

1. 序論

神経細胞の移動は、神経回路の結合構造を変容させ、神経回路に影響を及ぼすと考えられている。しかし、神経回路を構築した後の神経細胞の移動の機序は明らかではない。成熟した神経細胞を移動させる要因を特定できれば、神経細胞の移動と神経回路機能の関係の解明に貢献できると考えられる。

これまでに著者らは、高密度 CMOS アレイ [1] を用いた実験により、発火頻度と神経細胞の移動量には相関があることを報告した [2]。本研究では、移動は活動に依存するという仮説検証のため、移動と活動が同時に計測できる実験系を構築し、検証した。活動の計測には、電極間隔が $19\ \mu\text{m}$ で空間分解能が高く、単一の細胞が複数の電極で計測可能な高密度 CMOS アレイを用いた。発火頻度と移動量に因果関係があれば、外的要因で発火頻度を増減させて、神経細胞の移動量も増減できるはずである。そこで、本研究ではシナプス伝達を薬品で阻害して発火頻度を減らすこと、逆に、電気刺激して発火頻度を増やすことで、移動量を増減できるかを調べる。

2. 方法

実験系の構築と検証 高密度 CMOS アレイ上の神経細胞の移動の有無、移動量の分布を調べるため、遺伝子導入を行った。構築した実験系で同定した位置の検証のために神経細胞を免疫抗体染色し、同定した移動の検証ために移動前後で推定された神経細胞の形態を比較した。

活動が移動に与える影響 活動量の増減を与える影響を調べるため、シナプス伝達阻害によって活動量を減らし、電気刺激によって活動量を増やした。

高密度 CMOS アレイ上の分散培養 妊娠 18 日目ウィスター系ラットの胎児の脳新皮質を Trypsin-EDTA によって分解し、神経細胞を単離して、高密度 CMOS アレイ上に播種した。

遺伝子導入 神経細胞に蛍光タンパク質の遺伝子をリポフェクション法で導入し、観察した。プロモーターは human synapsin I, 蛍光タンパク質ベクターは DsRedExpress である。(n = 6)

神経細胞の移動量の算出 各電極で測定され

た電位の最大値の平均をマッピングし、得られた電位分布をガウシアンフィルタを用いて平滑化した。この平滑化した電位ピーク分布の極小値をとり、隣接 2 電極で活動電位を検出した場所を細胞の位置と推定した (Fig. 1)。ここで得られた細胞体の位置から、一日ごとの移動距離をユークリッド距離として算出した。

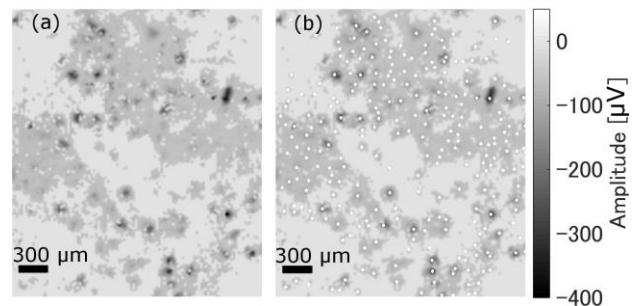


Fig. 1 Localization of neurons based on action potential. (a) Action potential map. (b) Detected neurons and gaussian-filtered action potential map. White points show estimated positions of neurons.

免疫抗体染色 免疫抗体染色により可視化し、蛍光観察した。抗体は、神経細胞に含まれる微小管結合タンパク質 2 に特異的に結合する抗 MAP2 抗体, GABA 受容体に特異的に結合する抗 GABA 抗体を用いた。(n = 3)

神経細胞の形態推定 移動前後の位置近傍の神経細胞の形態を推定し比較した。活動電位を分類し、分類された活動電位を起点とした電位変化を平均化して形態を予測した [3]。(n = 5)

シナプス伝達阻害 シナプス伝達阻害剤を用いて活動量を減少させた。APV が $30\ \mu\text{M}$, CNQX が $10\ \mu\text{M}$, bicuculline が $30\ \mu\text{M}$ になるように、培地に滴下した。(n = 3)

神経細胞の電気刺激 21 時間, $300\ \text{mV}$, $10\ \text{Hz}$ で 42 電極をランダムに選択して電気刺激した。(n = 4)

3. 結果と考察

3.1. 実験系の構築と検証

遺伝子導入した神経細胞の移動の観察により、高密度 CMOS アレイ上での神経細胞の移動を確認でき、その移動量の分布を得た (Fig. 2)。移動量が指数分布であるという帰無仮説に対してリリーフォース検定した結果、 $p = 0.50$ となり、指数分布に近似できることが分かった。近

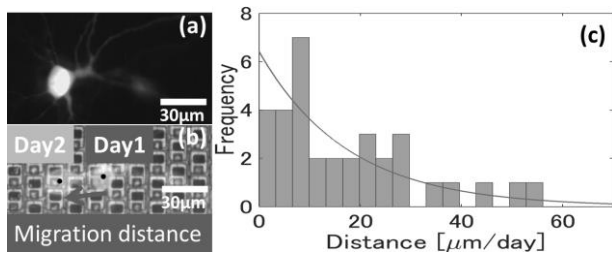


Fig. 2 Transfection. (a) Transfected neuron. (b) Detection of migration distance (c) Histogram of migration distance and fitted exponential line.

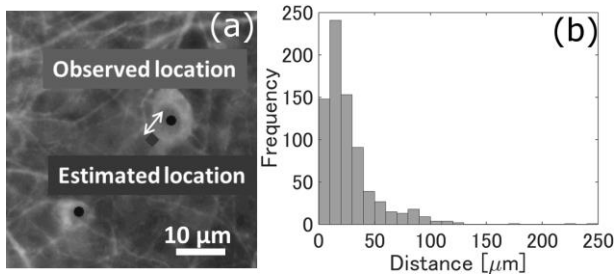


Fig. 3 (a) Estimated AIS position and observed positions of cell bodies. (b) Distances between two positions.

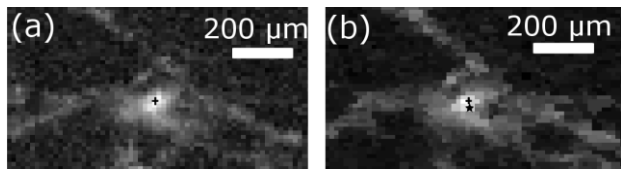


Fig. 4 Estimated cytoplasm. (a) First day. (b) Second day. Estimated position: (a) +, (b) ☆.

似した場合、98%の確率で移動量は $66 \mu\text{m}$ 以下になり、これを推定移動量の上限とした。

次に、免疫抗体染色し、蛍光観察した神経細胞の位置と CMOS の電位計測による推定位置を比較した (Fig. 3)。その結果、89 % の確率で両者の位置は $0\text{--}55 \mu\text{m}$ 離れていた。これは、CMOS で推定した位置は軸索起始部 (AIS) であるからであり [4]、細胞の位置を 89 % 精度で特定できたと言える。

同一細胞の移動を追跡していることを確認するため、移動前後の神経細胞の形態を推定した (Fig. 4)。その結果、12 個の移動のうち 10 個の移動において同一の細胞を追跡できていることが分かった。

3.2. 活動が移動に与える影響

神経活動が移動量に及ぼす影響を因果的に調べるため、神経細胞のシナプス伝達を阻害し、発火頻度を下げると移動量は増加した (Fig. 5) (2 標本コルモゴロフ・スミノフ検定, $p < 0.01$)。一方、電気刺激によって発火率を増加させても変化は見られなかった (Fig. 5) ($p = 0.05$)。これより、活動量よりも、シナプス伝達の有無が

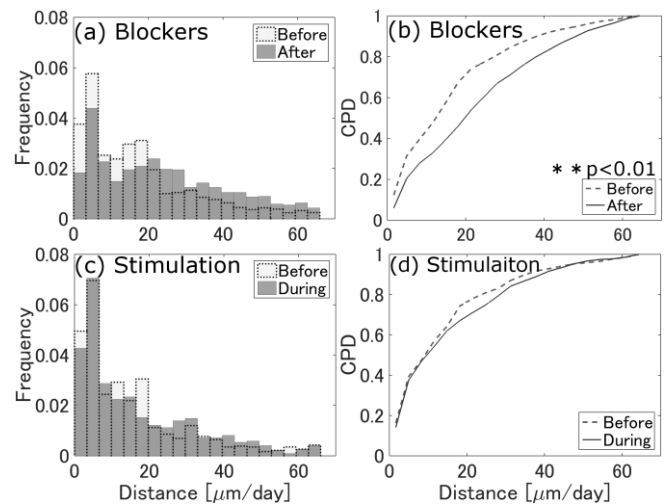


Fig. 5 Migration distance. (a)(b) Before and after synaptic blockers applied. (c)(d) Before and during stimulation. (a)(c) Normalized histogram. (b)(d) CPD.

移動量に大きな影響を与えることが示された。

4. 結論

神経細胞の移動は活動に依存するという仮説検証のため、移動と活動を同時に計測可能な実験系を構築し、蛍光観察と細胞の形態推定により検証した。構築した実験系を用いて、シナプス伝達の有無が移動量に影響を与えることを示した。これは、成熟した神経回路でも、神経細胞の移動が神経回路の機能調整を担うことを示唆している。

参考文献

- [1] D. J. Bakkum, U. Frey, M. Radivojevic, T. L. Russell, J. Müller, M. Fiscella, H. Takahashi, and A. Hierlemann, "Tracking axonal action potential propagation on a high-density microelectrode array across hundreds of sites.," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2181, 2013.
- [2] 大川知, 三田, 毅, D. Bakkum, U. Frey, A. Hierlemann, 神崎亮平, and 高橋宏知, "成熟した培養神経回路のネットワーク形状と活動の経時変化," *電気学会論文誌 C*, vol. 134, no. 3, pp. 338–344, 2014.
- [3] F. Franke, D. Jäckel, J. Dragas, J. Müller, M. Radivojevic, D. Bakkum, and A. Hierlemann, "High-density microelectrode array recordings and real-time spike sorting for closed-loop experiments: an emerging technology to study neural plasticity.," *Front. Neural Circuits*, vol. 6, no. December, p. 105, 2012.
- [4] M. S. Grubb and J. Burrone, "Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability," *Nature*, vol. 465, no. 7301, pp. 1070–1074, 2010.