

研究終了報告書

「バイオニック情報処理システムの人工再構成」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：山本 英明

1. 研究のねらい

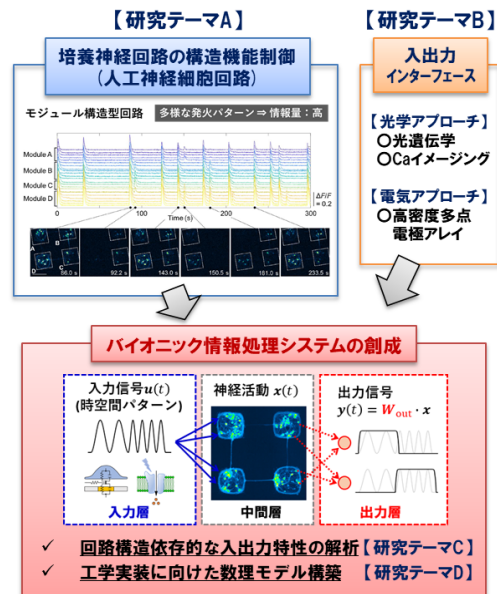
制御部・演算部・記憶部を分けたノイマン型アーキテクチャに基づいて構成された電子計算機と異なり、脳では神経回路自体が演算・記憶・データの機能を一手に担う。従って脳情報処理の本質は、「どの細胞同士が、どの方向に、どのような強度で接続されているか」という回路(ネットワーク)の接続構造に埋め込まれている。そして、脳のような複雑システムにおいて、この回路の接続構造と機能との関係(構造機能相関)を必要十分に明らかにするためには、完成されたシステムを調べ上げるトップダウン的(要素還元論的)研究に加えて、構成要素からシステムを再構成することで理解を深めるボトムアップ的研究が必須となる。しかし、特に回路網レベルの神経科学研究において、後者のアプローチは研究手段の開発が遅れていた。

本研究では、マイクロ加工基板表面に形成した「人工神経細胞回路」(※素子の配置・配線が規定された神経細胞ネットワーク)に対する摂動解析系を構築し、構造機能相関の観点から神経回路網の機能をボトムアップに解析する新しい実験系—バイオニック情報処理システム—を創成する。神経細胞ネットワークがバイオ素子に基づいて高次情報処理を実現するメカニズムを理解し、それを基盤とする情報処理システムを構築することは、脳神経系の基礎理解はもちろん、現在の脳型ハードウェアが直面している電力効率やアーキテクチャの壁などの解決に向けた、生物物理学的なアプローチの創成へと結びつくことが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、4つのテーマから構成される(右図)。研究テーマAでは、生物の脳神経系において進化的に保存されているモジュール構造に焦点をあてながら、神経細胞の培養系において問題となっていたネットワークの過剰な同期発火を抑制し、生物の脳に近い発火パターンを保持する神経回路を再構成するための細胞操作技術の開発を中心に研究を進めた。研究テーマBでは、光応答性イオンチャネルによる刺激と蛍光カルシウムプローブによる活動計測を組み合わせた光インターフェースを構築し、培養神経回路に対する摂動解析系を実現した。研究テーマCでは、研究テーマAとBで確立した技術を統合することにより、人工神経細胞回路の大自由度動的システムとしての特



研究計画の概要

性評価を進めた。モジュール性を制御した 2 種類の神経回路について、複数の空間パターンに対する応答特性のデータが取得できた。現在、時間方向にも構造をもった入力信号に対する性能の評価をするための準備を進めている。さらに研究テーマ D では、研究テーマ A と C の実験を先導する形で、積分発火ニューロンモデルを用いた計算機シミュレーションによる解析を進めた。

(2) 詳細

研究テーマ A「モジュール構造型培養神経回路の人工再構成」

神経細胞を均質なシャーレやカバーガラス上で培養すると、細胞間がランダムに接続したネットワークが形成され、ネットワーク全体が強く同期して活動する。この特徴は構造的にも機能的にも生体神経回路とかけ離れている。そこで、細胞のパターン培養技術を応用して、培養神経回路の接続構造を人工的に制御し、生体神経回路で進化的に保存されているモジュール性を付与することで、このギャップを埋めることを試みた。さきがけ研究期間中には、①マイクロコンタクトプリンティングと②マイクロ流体デバイスを用いた 2 種類の細胞パターンニング法を用いてこれを実現できることを示すことができた。

マイクロコンタクトプリンティングでは、洗浄したガラス基板に細胞接着阻害剤としてアガロースもしくは 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンポリマーを塗布した後、表面に微細な凹凸を有するポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のスタンプを用いて、細胞接着の足場として細胞外基質ゲルとポリリジンの混合液をパターン転写した。作製した基板上に胎生 18 日ラット胎児大脳皮質から採取した神経細胞を播種し、培養 10 日目に蛍光カルシウムイメージング法を用いて神経回路の自発活動を計測した。

ネットワークのモジュール性の効果を明らかにするためのモデル構造として、 $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ の正方形パターン ($400 \mu\text{m}$ 四方) と、それを 4 分割し、それらを 3 本、そして 1 本の細線で繋いだパターン (3 本接続、1 本接続) を比較した。モジュール間を繋ぐ線の本数が少ないほどモジュール間を結ぶ神経繊維の本数が少なくなるため、モジュール性が高いネットワークが構築される (Moriya, Yamamoto et al., Chaos 29, 013142 (2019))。神経回路の規模は、完全孤立系として観察が可能な 100 細胞程度の系を対象として、パターン間で一定に保たれるようにした。

入力刺激の無い状態において神経回路が自発的に生成する活動パターンをこれらの回路で比較したところ、モジュール構造を有していない $400 \mu\text{m}$ 四方パターンや、モジュール性の低い 3 本接続パターンでは全ての回路で回路全体での同期発火が観察された。一方、モジュールを結ぶ線の本数を減らすことでモジュール性を強めた 1 本接続パターンでは、17% の回路で一部のモジュールのみが同期する部分的な同期発火が見られた。発火状態の時空間的な複雑性の指標として、ニューロン間の相関係数のばらつきと、各時刻における発火細胞数のばらつきの積で計算される dynamical richness を定義し、パターン間を比較したところ、1 本接続パターンにおける値が $400 \mu\text{m}$ 四方パターンや 3 本接続パターンと比較して統計的に有意に高いことが分かった (代表論文 1)。

このように、マイクロコンタクトプリンティングを用いて作製したマイクロ加工基板を用いて、モジュール構造の重要性を明らかにすることができたが、マイクロコンタクトプリンティングではサンプル作製の安定性を向上することが難しかった。そこで、PDMS 製マイクロ流体デバイ

スを用いた細胞パターンニング法を応用して、モジュール構造型培養神経回路を作製する独自技術を開発した。ここでの課題は、各モジュールを構成する数百 μm スケールの微小な貫通孔をアレイ状に形成することであったが、PDMS を約 100 μm 厚に薄膜化することで、この問題を解決した(代表論文 3)。

研究テーマ B「人工神経細胞回路に対する摂動解析系の構築」

神経細胞の活動パターンを「コンピューティング」へと結びつけるためには、細胞集団に摂動を与えてその応答を解析する実験系を構築する必要がある。そこで、培養神経回路の摂動解析系として、光応答性カチオンチャンネルと蛍光カルシウムプローブを組み合わせた光インターフェースを構築した。ここで必要となる主要な要素技術は①光応答性イオンチャンネルの遺伝子導入と②パターン光照明装置の光学系構築である。要素技術①は、アデノ随伴ウイルスを用いて赤色応答型チャンネルロドプシン ChrimsonR (Klapoetke et al., Nature Methods 2014)を神経細胞に遺伝子導入することで実現した。要素技術②は高輝度赤色 LED 光をデジタルミラーデバイスでパターン化して、細胞培養用チャンバー付き倒立型蛍光顕微鏡に導入することで実現した。光学系の構成に加えて、観察下に置かれた培養神経回路の中から刺激対象となる細胞を GUI 上で任意に選択し、それらに対する刺激照明パターンを自動生成するコードを MATLAB ベースで開発した。以上の実験を進めたことによって、培養神経回路中の神経細胞に対して 400 ミリ秒の時間分解能で刺激を印加することが可能になった。

さきがけ研究期間中には、自作の多点電極アレイを用いた電気インターフェースも開発し、原著論文としても発表した(代表論文 2)、研究テーマ C 以降の実験は、刺激入力の自由度が高い前述の光インターフェースを用いて進めた。

研究テーマ C「入力信号のパターン分類特性の解析」

研究テーマ A で開発した細胞操作技術と研究テーマ B で開発した摂動解析系を統合し、マイクロ加工基板上で培養した培養神経回路のパターン分類特性を解析する実験系を構築した。具体的には、光遺伝学技術を用いて刺激(空間パターンもしくは時空間パターン)を印加し、蛍光カルシウムイメージングにより計測した培養神経回路の入力応答をレザバー計算の枠組みを用いて出力信号へと回帰した。

空間パターンに対する多クラス分類性能を評価したところ回帰対象となる出力信号を維持する時間幅に依存して、正答率にピークが現れ、その時間はネットワークのモジュール性が高くなるにつれて大きくなることが分かった。これはネットワーク内での活動伝搬速度の違いに起因するものであり、モジュール性の高い回路では活動伝搬が遅くなるために長時間(> 1 秒)の出力信号の回帰においても性能が保持されたと考えられる。

研究テーマ D「工学実装を指向した数理モデルの構築」

研究テーマ A と C の実験を先導する形で、積分発火ニューロンモデルを用いた計算機シミュレーションによる解析を進めた。特に研究テーマ C の内容については、マイクロパターン基板を用いて作成したモジュール構造型神経回路に対応するネットワークモデルを stochastic block model を用いて作成し、その回路に 3 種類のパルス電流入力を与え、出力層の結合荷

重値をリッジ回帰により学習させたうえで、ネットワークの分類性能を評価した。その結果、中程度のモジュール性をもつ回路が最も高い分類性能を示すことが分かった。モジュール構造は、生物の神経系において進化的に保存されているネットワーク構造であり、今回の解析により、その計算論的意義をレザバー計算の枠組みから示すことができた。

3. 今後の展開

高密度多点電極アレイ上に形成した人工神経細胞回路に対する摂動解析を進める予定である。さきがけ研究で開発した光インターフェースに基づく実験系に比べ、多点電極アレイを用いた電気インターフェース型では、活動計測と刺激入力の時間分解能をいずれも約1000倍上げることができるため、神経細胞のバースト発火や同期発火の中に埋もれた時空間ダイナミクスを活用できるようになり、より複雑な情報処理や可塑性(学習)の解析へと展開が図れることが期待される。

また、本研究で確立した人工神経細胞回路を薬効評価系として用いる応用研究についても検討を進めている。具体的には、細胞パターンニングによって培養神経回路の過剰興奮が抑えられるという特徴を生かして、神経炎症などの疾患がネットワークレベルでの自発活動や刺激応答という回路機能に及ぼす効果を調べる実験系として活用する予定である。

4. 自己評価

目標として掲げた神経回路網の機能をボトムアップに解析するための新しい実験系の創成とパターン分類タスクでの概念実証はほぼ予定通り達成でき、今後、3.に記載したような展開が期待される。当初の計画にはなかったが、研究期間中に本さきがけと同じ戦略目標下に設置されたCRESTチーム「スピンエッジコンピューティングハードウェア基盤」(代表:東北大学・佐藤茂雄教授)に協力者として加わり、超低消費電力で動作するアナログニューロン回路(Sato et al., ICANN2021, 177-181 (2021).)やシナプス回路(Moriya et al., NOLTA, IEICE 12, 685-694 (2021).)の設計にも携わることもできた。今後、ハードウェア実装を見据えたバイオ系のモデル化を進めることにより、脳型デバイスの更なる低消費電力化や学習の効率化が期待される。

また、領域会議などの機会を活用し、さきがけ研究者同士の研究交流を図ることもできた。特に松井鉄平准教授(岡山大学、専門:神経生理学)とは科研費・学術変革領域研究(B)「脳神経マルチセルラバイオコンピューティング(領域略称名:多細胞バイオ計算)」を共同で提案し、2021年8月に採択された。学術変革領域研究(B)では、神経生物学や数理工学の専門家の協力を得ながら、脳神経ネットワーク上での情報表現・情報処理を記述する生物規範的なモデルの構築へと本さきがけ研究を発展させる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 20件

1. *Hideaki Yamamoto, Satoshi Moriya, Katsuya Ide, Takeshi Hayakawa, Hisanao Akima, Shigeo Sato, Shigeru Kubota, Takashi Tanii, Michio Niwano, Sara Teller, Jordi Soriano,

<p>Ayumi Hirano-Iwata, "Impact of modular organization on dynamical richness in cortical networks," Science Advances 4, eaau4914 (2018).</p>
<p>大脳皮質神経回路の配線構造を培養系で再構成し、モジュール型接続が神経発火パターンの複雑性に及ぼす効果を解析した。同期状態と非同期状態が均衡した複雑な神経発火パターンは脳情報処理基盤として重要であるが、性質の異なる 2 つの活動状態がどのようにして 1 つの回路に共存できるのか、そのメカニズムは明らかにされていなかった。本研究では、モジュール構造型ネットワークは空間的には分離されているが、機能的には統合性が高いことを実験的に証明し、両者の均衡によって複雑な発火パターンが生まれる、という新たな仮説を提案した。</p>
<p>2. *Hideaki Yamamoto, Leroy Grob, Takuma Sumi, Kazuhiro Oiwa, Ayumi Hirano-Iwata, Bernhard Wolfrum, "Ultrasoft silicone gel as a biomimetic passivation layer in inkjet-printed 3D MEA devices," Advanced Biosystems 3, 1900130 (2019).</p>
<p>脳組織に近い弾性率を有する超軟ゲル材料を保護膜とする新しい多点電極デバイスを開発した。ポリジメチルシロキサンは電気的絶縁性と力学的柔軟性を併せ持つユニークな材料であるが、半導体プロセスとの相性が悪いことがデバイス応用上の障壁であった。本研究では、金属ナノ粒子のインクジェット印刷技術により電極構造を 3 次元化することでこの問題を解決した。神経細胞を含む培養細胞は足場材料の力学特性に応じてその特性を変えるため、このデバイスは生体模倣環境中での神経回路網の機能解析を支援するデバイスとしての展開が期待される。</p>
<p>3. Taiki Takemuro, *Hideaki Yamamoto, Shigeo Sato, Ayumi Hirano-Iwata, "Polydimethylsiloxane microfluidic films for in vitro engineering of small-scale neuronal networks", Japanese Journal of Applied Physics 59, 117001 (2020).</p>
<p>培養神経回路のモジュール性を制御するためのマイクロ流体デバイスを開発した。最小 100 × 100 μm² の微細な貫通孔アレイを形成するために、マイクロ流体デバイスを薄膜化するプロセスを確立した。ラット大脳皮質神経細胞を培養し、蛍光カルシウムイメージング法により自発活動パターンを計測し、先行研究(代表論文 1)などで見られていたように、モジュール構造型培養神経回路では過剰な同期発火が抑制されることを示した。100 細胞程度の微小な神経細胞ネットワークを扱う場合、マイクロ流体デバイスを用いた細胞パターンニング法は他の手法に比べて汎用性が高く、今後、多点電極アレイ上への神経細胞パターンニングなどにも活用が可能になると考えられる。</p>

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

● 主要な学会発表

- 竹室汰貴, 山本英明, 脇村 桂, 住 拓磨, 金野智浩, 佐藤茂雄, Jordi Soriano, 平野愛弓, 「マイクロパターン培養神経回路に対する光摂動系の構築」第 82 回応用物理学会秋季学術講演会, オンライン開催(2021 年 9 月 10-13 日)

- 住 拓磨, 山本英明, 守谷 哲, 竹室汰貴, 金野智浩, 佐藤茂雄, 平野愛弓, 「リザバー計算に基づく人工神経細胞回路のパターン分類特性の評価」第31回日本神経回路学会全国大会, オンライン開催(2021年9月21-23日)
- 受賞
 - 日本表面真空学会 講演奨励賞(若手研究者部門)「微細加工基板を用いた神経回路ダイナミクスの in vitro 制御」(2020年2月)
- 著作物
 - 山本英明 「百科繚覧 VOL.2～若手研究者が挑む学際フロンティア～第6章:ナノテクで神経細胞の回路を作る」、東北大学出版会、2020年発行
- プレスリリース
 - 「微細なハンコで神経回路網を操作 -シャーレ内での脳機能モデリングに向けて道筋-」(2018年11月15日)