

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

2024年2月

服部 晃平  
Kohei HATTORI

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

2024年2月

早稲田大学大学院 基幹理工学研究科  
電子物理システム学専攻 分子ナノ工学研究

服部 晃平  
Kohei HATTORI

# 謝辞

初めに、私の指導教官である谷井孝至 教授に心より感謝の意を表します。優しく、時に厳しくご指導を賜り、多くの事を研究生活の中で学ばせて頂きました。満期退学後もなお継続してご指導頂いたお陰で、ようやくこの謝辞を書くことができいております。本当に有難うございました。本研究を推進するにあたり、巧みなご指導を賜りました東北大学 山本英明 准教授、東北大学 平野愛弓 教授に感謝いたします。特に、一通目の原著論文執筆にあたっては、実験と論文執筆の両面から多大なサポートを頂きました。副査として丁寧なご査読を賜りました中西淳 教授、森本雄矢 准教授に感謝いたします。先生方の洞察に満ちたご指摘が本研究を明確にするための鍵となりました。

谷井研究室 神経班の石田実穂子 氏、中西彬 氏、今井絢子 氏、鞍掛碧流 氏、長谷川（高橋）穂乃歌 氏、橋本拓弥 氏、米山智也 氏、中根任宏 氏、黒飛敦 氏、佐藤晃揮 氏、小熊奏一郎 氏、望月直樹 氏、東北大学 早川岳志 氏に感謝いたします。実験とシミュレーションに関するサポートや、皆様との継続的な議論のお陰で充実した研究生活を送ることができました。

谷井研究室 神経班 OB の河野翔 博士に感謝いたします。河野氏からの後押しがなければ、私は博士課程進学に踏み切ることができませんでした。苦しい時期もありましたが、博士課程での活動を通じて多くの事を学び、それらは社会人となった今でも役に立っております。

構造ヘルスマニタリングに関する早稲田・鹿島共同研究でお世話になった西谷章 教授、仁田佳宏 教授、センスネットの金川清 様、そして片村立太 様をはじめとする鹿島建設の皆様感謝いたします。社会実装を見据えた貴重な研究の機会を頂いたことに心から感謝いたします。

谷井研究室 センサ班の浅田舜介 氏，韓宇華 氏，徐海洲 氏に感謝いたします。早稲田・鹿島共同研究にて共に活動できたことが，厳しい博士課程生活における励みにもなりました。

同期のアブデルガファ愛満 氏，岡田拓真 氏，加賀美理沙 氏，加藤佑拓 氏，野田和希 氏，若林洸 氏に感謝いたします。様々な研究テーマに関する議論は刺激的で，視野を広げることに繋がりました。

最後に，研究生活での私の支えとなってくれた両親の服部等，服部夏子，そして玄関でいつも出迎えてくれた愛猫のそらとしちみに感謝いたします。

私は恵まれた研究生生活を送ることができ，ただ幸運でした。現在はアカデミアを離れてしまっておりますが，学んだことを社会に還元していくことで，この恩に報いたいと思います。

なお，本研究は JSPS 科研費（18K19026，18H03325，20K19925），特定課題研究助成費（BARE004443），科学技術機構 CREST プログラム（JPMJCR14F3）の助成を受けたものです。

東京

2024年 1月

服部 晃平

# 目次

1 章 序論 .....	4
1.1 本研究の背景と動機.....	4
1.1.1 オータプス研究の必要性.....	4
1.1.2 基本的な帰還接続としてのオータプス.....	6
1.1.3 自発発火のダイナミクス .....	7
1.1.4 シナプス可塑性の役割 .....	9
1.1.5 神経細胞回路の複雑性に対する局所神経回路の位置づけ .....	10
1.1.6 マイクロパターン上での神経細胞回路構築.....	11
1.2 本論文の概要.....	13
参考文献.....	16
2 章 神経細胞の膜電位変化を表現する数理モデル .....	26
2.1 活動電位の生成と神経細胞間での信号伝達 .....	26
2.2 神経細胞の膜電位変化を表現する数理モデル .....	28
2.2.1 Integrate-and-Fire モデル .....	29
2.2.2 Hodgkin-Huxley モデル .....	30
2.3 シナプスの数理モデル .....	32
2.3.1 $\alpha$ シナプスモデル .....	34
2.3.2 ダイナミックシナプスモデル .....	36
2.4 本研究で活用した数理モデル .....	37
参考文献.....	39
3 章 オータプス培養した単一神経細胞の自発発火パターン計測とその数理 モデル構築 .....	42
3.1 背景および目的 .....	42
3.2 実験方法.....	46
3.2.1 ガラス基板表面におけるマイクロパターンの作製.....	46
3.2.2 細胞培養 .....	48
3.2.3 パッチクランプ法による単一神経細胞の膜電位計測.....	49
3.2.4 相関分析による自発発火パターン分類.....	50
3.3 シミュレーション方法.....	50

3.3.1 受容体の異なる複数のオートプスを持つ単一神経細胞の数理モデル構築	50
3.4 結果および考察	54
3.4.1 オートプスを持つ単一神経細胞の自発発火パターン	54
3.4.2 自発発火パターンの生成メカニズム	60
3.4.3 オートプスを持つ単一神経細胞の脳機能における役割	62
3.5 結論	65
参考文献	66
4章 オートプス培養した単一神経細胞の刺激と応答	74
4.1 背景および目的	74
4.2 実験方法	76
4.2.1 ガラス基板表面におけるマイクロパターンの作製	76
4.2.2 細胞培養	77
4.2.3 カルシウムイメージング法を用いた神経活動計測	77
4.2.4 単一神経細胞への選択的刺激のための2本針電極の作製	78
4.3 シミュレーション方法	80
4.3.1 LTspice シミュレータを用いた積分発火型2コンパートメント等価回路モデルの構築	80
4.3.2 Hodgkin-Huxley 型2コンパートメントモデルの構築	83
4.4 結果および考察	85
4.4.1 2本針電極による標的細胞への選択的刺激	85
4.4.2 2本針電極を用いた神経刺激の電気的メカニズムの解析	89
4.4.3 電極特性が刺激選択性に与える影響	92
4.4.4 刺激に依存した神経活動の変化	95
4.5 結論	98
参考文献	99
5章 オート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	106
5.1 背景および目的	106
5.2 シミュレーション方法	109
5.2.1 STDP オートプスを持つ単一神経細胞の数理モデル構築	109
5.3 結果および考察	111
5.4 結論	118

参考文献.....	120
6章 結論.....	123
業績リスト.....	126

## 1 章 序論

### 1.1 本研究の背景と動機

#### 1.1.1 オータプス研究の必要性

ニューラルネットワークをベースとする今日の機械学習モデルに関する研究は、脳機能解析とは独立して発展しつつも、生体神経細胞回路のダイナミクスから着想を得た仕組み自体を随所に取り入れてきた<sup>1-5</sup>。この試みは、視覚野を模した構造である畳み込みニューラルネットワークの成功からも明らかのように、基礎領域と応用領域の双方に貢献しており、生体脳特有の情報処理に寄与する神経細胞の素子特性や回路構造を理解することは工学応用の観点からも重要である。これらの事実は、脳機能の理解を基盤として、それを情報処理システムや素子に取り込むことによる更なる発展の可能性を示唆している。

これまでの研究によって脳機能の理解が進む一方で、既知ではあるが人工ニューラルネットワークには組みこまれていない要素も残されている。そもそも神経パルスパターンにどのように情報がコーディングされているのか？といった根本的な疑問だけでなく、例えば、（1）外部入力のない状態でも神経ネットワーク内部の帰還接続を介した持続的な信号伝搬による自発活動や熱的揺らぎによって生じると考えられている自発発火現象<sup>6,7</sup>、（2）イオンチャネル分布や形態の違いによる単一神経細胞の多様な発火パターン生成<sup>8,9</sup>、（3）脳の外側の環境も含めた信号の帰還とそのフィードバックによる状態遷移<sup>10,11</sup>、などが挙げられる。

本研究では、もっとも基本的な帰還接続と見なせるオータプスに着目する。オータプスは神経細胞の軸索とその細胞自身の樹状突起との間に自己帰還接続を形成する



シナプスである<sup>12-20</sup>。オータプスに関しては脳内の様々な領域でその存在が確認されてきたにも関わらず、脳機能として重要視されていなかった。近年、その機能やネットワークに与える影響が理論計算を中心に報告され始めたが、オータプスを持つ単一神経細胞回路の形成とその計測に関する実験的手法には改良の余地が残されており、また、生物学的なオータプスの役割は明らかでない。そのため、オータプスの寄与によって実現される機能とそのメカニズムを明らかにできれば、それらを機械学習モデルの新たな要素として利用できる可能性がある。

神経細胞回路へのオータプスの寄与は、脳における主たる信号伝達の経路がフィードバック経路であることや、脳が少数個の神経細胞から構成される機能モジュールの集合であることから推測できる(図 1.1)。神経細胞回路が発火した際、内在するオータプスの接続強度は、オータプスがシナプスの一種であるゆえ、シナプス可塑性によって変化すると想定される。したがって、オータプスを持つ神経細胞回路の実効的な回路構造やそこから生じる性質は、たとえ物理的な配線に変化がなくとも動的に変化する。これによりオータプスは、(1) フィードバックによる単一神経細胞の反応性の向上、(2) それに基づく神経細胞回路の活動の適切な同期化、(3) フィードバック遅延に基づく選択的な情報の抽出と処理などの多様な機能を機能モジュールにもたらすと考えられる。このようなダイナミクスを現行のニューラルネットワークに組み込むことができれば、例えば、少数個の人工ニューロンから構成される局所的な計算ユニットにおける情報処理性能の向上や、小規模かつ一定の機能性の担保された新たなモデルの構築(ノード数を増やすことで性能向上を図ってきた今日のニューラルネットワークモデルとは反対のアプローチ)などへの応用が期待できる。上記を背景として本研究では、オータプスのみを持つ単一神経細胞の数理モデル、および実験手法の構築を行った。

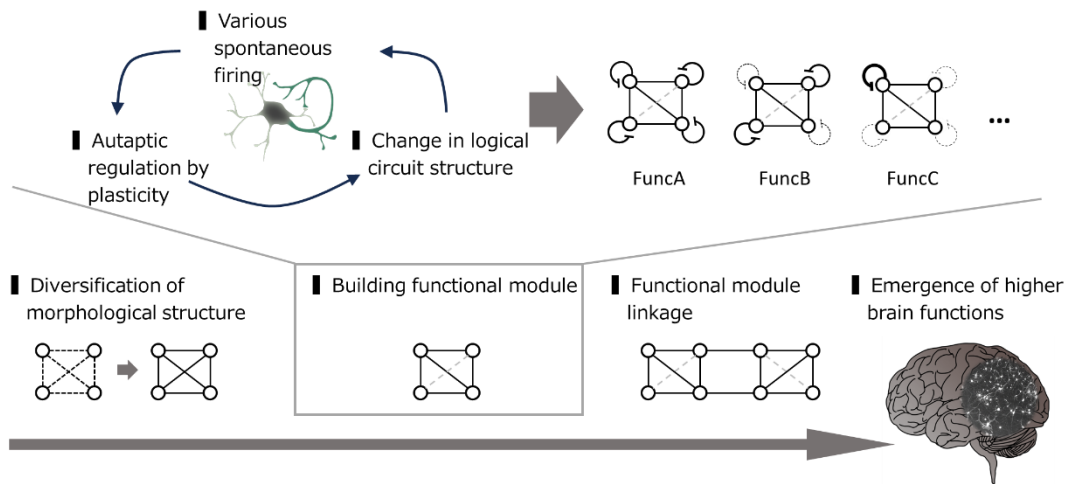


図 1.1 脳機能におけるオートプスの想定しうる位置づけ.

### 1.1.2 基本的な帰還接続としてのオートプス

オートプスは神経細胞の軸索とその細胞自身の樹状突起との間に自己帰還接続を形成するシナプスである (図 1.2) . オートプスが自己帰還接続であることから, 当初それは, 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回路と見なされていた<sup>21</sup>. それゆえ, 神経ネットワークにおいてオートプスが果たす役割について注目されることはあまりなく, もっぱらギャップ接合または  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) 電流を主成分とする化学シナプスとしてモデル化された<sup>22</sup>. どちらも細胞自身の膜電位を上昇させるフィードバック電流を生成する. フィードバック電流の特性は, 通常, 時間軸上において不変のギャップ接合部やシナプス受容体の特性に依存している. したがって, オートプスは静的なフィードバック電流を提供し, 周期的な発火を誘発すると考えられていた<sup>21</sup>. しかしながら, オートプスを持つ神経細胞が様々な発火パターンを示すことが生理学的実験で観察されるようになると<sup>23-27</sup>, 神経ネットワークにおけるオー

タプスの役割も注目されるようになった。また、他の細胞とは接続を持たず、オートプスのみを持つ単一神経細胞が *in vitro* で培養されるようになると、自己帰還接続しか持たない単純な構成であるにもかかわらず、個々の単一神経細胞がそれぞれ異なる発火パターンを示すことが報告された<sup>26</sup>。これらの報告は、生体のオートプスが多様な発火特性によって、理論研究で報告されてきた同期的挙動に対する寄与のみならず、多様な効果を神経細胞回路に対してもたらすことを示唆するものと考えられる。

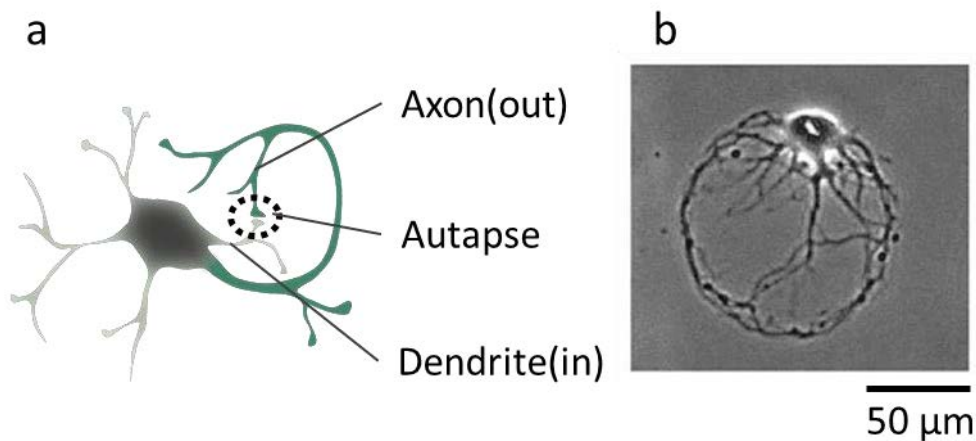


図 1.2 オータプスを持つ単一神経細胞回路の(a)模式図，および，(b)円形接着領域上で成長した例（位相差像）。

### 1.1.3 自発発火のダイナミクス

神経細胞回路内の細胞は、感覚器からの外部刺激が与えられていない状態でも発火しうる。このような内因性の発火は自発発火と呼ばれる。自発発火のパターンは、神経細胞回路の成熟度や構造によって異なる。発達初期の神経細胞回路では、個々の細胞が散発的な自発発火を示し、そのパターンには相関がみられないが、成熟するにつれて、神経ネットワーク内での情報伝送において優位に働くと考えられている同期的

パターン<sup>28-31</sup>や、認知機能に関連するとされる特定の規則性を持ったパターン<sup>32, 33</sup>が、自発発火パターンとして現れるようになる。そのため、自発発火は不要な生理現象ではなく、情報処理における機能的役割を担うと考えられる。興味深いことに、分散培養した神経細胞回路は、生体内の神経細胞回路と比べてシナプスを形成しやすく、過剰な同期発火を示す傾向がある<sup>34</sup>。また、自発発火を示す神経細胞回路に対してシナプス受容体拮抗薬を作用させることで、自発発火スパイクの生成頻度が減少することが一般に知られている。そのため、シナプスにおける確率的な神経伝達物質の放出などによる神経ノイズが、自発発火に関与していると考えられる。特に神経細胞がオートプスを形成した場合は、神経ノイズだけでなく、その細胞自身が生成した活動電位がオートプスを介したフィードバック入力となることも自発発火に寄与する。これらは、小規模な神経細胞回路における自発発火パターンが、内在するシナプス接続の特性によって定義される実効的な回路構造に依存していることを意味している。

自発発火のダイナミクスは新たな情報処理モデルの仕組みとしても利用できる。例えば、ノイズによって確率的に発火する興奮性神経細胞と抑制性神経細胞とからなる皮質微小回路モデルは、任意の初期状態から始まる自発発火パターンを、ネットワーク特性に備わる定常分布へと指数関数的に収束させられうる<sup>35</sup>。この特性を利用することで、制約従属問題の解を神経細胞回路の自発発火パターンから生成する試みがなされている<sup>35-37</sup>。また、再帰的接続を持つスパイクニューラルネットワークモデルを関数近似器として利用する **Liquid State Machine** は、入力信号パターンをネットワーク内の持続的な自発活動パターンに変換することで、時系列情報を予測する<sup>38</sup>。<sup>39</sup>。このように、自発発火メカニズムの理解は脳機能理解の観点だけでなく、工学応用の観点からも意義を持つ。

### 1.1.4 シナプス可塑性の役割

神経細胞回路の発火特性は、個々の細胞の成長や細胞間での相互作用によって可塑的に変化する。特に、成熟した神経細胞回路は、細胞間のシナプス接続の強度をシナプス可塑性によって動的に変化させることで、多様な機能を実現していると考えられている。スパイクタイミング依存性可塑性 (Spike-Timing-Dependent Plasticity; STDP) は、隣接する 2 細胞間のシナプス接合の強度を、2 つの細胞の発火タイミングに応じて増強あるいは抑圧する可塑性である<sup>40-43</sup>。具体的には、ある神経細胞が発火し、その後に隣接する下流の神経細胞が短い時間窓 (約 100 ms) の中で発火すると、それらの神経細胞間のシナプス結合は増強される。逆に、下流の神経細胞が発火した後に上流の神経細胞が発火すると、シナプス結合は抑圧される。STDP は複数の脳領域や、分散培養系、脳スライスにおいて確認されており、神経細胞回路に広く内在する。STDP は、2 つの細胞において生じた発火に関連性が高い場合は両者の接続を強化するように働くため、記憶形成や学習プロセスにおける回路構造の再構築に関与すると考えられる。

シミュレーション研究によって、STDP が組み込まれた神経ネットワークが、同期的発火パターン<sup>44-46</sup>、非同期的発火パターン<sup>47, 48</sup>、同期非同期間を不規則に遷移する発火パターン<sup>49, 50</sup>を生成しうることが報告されている。これらの中には、生体神経細胞回路と同様の発火パターンが含まれており、例えば、機能的接続によって随時形成させる特定の細胞集団の同期発火 (セルアセンブリ) や、細胞集団の連鎖伝搬的な発火 (シンファイアチェイン) などが確認されている。このように、STDP は脳機能において重要な役割を持つ発火パターンをもたらす。なお、先述した自発発火のダイナミクスと同様に、STDP は情報処理モデルの精度の観点からも優位に働きうる。例えば、適切なパラメータ設定がなされた STDP が組み込まれた Liquid State

Machine は、STDP が含まれない場合よりも高いパターン認識精度を達成できることが報告されている<sup>51-53</sup>.

### 1.1.5 神経細胞回路の複雑性に対する局所神経回路の位置づけ

大規模神経ネットワークにおける多数の神経細胞同士の相互作用によって様々な活動パターンが創発することが確認されてきた一方で、数個～数十個ほどの細胞から構成される小規模な神経細胞回路における発火パターンやその機能的役割は十分に理解されていない。高次認知機能を司る大脳皮質はその典型例である。大脳皮質は、20 個程度の神経細胞が積み重なった 6 層構造から成るマイクロカラムが、脳表面に対して平行に配列することで構成されている<sup>54, 55</sup>。脳内の神経細胞の総数が億単位であることを鑑みれば、比較的シンプルなこの構造にも関わらず、マイクロカラムが実現する機能やそのメカニズムには未解明である。これは、個々の神経細胞のダイナミクスが人工ニューロンのような単純なモデルよりも複雑であることや、シナプス可塑性を介して定義される実効的な回路構造を把握することが容易でないことに起因する。例えば、大脳皮質錐体細胞は、等間隔で規則的に発火する **Regular Spiking** 細胞や周期的にバースト発火する **Intrinsically Bursting** 細胞などのいくつかのサブタイプに分けられる<sup>56-58</sup>。また、特定の脳領域の細胞のみが示す固有の発火パターンが存在することも知られており、例えば、小脳のプルキンエ細胞はシナプス入力のない状態でも複数のピーク電位からなるバーストスパイクを自発的に生成しうる<sup>59, 60</sup>。このような単一神経細胞の発火パターンの複雑性は、理論研究によっても調査されており、近年、大脳皮質の神経細胞の入出力特性が 5～8 層のディープニューラルネットワークモデルによって再現されることが示された<sup>61</sup>。以上の事例は、単一の神経細胞がそれ自体

で複雑な計算能力を持つ可能性が高いことを示唆している。生体内の神経細胞は平均 7,000 個（ヒトの場合）ものシナプスを形成し<sup>61</sup>、神経細胞回路を構成している。そのため、数個～数十個程度の神経細胞が組み合わさることで構成される神経細胞回路は、細胞数から直感的に想像される以上に豊かなダイナミクスを持ち、生体脳特有の情報処理に寄与していると推測される。このような規模の神経細胞回路の機能解析において、1つの方法論となるのが細胞パターンニング技術である。

### 1.1.6 マイクロパターン上での神経細胞回路構築

神経細胞を対象とした細胞パターンニング<sup>70</sup>は実神経細胞回路解析の強力なツールである。大脳皮質の局所神経回路（マイクロカラム）に代表されるように、脳は階層構造を持つ神経細胞回路で構成されている<sup>71, 72</sup>。また、機能構造上、最下層に位置する数個～数十個程度の細胞から構成される局所的な神経細胞回路でさえ、何らかの計算機能を有するとされる。細胞パターンニングを用いると、局所神経回路を模した神経細胞回路や、その機能理解のために人工的に設計した神経細胞回路を基板上に構築できる。これらの回路の解析によって、高次の神経細胞回路の動作に影響を与えうる基本的な回路の特性を導き出すことができ、構成論的観点から神経細胞回路の動作を理解できる。

マイクロパターン上に構成可能な回路構造の種類は神経突起の形態的成長をどの程度まで制御できるかに委ねられる。この制御は神経突起の先端部に形成される成長円錐が周辺の三次元構造と表面の化学的性質の違いを認識できる特性<sup>73-77</sup>を利用することで実現できる。具体的な手法には、構造物の物理的な凹凸のサイズや形状によって神経突起の伸張を誘導する物理的手法や、神経細胞が接着し成長できるパターンを

表面改質によって定義する化学的手法がある。物理的手法は、セットアップが容易である反面、パターン境界と神経突起とが会合した際の伸長方向の決定が確率的であるため、神経細胞回路の構造はランダム性を伴う<sup>78, 79</sup>。対して、化学的手法は自己組織化単分子膜 (Self-Assembled Monolayer; SAM) などのパターン形状に基づく神経突起の絶対的な誘導を可能とする<sup>80, 81</sup>。配線パターンが密集していると例外的に配線間のジャンプが発生する可能性があるが、それを防ぐために十分な間隔 (30  $\mu\text{m}$  程度) を設けた配線パターンを用いることで<sup>72</sup>、再現性の高い神経細胞回路が構築されている。そのため複雑な形態変化を示す神経細胞のパターニングにおいては、一般に化学的パターニングが用いられる。

SAM を用いた化学的パターニングによって、個々の神経細胞の素子特性の識別や、回路構造の動的制御が可能である。例えば、GABA ( $\gamma$ -アミノ酪酸) 作動性神経細胞かそうでないかといった細胞種の識別が、神経突起の走化性を利用した非対称マイクロパターンによって実行された。細長い接着領域を用意すると、その近傍に接着した神経細胞の神経突起は接着領域に沿って伸長する。この際の神経突起の最終的な長さや伸長速度の違いから、神経突起の種類 (軸索, 樹状突起) および細胞種 (興奮性, 抑制性) が識別された<sup>82</sup>。なお、この識別は接着領域の面積や形状、播種密度の組み合わせ次第で、基板上的複数細胞に対して同時に行うこともできる。他方、回路構造の動的制御には、主に2つの手法の報告がなされている。1つは神経突起の周辺に集光レーザー (光ピンセット) を照射し、光学的な作用によってレーザースポットへと神経突起を引き寄せる手法である<sup>83, 84</sup>。この手法は、可視から近赤外の波長範囲 (0.5 ~ 1  $\mu\text{m}$ ) の集光レーザーを光ピンセットとして用いることで、標的細胞周辺のマイクロメートルサイズの物質を非接触で操作することを可能とする。シナプス小胞の放出をも制御できる高い制御性を誇るが<sup>85</sup>、神経突起誘導で用いる場合、光反応や



熱による神経突起の損傷が生じる懸念がある。もう一つの手法は細胞培養表面をフェムト秒レーザーなどで改質することで、接着領域を描く手法である<sup>86-89</sup>。この手法は複数の標的を同時に処理できることを利点とする。神経細胞は非常に脆弱なため、パターン形成時のレーザー照射によってダメージを受ける場合があるが、レーザーの代わりに可視光を使用することでこの点を克服できることが報告されている<sup>90</sup>。以上のように、所望の接続構造を持つ神経細胞回路の時空間的活動パターン解析のための要素技術が、マイクロパターンニング技術によって揃いつつある。本研究では、単一神経細胞をガラス基板上で孤立して成長させるために、SAMを用いた。これにより、単一神経細胞がオータプスのみを持つように制御した。加えて、シナプスを介した他細胞からの直接的な信号入力がない状況を人為的に構築した。

## 1.2 本論文の概要

これまでに述べたように、脳情報処理においてオータプスは何らかの機能的な役割を担うと推測されるが、オータプスを持つ神経細胞回路の自発発火パターン生成や、可塑性による回路構造変化の機序は、大きく2つの理由から未解明である。1つは、オータプスを持つ単一神経細胞の発火パターンの生成メカニズムを説明するための数理モデルが不足していることである。多くの理論解析においてオータプスは、振動子として機能する神経細胞の文脈において注目され、単純なシナプスとしてモデル化される。そのため、生物学的なシナプスに見られる受容体の多様性などの影響は捨象されている。もう1つの理由は、オータプス可塑性が発火特性にもたらす影響を調査するための方法論が不足しているためである。これは、本章冒頭で述べたオータプス自体が重要視されてこなかったことや、それに伴って、オータプスを持つ単一神経細

胞を非侵襲的に刺激する実験的手法が不足していることに起因する。以上を踏まえて本研究では、以下の 3 項目に取り組むことで、小規模な神経細胞回路におけるオートプスの寄与を調査するために必要となる、次の①から③の数理モデルと実験的手法を構築した。①オートプスを持つ単一神経細胞の自発発火パターンの生成メカニズムを説明できる数理モデルの構築、②オートプスを持つ単一神経細胞の活動状態の可塑的变化の調査に利用できる非侵襲神経刺激手法の構築、③オートプスがシナプス可塑性を持つ場合に現れる神経回路の実効的な回路構造変化の解析。

本論文では、神経細胞回路の発火パターンの理論解析のための数理モデルについてはじめに論じる。次に、オートプス培養した単一神経細胞の自発発火に関する実験およびシミュレーション結果に対して、オートプスの機能性に関する考察を与える。さらに、神経活動の長期計測に向けて構築した、選択性と非侵襲性を兼ね備えた神経刺激手法について述べる。その後、刺激に対するオートプスの可塑的变化について述べる。最後に全体を通しての結論を与えると同時に、将来の神経細胞回路解析への本研究の波及効果の可能性について述べる。

2 章「神経細胞とシナプスの数理モデル」では、理論解析で用いられる代表的な数理モデルを論じる。神経細胞とシナプスの数理モデルごとに、数理モデルの複雑性、表現できるダイナミクスを示し、3 章と 4 章における理論解析で採用すべき数理モデルを選定するための判断基準を示す。

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。自発発火パターンが 3 種類に分類できることを示す。さらに、シナプス受容体の多様性と短期可塑性が、発火パターン決定に寄与していることを示す。この結果を踏まえて、神経細胞回路におけるオートプスの機能的役割について述べる。

4 章「オータ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実現する新手法の構築，およびその性能検証結果について論じる．2 本針電極による神経刺激が，培養表面上の特定の単一神経細胞の神経発火を誘起できること，および刺激の選択性を電極特性で制御可能なことを示す．さらに，複数神経細胞からなる回路の自発発火パターンの可塑的な変化を，神経刺激によって誘起できることを示す．これらの結果を踏まえて，本手法の有用性について述べる．

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選択」では，3 章および 4 章で扱った神経細胞回路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た，オータプス遅延と 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結果について論じる．神経細胞回路への刺激入力によって特定のオータプスが刺激周波数に依存して選別されること，その選択規則を STDP 曲線で説明できることを示す．この結果を踏まえて，神経信号処理におけるオータプスの有用性について述べる．

6 章「結論」では，本論文全体の結論を与える．さらに，本研究の将来性および波及効果についても述べる．

## 参考文献

1. Hinton, G. E., Osindero, S. & Teh, Y.-W. A Fast Learning Algorithm for Deep Belief Nets. *Neural Comput.* **18**, 1527–1554 (2006).
2. Hopfield, J. J. Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 2554–2558 (1982).
3. Holland, J. H. Genetic Algorithms. *Sci. Am.* **267**, 66–73 (1992).
4. Salimans, T., Ho, J., Chen, X., Sidor, S. & Sutskever, I. Evolution Strategies as a Scalable Alternative to Reinforcement Learning. *arXiv.1703.03864* (2017).
5. Yada, Y., Yasuda, S. & Takahashi, H. Physical reservoir computing with FORCE learning in a living neuronal culture. *Appl. Phys. Lett.* **119**, 173701 (2021).
6. Gj, R., Ma, C. & Am, H. Development in the absence of spontaneous bioelectric activity results in increased stereotyped burst firing in cultures of dissociated cerebral cortex. *Exp. Brain Res.* **79**, (1990).
7. Sun, J.-J., Kilb, W. & Luhmann, H. J. Self-organization of repetitive spike patterns in developing neuronal networks in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **32**, 1289–1299 (2010).
8. Connors, B. W., Gutnick, M. J. & Prince, D. A. Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* **48**, 1302–1320 (1982).
9. Llinás, R. & Sugimori, M. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J. Physiol.* **305**, 197–213 (1980).

10. Compte, A., Brunel, N., Goldman-Rakic, P. S. & Wang, X.-J. Synaptic Mechanisms and Network Dynamics Underlying Spatial Working Memory in a Cortical Network Model. *Cereb. Cortex* **10**, 910–923 (2000).
11. Durstewitz, D., Seamans, J. K. & Sejnowski, T. J. Neurocomputational models of working memory. *Nat. Neurosci.* **3**, 1184–1191 (2000).
12. Van der Loos, H. & Glaser, E. M. Autapses in neocortex cerebri: synapses between a pyramidal cell's axon and its own dendrites. *Brain Res.* **48**, 355–360 (1972).
13. Preston, R. J., Bishop, G. A. & Kitai, S. T. Medium spiny neuron projection from the rat striatum: an intracellular horseradish peroxidase study. *Brain Res.* **183**, 253–263 (1980).
14. Peters, A. & Proskauer, C. C. Synaptic relationships between a multipolar stellate cell and a pyramidal neuron in the rat visual cortex. A combined Golgi-electron microscope study. *J. Neurocytol.* **9**, 163–183 (1980).
15. DiFiglia, M., Pasik, P. & Pasik, T. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* **114**, 245–256 (1976).
16. Park, M. R., Lighthall, J. W. & Kitai, S. T. Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res.* **194**, 359–369 (1980).
17. Scheibel, M. E. & Scheibel, A. B. Inhibition and the Renshaw cell. A structural critique. *Brain Behav. Evol.* **4**, 53–93 (1971).
18. Karabelas, A. B. & Purpura, D. P. Evidence for autapses in the substantia nigra. *Brain Res.* **200**, 467–473 (1980).

19. Cobb, S. R. et al. Synaptic effects of identified interneurons innervating both interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *Neuroscience* **79**, 629–648 (1997).
20. Bekkers, J. M. & Stevens, C. F. Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7834–7838 (1991).
21. Herrmann, C. S. & Klaus, A. Autapse turns neuron into oscillator. *Int. J. Bifurc. Chaos* **14**, 623–633 (2004).
22. Li, Y., Schmid, G., Hänggi, P. & Schimansky-Geier, L. Spontaneous spiking in an autaptic Hodgkin-Huxley setup. *Phys. Rev. E* **82**, 061907 (2010).
23. Kimura, F., Otsu, Y. & Tsumoto, T. Presynaptically silent synapses: spontaneously active terminals without stimulus-evoked release demonstrated in cortical autapses. *J. Neurophysiol.* **77**, 2805–2815 (1997).
24. Rost, B. R. et al. Autaptic cultures of single hippocampal granule cells of mice and rats. *Eur. J. Neurosci.* **32**, 939–947 (2010).
25. Yin, L. et al. Autapses enhance bursting and coincidence detection in neocortical pyramidal cells. *Nat. Commun.* **9**, 4890 (2018).
26. Wyart, C. et al. Dynamics of excitatory synaptic components in sustained firing at low rates. *J. Neurophysiol.* **93**, 3370–3380 (2005).
27. Segal, M. M. Epileptiform activity in microcultures containing one excitatory hippocampal neuron. *J. Neurophysiol.* **65**, 761–770 (1991).

28. Gray, C. M., König, P., Engel, A. K. & Singer, W. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature* **338**, 334–337 (1989).
29. Meister, M., Wong, R. O. L., Baylor, D. A. & Shatz, C. J. Synchronous Bursts of Action Potentials in Ganglion Cells of the Developing Mammalian Retina. *Science* **252**, 939–943 (1991).
30. Momose-Sato, Y. & Sato, K. Large-scale synchronized activity in the embryonic brainstem and spinal cord. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, (2013).
31. Lippe, W. R. Rhythmic spontaneous activity in the developing avian auditory system. *J. Neurosci.* **14**, 1486–1495 (1994).
32. Ikegaya, Y. et al. Synfire Chains and Cortical Songs: Temporal Modules of Cortical Activity. *Science* **304**, 559–564 (2004).
33. Ji, D. & Wilson, M. A. Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. *Nat. Neurosci.* **10**, 100–107 (2007).
34. Wagenaar, D. A., Pine, J. & Potter, S. M. An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neurosci.* **7**, 11 (2006).
35. Habenschuss S., Jonke Z. & Maass W. Stochastic Computations in Cortical Microcircuit Models. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003311 (2013).
36. Jonke, Z., Habenschuss, S. & Maass, W. Solving Constraint Satisfaction Problems with Networks of Spiking Neurons. *Front. Neurosci.* **10**, 118 (2016).

37. Fonseca Guerra, G. A. & Furber, S. B. Using Stochastic Spiking Neural Networks on SpiNNaker to Solve Constraint Satisfaction Problems. *Front. Neurosci.* **11**, (2017).
38. Nakanishi, J., Takarada, T., Yamaguchi, K. & Maeda, M. Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences. *Anal. Sci.* **24**, 67–72 (2008).
39. Maass, W. & Markram, H. On the computational power of circuits of spiking neurons. *J. Comput. Syst. Sci.* **69**, 593–616 (2004).
40. Bell, C. C., Han, V. Z., Sugawara, Y. & Grant, K. Synaptic plasticity in a cerebellum-like structure depends on temporal order. *Nature* **387**, 278–281 (1997).
41. Bi, G. & Poo, M. Synaptic Modifications in Cultured Hippocampal Neurons: Dependence on Spike Timing, Synaptic Strength, and Postsynaptic Cell Type. *J. Neurosci.* **18**, 10464–10472 (1998).
42. Debanne, D., Gähwiler, B. H. & Thompson, S. M. Long-term synaptic plasticity between pairs of individual CA3 pyramidal cells in rat hippocampal slice cultures. *J. Physiol.* **507**, 237–247 (1998).
43. Zhang, L. I., Tao, H. W., Holt, C. E., Harris, W. A. & Poo, M. A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses. *Nature* **395**, 37–44 (1998).
44. Ravid Tannenbaum, N. & Burak, Y. Shaping Neural Circuits by High Order Synaptic Interactions. *PLoS Comput. Biol.* **12**, e1005056 (2016).



45. Karbowski, J. & Ermentrout, G. B. Synchrony arising from a balanced synaptic plasticity in a network of heterogeneous neural oscillators. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **65**, 031902 (2002).
46. Nowotny, T., Zhigulin, V. P., Selverston, A. I., Abarbanel, H. D. I. & Rabinovich, M. I. Enhancement of Synchronization in a Hybrid Neural Circuit by Spike-Timing Dependent Plasticity. *J. Neurosci.* **23**, 9776–9785 (2003).
47. Kube, K., Herzog, A., Michaelis, B., de Lima, A. D. & Voigt, T. Spike-timing-dependent plasticity in small-world networks. *Neurocomputing* **71**, 1694–1704 (2008).
48. Pérez, T. & Uchida, A. Reliability and synchronization in a delay-coupled neuronal network with synaptic plasticity. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **83**, 061915 (2011).
49. Yu, H., Guo, X., Wang, J., Deng, B. & Wei, X. Spike coherence and synchronization on Newman–Watts small-world neuronal networks modulated by spike-timing-dependent plasticity. *Phys. Stat. Mech. Its Appl.* **419**, 307–317 (2015).
50. Mikkelsen, K., Imparato, A. & Torcini, A. Emergence of slow collective oscillations in neural networks with spike-timing dependent plasticity. *Phys. Rev. Lett.* **110**, 208101 (2013).
51. Luo, S., Guan, H., Li, X., Xue, F. & Zhou, H. Improving liquid state machine in temporal pattern classification. *2018 15th International Conference on Control, Automation, Robotics and Vision (ICARCV)*, 88–91 (2018).

52. Jin, Y. & Li, P. AP-STDP: A novel self-organizing mechanism for efficient reservoir computing. *2016 International Joint Conference on Neural Networks (IJCNN)*, 1158–1165 (2016).
53. Wang, Q. & Li, P. D-LSM: Deep Liquid State Machine with unsupervised recurrent reservoir tuning. *2016 23rd International Conference on Pattern Recognition (ICPR)*, 2652–2657 (2016).
54. Maruoka, H., Kubota, K., Kurokawa, R., Tsuruno, S. & Hosoya, T. Periodic Organization of a Major Subtype of Pyramidal Neurons in Neocortical Layer V. *J. Neurosci.* **31**, 18522–18542 (2011).
55. Maruoka, H. et al. Lattice system of functionally distinct cell types in the neocortex. *Science* **358**, 610–615 (2017).
56. Connors, B. W., Gutnick, M. J. & Prince, D. A. Electrophysiological properties of neocortical neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* **48**, 1302–1320 (1982).
57. McCormick, D. A., Connors, B. W., Lighthall, J. W. & Prince, D. A. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol.* **54**, 782–806 (1985).
58. Agmon, A. & Connors, B. W. Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex. *J. Neurosci.* **12**, 319–329 (1992).
59. Cerminara, N. L. & Rawson, J. A. Evidence that Climbing Fibers Control an Intrinsic Spike Generator in Cerebellar Purkinje Cells. *J. Neurosci.* **24**, 4510–4517 (2004).

60. Schmolesky, M. T., Weber, J. T., de ZEEUW, C. I. & Hansel, C. The Making of a Complex Spike: Ionic Composition and Plasticity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **978**, 359–390 (2002).
61. Beniaguev, D., Segev, I. & London, M. Single cortical neurons as deep artificial neural networks. *Neuron* **109**, 2727–2739.e3 (2021).
70. Hong, N. & Nam, Y. Neurons-on-a-Chip: In Vitro NeuroTools. *Mol. Cells* **45**, 76–83 (2022).
71. Perin, R., Berger, T. K. & Markram, H. A synaptic organizing principle for cortical neuronal groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 5419–5424 (2011).
72. Yoshimura, Y., Dantzker, J. L. M. & Callaway, E. M. Excitatory cortical neurons form fine-scale functional networks. *Nature* **433**, 868–873 (2005).
73. Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M. & Ingber, D. E. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science* **276**, 1425–1428 (1997).
74. O'Neill, C., Jordan, P. & Ireland, G. Evidence for two distinct mechanisms of anchorage stimulation in freshly explanted and 3T3 Swiss mouse fibroblasts. *Cell* **44**, 489–496 (1986).
75. Clark, P., Connolly, P., Curtis, A. S., Dow, J. A. & Wilkinson, C. D. Topographical control of cell behaviour. I. Simple step cues. *Dev. Camb. Engl.* **99**, 439–448 (1987).
76. Clark, P., Britland, S. & Connolly, P. Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminin surfaces. *J. Cell Sci.* **105** (1), 203–212 (1993).

77. Clark, P., Connolly, P. & Moores, G. R. Cell guidance by micropatterned adhesiveness in vitro. *J. Cell Sci.* **103 (1)**, 287–292 (1992).
78. Clark, P., Connolly, P., Curtis, A. S., Dow, J. A. & Wilkinson, C. D. Topographical control of cell behaviour. I. Simple step cues. *Dev. Camb. Engl.* **99**, 439–448 (1987).
79. Pot, S. A. *et al.* Nanoscale Topography–Induced Modulation of Fundamental Cell Behaviors of Rabbit Corneal Keratocytes, Fibroblasts, and Myofibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 1373–1381 (2010).
80. Britland, S., Clark, P., Connolly, P. & Moores, G. Micropatterned substratum adhesiveness: A model for morphogenetic cues controlling cell behavior. *Exp. Cell Res.* **198**, 124–129 (1992).
81. Clark, P. Cell behaviour on micropatterned surfaces. *Biosens. Bioelectron.* **9**, 657–661 (1994).
82. Kono, S. *et al.* Live-Cell, Label-Free Identification of GABAergic and Non-GABAergic Neurons in Primary Cortical Cultures Using Micropatterned Surface. *PLoS ONE* **11**, e0160987 (2016).
83. Ehrlicher, A. *et al.* Guiding neuronal growth with light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16024–16028 (2002).
84. Mohanty, S. K., Sharma, M., Panicker, M. M. & Gupta, P. K. Controlled induction, enhancement, and guidance of neuronal growth cones by use of line optical tweezers. *Opt. Lett.* **30**, 2596–2598 (2005).

85. Hosokawa, C., Kudoh, S. N., Kiyohara, A. & Taguchi, T. Optical trapping of synaptic vesicles in neurons. *Appl. Phys. Lett.* **98**, 163705 (2011).
86. Kaji, H., Tsukidate, K., Matsue, T. & Nishizawa, M. In Situ Control of Cellular Growth and Migration on Substrates Using Microelectrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15026–15027 (2004).
87. Okano, K. *et al.* Induction of Cell–Cell Connections by Using in situ Laser Lithography on a Perfluoroalkyl-Coated Cultivation Platform. *ChemBioChem* **12**, 795–801 (2011).
88. Yamamoto, H. *et al.* In-situ guidance of individual neuronal processes by wet femtosecond-laser processing of self-assembled monolayers. *Appl. Phys. Lett.* **99**, 163701 (2011).
89. Okano, K. *et al.* In situ laser micropatterning of proteins for dynamically arranging living cells. *Lab. Chip* **13**, 4078–4086 (2013).
90. Kono, S. *et al.* In situ modification of cell-culture scaffolds by photocatalysis of visible-light-responsive TiO<sub>2</sub> film. *Jpn. J. Appl. Phys.* **57**, 027001 (2018).

## 2 章 神経細胞の膜電位変化を表現する数理モデル

### 2.1 活動電位の生成と神経細胞間での信号伝達

神経信号の実体は細胞膜外に対する細胞内部の電位変化であり、電位変化は神経細胞の細胞膜に分布するイオンチャネルやイオンポンプといった各種の膜タンパク質を介した能動的／受動的イオン移動によって生じる。細胞膜外に対する細胞内部の電位の差は膜電位と呼ばれる。膜電位を表現する最も簡単なモデルでは、細胞膜は可変抵抗（イオンチャネル）、キャパシタ（細胞膜）および電圧源（イオンポンプ）を並列に接続した素子として表される。そして、膜電位の時間発展 $V(t)$ が後述する回路方程式（微分方程式）で表される。イオンポンプは膜電位を静止膜電位（約 $-70$  mV）に維持しようとする働きを有する。このとき、細胞膜の内側に負電荷が、外側に正電荷が蓄積されていると見なす。一方、シナプスを介して上流の細胞より信号が入力すると、膜電位が変化する。膜電位を高めようとするシナプスを興奮性シナプス、低めようとするシナプスを抑制性シナプスと呼ぶ。静止膜電位より  $30$  mV 程度高い電位にしきい値があり、膜電位がしきい値より高くなると Na チャネルが一斉に開き（脱分極）、このイオンチャネルを介した細胞内への Na イオン流入により膜電位が急激に上昇し、スパイク状の活動電位が生成する。このとき、Ca チャネルも膜電位の上昇に寄与する。その後、約  $2$  ms のうちに Na イオンチャネルが閉じ、他方では K チャネルが開く。この K チャネルを介した細胞外への K イオン流出により膜電位が低下する。この膜電位の低下は静止膜電位より低い電位になるまで持続するが（過分極）、常にイオンポンプが機能しているため、上流から追加の信号入力がなければ、膜電位は約  $4$  ms 後に静止膜電位に戻る。

神経細胞間の信号送受（上流の細胞からの信号入力および下流の細胞への信号伝達）はシナプスを介して行われる。化学シナプスは神経細胞の軸索と樹状突起との間に形成される構造であり、シナプス前細胞の軸索末端に到達した活動電位を化学信号に変換する。この化学信号は、シナプス後細胞の細胞膜にある受容体との会合およびイオンチャネルを介したイオン輸送を介して、膜電位変化を生ずる。1細胞には多くて $\sim 10^4$ 個のシナプスが存在し、個々のシナプスで生じた膜電位変化は、樹状突起を通じて細胞体へと集約され、シナプス後細胞の活動電位生成に与る。シナプスの数理モデルは、シナプスにおける神経信号の処理（図 2.1）について数学的に表現するためのモデルである。なお、シナプスには電気シナプスと呼ばれるものもあり、この場合、化学信号を介さず、膜電位変化がギャップ接合を介して直接的にシナプス前細胞からシナプス後細胞へ伝搬する。

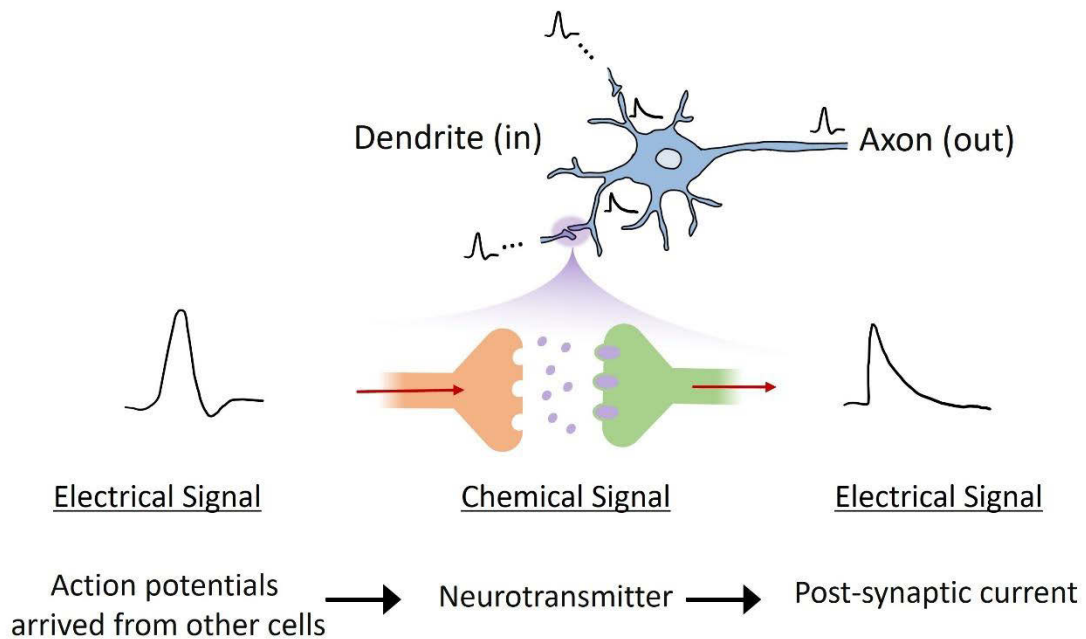


図 2.1 シナプスにおける信号伝達.

## 2.2 神経細胞の膜電位変化を表現する数理モデル

神経細胞の膜電位の時間変化を表現するための数理モデルは、例えばイオンチャネルの反応時定数といった生理学的パラメータに基づき膜電位変化の機序を物理化学的に表現するモデル（以降、生理学モデルと略記）と、膜電位の時間変化を定性的に捉え、それを数学的に模倣して表現するモデル（以降、定性的数学モデルと略記）とに大別される。生理学モデルには、しきい値以下での膜電位の時間変化を表現することに特化した **Integrate-and-Fire**（積分発火モデル）モデルと、活動電位の生成過程も含めて膜電位変化を表現できる **Hodgkin-Huxley** モデルがある<sup>1</sup>。生理学モデルは個々の物理化学反応と 1 対 1 で対応するので、実験結果と比較しやすい。実験的に新たな機序が解明された場合、それに相当する項を方程式に追加することでモデルを容易に改良できることも利点となる。しかしながら、より詳細に個々の反応とそれらの間の関係を表現しようとする、モデル自体が複雑化しやすく、慎重なパラメータ選定が求められる場合も多い。これは、個々のチャネルタンパク質の反応を取り込む **Hodgkin-Huxley** モデルで特に顕著となる。

一方、定性的数学モデルは比較的単純な数式で記述されるため、計算に掛かるコストを抑えることができる利点を持つ。例えば、相平面上での分岐現象として活動電位の生成過程を理解することにより神経発火に関わる本質的な機序を表現することに成功した代表的なモデルとして、**FitzHugh-Nagumo** モデル<sup>2</sup>、**Hindmarsh-Rose** モデル<sup>3</sup>、**Izhikevich** モデル<sup>4</sup>が挙げられる。これらのモデルは、その計算負荷の低さから、多数の神経細胞からなる大規模ネットワークの計算機シミュレーションを現実的な時間内で完了することを可能にするが、モデル中のパラメータが数学的に抽象化されており、その次元やスケールが計測値から推定しにくいといった欠点をもつ。



特に、ネットワーク内の神経細胞の種類、さらには発現受容体の種類が問題となる場合、定性的数学モデルの活用は難しい。

本研究では、実験結果と比較するために、目的に応じて **Integrate-and-Fire** モデルまたは **Hodgkin-Huxley** モデルを使い分けた。以下にそれらの特徴をまとめる。

### 2.2.1 Integrate-and-Fire モデル

膜電位の変化は悉無律にしたがう。一定量以上の正イオンの流入によって膜電位が上昇し、しきい値に到達すると、Na チャネルが急激に開くことで Na イオンが細胞内に流入し、膜電位が上昇する。その後、Na チャネルが不活性化すると同時に、開き始めた K チャネルから K イオンが細胞外へ排出されることで、膜電位が下降する。この過程において膜電位はスパイク状に変化する。対して、膜電位がしきい値より低い場合、Na チャネルや K チャネルの開閉によるコンダクタンス変化は穏健であり、細胞膜は時間に普遍的なコンダクタンス成分とキャパシタ成分からなる単純な線形回路と等価であると見なせる。このような領域における膜電位の時間変化  $V(t)$  のみを連続値で表現したモデルが **Integrate-and-Fire** モデルである。**Integrate-and-Fire** モデルは以下の線形微分方程式で表される。

$$C_m \frac{dV}{dt} = -G_L(V - E_L) + I_{app}; \quad \text{if } V > V_{th} \quad \text{then } V \rightarrow V_{reset} \quad (2.1)$$

ここで、 $C_m$  は膜容量、 $G_L$  はリークコンダクタンス、 $E_L$  はリーク電流の反転電位、 $I_{app}$  は電流の流入を表し、シナプスを介した信号入力として扱う場合と、パッチクランプ等により人為的に注入された電流として扱う場合がある。式(2.1)の *if*  $\dots$  *then*  $\dots$  条件は膜電位がしきい値に到達した場合の処理を表しており、膜電位がしきい値に到達し

た場合、神経細胞が発火したと見なして膜電位をリセット電位 $V_{reset}$ へと強制的に戻している。したがって、微分方程式(2.1)の解は直接的に活動電位を生成しない。Integrate-and-Fire モデルは非常に軽量なモデルであり、数百以上の神経細胞からなるネットワークのシミュレーションに適用される。線形微分方程式で記述されており理論的解析を行いやすいこと、実神経細胞と同じ尺度でパラメータを設定できることから、多くの研究で採用されてきた。一方で、発火の機序を大幅に簡略化しているため、Integrate-and-Fire モデル単体では、バースト発火といった実神経細胞固有の発火パターンを表現することができない。

## 2.2.2 Hodgkin-Huxley モデル

Alan Lloyd Hodgkin と Andrew Fielding Huxley によって 1952 年に生み出された Hodgkin-Huxley モデル<sup>1</sup>は、Na チャネルと K チャネルの開閉機序をモデル化することで膜電位の時間変化を連続的に記述したモデルである。Hodgkin-Huxley モデルは以下の微分方程式で表される。

$$C_m \frac{dV}{dt} = -I_{Na} - I_K - I_L + I_{app} \quad (2.2)$$

ここで、 $I_{Na}$  および  $I_K$  は電位依存性の Na チャネル電流および K チャネル電流である。 $I_L$  はその他のイオンチャネルに由来するリーク電流である。電位依存性 Na チャネルは脱分極時に開く 3 つの活性化ゲート  $m$  と、脱分極時に閉じる 1 つの不活性化ゲート  $h$  から構成される。対して、電位依存性 K チャネルは 4 つの活性化ゲート  $n$  から構成される。 $I_{Na}$  および  $I_K$  は、ゲート変数を用いた以下の式で表される。

$$I_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h (V - E_{Na}) \quad (2.3)$$

$$I_K = \bar{g}_K n^4 (V - E_K) \quad (2.4)$$

ここで、 $\bar{g}_{Na}$  および  $\bar{g}_K$  は最大 Na および最大 K コンダクタンスを表す。  $E_{Na}$  および  $E_K$  は Na および K チャネルの反転電位である。 ゲート変数  $m, h, n$  はイオンチャネルの開口率を現しており、膜電位に依存する以下の式で表される。

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V)(1 - m) + \beta_m(V)m \quad (2.5)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V)(1 - h) + \beta_h(V)h \quad (2.6)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V)(1 - n) + \beta_n(V)n \quad (2.7)$$

$\alpha_x(V)$  は、イオンチャネルを構成するサブユニットが閉じた状態から開いた状態へと遷移する速さを表している。 逆に  $\beta_x(V)$  は、イオンチャネルを構成するサブユニットが開いた状態から閉じた状態へと遷移する速さを表している。 これらは以下の式にしたがう。

$$\alpha_m(V) = \frac{2.5 - 0.1V}{\exp(2.5 - 0.1V) - 1} \quad (2.8)$$

$$\beta_m(V) = 4 \exp\left(-\frac{V}{18}\right) \quad (2.9)$$

$$\alpha_h(V) = 0.07 \exp\left(-\frac{V}{20}\right) \quad (2.9)$$

$$\beta_m(V) = \frac{1}{\exp(3 - 0.1V) + 1} \quad (2.10)$$

$$\alpha_n(V) = \frac{0.1 - 0.01V}{\exp(1 - 0.1V) - 1} \quad (2.11)$$

$$\beta_n(V) = 0.125 \exp\left(-\frac{V}{80}\right) \quad (2.12)$$

上記の関数群はヤリイカ巨大神経膜の特性に適合するようにパラメータを調整することで得られた関数である。例えば、 $\alpha_m$ が単調増加関数であることは、活性化ゲートが脱分極に伴い開きやすくなる特性に対応している。

Hodgkin-Huxley モデルは Integrate-and-Fire モデルと異なり、イオンチャネルのダイナミクスを考慮している。膜電位は連続関数で記述され、スパイク状の活動電位も微分方程式の解として表現される。そのため、電気生理実験で得られる結果と比較しやすい。また、イオン電流項を必要に応じて追加し、パラメータを調整することで、バースト発火等の複雑な発火パターンを再現することも可能であり、実験的に得られた膜電位変化の詳細な解析に適する。一方で、計算コストが高く、設定パラメータも多いため、多数の神経細胞を含む大規模な神経回路のシミュレーションには不向きである。

### 2.3 シナプスの数理モデル

シナプスとは、神経信号を出力する細胞とその信号を受け取る細胞との間に形成され、両者の信号伝達に関わる接続構造のことを指す。シナプスは、信号伝達の方式によって電気シナプスと化学シナプスの2種類に大別できる。2つの細胞の細胞膜が接着することで形成されるギャップ接合が電気シナプスである。電気シナプスは、主に下等脊椎動物や無脊椎動物で観察されるシナプスであり、接合部前後の細胞の電位差に基づく受動的なシナプス電流のみを提供する。そのため高速な信号伝達が可能である。対して化学シナプスは物理的接合の代わりに接合部に間隙を形成しており、そこでは化学信号を経由してシナプス後細胞へと神経信号が伝達される。具体的には、シナプス前細胞の活動電位がシナプス末端に到達すると、シナプス小胞から神経伝達物質がシナプス間隙へと放出されることで、化学信号への変換が行われる。拡散した

神経伝達物質がシナプス後細胞の受容体に結合することで、シナプス後細胞のイオンチャネルが開き、シナプス後細胞へシナプス電流が流入する。化学シナプスによる伝達は電気シナプスの場合よりも複雑なプロセスであるけれども、一方向性の信号伝達を可能とする。加えて、神経伝達物質や受容体の多様性によって、神経細胞の活動状態に応じた神経信号の増強・抑圧といった修飾がなされる。高等生物では、成長に伴い化学シナプスが爆発的に増え主要なシナプスとなったため、通常、数理モデル解析では化学シナプスのみが扱われる。そのため、本論文では化学シナプスのみを考慮し、単にシナプスと記載した場合は、化学シナプスを指すものとする。

シナプスには可塑性がある。シナプス前細胞における活動電位が一定の大きさのスパイクであっても、シナプス後細胞において生成されるシナプス電流の振幅は一定ではない。シナプスにおける化学信号の伝達効率やシナプス後細胞の樹状突起におけるイオンチャネルの発現率により、シナプス前細胞からシナプス後細胞への信号伝達効率（シナプス荷重）が変化するからである。

シナプス可塑性には、振幅の変化が数分以上にわたって持続する長期可塑性<sup>5-8</sup>と、数ミリ秒から数十秒程度までしか持続しない短期可塑性<sup>9-12</sup>の2種類があり、どちらの可塑性においてもシナプス強度を増強する場合と抑圧する場合がある。長期可塑性は、シナプス前後の細胞の発火タイミングに応じてシナプス受容体の発現・除去が誘導されることに起因しており、能動的なシナプス特性である。長期可塑性は長期記憶や空間把握、情報の忘却などに寄与しているとされており<sup>13,14</sup>、シミュレーションにおいては、連想記憶タスク等に対する寄与が調査されている<sup>15-17</sup>。一方、短期可塑性は、化学シナプスの伝達メカニズムに起因する受動的なシナプス特性である。短期可塑性の一種である短期抑圧（short-term depression）の場合、その現象は、神経伝達物質がシナプス前細胞へ回収されきる前に次の活動電位がシナプスに到達したために、

放出できる神経伝達物質の絶対量が減少することで生じる。このような活動電位の到達タイミングに応じたリソース調整によって、短期可塑性は単一神経細胞に対して、入力信号の周波数フィルタリング、感作、適応、ゲイン調整<sup>18,19</sup>といった機能を提供する。それだけでなく、近年の実験的、理論的検証によって、短期可塑性がワーキングメモリの容量を向上させうることや、意思決定タスクの精度向上に寄与しうることが報告されている<sup>20-23</sup>。以上より、長期可塑性が主に脳内における情報の記録に関係している一方で、短期可塑性は主に入力情報を逐次処理する演算機能に関係していると考えられる。

一般に、シナプスの振る舞いは定性的モデルで表現される。これは、シナプスにおける信号伝達の過程が非常に複雑である一方、1細胞あたり数千から数万個ものシナプスが存在するためである。注目する現象の時間スケールに応じて、異なるシナプスモデルが提案されており、数ミリ秒から数秒程度の短い時間スケールであれば、シナプスのモデルは短期可塑性の有無によって2種類に大別できる。短期可塑性を考慮しないモデルの代表格が $\alpha$ シナプスモデル<sup>24</sup>であり、短期可塑性も考慮したモデルの代表格がダイナミックシナプスモデル<sup>25</sup>である。なお、長期可塑性を持つシナプスは個別のシナプスモデルを持たず、 $\alpha$ シナプスやダイナミックシナプスといった基準となるシナプスモデルの定数項を拡張することでモデル化される。モデル拡張の詳細については5章で述べる。

### 2.3.1 $\alpha$ シナプスモデル

神経伝達物質がシナプス後膜に到達すると、シナプス後膜の受容体が開きシナプス電流が流れる。受容体の開口は細胞膜の場合と同様に一時的であることや、神経伝達

物質の再取り込みが行われることから、シナプス電流の振幅は一度上昇したのち指数関数的に減少する特性を持つ。αシナプス電流の時間波形は、以下の式で記述される。

$$I_{syn} = \bar{g}_{syn} \frac{(t-t_{AP})}{\tau} \exp\left(\frac{-(t-t_{AP})}{\tau}\right) (V - E_{syn}) \quad (2.13)$$

ここで、 $\bar{g}_{syn}$ は最大シナプスコンダクタンスを表し、 $E_{syn}$ はシナプス電流の反転電位を表す。 $t_{AP}$ はシナプス前細胞から活動電位が到達したタイミングを指している。シナプス電流は活動電位が到達した後に流れるため、常に $t > t_{AP}$ となる。 $\tau$ はシナプス応答の時定数を表し、この値の大小によって、シナプス電流の立ち上がり、立下りの速度が決定される。シナプスには、下流の神経細胞の膜電位を上昇させようと働く興奮性シナプスと、下降させようと働く抑制性シナプスが存在する。興奮性シナプスを構成する代表的な受容体はグルタミン酸をリガンドとするイオンチャネル型シナプス受容体である 2-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propanoic acid receptor (AMPA) 受容体 および N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) 受容体の2種類である。シナプス電流の応答速度はリガンド結合に対する応答速度に依存するため、シナプス電流の形状はシナプス受容体の種類によって異なる。時定数 $\tau$ の役割は、この違いを単一のモデルで吸収することである。

αシナプスモデルは単純な式でシナプス電流の波形をよく再現できるが、可塑性を考慮しないため、生成されるシナプス電流の形状は膜電位が同一であれば常に一定である。そのため、可塑性を省略できるほどシナプス電流の発生頻度が低い状況でのシミュレーションや、個々のシナプス電流波形ではなく大域的な活動パターンに注目したネットワークでのシミュレーションで採用される場合が多い。

### 2.3.2 ダイナミックシナプスモデル

神経情報処理において、短期可塑性は重要な役割を担う。シナプスに対してスパイク入力を高頻度で与えると、短期可塑性の結果として、シナプス電流の大きさが指数関数的に減衰する場合や、飽和領域に向けて増強していく場合がある。このような性質を再現するために、ダイナミックシナプスモデルが Tsodyks らによって構築された<sup>25</sup>。ダイナミックシナプスでは、神経伝達物質は、利用可能状態（シナプス前末端に利用可能な資源として存在する状態）、活性化状態（シナプス後末端の受容体に結合し有効な状態）、不活性化状態（シナプス後末端から前末端へ回収中の状態）の3状態をとるとされ、各状態における神経伝達物質の割合はそれぞれ変数  $R$ ,  $E$ ,  $I$  とされる。これらの変数は、以下微分方程式で記述される。

$$\frac{dR}{dt} = \frac{I}{\tau_{\text{rec}}} - U_{\text{SE}} \cdot R \cdot \delta(t - t_{\text{AP}}) \quad (2.14)$$

$$\frac{dE}{dt} = \frac{E}{\tau_{\text{inact}}} + U_{\text{SE}} \cdot R \cdot \delta(t - t_{\text{AP}}) \quad (2.15)$$

$$I = 1 - R - E \quad (2.16)$$

ここで、 $\tau_{\text{rec}}$ ,  $\tau_{\text{inact}}$  はそれぞれ神経伝達物質回収と消費の時定数である。 $U_{\text{SE}}$  は神経伝達物質の放出確率を表し、 $0 \sim 1$  の値をとる。 $\delta(t - t_{\text{AP}})$  は、シナプス前ニューロンの発火時刻  $t_{\text{AP}}$  において非ゼロとなる Dirac のデルタ関数として知られる超関数である。シナプス後電流の振幅は活性化状態にある神経伝達物質の割合に比例するため、シナプス後電流は下記のように記述できる。

$$I_{\text{syn}} = \bar{g}_{\text{syn}} E (V - E_{\text{syn}}) \quad (2.17)$$

ダイナミックシナプスモデルの特徴は、モデルのパラメータを調整することで短期増強と短期抑圧の2つの短期可塑性を表現できる点である。例えば、 $U_{\text{SE}}$  を 1 に近い値に



設定すると、最初のスパイク入力に対する応答で大半の神経伝達物質を消費し、次のスパイク到達までに神経伝達物質の回収が間に合わなくなるため、ダイナミックシナプスは減衰シナプスとして機能する。

短期可塑性は、増強の場合と抑圧の場合とで異なる機能的役割を担う。短期増強は高頻度の信号入力に対する適応性の向上や記憶の固定化に関与しているとされる。一方、短期抑圧は過剰な神経活動を抑制することで、ネットワークの安定性や効率性に寄与するとされる。また、高周波入力に対するフィルタ機能を有する点から、ノイズ入力の除去や信号パターンの選別にも寄与しているとされる。このような神経回路の重要な機能と関連を持つ短期可塑性のメカニズムを比較的単純な式で表現できる点がダイナミックシナプスモデルの利点である。ダイナミックシナプスモデルはネットワークのシミュレーションに適用することも可能であるが、長期可塑性のダイナミクスが再現されない点に注意する必要がある。シナプス電流強度の長期に渡る持続的な変化を追跡する場合、長期可塑性をモデル化したスパイクタイミング依存性可塑性 (Spike timing dependent plasticity; STDP) 学習側<sup>26</sup>をシナプスモデルに組み込む必要がある。

## 2.4 本研究で活用した数理モデル

各数理モデルの特徴をもとに、シミュレーションで用いる数理モデルを選定した。3章「オータプス培養した単一神経細胞の自発発火パターン計測とその数理モデル構築」では、オータプスを持つ単一神経細胞の自発発火を再現するためのシミュレーションを行った。このシミュレーションで考慮すべき点は以下の通りである。①単一神経細胞の詳細な膜電位変化を追跡する必要がある。②自己帰還接続を介した膜電位変

化は活動電位生成と同程度の時間スケール（1～100 ms）で生じると推測される。したがって、短期可塑性をモデルに組み込む。③特定の時点における自発発火パターンを解析対象とし、長期的活動に伴う自発発火パターン変化については考慮しない。これらの条件を満たすため、神経細胞の数理モデルとしては、膜電位の詳細な変化を記述できる Hodgkin-Huxley モデルを採用した。また、短期可塑性が働く期間における発火パターンを調査するため、ダイナミックシナプスを取り入れた。

4 章「オータプス培養した単一神経細胞の刺激応答」では、2 本針電極による電気刺激の結果生じる電気生理学的機序を解析するためのシミュレーションを行った。このシミュレーションでは、①細胞膜外の物質の性質（緩衝溶液や電極界面）が電気生理学的機序に与える影響を解析でき、②外部からの電気刺激による膜電位変化の過程を詳細に追跡できるモデルが必要となる。なお、③電気刺激の結果生じる電気生理学的機序に焦点を当てたので、刺激後の信号伝達過程は解析の対象外とした。したがって、神経細胞の数理モデルとして、Hodgkin-Huxley モデルと Integrate-and-Fire モデルを目的に応じて使い分けた。

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、オータプスを持つ単一神経細胞におけるオータプス荷重の時間発展をシミュレーション上で追跡した。5 章における考慮点は、3 章における①、②に加えて、シナプス荷重の長期的な変化を追跡できる点である。そのため、Hodgkin-Huxley モデルおよびダイナミックシナプスモデルを基本モデルとしつつ、STDP を組み込んだ拡張モデル（詳細は 5 章に記述）を使用した。

## 参考文献

1. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500–544 (1952).
2. FitzHugh, R. Mathematical models of threshold phenomena in the nerve membrane. *Bull. Math. Biophys.* **17**, 257–278 (1955).
3. Hindmarsh, J. L. & Rose, R. M. A model of neuronal bursting using three coupled first order differential equations. *Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* **221**, 87–102 (1984).
4. Izhikevich, E.M. Simple model of spiking neurons. *IEEE Transactions on Neural Networks* **14(6)**, 1569-1572 (2003).
5. Bliss, T. V. & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232**, 331–356 (1973).
6. Mulkey, R. M. & Malenka, R. C. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **9**, 967–975 (1992).
7. Frey, U. & Morris, R. G. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* **385**, 533–536 (1997).
8. Kemp, N. & Bashir, Z. I. Long-term depression: a cascade of induction and expression mechanisms. *Prog. Neurobiol.* **65**, 339–365 (2001).

9. Magleby, K. L. & Zengel, J. E. Augmentation: A process that acts to increase transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* **257**, 449–470 (1976).
10. Dobrunz, L. E. & Stevens, C. F. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* **18**, 995–1008 (1997).
11. Stevens, C. F. & Wang, Y. Facilitation and depression at single central synapses. *Neuron* **14**, 795–802 (1995).
12. Abbott, L. F. & Regehr, W. G. Synaptic computation. *Nature* **431**, 796–803 (2004).
13. Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S. & Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774–776 (1986).
14. Nader, K., Schafe, G. E. & Le Doux, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* **406**, 722–726 (2000).
15. Song, S., Miller, K. D. & Abbott, L. F. Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* **3**, 919–926 (2000).
16. Masquelier, T., Hugues, E., Deco, G. & Thorpe, S. J. Oscillations, phase-of-firing coding, and spike timing-dependent plasticity: an efficient learning scheme. *J. Neurosci.* **29**, 13484–13493 (2009).
17. Izhikevich, E. M. Solving the distal reward problem through linkage of STDP and dopamine signaling. *Cereb. Cortex* **17**, 2443–2452 (2007).

18. Markram, H. & Tsodyks, M. Redistribution of synaptic efficacy between neocortical pyramidal neurons. *Nature* **382**, 807–810 (1996).
19. Fortune, E. S. & Rose, G. J. Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends Neurosci.* **24**, 381–385 (2001).
20. Hennig, M. H. Theoretical models of synaptic short term plasticity. *Front. Comput. Neurosci.* **7**, 45 (2013).
21. Seeholzer, A., Deger, M. & Gerstner, W. Stability of working memory in continuous attractor networks under the control of short-term plasticity. *PLoS Comput. Biol.* **15**, e1006928 (2019).
22. Hens, C., Harush, U., Haber, S., Cohen, R. & Barzel, B. Spatiotemporal signal propagation in complex networks. *Nat. Phys.* **15**, 403–412 (2019).
23. Kim, S., Park, S. H. & Ryu, C. S. Multistability in Coupled Oscillator Systems with Time Delay. *Phys. Rev. Lett.* **79**, 2911–2914 (1997).
24. Destexhe, A., Mainen, Z. F. & Sejnowski, T. J. Synthesis of models for excitable membranes, synaptic transmission and neuromodulation using a common kinetic formalism. *J. Comput. Neurosci.* **1**, 195–230 (1994).
25. Tsodyks, M. V. & Markram, H. The neural code between neocortical pyramidal neurons depends on neurotransmitter release probability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 719–723 (1997).
26. Markram, H., Lübke, J., Frotscher, M. & Sakmann, B. Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* **275**, 213–215 (1997).

## 3章 オータプス培養した単一神経細胞の自発発火パターン計測とその数理モデル構築

### 3.1 背景および目的

オータプスは神経細胞の軸索とその細胞自身の樹状突起との間に自己帰還接続を形成するシナプスである<sup>1-9</sup>。1章でも述べたように、オータプスは哺乳類の脳の様々な領域に存在し、皮質第V層では80%以上を占める神経細胞がオータプスを持つ<sup>10</sup>。その必然性は未だ明らかでないが、淘汰の結果として捉えれば、この事実はオータプスが皮質第V層において特有の機能を担っていることを示唆している。

オータプスのような自己帰還接続であろうと複数の神経細胞を介した帰還回路であろうと、帰還接続は過去の信号を、何らかのフィルタリング操作を介して未来に継承する手段となり得る<sup>11-13</sup>。帰還経路において生じた伝搬遅延により、上流の細胞からの過去の信号が現在の信号と特定の神経細胞において突合し、その結果として生じた信号がさらに帰還経路における伝搬遅延によって未来へと継承されると同時に、逐次、帰還経路に含まれない下流の神経細胞に伝達されるからである。動物は脳→運動器→環境変化→感覚器→脳といった帰還経路によるフィードバックの影響を受けるシステムと見なすことができ、脳は帰還経路上の多数の神経細胞における情報処理を介して内部状態が変化するシステムと見なすことができる<sup>14</sup>。すなわち、脳は内部に多数の帰還接続を持ち、同時に環境を通じたフィードバックを受ける。この視点で捉えるなら、オータプスはシステム最下層に位置するもっとも単純かつ直接的な神経細胞の帰還接続である。

オータプスを持つ単一神経細胞が多様な発火パターンを示すことが実験的に明らかになったことを嚆矢として、少なくとも理論研究では、オータプスを持つ神経細胞は、たとえその割合が少なくとも、無視できない影響をネットワーク全体のダイナミクスに与えていると考えられるようになった<sup>15-21</sup>。上流の神経細胞からの興奮性の信号入力、オータプスの有無にかかわらず、その神経細胞の膜電位を上昇させる。仮にその細胞がオータプスを有するならば、その自己帰還接続により一定の伝搬遅延時間をもって活動電位が自身に戻される。したがって、脱分極した状態が一定期間継続する。この間、しきい値は実質的に低くなっていると見なせる。すなわち、オータプスをもつ細胞は、一定期間、上流の細胞からの弱い入力でも発火する状態—UP状態—を持続することが想定される。UP状態にあれば、この間の入力は活動電位として下流の神経細胞へと高効率で送出されることになる。したがって、オータプスは、UP状態への引き金となった信号入力と、その後に入力される信号に対する一致検出器としての役割を果たす<sup>22</sup>。なお、他細胞からの入力と自己帰還入力の時間軸上での不一致が神経細胞をDOWN状態へと遷移させ、信号伝搬効率を元の状態に戻す。

神経ネットワークにオータプスをもつ細胞が複数存在する場合には、オータプスによる上記のフィルタリング処理がネットワーク内で繰り返し生じることになる。これにより、ネットワークの広範囲においてコヒーレンス共鳴と呼ばれる同期的挙動が誘発される<sup>15, 23</sup>。したがって、ネットワーク全体の同期的挙動はネットワークに含まれるオータプスの接続強度や伝搬遅延に依存していると予想される。しかしながら、前述のように、オータプスのみを持つ神経細胞であっても様々な発火パターンを示すため、その多様なフィルタリングによって、同期的挙動のみならず、多様な効果をもたらされることが推測される。

ネットワーク中の神経細胞は、感覚器といったネットワークの外側からの信号入力がない環境下でも自発的に発火しうる。自発発火はそのパターンが一見ランダムであることから、発見当初は生体由来のノイズとみなされていた。しかし、脳によって消費される代謝エネルギーの80%を占めることがのちに明らかとなり<sup>24</sup>、約20 Wという厳しいエネルギー制約のもとで常に稼働しなければならない脳において、自発発火は何らかの機能的役割を担うと考えられるようになった。

自発発火パターンは多様である。代表的な例としては、ネットワーク内の大部分の神経細胞が近いタイミングで発火する同期発火や、複数の神経細胞が特定の発火順序を保ちつつ繰り返し発火する非同期発火がある。同期発火は、脳内では発達期から成熟期にかけて顕著にみられる<sup>25, 26</sup>。多数のシナプスの結合強度の増強あるいは抑圧を短い期間の中で引き起こし、重要なシナプス接続のみが残された機能的回路を淘汰の結果として形成することに寄与している。シナプスが、シナプス前後の神経細胞の発火タイミングに応じて、その結合強度を可塑的に変化させられる性質を持つためである。対して、非同期発火は成熟後に顕著にみられ、高次の認知機能に関与していると考えられている<sup>27-29</sup>。例えば、メモリーリプレイは、日中の活動中に現れた発火パターンと同様の自発発火パターンが睡眠中に再生される現象であり、記憶や学習に関与していると考えられる。

自発発火による種々の機能の物理的機序は明らかでないが、神経細胞回路内のシナプスの機能をグルタミン酸受容体拮抗薬によって抑制することで、自発発火の頻度が減少することが知られている<sup>30, 31</sup>。これは、シナプスの特性と自発発火パターンとが少なくとも相関関係を持つことを意味する。一方で、*in vitro*での実験により、少数個あるいは単一の神経細胞回路においてもオータプスが容易に形成されることや、オータプスには通常のシナプスと同様にシナプス電流が流れることが知られている<sup>32, 33</sup>。



そのため、神経細胞回路にはオータプスが普遍的に分布しており、それが自発発火パターンの決定に寄与している可能性がある。

マイクロパターニングを施した基板上で神経細胞を培養することで、単一細胞を孤立した状態で成長させることが可能である。マイクロパターニングによって、ガラス基板表面に細胞接着領域と非接着領域を規定できる<sup>34-36</sup>。細胞接着領域の形状やサイズを制御すると、1つの細胞接着領域内で成長する細胞の平均個数を制御でき、直径20  $\mu\text{m}$  程度の円形パターンでは、およそ1個の細胞が1つの接着領域に接着する。播種密度を低くすれば、より大きな接着領域であっても、平均で1個の神経細胞を成長させることができる。その場合、細胞体周辺の接着領域で伸長した軸索と樹状突起が会合して、オータプスを持つ単一神経細胞を成長させることができる。個々の細胞接着領域をガラス基板表面に少なくとも30  $\mu\text{m}$  以上隔離して配置すると、細胞接着領域上の単一神経細胞は自身の神経突起を領域外に伸長できないため<sup>37</sup>、他の細胞との接続を形成せず、オータプスのみを形成する。この場合、その神経細胞の自発発火は、原理上、他の細胞からの影響を受けず、オータプスを介した帰還信号による膜電位の純粋な脱過分極の過程を反映する。これは、オータプスのみを持つ単一神経細胞の発火パターンを調査するための培養系として、マイクロパターニングが有用であることを示している。

本研究では、オータプス培養した単一神経細胞の自発発火パターンを調査する。計算機シミュレーションによって、主要な興奮性シナプス受容体である AMPA および N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体から構成されたオータプスの接続強度と、自発発火パターンとの関係性を明らかにする。さらに、シミュレーション結果を、対応する実験データと比較することで検証する。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 ガラス基板表面におけるマイクロパターンの作製

フォトリソグラフィを用いて、単一神経細胞を培養するためのマイクロパターンをガラス基板表面に作製した。一連のプロセスの概要を図 3.1 に示す。以下に示す作製プロセスは引用文献<sup>38, 39</sup>にある記載を参考にして設計された。はじめに、ガラスカバースリップ (Harvard Apparatus, 15 mm  $\phi$   $\times$  0.17 mm) を硫酸 : 過酸化水素溶液 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  :  $\text{H}_2\text{O}_2 = 4 : 1$ ) に 10 min 浸漬した。その後、Milli-Q 水で 8 回洗浄し、カバースリップをエアガンで乾燥させた。次に、octadecyltrichlorosilane (OTS) を用いて細胞非接着性単分子膜をカバースリップ表面に成膜した。toluene 100 mL に対して OTS 39.6  $\mu\text{L}$  を混合することで 1 mM toluene 溶液を調製し、カバースリップをドライ窒素雰囲気下で toluene に 70 min 浸漬した。OTS 単分子膜の形成後、カバースリップを toluene 中で 5 min, ethanol 中で 5 min, acetone 中で 5 min, Milli-Q 中で 5 min, この順で、いずれも超音波で処理しながら洗浄した。その後、Milli-Q 水で 4 回リンスし、エアガンでカバースリップを乾燥させた。次に、ZEP-520A (日本ゼオン) および TSMR-V90 LB (東京応化工業) をそれぞれ保護膜用ポリマー層、フォトレジスト層として、以下の手順によりパターンニングした。カバースリップ表面の水分を除去するため、225  $^{\circ}\text{C}$  のホットプレートでカバースリップを 2 min 加熱した。スピンドーターにカバースリップをセットした後、ZEP-520A を OTS 単分子膜表面に滴下した。300 rpm で 3 s, 続けて 4000 rpm で 120 s, 回転を保持することで、OTS 単分子膜表面に均一な保護膜 (ZEP-520A) を形成した。その後、225  $^{\circ}\text{C}$  のホットプレートでカバースリップを 5 min 加熱し、保護膜を固化させた後、保護膜の上にフォトレジスト (TSMR-V90 LB) を滴下した。1000 rpm で 10 s, 続けて 7000 rpm で 30 s, 回転を

保持することで、カバースリップ表面にフォトレジストをスピコートした。その後、115 °Cのホットプレート上で 1 min 加熱させることで、フォトレジストを固化した。次に、光露光装置で 6 s 露光し、115 °Cのホットプレートでカバースリップを 90 s 加熱した。その後、カバースリップを 2.38%の tetramethyl ammonium hydroxide 水溶液（東京応化工業 NMD-3）に浸漬し、マイクロパターンを現像した。このカバースリップを Milli-Q 水でリンスし、エアガンで乾燥させた。プラズマクリーナー（ヤマト科学, PR301; 出力 100 W ; 100 ppm O<sub>2</sub> ; 150 s）を用いて、カバースリップ表面を O<sub>2</sub> プラズマに曝露し、その後、緩衝フッ酸水溶液（50% HF 10 ml+40% NH<sub>4</sub>F 40 ml+H<sub>2</sub>O 865 ml）にカバースリップを 3 min 浸漬し、Milli-Q 水で 3 回リンスした後、エアガンで乾燥させた。これにより、フォトレジスト層のマイクロパターンを保護膜層および OTS 単分子膜に転写した。オゾン発生器（Enerzen）を用いて、30 min の間カバースリップ表面をオゾンに曝露することで、マイクロパターン内部のガラス表面の有機物残渣を除去した。この状態で、マイクロパターンの外側には、未だ OTS 単分子膜、保護膜、およびフォトレジスト層が残った状態になっている。次に、poly-D-lysine（細胞接着性ポリペプチド） / phosphate buffered saline（PBS）溶液（濃度：50mg mL<sup>-1</sup>）をカバースリップ表面に滴下し、8 h 浸漬した。その後、カバースリップを tetrahydrofuran および ethanol 中でそれぞれ 5 min ずつ超音波処理し、さらに MilliQ 水で 3 回リンスした。この操作を 2 回実施した。以上の工程により、カバースリップ表面に、poly-D-lysine（細胞接着性領域：マイクロパターンの内部）と OTS 単分子膜（細胞非接着性領域：マイクロパターンの外側）を形成した。最後に、溶融したパラフィンワックスをカバースリップの外周にスポッティングしてドット状に固化させた。これにより、共培養で用いるグリア細胞層との間隙を設けられるようにした。

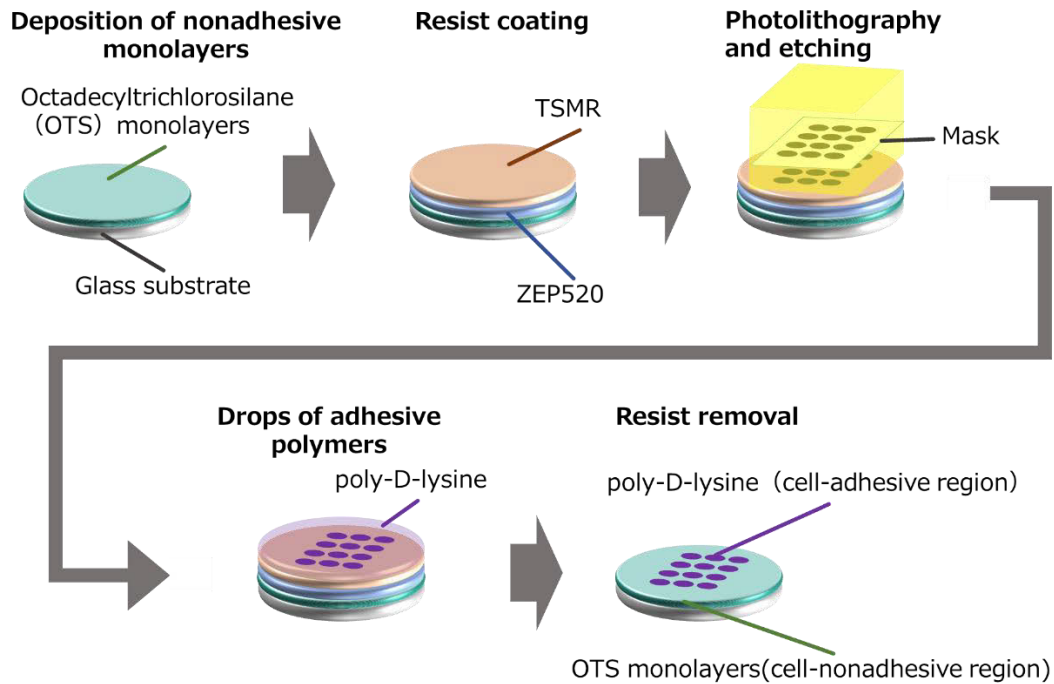


図 3.1 ガラス基板表面におけるマイクロパターン作製プロセスの概要.

### 3.2.2 細胞培養

妊娠した Sprague Dawley ラット (Charles River Laboratories) から、胎生 18 日目のラットの大脳皮質を採取した。その後、大脳皮質をトリプシン処理によって単一細胞に分離し、さらに Freezing medium により凍結保存した。実験では、凍結保存した大脳皮質神経細胞を恒温槽で解凍して用いた。分離した神経細胞を plating medium (minimal essential medium (MEM) + 5% fetal bovine serum (FBS) + 0.6% glucose) 中で播種し、3 h 培養した。その後、マイクロパターン上に神経細胞が接着したガラスカバースリップを、プラスチックシャーレの底面で成長したグリア細胞と対面するように裏返して静置し、neuron culture medium (MEM + N-2 supplement + 0.5 mg

mL<sup>-1</sup> ovalbumin + 10 mM HEPES) 中で培養した<sup>40</sup>。播種日を培養日数0日目 (0 DIV) とし, 3 DIV 及び 7 DIV ごとにシャーレ内の培地の半量を新しい培地と交換した。

### 3.2.3 パッチクランプ法による単一神経細胞の膜電位計測

神経細胞の成長の様子に応じて 13 DIV から 28 DIV の神経細胞を用いて, パッチクランプ計測 (HEKA EPC-10) を実施した。最初に, ホウケイ酸マイクロピペット (Sutter BF 150-86-10) をマイクロピペットプラー (Sutter P-97magg) で加熱した。その状態で, ホウケイ酸マイクロピペットを引っ張り, 切断した。その後, 細胞内液 (146.3 mM KCl, 0.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM ATP-Mg, 0.3 mM GTP-Na, 5 U mL<sup>-1</sup> creatine phosphokinase, 12 mM phosphocreatine, 1 mM EGTA, および 17.8 mM HEPES (pH 7.4) ) をパッチ電極内に充填し, パッチ電極を作製した。その後, 表面上で神経細胞が培養されたカバースリップを, 細胞外液 (140 mM NaCl, 2.4 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, および 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4) ) に浸漬し, パッチクランプ計測を実施した。この際, 膜電位信号を 20 kHz でサンプリングし, 10 kHz および 2.9 kHz のベッセルフィルタでフィルタ処理した。一連の記録は室温下で行った。最後に, オータプスを持つ単一神経細胞の自発発火パターンに対する NMDA オータプス電流の寄与を調査するため, D-2-amino-5-phosphononate (AP5, 50 μM, Sigma) を NMDA ブロッカーとして用いた。

### 3.2.4 相関分析による自発発火パターン分類

AP5の自発発火パターンの相関分析を行った。最初に、発火しきい値を $-35\text{ mV}$ に設定し、パッチクランプ計測によって取得された膜電位の時系列データから、0（非発火）と1（発火）とで構成されるラスタ配列を作成した。その後、ラスタ配列の時間分解能を $1\text{ ms}$ に設定し、任意の2つのスパイク間の時間差をカウントすることで、自己コログラムを作成した。時間差の範囲は $0\text{ ms}$ から $60\text{ ms}$ に設定した。

## 3.3 シミュレーション方法

### 3.3.1 受容体の異なる複数のオータプスを持つ単一神経細胞の数理モデル構築

Hodgkin-Huxley モデル<sup>41</sup>を用いて、オータプスを有する単一神経細胞の自発発火をシミュレーションした。膜電位の時間発展は以下の微分方程式で表される。

$$C \frac{dV}{dt} = -I_{\text{Na}} - I_{\text{K}} - I_{\text{L}} - I_{\text{K}(\text{Ca})} - I_{\text{aut}} + I_{\text{noise}} + I_{\text{app}} \quad (3.1)$$

ここで、 $I_{\text{Na}}, I_{\text{K}}, I_{\text{L}}, I_{\text{K}(\text{Ca})}$ はそれぞれ、電位依存性 Na 電流、電位依存性 K 電流、リーク電流および Ca 依存性 K 電流である。神経細胞はオータプス電流 $I_{\text{aut}}$ を生成するための帰還接続を持つ。ノイズ電流 $I_{\text{noise}}$ は、神経ノイズを模した電流であり、神経細胞が自発的に発火しない程度の電流であると想定した。神経細胞の発火を誘起するために、シミュレーション開始から $1000\text{ ms}$ 経過した時刻にインパルス電流 $I_{\text{app}}$ ( $10\text{ mA}$ ,  $5\text{ ms}$ )を入力した。定数 $C = 1\text{ }\mu\text{F}$ は膜容量である。チャンネル電流 $I_{\text{Na}}, I_{\text{K}}, I_{\text{L}}, I_{\text{K}(\text{Ca})}$ は次の式に従って膜電位のダイナミクスを表現する。

$$I_{\text{Na}} = g_{\text{Na}} m^3 h (V - E_{\text{Na}}) \quad (3.2)$$

$$I_{\text{K}} = g_{\text{K}} n^4 (V - E_{\text{K}}) \quad (3.3)$$

$$I_{\text{L}} = g_{\text{L}} (V - E_{\text{L}}) \quad (3.4)$$

$$I_{\text{K(Ca)}} = g_{\text{K(Ca)}} c (V - E_{\text{K}}) \quad (3.5)$$

ゲート変数  $m, h, n$  はイオンチャネルの開口率を現しており，膜電位に依存する以下の式で表される．

$$\frac{dx}{dt} = \alpha_x(V)(1 - x) - \beta_x(V)x \quad (x = m, h, n) \quad (3.6)$$

ここで，イオンチャネルを構成するサブユニットの開閉のダイナミクスを表現する関数  $\alpha_x(V), \beta_x(V)$  は以下の式に従う．

$$\alpha_m(V) = \frac{0.1(V + 40)}{1 - \exp(-(V + 40)/10)} \quad (3.7)$$

$$\beta_m(V) = 4 \exp\left(-\frac{V + 65}{18}\right) \quad (3.8)$$

$$\alpha_h(V) = 0.07 \exp\left(-\frac{V + 65}{20}\right) \quad (3.9)$$

$$\beta_h(V) = \frac{1}{1 + \exp(-(V + 35)/10)} \quad (3.10)$$

$$\alpha_n(V) = \frac{0.1(V + 55)}{1 - \exp(-(V + 55)/10)} \quad (3.11)$$

$$\beta_n(V) = 0.125 \exp\left(-\frac{V + 65}{80}\right) \quad (3.12)$$

ここで,  $g_{Na}, g_K, g_L, g_{K(Ca)}$  はそれぞれ最大 Na コンダクタンス, 最大 K コンダクタンス, 最大リークコンダクタンス, 最大 Ca 依存性 K コンダクタンスを表し, その値は 56 mS, 5 mS, 0.0205 mS, 0.0002 mS/ $\mu$ M とした.  $E_{Na}, E_K, E_L$  は Na, K, およびリークチャネルの反転電位を表し, その値は 50 mV, -90 mV, -70.3 mV とした. 細胞内 Ca 濃度  $c$  は以下の微分方程式で表される.

$$\frac{dc}{dt} = c_{\text{step}}(V) \sum_j \delta(t - t_j) - \frac{c(t)}{\tau_c} \quad (3.13)$$

ここで,  $c_{\text{step}}$  は神経細胞が時刻  $t_j$  で発火した時の Ca 濃度の変化量であり,  $\tau_c$  は Ca 放出の時定数である. 本章のシミュレーションでは,  $c_{\text{step}}$  と  $\tau_c$  はそれぞれ 100 nM, 50 ms とした. 上述の関数群とパラメータは, Hodgkin-Huxley モデルを大脳皮質神経細胞のイオンチャネル特性に沿うよう修正したモデル<sup>42,43</sup>から得られた.

オートプス電流  $I_{\text{aut}}$  は AMPA 受容体と NMDA 受容体によって生成される 2 種類のシナプス電流から構成される. これらの受容体は, 主要な興奮性シナプス受容体である. 通常,  $Mg^{2+}$  による電位依存性のチャネルブロックが作用し, NMDA 受容体からは殆ど電流が流れないが, 本シミュレーションでは, オータプスによる持続的な興奮性フィードバックが, NMDA 成分を活性化すると仮定した.

$$I_{\text{aut}} = g_{\text{AMPA}} E_{\text{AMPA}} (V - E_{\text{syn}}) + g_{\text{NMDA}} E_{\text{NMDA}} (V - E_{\text{syn}}) \times \left( 1 + \frac{[Mg^{2+}] \exp(-0.062V)}{3.57} \right)^{-1} \quad (3.14)$$

ここで,  $g_{\text{AMPA}}, g_{\text{NMDA}}$  は最大 AMPA, NMDA コンダクタンスを表す.  $[Mg^{2+}]$  は細胞外  $Mg^{2+}$  濃度を表す.  $E_{\text{syn}} = 0$  mV は興奮性シナプス反転電位である. 上記モデルはダイナミックシナプスモデルを含んでおり, 短期可塑性を再現する.  $E_{\text{AMPA}}, E_{\text{NMDA}}$  はダイナミックシナプスモデルにおける活性化状態を表す. 本シミュレーションでは,



NMDA 受容体の緩慢な応答を表現するため、以下のように修正したダイナミックシナプスモデルを用いた<sup>44</sup>。

$$\frac{dE_x}{dt} = \frac{E_x}{\tau_{\text{inact}}} + U_{\text{SE}} \cdot R_x \cdot \exp\left(-\frac{t - t_{\text{fire}}}{\tau_{\text{rise}}}\right) \quad (x = \text{AMPA, NMDA}) \quad (3.15)$$

$$\frac{dR_x}{dt} = \frac{I_x}{\tau_{\text{rec}}} - U_{\text{SE}} \cdot R_x \cdot \exp\left(-\frac{t - t_{\text{fire}}}{\tau_{\text{rise}}}\right) \quad (3.16)$$

$$I_x = 1 - R_x - E_x \quad (3.17)$$

ここで、 $R_x$ は利用可能状態を表し、 $I_x$ は不活性化状態を表す。AMPA 成分として、 $\tau_{\text{rec}} = 200 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{rise}} = 1.1 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{inact}} = 5 \text{ ms}$ を仮定し、NMDA 成分として、 $\tau_{\text{rec}} = 200 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{rise}} = 145 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{inact}} = 55 \text{ ms}$ を仮定した。これらの定数は、グルタミン酸受容体のダイナミクスを模倣するために現象学的に定義された値である。 $t_{\text{fire}}$ は神経細胞が発火した時刻を表し、シミュレーションでは、発火する度に直近の発火時刻へと更新する。引用文献<sup>43</sup>ではデルタ関数が使用されていたが、式(3.15)、(3.16)に示すように指数関数を代わりに用いることで、緩やかに上昇するNMDA電流をモデル化した。

本章のシミュレーションでは、神経細胞は以下に示すOrnstein–Uhlenbeck (OU)ノイズに曝される。

$$dI_{\text{noise}} = -a(I_{\text{noise}} - u)dt + bdW_t \quad (3.18)$$

ここで、 $a = 0.5$ ,  $u = 0.1$ ,  $b = 0.5$ とした。 $W_t$ はWiener仮定を表す<sup>45</sup>。上述の式群(3.1)～(3.18)は時間幅が0.02 msのオイラー法によって実行された。

## 3.4 結果および考察

### 3.4.1 オータプスを持つ単一神経細胞の自発発火パターン

単一神経細胞の自発発火パターンに対するオータプスの影響を明らかにするため、AMPA および NMDA オータプスが組み込まれた Hodgkin-Huxley 型神経細胞モデルを実装した。興奮性シナプスの主要な構成要素である AMPA 受容体と NMDA 受容体は、異なる機能性を有する。一般に、AMPA 電流は時定数の短い大きな振幅を持つが、NMDA 電流は長い時定数を有する<sup>46</sup>。自発発火におけるこれらの時間的分布が、単一の興奮性神経細胞の様々な発火パターンを引き起こすと仮定した。図 3.2a は、自発発火パターンに対する AMPA および NMDA オータプスの寄与を分析するために使用された神経細胞モデルの概略図を示している。現状、自発発火の起源は完全には解明されていないが、シナプスやイオンチャネルのノイズなどの熱揺らぎの結果として発生すると推測されている<sup>51</sup>。本シミュレーションでは、OU ノイズとデルタ刺激で構成されるノイズ電流を使用した。ここで、OU ノイズはシナプスノイズを模倣している。対して、デルタ刺激は突発的なノイズ入力を模倣している。シミュレーション開始から 1000 ms 経過した後、デルタ刺激を入力することで、自発発火を誘導した。合計シミュレーション時間は 5000 ms に設定している。図 3.2b は、シミュレーションによって得られた典型的な発火パターンの模式図である。デルタ刺激提示後、神経細胞は UP 状態に遷移する。図 3.2b に示すように、UP 状態持続期間として  $T_d$  を定義している。便宜上、UP 状態がシミュレーション終了時まで持続する場合、 $T_d$  は 4000 ms と評価される。

図 3.2c は、UP 状態持続時間  $T_d$  に対する AMPA および NMDA コンダクタンスの依存性を、異なる細胞外  $Mg^{2+}$  濃度ごとに示している。依存性は、暗い領域と明るい領域

で構成されるヒートマップによって可視化されている。暗い領域は UP 状態持続期間が短い状態を示し、明るい領域はシミュレーションが終了するまで神経細胞が UP 状態のままであったことを示す。NMDA コンダクタンスが大きいほど、UP 状態持続期間は長くなる (図 3.2e および f)。これは、NMDA オータプスが AMPA オータプスよりも長い期間、興奮性フィードバック電流を提供するためであり、UP 状態持続時間の決定に強く寄与していることを意味する。この傾向は、 $Mg^{2+}$ 濃度に対する UP 状態持続期間の依存性にも見られる。図 3.2c に示すように、NMDA コンダクタンスは  $Mg^{2+}$ 濃度の増加とともに減少するため、暗い領域は  $Mg^{2+}$ 濃度の増加とともに広がる。

UP 状態持続期間が NMDA コンダクタンスと  $Mg^{2+}$ 濃度の両方に依存する一方で、自発発火パターンは3種類に分類することができる。図 3.1d に示すように、AMPA および NMDA コンダクタンスを変数として発火パターンをマッピングできる。図 3.2c に示すように、短いバースト発火と他のバースト発火は、UP 状態持続期間によって単純に区別できる。これは、NMDA コンダクタンスが小さい場合、持続的な発火を誘起できる強度のオータプス電流が供給されないためである。一方、周期的バースト発火は、図 3.2d に示すように、AMPA コンダクタンスの強度に依存する。これは、高強度の AMPA コンダクタンスによる短時間での神経伝達物質の枯渇が、定期的なバースト発火を引き起こすためである。

AMPA および NMDA コンダクタンスの両方の大きさが一定水準を超える場合、UP 状態においてバーストスパイク列が周期的に現れる (図 3.2g)。図 3.2h に示すように、周期的バースト発火では、短い間隔 ( $\sim 10$  ms) と長い間隔 ( $\sim 200$  ms) の2つの周期性が観察される。この発火パターンは、fast rhythmic burstin (FRB) ニューロンの発火パターンと同様の特徴を有する<sup>48-50</sup>。このような周期的バースト発火は、

### 第3章 オータプス培養した単一神経細胞の自発発火パターン計測とその数理モデル構築

信号伝達の信頼性を高め、下流の神経細胞に大きな影響をもたらす<sup>51, 52</sup>。上記のシミュレーション結果は、オータプスを持つ単一神経細胞の発火パターンが、NMDA および AMPA コンダクタンスの組み合わせに強く依存することを示している。

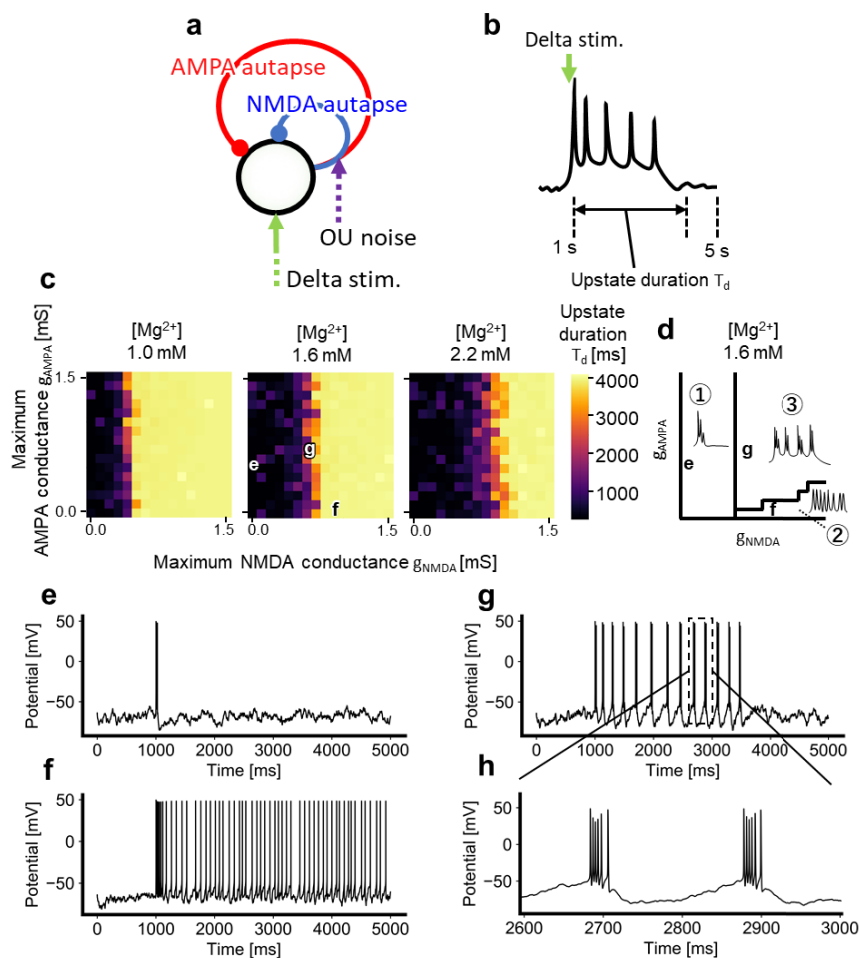


図 3.2 シミュレーションで得られたオートプスを持つ単一神経細胞の自発発火パターン。(a)シミュレーションした神経細胞の模式図。この神経細胞は、時定数の短い AMPA オータプス (赤) と時定数の長い NMDA オータプス (青) をフィードバック接続として持つ。神経細胞はシナプスノイズを模倣した OU ノイズ (紫) に常に曝されており、突発的なノイズを模したデルタ刺激 (緑) の入力を一度だけ受ける。(b) 代表的な自発発火パターン。モデル神経細胞はデルタ刺激直後から UP 状態に遷移する。 $T_d$  は UP 状態の持続時間として定義される。(c) UP 状態持続時間に対する AMPA および NMDA コンダクタンスの依存性。異なる細胞外  $Mg^{2+}$  濃度ごとに結果を示している。平均 UP 状態持続時間は同じシミュレーションを異なる乱数シードを用いて 10 回実行した結果から計算した。(d) 自発発火パターンの分類。①短いバースト、②長いバースト、および、③周期的バースト発火。この図では、短いバースト発火でなく、かつ、ISI の変動係数が 20 以上である発火を周期的バースト発火に分類している。典型的な発火パターンは、(e) 短いバースト、(f) 長いバースト、および、(g) 周期的バースト発火として示されている。これらの発火パターンを生成する AMPA および NMDA コンダクタンスの条件は(c) のヒートマップ上の文字 e, f, および、g で示される。(h) と (g) の点線領域の拡大グラフは周期的バースト発火の詳細な膜電位を示す。図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>58</sup>より引用した。

実神経細胞においてもシミュレーションと同様の自発発火パターンが生成されるかを確認するために、孤立した円形マイクロパターン上で神経細胞を成長させ、その活動を計測した。孤立した円形マイクロパターン上の神経細胞は、自身の樹状突起とのみシナプス接続を確立し、いくつかの培養日数を経たのち自発発火することが知られている<sup>47</sup>。図 3.3 は、マイクロパターン上で培養された神経細胞が発する代表的な自発発火パターンを示している。図 3.3d の挿入図に示されているように、神経細胞は細胞非接着性領域に囲まれた円形の細胞接着性領域内に閉じ込められているため、オータプスのみを確立している。図 3.3a-c に示すように、単一神経細胞は様々な種類の発火パターンを示す。この発火パターンは、刺激電流を人為的に注入しない限り、観察中に変化することはなかった。自発発火パターンは、シミュレーション結果と同様に、短いバースト、長いバースト、周期的バースト発火の3種類に分類でき、シミュレーションを支持する結果となった。

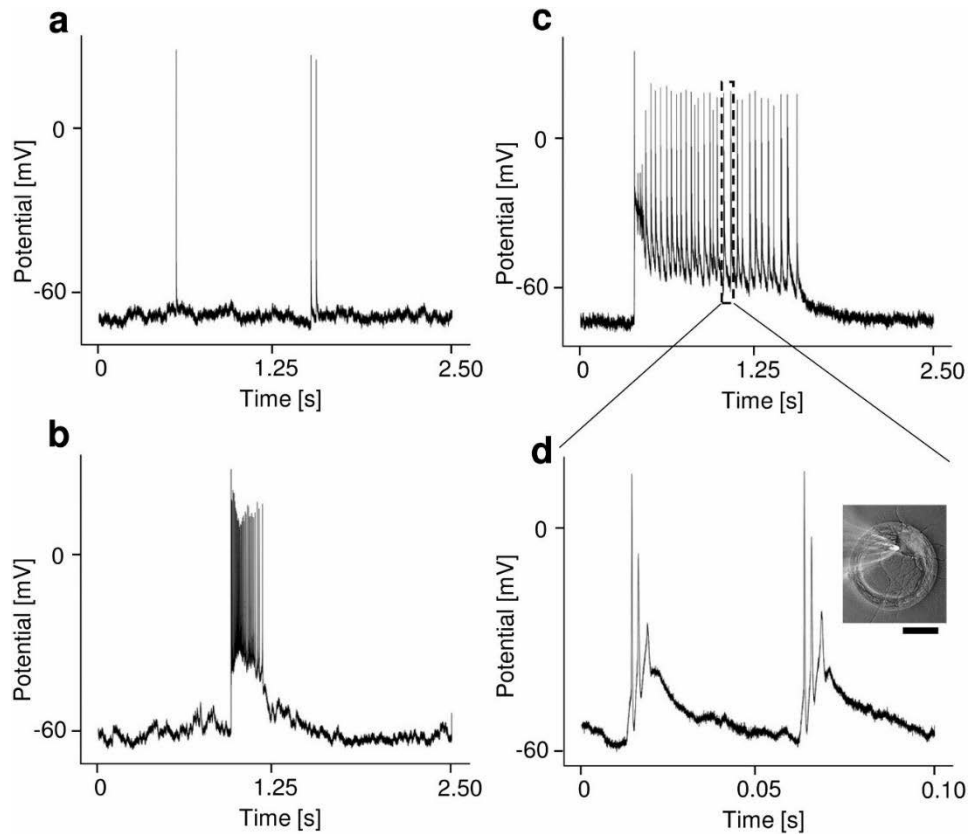


図 3.3 円形マイクロパターン上で培養したオータプスを持つ単一神経細胞の自発発火パターン. 自発発火パターンはパッチクランプ測定 (カレントクランプ) によって得られた. グラフはそれぞれ, (a)短いバースト発火, (b)長いバースト発火, および, (c)周期的バースト発火を示している. (d) (c)の点線領域の拡大グラフ. 位相差顕微鏡画像は円形マイクロパターン上の孤立した典型的な神経細胞を示している. 顕微鏡写真にはパッチクランプ電極も示されている. スケールバー: 50  $\mu\text{m}$ . 図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>58</sup>より引用した.

### 3.4.2 自発発火パターンの生成メカニズム

シミュレーション結果を用いて、周期的バースト発火の生成メカニズムを分析した。図 3.4 は、周期的バースト発火におけるシナプス電流を示している。周期的バースト発火は、AMPA オータプス電流と NMDA オータプス電流とが交互に現れることによって形成される。図 3.4a における 2700 ms, 2900 ms 付近の膜電位から明らかなように、高周波シナプス電流の主成分は AMPA オータプス電流である。対照的に、バーストスパイク間でのシナプス電流の主成分は NMDA オータプス電流である。時定数が短い AMPA オータプス電流は、バースト発火を引き起こすが、神経伝達物質の枯渇により、バースト発火は一時的に休止する。バースト発火の最中、NMDA オータプス電流も上昇するが、NMDA オータプス電流はバースト発火を維持するには不十分である。その一方で、NMDA オータプス電流は長い時定数を有するため、バーストスパイク間においても持続的に興奮性のフィードバック電流を供給し続ける。この電流供給は、次のバースト発火を誘発するのに十分な強度を持つ。この AMPA および NMDA オータプス電流の相互補完的な寄与によって、周期的バースト発火パターンが生成される。

次に、シミュレーションで明らかにされた自発的発火パターンに対する NMDA オータプス電流の影響を実験的に検証した。パッチクランプ法による自発発火パターンの計測の際、NMDA 受容体阻害薬である AP5 を投与し、投与前後での自発発火パターンを比較した。図 3.5 は AP5 による自発発火の抑制を示している。図 3.5a および b より、AP5 の投与後に UP 状態の期間が減少することは明らかである。AP5 投与後、自己コレログラムにおける遅延時間の分散は増加するが（図 3.5c）、遅延時間のカウンターのピーク値は 40 ms 付近から 20 ms 付近へと減少する。これは、シミュレーション結果と同様に、NMDA オータプス電流の減少によって UP 状態持続時間が減少する



ことを意味し、NMDA オータプス電流が自発発火パターンの生成メカニズムに寄与することを裏付ける。

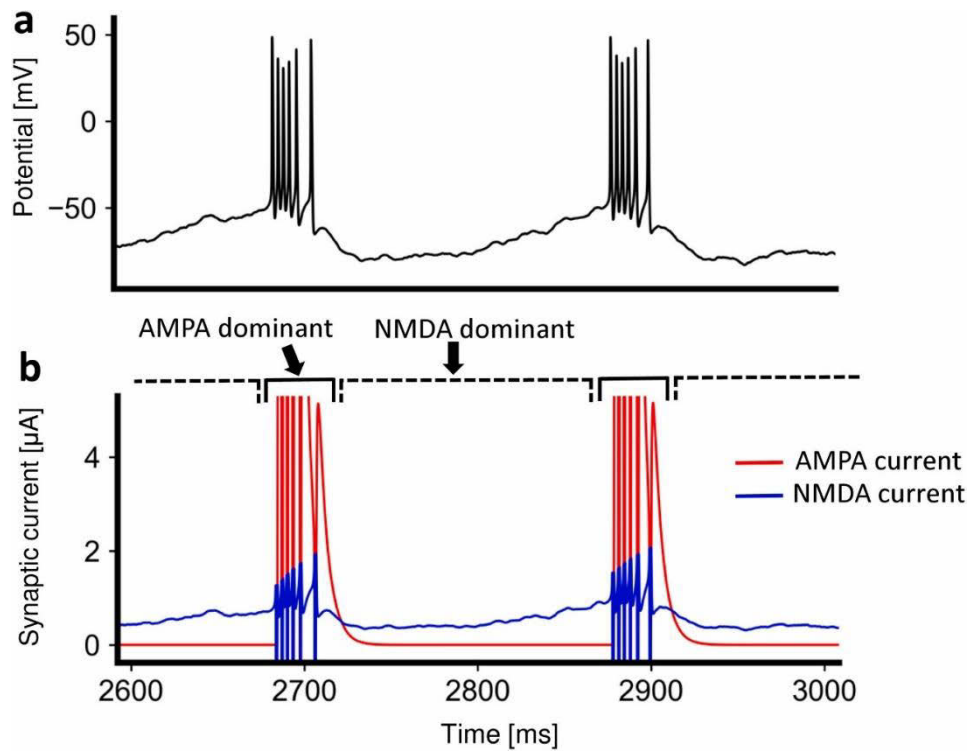


図 3.4 シミュレーションで得られたオータプスを持つ単一神経細胞の膜電位およびシナプス電流. 周期的バースト発火のケースを示している. シミュレーション条件は図 3.2g の場合と同じである. (a) 膜電位. (b) オータプス電流. 図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>58</sup>より引用した.

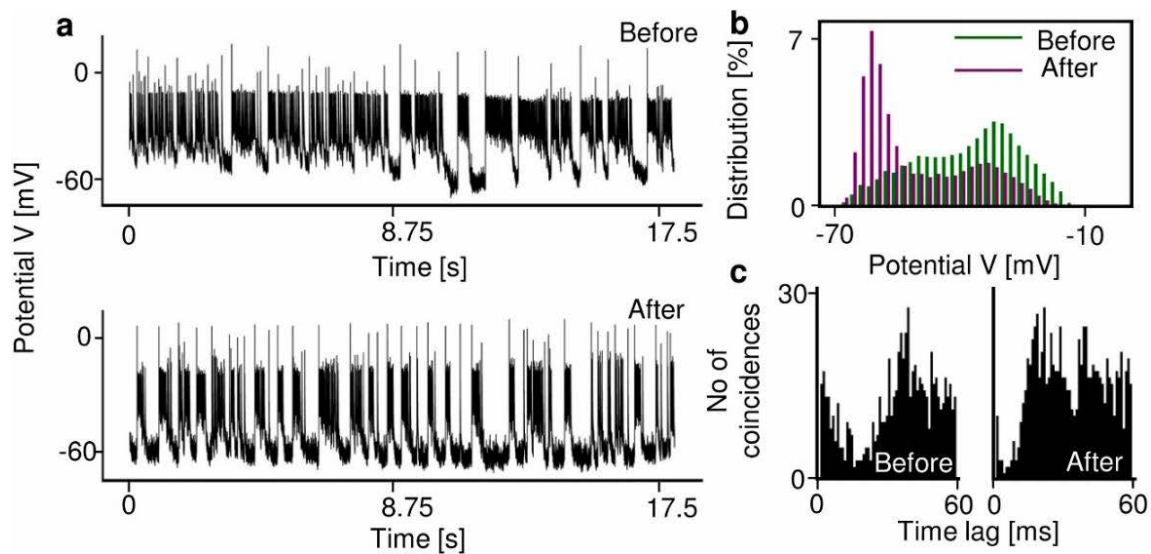


図 3.5 NMDA 受容体拮抗剤 AP5 はオータプス培養された単一神経細胞の自発的発火を抑制する。(a) AP5 投与前後でのオータプス培養された単一神経細胞の膜電位。(b) 膜電位のヒストグラム。(c) 膜電位の自己コログラム。図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>58</sup>より引用した。

### 3.4.3 オータプスを持つ単一神経細胞の脳機能における役割

オータプスを持つ神経細胞は、神経ネットワーク内に組み込まれると、一致検出器として機能する<sup>25</sup>。短いバースト発火の場合、オータプスを持つニューロンは、デルタ刺激後にいくつかの活動電位を放出する。この時、オータプスが神経ネットワーク内に組み込まれていると仮定すると、デルタ刺激は別の神経細胞からの入力と見なすことができる。膜電位は、オータプスのフィードバック入力によって脱分極状態に維持される。2 番目のスパイクが他の神経細胞から到着すると、オータプスを持つ神経細胞は、1 番目のスパイク到着との時間差が短い場合にのみ、一致を検出してスパイク信号を送出する。対照的に、周期的バースト発火する神経細胞は、2つの異なるタイミングにおいて一致を検出する場合がある。単発のスパイクではなく、バーストスパイクを伴いスパイク間隔に複数の分布を持つような持続的発火が、バーストスパイ

クによって神経コーディングを強化することが報告されている<sup>53-56</sup>。これらは、神経ネットワークにおけるオータプスの存在が発火パターンの多様性に寄与する可能性があることを示している。

図 3.6 は、オータプスを持つ単一神経細胞が持つ一致検出器としての機能の概略図を示している。この単一神経細胞が他細胞から独立している場合、発火パターンは、AMPA および NMDA コンダクタンスの構成比などの内部条件に強く依存する。しかし、オータプスを持つ単一神経細胞がネットワークに組み込まれている場合、他の神経細胞からの入力信号が反映された発火パターンが現れる。この状況は、内部バーストによる入力信号の変調をもたらすと推測される。すなわち、オータプスによる帰還信号は、入力信号が通過する可能性を高め、変調された出力パルス列を生成する。特に、周期的バースト発火を伴う単一神経細胞の場合（図 3.6c）、変調された出力パルス列が断続的に送出されうる。この出力特性は、AMPA および NMDA オータプスの協調による周期的バースト発火の生成が、神経ネットワークの大域的リズムに関係している可能性を示唆する。

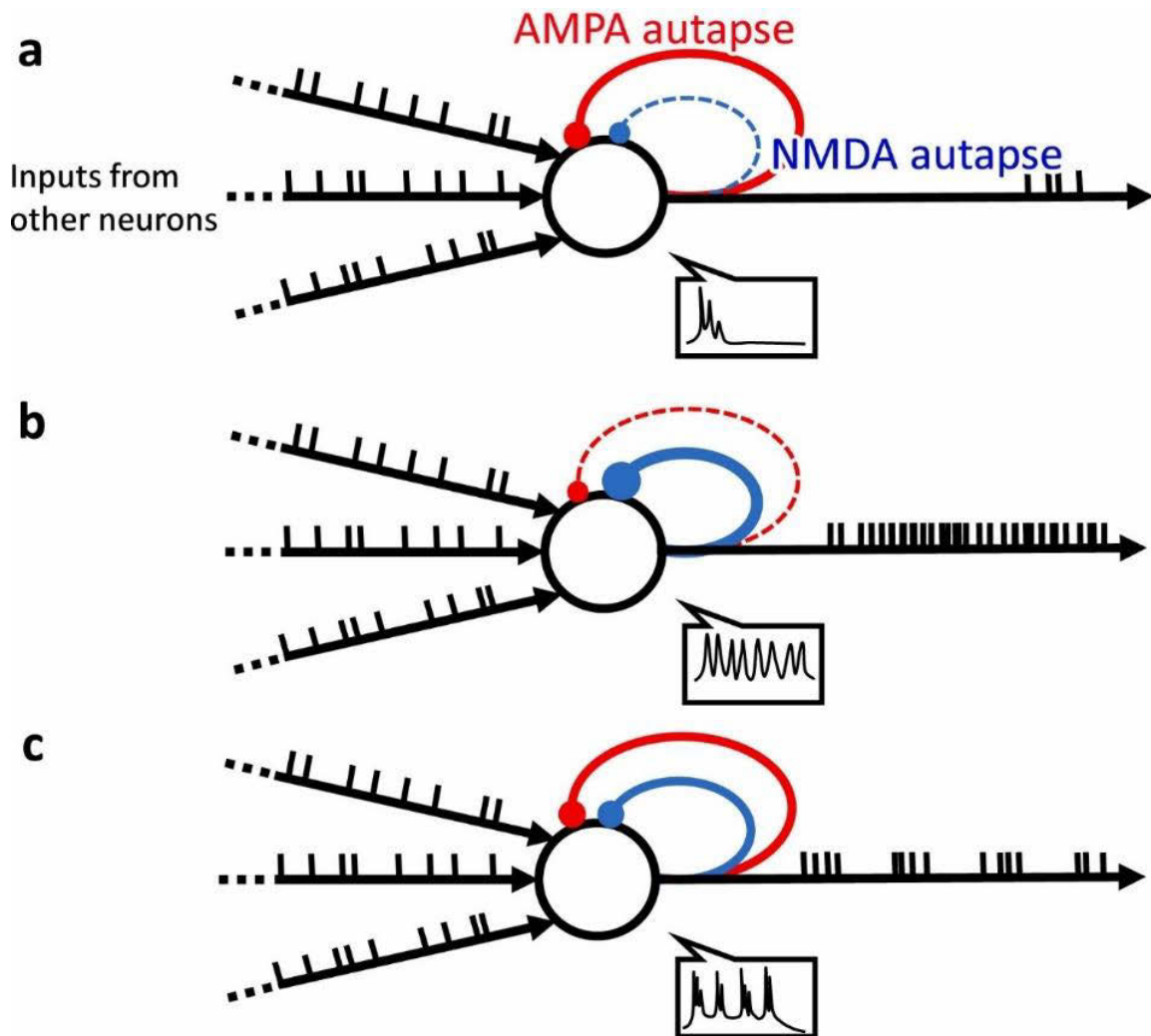


図 3.6 一致検出器として機能する、オートプスを持つ単一神経細胞の概要図. 神経細胞は AMPA および NMDA コンダクタンス間のバランスに応じて, (a) 短いバースト発火, (b) 長いバースト発火, および, (c) 周期的バースト発火を示す. 図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>58</sup>より引用した.

### 3.5 結論

小規模な神経細胞回路は、回路に内在すると想定されるオータプスが多様な自発発火パターンを示した場合に、多様な機能を持ちうると考えられる。そこで、オータプスを持つ単一神経細胞がとりうる自発発火パターンとその生成メカニズムを理解することを目的として、AMPA および NMDA オータプスを持つ単一神経細胞モデルの自発発火シミュレーションを行った。さらにパッチクランプ計測によって得られたオータプスを持つ単一神経細胞の自発発火パターンとシミュレーション結果とを比較することで、モデルの妥当性を検証した。その結果、オータプスを持つ単一神経細胞回路は、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種類の自発発火パターンを示すこと、AMPA および NMDA コンダクタンスの組み合わせによって発火パターンが変化することが明らかとなった。脳内の神経細胞回路ではハブニューロンなどの存在によって、小規模な神経細胞回路の活動からより規模の大きな神経細胞回路の活動が駆動されうる<sup>56, 57</sup>。この観点から捉えると、本研究の結果は小規模な神経細胞回路においてオータプスが有効に働く場合と、そうでない場合とがあることを示している。①短いバーストまたは③周期的バーストを示す場合、これらの発火パターンは共に一致検出器として機能し、オータプスを持つ単一神経細胞と上流の神経細胞との発火タイミングを同期させる機能を果たす。この効果は、一致検出の機能を周期的に提供し続けられる③周期的バーストにおいて顕著となり、同期活動中での複数の神経細胞間での信号処理を可能にする。対して、②長いバーストを示す場合は、その発火パターンを示すオータプスが過剰に存在した場合に、小規模な神経細胞回路の過剰な神経活動を誘発する可能性がある。これは、過剰な神経活動を原因とする神経疾患（てんかん、アルツハイマー病）の発生にオータプスが関与する可能性を示唆する。

したがって、正常な脳内では、過剰なオータプス形成を回避する仕組みが個々のオータプスの性質、あるいは小規模な神経細胞回路自体の特性に備わっている可能性がある。

## 参考文献

1. Van der Loos, H. & Glaser, E. M. Autapses in neocortex cerebri: synapses between a pyramidal cell's axon and its own dendrites. *Brain Res.* **48**, 355–360 (1972).
2. Preston, R. J., Bishop, G. A. & Kitai, S. T. Medium spiny neuron projection from the rat striatum: an intracellular horseradish peroxidase study. *Brain Res.* **183**, 253–263 (1980).
3. Peters, A. & Proskauer, C. C. Synaptic relationships between a multipolar stellate cell and a pyramidal neuron in the rat visual cortex. A combined Golgi-electron microscope study. *J. Neurocytol.* **9**, 163–183 (1980).
4. DiFiglia, M., Pasik, P. & Pasik, T. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res.* **114**, 245–256 (1976).
5. Park, M. R., Lighthall, J. W. & Kitai, S. T. Recurrent inhibition in the rat neostriatum. *Brain Res.* **194**, 359–369 (1980).
6. Scheibel, M. E. & Scheibel, A. B. Inhibition and the Renshaw cell. A structural critique. *Brain Behav. Evol.* **4**, 53–93 (1971).
7. Karabelas, A. B. & Purpura, D. P. Evidence for autapses in the substantia nigra. *Brain Res.* **200**, 467–473 (1980).

8. Cobb, S. R. et al. Synaptic effects of identified interneurons innervating both interneurons and pyramidal cells in the rat hippocampus. *Neuroscience* **79**, 629–648 (1997).
9. Bekkers, J. M. & Stevens, C. F. Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7834–7838 (1991).
10. Lübke, J., Markram, H., Frotscher, M. & Sakmann, B. Frequency and Dendritic Distribution of Autapses Established by Layer 5 Pyramidal Neurons in the Developing Rat Neocortex: Comparison with Synaptic Innervation of Adjacent Neurons of the Same Class. *J. Neurosci.* **16**, 3209–3218 (1996).
11. Lim, S. & Goldman, M. S. Balanced cortical microcircuitry for spatial working memory based on corrective feedback control. *J. Neurosci.* **34**, 6790–6806 (2014).
12. Kim, C. M. & Chow, C. C. Learning recurrent dynamics in spiking networks. *eLife* **7**, e37124 (2018).
13. Maass, W., Joshi, P. & Sontag, E. D. Computational Aspects of Feedback in Neural Circuits. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e165 (2007).
14. György, B. *Rhythms of the Brain*. (Oxford University Press, U.S.A., 2021).
15. Yilmaz, E., Ozer, M., Baysal, V. & Perc, M. Autapse-induced multiple coherence resonance in single neurons and neuronal networks. *Sci. Rep.* **6**, 30914 (2016).

16. Yilmaz, E., Baysal, V., Ozer, M. & Perc, M. Autaptic pacemaker mediated propagation of weak rhythmic activity across small-world neuronal networks. *Phys. A: Stat. Mech. Appl.* **444**, 538–546 (2016).
17. Xie, H., Gong, Y. & Wang, B. Spike-timing-dependent plasticity optimized coherence resonance and synchronization transitions by autaptic delay in adaptive scale-free neuronal networks. *Chaos Solit. Fractals* **108**, 1–7 (2018).
18. Wiles, L. *et al.* Autaptic Connections Shift Network Excitability and Bursting. *Sci. Rep.* **7**, 44006 (2017).
19. Fan, H., Wang, Y., Wang, H., Lai, Y.-C. & Wang, X. Autapses promote synchronization in neuronal networks. *Sci. Rep.* **8**, 580 (2018).
20. Wang, Q., Gong, Y. & Wu, Y. Autaptic self-feedback-induced synchronization transitions in Newman-Watts neuronal network with time delays. *Eur. Phys. J. B* **88**, 103 (2015).
21. Gong, Y., Wang, B. & Xie, H. Spike-timing-dependent plasticity enhanced synchronization transitions induced by autapses in adaptive Newman-Watts neuronal networks. *Biosystems* **150**, 132–137 (2016).
22. Yin, L. *et al.* Autapses enhance bursting and coincidence detection in neocortical pyramidal cells. *Nat. Commun.* **9**, 4890 (2018).
23. Jia, Y., Gu, H., Li, Y. & Ding, X. Inhibitory autapses enhance coherence resonance of a neuronal network. *Commun. Nonlinear Sci. Numer. Simul.* **95**, 105643 (2021).



24. Raichle, M. E. Two views of brain function. *Trends Cogn. Sci.* **14**, 180–190 (2010).
25. Corlew, R., Bosma, M. M. & Moody, W. J. Spontaneous, synchronous electrical activity in neonatal mouse cortical neurones. *J. Physiol.* **560**, 377–390 (2004).
26. Moody, W. J. & Bosma, M. M. Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol. Rev.* **85**, 883–941 (2005).
27. Ecker, A. S. et al. Decorrelated neuronal firing in cortical microcircuits. *Science* **327**, 584–587 (2010).
28. Alishbayli, A., Tichelaar, J. G., Gorska, U., Cohen, M. X. & Englitz, B. The asynchronous state's relation to large-scale potentials in cortex. *J. Neurophysiol.* **122**, 2206–2219 (2019).
29. Harris, K. D. & Thiele, A. Cortical state and attention. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 509–523 (2011).
30. Milner, L. D. & Landmesser, L. T. Cholinergic and GABAergic inputs drive patterned spontaneous motoneuron activity before target contact. *J. Neurosci.* **19**, 3007–3022 (1999).
31. Hanson, M. G. & Landmesser, L. T. Characterization of the circuits that generate spontaneous episodes of activity in the early embryonic mouse spinal cord. *J. Neurosci.* **23**, 587–600 (2003).

32. Mennerick, S., Que, J., Benz, A. & Zorumski, C. F. Passive and synaptic properties of hippocampal neurons grown in microcultures and in mass cultures. *J. Neurophysiol.* **73**, 320–332 (1995).
33. Liu, H., Chapman, E. R. & Dean, C. “Self” versus “Non-Self” Connectivity Dictates Properties of Synaptic Transmission and Plasticity. *PLoS ONE* **8**, e62414 (2013).
34. Yamamoto, H. *et al.* In situ modification of cell-culture scaffolds by photocatalytic decomposition of organosilane monolayers. *Biofabrication* **6**, 035021 (2014).
35. Kohei, S. *et al.* Surface modification of cell scaffold in aqueous solution using tio2 photocatalysis and linker protein l2 for patterning primary neurons. *e-J. Surf. Sci. Nanotechnol.* **13**, 213–218 (2015).
36. Kono, S. *et al.* Live-Cell, Label-Free Identification of GABAergic and Non-GABAergic Neurons in Primary Cortical Cultures Using Micropatterned Surface. *PLoS ONE* **11**, e0160987 (2016).
37. Clark, P. Cell behaviour on micropatterned surfaces. *Biosens. Bioelectron.* **9**, 657–661 (1994).
38. Yamamoto, H. *et al.* In-situ guidance of individual neuronal processes by wet femtosecond-laser processing of self-assembled monolayers. *Appl. Phys. Lett.* **99**, 163701 (2011).

39. Yamamoto, H., Hayakawa, T., Netoff, T. I. & Hirano-Iwata, A. A single-cell based hybrid neuronal network configured by integration of cell micropatterning and dynamic patch-clamp. *Appl. Phys. Lett.* **113**, 133703 (2018).
40. Kaeck, S. & Banker, G. Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* **1**, 2406–2415 (2006).
41. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500–544 (1952).
42. Pospischil, M. *et al.* Minimal Hodgkin-Huxley type models for different classes of cortical and thalamic neurons. *Biol. Cybern.* **99**, 427–441 (2008).
43. French, D. A. & Gruenstein, E. I. An integrate-and-fire model for synchronized bursting in a network of cultured cortical neurons. *J. Comput. Neurosci.* **21**, 227–241 (2006).
44. Tsodyks, M. V. & Markram, H. The neural code between neocortical pyramidal neurons depends on neurotransmitter release probability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 719–723 (1997).
45. Destexhe, A., Rudolph, M., Fellous, J. M. & Sejnowski, T. J. Fluctuating synaptic conductances recreate in vivo-like activity in neocortical neurons. *Neuroscience* **107**, 13–24 (2001).
46. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. & Traynelis, S. F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **51**, 7–61 (1999).

47. Wyart, C. *et al.* Dynamics of excitatory synaptic components in sustained firing at low rates. *J. Neurophysiol.* **93**, 3370–3380 (2005).
48. Gray, C. M. & McCormick, D. A. Chattering cells: superficial pyramidal neurons contributing to the generation of synchronous oscillations in the visual cortex. *Science* **274**, 109–113 (1996).
49. Steriade, M., Timofeev, I., Dürmüller, N. & Grenier, F. Dynamic properties of corticothalamic neurons and local cortical interneurons generating fast rhythmic (30-40 Hz) spike bursts. *J. Neurophysiol.* **79**, 483–490 (1998).
50. Cunningham, M. O. *et al.* A role for fast rhythmic bursting neurons in cortical gamma oscillations in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7152–7157 (2004).
51. Wang, X.-J. Fast burst firing and short-term synaptic plasticity: A model of neocortical chattering neurons. *Neuroscience* **89**, 347–362 (1999).
52. Higgs, M. H. & Spain, W. J. Conditional bursting enhances resonant firing in neocortical layer 2-3 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **29**, 1285–1299 (2009).
53. Miller, E. K., Lundqvist, M. & Bastos, A. M. Working Memory 2.0. *Neuron* **100**, 463–475 (2018).
54. Womelsdorf, T., Ardid, S., Everling, S. & Valiante, T. A. Burst firing synchronizes prefrontal and anterior cingulate cortex during attentional control. *Curr. Biol.* **24**, 2613–2621 (2014).
55. Shai, A. S., Anastassiou, C. A., Larkum, M. E. & Koch, C. Physiology of layer 5 pyramidal neurons in mouse primary visual cortex: coincidence detection through bursting. *PLoS Comput. Biol.* **11**, e1004090 (2015).

56. Naud, R. & Sprekeler, H. Sparse bursts optimize information transmission in a multiplexed neural code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115(27)**, E6329–E6338 (2018).

57. Gal, E. *et al.* The Role of Hub Neurons in Modulating Cortical Dynamics. *Front. Neural Circuits* **15**, 718270 (2021).

58. Hattori, K. *et al.* Contribution of AMPA and NMDA receptors in the spontaneous firing patterns of single neurons in autaptic culture. *Biosystems* **198**, 104278 (2020).

## 4章 オータプス培養した単一神経細胞の刺激と応答

### 4.1 背景および目的

神経細胞刺激は、神経細胞の発火を引き起こし、その際の時空間的な信号伝播を解析するための重要な技術である<sup>1,2</sup>。この技術は、自発発火の誘起やシナプス荷重の調節のために使用されるほか、神経細胞の発火パターンを変化させるためにも使用される<sup>3,4</sup>。神経細胞ネットワーク内の標的神経細胞を刺激することで、影響力のある神経細胞、すなわち多数の神経細胞へ出力を投射し、かつ投射先と効果的な強度のシナプス接続を形成している神経細胞を特定することが可能となる。そのような影響力を持つ神経細胞の発火は、神経ネットワーク全体を活性化し、30-40 min に渡って活性状態が維持する<sup>5-8</sup>。したがって、非侵襲的な単一細胞刺激は、ネットワーク接続および発火パターンの時間変化の解析に新たな可能性を提供する。

神経細胞刺激の手法を選択する際には、刺激パターンの時間分解能や制御範囲に加えて、選択性と侵襲性を考慮する必要がある。単一神経細胞解析における強力なツールである全細胞パッチクランプ法は、膜電位変化の速度よりも十分に高い時間分解能で制御された刺激パターンを標的とする単一神経細胞に提示することができ、同時に、刺激に対する膜電位応答を計測することもできる<sup>9,10</sup>。しかし、全細胞パッチクランプ法はクランプされた神経細胞にダメージを与えるため、標的細胞の生存時間（したがって、計測時間）を制限する。マルチ電極アレイ（Multi-Electrode Array; MEA）を使用した電圧パルスの印加は、非侵襲的な神経細胞刺激となるため、培養基板上で神経細胞が生存し続けている限りにおいて、電気刺激とその応答計測が可能である。この手法は神経ネットワークの大域的な信号伝搬の過程を追跡することに適するが、空間分解能が比較的 low、電極周囲の複数の神経細胞を同時に刺激する<sup>11</sup>。ま

た、電極が基板表面に固定されているため、細胞培養日数の増加に伴って細胞やネットワークが成長すると、特定の細胞を標的して刺激を印加することが困難になる。近年の光遺伝学は単一神経細胞レベルでの照準精度を実現しているものの、レーザーやデジタルミラーデバイスなどの光学システムを顕微鏡システムに追加で装備する必要性を伴う<sup>12,13</sup>。加えて、光活性化タンパク質の導入に伴う副作用も懸念される。以上の点から、回路形成後の単一神経細胞を照準でき、非侵襲的に刺激できる簡便な手法が、神経細胞回路の長期解析に求められている。

2本針電極による電気刺激は、ネットワーク形成後の神経細胞を刺激できる非侵襲的な刺激手法となりうる<sup>14,15</sup>。この手法は、脳スライスの局所領域を刺激することで神経回路の機能的関連性<sup>16,17</sup>や活動パターンの時間的变化<sup>18,19</sup>を調査するために使用されている。また、針電極による細胞外電気刺激は神経回路の興奮性を調整することもできるため、パーキンソン病などの神経障害の治療にも使用されている<sup>20-22</sup>。上記の例はいずれも複数の神経細胞を刺激対象とする。一方で、独立して移動する2本の針電極を単一神経細胞の近傍に配置することで、照準精度を向上させられることが理論的に予測されている<sup>23,24</sup>。これは、2本針電極がネットワーク内の単一の神経細胞を選択的に刺激できる可能性を示唆する。

マイクロパターンニング技術は、初代培養系において神経細胞の位置を規定することができるため<sup>25-31</sup>、2本針電極との親和性が高い。例えば、マイクロパターンニング技術によって、複数の神経細胞をガラス基板上の規定した位置に、それらが相互に接続を持つか否かの如何に関わらず、配置できる。細胞間シグナル伝達の調査のためには、ネットワーク中の特定の神経細胞にのみ電気刺激を印加できる必要がある。なぜなら、2つの神経細胞が接続されている場合、近接した2つの神経細胞が同時に発火したとすると、両方の神経細胞が電気刺激に応答して発火したのか、細胞間接続を介した信

号伝播を介して発火したのかを判断することが困難になるからである。マイクロパターンニング技術で神経細胞をガラス基板上に分離して配置することは、信号伝播によるアーティファクトを防ぎ、電気刺激の効果を直接測定できる点において有用となる。

本章では、2本針電極による単一神経細胞刺激の実行可能性について報告する。最初に、マイクロパターン上で二つの神経細胞を分離して培養し、2本針電極で電気刺激した際のカルシウムイメージング計測の結果を示す。次に、集中定数回路モデルによる神経刺激のシミュレーションを行い、2本針電極による刺激の有効性を評価する。この際、近接配置した2本針の電極による電気刺激によって、標的神経細胞が発火するメカニズム、および刺激の時空間分解能を決定するキーパラメータを2コンパートメント神経細胞モデルによって明らかにする。最後に、2本針電極で神経細胞回路内の標的細胞を刺激することで、活動状態の可塑的な変化を誘発できる可能性について実験的に示す。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 ガラス基板表面におけるマイクロパターンの作製

フォトリソグラフィを用いて、単一神経細胞を培養するためのマイクロパターンをガラス基板表面に作製した。3.2.1 節に記述したプロセスを用いて、カバースリップ表面に、poly-D-lysine からなる細胞接着性領域と、octadecyltrichlorosilane (OTS) からなる細胞非接着性領域を形成した。神経細胞が播種された表面を識別できるようにするため、3.2.1 節に記述した方法を用いて、パラフィンワックスのスポットティングを行った。



## 4.2.2 細胞培養

3.2.2 節に記述したプロセスを用いて、胎生 18 日目のラットの大脳皮質の神経細胞を plating medium 中に播種し、3 h 培養した。その後、plating medium をピペットで全量吸い取り、神経細胞培地（148-09671, 富士フイルム和光純薬）を加えて培養した。播種日を培養日数 0 日目（0 DIV）とし、3 DIV 及び 7 DIV ごとにシャーレ内の培地の全量を未使用の同培地と交換した。

## 4.2.3 カルシウムイメージング法を用いた神経活動計測

12~14 DIV の神経細胞を用いてカルシウムイメージングを実施した。最初に、128 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glucose, 10 mM HEPES, 45 mM sucrose を含む 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-buffered saline (HBS) で、神経細胞が播種されたカバースリップを 3 回リンスした。次に、2  $\mu$ M fluo-4 AM (Invitrogen) および 0.01% pluronic F-127 を含む HEPES buffered saline (HBS) 溶液にカバースリップを浸漬し、37 °C 下で 30 min インキュベートすることで、蛍光 Ca 指示薬を神経細胞に導入した。その後、カバースリップを新鮮な HBS でリンスし、fluo-4 AM の脱酸化が完了するまでさらに 10 min インキュベートした。対物レンズ（20 $\times$ , 開口数 0.45）, フィルターキューブ（B-2A, Nikon）, 青色パワーLED（OSB5XNE3C1E, OptoSupply）を用いた自作 LED 光源, および、科学用デジタル CCD カメラ（ORCA-R2, Hamamatsu Photonics）を備えた倒立顕微鏡（TE300, Nikon）を用いて、試料のイメージングを行った。蛍光強度を 12 ビット（4096 ステップ）でデジタル化した。すべての記録は 37 °C で行った。HImage ソフトウェア（Hamamatsu Photonics）を使用して 10 fps で蛍光像を取得

した。なお、4.4.4節の実験では、科学用デジタルCCDカメラ（ORCA-Flash4.0 V3, Hamamatsu Photonics）を用い、20 fpsで蛍光イメージングを実行した。

### 4.2.4 単一神経細胞への選択的刺激のための2本針電極の作製

タングステン線 (W-461337, Nilaco)を 100 mM NaOH で電解研磨し、刺激電極を作製した。2本のタングステン針を、先端部を除いて絶縁ポリマーでコーティングし、マニピュレータに取り付けた。神経刺激に関与する電気伝導領域を測定するため、針電極の光学顕微鏡写真（図 4.1a）を撮影した。この写真より、電極先端部の露出面積を、5000 ~ 50000  $\mu\text{m}^2$ と評価した。これは 250~2500 nF の容量に相当する。これらの2本の針を、標的神経細胞を挟み込むように配置した（図 4.1b）。神経細胞から電極先端部までの距離を 100  $\mu\text{m}$  までの範囲で制御した。この際、電極の高さを基板表面から上方 0.25  $\mu\text{m}$  になるように制御した。双極方形波電圧パルスを、マイクロパターン上で培養された神経細胞に印加するため、DDS 関数発生器（FY6600, Kuman）を用いた。なお、各実験で用いた電圧パルスの振幅および周期は、各図のキャプションに記されている。

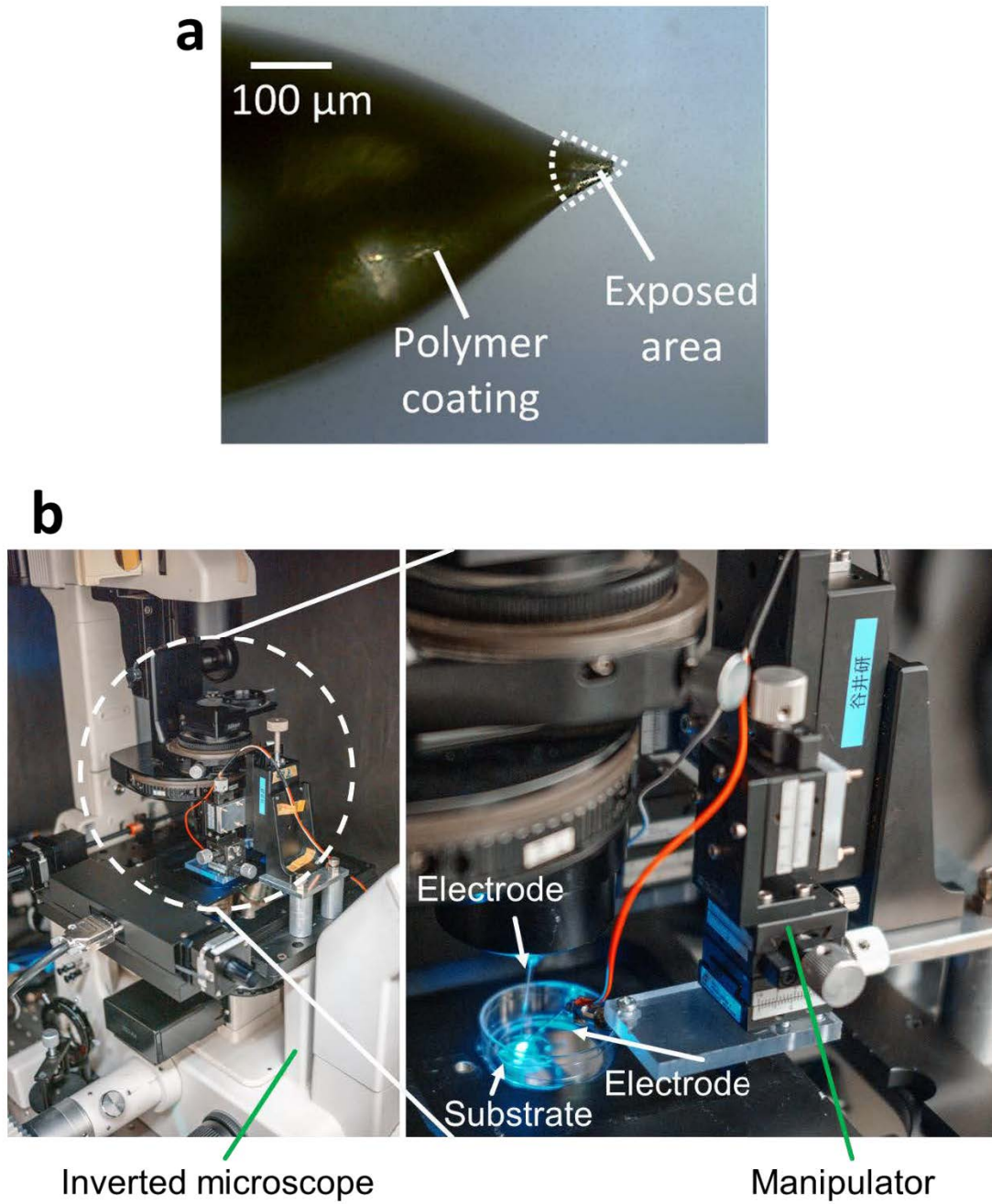


図 4.1 2本針電極刺激のセットアップ。(a) 針電極先端の光学顕微鏡像。(b) 2本針電極で標的神経細胞を照準している様子。図 4.1aは CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>48</sup>より引用した。

### 4.3 シミュレーション方法

#### 4.3.1 LTspice シミュレータを用いた積分発火型2コンパートメント等価回路モデルの構築

しきい値以下における神経細胞の膜電位変化を、LTspice ソフトウェア<sup>32</sup>を用いて解析した。電気二重層と溶液抵抗を介して2本針電極のそれぞれに電氣的に接続された単一神経細胞の等価回路モデルとして Integrate-and-Fire 神経細胞モデルを用いた。モデル化における重要な点は、神経細胞を2つの部位（コンパートメント）に分割することである。各部位は、2つの針電極のいずれかで刺激される。電気刺激により、2つの部位のいずれかの膜電位が閾値電位を超えると、神経細胞が発火すると予測した。特に明記しない限り、シミュレーションでは表4.1のパラメータを使用した<sup>33-35</sup>。イオン電流の流れを考慮するため、針電極界面の電気二重層によって生じる疑似キャパシタンスがパラメータに含まれている<sup>36</sup>。

なお、パラメータの妥当性を担保するための実験を別途実行した。4.2.3項の手順で作製した2本針電極を細胞実験で使用するものと同じ緩衝溶液に浸し、細胞実験と同じ電圧パルスを印加して電流計測を行った。その結果、図4.2に示すように、シミュレーションと実験から得られた電極間の電流値、電流の時定数は同じオーダーを示した。このことは、シミュレーションに用いたパラメータ（表4.1）が、実際の細胞実験と同じオーダーであったことを示している。

表 4.1 シミュレーションで用いたパラメータ.

Name	Value & unit	Description
$R_1$ and $R_2$	400 M $\Omega$	Membrane resistance
$R_3$	10 m $\Omega$	Cytoplasmic resistance
$R_4$	20 $\Omega$	Solution resistance
$R_5$ and $R_6$	50 $\Omega$	Solution resistance
$R_7$ and $R_8$	50 k $\Omega$	Interfacial resistance
$C_1$ and $C_2$	6 pF	Membrane capacitance
$C_3$ and $C_4$	500 nF	Electric double layer capacitance
$E_L$	-70 mV	Reversal potential

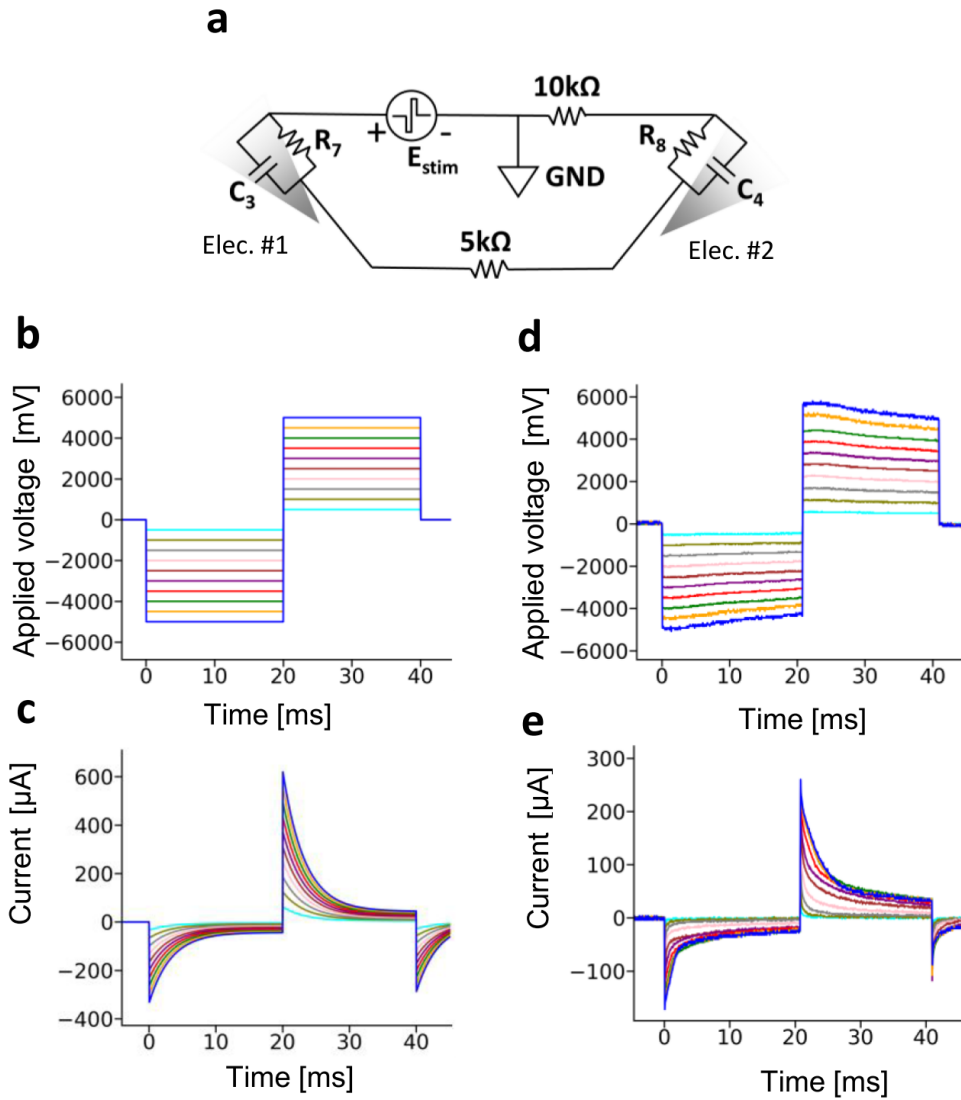


図 4.2 2本針電極の電流-電圧特性. (a) LTspice シミュレーションで使用した回路モデル. (b) LTspice シミュレーションで2本針電極に適用した電圧. 振幅は  $1 V_{p-p}$  から  $10 V_{p-p}$  の範囲で変化させた. (c) LTspice シミュレーションによって計算された溶液抵抗を通る電流. (d) 電極間距離が  $100 \mu m$  の HBS 溶液に浸した2本針電極に適用した電圧. (e) HBS 溶液を通る電流. 図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>49</sup>より引用した.

### 4.3.2 Hodgkin-Huxley 型 2 コンパートメントモデルの構築

しきい値を超える電気刺激が入力された際の膜電位変化を、2 コンパートメント Hodgkin-Huxley モデルを用いて解析した<sup>37</sup>。各部位の膜電位 $V_{m1}$ および $V_{m2}$ の時間発展は以下の微分方程式で表される。

$$V_{mx} = V_{mx,intra} - V_{mx,extra} \quad (x = 1, 2) \quad (4.1)$$

$$C \frac{dV_{m1, intra}}{dt} = -I_{Na}(V_1) - I_K(V_1) - I_L(V_1) - R_{link}(V_{m1, intra} - V_{m2, intra}) \quad (4.2)$$

$$C \frac{dV_{m2, intra}}{dt} = -I_{Na}(V_2) - I_K(V_2) - I_L(V_2) - R_{link}(V_{m2, intra} - V_{m1, intra}) \quad (4.3)$$

ここで、細胞外電位 $V_{m1,extra}$ および $V_{m2,extra}$ は、LTspice シミュレーションの結果に応じて変化する。 $I_{Na}$ ,  $I_K$ および $I_L$ は、それぞれ電圧依存性 Na 電流、電圧依存性 K 電流およびリーク電流である。2つのコンパートメントは、細胞質抵抗 $R_{link} = R_3 g_L / R_1 \approx 100 \Omega / \text{cm}^2$ を介して接続されている。定数 $C = 1 \mu\text{F} / \text{cm}^2$ は膜容量である。チャンネル電流 $I_{Na}$ ,  $I_K$ ,  $I_L$ は、以下の式に従う膜電位ダイナミクスを示す。

$$I_{Na} = g_{Na} m^3 h (V_{mx} - E_{Na}) \quad (x = 1, 2) \quad (4.4)$$

$$I_K = g_K n^4 (V_{mx} - E_K) \quad (x = 1, 2) \quad (4.5)$$

$$I_L = g_L (V_{mx} - E_L) \quad (x = 1, 2) \quad (4.6)$$

ゲート変数 $m, h, n$ はイオンチャンネルの開口率を現しており、膜電位に依存する以下の式で表される。

$$\frac{dy}{dt} = \alpha_y(V_{mx})(1 - y) - \beta_y(V_{mx})y \quad (x = 1, 2; y = m, h, n) \quad (4.7)$$

ここで、イオンチャンネルを構成するサブユニットの開閉のダイナミクスを表現する関数 $\alpha_x(V)$ ,  $\beta_x(V)$ は以下の式に従う。

$$a_m(V) = \frac{0.1(V + 40)}{\left[1 - \exp\left(-\frac{V + 40}{10}\right)\right]} \quad (4.8)$$

$$b_m(V) = 4 \exp\left(-\frac{V + 65}{18}\right) \quad (4.9)$$

$$a_h(V) = 0.07 \exp\left(-\frac{V + 65}{20}\right) \quad (4.10)$$

$$b_h(V) = \frac{1}{\left[1 + \exp\left(-\frac{V + 35}{10}\right)\right]} \quad (4.11)$$

$$a_n(V) = \frac{0.1(V + 55)}{\left[1 - \exp\left(-\frac{V + 55}{10}\right)\right]} \quad (4.12)$$

$$b_n(V) = 0.125 \exp\left(-\frac{V + 65}{80}\right) \quad (4.13)$$

ここで,  $g_{Na}, g_K, g_L$  はそれぞれ最大 Na コンダクタンス, 最大 K コンダクタンス, 最大リークコンダクタンスを示し, その値は  $56 \text{ mS/cm}^2$ ,  $5 \text{ mS/cm}^2$ ,  $0.0205 \text{ mS/cm}^2$  であると仮定した.  $E_{Na}, E_K$ , および  $E_L$  は Na チャネル, K チャネル, およびリークチャネルの反転電位であり, その値は  $-50 \text{ mV}$ ,  $-90 \text{ mV}$ ,  $-70.3 \text{ mV}$  であると仮定した. 上記の式は大脳皮質ニューロンのイオンチャネルダイナミクスを表している<sup>38</sup>. 電気刺激は, シミュレーション開始から  $500 \text{ ms}$  経過した際に, 各部位の細胞外電位を  $10 \text{ mV}$  から  $60 \text{ mV}$  脱分極または過分極させることで再現された. これは, 刺激パルスが入力される際に膜電位の過渡変化が細胞内膜電位ではなく細胞外膜電位の変化に強く依存することに基づいている. 上記の手順を式 (4.2) および (4.3) に取り入れることで膜電位  $V_{m1}$  および  $V_{m2}$  の時間発展を計算した.



## 4.4 結果および考察

### 4.4.1 2本針電極による標的細胞への選択的刺激

最初に、2つの針電極を用いた神経刺激の実現可能性を調査した。図 4.3 に示すように、オータプスを持つ孤立した単一神経細胞を2本針電極で電氣的に刺激した。蛍光 Ca 指示薬を用いて、神経細胞の刺激応答を確認した。図 4.3b に示すように、 $5 V_{pp}$ 以上の振幅の刺激パルスを印加すると、標的神経細胞からの蛍光が刺激ごとにスパイク状の応答を示した。一般に、神経細胞の発火は細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の一時的な上昇と下降を引き起こす<sup>39</sup>。この時、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の変化の時定数は膜電位変動の時定数よりも長く、細胞外への  $Ca^{2+}$ 排出時には数 s を要する場合もある。したがって、図 4.3b に示す蛍光スパイクは、振幅が十分に大きい場合にのみ標的神経細胞が発火したことを反映している（以降の図で示される蛍光スパイクも同様）。図 4.3c は、電極から標的神経細胞までの距離に応じて、神経細胞の発火を誘起する電圧振幅が変化することを示している。この結果から、振幅が約  $5 V_{pp}$ の双極方形波電圧パルスは、2本の針の間に設置された標的神経細胞の発火を誘発する一方で、電極から離れた箇所が存在する他の神経細胞には、発火に至るほどの刺激を与えない可能性が示唆された。

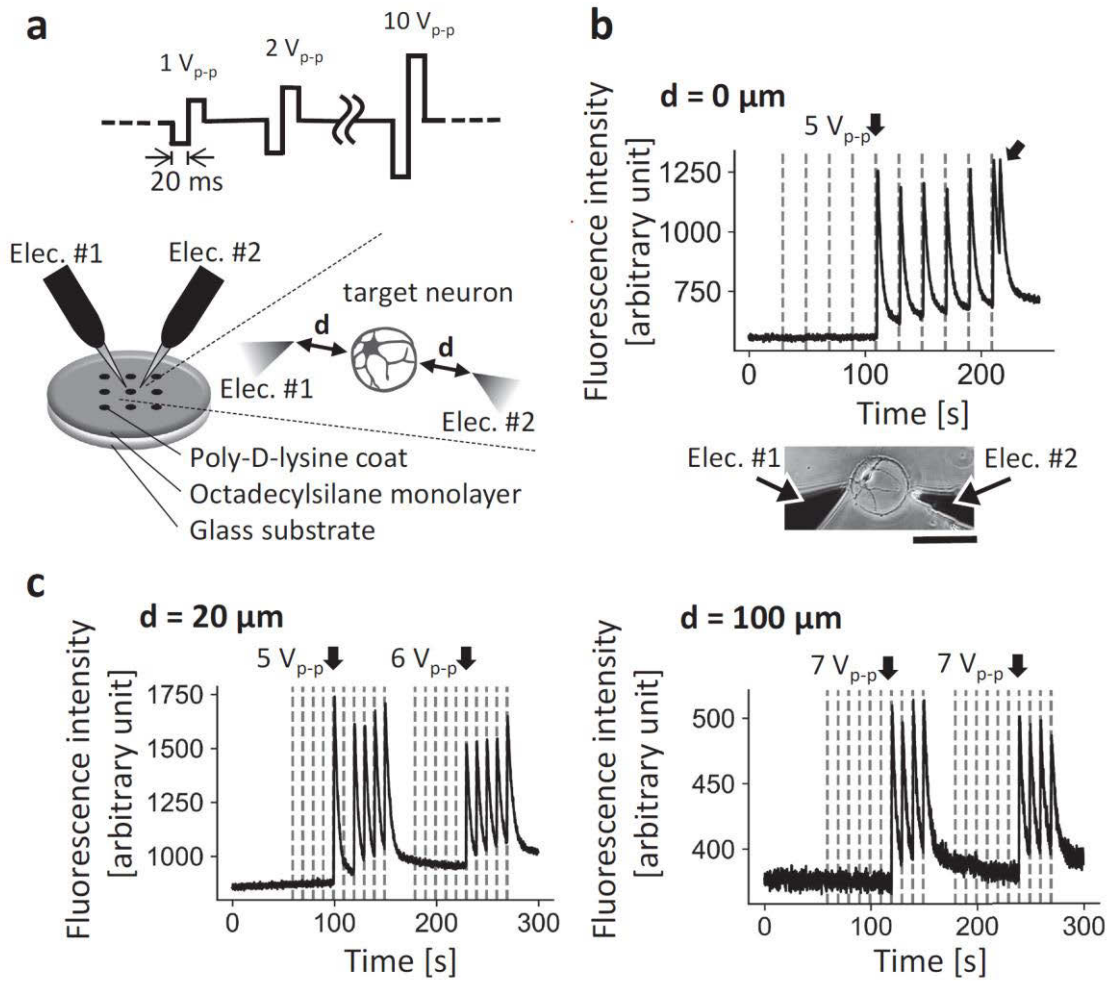


図 4.3 円形マイクロパターン上の孤立した神経細胞への2本針電極を用いた刺激。(a) 標的神経細胞に適用される双極方形波パルスの模式図。双極方形波パルスの振幅をパルス適用のたびに  $1\text{ V}_{\text{p-p}}$  から  $10\text{ V}_{\text{p-p}}$  まで  $1\text{ V}$  ずつ増加させた。パルスの立ち上がりおよび立ち下がり時間はどちらも  $40\text{ ms}$  である。マイクロパターン加工を施したガラス基板に対する針電極の空間配置、および、電極と標的神経細胞との距離  $d$  も図示されている。(b) 標的神経細胞のカルシウムイメージングにより得られた蛍光強度。神経細胞と針電極の配置を挿入図に示す(スケールバー,  $100\text{ }\mu\text{m}$ )。点線は、双極方形波パルスが針電極に適用された時間を示す。ニューロンは、 $5\text{ V}_{\text{p-p}}$  以上の双極方形波パルスが適用されたときに発火する。黒い斜め矢印で示される最後のスパイクは、自発発火を示す。(c) 距離  $d = 20\text{ }\mu\text{m}$ 、および、 $100\text{ }\mu\text{m}$  での電圧刺激。針電極と神経細胞との距離が長い場合、標的神経細胞が発火するためにはより大きな電圧振幅が必要となる。図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>49</sup>より引用した。

次に刺激の選択性を調査した (図 4.4) . 円形マイクロパターン上には, 孤立培養した神経細胞が接着している. 2本針電極の間には標的となる神経細胞のみが配置されている. 円形マイクロパターン外に付着している神経細胞は, 基板表面に非特異的に付着した細胞であり, 培養プロセスを経た後でも神経突起を伸長しない. したがって, 異なる円形マイクロパターン内の神経細胞間では, シナプス結合が形成されず, ある神経細胞から他の神経細胞に信号が伝播することがない. これにより, 電気刺激に対する直接的な神経応答を, カルシウムイメージングによって明らかにすることが可能となる. 標的神経細胞の発火が2本針電極を用いた電気刺激によって誘起された際, 非標的神経細胞は発火応答を示さなかった. この結果より, 非標的神経細胞が標的神経細胞から少なくとも  $300\ \mu\text{m}$  離れていれば, 刺激を選択的に与えられることが判明した. なお, 発火に必要な最低電圧は, 図 4.3 に示したものよりも高い  $8\ \text{V}_{\text{pp}}$  であるが, この違いは主に電極の電気的特性の変動によるものと推測される.

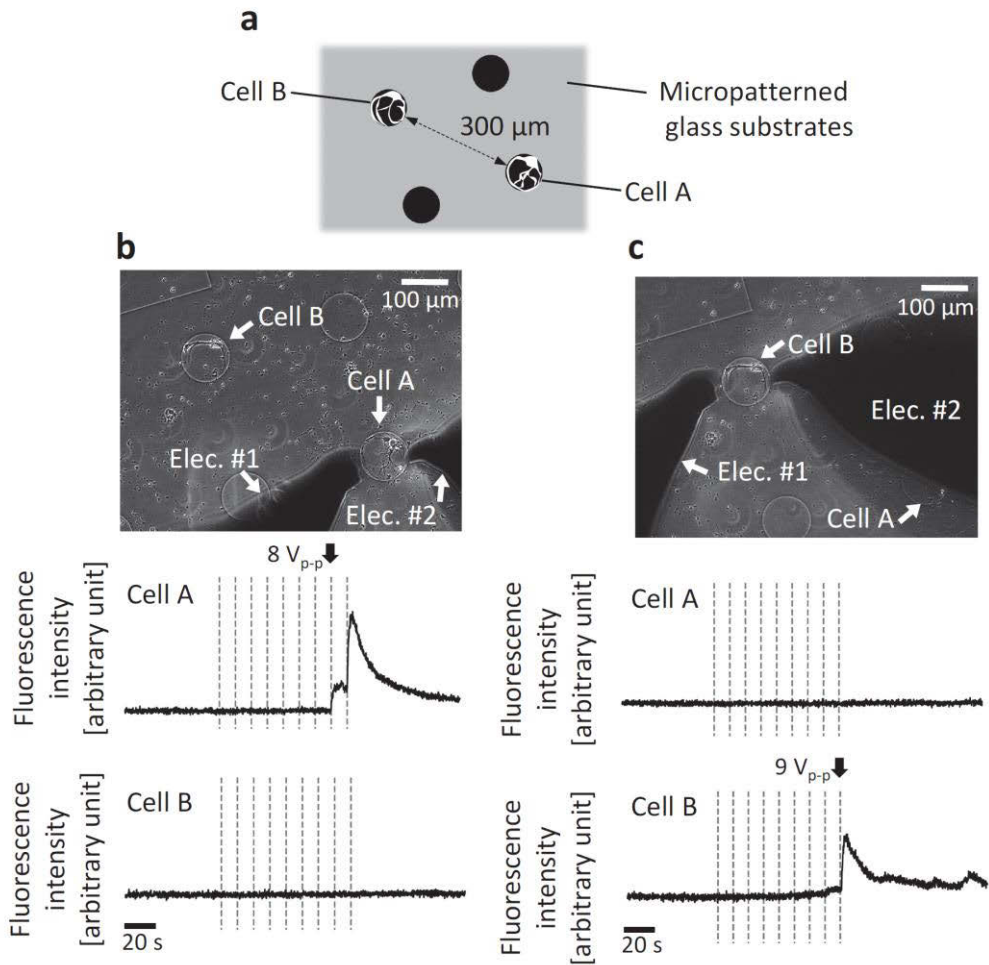


図 4.4 円形マイクロパターン上で孤立培養して成長した神経細胞への選択的刺激。顕微鏡写真では、標的神経細胞が 2 本の針の間に配置されている。標的および非標的神経細胞の蛍光応答も示されている。双極方形波パルスの振幅は、パルスの印加タイミングごとに 1 V<sub>p-p</sub> から 9 V<sub>p-p</sub> まで 1 V ずつ増加させた。標的神経細胞と非標的神経細胞の間の距離は約 300 μm である。(a) マイクロパターン上の細胞の位置の概略図。(b) 8 V<sub>p-p</sub> の双極方形波パルスが適用された際、標的神経細胞 (Cell A) のみが発火した。(c) Cell B を刺激するために 2 本の針を移動し、再び 9 V<sub>p-p</sub> の双極方形波パルスを印加した。その結果、標的神経細胞 (細胞 B) のみが発火した。点線はパルスの印加タイミングを示す。図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>49</sup>より引用した。

#### 4.4.2 2本針電極を用いた神経刺激の電気的メカニズムの解析

計算機シミュレーションを実施し、双極方形波電圧パルスを印加したときの膜電位変化を解析した。図 4.5a は、LTspice によるシミュレーションで使用した回路モデルである。本シミュレーションでは、細胞膜は最も近接した電極の影響を強く受けると推測した。細胞膜のダイナミクスを表現する 2 つの部位を、2 本針電極で刺激する 2 コンパートメントモデルを採用した。2 つの部位は、集中溶液抵抗と、電極近傍の電気二重層を表す抵抗および容量の並列接続とを介して、2 本針電極に電気的に接続されている。2 つの部位のどちらかの膜電位が閾値を超えたときに、神経細胞が発火すると仮定した。図 4.5b では、左側の部位の膜電位  $V_1$  が一過性のアップダウンのパルスとして現れている。同時に、右側の部位では、 $V_2$  の対応する 3 つのパルスが逆方向に現れる。このような過渡的なパルスは、双極方形波パルスの立ち上がり立ち下がりの際にのみ現れる。これは、電流は主に神経細胞の外側を流れ<sup>40</sup>、立ち上がり立ち下がりのエッジでは、細胞外の電流の過渡的な変化が細胞内の電流の過渡的な変化よりも大きくなることで、過渡的な膜電位の変化が誘発されるためである。双極方形波パルスの中央の立ち上がりエッジでは、印加電圧の変化が最も大きくなるため、膜電位の変化も最も大きくなる。図 4.5c では、 $5 V_{pp}$  の双極方形波パルス印加した場合、ピーク電位は  $-2.6 \text{ mV}$  となっている。図 4.5d では、ピーク電位は、 $125 \text{ mV}/\mu\text{s}$  の一定の急峻さのもと、双極方形波パルスの振幅とともに増加している。しかし、ピーク電位は急峻さにも依存する。図 4.5e では、双極方形波パルスの振幅を  $5 V_{pp}$  に維持した場合、ピーク電位は急峻さとともに増加している。この結果から、 $5 V_{pp}$  の電圧パルスで刺激したときに神経細胞が発火するためには、 $50 \text{ mV}/\mu\text{s}$  以上の急峻さを持つ電圧パルスが必要であった。

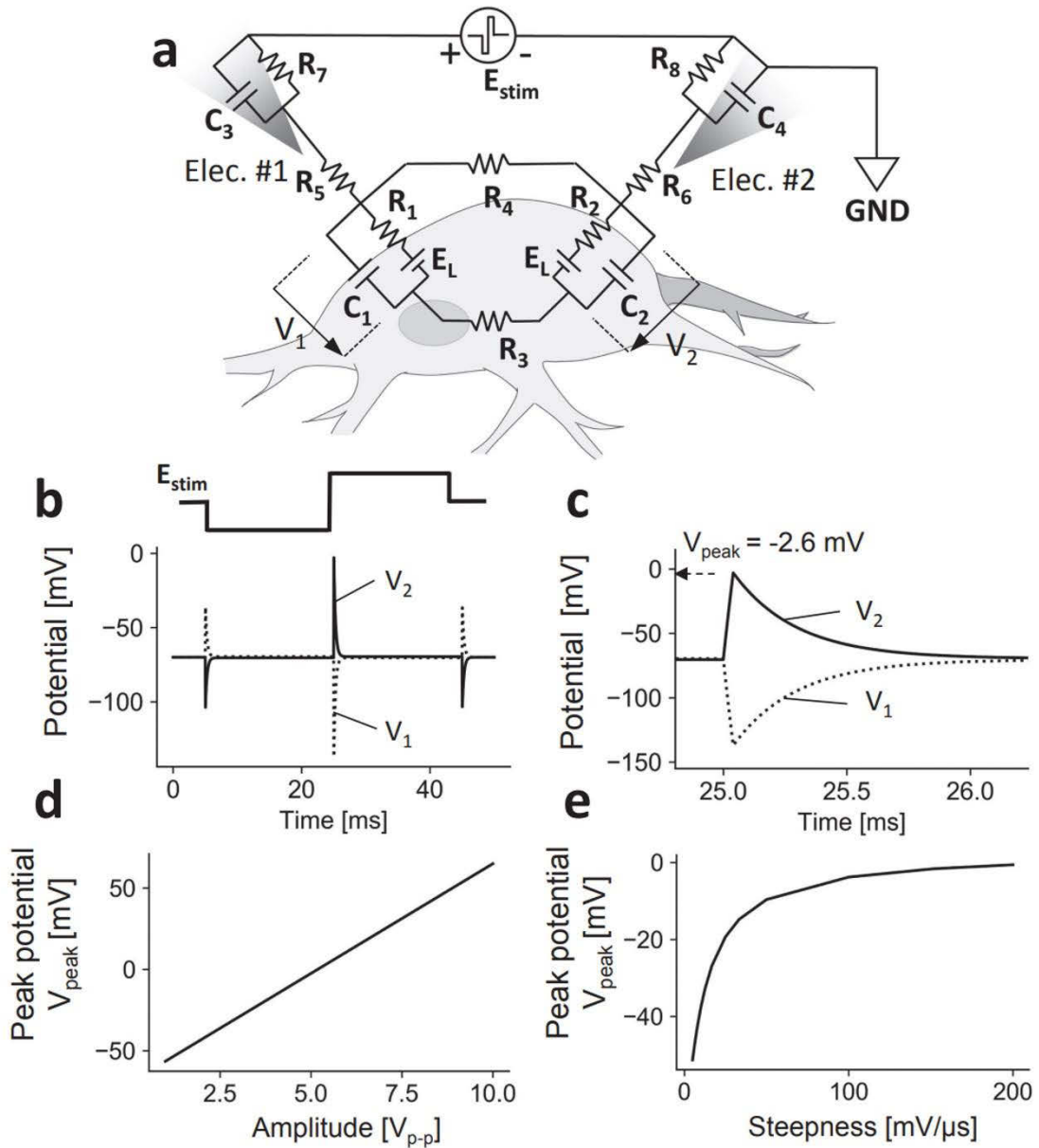


図 4.5 LTspice シミュレーション結果. (a) LTspice シミュレーションで使用する 2 コンパートメントモデル. (b) LTspice シミュレーションから得られた膜電位の時間発展. 刺激パルスの立ち上がり時間と立ち下がり時間は共に  $40 \mu\text{s}$  である. すなわち, 時間に対する電位の傾きは, 最初と最後の立ち下がりエッジでは  $62.5 \text{ mV}/\mu\text{s}$ , 中央の立ち上がりエッジでは  $125 \text{ mV}/\mu\text{s}$  であった. (c) 中央パルス周辺 ( $25.0 \sim 26.0 \text{ ms}$ ) における(b)の膜電位の拡大図. ピーク電位は双極方形波パルスの中央エッジが立ち上がっているときの脱分極成分の最大膜電位として定義される. (d) ピーク電位と双極方形波パルスの振幅との関係. (e) ピーク電位と双極方形波の急峻度との関係. 図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>49</sup>より引用した.

2本針電極刺激によって活動電位が生成されるメカニズムは、Hodgkin-Huxley モデルを用いた膜電位解析によって理解できる。図 4.6a, 6b は、2つの部位を持つ Hodgkin-Huxley モデルで定義された神経細胞に、2本針電極を模した刺激を一度だけ与えた際の膜電位の時間発展を示している。便宜上、2本針状電極による刺激は、2つの部位の細胞外電位を直接変化させることで実現した。図 4.6a は、ピーク電位が  $-40\text{ mV}$  のとき、刺激後に脱分極および過分極した部位の膜電位が、活動電位を発生させることなく静止電位に戻っていることを示している。図 4.6b は、ピーク電位が  $-10\text{ mV}$  のとき、活動電位が生成されることを示している。刺激後に両部位の膜電位は一時的に静止膜電位に戻ろうとするが、Na チャネルが遅れて開き始めることで、脱分極した部位の膜電位が再び上昇し、活動電位の生成を促す。その結果、脱分極した部位から細胞質抵抗  $R_{\text{link}}$  を介して過分極した部位にも電流が流れる。それに伴い過分極した部位にも活動電位が発生し、最終的に両部位の発火に至る。シミュレーションの結果、両部位が活動電位を発生させるために必要な最小ピーク電位は、 $-25\text{ mV}$  と評価された。なお、この Hodgkin-Huxley モデルでは、細胞を2つの部位に均等に分割しているため、2つの部位のパラメータは同じ値を持つ。しかし、実際の神経細胞のイオンチャネル分布は部位ごとに異なる。例えば、軸索小丘が脱分極した部位にのみ含まれていると仮定すると、軸索小丘の電位依存性 Na チャネルの濃度はシミュレーションで用いた濃度よりも高いため、活動電位の発生に必要なピーク電位はシミュレーションで評価した値よりも低くなると想定される<sup>41</sup>。これは、脱分極刺激を与える部位を興奮性の高い部位とすることで、神経発火をより低い刺激強度で誘発できることを示唆する。

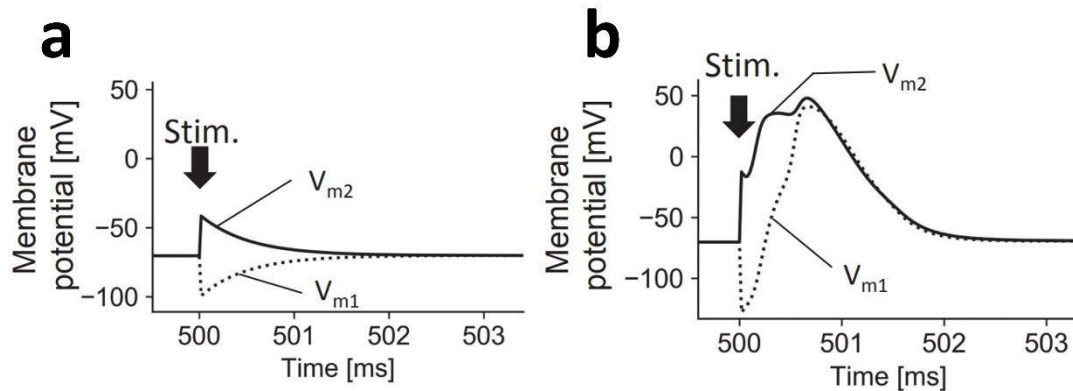


図 4.6 2コンパートメント Hodgkin-Huxley モデルを用いたシミュレーション結果. (a) シミュレーションによって得られた膜電位. 時刻 500 ms で印加した刺激は, 両コンパートメント近傍の細胞外電位を  $\pm 30$  mV 変化させることによって実現される. これはピーク電位が  $-40$  mV となる刺激に相当する. (b) 両部位の細胞外電位を  $\pm 60$  mV 変化させることによって得られた膜電位. これはピーク電位が  $-10$  mV となる刺激に相当する. 図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>49</sup>より引用した.

#### 4.4.3 電極特性が刺激選択性に与える影響

隣接する神経細胞のうち, 片方の細胞のみを刺激するためには, 標的神経細胞を挟み込むように2つの電極を配置する必要がある. 電極特性が刺激選択性に与える影響を調べるため, LTspice シミュレーションモデルの集中パラメータを変更した. 図 4.7a は,  $E_{stim}$  ( $5 V_{pp}$ ,  $125 \text{ mV}/\mu\text{s}$ ) 適用時における, 電極近傍の電気二重層容量 ( $C_3$ および $C_4$ ) とピーク電位の関係を示している. 電気二重層容量の増大に伴いピーク電位も増大することは, 電極表面積が大きいほど, より低い電圧供給によって標的神経細胞を発火させられることを示している. また, 絶縁ポリマーでコーティングされた電極の先端の露出面積を一定に保つことで, 刺激電圧 $E_{stim}$ が一定の下で標的神経細胞を発火させられることも示唆している. 図 4.7b は, 神経細胞と2本針電極の間にある溶液抵抗 ( $R_5$ および $R_6$ ) の大きさを独立して変更した際のピーク電位を示してい



る。溶液抵抗値の大小は神経細胞から電極までの距離の大小に対応している。図 4.7c に示すように、この時のピーク電位の勾配は、溶液抵抗の値が小さくなるほど急になる。これは、両電極を可能な限り標的神経細胞に近づけることで、標的神経細胞のみを刺激して発火させられることを意味する。

LTspice シミュレーションによって刺激の選択性を調査した。図 4.7d に示すように、標的および非標的神経細胞をシミュレーション上に準備した。標的神経細胞 (Cell A) から電極までの距離は 10  $\mu\text{m}$  で固定され、非標的神経細胞 (Cell B) から電極までの距離は 10~100  $\mu\text{m}$  に変更される。これは、500 から 5,000  $\Omega$  の範囲の溶液抵抗に相当する。図 4.7e に示されるように、非標的神経細胞のピーク電位は、細胞・電極間距離が増加することで減少したが、標的神経細胞のピーク電位はほぼ一定であった。結果として、非標的神経細胞は、刺激 (5  $V_{pp}$ , 125  $\text{mV}/\mu\text{s}$ ) によって発火した標的神経細胞から 15  $\mu\text{m}$  以上離れた位置にある場合には発火しなかった。この値は、神経細胞の細胞体の平均直径よりも小さい。そのため、理想的な条件下では、2本針電極による刺激手法は、単一細胞レベルでの刺激選択性を持つ。

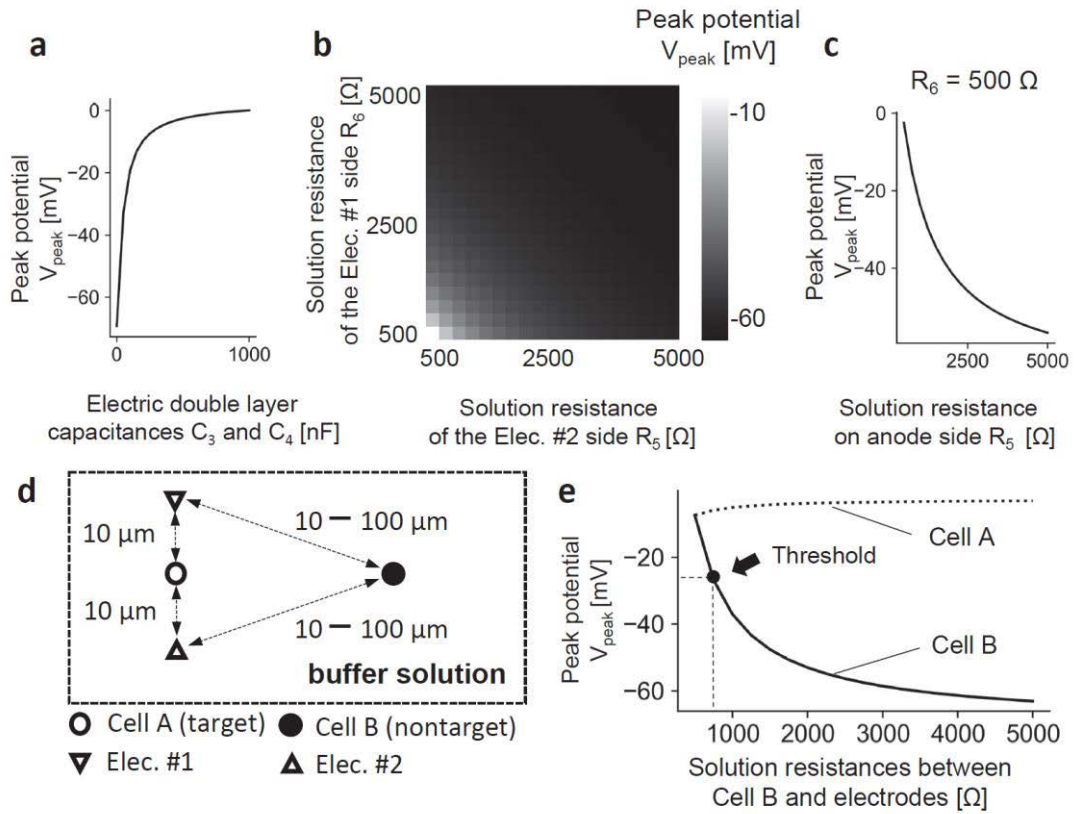


図 4.7 ピーク電位に対する電極特性および細胞-電極間の配置の影響. 結果は LTspice シミュレーションによって得られた. ピーク電位は, 双極方形波パルスが適用された際の最大膜電位を示す. (a)電気二重層容量とピーク電位の依存性. (b)電極と標的細胞の間に存在する溶液抵抗のピーク電位に対する依存性. Elec. #2 側のみの溶液抵抗が変更された際のピーク電位も(c)に示している. (d)刺激選択性を調査するための細胞-電極間の配置関係. (e)細胞-電極間距離とピーク電位の関係. 2コンパートメントモデルからなる2つの細胞は, それぞれ2つの電極と並列に接続している. 細胞 A と電極との距離が 10  $\mu\text{m}$  で固定されている一方で, 細胞 B との距離は 10 から 100  $\mu\text{m}$  に変更される. 溶液抵抗が 50  $\Omega/\mu\text{m}$  の変換比で細胞-電極距離に変換できると仮定している. 図は CC BY 4.0 ライセンスに基づき参考文献<sup>49</sup>より引用した.

#### 4.4.4 刺激に依存した神経活動の変化

2本針電極を用いた刺激による神経活動変調の実行可能性を調査した。シータ波 (4~7 Hz) は、学習や記憶のプロセスに関係していると考えられる脳波である<sup>42-45</sup>。シータリズムを刻む海馬等の神経回路において、外部から信号が入力された際のシータリズムの位相に応じて長期増強や長期抑圧が誘発されることが報告されている。また、約 50 Hz の刺激パルス数本をシータ波と同じ周期で印可するシータバースト刺激が、刺激された神経細胞の長期増強や長期抑圧を誘発することも知られている<sup>4,46-48</sup>。いずれの現象もその詳細な物理的機序は不明であるが、スパイクタイミング依存性可塑性 (Spike-Timing-Dependent Plasticity; STDP) とシータ波帯の神経活動との協調によって、活動状態が変化していると考えられている。これは、オータプスを持つ単一神経細胞においても、シータバースト刺激によってオータプス強度が変化することを示唆する。

オータプスを持つ単一神経細胞回路をシータバースト波で刺激し、刺激前後での自発発火頻度を比較することで、刺激による神経活動の変化を評価した。標的神経回路に対して図 4.8a に示す単極性のシータバースト刺激を 1 min 与えた。その後の自発活動を 8 min 計測することで、刺激後の自発発火頻度を取得した。ここでは、前節までの理論解析によって、印加電圧の正負よりも電圧変化の急峻さが刺激強度に寄与することが示されているため、より単純な単極性の刺激パルスを採用している。刺激時の一連の計測フローは図 4.8b に示されている。カルシウムイメージングによる計測は、長期の神経活動計測には適さないため、刺激を与えず自発活動のみを計測する試行を別途設け、刺激前の自発発火頻度の取得に用いた。

平均自発発火頻度は、表 4.2 に示されるように、オータプスを持つ単一神経細胞回路をシータバースト波で刺激することで変化した。各電圧値における平均自発発火頻

度のデータ群の間で t 検定を行うことで、以下の結果が得られた：① 0.0 V（自発活動のみ）のデータ群と 2.0 V のデータ群での検定では、 $p=0.048$  となり、優位水準 0.05 を下回った。② 1.0 V のデータ群と 2.0 V のデータ群での検定では、 $p=0.040$  となり、優位水準 0.05 を下回った。③ 0.0 V（自発活動のみ）のデータ群と、0.5 V あるいは 1.0 V のデータ群での検定では、p 値は優位水準 0.05 を上回った。これらの結果は、振幅 2.0 V のシータバースト刺激が、標的神経回路の自発発火頻度を増加させうることを、すなわちシナプス接続の長期可塑性を誘導しうることを意味する。図 4.8c および d に示されるように、標的神経回路は、振幅 1.0 V のバーストパルスの一部に対して蛍光パルスを示す一方で、振幅 2.0 V の全てのバーストパルスに対して蛍光パルスを生成する。蛍光パルスの生成は神経細胞の発火に対応するため、神経細胞の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が、自発発火頻度の変調には必要であると推測される。以上の結果は、2 本針電極を用いた刺激によって、神経活動を変化させられうることを示唆する。

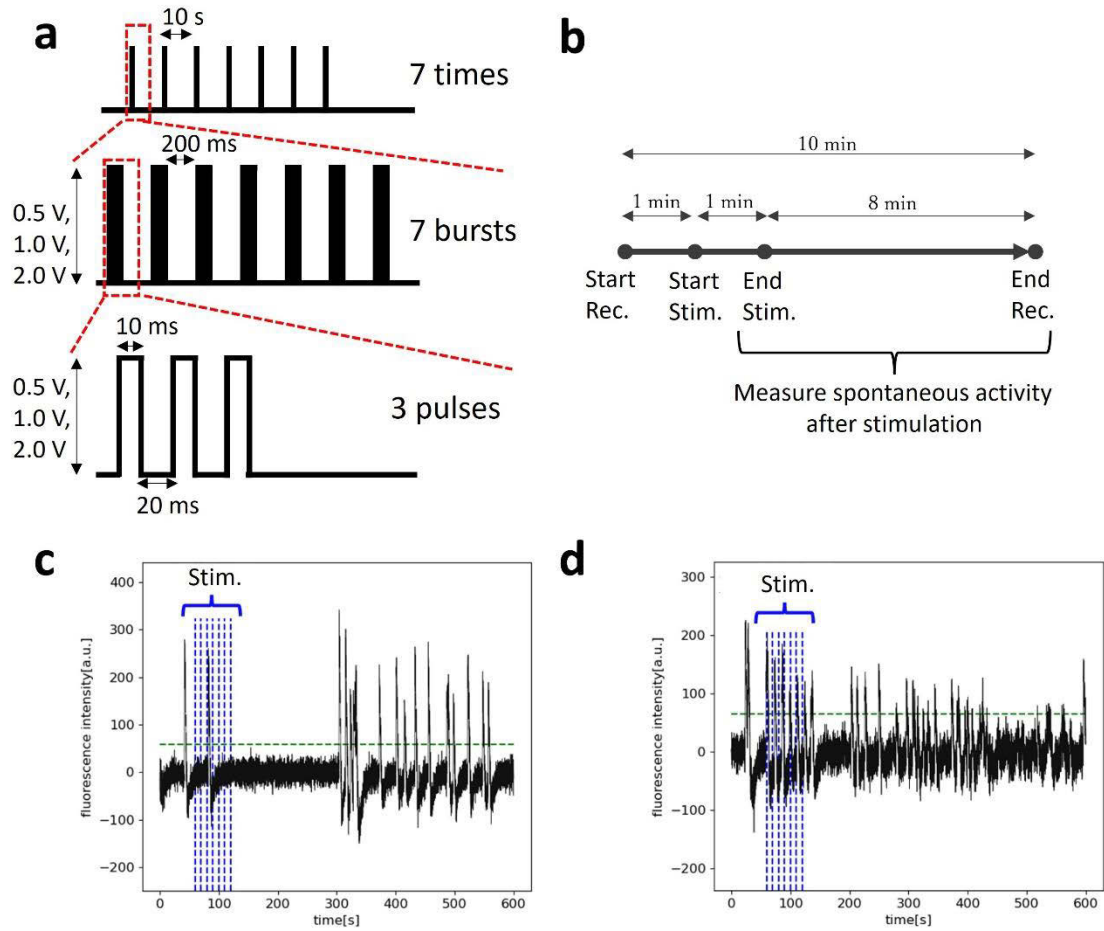


図 4.8 シータバースト刺激による神経細胞回路の活動状態変化. (a) シータバースト波の概略図. 3本の単極性矩形波からなる 20 ms 間隔のバースト刺激を, シータ波帯である 200 ms 間隔で 7 回刺激する過程を一度の刺激とし, 10 s 間隔で 7 回提示した. (b) 刺激入力前後の計測期間. 刺激終了 (End Stim.) から録画終了 (End Rec.) までの期間を刺激後の自発活動データとして用いる. 刺激前の自発活動データは, 刺激を入力しない別の試行結果から取得される. 録画開始 (Start Rec.) から刺激開始 (Start Stim.) までの 1 min で取得されるデータは評価外とする. (c-d) 刺激による蛍光強度変化の例. (c), (d)は電圧振幅をそれぞれ 1.0 V と 2.0 V に設定した場合の結果を示す.

表 4.2: シータバースト波の振幅と刺激後の平均自発発火頻度の関係

Input voltage	Average firing frequency	Samples
0.0 V	0.48 min <sup>-1</sup>	51
0.5 V	0.36 min <sup>-1</sup>	30
1.0 V	0.36 min <sup>-1</sup>	30
2.0 V	0.73 min <sup>-1</sup>	30

## 4.5 結論

マイクロパターンニング技術を活用し、2本針電極を用いた神経刺激手法の有効性について論じた。2本針電極の空間的配置を変更しつつ、円形マイクロパターン上で孤立培養したオータプスを持つ単一神経細胞回路を刺激することで、単一神経細胞を選択的に刺激できることを示した。さらに、集中定数パラメータからなる神経刺激モデルのシミュレーションを行い、針電極の電気的特性や配置条件によって、刺激の選択性を制御できることを明らかにした。また、刺激前後の自発発火頻度を実験的に計測し、本手法が外部刺激による神経細胞回路の内部状態の可塑的な変化を調査するためのツールとして有用であることを示した。なお、本章で扱った実験では、神経活動の可視化にカルシウムイメージングを用いたため、実際に長期計測を実施することはなかった。しかし、原理上この手法は、電位感受性色素、マルチ電極アレイ、固体量子センサといった神経活動を非侵襲的に計測する手法と組み合わせることができ、単一細胞レベルでの神経刺激と長期計測を同時に実現するポテンシャルを持つ。

## 参考文献

1. Bakkum, D. J., Chao, Z. C. & Potter, S. M. Long-Term Activity-Dependent Plasticity of Action Potential Propagation Delay and Amplitude in Cortical Networks. *PLoS ONE* **3**, e2088 (2008).
2. Bakkum, D. J. *et al.* Tracking axonal action potential propagation on a high-density microelectrode array across hundreds of sites. *Nat. Commun.* **4**, 2181 (2013).
3. Froemke, R. C. & Dan, Y. Spike-timing-dependent synaptic modification induced by natural spike trains. *Nature* **416**, 433–438 (2002).
4. Gustafsson, B., Wigstrom, H., Abraham, W. & Huang, Y. Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials. *J. Neurosci.* **7**, 774–780 (1987).
5. London, M., Roth, A., Beeren, L., Häusser, M. & Latham, P. E. Sensitivity to perturbations in vivo implies high noise and suggests rate coding in cortex. *Nature* **466**, 123–127 (2010).
6. Hemberger, M., Shein-Idelson, M., Pammer, L. & Laurent, G. Reliable Sequential Activation of Neural Assemblies by Single Pyramidal Cells in a Three-Layered Cortex. *Neuron* **104**, 353-369.e5 (2019).
7. Bazelot, M., Teleńczuk, M. T. & Miles, R. Single CA3 pyramidal cells trigger sharp waves in vitro by exciting interneurons. *J. Physiol.* **594**, 2565–2577 (2016).
8. Li, C.-Y. T., Poo, M.-M. & Dan, Y. Burst spiking of a single cortical neuron modifies global brain state. *Science* **324**, 643–646 (2009).

9. Neher, E. & Sakmann, B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**, 799–802 (1976).
10. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85–100 (1981).
11. Thomas, C. A., Springer, P. A., Loeb, G. E., Berwald-Netter, Y. & Okun, L. M. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp. Cell Res.* **74**, 61–66 (1972).
12. Deisseroth, K. *et al.* Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J. Neurosci.* **26**, 10380–10386 (2006).
13. Allen, B. D., Singer, A. C. & Boyden, E. S. Principles of designing interpretable optogenetic behavior experiments. *Learn. Mem.* **22**, 232–238 (2015).
14. Ranck, J. B. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Res.* **98**, 417–440 (1975).
15. Tehovnik, E. J. Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses. *J. Neurosci. Methods* **65**, 1–17 (1996).
16. O'Connor, J. J. & O'Neill, C. A Role for Adenosine A1 Receptors in GABA and NMDA-Receptor Mediated Modulation of Dopamine Release: Studies Using Fast Cyclic Voltammetry. *Sensors (Basel)* **8**, 5516–5534 (2008).
17. Min, M. Y., Melyan, Z. & Kullmann, D. M. Synaptically released glutamate reduces gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic inhibition in the hippocampus via kainate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9932–9937 (1999).



18. Shillinglaw, J. E., Morrisett, R. A. & Mangieri, R. A. Ethanol Modulates Glutamatergic Transmission and NMDAR-Mediated Synaptic Plasticity in the Agranular Insular Cortex. *Front. Pharmacol.* **9**, 1458 (2018).
19. Judge, S. J. & Hasselmo, M. E. Theta Rhythmic Stimulation of Stratum Lacunosum-Moleculare in Rat Hippocampus Contributes to Associative LTP at a Phase Offset in Stratum Radiatum. *J. Neurophysiol.* **92**, 1615–1624 (2004).
20. Deli, G. *et al.* Comparison of the efficacy of unipolar and bipolar electrode configuration during subthalamic deep brain stimulation. *Parkinsonism Relat. Disord.* **17**, 50–54 (2011).
21. Ramasubbu, R., Lang, S. & Kiss, Z. H. T. Dosing of Electrical Parameters in Deep Brain Stimulation (DBS) for Intractable Depression: A Review of Clinical Studies. *Front. Psychiatry* **9**, 302 (2018).
22. Badstuebner, K., Gimsa, U., Weber, I., Tuchscherer, A. & Gimsa, J. Deep Brain Stimulation of Hemiparkinsonian Rats with Unipolar and Bipolar Electrodes for up to 6 Weeks: Behavioral Testing of Freely Moving Animals. *Parkinson's Disease* **2017**, e5693589 (2017).
23. Neagu, B., Strominger, N. L. & Carpenter, D. O. Use of bipolar parallel electrodes for well-controlled microstimulation in a mouse hippocampal brain slice. *J. Neurosci. Methods* **144**, 153–163 (2005).
24. Toda, K., Iriki, A. & Ichioka, M. Selective stimulation of intrapulpal nerve of rat lower incisor using a bipolar electrode method. *Physiol. Behav.* **26**, 307–311 (1981).

25. Yamamoto, H. *et al.* Differential neurite outgrowth is required for axon specification by cultured hippocampal neurons. *J. Neurochem.* **123**, 904–910 (2012).
26. Kono, S. *et al.* Live-Cell, Label-Free Identification of GABAergic and Non-GABAergic Neurons in Primary Cortical Cultures Using Micropatterned Surface. *PLoS ONE* **11**, e0160987 (2016).
27. Kono, S. *et al.* In situ modification of cell-culture scaffolds by photocatalysis of visible-light-responsive TiO<sub>2</sub> film. *Jpn. J. Appl. Phys.* **57**, 027001 (2018).
28. Yamamoto, H. *et al.* Impact of modular organization on dynamical richness in cortical networks. *Sci. Adv.* **4**, eaau4914 (2018).
29. Hattori, K. *et al.* Contribution of AMPA and NMDA receptors in the spontaneous firing patterns of single neurons in autaptic culture. *Biosystems* **198**, 104278 (2020).
30. Yamamoto, H. *et al.* In-situ guidance of individual neuronal processes by wet femtosecond-laser processing of self-assembled monolayers. *Appl. Phys. Lett.* **99**, 163701 (2011).
31. Yamamoto, H., Hayakawa, T., Netoff, T. I. & Hirano-Iwata, A. A single-cell based hybrid neuronal network configured by integration of cell micropatterning and dynamic patch-clamp. *Appl. Phys. Lett.* **113**, 133703 (2018).
32. Linear Technology, LTspice xvii, [www.linear.com/designtools/software/](http://www.linear.com/designtools/software/) (2018).
33. Spira, M. E. & Hai, A. Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 83–94 (2013).

34. Spruston, N. & Johnston, D. Perforated patch-clamp analysis of the passive membrane properties of three classes of hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **67**, 508–529 (1992).
35. Thurbon, D., Lüscher, H. R., Hofstetter, T. & Redman, S. J. Passive electrical properties of ventral horn neurons in rat spinal cord slices. *J. Neurophysiol.* **79**, 2485–2502 (1998).
36. Srinivasan, S. & Gileadi, E. The potential-sweep method: A theoretical analysis. *Electrochim. Acta* **11**, 321–335 (1966).
37. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500–544 (1952).
38. Pospischil, M. *et al.* Minimal Hodgkin-Huxley type models for different classes of cortical and thalamic neurons. *Biol. Cybern.* **99**, 427–441 (2008).
39. Grienberger, C. & Konnerth, A. Imaging calcium in neurons. *Neuron* **73**, 862–885 (2012).
40. Kasai, I., Kitazumi, Y., Kano, K. & Shirai, O. Electrical cell-to-cell communication using aggregates of model cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 21288–21296 (2020).
41. Kole, M. H. P. *et al.* Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat. Neurosci.* **11**, 178–186 (2008).

42. Alonso, A. & García-Austt, E. Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat. II. Phase relations between unit discharges and theta field potentials. *Exp. Brain Res.* **67**, 502–509 (1987).
43. Nuñez, A., de Andrés, I. & García-Austt, E. Relationships of nucleus reticularis pontis oralis neuronal discharge with sensory and carbachol evoked hippocampal theta rhythm. *Exp. Brain Res.* **87**, 303–308 (1991).
44. Kocsis, B. & Vertes, R. P. Characterization of neurons of the supramammillary nucleus and mammillary body that discharge rhythmically with the hippocampal theta rhythm in the rat. *J. Neurosci.* **14**, 7040–7052 (1994).
45. Terada, S., Sakurai, Y., Nakahara, H. & Fujisawa, S. Temporal and Rate Coding for Discrete Event Sequences in the Hippocampus. *Neuron* **94**, 1248-1262.e4 (2017).
46. Bi, G. & Poo, M. Synaptic Modifications in Cultured Hippocampal Neurons: Dependence on Spike Timing, Synaptic Strength, and Postsynaptic Cell Type. *J. Neurosci.* **18**, 10464–10472 (1998).
47. Dembitskaya, Y., Wu, Y.-W. & Semyanov, A. Tonic GABAA Conductance Favors Spike-Timing-Dependent over Theta-Burst-Induced Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *J. Neurosci.* **40**, 4266–4276 (2020).
48. Capocchi, G., Zampolini, M. & Larson, J. Theta burst stimulation is optimal for induction of LTP at both apical and basal dendritic synapses on hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* **591**, 332–336 (1992).

49. Hattori, K. *et al.* Selective Stimulation of a Target Neuron in Micropatterned Neuronal Circuits Using a Pair of Needle Electrodes. *Electrochemistry* **89**, 348–354 (2021).

## 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

### 5.1 背景および目的

神経接続は情報処理の観点から物理的接続と論理的接続とに分類できる。このとき、軸索と樹状突起の間のシナプスが2つの神経細胞の間の物理的接続とみなせる。一方、たとえシナプス前細胞の軸索とシナプス後細胞の樹状突起とがシナプスを介して物理的に接続されているように見えても、シナプス荷重が小さい場合には、実効的には神経信号の伝搬は抑圧される。このことを鑑みると、各軸索末端に位置するシナプスは、シナプス受容体ごとに定義される応答特性とシナプス荷重の効果的な調節によって、論理的接続を規定していると思なせる。すなわち、シナプス荷重が弱く調節されると、後シナプスの神経細胞へのスパイク信号の伝播が抑制されるため、物理的接続はあまり重要でなく、無視できる場合もある。したがって、神経接続はシナプス荷重の調節に従って選択される（刈り込まれる）と推測できる。

シナプス荷重の調節は神経可塑性によって行われる<sup>1,2</sup>。これは神経接続選択のルールが可塑性の種類に依存することを示唆している。これまでに、さまざまな種類の可塑性が見つかり、対応する数学的モデルが提案されている<sup>3-5</sup>。神経可塑性による論理的接続の調節は、生物が環境変化に適応し、生存するための結果として生じた可能性がある。そのため、回路構造が規定された神経細胞回路において、神経可塑性がシナプス荷重をどのように調節するかを理解することは重要である。しかしながら、ネットワーク内のすべてのシナプスの荷重を実験的に監視することは実質的に不可能である。そこで、特定の構造を持つ神経回路をシミュレートし、回路内のすべてのシナプス荷重をモニタリングして、神経可塑性を理論的に解析することを試みる。

## 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

スパイクタイミング依存性可塑性 (Spike-timing-dependent plasticity; STDP) はシナプス結合の強さを動的に増強あるいは抑圧する可塑性である<sup>6,7</sup>。STDP を有するシナプスは、シナプス前細胞の発火後に後細胞が発火した場合にその結合を増強し、逆に、シナプス後細胞の発火後に前細胞が発火した場合にその結合を抑圧する。これは、2つの細胞の発火に因果関係がある可能性の高い場合に、その結合が強化されることを意味する。仮に2つの細胞の軸索がそれぞれ相手側の樹状突起とシナプスを形成した場合、STDPによって片方のシナプスが増強されると、もう一方のシナプスは発火タイミングのずれが増強の場合の逆値となるため、STDPによって抑圧される。そのため、STDPは神経細胞回路内の接続構造をフィードフォワード型の論理的接続からなる構造へと遷移させうる。しかし、実際には全ての神経細胞回路がフィードフォワード接続で結合されているわけではなく、むしろ、大部分の神経細胞回路にはフィードバック接続が含まれる。これは、神経細胞回路に内在する帰還構造が、STDPが有効な環境でもその構造を保持できるような、何らかのメカニズムを備えていることを暗示している。

オータプスを持つ単一神経細胞モデルは、フィードバック接続を持つ最も単純かつ基本的な神経細胞回路モデルである。オータプス伝搬遅延を帰還ループ部の軸索長に応じた神経信号の伝搬遅延と定義することができる。STDPによるオータプス荷重の変化を直接観測した事例は現時点では存在しないが、オータプスはシナプスの一種であるため、STDPをモデルに組み込むこともできる。この時、STDPは純粹にオータプスにおけるSTDPを直接表現することもあれば、オータプス伝搬遅延が長い場合には、信号が複数細胞を経由して最終的に元の細胞へ戻るときに他細胞と形成されるシナプスでのSTDPを間接的に表現することもある。このように、オータプスを持つ

## 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

単一神経細胞モデルは、複数細胞からなりフィードバック接続の含まれる神経細胞回路の動態を理解するための抽象モデルとして利用できる。

本研究では、オータプスを持つ単一の神経細胞回路を構成し、回路内のオータプス荷重の時間進化をシミュレートした。3章で述べたように、オータプスを持つ神経細胞はさまざまな脳領域に存在している<sup>9</sup>。局所領域への寄与としては一致検出器として働くこと<sup>10-12</sup>が、大域的領域への寄与としては同期活動の強化に寄与すること<sup>13-16</sup>が報告されており、これらはオータプスからのスパイク信号が神経細胞の自発活動に影響を与えることを示唆している。オータプスを持つ単一神経細胞回路の場合、活動電位はオータプスを経由して、活動電位を生成した神経細胞自身に入力される。この再帰的プロセスにおいてオータプス荷重は単一神経細胞の発火タイミングに依存して調節される。したがって、オータプス荷重の時間発展は、カオス的な振る舞いを示すか、あるいは神経接続の選択によって神経細胞回路固有の論理的接続を持つ定常状態に達するかもしれない。

上記に基づいて、オータプス荷重がスパイクタイミング依存性可塑性 (STDP) によって調節されると仮定した<sup>6,7</sup>。さらに、STDP がオータプス荷重をどのように調節するかを理解するためのキーパラメータ<sup>17,18</sup>として、オータプス伝搬遅延をモデルに組み込んだ。選択ルール (刈り込みの機序) を明らかにするために、オータプス培養された単一神経細胞をシミュレートし、オータプス伝搬遅延と STDP に基づくオータプス荷重の時間発展のメカニズムを調べた。



## 5.2 シミュレーション方法

### 5.2.1 STDP オータプスを持つ単一神経細胞の数理モデル構築

Hodgkin-Huxley モデル<sup>19</sup>を用いて、STDP オータプスを有する単一神経細胞をシミュレートした。膜電位の時間発展は以下の微分方程式で表される。

$$C \frac{dV}{dt} = -I_{Na} - I_K - I_L - I_M - I_{aut} + I_{app} \quad (5.1)$$

このモデルは3.3.1節で説明したシミュレーションモデルをベースとしており、異なる点はオータプス電流 $I_{aut}$ および注入電流 $I_{app}$ の定義である。オータプス電流 $I_{aut}$ はAMPA受容体とNMDA受容体によって生成される2種類のシナプス電流から構成され、3章で扱ったシミュレーションモデルと同様にダイナミックシナプスモデルで表現される。

$$\begin{aligned} I_{aut} &= \sum_i I_{aut,i} = \sum_i (I_{AMPA,i} - I_{NMDA,i}) \\ &= \sum_i (w_i g_{AMPA,i} (V - E_{syn}) - w_i g_{NMDA,i} (V - E_{syn})) \end{aligned} \quad (5.2)$$

ここで、 $w_i$ と $E_{syn}$ はそれぞれオータプス荷重とシナプス反転電位を表しており、 $E_{syn} = 0 \text{ mV}$ と仮定した。AMPAオータプスとNMDAオータプスは異なる伝搬遅延を持つ複数のオータプスから構成されており、接尾辞 $i$ は $i$ 番目のオータプスを指す。AMPAコンダクタンス $g_{AMPA}$ およびNMDAコンダクタンス $g_{NMDA}$ はそれぞれ以下の式によって与えられる。

$$g_{AMPA,i} = 4.5 E_{AMPA,i} \times 10^{-2} \quad (5.3)$$

$$g_{NMDA,i} = 7.8 E_{NMDA,i} \times 10^{-3} \times \left( 1 + \frac{[Mg^{2+}] \exp(-0.062V)}{3.57} \right) \quad (5.4)$$

$$\frac{dE_{x,i}}{dt} = \frac{E_{x,i}}{\tau_{\text{inact},x}} + U_{\text{SE},x} R_{x,i} \exp\left(-\frac{t - t_{\text{AP}} - \tau_{\text{delay},i}}{\tau_{\text{rise},x}}\right) \quad (5.5)$$

$$\frac{dR_{x,i}}{dt} = \frac{I_{x,i}}{\tau_{\text{rec},x}} - U_{\text{SE},x} R_{x,i} \exp\left(-\frac{t - t_{\text{AP}} - \tau_{\text{delay},i}}{\tau_{\text{rise},x}}\right) \quad (5.6)$$

$$I_{x,i} = 1 - R_{x,i} - E_{x,i} \quad (x = \text{AMPA, NMDA}) \quad (5.7)$$

ここで、 $t_{\text{AP}}$ は神経細胞の発火タイミングを表し、シミュレーションでは、発火する度に直近の発火時刻へと更新する。AMPA成分として、 $\tau_{\text{rec}} = 200 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{rise}} = 1.1 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{inact}} = 5 \text{ ms}$ を仮定し、NMDA成分として、 $\tau_{\text{rec}} = 200 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{rise}} = 145 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{inact}} = 55 \text{ ms}$ を仮定した。これらの定数は、グルタミン酸受容体のダイナミクスを模倣するために現象学的に定義された値である。 $\tau_{\text{delay},i}$ はオータプス伝搬遅延である。オータプス荷重 $w_i$ はSTDPを表現する以下式に従って更新される。

$$w_i = w_i + \Delta w_i \times 10^{-3} \quad (5.8)$$

$$\Delta w_i = \begin{cases} A_1 \exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau_1}\right) & (\Delta t > 0) \\ -A_2 \exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau_2}\right) & (\Delta t < 0) \end{cases} \quad (5.9)$$

ここで、 $\Delta t$ はシナプス後神経細胞の発火タイミングとシナプス前神経細胞からの入力されるシナプス電流の到達タイミングの時間差を表す。そのため、 $\Delta t$ は正と負の両方の値を取りうる。オータプスの場合、シナプス後神経細胞とシナプス前神経細胞は同じ細胞となる。 $A_1 = 1.0$ ,  $A_2 = 0.5$ ,  $\tau_1 = 1.8 \text{ ms}$ ,  $\tau_2 = 6.0 \text{ ms}$ と仮定した。また、 $w_i$ は0から1までの間の値を取ると仮定した。

注入電流 $I_{\text{app}}$ は他の神経細胞からの電気パルス入力を模倣する以下の式によって定義される。

$$I_{\text{app}} = 10^{-2} \times \left( \exp\left(-\frac{t - t_{\text{input}}}{\tau_{\text{fall}}}\right) - \exp\left(-\frac{t - t_{\text{input}}}{\tau_{\text{rise}}}\right) \right) \times (E_{\text{syn}} - V) \quad (5.10).$$

$\tau_{\text{fall}}=5.3$  ms,  $\tau_{\text{rise}}=0.2$  ms と仮定した. 電気パルスは, 与えられた平均発生頻度でのポアソン過程に従って入力される. 数値計算は, オイラー法を用いて 0.04 ms の時間ステップで実行された.

### 5.3 結果および考察

神経細胞が他の神経細胞からスパイクを受け取ったときに, STDP オータプスの荷重がどのように変化するかを調査した. シミュレーションモデルを図 5.1a に示す. 異なるオータプス伝搬遅延 (1~60 ms) を持つ 60 個のオータプスを持つ単一の神経細胞を設定した. ここで, 遅延時間の長いオータプスは複数細胞を経由したフィードバック接続を抽象化したものとも見なせる. 個々の神経細胞における神経突起長, 活動電位を生成するのに要する時間, 活動電位の伝達速度がそれぞれ 100  $\mu\text{m}$ , 3 ms, 1 m/1 s であると仮定した. そのうえで, 最大で 20 個程度 (大脳皮質のマイクロカラムを構成する細胞数と同程度) の神経細胞を経由したフィードバック接続を想定して選択した. 他の神経細胞からの信号を模倣したパルス列  $I_{\text{app}}$  を 5 s 注入し, オータプス荷重の時間変化をモニタリングした.

図 5.1b は, パルス注入時に STDP オータプスのオータプス荷重がどのように変化するかを示している. 開始点で 0.5 に設定されたオータプス荷重は, パルス注入中に更新される. パルス注入後の各オータプス荷重の最終値は,  $I_{\text{app}}$  の確率的特性により変動する. しかし, 注入されたパルスの平均発生頻度が一定である場合, 特定のオータプス伝搬遅延を伴うオータプスが增強される傾向を示した. この傾向はパルス注入時間が 5 s 以上であっても維持された. 図 5.1b に示すように, 約 10 ms の伝搬遅延

## 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

を有するオータプスのオータプス荷重は、1 kHz のパルス注入によって選択的に増強された。

図 5.1c は、注入パルスの平均発生頻度をパラメータとした最終的なオータプス荷重を示している。シミュレーションは異なるパルス列で 50 回実行され、最終的なシナプスの重みが平均された。最終的なオータプス荷重は、オータプス伝搬遅延に応じて増強と抑圧を繰り返す周期性を示す。すなわち、オータプスは、オータプス伝搬遅延に基づいて刈り込まれる。

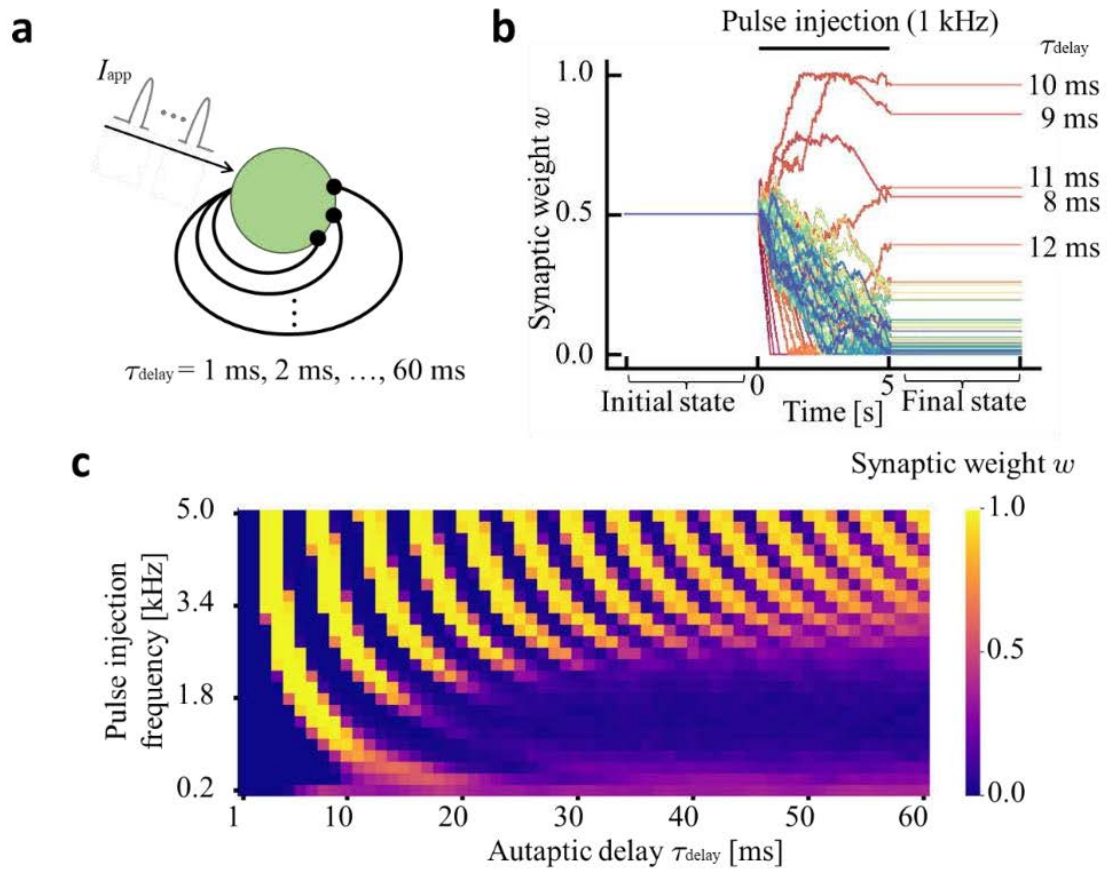


図 5.1 (a) 60 個のオートプスを持つ神経細胞の概略図. それぞれのオートプスの伝播遅延は異なる. 神経細胞が, 平均周波数 1 kHz でランダムに到達する電気パルス入力を受けると仮定した. (b) 電気パルス印加時のオートプス荷重  $w$  の時間発展の例. パルスを 5 s に渡る入力と定義した. 各線は, パルス入力時のオートプス荷重の時間発展をオートプス遅延ごとに示したものである. (c) 最終的なオートプス荷重に対するパルス入力周波数とオートプス遅延の影響. 縞模様は, STDP オータプスが, 伝搬遅延に応じて増強または抑圧されることを示している.

図 5.2a は、スパイク間隔 (Inter-Spike Interval; ISI) とパルス注入周波数の関係を示している。ISI は神経細胞が受けるパルス注入 (外部刺激) の頻度を間接的に表現する指標であり、パルス注入やオータプス入力によって生じる複数の活動電位の発生間隔を平均することで算出される。ISI とパルス注入周波数とは反比例の関係にあり、高周波パルス注入時の ISI が短いことは、神経細胞への高頻度刺激が高頻度の発火を引き起こすことを示している。なお、神経細胞の不応期が活動電位を生成できる間隔を制限するため、ISI が 0 ms になることはない。図 5.2b に示すように、ISI は時間軸上のオータプス遅延と直接比較できるため、以降の解析では注入パルスの平均発生頻度ではなく ISI を用いることとする。

パルス注入ごとにシナプスの重みが更新され、増強されるか抑圧されるかを決定するのは STDP 曲線である。図 5.2b に示すように、フィードバックシナプス電流  $I_{\text{syn}}$  は、最初のスパイク生成後にオータプス遅延  $\tau_{\text{delay}}$  を伴って到着し、膜電位を脱分極させる。この時、 $\Delta t_p$  は  $I_{\text{syn}}$  の到着時刻から 2 番目のスパイクまでの期間として定義される。同時に、 $\Delta t_d$  は、2 番目のスパイクから次の  $I_{\text{syn}}$  の到着時間までの期間として定義される。つまり、 $\text{ISI} > \tau_{\text{delay}}$  の場合、 $\tau_{\text{delay}}$  に相当する。図 5.2c に示すように、STDP 関数を用いて、増強成分  $\Delta w(\Delta t_p)$  および抑圧成分  $\Delta w(\Delta t_d)$  を評価した。オータプスによる再帰的なスパイク生成が続く間は、STDP による増強と抑圧とが競合する。そのため、オータプス荷重の時間発展は増強成分と抑圧成分のバランスである  $W_{\text{pd}} = \Delta w(\Delta t_p) + \Delta w(\Delta t_d)$  に委ねられる。

図 5.1c に示すように、高周波領域ではオータプス選択の周期性が明確となり、半数ほどのオータプスの論理的接続が強化された状態で存続する。これは、パルス注入周波数が増加するにつれて ISI の変動が減少し、時間ステップごとの  $W_{\text{pd}}$  も一定値に漸近するためである。対照的に、低周波数では STDP 曲線の増強と抑圧における非対称な

## 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

特性によって、抑圧が支配的になる。オートプスが外部信号に対する反応性を強化できること（3章・図 3.6）も踏まえると、STDP オータプスは高周波信号入力に対する反応性を選択的に強化していると考えられる。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 オータプスにおける刈り込みは、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として機能していると考えられることができる。

本章にて扱った数理モデルを複数細胞からなりかつフィードバック接続を含む神経細胞回路の動態を理解するための抽象モデルとして捉える。この場合、図 5.1c において周期的なオートプスの刈り込みが生じたことは、複数細胞を経由して元の細胞に到達するフィードバック接続が、正味のフィードバック遅延時間に応じて、増強あるいは抑圧されることに対応する（図 5.3）。仮に、複数細胞を経由したフィードバック遅延時間が複数の値に分布していた場合、神経細胞回路におけるシナプス荷重は、発火頻度に応じて調節されるものの、増強および抑圧される接続を共に一定以上の数維持できることになる。このような発火頻度のフィードバック遅延の協調が、神経細胞回路内におけるフィードバック構造の維持に寄与している可能性がある。

なお、本シミュレーションで扱ったモデルは、Hodgkin-Huxley モデルをベースとしており、複数のオートプス電流が一つの Hodgkin-Huxley モデルの入力として統合されうるため、非線形性を持つ。しかし、オートプスの増強と抑圧を決定する  $W_{pd}$  は、各オートプスにおいて固定値となる伝搬遅延と、おおよそ固定値となる ISI（図 5.2a）とに依存する。したがって、図 5.1c にて示したオートプスの刈り込みの結果は、モデルに組み込んだオートプスの本数によらない普遍的な結果として得られると想定される。

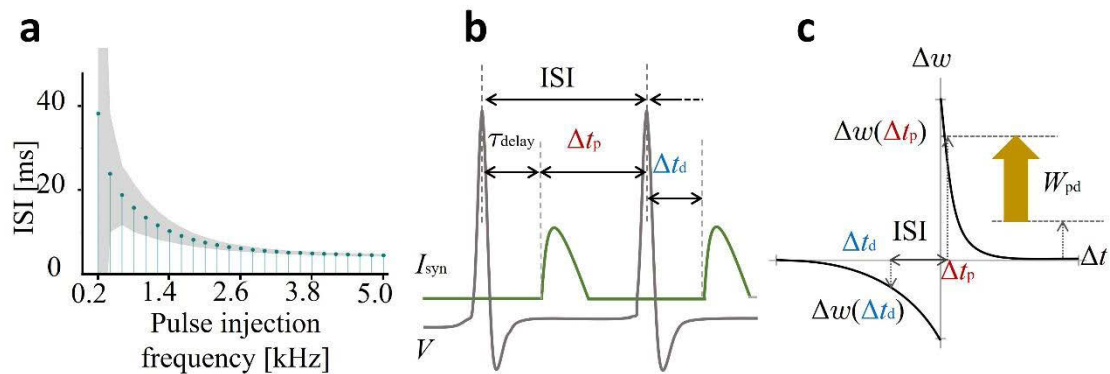


図 5.2 (a)60 個のオータプスを持つ単一神経細胞における平均パルス注入周波数と平均 ISI の関係。ロリポップチャートの影の領域は標準偏差を示す。(b)与えられた ISI とオータプス遅延から  $\Delta t_p$  と  $\Delta t_d$  を決定するための図。  $\Delta t_p$  は前のフィードバックシナプス電流  $I_{syn}$  の到着時間から後続スパイク (図中の 2 番目のスパイク) までの期間で定義され、  $\Delta t_d$  はスパイクから後のシナプス電流の到着時間までの期間で定義される。  $\tau_{delay} < ISI$  の場合、  $\Delta t_d$  は  $\tau_{delay}$  と同等であり、  $\Delta t_p$  は  $ISI - \tau_{delay}$  と同等であることが図示されている。  $\tau_{delay} > ISI$  の場合、  $\Delta t_d$  と  $\Delta t_p$  はその値に応じて決定される。オータプスの増強と抑圧は、図 5.2c で示される STDP 曲線によって推定することができる。スパイクのタイミングごとに、オータプス荷重が  $\Delta w(\Delta t_p)$  と  $\Delta w(\Delta t_d)$  のバランスに従って更新される。  $\Delta w(\Delta t_p) > \Delta w(\Delta t_d)$  であれば、オータプス荷重は増強される。それ以外の場合、オータプス荷重は抑圧、あるいは維持される。



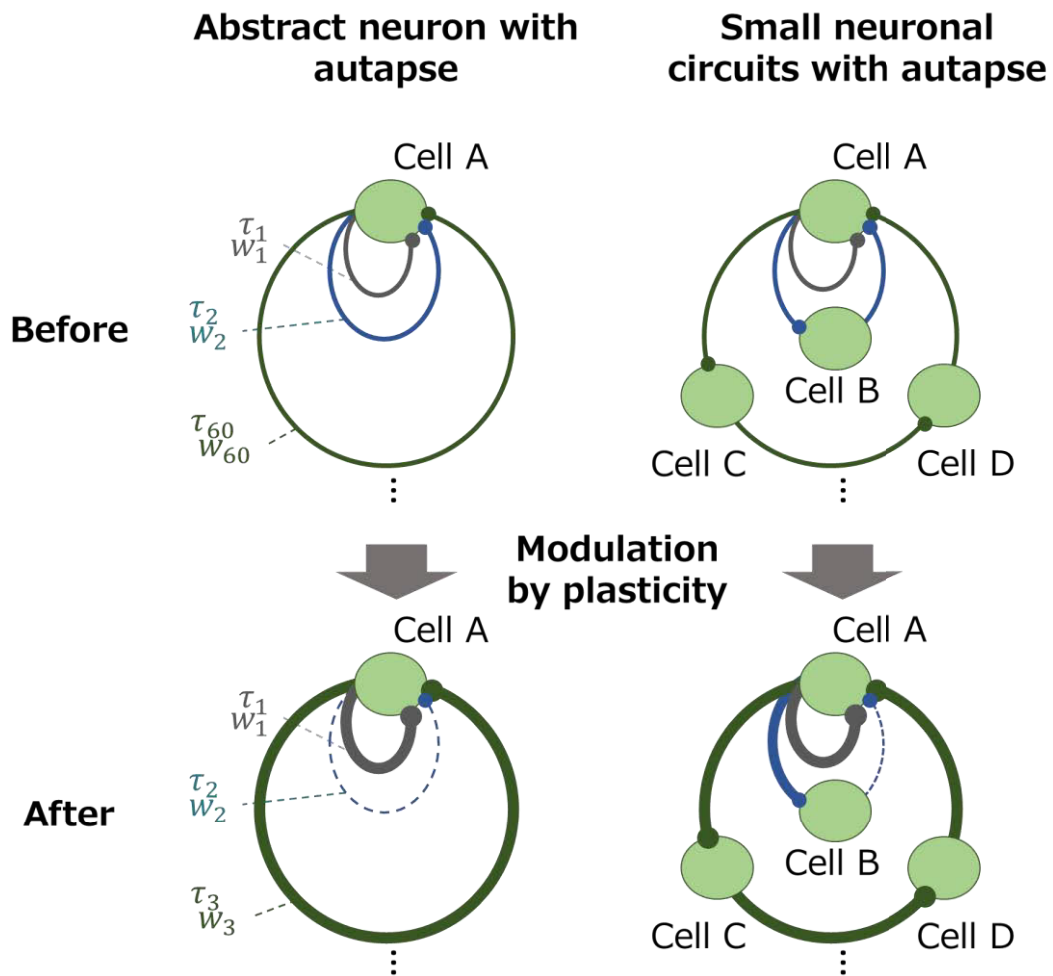


図 5.3 複数のオータプスを持つ単一神経細胞回路（左図）と、複数細胞からなる小規模な神経細胞回路（右図）におけるシナプス可塑性の対比。Cell A に向けたオータプス（あるいは通常のシナプス）の刈り込みの結果は、両方の回路において同じとなりうる。便宜上、Cell A から Cell B に対して形成するシナプスが強化される場合を示している。ただし、Cell B から Cell A に対して形成するシナプスが淘汰される場合、発火タイミングに相関が生じず結果として Cell A から Cell B に対して形成するシナプスが抑圧される場合もあることに注意。

## 5.4 結論

小規模な神経細胞回路にオータプスが内在した場合、その実効的な回路構造はオータプスにおける可塑性によって動的に変化し、異なる機能が生じうると想定される。そこで、オータプスを持つ単一神経細胞が上流の神経細胞群からの信号入力を受けた際にとりうる実効的な回路構造を理解することを目的として、STDP オータプスにおけるオータプス荷重の時間発展のメカニズムを調べた。その結果、単一神経細胞における異なるオータプス伝搬遅延を持つオータプス群は、パルス入力周波数とオータプス伝搬遅延に基づいて増強あるいは抑圧されることが明らかとなった。また、オータプスの刈り込まれ方には以下の特徴があることを見出した。①高周波信号（約 2 kHz 以上）の入力に対する応答には飽和傾向があり、オータプス結合強度の分布は、増強あるいは抑圧されるオータプスが周期的に現れる状態に収束する。②高周波でない信号（約 2 kHz 未満）の入力は、特定のオータプス伝搬遅延を持つ少数個のオータプスを選択的に生存させ、その他のオータプスを全て淘汰する傾向をもたらす。本章のシミュレーションで用いたモデルはフィードバック接続の内在する小規模な神経細胞回路の抽象モデルとして捉えることもできる。この観点を踏まえると、①の結果は神経細胞回路内の複数の細胞が過剰に発火した場合に（つまり高周波信号入力を伴う）、淘汰されるシナプスが正味の伝搬遅延時間に応じて必ず生じることを示している。これは、神経細胞回路がその防衛機構として、回路に内在するフィードバック接続とシナプス可塑性の協業によって回路自身の過剰な神経活動を抑制する能力を本質的に備えていることを示唆する。一方、②の結果は、パルス入力周波数に応じて、特定の伝搬遅延を持つオータプスが強化されることを示している。3章で述べたようにオータプスは一致検出器としての機能を果たす。ここで、効率的な信号伝達が可能となる時間窓は、オータプスを持つ単一神経細胞がフィードバック電流によって UP 状態にあ

## 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

るタイミングと、上流の神経細胞から提供される活動電位が到達したタイミングとが一致する時間窓によって定義されるため、オータプス伝搬遅延によって変化する。言い換えれば、オータプスを持つ単一神経細胞は上流の神経細胞と、オータプス伝搬遅延の長さだけ時間軸上でずれた状態で同期的活動を維持することに寄与する。この許容される時間軸上の同期のずれは、神経細胞回路に内在する複数のオータプスが異なるオータプス伝搬遅延を持つことで多様となる。すなわち、神経細胞回路に内在するオータプスは、非同期状態と過剰な同期状態との間に位置する豊かな発火パターンの維持に寄与している可能性がある。

## 参考文献

1. Hebb, D. O. *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. (Wiley, 1949).
2. Bi, G. & Poo, M. Synaptic Modifications in Cultured Hippocampal Neurons: Dependence on Spike Timing, Synaptic Strength, and Postsynaptic Cell Type. *J. Neurosci.* **18**, 10464–10472 (1998).
3. Kempter, R., Gerstner, W. & van Hemmen, J. L. Hebbian learning and spiking neurons. *Phys. Rev. E* **59**, 4498–4514 (1999).
4. Song, S., Miller, K. D. & Abbott, L. F. Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Nat. Neurosci.* **3**, 919–926 (2000).
5. Tsodyks, M. V. & Markram, H. The neural code between neocortical pyramidal neurons depends on neurotransmitter release probability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 719–723 (1997).
6. Letzkus, J. J., Kampa, B. M. & Stuart, G. J. Learning rules for spike timing-dependent plasticity depend on dendritic synapse location. *J. Neurosci.* **26**, 10420–10429 (2006).
7. Feldman, D. E. The spike-timing dependence of plasticity. *Neuron* **75**, 556–571 (2012).
8. Fukushima, K. Neocognitron: A self-organizing neural network model for a mechanism of pattern recognition unaffected by shift in position. *Biol. Cybernetics* **36**, 193–202 (1980).

9. Van der Loos, H. & Glaser, E. M. Autapses in neocortex cerebri: synapses between a pyramidal cell's axon and its own dendrites. *Brain Res.* **48**, 355–360 (1972).
10. Wang, H., Ma, J., Chen, Y. & Chen, Y. Effect of an autapse on the firing pattern transition in a bursting neuron. *Commun. Nonlinear Sci. Numer. Simul.* **19**, 3242–3254 (2014).
11. Hull, M. J., Soffe, S. R., Willshaw, D. J. & Roberts, A. Modelling Feedback Excitation, Pacemaker Properties and Sensory Switching of Electrically Coupled Brainstem Neurons Controlling Rhythmic Activity. *PLoS Comput. Biol.* **12**, e1004702 (2016).
12. Hattori, K. *et al.* Contribution of AMPA and NMDA receptors in the spontaneous firing patterns of single neurons in autaptic culture. *Biosystems* **198**, 104278 (2020).
13. Sillito, A. M., Jones, H. E., Gerstein, G. L. & West, D. C. Feature-linked synchronization of thalamic relay cell firing induced by feedback from the visual cortex. *Nature* **369**, 479–482 (1994).
14. Yilmaz, E., Baysal, V., Ozer, M. & Perc, M. Autaptic pacemaker mediated propagation of weak rhythmic activity across small-world neuronal networks. *Phys. A: Stat. Mech. Appl.* **444**, 538–546 (2016).
15. Gong, Y., Wang, B. & Xie, H. Spike-timing-dependent plasticity enhanced synchronization transitions induced by autapses in adaptive Newman-Watts neuronal networks. *Biosystems* **150**, 132–137 (2016).

16. Fan, H., Wang, Y., Wang, H., Lai, Y.-C. & Wang, X. Autapses promote synchronization in neuronal networks. *Sci. Rep.* **8**, 580 (2018).
17. Kerr, R. R., Burkitt, A. N., Thomas, D. A., Gilson, M. & Grayden, D. B. Delay Selection by Spike-Timing-Dependent Plasticity in Recurrent Networks of Spiking Neurons Receiving Oscillatory Inputs. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1002897 (2013).
18. Lubenov, E. V. & Siapas, A. G. Decoupling through synchrony in neuronal circuits with propagation delays. *Neuron* **58**, 118–131 (2008).
19. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500–544 (1952).

## 6章 結論

本論文では、オータプスを持つ単一神経細胞の自発発火パターン、単一神経細胞レベルの空間分解能を有する非侵襲刺激手法、オータプスがシナプス可塑性を持つ場合に現れる神経細胞回路の実効的な回路構造変化について論じた。2章では、オータプスを持つ単一神経細胞の発火パターン解析で必用となる神経細胞モデルとシナプスモデルを論じた。シナプス可塑性の影響を考慮する場合は、Hodgkin-Huxley モデルとダイナミックシナプスモデルの組み合わせが有効であり、一方で、細胞外電位が変化する際の膜電位の空間的分布を考慮する場合は、Integrate-and-Fire モデルが有効な選択肢となることを述べた。3章では、オータプスを持つ単一神経細胞の自発発火パターンを理論的および実験的に解析した結果を論じた。AMPA および NMDA オータプスの結合強度のバランスによって3種類の自発発火パターンが現れることを示し、それらの中に神経信号処理においてオータプスが有効に働く発火パターンが含まれることを述べた。4章では、オータプスを持つ単一神経細胞への刺激について論じた。2本針電極を用いた刺激手法とマイクロパターンニング技術とを組み合わせることで、単一細胞レベルの照準精度と刺激の非侵襲性を同時に達成できることを示した。さらに、シータバースト刺激によってオータプスを持つ単一神経細胞の自発発火頻度が増加することを示し、2本針電極を用いた刺激が、小規模な神経細胞回路を刺激した際の活動パターンの変化を解析するうえでの有効な手段となることを述べた。5章では、STDP オータプスにおけるオータプス荷重の時間発展の解析について論じた。オータプスを持つ単一神経細胞回路における特定のオータプスが、パルス入力周波数とオータプス伝搬遅延の組み合わせに応じて、増強あるいは抑圧されることを示した。この結果をもとに、神経細胞回路の活動におけるフィードバック接続（オータプスを含む）の優位性を述べた。

本研究では、その方法論として、細胞パターンニングや2本針電極などの実験的手法と、AMPA/NMDA オータプスや STDP オータプスなどの数理モデルとを組み合わせた。これにより、単一神経細胞回路がオータプスを有することで多様な発火パターンを生成でき、かつ可塑性によって自律的な回路構造の変化を引き起こしうることを示した。これらの結果は、極めて単純化されたノードと多数ノードのフィードフォワード接続を中心とする人工ニューラルネットワークの情報処理戦略とは対照的である。本研究で構築した実験的手法や数理モデルを用いることで、オータプスの含まれる小規模な神経細胞回路の活動を解析し、その特有の機能を明らかにできることが期待される。したがって、将来的な展望としては、次の①から③を想定できる。①オータプスのダイナミクスに基づいたニューラルネットワークのノードへの新機能付与。②数理モデルによる予測に基づいた細胞機能の理解。③ボトムアップアプローチに基づく人工神経回路網の設計。

小規模な神経細胞回路の機能を理解することは、ニューラルネットワークベースのより優れた情報処理モデルの構築に応用できるポテンシャルを持つ。近年、機械学習モデルの一種である大規模言語モデルは、テキストデータ処理、プログラム生成などの特定のタスクにおいて、優れたアウトプットを生物脳よりも高速に生成することを可能とし始めている。一方で、もっともらしく誤ったアウトプットを生成する場合があります（ハルシネーションと呼ばれる）、生物脳に特有の認知処理が再現されているわけではない。大規模言語モデルの優れた性能は、生物1個体では到底処理できない膨大な学習データと豊かな計算資源を用いた事前学習によって達成されている。そのため、集積回路よりも遥かに遅い速度で信号を処理する素子（神経細胞）と20Wほどの限られたエネルギー資源とから高度な情報処理を実現する脳の動作機序を理解することは、依然として大きな意義を持つ。人工ニューロンと生体神経細胞の決定的な違



いは、生体神経細胞のAND演算的な側面（しきい値以上での発火）のみを人工ニューロンモデルが捉えていることである。生体特有の複雑なダイナミクスが含まれる小規模な神経細胞回路が持ちうる機能性を理解することができれば、構成論的アプローチに基づく脳機能の理解に繋がるだけでなく、より効率的な情報処理を可能とする機械学習モデルを構築する際の助けとなりうる。

本論文で述べた、オート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新たな神経刺激手法は、複数細胞からなる神経細胞回路の機能解析で利用できる。ここでは、神経細胞の自発発火と誘起発火の双方を包括的に評価することで、生体神経細胞と人工ニューロンとの間の情報処理のギャップを埋めることが期待できる。本研究は神経科学と計算機科学の交点にあり、両分野における新たな洞察の基礎となる。

## 業績リスト

学術論文

1. K. Hattori, 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, *Electrochemistry* **89**, 348-354 (2021).
2. K. Hattori, 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, *Biosystems* **198**, 104278 (2020).
3. S. Kono, K. Furusawa, A. Kurotobi, K. Hattori, 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, *Jpn. J. Appl. Phys.* **57**, 027001 (2018).

国際学会

1. K. Hattori, 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).
2. K. Hattori, 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).

3. K. Hattori, 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).
4. J. Imai, H. Kurakake, T. Hashimoto, K. Hattori, 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).
5. M. Ishida, K. Hattori, 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).
6. H. Takahashi, K. Sato, S. Oguma, T. Hayakawa, K. Hattori, H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tanii: An experimental study on the spontaneous firing of single isolated autaptic neurons using Micropatterned substrates, The 4th International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development, Sendai, October, (2019).

7. K. Sato, T. Nakane, H. Takahashi, K. Hattori, 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, February, (2019).
8. K. Hattori, 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).
9. K. Hattori, 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).
10. K. Hattori, 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).
11. K. Hattori, 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

1. 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.
2. 石田実穂子, 中西彬, 服部晃平, 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.
3. 阿部雅史, 鈴木芳隆, 片村立太, 金子貴司, 西谷章, 谷井孝至, 服部晃平, 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.
4. 服部晃平, 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.
5. 鞍掛碧流, 服部晃平, 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.
6. 服部晃平, 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.

7. 服部晃平, 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.
8. K. Hattori, 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.
9. 河野翔, 黒飛敦, 服部晃平, 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.
10. 服部晃平, 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.

#### 助成金

1. 日本学術振興会若手研究(20K19925), 日本学術振興会, 2020年-2021年.

## 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)

種類別	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.