

早稲田大学大学院 基幹理工学研究科

# 博士論文概要

## 論文題目

オートプスを持つ神経細胞回路の形成とそのスパイク活動解析

Formation of neuronal circuits containing autapses and analysis of their spiking activity

申請者

服部 晃平  
Kohei HATTORI

電子物理システム学専攻 分子ナノ工学研究

2023年12月

薄膜形成やリソグラフィといった微細加工技術の進展によって、細胞接着性の異なる特定の薄膜パターンを基板表面に形成できるようになった。これにより、生きた細胞に対して、接着・成長位置を規定し、さらに、その形態的特徴による分化制御や機能付与が可能となりつつある。特に神経細胞に対しては、回路構造を規定する手段となる。

神経細胞は入出力のための2つの神経突起（上流の細胞からの神経信号を受け取る樹状突起と、下流の細胞に神経信号を送出する軸索）をもつ。樹状突起からの入力がかきい値を超えると、細胞膜電位はスパイク状の変化を示し、活動電位を生成（発火）する。この活動電位は、出力信号として、化学シナプスを介して下流の細胞に伝わる。神経細胞同士がシナプスを介して接合し、多数のシナプスを形成することで神経細胞回路が構成されるが、大脳皮質のマイクロカラムに代表されるように、数十から百個程度の細胞からなる神経細胞回路でさえも特定の情報処理機能を実現することから、少数個の細胞からなる神経回路の機能の理解が求められている。1細胞あたりに数万個のシナプスが形成されるため、通常、神経細胞回路の構造把握には困難が伴う。それでもなお、マイクロパターニングは神経細胞の接着位置の規定だけでなく、神経突起の伸張方向制御や細胞種の識別をも可能としており、これにより、実質的に回路構造を規定した少数神経細胞回路を基板表面に構築できる。

実神経細胞は、ニューラルネットワーク（NN）型の機械学習モデルで使われるニューロンモデルと異なり、それ自体が複雑な発火パターンを示す情報処理素子である。特に、脳の神経細胞が持つオートプス（神経細胞が自身の軸索と樹状突起との間に形成する自己帰還シナプス）は最小の帰還接続であり、オートプスのみを持つ単一神経細胞が自発的にスパイクを生成し、多様な発火パターンを示すことは神経細胞回路の構成論的理解の出発点となる。

私は、オートプスを基軸とする神経細胞回路の発火メカニズムの理解が、ニューロベースの新たな情報処理モデルを開拓するための手掛かりとなる可能性を持つと考え、オートプスのみを持つ単一神経細胞の発火パターンの計測と数理モデル化に取り組んだ。本博士論文は、それを下記の6章にまとめたものである。

第1章「序論」では、細胞パターニング技術および神経細胞回路の諸特性に関する先行研究についてまとめたうえで、現状の課題と将来性について述べる。

第2章「神経細胞の膜電位変化を表現する数理モデル」では、理論解析で用いられる代表的な数理モデルとして、膜電位変化を表現する神経細胞モデルと神経細胞間の信号送受の過程を表現するシナプスモデルについて述べる。数理モデルの複雑性、表現できるダイナミクスを示し、第3章から第5章にかけて扱う理論解析で採用すべき数理モデルを選定する。

第3章「オートプス培養した単一神経細胞の自発発火パターン」では、円形マイクロパターン上でオートプス培養した単一神経細胞の自発発火パターンの生成

メカニズムについて論じる。当初、オートプスは、電子回路におけるリングオシレータのように、一定の周期を持つ単調な活動電位を生成する帰還接続と見なされていた。しかしながら、オートプスを持つ神経細胞が多様な自発発火パターンを示すことが実験的に観察され、それがネットワーク全体の同期的挙動を誘発することが示されたことを契機として、神経ネットワークにおけるオートプスの役割が注目されるようになった。私は、主要な興奮性シナプス受容体であり、短い時定数のシナプス電流を生成する  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 受容体と、長い時定数のシナプス電流を生成する N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の、2種類の受容体に由来するオートプス電流の寄与の仕方によって、オートプスを持つ神経細胞の発火パターンを再現できるとの独自の推論を得た。そこで、AMPA および NMDA オートプスを持つ単一神経細胞モデルを構築し、自発発火シミュレーションを実行した。同時に、マイクロパターン上で成長した、オートプスのみを有する単一神経細胞の発火パターンをパッチクランプにより取得し、シミュレーション結果と比較した。その結果、自発発火パターンが、①短いバースト、②長いバースト、③周期的バースト発火の3種類に分類できること、AMPA および NMDA コンダクタンスのバランスによって発火パターンが変化することを明らかにした。NMDA コンダクタンスが小さい場合、発火を持続させるだけの帰還電流を供給できなくなるために①の発火パターンが現れるのに対し、②ないし③の発火パターンを生成するためには、一定の水準を超える NMDA 電流が必要であった。パッチクランプにより取得された実験結果は、シミュレーションと同様の傾向を示し、AMPA および NMDA オートプスに基づく理論モデルを裏付けた。これらの結果は、AMPA 電流と NMDA 電流の寄与の仕方によって、オートプスを持つ神経細胞が異なる発火パターンを示すという仮説の妥当性を示している。

第4章「オートプス培養した単一神経細胞の刺激応答」では、神経細胞回路への選択的かつ非侵襲的な刺激を可能とする手法の構築、およびその性能検証結果について論じる。神経細胞への電気刺激は信号伝播の解析やシナプス強度の調節、神経細胞発火パターンの調節において重要な手法となる。全細胞パッチクランプ、マルチ電極アレイ、または光遺伝学を用いた手法が開発されたことで、様々な規模の神経細胞回路を刺激できるようになった。本研究では、2本針電極による電気刺激と細胞パターンニングとを組み合わせることで、それが小規模の神経細胞回路の解析に特化した実験的手法となることを示す。はじめに、LTspice 回路シミュレータを用いて、集中定数素子からなる神経細胞刺激系の等価回路を構成し、2本針電極による刺激の理論上の空間分解能を調査した。その結果、①電極界面の容量や細胞との距離によって、実質的な刺激範囲と強度をコントロールできること、②単一細胞を選択的に刺激できること、③刺激時の細胞外電位の瞬間的な下降によって電極近傍の細胞膜の電位が相対的に脱分極した状態となり、その部位で生成される活動電位が細胞膜表面を伝播することで、神経細胞全体の発火が

誘発されることを明らかにした。また、実神経細胞を用いた計測において、電気刺激に対する神経応答をカルシウムイメージングにより可視化し、電極に近い場所に位置する細胞ほど強い蛍光応答を示すこと、細胞パターンニングによって細胞間の距離を確保することで、単一神経細胞を照準して発火させられうることを実験的に示した。最後に、本手法の有用性を示すため、2本針電極刺激の前後における神経細胞の自発発火パターンを計測した。誘起発火を引き起こせる強度のシータバースト刺激を複数回入力することで、刺激前後での自発発火頻度が増加することを確認した。これら結果は、2本針電極を用いた刺激によって、自発発火頻度を増加させられうることを示している。

第5章「オータプスを持つ単一神経細胞回路における神経可塑性に基づくシナプス刈り込み」では、神経信号処理におけるオータプスの機能的役割を探索することを目的として、オータプス遅延とスパイクタイミング依存性シナプス可塑性（STDP）に基づくオータプス荷重の時間発展のシミュレーションを行った結果について論じる。シミュレーションモデルは第3章で扱ったモデルをベースとしており、異なる伝搬遅延を持つ複数のオータプスと、長期可塑性のダイナミクスとしてSTDPを含む。オータプスを持つ単一神経細胞モデルに対し、他細胞からの信号入力を模倣したポアソンスパイクを5秒間入力した。その結果、一定強度のスパイク入力に対して、接続強度の増強と抑圧がオータプス遅延時間帯別に交互に現れた。さらに、接続強度が増強される伝搬遅延群は、入力周波数に依存して変化した。淘汰されるオータプスに対する条件は、スパイク入力中の発火タイミング、およびオータプスにおける伝搬遅延から算出されるオータプス前後の実効的な発火タイミングのずれを、STDP曲線上にマップすることで得られる。高頻度で到達するスパイクには本質的に重要な情報が含まれていると捉えれば、STDPオータプスによるシナプス選択の特性は、重要な信号情報を選択的に抽出するための信号フィルターとして利用できることを意味する。

第6章「結論」では、実験とシミュレーションで得られた結果に対する結論を述べる。第3章から第5章にかけて述べた、オータプスを持つ単一神経細胞の発火パターンに関する考察と神経刺激手法は、複数細胞からなる神経ネットワークの機能解析にそのまま適用できる。したがって、小規模の神経細胞回路の解析に有用な実験手法である。加えて、本研究では自発発火と誘起発火の両面から小規模の神経細胞回路の解析を行った。この解析結果は、生体神経細胞回路に固有の機能に基づく、あるいはそれに着想を得た新たな情報処理モデルの開拓に繋がるものと位置付ける。

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名： 服部 晃平 印

(2023年 10月 12日 現在)

種別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
学術論文 ○	<u>K. Hattori</u> , H. Kurakake, J. Imai, T. Hashimoto, M. Ishida, K. Sato, H. Takahashi, S. Oguma, H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: Selective Stimulation of a Target Neuron in Micropatterned Neuronal Circuits Using a Pair of Needle Electrodes, <i>Electrochemistry</i> 89(4) (2020) 348.
学術論文 ○	<u>K. Hattori</u> , T. Hayakawa, A. Nakanishi, M. Ishida, H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: Contribution of AMPA and NMDA receptors in the spontaneous firing patterns of single neurons in autaptic culture, <i>Biosystems</i> 198 (2020) 104278.
学術論文 (共著)	S. Kono, K. Furusawa, A. Kurotobi, <u>K. Hattori</u> , H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: In situ modification of cell-culture scaffolds by photocatalysis of visible-light-responsive TiO <sub>2</sub> film, <i>Jpn. J. Appl. Phys.</i> 57 (2018) 027001, 1-5.
国際学会	<u>K. Hattori</u> , M. Ishida, H. Takahashi, S. Oguma, H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: Extracellular Stimulation of a Target Neuron in a Micropatterned Neuronal Circuit Using a Pair of Needle Electrodes, The 9th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Online, December, (2020).
国際学会	<u>K. Hattori</u> , H. Kurakake, J. Imai, T. Hashimoto, M. Ishida, K. Sato, H. Takahashi, S. Oguma, H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii, Extracellular Stimulation of a Target Neuron in Micro-Patterned Neuronal Circuits Using a Pair of Needle Electrodes, ECS PRiME 2020, Online, October, (2020).
国際学会	<u>K. Hattori</u> , K. Sato, H. Takahashi, S. Oguma, M. Ishida, H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: An experimental study on the spontaneous firing of single isolated neurons in autaptic culture using micropatterned substrates, The 8th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Sendai, February, (2020).
国際学会 (連名)	J. Imai, H. Kurakake, T. Hashimoto, <u>K. Hattori</u> , K. Sato, H. Takahashi, S. Oguma, M. Ishida, H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: Stimulation of micropatterned neurons with a pair of needles electrodes and the activity measurement, The 8th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Sendai, February, (2020).
国際学会 (連名)	M. Ishida, <u>K. Hattori</u> , A. Nakanishi, T. Hayakawa, H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: A computational study on the spontaneous firing pattern of single autaptic neurons - The contribution of AMPA and NMDA current -, The 4th International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development, Sendai, October, (2019).
国際学会 (連名)	H. Takahashi, K. Sato, S. Oguma, T. Hayakawa, <u>K. Hattori</u> , H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: An experimental study on the spontaneous firing of single isolated autaptic neurons using icropatterned substrates, The 4th International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development, Sendai, October, (2019).
国際学会 (連名)	K. Sato, T. Nakane, H. Takahashi, <u>K. Hattori</u> , H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: Koki Sato, Takahiro Nakane, Honoka Takahashi, Kouhei Hattori, Hideaki Yamamoto, Ayumi Hirano-Iwata and Takashi Tanii An experimental study on spontaneous firing of a single neuron on micropatterned substrates, The 7th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Sendai,
国際学会	<u>K. Hattori</u> , T. Hayakawa, A. Nakanishi, M. Ishida, H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: Computational modeling of spontaneous firing patterns generated by single autaptic neurons, The 7th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Sendai, February, (2019).
国際学会	<u>K. Hattori</u> , T. Hayakawa, A. Nakanishi, M. Ishida, H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: A computational modelling of spontaneous firing of single autaptic neurons, The 28th Annual Conference of the Japanese Neural Network Society, Okinawa Institute of Science and Technology(OIST), Okinawa, October, (2018).

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名： 服部 晃平 印

(2023年 10月 12日 現在)

種別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
国際学会	<u>K. Hattori</u> , S. Kono, T. Yoneyama, A. Nakanishi, H. Yamamoto, T. Tanii: An experimental and computational study on spontaneous firing pattern of a single neuron, The 6th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Sendai, February, (2018).
国際学会	<u>K. Hattori</u> , S. Kono, H. Yamamoto, T. Tanii: A computational study on spontaneous activity of a single neuron, The 5th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, Sendai, February, (2017).
国内学会 (連名)	小熊奏一郎, 服部晃平, 鞍掛碧流, 今井絢子, 山本英明, 平野愛弓, 谷井孝至, マイクロパターン上の神経細胞回路中の標的ニューロンへの二本針電極を用いた選択的刺激, 第68回応用物理学会春季学術講演会, オンライン, 2021年3月.
国内学会 (連名)	石田実穂子, 中西彬, <u>服部晃平</u> , 山本英明, 平野愛弓, 谷井孝至, オータプス伝搬遅延によるSTDPシナプスの淘汰: 孤立した単一神経細胞に関する数理モデル化, 第30回日本神経回路学会全国大会, オンライン, 2020年12月.
国内学会 (連名)	阿部雅史, 鈴木芳隆, 片村立太, 金子貴司, 西谷章, 谷井孝至, <u>服部晃平</u> , 仁田佳宏, 大型振動台を用いたRC 造建物加振実験における同時計測による各種計測センサの有効性の検証, 2020年度日本建築学会大会, 千葉大学, 千葉, 2020年9月.
国内学会	<u>服部晃平</u> , 石田実穂子, 鞍掛碧流, 今井絢子, 橋本拓弥, 佐藤晃揮, 高橋穂乃歌, 小熊奏一郎, 山本英明, 平野愛弓, 谷井孝至, 2針電極を用いた神経細胞刺激の応答計測とその理論解析, 第67回応用物理学会春季学術講演会, 上智大学, 東京, 2020年3月.
国内学会 (連名)	鞍掛碧流, <u>服部晃平</u> , 今井絢子, 橋本拓弥, 佐藤晃揮, 高橋 穂乃歌, 小熊奏一郎, 石田実穂子, 山本英明, 平野愛弓, 谷井孝至, マイクロパターン上の神経細胞への 2 針電極による刺激とその応答計測, 第67回応用物理学会春季学術講演会, 上智大学, 東京, 2020年3月.
国内学会	<u>服部晃平</u> , 石田実穂子, 高橋穂乃歌, 佐藤晃揮, 中西彬, 小熊奏一郎, 早川岳志, 山本英明, 平野愛弓, 谷井孝至, マイクロパターン基板表面で培養した単一神経細胞の自発活動, 学際・国際的高度人材育成ライフイノベーションマテリアル創製共同研究プロジェクト(6大学連携プロジェクト)第4回公開討論会, 東京ガーデンパレス, 東京, 2020年3月.
国内学会	<u>服部晃平</u> , 鞍掛碧流, 今井絢子, 橋本拓弥, 佐藤晃揮, 高橋穂乃歌, 早川岳志, 山本英明, 平野愛弓, 谷井孝至, 2本針型刺激電極の試作とマイクロパターン上神経細胞回路への刺激導入に関する実行可能性評価, 第80回応用物理学会秋季学術講演会, 北海道大学, 札幌, 2019年9月.
国内学会	<u>K. Hattori</u> , S. Kono, T. Yoneyama, A. Nakanishi, H. Yamamoto, T. Tanii, An experimental and computational study on spontaneous firing pattern of a single neuron, 第27回日本神経回路学会全国大会, 北九州国際会議場, 福岡, 2017年9月.
国内学会 (連名)	河野翔, 黒飛敦, <u>服部晃平</u> , 山本英明, 平野愛弓, 谷井孝至, 可視光応答酸化チタンの光触媒作用を活用した液中表面改質と細胞パターンニング, 第37回 表面科学学術講演会, 横浜市立大学, 神奈川, 2017年8月.
国内学会	<u>服部晃平</u> , 丸谷翔平, 畑田朋彦, 片村立太, 西谷章, 谷井孝至, 非接触型センサを用いた建物の層間変位計測システム その12 データ処理機能を内蔵した小型統合センサの開発, 2016年度日本建築学会大会, 福岡大学, 福岡, 2016年8月.