるパラメータである軸索の直径やイオンチャネルの密度や分布は軸索毎にばらつきがあり [Firmin 2014; Zeng 2009; Nusser 2009]、活動の伝導時間や刺激に対する応答性にも軸索毎にばらつきがあると考えられる。つまり、同じ頻度の刺激が印加されたとしても、軸索毎に伝導時間の変化過程には違いがあると考えられる。軸索毎に異なる伝導時間の変化過程は、個々の軸索における誘発応答の波形のばらつきを生じさせることが予想される。

2 つ目は、前述の **conduction failure** の影響である。特に高頻度の刺激を印加した際に起こることが知られており、ZD7288 の添加により h 電流を阻害すると発生率が上昇することも報告されている [Soleng 2003]。以上の特性は、本研究において、Control の条件では 10 Hz 以上で刺激した際に顕著な振幅の低下が起こったことや、ZD7288 を添加した際に顕著な振幅の減少が観察されたことと一致する。以上より、波形のばらつきおよび **conduction failure** の影響が重なり、波形の振幅が低下したことが示唆された。

2 Hz での刺激時に振幅が上昇傾向を示した。Sasaki らは、アストロサイト放出したグルタミン酸が軸索の AMPA 型受容体に作用することにより、軸索における活動電位の幅が広がることを示した [Sasaki 2011]。複数の軸索において活動電位の幅が広がることは、重ね合わせた波形の振幅を上昇させると考えられる。微小トンネル内には複数の軸索が伸長していたため、刺激によって軸索終末から放出されたグルタミン酸が他の軸索の AMPA 型受容体に結合する可能性は存在すると考えられる。以上より、低頻度の刺激による振幅の上昇は、グルタミン酸が軸索の AMPA 型受容体に結合した影響であることが示唆された。今後、AMPA 型受容体の阻害剤である 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) の存在下で同様の実験を行うことで、AMPA 型受容体を介した影響を評価できると考えられる。

4-6-7 刺激頻度依存性の伝導時間の増加

様々な頻度で 200 回の刺激を印加し伝導時間を計測したところ、伝導時間の変化率は刺激の頻度に依存して変化した。また、刺激頻度が上昇すると単純に変化率が上昇する訳ではなく、75 番目までの刺激において、20 Hz で刺激をした際の伝導の変化率は、低い頻度で刺激した場合と比較して小さかった。考えられる理由の 1 つに、h 電流が流れ始めたタイミングが挙げられる。一般に、h 電流を通すイオンチャネルである HCN チャネルは、膜電位が過分極した際に開口する。また、刺激頻度が高い方が効果的に細胞膜の過分極を引き起こす。したがって、刺激の頻度が異なると HCN チャネルが開口するタイミングが異なることが予想される。以上から、20 Hz の刺激では、低頻度の刺激と比較して h 電流が早いタイミングで発生し、軸索の伝導時間の変化を打ち消していたことが示唆される。加えて、ZD7288 を用いて h 電流を阻害した際に、20 Hz での変化率が低い現象が観察されなかったことも、本説明を支持する。一方、h 電流を阻害すると刺激の影響が顕著に現れるため、実際は h 電流ではない理由で本現象が起きていたにも関わらず、相対的に大きな変化によって打ち消された可能性も否定できない。今後、Na⁺チャネル、K⁺チャネルおよび Na⁺-K⁺ ATPase といった伝導時間への寄与が大きいタンパク質に対する薬理操作を行うことで、本現象の発生機序が評価できると考えられる。

4-6-8 自発的な変化と刺激による影響の関係

自発的な伝導時間変化率と、同様の刺激をした際に想定される推定変化率を比較した。結果、5 DIV においては自発的な変化の方が大きかったが、10 DIV 以降は推定変化率の方が大きくなった。本結果は、発達過程において伝導時間変化率の低下が起こることを示唆する。自発活動による変化のみを指標とした場合、培養日数の経過に伴いバースト活動内における発火頻度およびスパイク数が低下したため、伝導時間の変化率の低下が、発達に依存するか活動が変化したことに依存するかは明らかでなかった。以上から、自発的な変化と刺激のデータを組み合わせることが有効であると考えられる。また、刺激のデータは一ヶ月以上培養した試料を用いて計測しており、神経細胞の状態は十分に発達していたと考えられる。推定変化率に対する自発的な変化率を算出した場合に、15 DAI および 20 DAI において値が 1 となったことは、軸索の伝導時間変化率に影響を与える細胞内の変化が 15 DAI には終了することを示唆する。今後、発達に伴う細胞内のタンパク質の発現過程と伝導時間変化率の変化過程を比較することで、伝導時間変化率を指標とした際に、神経細胞内のどのタンパク質の発現量を間接的に評価できるかが明らかになると考えられる。

4-6-9 活動伝導を指標とした分化誘導神経細胞の評価の可能性

axon MEA を用いて, hiPS-neuron のバースト活動前後での伝導時間の変化を評価した. 結果, バースト活動後に伝導時間が上昇する傾向が示された. また, 電気刺激を用いて hiPS-neuron の軸索の伝導時間を評価したところ, 培養日数により伝導時間が変化した. 本結果は, axon MEA を用いることで, 第 3 章において述べた神経回路網レベルでの発達過程に加えて, 軸索における伝導を指標として軸索に発現したイオンチャネルの特性を評価できることを示唆している. 本項では, 中枢神経系の神経細胞の軸索に発現するタンパク質のうち発達過程に発現量が変化するものを例に挙げ, axon MEA を用いた伝導計測による発達過程の評価の可能性について述べる.

ラット嗅内皮質の神経細胞は, シナプス前部に HCN チャネルを構成するタンパク質の一種である HCN1 を発現し, 成熟に伴い発現量を減少させることが知られている [Bender 2007]. 前述の通り, HCN チャネルを流れる電流である h 電流は, 高頻度の発火による過分極を抑制する働きを持つ. したがって, HCN1 の発現量が低下すると, 高頻度の発火により過分極が起こりやすくなると考えられる. そこで, hiPS-neuron の発達過程において, 連続刺激による伝導時間の増加率と軸索における HCN1 の発現量の関係性を評価できれば, 神経細胞の活動を指標とした hiPS-neuron の発達過程の評価手法の構築に貢献できると考えられる.

4-6-10 生体内における h 電流の役割とスパイクタイミングの重要性

h 電流には軸索における過度の過分極を抑制する働きがあるため, 神経回路網の情報処理においても重要な役割を果たしていることが報告されている. 本項では, 生体内における h 電流の役割と, 神経細胞において軸索を伝導する活動電位の伝導速度が重要となる例について述べる. 神経細胞が高頻度に発火すると, 軸索の細胞膜が過分極し, 軸索における伝導が途中で止まる **conduction failure** と呼ばれる現象が起こることが知られている [Debanne 2004]. 軸索における h 電流は, **conduction failure** の発生を抑制する働きを有することが知られており [Soleng 2003], 生体内においても, 伝導の信頼性を高める役割を果たすと考えられる. また, 神経細胞の発火タイミングが重要となることも数多く報告されている [Goel 2014]. 聴覚野においては, 音の高さの選択性に加えて, 2 つの音のインターバルに応じて反応する神経細胞が存在することが知られている [Sadagopan 2009]. 上記の神経細胞では, 2 つの入力のタイミングが重要であり, シナプス前ニューロンの伝導速度が一定であることが肝要であると考えられる.

4-6-11 設定した要件の達成度

本章で設定した要求仕様は、タンパク質の発現が反映された情報を計測できること、長期間にわたり安定して計測できること、および遺伝子改変を行う必要がないことである。

1点目は、タンパク質の発現が反映された情報を計測できることである。本章では、微小トンネル内に伸長した軸索の伝導時間を評価指標とした。自発的な活動による伝導時間の変化を評価した結果、自発活動により伝導時間が変化すること、および培養日数の経過により変化率が低下することを示した。続いて、刺激による伝導時間の変化を評価し、刺激頻度に依存して変化すること、および HCN チャネルを流れる h 電流が変化を抑制する働きを持つことを示した。さらに、自発活動と刺激のデータから、自発活動において観察された、培養日数の経過に伴う伝導時間変化率の低下が、単に活動パターンが変化したことによらないことを示した。以上から、軸索における伝導時間のデータは、HCN チャネルの発現に関する情報を有すること、および発達に依存した変化を抽出可能であることが示された。したがって、本章の要件である、タンパク質の発現が反映された情報を取得できることが、達成されたと考えられる。

2点目は、長期間にわたり安定して計測できることである。第3章において示した通り、MEA と PDMS 構造物を組み合わせ、微小トンネルに伸長した軸索から活動を計測するという手法は、発達過程を評価するために十分な安定性を有した。したがって、長期間にわたる計測の安定性という要件は、満たされたと考えられる。

3点目は、遺伝子改変を行う必要がないことである。本章で用いた hiPS-neuron および初代培養細胞に対しては、発達過程を評価するための遺伝子改変を行っていない。一方、本手法を用いることで、発達に伴う変化を検出できた。以上は、要件である遺伝子改変を行う必要がないことを満たしていることを示す。

以上から、設定した全ての要件を満たした計測手法が開発できたと考えられる。今後、評価指標の選定、伝導時間の変化に関係するタンパク質の種類、および発現量の変化と伝導時間変化率の関係を詳細に明らかにすることが重要である。

4-6-12 本研究で得られた結果の新規性

本項では、本章で得られた結果が有する 4 点の新規性について述べる。

1 点目は、自発的な高頻度発火により伝導時間の変化が誘発されることを示した点である。先行研究では、電気刺激により伝導時間の変化を誘発していた [Soleng 2003]。一方、本章では、微小トンネル構造の利用と、スパイクソーティング手法の改良により、個々の軸索における伝導の抽出に成功した。手法の改良により発火パターンと伝導時間の対応がついたことで、自発的な活動による伝導時間の変化を示した。

2 点目は、伝導時間変化率の刺激頻度依存性を示した点である。本章では、20 Hz で刺激した際に、10 回目および 20 回目の刺激による伝導時間の変化率が、5 Hz で刺激した場合と比較して小さいという結果を得た。また、h 電流の阻害剤を添加することにより、刺激頻度依存性が観測されなくなることから、本現象における h 電流の寄与を示した。以上の結果は、神経細胞の情報伝達に適した発火頻度が存在することを示唆している。

3 点目は、自発的な伝導時間の変化と、刺激により誘発された変化を比較し、培養日数の経過による伝導時間変化率の低下が発達によることを示した点である。自発活動のみのデータでは、伝導時間変化率の低下が、発達による変化であるか、活動パターンが変化したことによるかの判断は困難であった。しかし、刺激により誘発された伝導時間変化率と比較することにより、培養日数が最も短い 5 DIV のデータのみ、刺激により誘発された変化と比較して自発的な変化が大きいことを示した。以上は、伝導時間の計測により、神経細胞の発達過程を評価できる可能性を示す。

4 点目は、hiPS-neuron の軸索から活動計測を行い、発達により伝導時間が変化する可能性を示した点である。これまで伝導の計測は、マウスやラットの初代培養細胞のみから行われてきた。ヒト細胞においても、同様の手法が有効であることを示したのは、本研究が初めての報告である。

4-7 まとめ

本章では、PSC-neuron の細胞内機能発現の過程を長期的に取得できる手法の開発を目的とし、活動パターンに依存した神経細胞内における信号伝播の変化を評価した。以下に、自発的なバースト活動に応じた伝導時間の変化の評価、電気刺激を用いた軸索における伝導時間変化の刺激頻度依存性の評価、自発的な伝導変化率と刺激により想定される推定変化率の比較、および hiPS-neuron の軸索を伝導する活動の検出を行ったことによって得られた知見をまとめる。

自発活動から軸索を伝導する活動を検出し、バースト活動による伝導時間の変化を評価したところ、バースト活動に応じて軸索の伝導時間が増加することが示された。また、伝導時間の変化率は、培養日数に応じて変化した。

軸索に対して連続的な電気刺激を印加したところ、刺激に応じて伝導時間が増加した。h 電流を阻害した条件では、伝導時間の増加率が高い傾向が観察された。また、100 Hz の頻度で 200 回刺激した場合には、刺激の影響から回復するまでに 50 秒を要した。次に、様々な頻度で刺激を印加した結果、20 Hz で刺激した際に、75 番目の刺激までは低い頻度で刺激した場合と比較して伝導時間の変化が小さいという結果が得られた。また、上記の刺激頻度依存性は、h 電流の阻害によって観測されなくなった。

自発的なバースト活動による伝導時間の変化率と、同様の刺激を印加した際に想定される推定伝導時間変化率を比較した。結果、5 DIV においては自発的な変化率の方が高いものの、10 DIV 以降は刺激による推定変化率の方が高いことが示された。また、推定値に対する自発的な変化率の比は、15 DIV および 20 DIV では 1 となり、15 DIV 以降は刺激と自発の変化率が同様の値をとることが示された。

hiPS-neuron においても、自発活動から軸索における伝導を検出できた。バースト活動における伝導時間の変化を評価したところ、伝導時間が増加する傾向が観察された。また、電気刺激を用いることで、1 本の微小トンネルから複数の軸索の情報を取得できることが示された。さらに、hiPS-neuron の軸索の伝導時間が、発達に伴い変化することが示唆された。

以上の結果より、本章の目的である、PSC-neuron の細胞内機能発現の過程を長期的に取得できる手法の開発が達成されたと考えられる。今後、本手法を用いて計測された指標が、細胞内のどのタンパク質の情報を有するかについての評価を行うことで、細胞内機能発現の評価が可能になる。

第 5 章

神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築

5-1 緒言

本章では、神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築を目的とし、PSC-neuron による神経回路網と初代培養神経回路網間の結合形成に伴う同期活動の変化を評価する。神経系細胞の移植を模擬した実験系の要求仕様は、長期的に計測できること、移植細胞とホスト細胞の活動を区別して計測できること、および結合過程を定量的に評価できることの 3 点であると考えられる。

長期的に計測できることについては、第 3 章において述べた通りである。

移植細胞とホスト細胞の活動を区別して計測できるという仕様については、マイクロ加工技術を用いて 2 箇所の培養区画を有する PDMS 構造物により満たすことができる。Takayama らは、2 種類の神経細胞を独立した区画内で培養可能なチャンバを開発し、PSC-neuron と初代培養神経細胞がそれぞれ形成した神経回路網が、同期して活動したことを報告した [Takayama 2011]。第 4 章で作製した ring MEA を用いてリング型 PDMS 構造物の内側および外側で、それぞれ PSC-neuron および生体由来神経細胞を培養することにより、移植細胞とホスト細胞を混在させずに共培養できる。また、微小トンネル内に伸長した軸索を伝導する活動を評価することにより、伝導の方向から細胞種を特定できると考えられる。

結合過程を定量的に評価できることについては、第 4 章において構築した手法を用いることで解決可能である。スパイクソーティングにより、神経回路網間を結ぶ個々の軸索を示すクラスタが検出できるため、発達過程における軸索の本数の変化を可視化できると考えられる。また、軸索を伝導する活動は、神経回路網間を流れる信号に対応すると考えられ、神経回路網間の相互作用も評価できる。

本章では、PSC-neuron による神経回路網と初代培養神経回路網間の結合形成に伴う同期活動の変化を評価することを目的とし、以下の実験を行った。最初に、P19 胚性腫瘍細胞由来の神経細胞 (P19-neuron) およびマウス CX を、それぞれ ring MEA の内側および外側の培養区画で培養し、結合の形成過程および同期活動の変化を評価する。ここで、PSC-neuron のモデルとして P19-neuron を用いた理由は、Takayama らの先行研究と同様の培養細胞を用いることで [Takayama 2012]、手法の優位性に関する評価が行いやすくなるためである。次に、P19-neuron の代わりに、miPS-neuron を内側の区画に培養し、miPS-neuron と CX の共培養実験においても、本手法が適用可能であることを示す。

5-2 P19 細胞の基本的性質

本項では、P19 細胞の基本的な性質についてまとめる。最初に、P19 細胞の性質について述べた後、P19-neuron の性質について述べる。

P19 細胞は、McBurney らによって樹立された細胞株である。C3H/HeHa マウスの 7 日胚をオスのマウスの精巣に移植し、形成された奇形腫からクローニング技術を用いて樹立された [McBurney 1982]。維持培養において Feeder 細胞上で培養する必要がない。また、マウス ES 細胞やマウス iPS 細胞と異なり、未分化状態の維持に LIF の添加が必要ないという特徴を持つ。さらに、P19 細胞を浮遊培養することで EB が形成され、RA を含む培養液で EB を分化誘導すると神経細胞に [Jones-Villeneuve 1982]、DMSO を含む培養液で分化誘導すると心筋細胞や骨格筋細胞に分化する [Edwards 1983]。以上の特性から、取り扱いが容易であり、効率良く神経細胞に分化するため、神経分化のモデル細胞として広く用いられている。

P19-neuron は、以下の理由から中枢神経細胞としての特徴を有すると考えられている。1 つ目は、P19 細胞を分化誘導すると、一部が中枢神経系を構成する細胞であるオリゴデンドロサイトに分化的ることである [Staines 1996]。2 つ目は、自発活動を示し、P19-neuron から形成された神経回路網が、初代培養の中枢神経系の神経細胞に近い活動パターンを示すことである [Takayama 2011]。以上から、P19-neuron は中枢神経系の神経細胞のモデル細胞として用いられている。また、P19-neuron をラットの線条体に移植したところ、機能的に成熟し、げっ歯類の脳皮質や海馬の錐体細胞と同様の特徴を示したことも報告されている [Magnuson 1994]。

5-3 実験手法

5-3-1 微細加工

大脳皮質神経細胞と分化誘導細胞を共培養するために、第 4 章において説明した ring MEA を用いた。共培養実験の概要を図 5-1 に示す。用いたデバイスの構造および作製方法は、それぞれ第 4 章および第 3 章において説明した通りである。

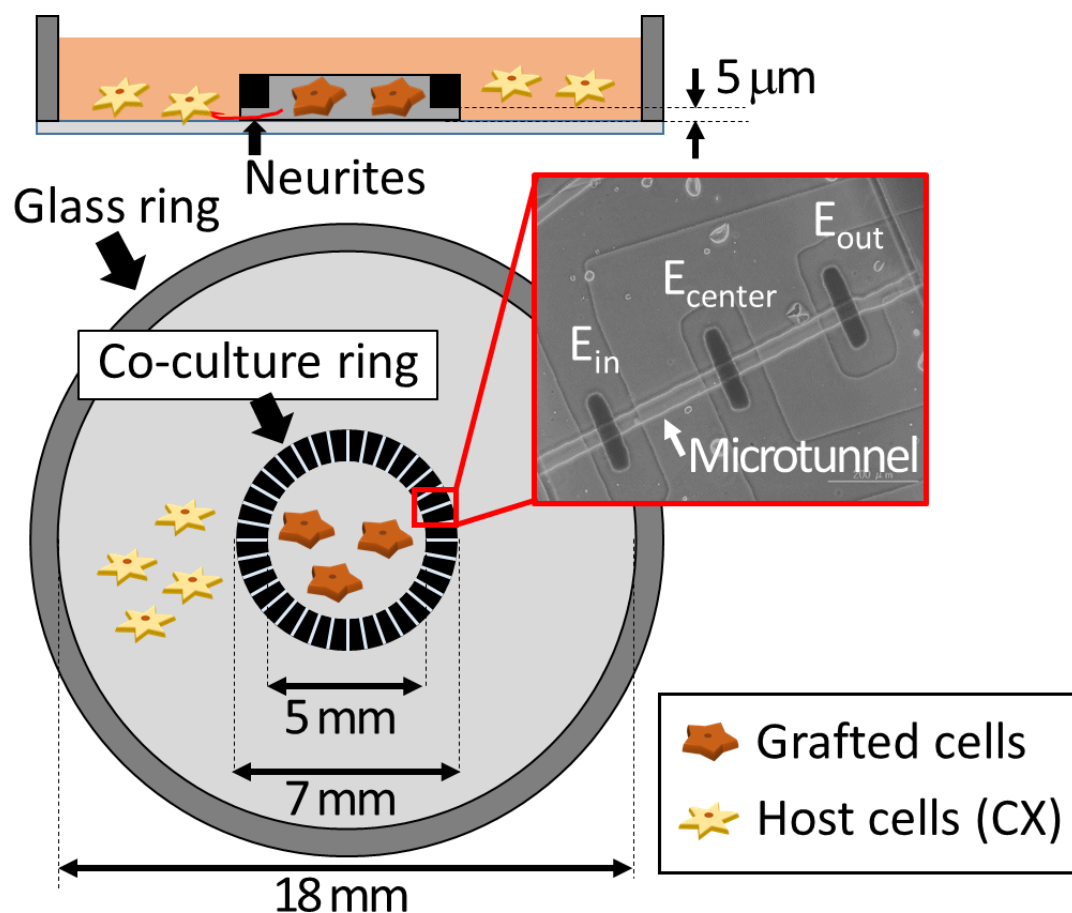


図 5-1 共培養系の概要 [Shimba 2015b 改変]。リング状の PDMS 構造物の内側および外側に、それぞれ移植細胞を模した幹細胞由来神経細胞およびホスト細胞を模したマウス CX を培養する。両区画は微小トンネルによりつながっており、それぞれの細胞が軸索を投射できる。18 本の微小トンネルには、電極を 3 点ずつ配置した。

5-3-2 細胞培養

本章では，マウス大脳皮質神経細胞，P19 細胞，およびマウス iPS 細胞を用いた．以下に，用いた培養液の組成およびそれぞれの細胞の培養方法を述べる．なお，本章では，培養日数を，共培養開始日を基準として **days in co-culture (DIC)** で示す．また，図 5-2 に，培養液，細胞播種のタイミングおよび細胞の形状を示す．

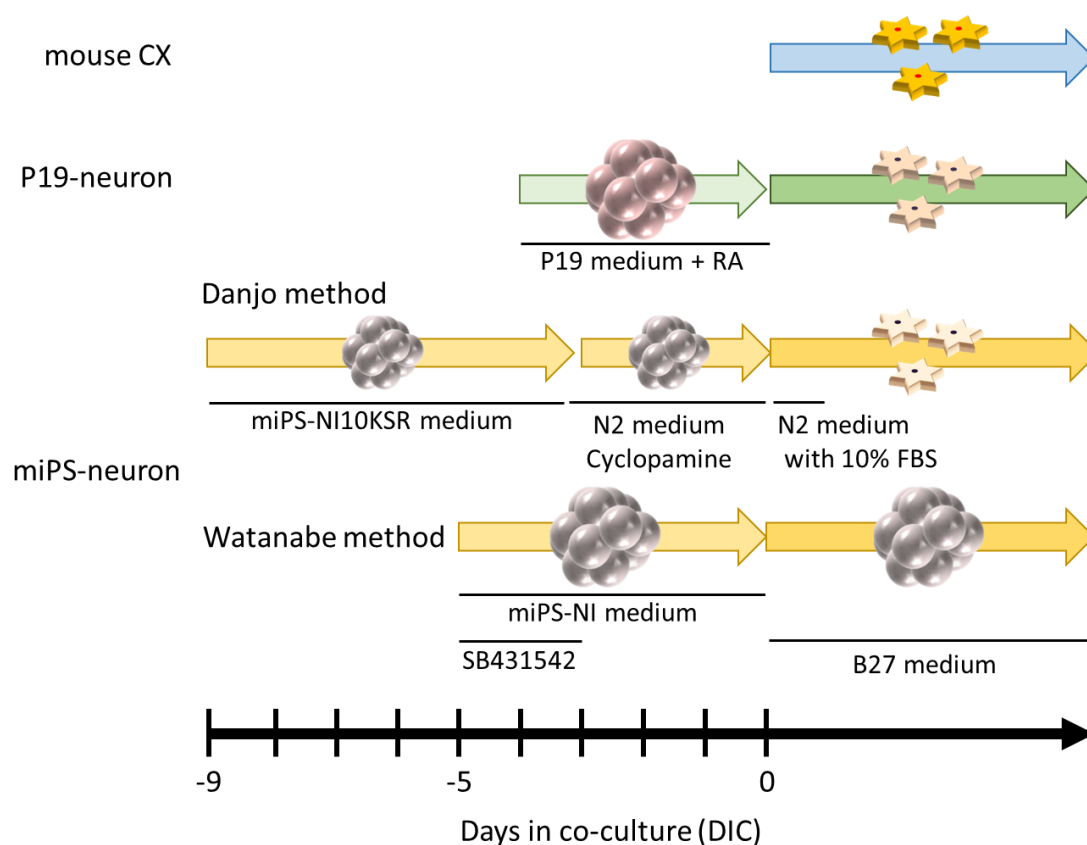


図 5-2 共培養実験の概要．P19-neuron は，単離した状態で播種した．Danjo らの手法で分化誘導した miPS-neuron [Danjo 2011] は，凝集塊の状態で浮遊培養した後に，単離して播種した．Watanabe らの手法で分化誘導した miPS-neuron [Watanabe 2005] は，凝集塊の状態で播種した．全ての条件で，マウス CX を播種した日を共培養開始日とした．RA, retinoic acid.

培養液の組成

- P19 細胞用培地 (P19 medium)

Alpha minimum essential medium (Life Technologies)

+ 10% v/v FBS

1% pe-st

- マウス iPS 細胞維持培地 (miPS medium)

DMEM

+ 15% v/v FBS

1% NEAA

0.1 mM 2-ME

0.1% v/v LIF (Wako)

- マウス iPS 細胞用神経分化誘導培地 (miPS-NI medium)

Glasgow Minimum Essential Medium

+ 5% v/v KSR

2mM GlutaMAX

1 mM sodium pyruvate (Life Technologies)

0.1 mM NEAA

0.1 mM 2-ME

- マウス iPS 細胞様神経分化誘導培地 10%KSR (miPS-NI10KSR)

miPS-NI medium の KSR の比率を 10% v/v とした.

- マウス iPS 細胞用神経分化誘導培地 N2 添加 (miPS-NI with N2 medium)

miPS-NI medium に, KSR の代わりに×1 N2 supplement を添加した.

マウス大脳皮質神経細胞

4 章において説明した方法を用いて、大脳皮質組織の採取および単離を行い、ring MEA の外側の培養区画に 5.0×10^3 cells/mm² の細胞密度で播種した。培養液には B27 medium を用いた。

P19 細胞

多能性幹細胞のモデル細胞として、P19 細胞を用いた。P19 細胞は、P19 medium を用いて T-25 culture flask (BD) 内で培養し、2 日毎に継代操作を行った。継代の際は、PBS を用いて 1 回洗浄した後、0.25% trypsin-EDTA を加え、インキュベータで 3 分間静置した。P19 medium を加え酵素の反応を停止させた後、新しい culture flask に、 2.0×10^5 cells だけ播種した。分化誘導を行う際は、継代操作と同様の手順で懸濁液を調整した後、 $1.0 \mu\text{M}$ all-trans RA (Sigma) を添加した P19 medium を用いて、 1.0×10^5 cells/ml で 4 日間浮遊培養した。浮遊培養の際は、直径 100 mm のバクテリア培養用 dish (BD) を用いた。4 日後、形成された EB を回収し、0.25% trypsin-EDTA を 37°C で 3 分間作用させた後にピペッティングを行うことで単離した。単離後、 5.0×10^3 cells/mm² の細胞密度で ring MEA の内側の培養区画に播種した。

マウス iPS 細胞の培養方法

マウス iPS 細胞は、理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けた iPS-Stm-FB/gfp-99-1 株を用いた。本株は、Okita らによってマウス胃上皮細胞からプラスミドベクターを用いて樹立された株であり、恒常的に GFP を発現することが特徴である [Okita 2008]。以下に、マウス iPS 細胞の維持培養および分化誘導の手順を述べる。

マウス iPS 細胞は、 8.0×10^5 cells/dish で Feeder 細胞を播種した 60 mm dish 内で、維持培養した。培養液には miPS medium を用い、2 日毎に継代操作を行った。継代操作の際は、最初に PBS を用いて 1 回洗浄した後、0.25% trypsin-EDTA を加え、37°C で 90 秒間作用させた。10 ml の miPS medium を加え酵素を停止させた後、 8.0×10^5 cells/dish で、あらかじめ Feeder 細胞を培養しておいた 60 mm dish に播種した。また、播種 1 日後には培養液を全量交換した。

分化誘導は、播種する際の形態に合わせて、2 種類の手法を用いた。1 つ目の手法は、Danjo らの手法を一部改変した方法である [Danjo 2011]。継代時と同様の手順で細胞を回収した後、浮遊培養用の U 底 96 穴プレート (住友ベークライト) に、1 ウェルあたり 5.0×10^3 cells を、80 μl の miPS-NI10KSR medium に懸濁して播種した。分化誘導開始後 3 日目に、それぞれのウェルに 80 μl ずつの miPS-NI10KSR medium を追加した。分化誘導開始後 6 日目に、凝集塊の形状のまま、 $5 \mu\text{M}$ cyc を添加した N2 medium で懸濁し、バク

テリア用培養皿に移した。分化誘導 9 日目に凝集塊を回収し、accutase で 20 分間および 0.25% trypsin EDTA で 3 分間の酵素処理により単離した。単離した細胞は、 1.0×10^3 cells/mm² の細胞密度で ring MEA の内側の培養区画に播種した。1 DIC までは、内側の培養区画内の培養液を、10% FBS を添加した N2 medium とした。2 DIC 以降は、外側の培養区画と同様に、B27 medium を用いて培養した。

2 つ目の手法は、Watanabe らの手法を一部改変した方法である [Watanabe 2005]。継代操作と同様の手順で懸濁液を調製し、 5.0×10^4 cells/ml の細胞密度でバクテリア用培養皿に播種し、EB を形成させた。培養液には、miPS-NI medium を用いて、分化誘導開始後 2 日目および 4 日目に培地交換を行った。分化誘導 5 日目に、EB の状態のまま、培養皿および ring MEA の内側の培養区画に播種した。

5-3-3 染色方法

免疫組織化学染色および AP 染色は、第 2 章において述べた手法を用いて行った。また、第 5 章で免疫組織化学染色に用いた一次抗体のリストを表 5-1 に示す。

表 5-1 第 5 章で用いた一次抗体

Name	Expression	Isotype	Dilution	Source
Beta 3 Tubulin (B3T)	Neural cytoskeleton	Mouse IgG	1:500	Sigma
B3T	Neural cytoskeleton	Rabbit IgG	1:500	Abcam
Microtubule associated protein 2 (MAP2)	Neural soma and dendrite	Mouse IgG	1:500	Abcam
Synapsin I (SYN)	Synaptic vesicle	Rabbit IgG	1:1000	Abcam

5-3-4 Calcein 染色

各区画に培養した神経細胞の軸索が微小トンネル内を通過したことを確認するために、calcein AM を用いて、各区画内の細胞を特異的に染色した。以下に、染色方法、および特異的な染色ができたことの確認方法について述べる。

片方の区画内の培養液を、5 μ M calcein AM (Dojindo) および 5 μ g/ml Hoechst 33342 を含む PBS で置換し、インキュベータ内で 15 分間静置した。染色時、calcein を含む区画の液面を、他方の区画の液面より低くすることで、calcein および Hoechst が区画内から流出することを防止した。次に、37°C に加温した HEPES Buffer で 3 回洗浄した。さらに、細胞内エステラーゼにより calcein AM を加水分解する目的で、インキュベータで 15 分間静置した。加水分解により AM 基が外れた calcein は、細胞膜を通過しにくくなり、励起光に

より蛍光を発する状態となる．蛍光画像の取得は，第 2 章に示した装置および設定で行った．

染色時に calcein AM が微小トンネルを介して他方の区画に流出しなかったことを確認するために，Hoechst を用いた核染色を同時に行った．流出が起こらなかった場合，calcein AM および Hoechst を添加した区画の細胞核のみが染色される．そこで，Hoechst 陽性の画素数を各区画について評価した．PDMS の 3 次元構造により，励起光が照射される強さにばらつきが生じる可能性がある．そこで，画像内のそれぞれの画素の輝度値から，全画素の中央値を引き，画像間での輝度値のばらつきを補正した．次に，Hoechst 陽性の画素を検出するために，補正後の全画像の輝度から Otsu 法を用いて閾値を決定した．以上の全ての操作は，MATLAB (Math Works) を用いて行った．各条件について，1 つの PDMS 構造物から 5 視野の画像を取得し，比較を行った．また，神経突起の伸長を評価する際は，各条件について，2 つの PDMS 構造物の 72 本全ての微小トンネルを観察した．

5-3-5 GFP の観察

第 2 章の免疫組織化学染色の手法において述べた装置を用いて GFP の蛍光画像を取得した．なお，未分化状態のマウス iPS 細胞を観察する際は，細胞核を可視化する目的で，5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 を細胞内にロードした．Hoechst をロードする際の条件は，前述の通りである．

5-3-6 活動計測と解析手法

第 3 章および第 4 章において述べた手法を用いて活動計測および軸索における伝導の検出を行った．サンプリング周波数は 50 kHz とした．P19-neuron を用いた実験については 5 DIC から 3 日おきに，miPS-neuron を用いた実験については 5 DIC から 5 日おきに自発活動を計測した．

同期バースト検出には，3 章において述べた手法に，計測したデバイスの形状に応じた調整を加えた手法を用いた．なお，本手法は van Pelt らおよび Ham らの手法を基にした [van Pelt 2004; Ham 2008]．先行研究では，1 mm 四方の領域に電極が配置されていたのに対して，本研究では直径 7 mm の領域に電極を配置しており，電極の密度を考慮してビン幅および閾値を変更した．最初に，有効なクラスタに含まれるスパイクを 40 ms のビンに区切り，ビン毎にスパイク数と電極数の積で定義される product を算出した．product が閾値として設定した 9 を超えた場合に同期バーストを検出した．同期バーストの開始時刻および終了時刻はビン内にスパイクがなかった時点とした．また，間隔が 200 ms 以内で起こった同期バーストは，同じ同期バーストであるとみなして連結した．

5-4 P19 細胞由来神経細胞を用いた手法の評価

分化誘導細胞と初代培養細胞の結合過程の評価に軸索からの伝導計測が有効であることを示すために、P19-neuron と CX が結合していく様子を評価した。本節では、最初に 2 種類の染色法を用いて、共培養した P19-neuron と CX が相互にシナプス結合を形成したことを示す。続いて、微小トンネル内の軸索から計測されるシグナルが、内外の培養区画に播種した細胞種を反映して変化することを示し、本手法の有効性をサポートする。最後に、経時的に計測したデータから共培養神経回路網の結合過程を示す。

5-4-1 Calcein 染色による形態的結合の確認

Calcein 染色を用いて各区画に培養した細胞を特異的に標識し、両細胞の軸索が微小トンネルを通過し、もう一方の区画に投射したことを示した。最初に、色素が片方の培養区画内の細胞種のみロードできたことを示すために、溶液の流出および拡散が起らなかったことを確認した。図 5-3 に、微小トンネル付近の Hoechst 染色の結果を示す。片方の培養区画のみに色素液を添加し、色素を添加した区画と添加していない区画の Hoechst 陽性領域の面積を評価した。図 5-4 に、各条件での Hoechst 陽性領域の面積を示す。色素を添加した領域では、添加していない領域と比較して有意に面積が広がった。色素が流出した場合、色素を添加した区画と添加していない区画で、Hoechst 陽性領域の面積が同程度となると考えられる。以上から、色素ロード時に、微小トンネルを介して顕著な色素の流出が起らなかったことが示唆された。

Calcein 染色により一方の培養区画内の神経細胞の神経突起を染色した。図 5-5 に染色結果を示す。P19-neuron および CX が相互に軸索を投射したことが示された。2 つの独立した PDMS 構造物の全ての微小トンネルについて観察した結果、どちらの神経細胞種も、9 割以上の微小トンネルで他方の細胞の培養区画まで軸索を伸長していた。また、微小トンネルを通過した後に、P19-neuron の方は一度束になった神経突起が広がっていく様子が観察された。一方、CX の方は、束になった形状を維持したまま、P19-neuron が形成した凝集塊に投射した様子が観察された。

Dye loading compartment

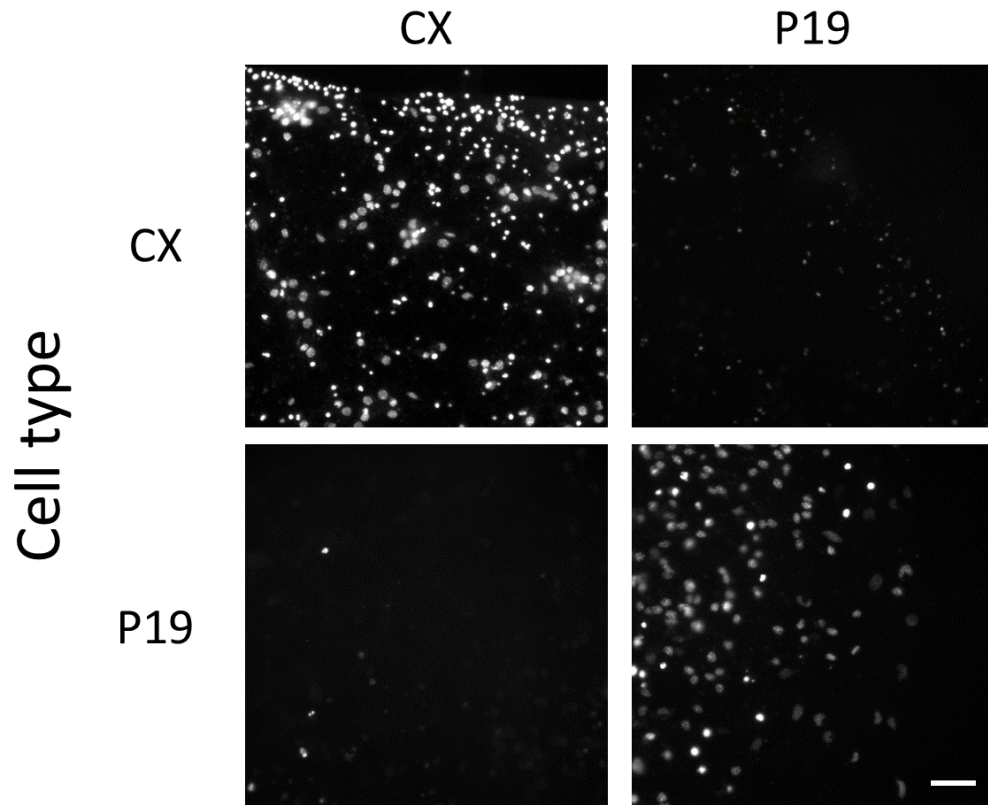


図 5-3 染色液の有無による Hoechst 染色 [Shimba 2015b 改変]. 色素を添加した区画と, 添加していない区画において, Hoechst を用いた核染色の画像を取得した. スケールバーは 50 μm .

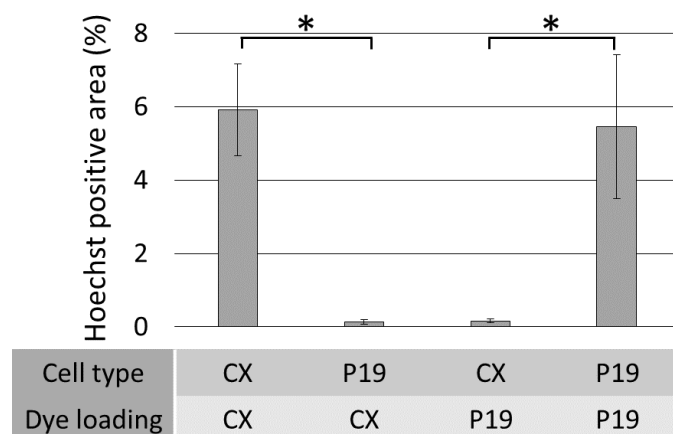


図 5-4 Hoechst 陽性領域の違い [Shimba 2015b 改変]. 色素を添加した区画では, 添加していない区画と比較して Hoechst 陽性の領域が 30 倍以上となった. *, $p < 0.05$; Welch's t test; $n = 5$; mean \pm SE.

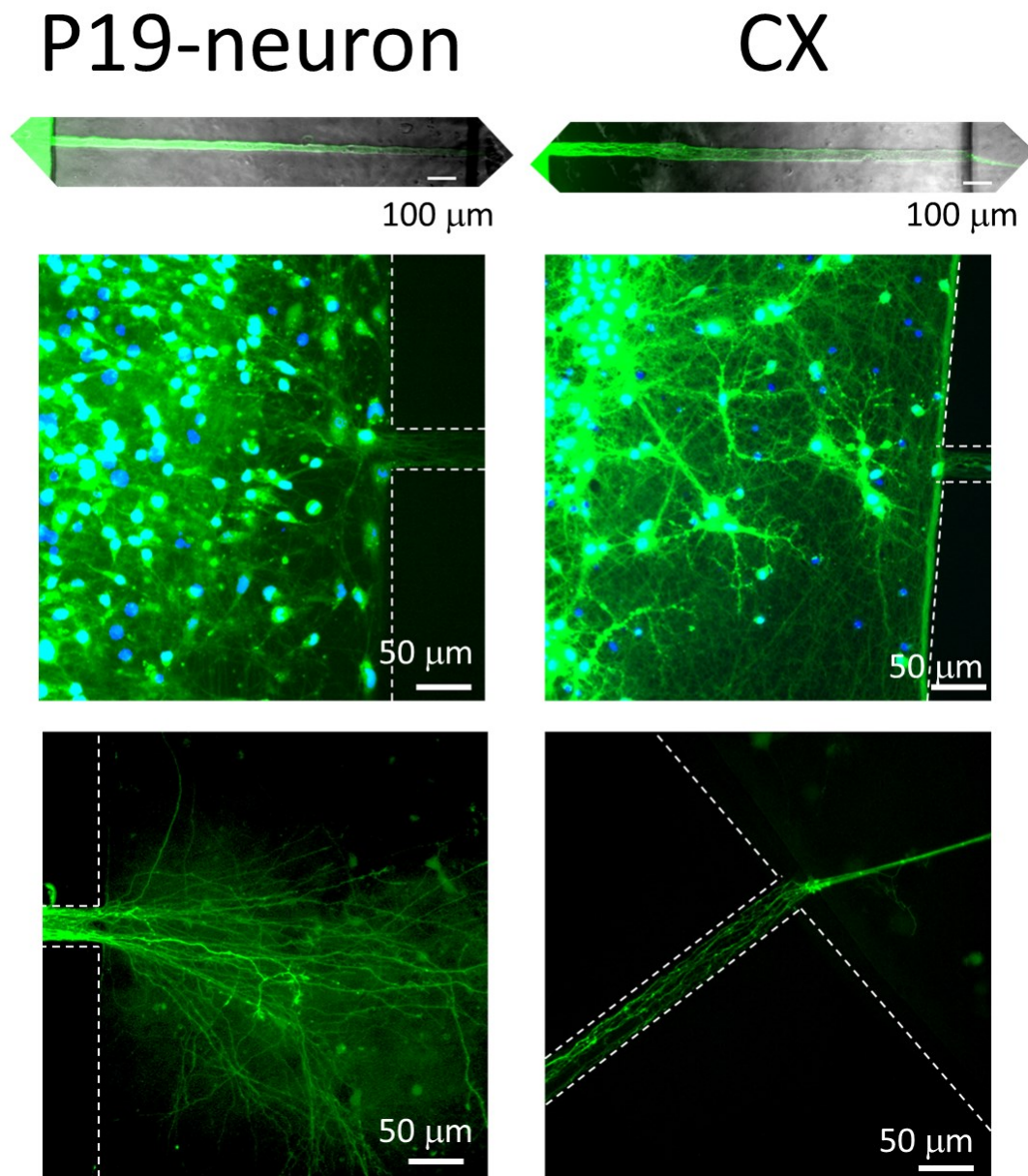
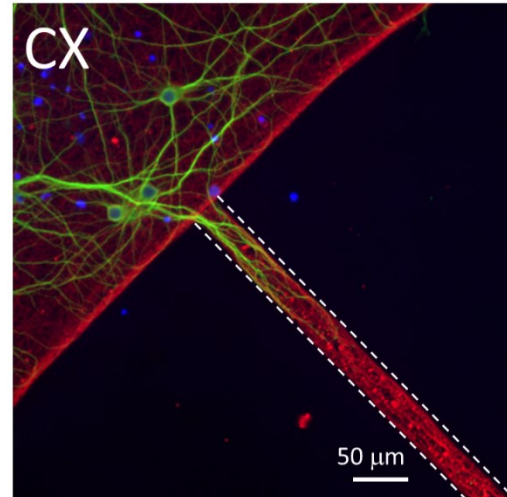
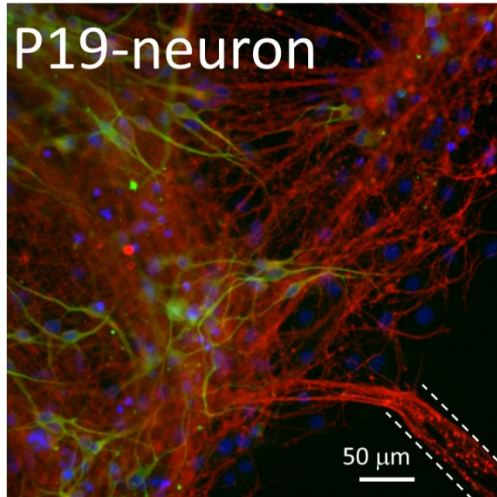


図 5-5 P19-neuron および CX の軸索の投射 [Shimba 2015b 改変]. 軸索が微小トンネルを通過したことを確認するために、calcein 染色を行った (緑色). 結果, どちらの細胞の軸索も微小トンネルを通過したことが確認された. 細胞核は, Hoechst を用いて標識した (青色). 白い破線は, PDMS 構造物および微小トンネルの端部を示す.

5-4-2 免疫組織化学染色による形態的結合の確認

微小トンネルを通過した神経突起が軸索であるか、および微小トンネルの入り口周辺においてシナプス形成が観測されるかを評価するために、免疫組織化学染色を行った。図 5-6 に 12 DIC における代表的な染色画像を示す。図 5-6A は、神経細胞全体に発現する B3T (赤色)、および細胞体と樹状突起に特異的に発現する MAP2 (緑色) に対する抗体を用いて染色した結果である。つまり、MAP2 陰性かつ B3T 陽性の神経突起は、軸索を示す。微小トンネル内には多数の軸索が伸長したものの、樹状突起は微小トンネルを通過しなかったことが示された ($n = 72$ microtunnels from two PDMS structures)。また、図 5-6B は、シナプス小胞膜タンパク質である SYN (赤色) および B3T (緑色) に対する抗体を用いた染色画像である。微小トンネル周囲でのシナプス形成が示された。

A



B

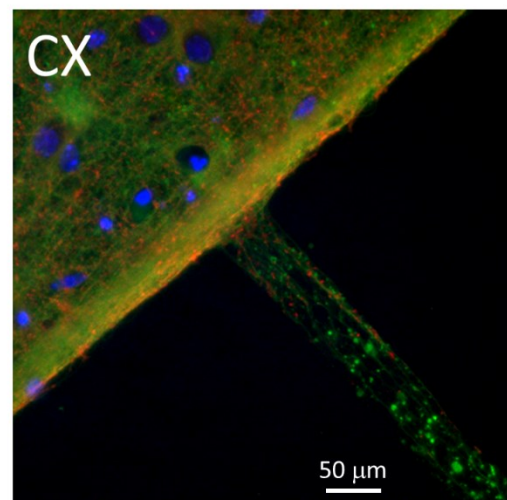
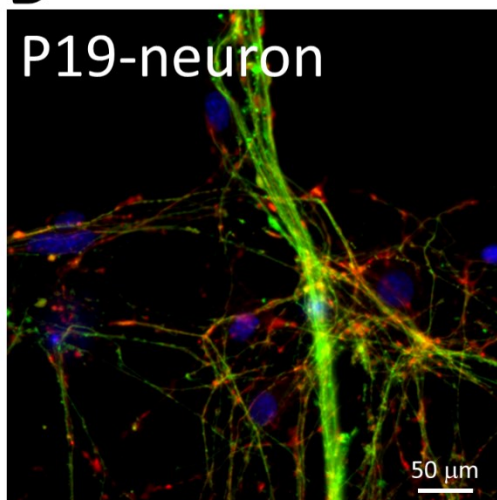


図 5-6 軸索の投射およびシナプス形成の確認 [Shimba 2015b 改変]. (A) 軸索と樹状突起. 抗 MAP2 抗体を用いて樹状突起および細胞体を標識した (緑色). 抗 B3T 抗体により神経細胞を標識した (赤色). 樹状突起が微小トンネルを通過しなかったことが確認された. (B) 微小トンネル端部でのシナプス形成. 抗 SYN 抗体によりシナプス小胞を標識した (赤色). また, 抗 B3T 抗体により神経細胞を標識した (緑色). 微小トンネル端部でのシナプス形成が確認された. 細胞核は, DAPI を用いて標識した (青色). 白い破線は, 微小トンネルを示す.

5-4-3 細胞種の変更による伝導の比率の変化

共培養を行った4つの試料から、5 DIC から 20 DIC まで5日毎に自発活動を計測した。全てのサンプルで、8 DIC より、分散培養した神経回路網に特徴的な活動パターンである同期バーストが観測された。図 5-7 に、微小トンネル内に配置した電極から計測された活動の代表的な波形を示す。第4章と同様に、 E_{in} 、 E_{center} および E_{out} の波形を、それぞれ赤、黒および青で示した。本研究では、CX を外側の培養区画に、P19-neuron を内側の培養区画に培養したため、内向きおよび外向きの伝導をそれぞれ CX および P19-neuron の活動とみなした。20 DIC において、CX および P19-neuron の伝導は、それぞれ $27 \pm 2\%$ および $13 \pm 4\%$ の微小トンネルから検出された (mean \pm SE)。また、伝導が検出された微小トンネルにおいて、CX および P19-neuron の軸索は、平均してそれぞれ 3.4 ± 0.7 本および 1.4 ± 0.2 本検出された (mean \pm SE)。図 5-7B に代表的なラスタプロットを示す。なお、図中の青い点および赤い点は、それぞれ CX および P19-neuron の活動を示す。両者が同期したタイミングで活動したことが観察された。

異なる培養区画に培養した細胞の活動を伝導方向から区別できることを確認した。結果を図 5-8 に示す。内側の培養区画に培養する神経細胞の種類を変化させた場合の、全クラスタに対する外向きのクラスタの比率を評価した。評価は 20 DIC において行った。内側および外側の培養区画に CX を培養した場合、外向きのクラスタは $54 \pm 8\%$ (mean \pm SE; $n = 9$) となった。両培養区画に同じ種類の神経細胞を培養した場合に外向きと内向きのクラスタがおおよそ半数ずつになったことは、培養区画の違いは伝導の割合に大きな影響を与えないことを示唆している。次に、外側の培養区画に培養した神経細胞の軸索が、内側の培養区画まで伸長した後、再度微小トンネルを通り外向きのクラスタと判別されることがないかを確認した。内側の培養区画には細胞を培養せず、外側の培養区画のみで CX を培養した場合、外向きのクラスタは $2.6 \pm 1.0\%$ (mean \pm SE; $n = 4$) となった。最後に、P19-neuron を内側の培養区画に培養した場合、外向きのクラスタは $14 \pm 2\%$ (mean \pm SE; $n = 4$) となった。

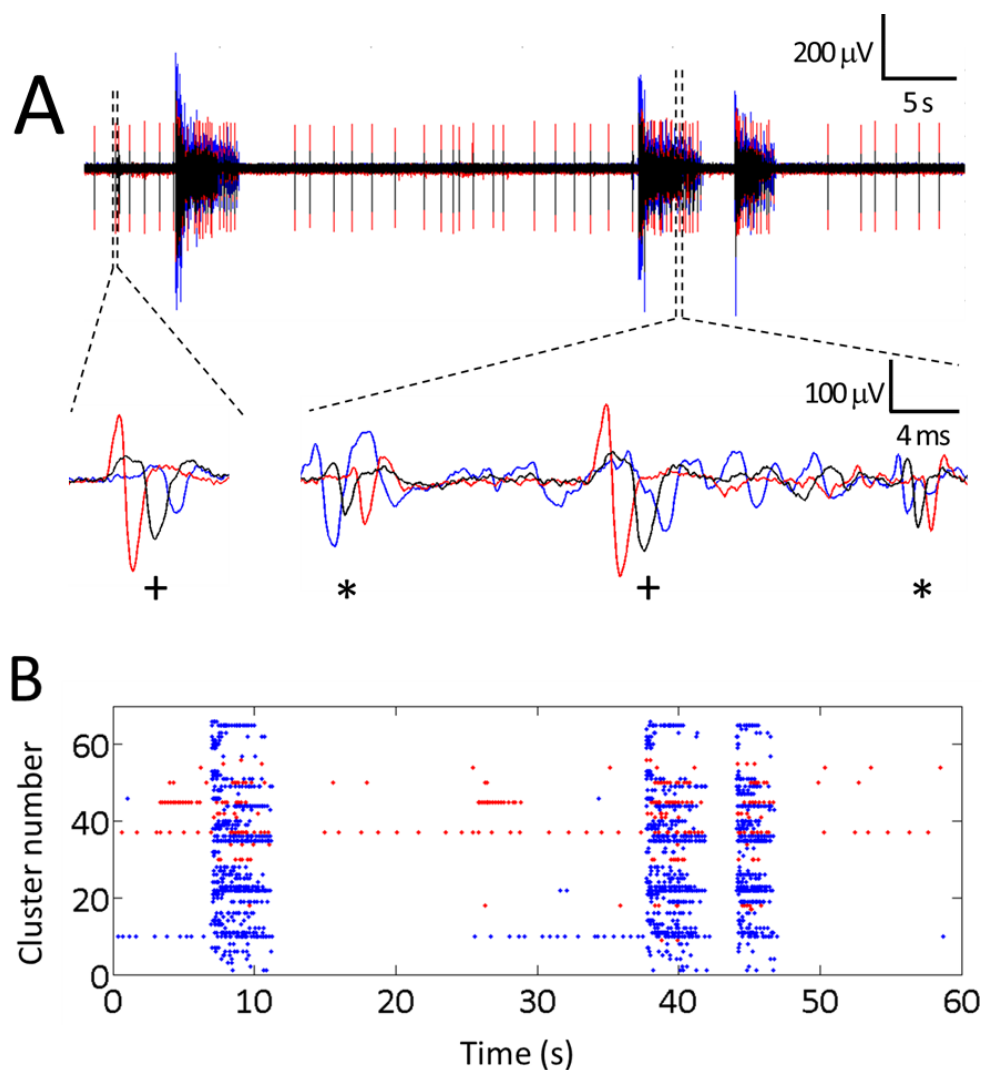


図 5-7 P19-neuron と CX の活動 [Shimba 2015b 改変]. (A) 代表的な波形. 内側の培養区画に近い電極から, 赤色, 黒色および青色で示した. 微小トンネルに配置した 3 点の電極からは, 同じタイミングでスパイク状の波形が観察された (上段). 波形を拡大すると, 3 点の電極のスパイク時刻に 1 ms 程度の違いがあることが確認された (下段). アスタリスク (*) および十字 (+) は, それぞれ外向きおよび内向きの伝導を示す. (B) ラスタプロット. 青色および赤色は, それぞれ内向きおよび外向きの伝導を示す. 両方向の伝導において, 同期した高頻度の発火が観察された.

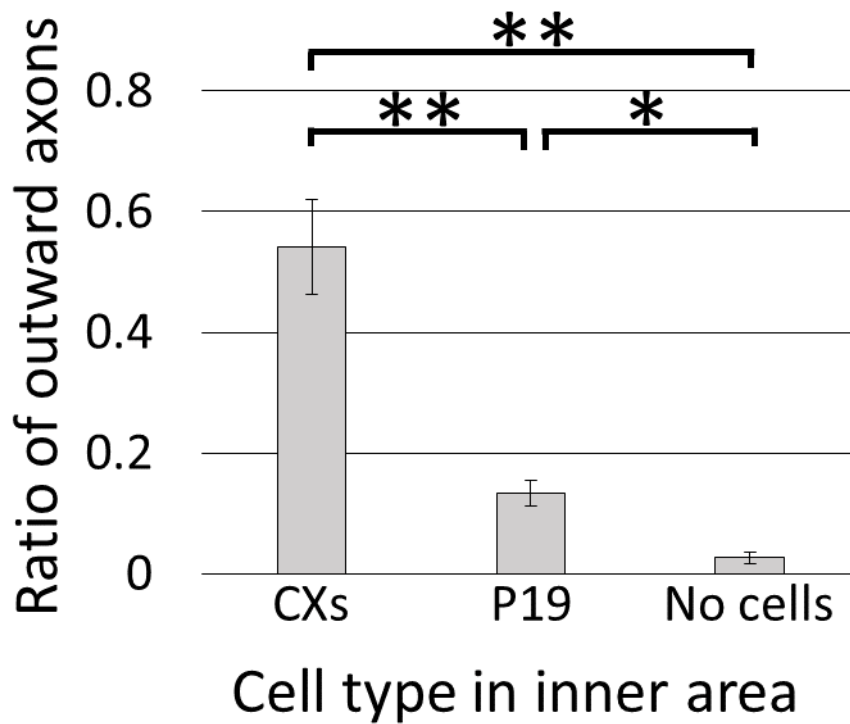


図 5-8 細胞種の違いと外向きのクラスタの割合の関係 [Shimba 2015b 改変]. 外側の培養区画では, CX を培養した. 内外の培養区画に同種の細胞を培養した場合 (CXs), 半数程度の伝導が外向きであった. 一方, 内側に細胞を播種しない場合は, 2.6%の伝導が外向きであった. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; Welch's t test with Bonferroni correction; $n = 9$ for CXs, $n = 4$ for P19 and no cells; mean \pm SE.

5-4-4 細胞種の違いによる伝導時間の違い

細胞種が異なった場合に伝導時間が異なるかを評価するため、CX および P19-neuron の軸索における伝導時間を評価した。本項ではデータを $\text{mean} \pm \text{SD}$ で表示する。対照実験として、両方の培養区画に CX を培養した試料でも同様の評価を行った。結果を図 5-9 に示す。P19-neuron の軸索の伝導時間は、14 DIC において $2.84 \pm 0.78 \text{ ms}$ ($n = 17 \text{ axons}$) であり、20 DIC において $2.86 \pm 0.90 \text{ ms}$ ($n = 30 \text{ axons}$) であった。一方、CX の軸索の伝導時間は、14 DIC において $2.21 \pm 0.52 \text{ ms}$ ($n > 100 \text{ axons}$) であり、20 DIC において $2.38 \pm 0.72 \text{ ms}$ ($n > 100 \text{ axons}$) であった。P19-neuron の軸索における伝導時間は、CX と比較して有意に大きかった ($p < 0.05$)。また、両方の培養区画に CX を播種した条件では、外向きと内向きの伝導時間に有意な差は検出されなかった。電極間の距離は $600 \mu\text{m}$ に設定したことから、P19-neuron および CX の伝導速度を計算すると、それぞれ $0.16 - 0.31 \text{ m/s}$ および $0.19 - 0.36 \text{ m/s}$ となった。

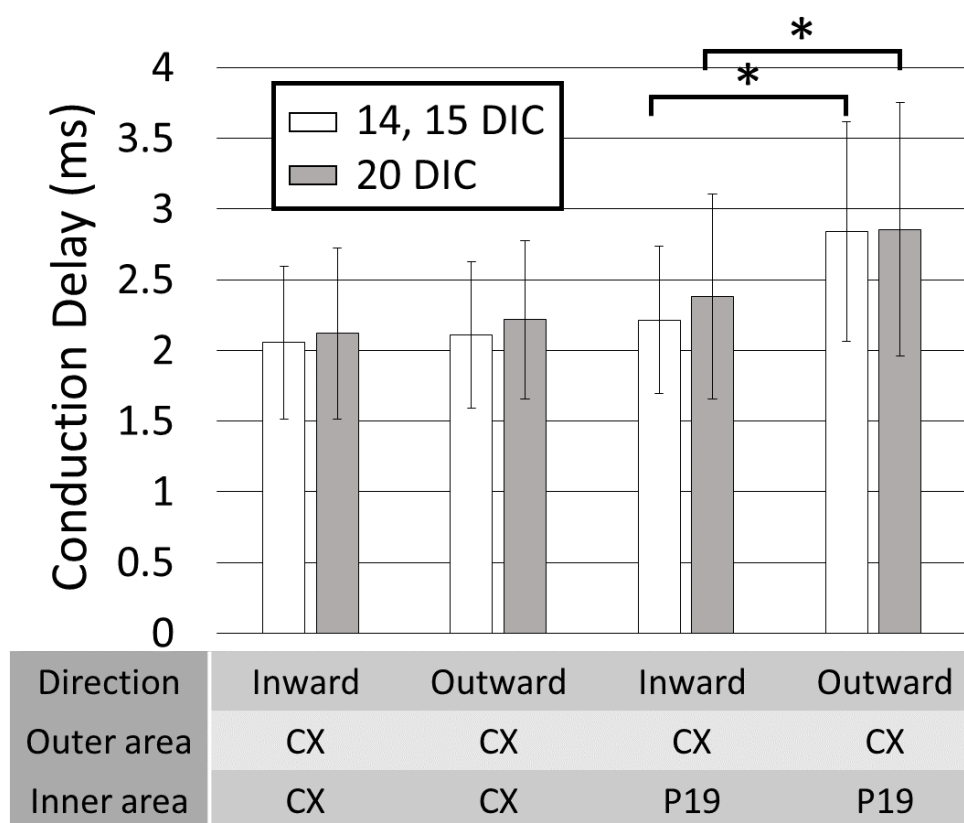


図 5-9 P19-neuron および CX の伝導時間 [Shimba 2015b 改変]. P19-neuron と CX を共培養した場合と、両方の培養区画に CX を培養した場合で、伝導時間を比較した。結果、CX の軸索の伝導時間と比較して、P19-neuron の軸索の伝導時間が有意に大きかった。DIC, days in co-culture; *, $p < 0.05$; Welch's t test with Bonferroni correction; P19, $n = 17 \text{ axons}$ at 14DIC; $n = 30 \text{ axons}$ at 20 DIC; CX, $n > 100 \text{ axons}$ for each condition; $\text{mean} \pm \text{SD}$.

5-4-5 発達に伴う P19-neuron の CX 神経回路網への統合

培養日数の経過に伴う, P19-neuron および CX のクラスタ数の変化および同期バーストが P19-neuron の活動を含む割合を評価した. 図 5-10 に結果を示す. CX のクラスタ数は, 14 DIC まで増加し, その後減少した. 一方, P19-neuron のクラスタは 8 DIC から検出され, 20 DIC まで培養日数の経過に伴って増加した. 同期バーストに P19-neuron の活動が含まれる割合は, 11 DIC においては 0.43 ± 0.20 (mean \pm SE) であったが, 14 DIC 以降は 0.75 以上となった.

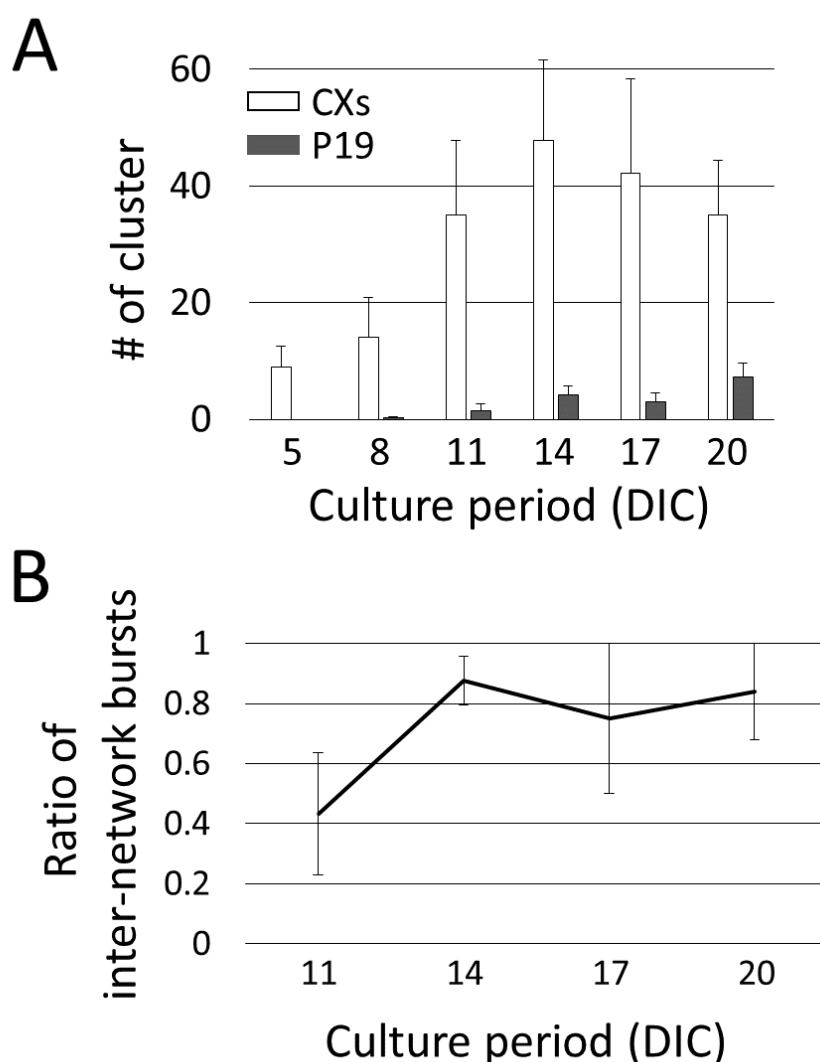


図 5-10 発達過程におけるクラスタ数と活動の変化 [Shimba 2015b 改変]. (A) 培養日数の経過に伴うクラスタ数の変化. CX のクラスタ数は, 14 days in co-culture (DIC) まで増加し, その後減少した. 一方, P19 のクラスタは, 8 日目に初めて検出され, 20 DIC まで増加した. (B) P19 が発火した同期バーストの割合. 14 DIC 以降, 80%程度の同期バーストで P19 の活動が検出された. Mean \pm SE; n = 4.

5-5 マウス iPS 細胞由来神経細胞のホスト神経回路網への統合

本節では、ring MEA を用いて miPS-neuron と CX の結合過程を評価した結果を示す。最初に、AP 染色を用いてマウス iPS 細胞の未分化状態が維持されていることを確認した。また、樹立時に導入された GFP の発現が維持されたことも確認した。次に、凝集状態で播種する場合の培養条件を検討した。最後に、単離状態および凝集状態の miPS-neuron を CX と共培養した。

5-5-1 AP 染色および GFP の観察によるマウス iPS 細胞の可視化

Feeder 細胞上で培養したマウス iPS 細胞に対して AP 染色を行い、AP 活性が維持されたことを確認した。図 5-11 に AP 染色および GFP の蛍光観察の結果を示す。位相差顕微鏡画像から確認されるコロニーの部位にのみ AP 活性が観察され、マウス iPS 細胞が未分化状態を維持していたことが示唆された。また、図 5-11B より、コロニーを形成した細胞が GFP 陽性であることが確認された。

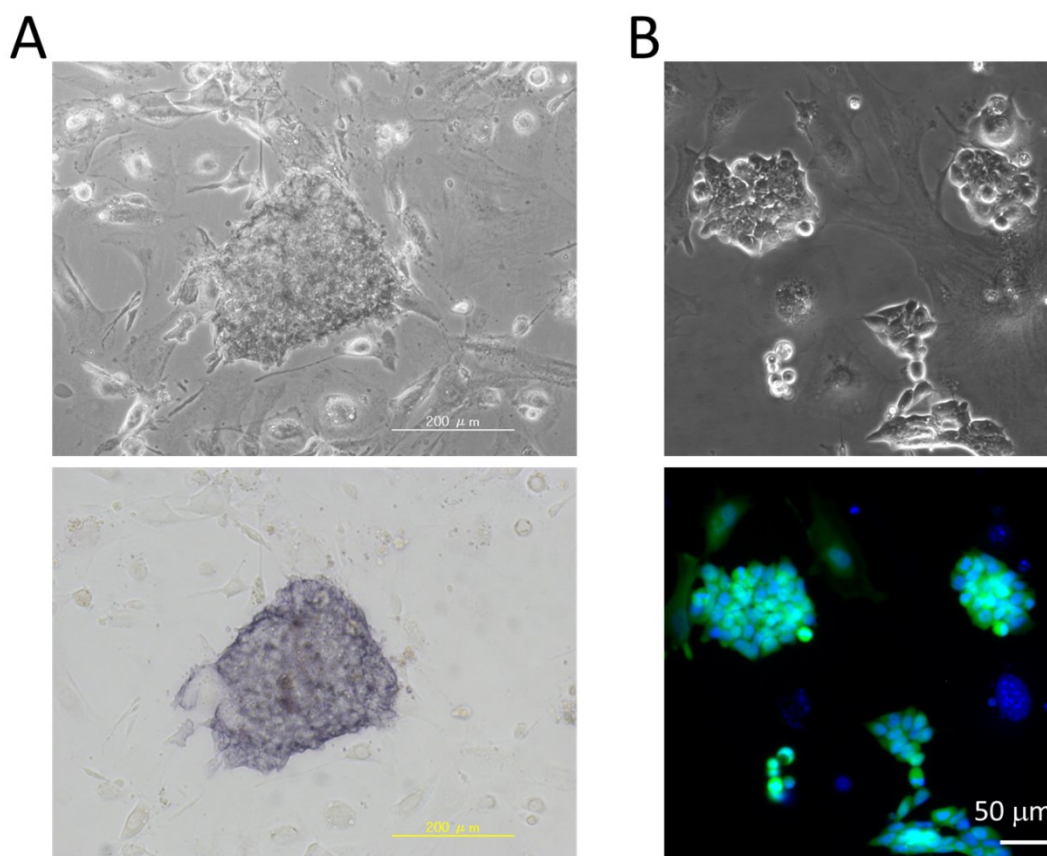


図 5-11 未分化状態のマウス iPS 細胞. (A) AP 染色を用いた未分化状態の確認. マウス iPS 細胞のコロニーにおいて、AP 活性が観察された (下段). (B) GFP の観察. マウス iPS 細胞は、GFP 陽性であった (下段 緑色). 細胞核は、Hoechst を用いて標識した (青色). 上段は、同じ視野における位相差顕微鏡の画像.

5-5-2 凝集状態 miPS-neuron の培養条件

5 日間浮遊培養を行ったマウス iPS 細胞を、PEI および laminin でコーティングした培養皿に播種した。培養条件を検討するために、図 5-12 に示す 3 つの条件で培養し、位相差顕微鏡から細胞の状態を評価した。条件 1 および条件 3 は、それぞれ miPS-neuron および CX にとって最適であると考えられる条件であり、条件 2 は両者を混合した条件に設定した。以下に、各条件の詳細を示す。条件 1 は、先行研究において採用されている条件である [Watanabe 2005]。最初の 2 日間を miPS-NI medium で培養し、それ以降は miPS-NI/N2 medium を用いて培養した。条件 2 は、2 日目まで miPS-NI medium で培養し、それ以降は B27 medium を用いて培養した。条件 3 は、前節において CX と P19-neuron の共培養に用いたものと同じ条件であり、播種した時から B27 medium で培養した。

図 5-13 に、各条件で培養した miPS-neuron の位相差顕微鏡画像を示す。条件 1 は、播種 4 日目では最も長く神経突起を伸長したが、11 日目には神経突起の一部が断片化する様子が観察された。断片化した軸索は神経細胞や軸索が障害を受けた際に観察されることが知られているため [Gerdtz 2011]、11 日目において条件 1 で培養した miPS-neuron の培養状態が悪化したことが示唆された。条件 2 および 3 では、条件 1 と比較して神経突起が伸長し始めるタイミングが遅かったものの、11 日目においても神経突起が断片化せず維持されたことが観察された。また、突起を有しない細胞の増殖が観察されたが、共培養実験の結果には大きな影響は与えないとみなした。以上より、CX の培養に適した条件で miPS-neuron を培養可能であることが示唆されたため、共培養を行う際の培養液の条件には、条件 3 を用いることとした。

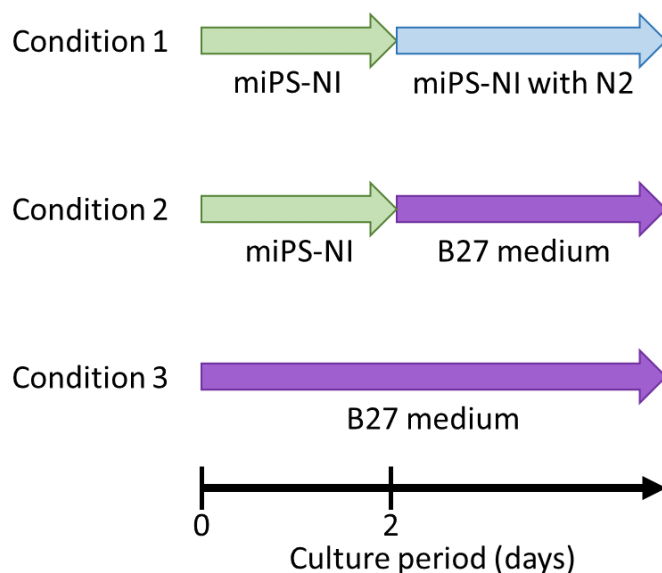


図 5-12 分化誘導後の miPS-neuron の培養条件.

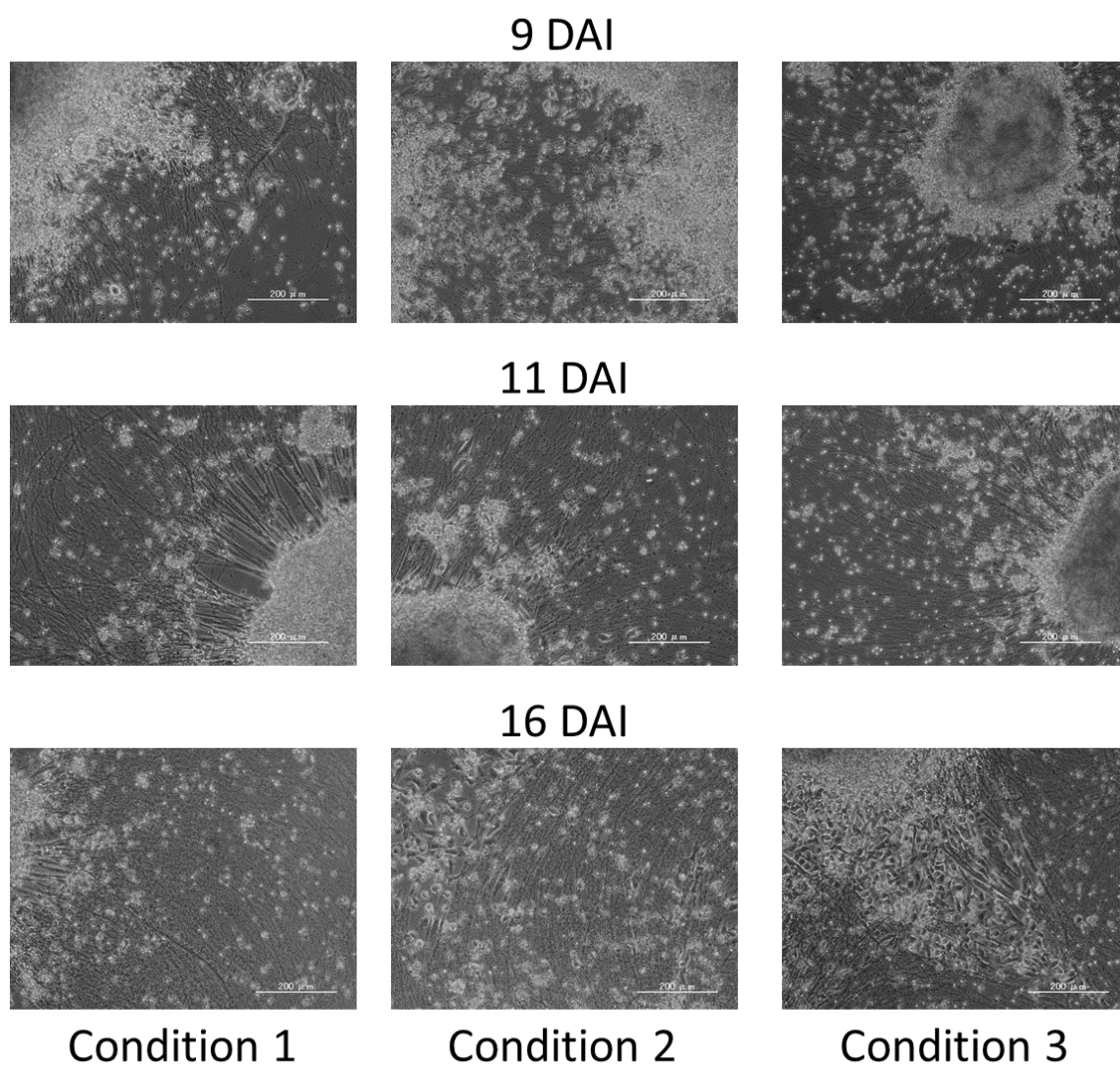


図 5-13 培養条件の違いによる miPS-neuron の形態の変化. DAI, days after induction.

5-5-3 単離状態のマウス iPS 細胞由来神経細胞を用いた共培養

形態観察

単離状態の miPS-neuron を，CX と共培養した．最初に，15 DIC および 25 DIC において，抗 B3T 抗体を用いて，miPS 細胞由来の神経細胞を標識した．図 5-14 に 15 DIC における蛍光画像を示す．15 DIC においては，播種した細胞は一様に分布しており，一部の細胞が B3T 陽性の神経突起を伸長していた（図 5-14 赤色）．B3T を発現した細胞は，B3T 陰性細胞と比較して，GFP の輝度が低い傾向があった．また，非神経系細胞が集まりコロニー様の集合体を形成した様子が観察された．図 5-15 に，25 DIC における蛍光画像を示す．15DIC には細胞が一様に分布していたのに対して，25 DIC では細胞密度が高い領域と低い領域が存在した．細胞密度が低い領域では，死細胞の細胞核であると考えられる，通常の細胞核と比較してサイズが小さい DAPI 陽性の構造が観察された（上段 矢印）．一方，細胞密度が高い領域では，神経突起が視野全体に存在した．また，複数の神経突起が束になる様子が観察された．B3T 陽性の細胞と GFP 陽性の細胞の分布から，神経細胞と非神経細胞は，一様に分布するのではなく，いずれかの細胞種の密度が高い領域を形成することが示唆された．

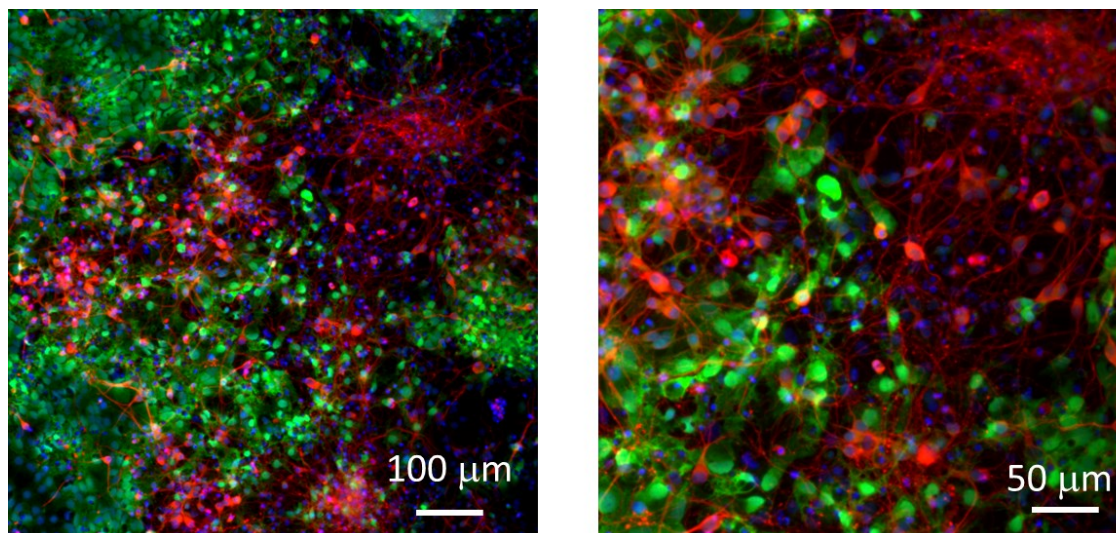
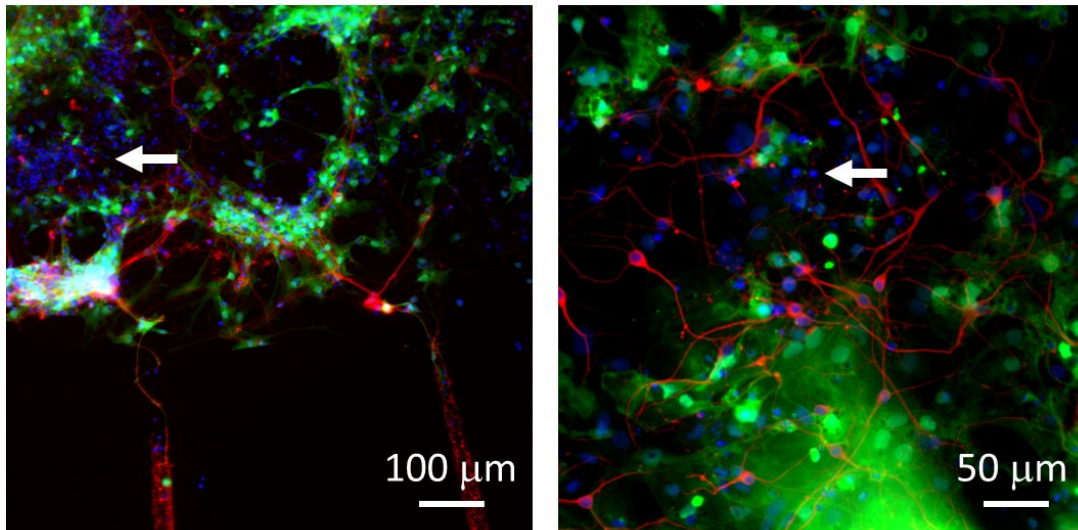


図 5-14 15 日目における単離状態 miPS-neuron の形態．神経細胞に発現する B3T を標識した（赤色）．GFP および細胞核を，それぞれ緑色および青色で示す．miPS 細胞の一部が神経細胞に分化したことが確認された．右図は，左図の拡大図である．

Sparse area



Dense area

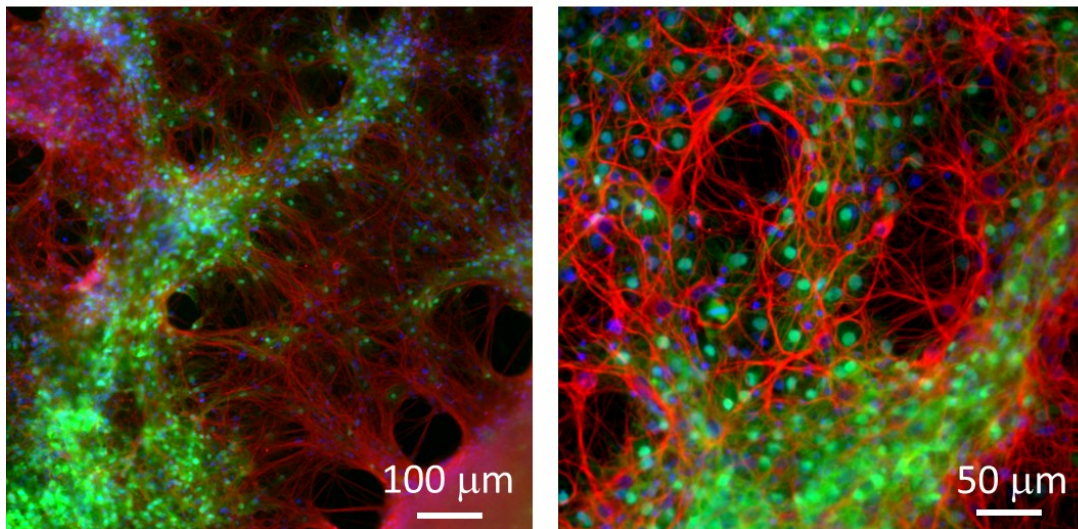


図 5-15 25 日目における単離状態 miPS-neuron の形態. 抗 B3T 抗体を用いて, 神経細胞を標識した (赤色). GFP 陽性領域および細胞核を, それぞれ緑色および青色で示す. 細胞密度が低い領域 (上段) と高い領域 (下段) が形成された. 細胞密度が低い領域では, 死細胞の細胞核であると考えられる, サイズが小さな DAPI 陽性の構造が観察された (白い矢印). 細胞密度が高い領域では, 神経突起が束になる様子が観察された.

活動計測

5 DIC から 30 DIC まで 5 日毎に活動を計測し，miPS-neuron および CX のクラスタ数を評価した．結果を図 5-16 に示す．CX のクラスタは，15 DIC に最大となり，それ以降は減少した．一方，miPS-neuron のクラスタは，計測期間を通して 1 未満となった．以上から，単離状態 miPS-neuron の軸索は，微小トンネルを通過しなかったことが示された．

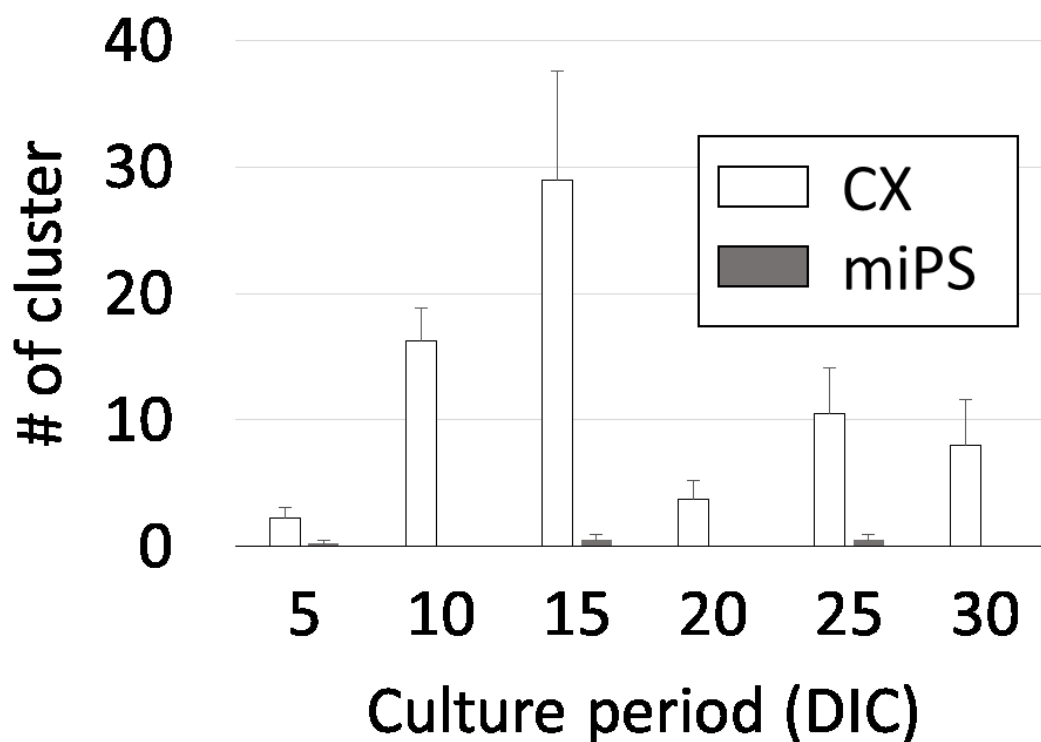


図 5-16 単離状態 miPS-neuron と CX のクラスタ数の変化．CX のクラスタは，15 days in co-culture (DIC) で最大となった．一方，miPS-neuron のクラスタは，計測期間を通して平均値が 1 未満となった．Mean \pm SE; $n = 4$.

5-5-4 凝集塊状のマウス iPS 細胞由来神経細胞を用いた共培養

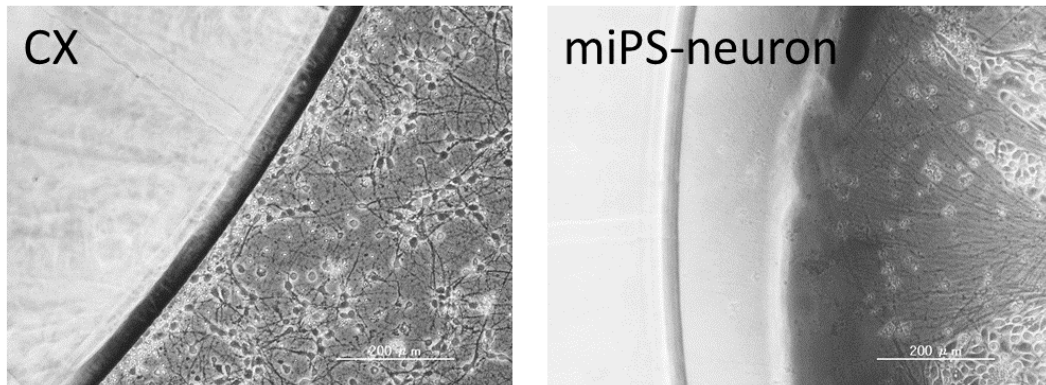
形態観察

5-5-2 で選択した条件を用いて、miPS-neuron と CX を共培養した。図 5-17 に代表的な位相差顕微鏡写真を示す。CX は播種数時間後から、miPS-neuron は播種後 1 日ごろから神経突起を伸長し始め、培養日数の経過とともに培養底面を覆う神経突起の面積が増加する様子が観察された。また、7 DIC には、両区画で一部の突起が束になる様子も観察された。miPS-neuron の形態を観察するために、7 DIC および 14 DIC において miPS-neuron が発現した GFP を蛍光観察した。図 5-18 および図 5-19 に結果を示す。7 DIC において、miPS-neuron の神経突起は $90 \pm 10\%$ の微小トンネル内に伸長しており、 $50 \pm 43\%$ の微小トンネルでは CX 側の区画まで到達している様子が観察された (mean \pm SD)。14 DIC には、突起状の構造を持たない細胞が微小トンネル内に存在する様子が観察された (図 5-19 左図)。また、一部の細胞は微小トンネルを通過し、CX 側の区画に生着していた (図 5-19 左図 矢印)。7 DIC では神経突起が観察されたが、14 DIC では神経突起が断片化し変性した様子が観察された (図 5-19 右図)。

免疫組織化学染色法を用いて、15 DIC において共培養した両細胞の形態を観察した。図 5-20 に代表的な蛍光画像を示す。miPS-neuron 側の区画では、miPS-neuron が B3T 陽性の突起を伸長する様子が観察された。単離状態で播種した場合と同様に、B3T 陽性の細胞は、B3T 陰性の細胞と比較して、GFP の輝度値が低い傾向があった。また、単離状態で播種した場合とは異なり、B3T 陰性の非神経細胞は円形の形状を有しており、細胞間では結合を形成していない様子が観察された。一方、CX 側の区画では、微小トンネルを通過したと考えられる GFP 陽性の細胞が存在する様子が観察された。

以上から、凝集状態で播種した miPS-neuron は、7 DIC までに神経細胞へと分化し、神経突起を伸長することが示された。しかし、14 DIC には軸索が変性し断片化した。また、非神経系細胞が微小トンネルを通過し、CX 側の培養区画まで移動する可能性があることも示された。

7 DIC



11 DIC

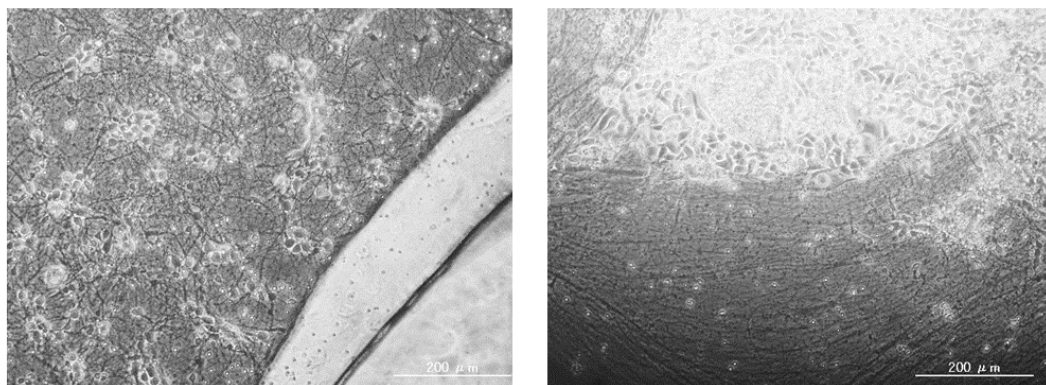
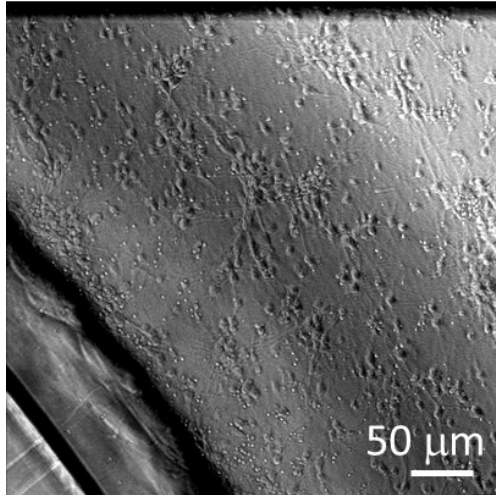


図 5-17 共培養環境における miPS-neuron および CX. 共培養開始後 7 日目 (days in co-culture; DIC) には, 両細胞が神経突起を伸長する様子が観察された. 11 DIC には, 神経突起の密度が上昇した傾向が見られた.

CX



miPS-neuron

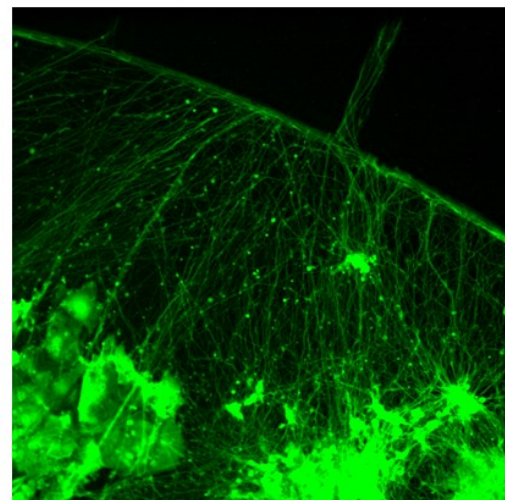
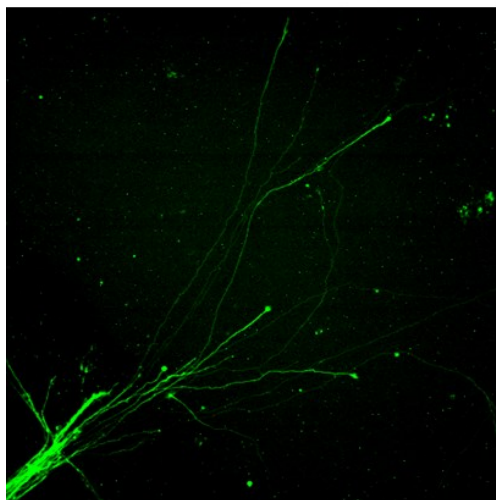
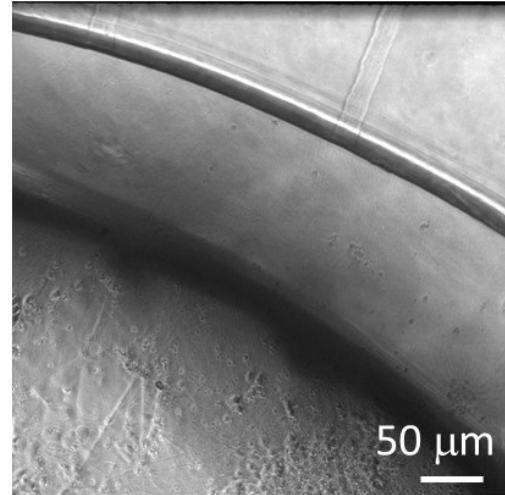
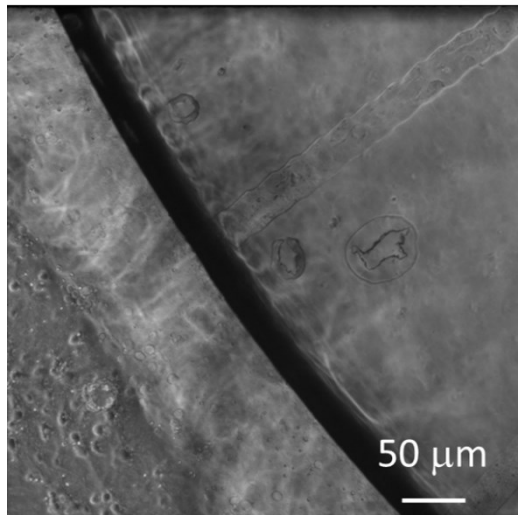


図 5-18 7 日目における miPS-neuron の突起伸長. それぞれの視野における位相差顕微鏡画像（上段）および GFP の蛍光画像（下段）を示す. miPS-neuron の神経突起が微小トンネルを通過し, CX 側の培養区画に到達したことが示された.

Non neuronal cells



Fragmented axon

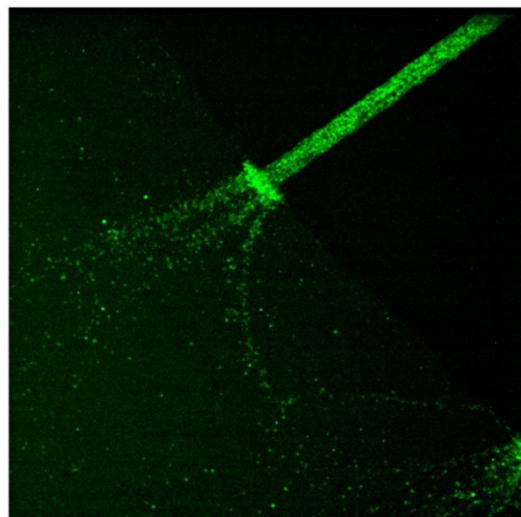
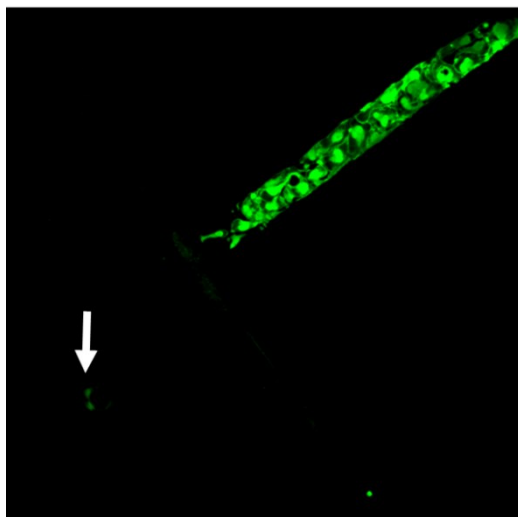
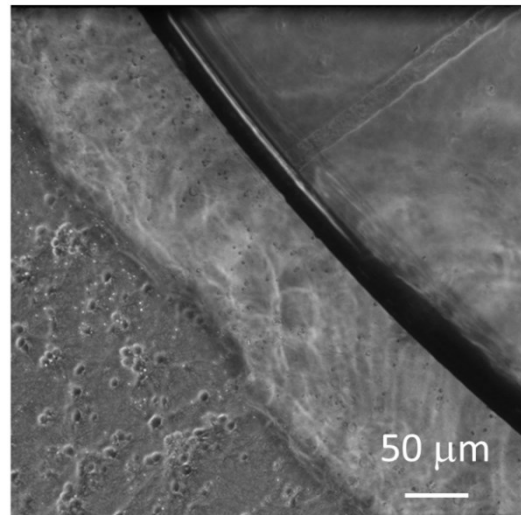


図 5-19 14 日目における miPS 細胞の形態. 微小トンネルの CX 側の端部を撮影した. それぞれの視野における位相差顕微鏡画像 (上段) および GFP の蛍光画像 (下段) を示す. 左図: 微小トンネル内の非神経系細胞. 一部の細胞は CX 側の培養区画に生着した (矢印). 右図: 変性し断片化した軸索.

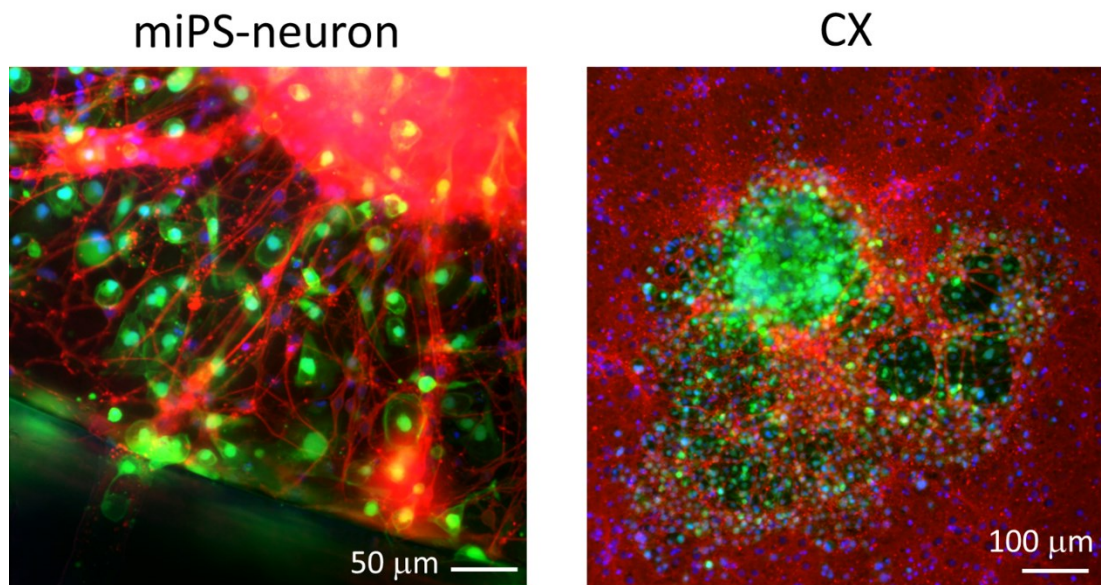


図 5-20 非神経系細胞の増殖. 15 日目において, 抗 B3T 抗体を用いて細胞を標識した (赤色). GFP 陽性部位および細胞核を, それぞれ緑色および青色で示す. miPS-neuron 側の区画では, miPS-neuron が B3T 陽性の神経突起を伸長する様子が観察された. 一方, CX 側の区画では, GFP 陽性の細胞が神経回路網内に生着した様子が観察された.

活動計測

5 DIC から 30 DIC まで 5 日毎に, ring MEA を用いて活動計測を行った. 計測された活動の代表的な波形を図 5-21 に示す. 図中の赤, 黒および青の線は, それぞれ E_{in} , E_{center} および E_{out} から計測された波形を示す. したがって, 青, 黒および赤の順にスパイク状の波形が観察された場合は CX 側からの伝導であり, 反対に赤, 黒および青の場合は miPS-neuron 側からの伝導であると考えられる. 5 DIC においては, CX 側からの伝導のみが観察された. 一方, 10 DIC においては, 両側からの伝導が同一の微小トンネルから観察された. 以上は, 10 DIC には両細胞が互いに軸索を投射したことを示唆している.

培養日数の経過に伴う, miPS-neuron および CX のクラスタ数の変化を評価した. 図 5-22 に, 培養日数とそれぞれの細胞のクラスタ数の関係を示す. クラスタは 10 DIC より検出された. CX のクラスタは 15 DIC まで増加した後, 減少傾向を示した. 一方, miPS-neuron のクラスタは, 10 DIC において 1 試料あたり 8.3 ± 3.3 (mean \pm SE) となったが, 15 DIC からは 1 未満であった. 以上から, 凝集状態で播種した miPS-neuron の軸索が, 10 DIC から 15 DIC の間に変性したことが示唆された.

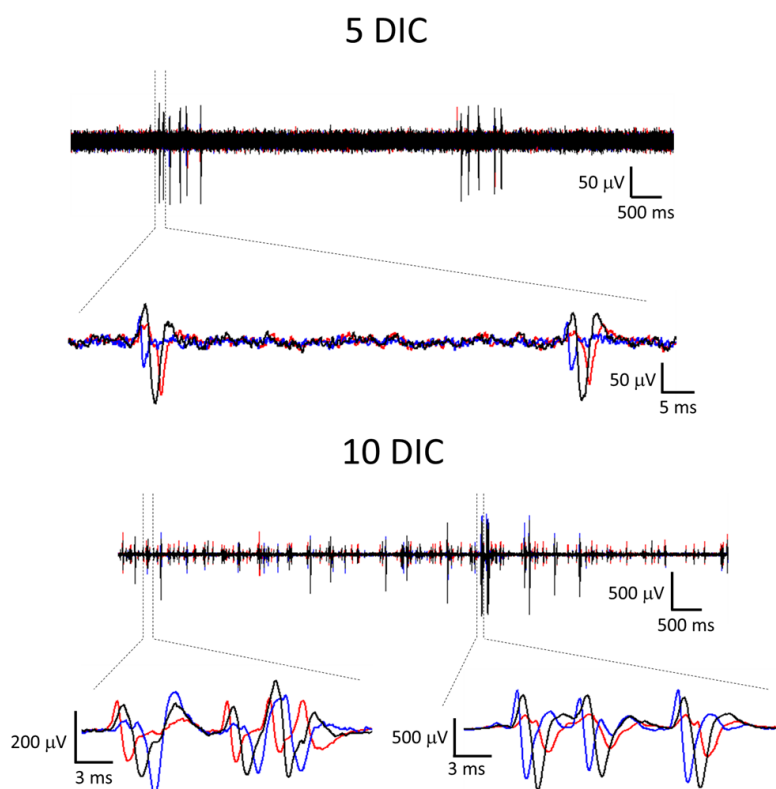


図 5-21 miPS-neuron および CX から計測された活動. 内側の培養区画に近い電極から, 赤色, 黒色および青色で示した. 微小トンネルに配置した 3 点の電極からは, 同じタイミングでスパイク状の波形が観察された (上段). 波形を拡大すると, 3 点の電極のスパイク時刻に 1 ms 程度の違いがあることが確認された (下段). DIC, days in co-culture.

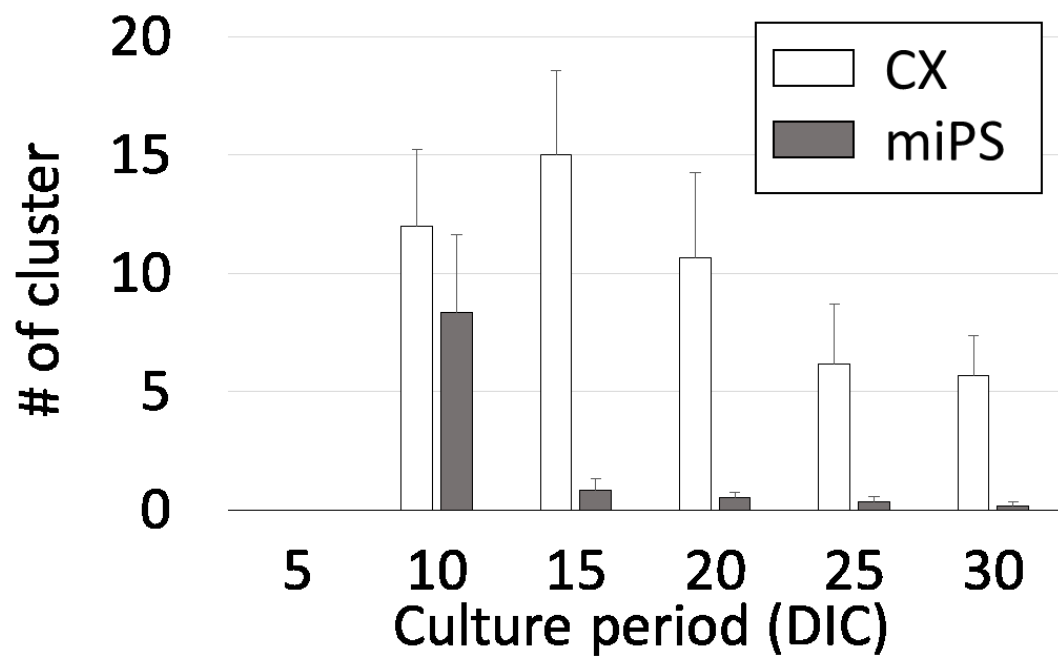


図 5-22 培養日数の経過に伴うクラスタ数の変化. CX のクラスタは 15 days in co-culture (DIC) まで増加し、その後減少傾向を示した. 一方, miPS-neuron のクラスタ数は, 10 DIC が最大となった. Mean \pm SE; $n = 4$.

5-6 考察

5-6-1 クラスタの数から結合を評価する優位性

本項では、神経細胞間の機能的結合を評価した先行研究と比較して、微小トンネルを用いた手法のメリットおよびデメリットを考察する。最初に、自発活動および刺激による誘発応答を指標とした機能的結合の評価方法を述べる。続いて、本研究で用いた手法のメリットおよびデメリットについて述べる。

自発活動から機能的結合を推定するための方法として、相互相関関数や **Transfer entropy** が指標として用いられている。Kanagasabapathi らは、PDMS 構造物を用いて大脳皮質および視床から採取した神経細胞の共培養を行い、相互相関を指標として両者が形成した結合を評価した [Kanagasabapathi 2012]。また、Garofalo らは、MEA を用いて計測したデータから、様々な手法を用いて電極間の機能的結合を評価し、評価法として **Transfer entropy** が適していたことを報告した [Garofalo 2009]。上記の手法は、ノード間の結合強度を推定するために用いられる手法であり、MEA を用いることで同時に複数のノード間の結合強度を推定可能である。一方、1つの神経細胞が複数の細胞と形成した結合を重複して数え上げるため、結合の数の推定には適していない。

光刺激や電気刺激に対する応答も、機能的結合を推定するための指標として用いられている。Tonnesen らは、神経幹細胞由来のドーパミン作動性神経細胞を、チャネルロドプシンを発現させた線条体スライス上で培養した [Tonnesen 2011]。光刺激を用いて線条体神経細胞の活動を誘起し、移植した細胞の活動をパッチクランプ法で計測することで、結合を評価した。また、Avaliani らは、ヒト iPS 細胞由来の GABA 作動性神経細胞をラット海馬スライス上に培養し、光刺激を用いて結合を評価した [Avaliani 2014]。光刺激を用いることで、一方の種類の神経細胞のみを選択的に刺激可能であるため、正確な評価を行うことができる。しかし、実験を行うために、遺伝子導入操作や光刺激のための設備が要求される。また、結合の形成過程を評価するためには、経時的に刺激を行う必要がある、しかし、慢性的な刺激が神経回路網の形状 [Jun 2007]、自発活動 [Goel 2013]、および遺伝子発現 [Stock 2012] に影響を与えることが報告されており、発達過程の複数のタイミングで刺激を印加することは望ましくない。

本手法では、微小トンネルを用いて活動伝導を計測し、スパイクソーティングを行うことで、個々の軸索を示すクラスタの情報が得られ、軸索の数を指標とした評価が可能である。また、クラスタ内の活動は、軸索を伝導して一方の神経細胞から他方の神経回路網へと入力された情報であるとみなすことができる。したがって、2種類の神経回路網の間の結合および活動の入出力を推定できることが本手法のメリットである。また、結合の推定に刺激を印加する必要がないため、長期間の経時的な評価に用いることも可能である。一方、本手法で評価できない点は、検出した軸索の両神経回路網間の結合への寄与の度合いである。そこで、本研究では同期バーストの解析手法を併用し、神経回路網全体での発火が起きた時に P19-neuron が活動した比率を指標として評価した。今回のように、本手法と従来の結合強度の

推定手法を併用することで、結合の強さが評価できない点を克服可能であると考えられる。

5-6-2 伝導方向を指標とした細胞種の判別法の信頼性

本手法では、伝導の方向を指標として神経細胞の種類を判別した。伝導の方向は、同様の微小トンネルを用いた先行研究でも指標として用いられており [Brewer 2013; Pan 2011], 本研究においても有効であると考えられる。さらに、本研究では、神経細胞の種類の判別において伝導の方向が有効な指標であることを確認するために、内側の培養区画に播種する神経細胞の種類を変化させた。最初に、両側の区画に CX を播種した場合、外向きと内向きの伝導の数はおよそ半数ずつとなり、リングの内側と外側という PDMS の構造が与える影響は小さいことが示唆された。続いて、外側の区画のみに CX を培養した場合、細胞を培養している区画からの伝導が 97%以上となった。本結果は、外側の区画で培養した CX が内側の区画まで軸索を伸長し、さらに内側から外側に向かって微小トンネルを通過した軸索が存在したことを示唆する。しかし、シナプス形成後に軸索の伸長は止まるため [Cooper 1992], 内側の培養区画にも神経細胞を培養した場合には、微小トンネルを二度通過する軸索は、本条件より少なくなると考えられる。以上から、伝導方向を指標とすることで、神経細胞の細胞体が存在する区画を推定可能であることが示唆された。今後、一方の区画に培養した神経細胞のみに TTX を作用させ、他方からの伝導のみが起こる条件を用いた実験を行うことで、本手法の有効性をさらに補強できる。

5-6-3 微小トンネル内に伸長した神経突起の可視化

Calcein 染色および免疫組織化学染色法を用いて、CX および P19-neuron を標識した。結果、両者が神経突起を他方の培養区画まで伸長したことが示された。以上より、CX および P19-neuron が互いに軸索を投射したことが示唆された。Taylor らは微小トンネル内に伸長した CX の神経突起を標識し、樹状突起は長いもので 450 μm 程度であったことを報告しており [Taylor 2005], 本研究における MAP2 抗体を用いた染色結果と一致する。また、SYN 抗体を用いて染色した結果からは、微小トンネル付近でシナプスが形成されていることが示されたが、どちらの細胞によるシナプスであるかは判別できなかった。免疫組織化学染色法を用いてシナプスの形成を示すためには、片方の細胞を特異的に染色する必要がある。

本研究で用いた miPS-neuron は GFP を恒常的に発現するため、特別な操作をせずに蛍光観察が可能である。本研究では、7 DIC において蛍光観察を行い、miPS-neuron の神経突起が多くの微小トンネルに伸長したことを示した。今後、SYN 抗体を用いた免疫組織化学染色と GFP を組み合わせることで、miPS-neuron が CX に対して形成したシナプスを観察することができると考えられる。また、B3T 抗体と GFP を用いることで、GFP 陽性/B3T

陽性の miPS-neuron と GFP 陰性/B3T 陽性の CX の染め分けが可能である。

5-6-4 発達過程におけるクラスタ数の変化および活動パターン

5 DIC より 3 日毎に活動を計測し、発達過程におけるクラスタ数の変化および活動のパターンを評価した。本項では、最初に CX および P19-neuron のクラスタ数の変化について述べる。次に、両者の同期バーストについて、先行研究との比較を行う。

CX のクラスタ数は 14 DIC まで増加し、その後減少した。理由として、以下の 2 つが挙げられる。1 つ目は、CX が細胞死を起こした可能性である。先行研究では、播種後 3 週間の間、CX の細胞死が観察されることが報告されている [Voigt 1997]。神経細胞が細胞死を起こせば軸索は減少するため、妥当な理由であると考えられる。Calcein および propidium iodide などの色素を用いて生細胞と死細胞の染め分けを行い、計測を行った培養日数での死細胞の割合を評価することで検証可能である。2 つ目の理由として、軸索の刈り込みが挙げられる。CX は活動に応じて軸索の刈り込みを行い、適切な神経回路網を形成することが報告されている [Low 2006]。また、CX を MEA 上で培養し、長期的に活動を計測した複数の先行研究では、播種後 2 週目から 3 週目までに神経回路網の活動パターンが変化することが報告されている [Mukai 2003; Esposti 2009]。以上を合わせると、培養 2 週目において起こる活動パターンの変化が、軸索の刈り込みを引き起こすことが示唆される。活動パターンの変化は(2R)-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) や CNQX といったグルタミン酸受容体の阻害剤でも引き起こすことができるため、今後薬剤の添加により引き起こした活動パターンの変化がクラスタ数に与える影響を評価することで、活動パターンと軸索の刈り込みの関係性を評価できる。

CX のクラスタ数は 14 DIC 以降に減少したのに対して、P19-neuron のクラスタは 8 DIC において初めて検出され、計測を行った 20 DIC までの間増加傾向を示した。P19-neuron を単独で培養した先行研究では、P19-neuron が播種後 3 日目までに神経突起を伸ばし始め、5 日目から 10 日目までの間に軸索と樹状突起の分離が起こったことが報告されている [Finley 1996; Takayama 2011]。先行研究と同様のタイムスケールで P19-neuron が成熟したと考えると、今回得られた結果は矛盾がないと考えられる。

14 DIC から 20 DIC までの間、同期バーストが起こった際に 7 割以上の割合で CX と P19-neuron の両方から活動が計測された。一方、CX と P19-neuron を共培養した先行研究では、18 日目において両者の同期バーストが観測されなくなったことが報告されている [Takayama 2012]。先行研究と本研究の活動パターンの違いは、電極を配置した場所の違いによると考えられる。先行研究では細胞体より活動を計測したのに対して、本研究では微小トンネル内の軸索から活動を計測した。P19-neuron は、培養日数の経過とともに凝集塊を形成し始め、凝集塊が大きくなると培養底面から剥離することが報告されている [Takayama 2011]。凝集により細胞が底面から剥離すると、細胞が電極に接しなくなるため、

活動を計測できる電極数が減少する。一方、第 2 章において述べたように、微小トンネル内から活動を計測する場合、微小トンネルにより信号源である軸索が電極上に固定されるため、細胞体が存在する領域での形態的な変化の影響を受けにくいと考えられる。以上をまとめると、微小トンネル内から活動計測を行ったことにより、培養区画内における形態の変化の影響を受けにくくなり、先行研究よりも長期間の活動計測に成功したことが示唆される。

5-6-5 CX と P19-neuron の間の伝導時間の違い

微小トンネルから計測した CX と P19-neuron の軸索の伝導速度を比較したところ、P19-neuron の方が有意に大きな値となった。また、両側の区画に CX を播種し伝導時間を比較しても、有意な差は見られなかった。以上の結果は、P19-neuron と CX の軸索には生理学的な違いがあることを示唆している。第 4 章で述べたようにオリゴデンドロサイトがミエリン鞘を形成していた可能性は低いと考えられる。無髄線維の伝導速度は、直径、分枝の位置や数、およびイオンチャネルの密度や分布によって決定されることが知られており [Bucher 2011]、CX と P19-neuron の軸索の間に上記の特性の違いがあったことが示唆される。先行研究においても、P19-neuron 同士がシナプスを形成した場合のシナプス後電流は、CX 同士のシナプスと比較して 20 分の 1 程度であることが報告されており [Finley 1996]、タンパク質の発現パターンに違いがある可能性が示唆されている。両者のタンパク質の発現量の違いを詳細に評価することにより、PSC-neuron と生体内の神経細胞の差異の解明につながる有用な知見が得られる可能性がある。今後、タンパク質の発現パターンや電気生理的な特性の比較を行うことが重要である。

5-6-6 miPS と CX の結合過程

単離状態で播種した miPS-neuron のクラスタは、計測期間を通してほとんど検出されなかった。一方、凝集状態で播種した miPS-neuron のクラスタは、10 DIC において多く検出されたが、15 DIC 以降はほとんど検出されなかった。以上の結果は、P19-neuron を用いた場合と異なる傾向を示している。本項では、播種時の形態の違いによる軸索の伸長速度、および微小トンネル内の軸索の状態について考察する。

凝集塊の状態で播種した場合、単離状態と比較して、細胞同士の接触によるシグナルが強く、細胞が放出した因子の濃度が局所的に高くなるため、神経突起の伸長の開始時期が早く、伸長速度が速いと考えられる。本研究においても、凝集塊状態で播種した場合、GFP による観察および MEA による自発活動計測の両方で、10 DAI には軸索が微小トンネルを通過したことが示された。一方、単離した状態では、軸索が微小トンネル内に伸長しなかった様子が観察された。以上から、軸索の伸長のみを考慮した場合、凝集塊の状態で播種することが適していたと考えられる。

微小トンネル内の軸索について、凝集塊で播種した結果を基に考察する。GFP を観察した結果、7 DIC では軸索が微小トンネル内に伸長したことが示された。14 DIC では、軸索が変性し断片化した様子が観察された。軸索が変性した理由として、神経細胞へのダメージおよび軸索に対するダメージの 2 つが考えられる。前述の通り、凝集塊の形状で細胞を培養した場合、細胞間のシグナルが強く、液性因子の濃度が高いことが想定される。上記の環境は増殖性細胞の細胞分裂を促進するため、培養区画内における非神経系細胞の数が増加しやすい。結果、培養区画内での栄養分の枯渇や代謝産物の濃度上昇が引き起こされ、神経細胞へ障害を与えたと考えられる。また、微小トンネル内の軸索に対するダメージも理由として挙げられる。GFP を観察した結果、微小トンネル内で突起状の構造を持たない細胞が増殖したことが示された。細胞の増殖により微小トンネル内の軸索が物理的に障害を受ける可能性がある。以上より、非神経系細胞の増殖は培養状態の悪化を導く可能性がある。

以上から、本研究で用いた手法により分化誘導した miPS-neuron において、単離状態では細胞の生存や生着の効率が低いこと、および凝集塊の形状は長期培養に適していなかったことが示唆された。今後、分化誘導条件の検討や播種時の形状を工夫することにより、miPS-neuron と初代培養細胞の共培養が達成できる。

5-6-7 P19-neuron と miPS-neuron の性質の違い

本章では、ring MEA 上で P19-neuron および miPS-neuron を培養した。本項では、両者が分化する可能性が高い神経細胞の種類、および神経系細胞に分化しなかった場合に分化する可能性のある細胞種の範囲について述べる。

P19 細胞については、ES 細胞や iPS 細胞のように特定の種類の神経細胞への分化誘導を行った例は報告されていない。しかし、中枢神経系の神経細胞に似た分化過程を示すことや [Staines 1994; Monzo 2012; Santiago 2005], P19-neuron をラット線条体に移植すると海馬や大脳皮質の錐体細胞に類似した状態に成熟すること [Magnuson 1995], 生体外で培養した際に中枢神経系の神経回路網に似た活動パターンを示すことが報告されている [Takayama 2011]。また、中枢神経系の細胞であるアストロサイトやオリゴデンドロサイトへと分化することも報告されている [Jones-Villeneuve 1982; Staines 1996]。神経伝達物質に着目すると、複数の種類のグルタミン酸受容体を発現し、グルタミン酸の添加により強い興奮毒性を示すこと [Turetsky 1993], および単独培養した場合に 80% のシナプスがグルタミン酸受容体を介した興奮性シナプスであることから [Finley 1996], グルタミン酸作動性神経細胞の割合が高いことが示唆される。以上をまとめると、P19-neuron の多くは、中枢神経系におけるグルタミン酸作動性神経細胞の特性を有することが示唆される。

miPS-neuron は、Watanabe らおよび Danjo らの手法を基本として神経系細胞への分化誘導を行った [Watanabe 2005; Danjo 2011]。マウス ES 細胞から分化した前脳の細胞は誘導因子を添加しない限り腹側の神経細胞へと分化することが報告されている [Gaspard

2008]. 本研究では, Watanabe らの手法を用いた際は誘導因子を添加しない条件を用い, Danjo らの手法を用いた際は *cyc* を添加したため, それぞれ大脳皮質腹側および背側の神経細胞が多く分化誘導されたと考えられる. したがって, 凝集塊の形状で播種した際の *miPS-neuron* の多くは, 前脳腹側由来の GABA 作動性神経細胞であり, 単離した条件の際はグルタミン酸作動性神経細胞が多く含まれたことが示唆される.

一般に, 多能性幹細胞の分化誘導を行った場合, 目的とした細胞種以外の細胞が混在する. P19 細胞は, 90%以上の効率で神経系細胞へと分化することが知られている [Jones-Villeneuve 1982]. また, *miPS* 細胞も, Watanabe らの手法を用いて分化誘導した場合 90%程度の割合で神経分化することが報告されている [Watanabe 2005]. どちらの細胞の分化効率も目的とした細胞を得るためには十分高いものの, 神経系に分化しなかった細胞が増殖性を有する場合, 培養中に非神経系細胞が増殖する可能性がある. Watanabe とも Danjo とも純粋な神経系細胞の集団を得るために, 蛍光輝度による細胞のソーティングを行った [Watanabe 2005; Danjo 2011]. 共培養系における増殖性細胞の混在は, 増殖した細胞が電極を覆うことによる有効電極数の減少や, 微小トンネル内で細胞が増殖することによる軸索の損傷を引き起こすことが考えられる. 今後, 分化誘導手法の改良により増殖性細胞の混入を可能な限り低減すること, 細胞のソーティングを行うこと, および細胞増殖を阻害する *cytosine arabinoside* を培養液中に添加することを検討する必要がある.

5-6-8 要件に対する考察

本章では, 神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築に向け, 長期的に計測できること, 移植細胞と宿主細胞の活動を区別して計測できること, および結合過程を定量的に評価できることの 3 点を要求仕様として設定した. 以下に, それぞれの要求仕様について考察する.

1 点目は, 長期的に計測できることである. MEA と PDMS 構造物による本手法を用いた場合, 1 ヶ月は活動計測が可能であることが示された. 第 3 章で述べた通り, マウスやラットの神経回路網は 1 ヶ月程度で成熟することが報告されている [Mukai 2003]. したがって, 本手法は, 1 点目の要求仕様を満たしていると考えられる.

2 点目は, 移植細胞と宿主細胞の活動を区別して計測できることである. 内側に播種する細胞種を変更した実験から, 細胞種に応じて外向きの伝導が占める割合が変化することが示された. また, 変化の傾向は, 変更した条件が意図した変化と同様であった. 以上から, 微小トンネル内に伸長した軸索の伝導方向から, 細胞種を区別できることが示された. したがって, 2 点目の要求仕様を満たしたと考えられる.

3 点目は, 結合過程を定量的に評価できることである. P19-neuron を用いた実験から, 培養日数の経過に伴い P19-neuron の軸索が増加する傾向を観察した. また, 凝集塊の形状で *miPS-neuron* を共培養した実験からは, GFP の観察により得られた軸索の形状と, 活動

計測により示された結果が一致することが示された。以上から、本手法を用いることで、異なる細胞種の結合過程を定量的に評価できると考えられる。

以上より、本章において構築した共培養系および評価手法は、神経系細胞の移植を模擬した実験系として適当であることが示された。

5-6-9 得られた結果の新規性

本項では、本章において得られた結果が有する新規性について考察する。

1点目は、微小トンネルから軸索における伝導方向を指標とすることで、異なる培養区画内で培養した神経細胞の結合過程を定量的に評価できることを示した点である。これまで、異種の神経細胞の共培養は行われているが、両者が形成した結合の定量的な評価は行われていない [Takayama 2012; Kanagasabapathi 2012]。一方、本手法を用いることで、結合過程の定量的な評価が可能となった。今後、移植を模した系のみではなく、異なる特性を持った神経回路網同士が結合した場合に、集団としての活動はどう変化するかについての研究にも応用できると考えられる。

2点目は、神経発生のモデル細胞として用いられている P19-neuron と凝集塊の形状で播種した miPS-neuron について、CX との結合過程を示した点である。PSC-neuron を生体内に移植する研究 [Ben-Hur 2010] やスライス切片上に播種する研究 [Tonnesen 2011; Avaliani 2014] は行われているが、細胞種や播種時の形態による結合過程の違いを示したのは本研究が初めてである。

5-7 まとめ

本章では、神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築を目的とし、PSC-neuron による神経回路網と初代培養神経回路網間の結合形成に伴う同期活動の変化を評価した。以下に、CX と P19-neuron の共培養実験、および CX と miPS-neuron の共培養実験の結果により得られた知見についてまとめる。

P19-neuron と CX を ring MEA 内で共培養した。最初に、calcein を用いて、P19-neuron および CX の神経突起を選択的に染色し、両細胞が互いに軸索を投射したことを示した。次に、内側の培養区画で培養する細胞の種類を変えることにより、伝導を指標として細胞体が存在する区画を識別可能であることを示した。続いて、発達過程におけるクラスタ数の変化を評価した。結果、CX のクラスタは、14 DIC まで増加傾向を示した後、減少傾向を示した。一方、P19-neuron のクラスタは 8 DIC において初めて検出され、20 DIC まで増加傾向を示した。また、神経回路網間における同期率を評価することにより、両者のクラスタの数が増加した時期から、神経回路網全体での同期活動の割合が上昇したことが示された。以上より、軸索から計測された活動を指標とすることで、結合の形成過程を定量的に評価できることが示唆された。

miPS-neuron と CX を ring MEA 内で共培養した。単離した状態で miPS-neuron を播種した場合、miPS-neuron の軸索はほとんど微小トンネル内に伸長しないことが示された。一方、凝集塊の形状で播種した場合、7 DIC において miPS-neuron が発現した GFP を蛍光観察したところ、神経突起が CX 側の区画まで伸長したことが確認できた。しかし、14 DIC においては、miPS-neuron の軸索が変性し断片化した様子が観察された。また、軸索から計測した活動からクラスタの数を評価したところ、10 DIC においては miPS-neuron のクラスタが検出された。しかし、15 DIC 以降は、miPS-neuron のクラスタがほとんど検出されなかった。

以上の知見が得られたことから、神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築には成功したと考えられる。しかし、miPS-neuron の軸索を安定して検出できた期間が 10 DIC であったことから、分化誘導条件および播種条件の改良が必要であると考えられる。

第 6 章

結論

6-1 結論

本研究の目的は、神経系の疾患に対する再生医療の実現に向けて、幹細胞から神経系細胞までの分化過程、神経系細胞の発達過程、および幹細胞由来の神経組織と宿主組織の結合過程において、工学的アプローチから評価および制御を行う技術を提供することであった。目的の達成に向け、4点の検討課題を設定し研究を行った。本節では、最初に、得られた結果が有する意義について、サイエンスとしての意義、および医療応用や創薬といった応用面での意義に分けて述べる。次に、各章における検討課題について、概要と得られた結果をまとめる。最後に、本論文の結論を述べる。

サイエンスとしての意義

1点目は、ヒト iPS 細胞における細胞周期と Ca 変動の関係である。先行研究では、薬剤を用いて細胞周期のステージを同期した際の Ca 変動の頻度が評価されており [Kapur 2007]、個々の細胞における細胞周期と Ca 変動の関係を直接示した例はない。一方、本研究では、Ca imaging を行った視野での細胞周期解析により、それぞれの細胞において細胞周期のステージと Ca 変動の頻度を評価し、G0/G1 期の細胞において Ca 変動を示す割合が高いことを示した。本成果は、細胞周期と Ca 変動の関係を直接示したことに意義があり、両者に関連の深い細胞分化や発生に関する現象を考察する上で重要である。

2点目は、ヒト神経細胞が形成した神経回路網の発達過程が、マウスやラットと同様の傾向をたどるものの、要する期間が異なることである。要する期間の違いは、生物種の違いに起因すると考えられる。したがって、本成果は、生体外に取り出し分散した状態においても、マウス、ラットおよびヒトといった生物種の情報が保存されることを示す。

3点目は、自発活動による伝導速度変化の誘発である。本研究では、微小トンネルを伸長した複数の軸索の活動をクラスタリングする手法を開発した。結果、それぞれの軸索において自発活動により誘発される伝導時間の変化を示した。伝導時間の変化は、先行研究では電気刺激を用いて引き起こされていた。本成果は、電気刺激が伝導時間変化の必要条件ではないことを示したことに意義があり、軸索における伝導時間の調節が生体内においても機能することを示唆する。

医療応用・創薬における意義

1点目は、電気刺激を用いた分化誘導法である。本研究では、未分化状態のヒト iPS 細胞に対して電気刺激を印加することで、分化方向を調節できる可能性を示した。電気刺激の印加による分化誘導方法が実現した場合、従来手法である薬剤の添加および培養液の置換と比較して、低コストでヒト iPS 細胞を分化誘導できることが見込まれる。したがって、医療のコストを抑える意味で、重要な成果である。

2点目は、ヒト神経細胞の安定した活動計測手法である。第3章において開発した手法を用いることで、少なくとも250日間にわたってhiPS-neuronの活動を計測できる。薬剤開発において重要なステップである神経毒性の評価系として、hiPS-neuronには注目が集まっており、長期間にわたり活動計測できる本手法の需要は大きいと考えられる。また、遺伝的疾患を有する患者から樹立した疾患特異的iPS細胞は、神経分化後に疾患と同様の形質を示すことが知られており[Egawa 2012]、本計測系と組み合わせることで、薬効の評価系としての運用が可能である。

3点目は、移植を模擬した実験系である。本研究により、移植細胞とホスト細胞の相互作用および結合過程が定量的に評価できるようになった。今後、疾患の微小環境を模した条件でPSC-neuronとホスト神経回路網を共培養することで、移植の条件を検討する際の実験系として用いることが可能である。

各章の結論

第2章 物理的刺激を用いたヒトiPS細胞の分化誘導手法の開発

医療応用のためには、高い純度や品質を有する細胞を分化誘導する必要がある。分化誘導条件の最適化が重要である。分化誘導条件の最適化には、制御性に優れ、一度に多数の条件検討が可能な分化誘導手法が要求される。上記の課題は、物理的刺激を用いることで解決できる。そこで、物理的刺激によりヒトiPS細胞を高効率で神経系細胞へ分化誘導する手法の開発を目的として実験を行った。

分化初期のヒトiPS細胞由来神経系細胞のCa変動を評価した結果、3DAIまでは個々の細胞が独立にCa変動を示したが、6DAIではCa waveの発生が観察された。したがって、分化の段階に応じて、神経系細胞のCa変動のパターンが変化することが示された。また、未分化状態のヒトiPS細胞に対して、核染色画像を用いた細胞周期解析とCa imagingを行った。結果、G2/M期の細胞の割合が高い区画においては、Ca変動を示す細胞の割合が有意に低かった。上記の結果より、ヒト多能性幹細胞における、Ca変動と細胞周期のステージの関係を示した。さらに、ヒトiPS細胞に対して電気刺激を行い、短期的な応答および長期的な応答を評価した。結果、電気刺激により、ヒトiPS細胞のCa変動が誘発されることが示された。また、慢性的に刺激を印加した場合、3日後にPAX6の発現量が上昇したことが示された。

以上の知見が得られたことから、本章の目的である物理的刺激によりヒトiPS細胞を高効率で神経系細胞へ分化誘導する手法の開発について、刺激デバイスの開発と有効性の評価まで達成できたと考えられる。

第3章 発達過程における神経回路網レベルでの機能評価手法の構築

移植前には、機能面から細胞の品質を評価する必要がある。神経細胞に求められる機能は、周囲の神経細胞と協調動作し、脳の機能を維持することである。そこで、神経回路網レベルの活動評価が可能な MEA を用いることが適切であると考え、発達段階に依存した hiPS-neuron の活動パターンの評価を目的として実験を行った。

ヒト iPS 細胞から分化誘導した大脳皮質神経細胞を MEA 上で培養し、活動計測を行った。結果、70 DAI において長い IBI を有する活動パターンが観測された。神経回路網の発達過程において、同期バーストの持続時間と IBI が低下傾向を示し、バースト率と burstiness は上昇傾向を示した。本傾向は、std-MEA と axon MEA の両方において観察された。また、axon MEA を用いることで、従来手法と比較して、長い期間、多くの電極から活動を計測できることが示された。

以上の知見が得られたことから、本章で目的として設定した、発達段階に依存した hiPS-neuron の活動パターンの評価を行うための手法の開発に成功したと考えられる。一方、ヒト神経細胞の活動が安定するまでに要する期間については、計測した 300 DAI までのデータからは明らかにすることができなかった。今後、axon MEA を用いた計測を継続して行い、burstiness の変化が見られなくなるまでに要する期間を評価することが重要である。

第4章 発達過程における細胞内機能発現の評価手法の開発

多能性幹細胞より分化誘導した神経細胞の機能評価において、長期的に細胞内の状態を示すデータを取得する方法の開発が求められている。微小トンネル内に配置した電極から、軸索を伝導する活動を計測可能である。軸索を伝導する活動からは、発火時刻の情報に加えて、細胞内のタンパク質の発現を反映する可能性が高い伝導時間の情報を取得可能である。そこで、PSC-neuron の細胞内における機能発現を長期的に評価できる手法の開発を目的に設定し、実験を行った。

自発活動から軸索を伝導する活動を検出し、バースト活動による伝導時間の変化を評価したところ、バースト活動に応じて軸索の伝導時間が増加することが示された。次に、軸索に対して連続的な電気刺激を印加したところ、刺激に応じて伝導時間が増加した。h 電流を阻害した場合、伝導時間の増加率が高かった。自発的な変化と、同様の強度の刺激により想定される変化を比較したところ、5 DIV においては自発的な変化の方が大きいものの、10 DIV 以降は刺激による推定変化率の方が大きいことが示された。最後に、hiPS-neuron に対して、自発活動からの伝導検出を行った。結果、hiPS-neuron においても、バースト活動による伝導時間の増加が観察された。

以上の結果より、本章の目的である、PSC-neuron の細胞内機能発現の過程を長期的に取得できる手法の開発が達成されたと考えられる。今後、本手法を用いて計測された指標が、

細胞内のどのタンパク質の情報を有するかについての評価を行うことで、細胞内機能発現の評価が可能になる。

第 5 章 神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築

疾患部位や損傷部位の環境は理想的な培養条件とは異なる可能性が高く、細胞の移植と同時に薬剤等による補助が必要となる可能性が考えられる。また、移植細胞の結合により、ホスト回路網の活動が変化し、機能面で予期しない結果を導く可能性がある。したがって、想定される環境を実現した上で、神経細胞の活動を指標として移植細胞とホスト細胞の関係を評価することが重要である。そこで、神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築を目的とし、PSC-neuron による神経回路網と初代培養神経回路網間の結合形成に伴う同期活動の変化を評価した。

ring MEA の外側の培養区画に CX を培養し、内側の培養区画で培養する細胞の種類を変えることにより、伝導の方向を指標として細胞が存在する培養区画を識別可能であることを示した。次に、P19-neuron と CX を共培養し、発達過程において、軸索を示すクラスタ数の変化を評価した。結果、CX のクラスタは、14 DIC まで増加傾向を示した後、減少傾向を示した。一方、P19-neuron のクラスタは 8 DIC において初めて検出され、20 DIC まで増加傾向を示した。神経回路網間における同期率を評価することにより、両者のクラスタの数が増加した時期から、神経回路網全体での同期活動の割合が上昇したことが示された。最後に、miPS-neuron と CX を ring MEA 内で共培養した。単離した状態で播種した場合、miPS-neuron の軸索はほとんど微小トンネル内に伸長しないことが示された。一方、凝集塊の形状で播種した場合、miPS-neuron の神経突起が微小トンネル内へ伸長したことが確認できた。また、クラスタの数を評価したところ、10 DIC においてはクラスタが検出されたが、15 DIC 以降はほとんど検出されなかった。

以上の知見が得られたことから、神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築に成功したと考えられる。しかし、miPS-neuron の軸索を安定して検出できた期間が 10 DIC であったことから、分化誘導条件および播種条件の改良が必要であると考えられる。

以上より、設定した 4 点の検討課題に対する研究を基に、幹細胞から神経系細胞までの分化過程、神経系細胞の発達過程、および幹細胞由来の神経組織とホスト組織の結合過程において、工学的アプローチから評価および制御を行う技術が実現され、神経系の疾患に対する再生医療の実現に向けて有用な知見が得られる可能性を示した。

6-2 展望

前節において、各章の結論を述べた。本節では、それぞれの検討課題について、課題と展望について述べる。

1) 物理的刺激を用いたヒト iPS 細胞の分化誘導手法の開発

第 2 章では、Ca 変動の可視化を行い、未分化状態の iPS 細胞および分化初期の神経系細胞において Ca 変動が起こることを示した。一方、Ca 変動を制御することにより、細胞周期、増殖および分化といった細胞の機能を制御可能であるかについては、未確認である。今後、電気刺激による Ca 変動の誘導を通して細胞の機能を制御可能であるかについて検討する必要がある。また、刺激の強度や印加する時期の変化が、分化運命や分化効率に与える影響を評価することも重要である。

本手法が実現した場合、精密な時間窓で $[Ca^{2+}]_i$ を制御可能になると考えられる。精密な時間窓での刺激が可能となることで、分化誘導効率の向上だけでなく、分化過程における critical period の期間を正確に評価できるようになる。また、分化過程における critical period の期間は、iPS 細胞の株間のばらつきを評価するための指標としても利用できる。

2) 発達過程における神経回路網レベルでの機能評価手法の構築

第 3 章において、同期バーストの特徴を指標として発達過程の評価を行った。さらに活動計測を続けることにより、活動が安定する時期を特定することが次の課題である。

MEA を用いることで、発達過程において神経回路網レベルで機能評価ができることが示された。活動パターンや発達過程の評価を通して、ヒトとマウスという種の違いがもたらす差を評価することは生物学の観点から有用である。また、疾患特異的な遺伝子型を有する iPS 細胞から分化誘導した神経細胞を用いることで、特定の疾患の発現型を神経回路網レベルでの活動から評価でき、医学分野において有用な知見の獲得を期待できる。

3) 発達過程における細胞内機能発現の評価手法の開発

第 4 章において、活動パターンに依存した神経細胞内における信号伝播の変化を評価した。自発活動と電気刺激が、同程度の頻度および回数であった場合に、伝導時間の増加率が同程度となるかは、興味深い課題である。また、刺激の頻度依存性について、h 電流が関与した可能性を示唆する結果が得られたが、発生機序の解明のためにはより詳細な評価を行う必要がある。また、本研究で用いた寸法では、複数の軸索が微小トンネルに伸長したため、複数の軸索の応答が重畳された波形を計測した。微小トンネルのサイズを変更し、1本の軸索のみが伸長可能な微小トンネルを用いて実験を行うことも重要である。

軸索における伝導時間の変化というミクロなレベルの現象が、神経回路網や脳といったマクロなレベルの機能に与える影響を評価することは、興味深いテーマである。神経回路網の数理モデルを用いた研究において、軸索の伝導時間を定数ではなく、活動依存性の変数とするというアプローチが考えられる。変数の設定においては、本研究で評価した頻度依存性や、刺激の影響からの回復時間が有用な知見となる。

4) 神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築

第5章では、P19-neuronについては結合過程の評価を行うことができたが、miPS-neuronについては培養条件が適切でなかったことが示された。今後、培養条件を最適化した上で、miPS-neuron と CX の結合過程を評価し、P19-neuron を用いた場合と比較することが必要である。また、miPS-neuron は、グルタミン酸作動性や GABA 作動性の神経細胞に選択的に分化誘導できるため、内側の培養区画で培養する神経細胞の興奮と抑制のバランスを調節することが可能である。内側に培養する神経細胞の性質を変更した場合に、神経回路網全体の活動パターンに起こる影響を評価することは、重要な課題である。

神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築のためには、疾患の環境を模擬することが重要である。そこで、パーキンソン病、アルツハイマー病および脊髄損傷といった環境を模擬し、それぞれ miPS 細胞から分化誘導したそれぞれドーパミン作動性神経細胞、アセチルコリン作動性神経細胞および運動神経細胞といった神経細胞を用いて研究することで、疾患モデルとしての適用が可能である。

謝辞

本研究を進めるに当たり、多くの方々にお世話になりました。この場を借りて御礼申し上げます。

学部 4 年生の時に配属されてから、研究におけるものの考え方を教えていただき、自分で考えて研究を進めてよいという大変贅沢な環境を提供してくださった、指導教員である**東京大学大学院 工学系研究科 精密工学専攻 教授 神保泰彦 先生**に厚く御礼申し上げます。卒論配属の際、自分の直感に従い神保小谷研究室を希望しましたが、ベストな選択であったと今でも思っています。

研究に関して適切な助言をいただくだけでなく、研究の様々な方向への発展性を示してくださった**東京大学 先端科学技術研究センター 准教授 小谷潔 先生**に厚く御礼申し上げます。今後も、ミクロな系において見られる現象と、マクロな機能の関係について議論できたら幸いです。

神保小谷研究室の先輩、同期および後輩の皆様には、研究を進める上で、様々なタイミングで助けていただきました。皆様と一緒に進めてきたからこそ、楽しく研究ができたと思っています。ありがとうございました。特に、本論文の執筆に当たって、**酒井洸児氏**、および**飯田尚子氏**に大変お世話になりました。ここに厚く御礼申し上げます。

2016 年 2 月 9 日 榛葉健太

参考文献

- Abematsu M., K. Tsujimura, M. Yamano, M. Saito, K. Kohno, J. Kohyama, M. Namiyama, S. Komiya and K. Nakashima (2010) Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *J Clin Invest*, 120(9), 3255-3266.
- Avaliani N., A. T. Sorensen, M. Ledri, J. Bengzon, P. Koch, O. Brustle, K. Deisseroth, M. Andersson and M. Kokaia (2014) Optogenetics reveal delayed afferent synaptogenesis on grafted human-induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors. *Stem Cells*, 32(12), 3088-3098.
- Bakkum D. J., Z. C. Chao and S. M. Potter (2008) Long-term activity-dependent plasticity of action potential propagation delay and amplitude in cortical networks. *PLoS One*, 3(5), e2088.
- Bakkum D. J., U. Frey, M. Radivojevic, T. L. Russell, J. Muller, M. Fiscella, H. Takahashi and A. Hierlemann (2013) Tracking axonal action potential propagation on a high-density microelectrode array across hundreds of sites. *Nat Commun*, 4, 2181.
- Ban J., P. Bonifazi, G. Pinato, F. D. Broccard, L. Studer, V. Torre and M. E. Ruaro. (2007). Embryonic stem cell-derived neurons form functional networks in vitro. *Stem Cells*, 25(3), 738-749.
- Becker K. A., P. N. Ghule, J. A. Therrien, J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. van Wijnen and G. S. Stein (2006) Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol*, 209(3), 883-893.
- Ben-Hur T. (2010) Reconstructing neural circuits using transplanted neural stem cells in the injured spinal cord. *J Clin Invest*, 120(9), 3096-3098.
- Bender R. A., T. Kirschstein, O. Kretz, A. L. Brewster, C. Richichi, C. Ruschenschmidt, R. Shigemoto, H. Beck, M. Frotscher and T. Z. Baram (2007) Localization of HCN1 channels to presynaptic compartments: novel plasticity that may contribute to hippocampal maturation. *J Neurosci*, 27(17), 4697-4706.

- Bernardo A. S., T. Faial, L. Gardner, K. K. Niakan, D. Ortmann, C. E. Senner, E. M. Callery, M. W. Trotter, M. Hemberger, J. C. Smith, L. Bardwell, A. Moffett and R. A. Pedersen (2011) BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages. *Cell Stem Cell*, 9(2), 144-155.
- Bonifazi P., M. E. Ruaro and V. Torre (2005) Statistical properties of information processing in neuronal networks. *Eur J Neurosci*, 22(11), 2953-2964.
- Brewer G. J. (1999) Regeneration and proliferation of embryonic and adult rat hippocampal neurons in culture. *Exp Neurol*, 159(1), 237-247.
- Brewer G. J., M. D. Boehler, S. Leondopulos, L. Pan, S. Alagapan, T. B. Demarse and B. C. Wheeler (2013) Toward a self-wired active reconstruction of the hippocampal trisynaptic loop: DG-CA3. *Front Neural Circuits*, 7, 165.
- Bucher D. and J. M. Goaillard (2011) Beyond faithful conduction: short-term dynamics, neuromodulation, and long-term regulation of spike propagation in the axon. *Prog Neurobiol*, 94(4), 307-346.
- Campenot R. B. (1977) Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(10), 4516-4519.
- Campos L. S., D. P. Leone, J. B. Relvas, C. Brakebusch, R. Fassler, U. Suter and C. ffrench-Constant (2004) Beta1 integrins activate a MAPK signalling pathway in neural stem cells that contributes to their maintenance. *Development*, 131(14), 3433-3444.
- Carpenter A. E., T. R. Jones, M. R. Lamprecht, C. Clarke, I. H. Kang, O. Friman, D. A. Guertin, J. H. Chang, R. A. Lindquist, J. Moffat, P. Golland and D. M. Sabatini (2006) CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol*, 7(10), R100.
- Caviness V. S., Jr., T. Takahashi and R. S. Nowakowski (1995) Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci*, 18(9), 379-383.

- Chambers S. M., C. A. Fasano, E. P. Papapetrou, M. Tomishima, M. Sadelain and L. Studer (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*, 27(3), 275-280.
- Chen W. C., P. H. Wu, J. M. Phillip, S. B. Khatau, J. M. Choi, M. R. Dallas, K. Konstantopoulos, S. X. Sun, J. S. Lee, D. Hodzic and D. Wirtz (2013) Functional interplay between the cell cycle and cell phenotypes. *Integr Biol (Camb)*, 5(3), 523-534.
- Chiappalone M., M. Bove, A. Vato, M. Tedesco and S. Martinoia (2006) Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain Res*, 1093(1), 41-53.
- Chida K., K. Kaneko, S. Fujii and Y. Yamazaki (2015) Activity-dependent modulation of the axonal conduction of action potentials along rat hippocampal mossy fibers. *Eur J Neurosci*, 41(1), 45-54.
- Chin M. H., M. J. Mason, W. Xie, S. Volinia, M. Singer, C. Peterson, G. Ambartsumyan, O. Aimiwu, L. Richter, J. Zhang, I. Khvorostov, V. Ott, M. Grunstein, N. Lavon, N. Benvenisty, C. M. Croce, A. T. Clark, T. Baxter, A. D. Pyle, M. A. Teitell, M. Pelegri, K. Plath and W. E. Lowry (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*, 5(1), 111-123.
- Chu J. U., M. J. Jeong, K. I. Song, H. C. Lee, J. Kim, Y. J. Kim, K. Choi, J. K. Suh and I. Youn (2012) Spontaneous synchronized burst firing of subthalamic nucleus neurons in rat brain slices measured on multi-electrode arrays. *Neurosci Res*, 72(4), 324-340.
- Chung Y., I. Klimanskaya, S. Becker, T. Li, M. Maserati, S. J. Lu, T. Zdravkovic, D. Ilic, O. Genbacev, S. Fisher, A. Krtolica and R. Lanza (2008) Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*, 2(2), 113-117.
- Claverol-Tinture E. and J. Pine (2002) Extracellular potentials in low-density dissociated neuronal cultures. *J Neurosci Methods*, 117, 13-21.
- Clelland C. D., M. Choi, C. Romberg, G. D. Clemenson, Jr., A. Fragniere, P. Tyers, S. Jessberger, L. M. Saksida, R. A. Barker, F. H. Gage and T. J. Bussey (2009) A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation.

- Cooper J. A. (2008) A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. *Trends Neurosci*, 31(3), 113-119.
- Cooper M. W. and S. J. Smith (1992) A real-time analysis of growth cone-target cell interactions during the formation of stable contacts between hippocampal neurons in culture. *J Neurobiol*, 23, 814-828.
- Coronado D., M. Godet, P. Y. Bourillot, Y. Taponnier, A. Bernat, M. Petit, M. Afanassieff, S. Markossian, A. Malashicheva, R. Iacone, K. Anastassiadis and P. Savatier (2013) A short G1 phase is an intrinsic determinant of naive embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cell Res*, 10(1), 118-131.
- Danjo T., M. Eiraku, K. Muguruma, K. Watanabe, M. Kawada, Y. Yanagawa, J. L. Rubenstein and Y. Sasai (2011) Subregional specification of embryonic stem cell-derived ventral telencephalic tissues by timed and combinatorial treatment with extrinsic signals. *J Neurosci*, 31(5), 1919-1933.
- De Col R., K. Messlinger and R. W. Carr (2008) Conduction velocity is regulated by sodium channel inactivation in unmyelinated axons innervating the rat cranial meninges. *J Physiol*, 586(4), 1089-1103.
- De Col R., K. Messlinger and R. W. Carr (2012) Repetitive activity slows axonal conduction velocity and concomitantly increases mechanical activation threshold in single axons of the rat cranial dura. *J Physiol*, 590(Pt 4), 725-736.
- Debanne D. (2004) Information processing in the axon. *Nat Rev Neurosci*, 5(4), 304-316.
- Dworak B. J. and B. C. Wheeler (2009) Novel MEA platform with PDMS microtunnels enables the detection of action potential propagation from isolated axons in culture. *Lab Chip*, 9(3), 404-410.
- Edwards M. K., J. F. Harris and M. W. McBurney (1983) Induced muscle differentiation in an embryonal carcinoma cell line. *Mol Cell Biol*, 3(12), 2280-2286.
- Egawa N., S. Kitaoka, K. Tsukita, M. Naitoh, K. Takahashi, T. Yamamoto, F. Adachi, T. Kondo, K. Okita, I. Asaka, T. Aoi, A. Watanabe, Y. Yamada, A. Morizane, J. Takahashi, T.

- Ayaki, H. Ito, K. Yoshikawa, S. Yamawaki, S. Suzuki, D. Watanabe, H. Hioki, T. Kaneko, K. Makioka, K. Okamoto, H. Takuma, A. Tamaoka, K. Hasegawa, T. Nonaka, M. Hasegawa, A. Kawata, M. Yoshida, T. Nakahata, R. Takahashi, M. C. Marchetto, F. H. Gage, S. Yamanaka and H. Inoue (2012) Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med*, *4*(145), 145ra104.
- Eriksson P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson and F. H. Gage (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, *4*(11), 1313-1317.
- Esposti F., M. G. Signorini, S. M. Potter and S. Cerutti (2009) Statistical long-term correlations in dissociated cortical neuron recordings. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*, *17*(4), 364-369.
- Estivill-Torrus G., H. Pearson, V. van Heyningen, D. J. Price and P. Rashbass (2002) Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development*, *129*(2), 455-466.
- Evans M. J. and M. H. Kaufman (1981) Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature*, *292*(5819), 154-156.
- Fasano C. A., S. M. Chambers, G. Lee, M. J. Tomishima and L. Studer (2010) Efficient derivation of functional floor plate tissue from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, *6*(4), 336-347.
- Finley M. F., N. Kulkarni and J. E. Huettner (1996) Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J Neurosci*, *16*(3), 1056-1065.
- Fino E., J. M. Deniau and L. Venance (2008) Cell-specific spike-timing-dependent plasticity in GABAergic and cholinergic interneurons in corticostriatal rat brain slices. *J Physiol*, *586*(1), 265-282.
- Firmin L., P. Field, M. A. Maier, A. Kraskov, P. A. Kirkwood, K. Nakajima, R. N. Lemon and M. Glickstein (2014) Axon diameters and conduction velocities in the macaque

pyramidal tract. *J Neurophysiol*, 112(6), 1229-1240.

Forostyak O., N. Romanyuk, A. Verkhatsky, E. Sykova and G. Dayanithi (2013) Plasticity of calcium signaling cascades in human embryonic stem cell-derived neural precursors. *Stem Cells Dev*, 22(10), 1506-1521.

Garofalo M., T. Nieuw, P. Massobrio and S. Martinoia (2009) Evaluation of the performance of information theory-based methods and cross-correlation to estimate the functional connectivity in cortical networks. *PLoS One*, 4(8), e6482.

Gaspard N., T. Bouchet, R. Hourez, J. Dimidschstein, G. Naeije, J. van den Amele, I. Espuny-Camacho, A. Herpoel, L. Passante, S. N. Schiffmann, A. Gaillard and P. Vanderhaeghen (2008) An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature*, 455(7211), 351-357.

Gaspard N. and P. Vanderhaeghen (2010) Mechanisms of neural specification from embryonic stem cells. *Curr Opin Neurobiol*, 20(1), 37-43.

Ge S., C. H. Yang, K. S. Hsu, G. L. Ming and H. Song (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54(4), 559-566.

Gerdts J., Y. Sasaki, B. Vohra, J. Marasa and J. Milbrandt (2011) Image-based screening identifies novel roles for I κ B kinase and glycogen synthase kinase 3 in axonal degeneration. *J Biol Chem*, 286(32), 28011-28018.

Ghosh Z., K. D. Wilson, Y. Wu, S. Hu, T. Quertermous and J. C. Wu (2010) Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS One*, 5(2), e8975.

Ghule P. N., R. Medina, C. J. Lengner, M. Mandeville, M. Qiao, Z. Dominski, J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. van Wijnen and G. S. Stein (2011) Reprogramming the pluripotent cell cycle: restoration of an abbreviated G1 phase in human induced pluripotent stem (iPS) cells. *J Cell Physiol*, 226(5), 1149-1156.

Goel A. and D. V. Buonomano (2013) Chronic electrical stimulation homeostatically decreases

- spontaneous activity, but paradoxically increases evoked network activity. *J Neurophysiol*, 109(7), 1824-1836.
- Goel A. and D. V. Buonomano (2014) Timing as an intrinsic property of neural networks: evidence from in vivo and in vitro experiments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1637), 20120460.
- Greber B., G. Wu, C. Bernemann, J. Y. Joo, D. W. Han, K. Ko, N. Tapia, D. Sabour, J. Sternecker, P. Tesar and H. R. Scholer (2010) Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 6(3), 215-226.
- Greig L. C., M. B. Woodworth, M. J. Galazo, H. Padmanabhan and J. D. Macklis (2013) Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*, 14(11), 755-769.
- Gross G. W. (1979) Simultaneous single unit recording in vitro with a photoetched laser deinsulated gold multimicroelectrode surface. *IEEE Trans Biomed Eng*, 26(5), 273-279.
- Habibey R., A. Golabchi, S. Latifi, F. Difato and A. Blau (2015) A microchannel device tailored to laser axotomy and long-term microelectrode array electrophysiology of functional regeneration. *Lab Chip*, 15(24), 4578-4590.
- Ham M. I., L. M. Bettencourt, F. D. McDaniel and G. W. Gross (2008) Spontaneous coordinated activity in cultured networks: analysis of multiple ignition sites, primary circuits, and burst phase delay distributions. *J Comput Neurosci*, 24(3), 346-357.
- Hampton D. W., D. J. Webber, B. Bilican, M. Goedert, M. G. Spillantini and S. Chandran (2010) Cell-mediated neuroprotection in a mouse model of human tauopathy. *J Neurosci*, 30(30), 9973-9983.
- Hanashima C., S. C. Li, L. Shen, E. Lai and G. Fishell (2004) Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science*, 303(5654), 56-59.
- Hebert J. M. and G. Fishell (2008) The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat Rev Neurosci*, 9(9), 678-685.

- Horwitz G. C., A. Lelli, G. S. Geleoc and J. R. Holt (2010) HCN channels are not required for mechanotransduction in sensory hair cells of the mouse inner ear. *PLoS One*, *5*(1), e8627.
- Hou P., Y. Li, X. Zhang, C. Liu, J. Guan, H. Li, T. Zhao, J. Ye, W. Yang, K. Liu, J. Ge, J. Xu, Q. Zhang, Y. Zhao and H. Deng (2013) Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, *341*(6146), 651-654.
- Hou P. S., C. Y. Chuang, C. F. Kao, S. J. Chou, L. Stone, H. N. Ho, C. L. Chien and H. C. Kuo (2013) LHX2 regulates the neural differentiation of human embryonic stem cells via transcriptional modulation of PAX6 and CER1. *Nucleic Acids Res*, *41*(16), 7753-7770.
- Hu B. Y., J. P. Weick, J. Yu, L. X. Ma, X. Q. Zhang, J. A. Thomson and S. C. Zhang (2010) Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(9), 4335-4340.
- Hu B. Y. and S. C. Zhang (2009) Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc*, *4*(9), 1295-1304.
- Hu Q., A. M. Friedrich, L. V. Johnson and D. O. Clegg (2010) Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. *Stem Cells*, *28*(11), 1981-1991.
- Hwang Y. S., B. G. Chung, D. Ortmann, N. Hattori, H. C. Moeller and A. Khademhosseini (2009) Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate via differential expression of WNT5a and WNT11. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(40), 16978-16983.
- Illes S., S. Theiss, H. P. Hartung, M. Siebler and M. Dihne (2009) Niche-dependent development of functional neuronal networks from embryonic stem cell-derived neural populations. *BMC Neurosci*, *10*, 93.
- Inoue T., S. Nakamura and N. Osumi (2000) Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Dev Biol*, *219*(2), 373-383.

- Ito D., T. Komatsu and K. Gohara (2013) Measurement of saturation processes in glutamatergic and GABAergic synapse densities during long-term development of cultured rat cortical networks. *Brain Res*, 1534, 22-32.
- Ito S., F. C. Yeh, E. Hiolski, P. Rydygier, D. E. Gunning, P. Hottowy, N. Timme, A. M. Litke and J. M. Beggs (2014) Large-scale, high-resolution multielectrode-array recording depicts functional network differences of cortical and hippocampal cultures. *PLoS One*, 9(8), e105324.
- Jiang P., S. N. Rushing, C. W. Kong, J. Fu, D. K. Lieu, C. W. Chan, W. Deng and R. A. Li (2010) Electrophysiological properties of human induced pluripotent stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(3), C486-495.
- Jimbo Y., N. Kasai, K. Torimitsu, T. Tateno and H. P. Robinson (2003) A system for MEA-based multisite stimulation. *IEEE Trans Biomed Eng*, 50(2), 241-248.
- Jimbo Y., T. Tateno and H. P. Robinson (1999) Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophys J*, 76(2), 670-678.
- Jones-Villeneuve E. M., M. W. McBurney, K. A. Rogers and V. I. Kalnins (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol*, 94(2), 253-262.
- Jun S. B., M. R. Hynd, K. L. Smith, J. K. Song, J. N. Turner, W. Shain and S. J. Kim (2007) Electrical stimulation-induced cell clustering in cultured neural networks. *Med Biol Eng Comput*, 45(11), 1015-1021.
- Kamao H., M. Mandai, S. Okamoto, N. Sakai, A. Suga, S. Sugita, J. Kiryu and M. Takahashi (2014) Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports*, 2(2), 205-218.
- Kamentsky L., T. R. Jones, A. Fraser, M. A. Bray, D. J. Logan, K. L. Madden, V. Ljosa, C. Rueden, K. W. Eliceiri and A. E. Carpenter (2011) Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software.

Bioinformatics, 27(8), 1179-1180.

Kamioka H., E. Maeda, Y. Jimbo, H. P. Robinson and A. Kawana (1996) Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neurosci Lett*, 206(2-3), 109-112.

Kanagasabapathi T. T., D. Ciliberti, S. Martinoia, W. J. Wadman and M. M. Dece (2011) Dual-compartment neurofluidic system for electrophysiological measurements in physically segregated and functionally connected neuronal cell culture. *Front Neuroeng*, 4, 13.

Kanagasabapathi T. T., P. Massobrio, R. A. Barone, M. Tedesco, S. Martinoia, W. J. Wadman and M. M. Dece (2012) Functional connectivity and dynamics of cortical-thalamic networks co-cultured in a dual compartment device. *J Neural Eng*, 9(3), 036010.

Kapucu F. E., J. M. Tanskanen, J. E. Mikkonen, L. Yla-Outinen, S. Narkilahti and J. A. Hyttinen (2012) Burst analysis tool for developing neuronal networks exhibiting highly varying action potential dynamics. *Front Comput Neurosci*, 6, 38.

Kapur N., G. A. Mignery and K. Banach (2007) Cell cycle-dependent calcium oscillations in mouse embryonic stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(4), C1510-1518.

Kirkeby A., S. Grealish, D. A. Wolf, J. Nelander, J. Wood, M. Lundblad, O. Lindvall and M. Parmar (2012) Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. *Cell Rep*, 1(6), 703-714.

Kirwan P., B. Turner-Bridger, M. Peter, A. Momoh, D. Arambepola, H. P. Robinson and F. J. Livesey (2015) Development and function of human cerebral cortex neural networks from pluripotent stem cells in vitro. *Development*, 142(18), 3178-3187.

Kreitzer A. C. and R. C. Malenka (2008) Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4), 543-554.

Leclerc C., S. E. Webb, C. Daguzan, M. Moreau and A. L. Miller (2000) Imaging patterns of calcium transients during neural induction in *Xenopus laevis* embryos. *Journal of*

cell science, 113(19), 3519-3529.

- Lewandowska M. K., D. J. Bakkum, S. B. Rompani and A. Hierlemann (2015) Recording Large Extracellular Spikes in Microchannels along Many Axonal Sites from Individual Neurons. *PLoS One*, 10(3), e0118514.
- Li X. J., Z. W. Du, E. D. Zarnowska, M. Pankratz, L. O. Hansen, R. A. Pearce and S. C. Zhang (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 23(2), 215-221.
- Li X. J., X. Zhang, M. A. Johnson, Z. B. Wang, T. Lavaute and S. C. Zhang (2009) Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells. *Development*, 136(23), 4055-4063.
- Lin H. H., E. Bell, D. Uwanogho, L. W. Perfect, H. Noristani, T. J. Bates, V. Snetkov, J. Price and Y. M. Sun (2010) Neuronatin promotes neural lineage in ESCs via Ca(2+) signaling. *Stem Cells*, 28(11), 1950-1960.
- Lombardi F., H. J. Herrmann, C. Perrone-Capano, D. Plenz and L. de Arcangelis (2012) Balance between Excitation and Inhibition Controls the Temporal Organization of Neuronal Avalanches. *Physical Review Letters*, 108(22), 228703.
- Low L. K. and H. J. Cheng (2006) Axon pruning: an essential step underlying the developmental plasticity of neuronal connections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 361(1473), 1531-1544.
- Lukovic D., V. Moreno Manzano, M. Stojkovic, S. S. Bhattacharya and S. Erceg (2012) Concise review: human pluripotent stem cells in the treatment of spinal cord injury. *Stem Cells*, 30(9), 1787-1792.
- Lupo G., M. Bertacchi, N. Carucci, G. Augusti-Tocco, S. Biagioni and F. Cremisi (2014) From pluripotency to forebrain patterning: an in vitro journey astride embryonic stem cells. *Cell Mol Life Sci*, 71(15), 2917-2930.
- Magnuson D. S., D. J. Morassutti, W. A. Staines, M. W. McBurney and K. C. Marshall (1995) In vivo electrophysiological maturation of neurons derived from a multipotent

- precursor (embryonal carcinoma) cell line. *Brain Res Dev Brain Res*, 84(1), 130-141.
- Maroof A. M., K. Brown, S. H. Shi, L. Studer and S. A. Anderson (2010) Prospective isolation of cortical interneuron precursors from mouse embryonic stem cells. *J Neurosci*, 30(13), 4667-4675.
- Maroof A. M., S. Keros, J. A. Tyson, S. W. Ying, Y. M. Ganat, F. T. Merkle, B. Liu, A. Goulburn, E. G. Stanley, A. G. Elefanty, H. R. Widmer, K. Eggan, P. A. Goldstein, S. A. Anderson and L. Studer (2013) Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 12(5), 559-572.
- Matthews R. T. and W. L. Lee (1991) A comparison of extracellular and intracellular recordings from medial septum/diagonal band neurons in vitro. *Neuroscience*, 42(2), 451-462.
- Mcburney M. W. and B. J. Rogers (1982) Isolation of Male Embryonal Carcinoma-Cells and Their Chromosome-Replication Patterns. *Developmental Biology*, 89(2), 503-508.
- Monzo H. J., T. I. Park, J. M. Montgomery, R. L. Faull, M. Dragunow and M. A. Curtis (2012) A method for generating high-yield enriched neuronal cultures from P19 embryonal carcinoma cells. *J Neurosci Methods*, 204(1), 87-103.
- Mukai Y., T. Shiina and Y. Jimbo (2003) Continuous monitoring of developmental activity changes in cultured cortical networks. *Electrical Engineering in Japan*, 145(4), 28-37.
- Najm F. J., J. G. Chenoweth, P. D. Anderson, J. H. Nadeau, R. W. Redline, R. D. McKay and P. J. Tesar (2011) Isolation of epiblast stem cells from preimplantation mouse embryos. *Cell Stem Cell*, 8(3), 318-325.
- Nakajima F., K. Tokunaga and N. Nakatsuji (2007) Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem Cells*, 25(4), 983-985.
- Napoli A. and I. Obeid (2015) Comparative Analysis of Human and Rodent Brain Primary Neuronal Culture Spontaneous Activity Using Micro-Electrode Array Technology. *J*

Cell Biochem, doi: 10.1002/jcb.25312.

- Nevill J. T., A. Mo, B. J. Cord, T. D. Palmer, M.-m. Poo, L. P. Lee and S. C. Heilshorn (2011) Vacuum soft lithography to direct neuronal polarization. *Soft Matter*, 7(2), 343.
- Niwa H., Y. Toyooka, D. Shimosato, D. Strumpf, K. Takahashi, R. Yagi and J. Rossant (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, 123(5), 917-929.
- Nusser Z. (2009) Variability in the subcellular distribution of ion channels increases neuronal diversity. *Trends Neurosci*, 32(5), 267-274.
- Oberheim N. A., T. Takano, X. Han, W. He, J. H. Lin, F. Wang, Q. Xu, J. D. Wyatt, W. Pilcher, J. G. Ojemann, B. R. Ransom, S. A. Goldman and M. Nedergaard (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*, 29(10), 3276-3287.
- Odawara A., Y. Saitoh, A. H. Alhebshi, M. Gotoh and I. Suzuki (2014) Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 443(4), 1176-1181.
- Okada S., K. Ishii, J. Yamane, A. Iwanami, T. Ikegami, H. Katoh, Y. Iwamoto, M. Nakamura, H. Miyoshi, H. J. Okano, C. H. Contag, Y. Toyama and H. Okano (2005) In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J*, 19(13), 1839-1841.
- Okita K., Y. Matsumura, Y. Sato, A. Okada, A. Morizane, S. Okamoto, H. Hong, M. Nakagawa, K. Tanabe, K. Tezuka, T. Shibata, T. Kunisada, M. Takahashi, J. Takahashi, H. Saji and S. Yamanaka (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*, 8(5), 409-412.
- Okita K., M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka and S. Yamanaka (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322(5903), 949-953.
- Osumi N., H. Shinohara, K. Numayama-Tsuruta and M. Maekawa (2008) Concise review:

- Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells*, 26(7), 1663-1672.
- Ozair M. Z., S. Noggle, A. Warmflash, J. E. Krzyspiak and A. H. Brivanlou (2013) SMAD7 directly converts human embryonic stem cells to telencephalic fate by a default mechanism. *Stem Cells*, 31(1), 35-47.
- Pan L., S. Alagapan, E. Franca, G. J. Brewer and B. C. Wheeler (2011) Propagation of action potential activity in a predefined microtunnel neural network. *J Neural Eng*, 8(4), 046031.
- Pan L., S. Alagapan, E. Franca, T. DeMarse, G. J. Brewer and B. C. Wheeler (2013) Large extracellular spikes recordable from axons in microtunnels. *IEEE Trans Neural Syst Rehabil Eng*, 22, 453-459.
- Pang Y., B. Zheng, S. L. Kimberly, Z. Cai, P. G. Rhodes and R. C. Lin (2012) Neuron-oligodendrocyte myelination co-culture derived from embryonic rat spinal cord and cerebral cortex. *Brain Behav*, 2(1), 53-67.
- Parekkadan B., Y. Berdichevsky, D. Irimia, A. Leeder, G. Yarmush, M. Toner, J. B. Levine and M. L. Yarmush (2008) Cell-cell interaction modulates neuroectodermal specification of embryonic stem cells. *Neurosci Lett*, 438(2), 190-195.
- Park J., H. Koito, J. Li and A. Han (2009) Microfluidic compartmentalized co-culture platform for CNS axon myelination research. *Biomed Microdevices*, 11(6), 1145-1153.
- Perrier A. L., V. Tabar, T. Barberi, M. E. Rubio, J. Bruses, N. Topf, N. L. Harrison and L. Studer (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(34), 12543-12548.
- Pickard L., J. Noel, J. M. Henley, G. L. Collingridge and E. Molnar (2000) Developmental changes in synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor subunit composition in living hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 20(21), 7922-7931.
- Pine J. (1980) Recording action potentials from cultured neurons with extracellular

- microcircuit electrodes. *J Neurosci Methods*, 2(1), 19-31.
- Raastad M. and G. M. Shepherd (2003) Single-axon action potentials in the rat hippocampal cortex. *J Physiol*, 548(Pt 3), 745-752.
- Resende R. R., A. Adhikari, J. L. da Costa, E. Lorencon, M. S. Ladeira, S. Guatimosim, A. H. Kihara and L. O. Ladeira (2010) Influence of spontaneous calcium events on cell-cycle progression in embryonal carcinoma and adult stem cells. *Biochim Biophys Acta*, 1803(2), 246-260.
- Resende R. R., J. L. da Costa, A. H. Kihara, A. Adhikari and E. Lorencon (2010) Intracellular Ca²⁺ regulation during neuronal differentiation of murine embryonal carcinoma and mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 19(3), 379-394.
- Ruaro M. E., P. Bonifazi and V. Torre (2005) Toward the neurocomputer: image processing and pattern recognition with neuronal cultures. *IEEE Trans Biomed Eng*, 52(3), 371-383.
- Sadagopan S. and X. Wang (2009) Nonlinear Spectrotemporal Interactions Underlying Selectivity for Complex Sounds in Auditory Cortex. *Journal of Neuroscience*, 29(36), 11192-11202.
- Sakaue-Sawano A., H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai and A. Miyawaki (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*, 132(3), 487-498.
- Santiago M. F., S. S. Liour, R. Mendez-Otero and R. K. Yu (2005) Glial-guided neuronal migration in P19 embryonal carcinoma stem cell aggregates. *J Neurosci Res*, 81(1), 9-20.
- Sasaki T., N. Matsuki and Y. Ikegaya (2011) Action-potential modulation during axonal conduction. *Science*, 331(6017), 599-601.
- Sasaki T., N. Matsuki and Y. Ikegaya (2012) Targeted axon-attached recording with fluorescent patch-clamp pipettes in brain slices. *Nat Protoc*, 7(6), 1228-1234.

- Scholl M., C. Sprossler, M. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maelicke, W. Knoll and A. Offenhausser (2001) Ordered networks of rat hippocampal neurons attached to silicon oxide surfaces. *J Neurosci Methods*, 104(1), 65-75.
- Sela Y., N. Molotski, S. Golan, J. Itskovitz-Eldor and Y. Soen (2012) Human embryonic stem cells exhibit increased propensity to differentiate during the G1 phase prior to phosphorylation of retinoblastoma protein. *Stem Cells*, 30(6), 1097-1108.
- Shi Y., P. Kirwan and F. J. Livesey (2012) Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc*, 7(10), 1836-1846.
- Shi Y., P. Kirwan, J. Smith, H. P. Robinson and F. J. Livesey (2012) Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci*, 15(3), 477-486.
- Shimamura K. and J. L. R. Rubenstein (1997) Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development*, 124(14), 2709-2718.
- Shimba K., K. Sakai, T. Isomura, K. Kotani and Y. Jimbo (2015) Axonal conduction slowing induced by spontaneous bursting activity in cortical neurons cultured in a microtunnel device. *Integr Biol (Camb)*, 7(1), 64-72.
- Shimba K., K. Sakai, Y. Takayama, K. Kotani and Y. Jimbo (2015) Recording axonal conduction to evaluate the integration of pluripotent cell-derived neurons into a neuronal network. *Biomed Microdevices*, 17(5), 94.
- Shimba K., K. Sakai, K. Kotani and Y. Jimbo (2016) Experimental evaluation of activity-dependent changes in axonal conduction delay using a microtunnel device. *NOLTA*, *in press*.
- Shlosberg D., Y. Abu-Ghanem and Y. Amitai (2008) Comparative properties of excitatory and inhibitory inter-laminar neocortical axons. *Neuroscience*, 155(2), 366-373.
- Singh A. M., J. Chappell, R. Trost, L. Lin, T. Wang, J. Tang, B. K. Matlock, K. P. Weller, H. Wu, S. Zhao, P. Jin and S. Dalton (2013) Cell-cycle control of developmentally

- regulated transcription factors accounts for heterogeneity in human pluripotent cells. *Stem Cell Reports*, 1(6), 532-544.
- Soleng A. F., K. Chiu and M. Raastad (2003) Unmyelinated axons in the rat hippocampus hyperpolarize and activate an H current when spike frequency exceeds 1 Hz. *J Physiol*, 552(Pt 2), 459-470.
- Staines W. A., J. Craig, K. Reuhl and M. W. McBurney (1996) Retinoic acid treated P19 embryonal carcinoma cells differentiate into oligodendrocytes capable of myelination. *Neuroscience*, 71(3), 845-853.
- Staines W. A., D. J. Morassutti, K. R. Reuhl, A. I. Ally and M. W. McBurney (1994) Neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells have varied morphologies and neurotransmitters. *Neuroscience*, 58(4), 735-751.
- Stephens C. L., H. Toda, T. D. Palmer, T. B. DeMarse and B. K. Ormerod (2012) Adult neural progenitor cells reactivate superbursting in mature neural networks. *Exp Neurol*, 234(1), 20-30.
- Stett A., B. Muller and P. Fromherz (1997) Two-way silicon-neuron interface by electrical induction. *Physical Review E*, 55(2), 1779-1782.
- Stock M., B. Kirchner, D. Waibler, D. E. Cowley, M. W. Pfaffl and R. Kuehn (2012) Effect of magnetic stimulation on the gene expression profile of in vitro cultured neural cells. *Neurosci Lett*, 526(2), 122-127.
- Sun J. J., W. Kilb and H. J. Luhmann (2010) Self-organization of repetitive spike patterns in developing neuronal networks in vitro. *Eur J Neurosci*, 32(8), 1289-1299.
- Surmacz B., H. Fox, A. Gutteridge, P. Fish, S. Lubitz and P. Whiting (2012) Directing differentiation of human embryonic stem cells toward anterior neural ectoderm using small molecules. *Stem Cells*, 30(9), 1875-1884.
- Suzuki I. K. and P. Vanderhaeghen (2015) Is this a brain which I see before me? Modeling human neural development with pluripotent stem cells. *Development*, 142(18), 3138-3150.

- Tachibana M., P. Amato, M. Sparman, N. M. Gutierrez, R. Tippner-Hedges, H. Ma, E. Kang, A. Fulati, H. S. Lee, H. Sritanaudomchai, K. Masterson, J. Larson, D. Eaton, K. Sadler-Fredd, D. Battaglia, D. Lee, D. Wu, J. Jensen, P. Patton, S. Gokhale, R. L. Stouffer, D. Wolf and S. Mitalipov (2013) Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 153(6), 1228-1238.
- Takahashi K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872.
- Takahashi K. and S. Yamanaka (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.
- Takayama Y., H. Moriguchi, K. Kotani and Y. Jimbo (2009) Spontaneous calcium transients in cultured cortical networks during development. *IEEE Trans Biomed Eng*, 56(12), 2949-2956.
- Takayama Y., H. Moriguchi, K. Kotani, T. Suzuki, K. Mabuchi and Y. Jimbo (2012) Network-wide integration of stem cell-derived neurons and mouse cortical neurons using microfabricated co-culture devices. *Biosystems*, 107(1), 1-8.
- Takayama Y., A. Saito, H. Moriguchi, K. Kotani and Y. Jimbo (2011) Ensemble recording of electrical activity in neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells. *Electronics and Communications in Japan*, 94(4), 9-19.
- Takekawa T., Y. Isomura and T. Fukai (2010) Accurate spike sorting for multi-unit recordings. *Eur J Neurosci*, 31(2), 263-272.
- Takekawa T., Y. Isomura and T. Fukai (2012) Spike sorting of heterogeneous neuron types by multimodality-weighted PCA and explicit robust variational Bayes. *Front Neuroinform*, 6, 5.
- Taylor A. M., M. Blurton-Jones, S. W. Rhee, D. H. Cribbs, C. W. Cotman and N. L. Jeon (2005) A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods*, 2(8), 599-605.

- Taylor A. M., D. C. Dieterich, H. T. Ito, S. A. Kim and E. M. Schuman (2010) Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. *Neuron*, 66(1), 57-68.
- Thomson J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145-1147.
- Toma K., T. Kumamoto and C. Hanashima (2014) The timing of upper-layer neurogenesis is conferred by sequential derepression and negative feedback from deep-layer neurons. *J Neurosci*, 34(39), 13259-13276.
- Tomishima M. (2013) Neural Induction - Dual SMAD inhibition. *stemcellbook*, PMID: 23658995.
- Tonnesen J., C. L. Parish, A. T. Sorensen, A. Andersson, C. Lundberg, K. Deisseroth, E. Arenas, O. Lindvall and M. Kokaia (2011) Functional integration of grafted neural stem cell-derived dopaminergic neurons monitored by optogenetics in an in vitro Parkinson model. *PLoS One*, 6(3), e17560.
- Tornero D., S. Wattananit, M. Gronning Madsen, P. Koch, J. Wood, J. Tatarishvili, Y. Mine, R. Ge, E. Monni, K. Devaraju, R. F. Hevner, O. Brustle, O. Lindvall and Z. Kokaia (2013) Human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons integrate in stroke-injured cortex and improve functional recovery. *Brain*, 136(Pt 12), 3561-3577.
- Trimmer J. S. and K. J. Rhodes (2004) Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain. *Annu Rev Physiol*, 66, 477-519.
- Turetsky D. M., J. E. Huettner, D. I. Gottlieb, M. P. Goldberg and D. W. Choi (1993) Glutamate receptor-mediated currents and toxicity in embryonal carcinoma cells. *J Neurobiol*, 24(9), 1157-1169.
- Turner M., S. Leslie, N. G. Martin, M. Peschanski, M. Rao, C. J. Taylor, A. Trounson, D. Turner, S. Yamanaka and I. Wilmut (2013) Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. *Cell Stem Cell*, 13(4), 382-384.

- van de Leemput J., N. C. Boles, T. R. Kiehl, B. Corneo, P. Lederman, V. Menon, C. Lee, R. A. Martinez, B. P. Levi, C. L. Thompson, S. Yao, A. Kaykas, S. Temple and C. A. Fasano (2014) CORTECON: a temporal transcriptome analysis of in vitro human cerebral cortex development from human embryonic stem cells. *Neuron*, 83(1), 51-68.
- van Pelt J., P. S. Wolters, M. A. Corner, W. L. Rutten and G. J. Ramakers (2004) Long-term characterization of firing dynamics of spontaneous bursts in cultured neural networks. *IEEE Trans Biomed Eng*, 51, 2051-2062.
- Verkhratsky A. and H. Kettenmann (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci*, 19(8), 346-352.
- Vernier P. T., Y. Sun, L. Marcu, S. Salemi, C. M. Craft and M. A. Gundersen (2003) Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses. *Biochem Biophys Res Commun*, 310(2), 286-295.
- Voigt T., H. Baier and A. Dolabela de Lima (1997) Synchronization of neuronal activity promotes survival of individual rat neocortical neurons in early development. *Eur J Neurosci*, 9(5), 990-999.
- Wagenaar D. A., R. Madhavan, J. Pine and S. M. Potter (2005) Controlling bursting in cortical cultures with closed-loop multi-electrode stimulation. *J Neurosci*, 25(3), 680-688.
- Wagenaar D. A., J. Pine and S. M. Potter (2006) An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci*, 7, 11.
- Wang K., T. Xue, S. Y. Tsang, R. Van Huizen, C. W. Wong, K. W. Lai, Z. Ye, L. Cheng, K. W. Au, J. Zhang, G. R. Li, C. P. Lau, H. F. Tse and R. A. Li (2005) Electrophysiological properties of pluripotent human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23(10), 1526-1534.
- Wang L., M. Riss, J. O. Buitrago and E. Claverol-Tinture (2012) Biophysics of microchannel-enabled neuron-electrode interfaces. *J Neural Eng*, 9(2), 026010.
- Watanabe K., D. Kamiya, A. Nishiyama, T. Katayama, S. Nozaki, H. Kawasaki, Y. Watanabe,

- K. Mizuseki and Y. Sasai (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci*, *8*(3), 288-296.
- Weissman T. A., P. A. Riquelme, L. Ivic, A. C. Flint and A. R. Kriegstein (2004) Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, *43*(5), 647-661.
- White J. A., P. F. Blackmore, K. H. Schoenbach and S. J. Beebe (2004) Stimulation of capacitative calcium entry in HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields. *J Biol Chem*, *279*(22), 22964-22972.
- Wong C. K., W. Y. So, S. K. Law, F. P. Leung, K. L. Yau, X. Yao, Y. Huang, X. Li and S. Y. Tsang (2012) Estrogen controls embryonic stem cell proliferation via store-operated calcium entry and the nuclear factor of activated T-cells (NFAT). *J Cell Physiol*, *227*(6), 2519-2530.
- Woo D. G., M. S. Shim, J. S. Park, H. N. Yang, D. R. Lee and K. H. Park (2009) The effect of electrical stimulation on the differentiation of hESCs adhered onto fibronectin-coated gold nanoparticles. *Biomaterials*, *30*(29), 5631-5638.
- Wright D., B. Rajalingam, J. M. Karp, S. Selvarasah, Y. Ling, J. Yeh, R. Langer, M. R. Dokmeci and A. Khademhosseini (2008) Reusable, reversibly sealable parylene membranes for cell and protein patterning. *J Biomed Mater Res A*, *85*(2), 530-538.
- Yamada M., K. Tanemura, S. Okada, A. Iwanami, M. Nakamura, H. Mizuno, M. Ozawa, R. Ohyama-Goto, N. Kitamura, M. Kawano, K. Tan-Takeuchi, C. Ohtsuka, A. Miyawaki, A. Takashima, M. Ogawa, Y. Toyama, H. Okano and T. Kondo (2007) Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells. *Stem Cells*, *25*(3), 562-570.
- Yang Y., K. Adachi, M. A. Sheridan, A. P. Alexenko, D. J. Schust, L. C. Schulz, T. Ezashi and R. M. Roberts (2015) Heightened potency of human pluripotent stem cell lines created by transient BMP4 exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(18), E2337-2346.
- Yla-Outinen L., J. Heikkila, H. Skottman, R. Suuronen, R. Aanismaa and S. Narkilahti (2010) Human cell-based micro electrode array platform for studying neurotoxicity.

Front Neuroeng, 3, doi: 10.3389/fneng.2010.00111.

Yu D. X., F. P. Di Giorgio, J. Yao, M. C. Marchetto, K. Brennand, R. Wright, A. Mei, L. McHenry, D. Lisuk, J. M. Grasmick, P. Silberman, G. Silberman, R. Jappelli and F. H. Gage (2014) Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 2(3), 295-310.

Yu J., K. Hu, K. Smuga-Otto, S. Tian, R. Stewart, Slukvin, II and J. A. Thomson (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324(5928), 797-801.

Yu J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II and J. A. Thomson (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917-1920.

Yun K., S. Potter and J. L. R. Rubenstein (2001) Gsh2 and Pax6 play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development*, 128(2), 193-205.

Zeng S. and Y. Tang (2009) Effect of clustered ion channels along an unmyelinated axon. *Physical Review E*, 80(2).

Zhang E., X. Li, S. Zhang, L. Chen and X. Zheng (2005) Cell cycle synchronization of embryonic stem cells: effect of serum deprivation on the differentiation of embryonic bodies in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 333(4), 1171-1177.

岡野栄之 (2014), 脳の再生—中枢神経系の幹細胞生物学と再生戦略—, 朝倉書店

中内啓光 (2013), 幹細胞研究と再生医療, 南山堂

中村幸夫 (2012), 目的別で選べる細胞培養プロトコール, 羊土社

日本再生医療学会, 山中伸弥, 中内啓光 (2012), 幹細胞, 朝倉書店

山本雅, 仙波憲太郎, 山梨裕司 (2012), シグナル伝達キーワード辞典, 羊土社

宮田卓樹, 山本亘彦 (2013), 脳の発生学—ニューロンの誕生・分化・回路形成—, 化学同人

ClinicalTrial.gov NCT01217008, “<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01217008>”, 最終アクセス日 2015 年 12 月 23 日

滲出型加齢黄斑変性の臨床研究, “<http://www.riken-ibri.jp/AMD/index.html>”, 最終アクセス日 2016 年 2 月 9 日

業績

本論文に関連する業績

[Papers]

- [1] Kenta Shimba, Koji Sakai, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Experimental evaluation of activity-dependent changes in axonal conduction delay using a microtunnel device”, *NOLTA*, *in press*.
- [2] Kenta Shimba, Koji Sakai, Yuzo Takayama, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Recording axonal conduction to evaluate the integration of pluripotent cell-derived neurons into a neuronal network”, *Biomedical Microdevices*, Vol. 17, No. 5, 94, 2015.
- [3] Kenta Shimba, Koji Sakai, Takuya Isomura, Kiyoshi Kotani and Yasuhiko Jimbo, “Axonal conduction slowing induced by spontaneous bursting activity in cortical neurons cultured in a microtunnel device”, *Integrative Biology*, Vol. 7, No. 1, pp. 64-72, 2015.
- [4] 榛葉健太, 斎藤淳史, 武内彬正, 高山祐三, 小谷潔, 神保泰彦, “集積化マイクロ培養チャンバを用いた神経細胞移植モデルの構築”, *電気学会論文誌 C*, Vol. 132, No. 7, pp. 1072-1078, 2012.

[International Conferences]

- [1] Kenta Shimba, Shoko Iida, Yukimi Tanaka, Koji Sakai, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “In vitro monitoring of human iPS cell-derived neuron growth with a microfabricated device”, *ISSCR 2015 annual meeting*, Stockholm, Sweden, 2015.
- [2] Kenta Shimba, Koji Sakai, Yuzo Takayama, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Axonal conduction between P19 cell-derived and primary cultured neurons in microfabricated chamber”, *The 9th Forum of European Neuroscience*, Milan, Italy, 2014.
- [3] Kenta Shimba, Koji Sakai, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Changes of Axonal Conduction in Bursting Activity”, *9th international Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes(MEA meeting 2014)*, pp. 91 - 94, Reutlingen,

Germany, 2014.

- [4] Kenta Shimba, Koji Sakai, Kazuyuki Arimatsu, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Long Term Observation of Propagating Action Potential along the Axon in a Microtunnel Device”, 2013 6th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER), pp. 945-948, 2013, San Diego, USA.
- [5] Kenta Shimba, Atsushi Saito, Akimasa Takeuchi, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Bidirectional Synaptic Connection between Primary and Stem Cell-Derived Neurons in Co-culture Device”, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC’13), pp. 6675-6678, 2013.

[Domestic Conferences]

- [1] Kenta Shimba, Shoko Iida, Koji Sakai, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Maturation process of human iPS cell-derived neurons monitored by a microtunnel-electrode configuration”, ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2015, 104-105, 福岡, 2015.
- [2] 榛葉健太, 酒井洸児, 小谷潔, 神保泰彦, “軸索における情報処理機能の評価に向けた微小培養デバイス”, 第 54 回生体医工学会大会, P1-05-10-A, 名古屋, 2015.
- [3] 榛葉健太, 飯田尚子, 田中幸美, 小谷潔, 神保泰彦, “ヒト iPS 細胞の自発 C a 振動の評価”, 第 14 回日本再生医療学会総会, P-03-025, 神奈川, 2015.
- [4] 榛葉健太, 酒井洸児, 小谷潔, 神保泰彦, “培養神経細胞の成熟過程における活動伝導の変化”, 平成 26 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, pp. 235-238, 島根, 2014.
- [5] 榛葉健太, 酒井洸児, 高山祐三, 小谷潔, 神保泰彦, “マイクロ培養デバイスを用いた幹細胞の神経分化・成熟過程の評価”, 2014 年度精密工学会春季大会学術講演会, F15, 東京, 2014.
- [6] 榛葉健太, 酒井洸児, 有松和之, 高山祐三, 小谷潔, 神保泰彦, “初代培養一幹細胞由来神経細胞間における信号伝搬の評価”, 平成 25 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, pp. 29-32, 北海道, 2013

その他の業績

[Papers]

- [1] Kosuke Oiwa, Kenta Shimba, Takashi Numata, Akimasa Takeuchi, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “A device for co-culturing autonomic neurons and cardiomyocytes using micro-fabrication techniques”, Integrative Biology, 2016, DOI: 10.1039/c5ib00273g, in press.
- [2] Takuya Isomura, Kenta Shimba, Yuzo Takayama, Akimasa Takeuchi, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Signal transfer within a cultured asymmetric cortical neuron circuit”, Journal of Neural Engineering, 2015, in press.
- [3] Atsushi Saito, Yutaro Nakashima, Kenta Shimba, Yuzo Takayama, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Modulation of neuronal network activity using magnetic nanoparticle-based astrocytic network integration”, Biomaterials Science, Vol. 3, pp. 1228-1235, DOI: 10.1039/C5BM00092K, 2015.
- [4] 田中幸美, 門倉智之助, 磯村拓哉, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦, “培養海馬ニューロン新生の制御によるパターン分離能力の向上”, 電気学会論文誌 C, Vol. 135, No. 7, pp.805-812, 2015.
- [5] 大岩孝輔, 榛葉健太, 沼田崇志, 武内彬正, 小谷潔, 神保泰彦, “微細加工を用いた副交感神経細胞－心筋細胞共培養系の構築”, 電気学会論文誌 C, Vol. 135, No. 7, pp. 813-818, 2015.
- [6] 酒井洸児, 榛葉健太, 有松和之, 小谷潔, 神保泰彦, “神経細胞－オリゴデンドロサイト共培養環境下における活動伝導評価系の構築”, 電気学会論文誌 C, Vol. 134, No. 8, pp. 1056 – 1063, 2014.
- [7] 磯村拓哉, 武内彬正, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦, “結合強度推定に基づくニューロン種の分類－ドーパミンニューロンを含む培養神経回路網の電気活動－”, 電気学会論文誌 C, Vol. 133, No. 9, pp. 1806-1813, 2013
- [8] 榛葉健太, 有松和之, 磯村拓哉, 武内彬正, 小谷潔, 神保泰彦, “セロトニンによる培養神経回路網の発火パターン調節”, 電気学会論文誌 C, Vol. 133, No. 9, pp. 1814-1819, 2013.

[International Conferences]

- [1] Yukimi Tanaka, Takuya Isomura, Kenta Shimba, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Distance Dependent Activation of Dissociated Hippocampal Network by Tetanic Stimulation”, 37th annual international conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Milan, Italy, 2015.
- [2] Koji Sakai, Kenta Shimba, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Microfabricated multi-electrode device for detecting oligodendrocyte-regulated changes in axonal conduction velocity”, 37th annual international conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Milan, Italy, 2015.
- [3] Koji Sakai, Kenta Shimba, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Changes of action potential conduction velocity in neuron-oligodendrocyte co-culture”, The 9th Forum of European Neuroscience, Milan, Italy, 2014.
- [4] Koji Sakai, Kenta Shimba, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Evaluation of Action Potential Conduction Velocity for Myelination Research”, 9th international Meeting on Substrate-Integrated Microelectrodes(MEA meeting 2014), pp. 172 - 173, Reutlingen, Germany, 2014.
- [5] Kazuyuki Arimatsu, Takuya Isomura, Kenta Shimba, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo, “Bursting Activity of Neuronal Network Is Modified in Response to Burst-Like Pattern Stimulation”, 2013 IEEE EMBC Short Papers No. 3235.
- [6] Akimasa Takeuchi, Kenta Shimba, Yuzo Takayama, Kiyoshi Kotani, Jong-Kook Lee, Makoto Noshiro, Yasuhiko Jimbo, “Microfabricated device for co-culture of sympathetic neuron and iPS-derive cardiomyocytes”, 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC’13), pp. 3817-3820, 2013.

[Domestic Conferences]

- [1] 飯田尚子, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦, “Alteration in excitatory/inhibitory balance within iPSC-derived neuronal network”, ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2015, 福岡, 2015.

- [2] 金子翔一, 酒井洸児, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦, “In vitro model for monitoring stress-related response of hippocampal neuronal network mediated by HPA axis activation” ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2015, 福岡, 2015.
- [3] 田中幸美, 磯村拓哉, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦, “テタヌス刺激後における神経活動マーカーc-fos の空間的評価”, 第 54 回生体医工学会大会, P1-05-11-A, 名古屋, 2015.
- [4] 酒井洸児, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦, “マイクロ培養デバイスによる髄鞘形成過程における神経活動伝播評価”, 第 54 回生体医工学会大会, P1-05-12-A, 名古屋, 2015.
- [5] 飯田尚子, 榛葉健太, 田中幸美, 酒井洸児, 小谷潔, 神保泰彦, “大脳皮質の再現に向けた iPSC 由来神経細胞の 2 次元培養パターンニング”, 第 54 回生体医工学会大会, P1-05-9-A, 名古屋, 2015.
- [6] 大岩孝輔, 榛葉健太, 湯ノ口万友, 小谷潔, 神保泰彦, “微細加工技術を用いたマイクロ磁気刺激システムの構築”, 第 54 回生体医工学会大会, P1-05-7-A, 名古屋, 2015.
- [7] 飯田尚子, 榛葉健太, 田中幸美, 酒井洸児, 小谷潔, 神保泰彦, “iPSC 由来神経幹細胞による細胞移動モデルの形成”, 第 24 回ライフサポート学会フロンティア講演会, pp. 37, 東京, 2015.
- [8] 田中幸美, 門倉智之輔, 磯村拓哉, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦, “神経新生 in vitro モデルの構築と空間パターン刺激に対する応答評価”, 平成 26 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, pp. 1848-1849, 島根, 2014.
- [9] 金子翔一, 榛葉健太, 酒井洸児, 小谷潔, 神保泰彦, “視床下部一下垂体一副腎系の in vitro 再構築に向けた培養副腎細胞の活動評価”, 平成 26 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, pp. 1809-1810, 島根, 2014.
- [10] 酒井洸児, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦, “軸索伝導する活動の連続的長期評価”, 平成 26 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, pp. 239-242, 島根, 2014.

- [11] 田中幸美, 門倉智之助, 磯村拓哉, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦, “成体神経新生 in vitro モデルにおけるパターン認識”, 平成 25 年度電気学会研究会「医用・生体工学研究会」, MBE-14-029, 東京, 2014.
- [12] 磯村拓哉, 榛葉健太, 高山祐三, 武内彬正, 小谷潔, 神保泰彦, “マイクロチャンバを用いた神経ダイオード回路の作製”, 2014 年度精密工学会春季大会学術講演会, F13, 東京, 2014.
- [13] 酒井洸児, 榛葉健太, 有松和之, 小谷潔, 神保泰彦, “神経活動の伝導計測による髄鞘形成評価システム”, 2014 年度精密工学会春季大会学術講演会, F16, 東京, 2014.
- [14] 金子翔一, 酒井洸児, 榛葉健太, 小谷潔, 神保泰彦, “細胞培養におけるパターンニングのための微小流路デバイス”, 2014 年度精密工学会春季大会学術講演会, F08, 東京, 2014.
- [15] 中島佑太郎, 榛葉健太, 齋藤淳史, 小谷潔, 神保泰彦, “神経回路網-血液脳関門の相互作用評価に向けた in vitro モデルの構築”, ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2013, pp. 179-182, 神奈川, 2013.
- [16] 岩岡美由紀, 榛葉健太, 磯村拓哉, 小谷潔, 神保泰彦, “神経保護作用の解明に向けた培養大脳皮質細胞における pilocarpine の影響評価”, ライフエンジニアリング部門シンポジウム 2013, pp. 473-476, 神奈川, 2013.
- [17] 酒井洸児, 榛葉健太, 岩岡美由紀, 有松和之, 小谷潔, 神保泰彦, “培養系における跳躍伝導の検出デバイス”, 平成 25 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, pp. 1831-1832, 北海道, 2013.

表彰暦

- [1] 2014 年度精密工学会 春季学術大会 ベストプレゼンテーション賞
- [2] 平成 25 年電気学会 電子・情報・システム部門大会 優秀論文発表賞
- [3] 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'13), Student Paper Competition Finalist
- [4] 平成 24 年 電気学会 電子・情報・システム部門誌 論文奨励賞
- [5] 平成 22 年度 ライフサポート学会 奨励賞

付録 HCN の発現量の評価

従来の分子生物学的手法で、軸索における HCN タンパク質の発現量評価を試みた。以下に、免疫組織化学染色法および PCR 法を用いて HCN タンパク質を評価した結果を示す。

免疫組織化学染色法

B3T, MAP2 および HCN1 に対する抗体を用いて、それぞれ神経細胞の細胞骨格、細胞体・樹状突起、および HCN1 を標識した。図 S1 に、培養 5 日目におけるマウス CX の HCN1 の発現を示す。図 S1A は低倍率で撮影した画像であり、図 S1B から図 S1D は高倍率の対物レンズを用いて取得した画像である。軸索上に発現した HCN1 の領域は、B3T 陽性/MAP2 陽性/HCN1 陽性で示される。図 S1B および図 S1D には、白い矢印で示した通り、軸索上の HCN と考えられる領域が存在した。定量的に発現部位を評価するためには、軸索を示す B3T 陽性/MAP2 陰性の領域を正確に検出する必要がある。しかし、MAP2 抗体を用いた画像のコントラストは、検出をする上で十分なコントラストを有していなかった。また、図 S1A に示すように、B3T 陰性/MAP2 陰性の非神経細胞が強く HCN1 を発現する様子が観察された。HCN1 を発現した非神経細胞と、神経細胞の軸索が重なった場合、偽陽性の検出が起こる可能性が高い。以上から、免疫組織化学染色からは軸索上に発現した HCN1 タンパク質の定量的な評価は困難であると結論付けた。

PCR 法

PCR 法を用いて *HCN1* の発現量进行评估した。表 S1 に *HCN1* に対するプライマーの配列を示す。また、図 S2 に遺伝子発現を評価した結果を示す。*HCN1* の発現量に顕著な変化は見られなかった。PCR 法を用いた場合、微小な差を検出できる可能性はあるが、軸索に局在した *HCN1* を評価することは出来ない。したがって、PCR 法から軸索上に発現した *HCN1* の発現量进行评估することは困難であると結論付けた。

以上から、従来手法である免疫組織化学染色法および PCR 法を用いて、軸索上に発現した HCN1 を定量的に評価することは困難であると考えられる。

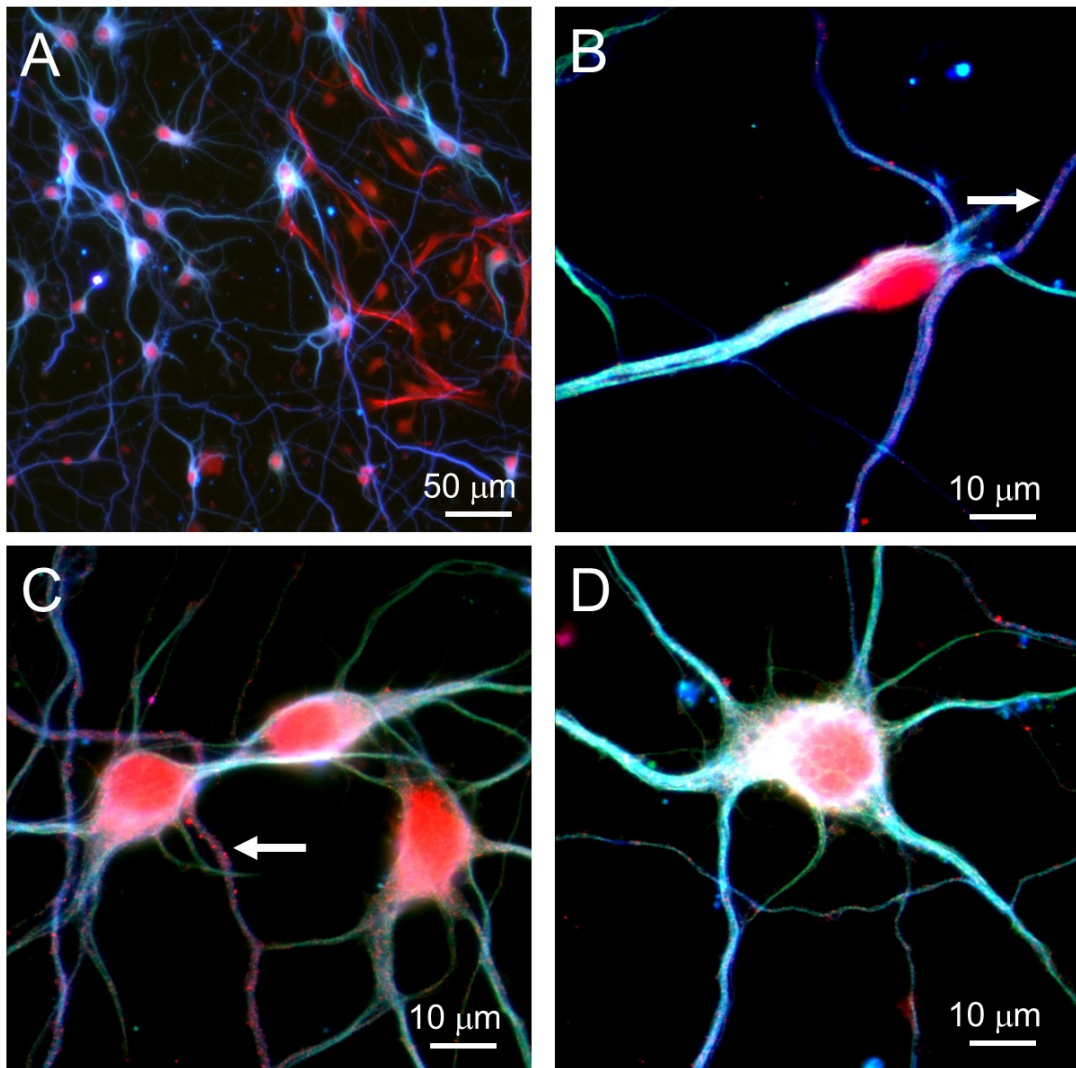


図 S1 培養 5 日目の神経細胞における HCN1 の発現. MAP2 および B3T に対する抗体を用いて、樹状突起・細胞体（緑色）、および神経細胞の細胞骨格（青色）を標識した. また、HCN1 は赤色で示す. A は低倍率の、B-D は高倍率の対物レンズを用いて取得した画像である. 白い矢印に示すように、軸索上における HCN1 の発現を確認した. また、非神経細胞が HCN1 を発現した様子も観察された.

表 S1 *HCN1* に対するプライマーの配列

Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Amplicon size (bp)	Reference
<i>HCN1</i>	ACATGCTGTGCATTGGTTATGGCG	AACAAACATTGCGTAGCAGGTGGC	107	Horwitz 2010

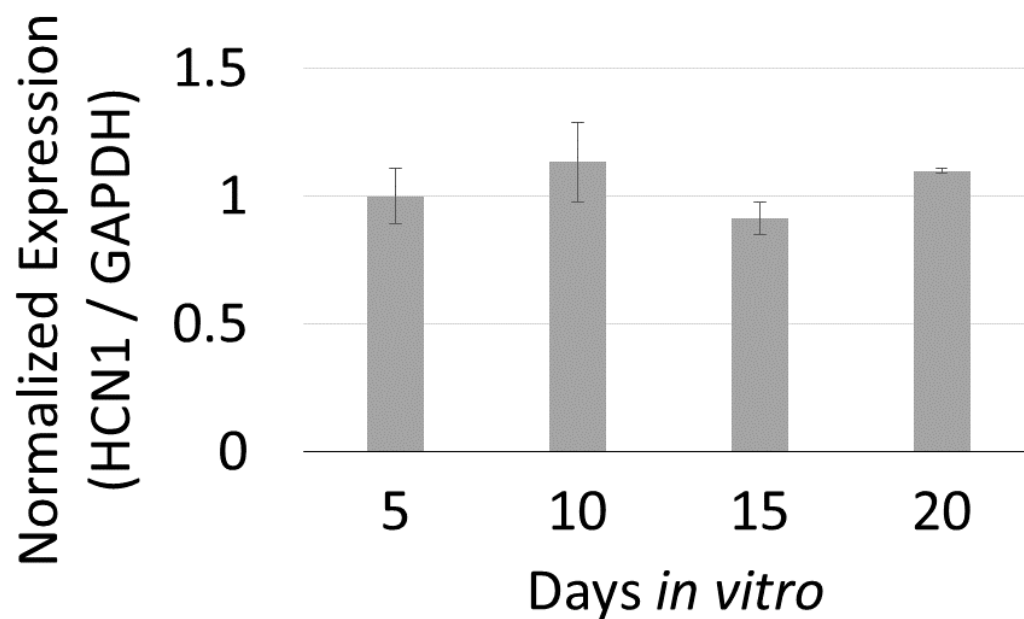


図 S2 *HCN1* の発現量の変化. PCR 法を用いて, マウス CX が発現した *HCN1* を評価した. 培養日数に伴う顕著な変化は見られなかった. Mean \pm SD, n = 3.