［研究助成（C）］

人工細胞膜と受容体タンパク質を利用した脳神経インタフェースの開発

Development of brain-machine interface device with lipid bilayers and membrane proteins

2207005

研究代表者　東京工業大学　大学院機械系　博士課程　彭　祖癸
共同研究者　東京工業大学　大学院機械系　教　授　八木　透

［研究の目的］

脳神経インタフェースは，脳と機械を接続し人間の機能/知能を拡張できる技術として注目されている。神経ネットワークは，シナプス前細胞が放出する神経伝達物質をシナプス後細胞が感知して，信号伝達を行っている。高度な脳神経インタフェースを実現するには，神経伝達物質を精確に感知する計測技術の開発が必要である。これまで，神経細胞の電気活動を細胞外で計測する細胞外記録法や，微小ガラス管を用いた細胞内記録法などの電気生理学的手法が長年に渡って用いられてきた。しかし，細胞外電位からは基本的に活動電位しか計測できないため，微弱なシナプス電位（活動電位の 1/100～1/10 程度）を感知できない。一方，微小ガラス管では単一細胞に対して複数点から接続することは極めて困難である。

そこで本研究では，人工細胞膜と受容体タンパク質と近い性質を持つナノチューブを利用してシナプス後細胞を人工的に実現し，シナプス前細胞から放出される神経伝達物質を検出する手法の開発を目的とする（図 1）。具体的には，自発展開現象（固体表面に人工細胞膜の構成成分である脂質を付着させ，界面の相互作用により人工細胞膜が固体表面上に広がる現象）を利用して，人工細胞膜を作製する。作製した人工細胞膜上にナノチューブを配置し，人工的なシナプス後細胞を実現する。その後，生細胞を人工細胞膜に接着させ，電気計測を行う。

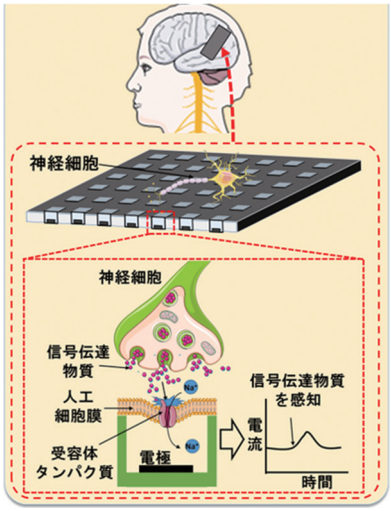

図 1　提案手法の概要

本研究の目標は人工細胞膜とナノチューブを利用することにより，分子レベルで神経細胞の活動電位を計測する技術の開発である。従来よりも詳細な活動電位の記録が可能であるため，シナプス電位の同時取得により神経可塑性の発現メカニズムを明らかにし，神経科学や神経工学分野の発展に貢献する脳神経インタフェースの実現における重要なマイルストーンとなることが期待できる。

［研究の内容，成果］

提案手法の実現に向け，これまで下記の 3 つ

のサブテーマに取り組んだ。

A）：長期的な計測に適した機械的強度の高い人工細胞膜の形成

B）：人工細胞膜上のナノチューブの物質透過性の評価

C）：細胞接着を促進する手法の開発

以下にそれぞれの詳細を示す

A）：長期的な計測に適した機械的強度の高い人工細胞膜の形成

・背景

従来の支持物のない人工細胞膜は機械的強度が低く，電極先端に長時間にわたって存在できない。一方，内部に固体を導入し人工細胞膜を支持する方法では，人工細胞膜上に固定されたナノチューブが固体に衝突し機能が損なわれる。そこで，多孔材料であるポリカーボネート基板上に人工細胞膜を作製し，人工細胞膜の機械的強度を向上させた。

・方法

人工細胞膜の原材料である脂質は以下の手順で準備した。まず 13 mM の L-α-Phosphatidylcholine from egg yolk（egg-PC）溶液および 1.3 mM の 1, 2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine（fluorescein- DHPE）を，それぞれ 100 ml と 10 ml で混合した。窒素ガスを用いて溶媒であるクロロホルムを蒸発させた後，減圧したチャンバー内で一晩静置してクロロホルムをさらに蒸発させ，粘着性の混合脂質を得た。22℃条件下で，表面に 50 nm の小孔を有するポリカーボネート基板上に混合脂質を塗布し，全体をバッファー（100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl; pH 7.6）に浸すことで人工細胞膜を自発展開させた。

・結果

共焦点顕微鏡による蛍光観察の結果，多孔質基板であるポリカーボネート基板上に人工細胞膜が展開できることが分かった（図 2(a)）。さらに FRAP 実験の結果，人工細胞膜が流動性を有していることが判明した。最後に原子間力顕微鏡計測の結果，人工細胞膜の特徴的な粘弾性質を示すフォースカーブが観察された。フォースカーブから算出した人工細胞膜のバネ定数は 0.039±0.007 N/m であり，先行研究（I. Mey *et. al.* 2009）と同等な機械的強度を有していることを示している（図 2(b)）。これらのことから，自発展開法は提案手法の実現に有用であることが示唆された。

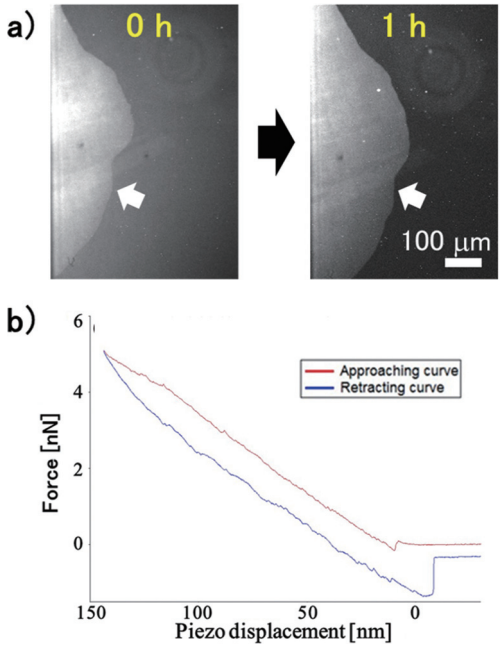

図 2　a）人工細胞膜のポリカーボネート基板上での自発展開の様子。白い矢印は人工細胞膜の先端を示す。b）原子間力顕微鏡によるフォースカーブ計測の結果。

B）：人工細胞膜上のナノチューブの物質透過性の評価

・背景

ナノチューブの物質透過性は，提案手法の実現において極めて重要な性質である。人工細胞膜との相互作用によって，ナノチューブの物質透過が変化することが知られている（J. Geng *et. al.* 2014）。そこで，本研究では人工細胞膜上でのナノチューブの物質透過性を評価するため，モデルナノチューブである単層カーボンナノチューブ（SWNT）を人工細胞膜上に導入し，一定の電圧を加えることで，そのイオン透過性を調査した。

・方法

SWNT の電気計測には，Droplet Interface Bilayer（DIB）法を用いた（図 3）。具体的には，まず銀線を 2 本用意し，それぞれ AgCl 化した後，agarose-LM ゲルでコーティングした。Agarose がゲル化したあと，ゲルに対して 5 μl の SWNT 溶液（150 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 8.0）を滴下し，10 mg/mL の 1,2-diphytanoylphosphatidylcholine，1,2-di-(3,7,11,15-tetramethylhexadecanoyl) -sn-glycero-3-phosphocholine（DPhPC）のヘキサデカン溶液に挿入した。両媒性分子である DPhPC が相互作用により，液滴まわりを脂質一重膜でコーティングできるため，2 つの液滴を接触させることで人工細胞膜形成した。その後，膜内に挿入された SWNT に対して 50 mV の電圧を印加し，SWNT の電流応答値を記録した（Axpatch 200B）。得られた電流応答値をもとに，SWNT のコンダクタンス値を算出した。

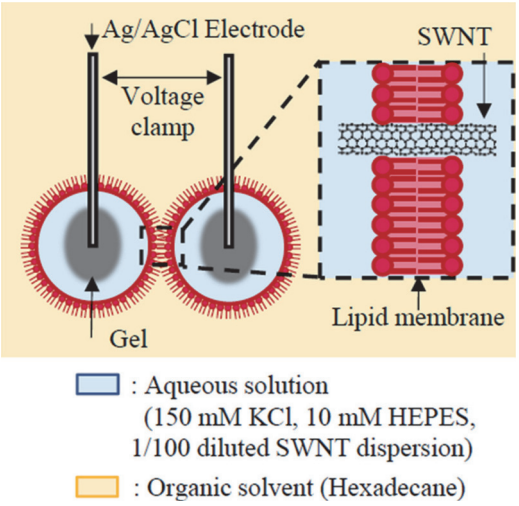

図 3　SWNT の電気計測の模式図

・結果

図 4(a) に電気計測の結果の一例を示す。人工細胞膜に対して電圧印加したところ，50 pA のステップを確認できたことから，イオンが人工細胞膜に挿入された SWNT を透過できることがわかった。電流値の上下は，SWNT が膜への挿入と膜からの離脱を繰り返していること

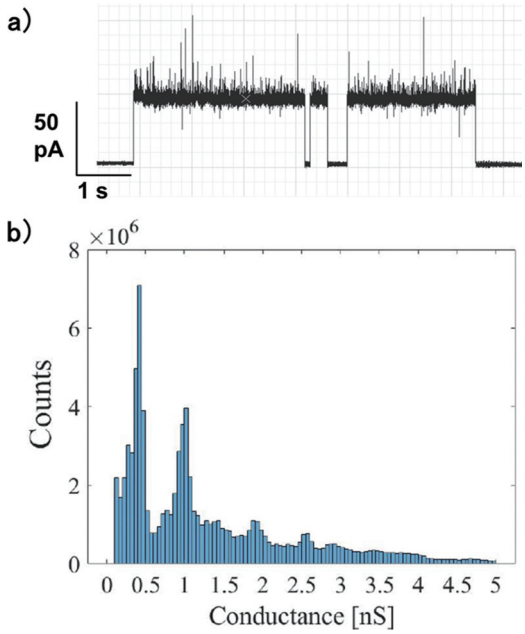

図 4　a）SWNT の人工細胞膜挿入の一例。b）SWNT のコンダクタンスのヒストグラム。

を示唆する。図 4(b) に，電圧値と電流応答値から算出した，SWNT のコンダクタンスのヒストグラムを示す（0.1 nS 以下のデータは，電流が流れていないときのデータを除外するためにカットしている）。0.40～0.45 nS と 1.00～1.05 nS にピークが観察されている。先行研究で報告した SWNT のコンダクタンス値が 0.63 nS 前後であることから（J. Geng *et. al.* 2014），低いピークが単一の SWNT，高いピークが 2 本の SWNT が同時に人工細胞膜に挿入したことを意味すると推察できる。しかし，SWNT のコンダクタンス値が SWNT の長さ，直径に依存するため，今後はシミュレーションなどの手法を用いて，コンダクタンス値の二峰性の理由を精査する必要がある。

C）：細胞接着を促進する手法の開発

・背景

提案手法で細胞を計測するためには，細胞を人工細胞膜上に接着させる必要がある。通常，細胞は人工細胞膜に対する生着率が低いと思われるため，本研究では磁気粒子を用いて細胞の接着を促進する技術を開発した（図 5）。

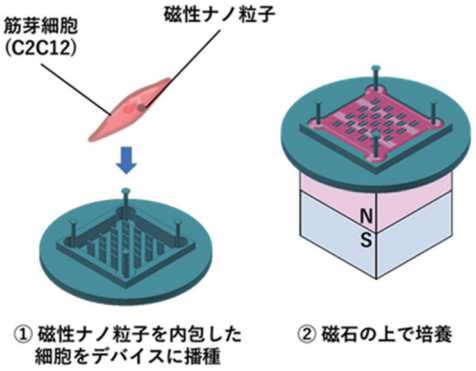

図 5　SWNT の電気計測の模式図

・方法

C2C12 細胞は理研セルバンク（RCB0987; RIKEN）から入手した。培地は 10% 牛胎児血清（Sigma-Aldrich）および 1 % Penicillin-Streptomycin Solution（PS）（Sigma-Aldrich）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM; Sigma-Aldrich）を成長培地（Growth Medium: GM）として培養した。培地は一日ごとに交換した。60～70% コンフルエントに達した時点で，培地 1 ml あたり 0.5 μl，2.5 μl，5 μl のマグネタイトナノ粒子を添加した（以降のマグネタイト濃度はすべて培地に対する体積比率で表す）。磁性粒子，細胞核，細胞質を染色し，磁性粒子の細胞への取り込みを観察した。磁さらに，磁石に対する細胞の反応を調べるために，培地中に磁性粒子を入れた細胞を用意した。24 時間後に細胞を培養皿から取り出し，12 ウェルプレートに 5×104 cell の細胞を播種し，磁石をウェルの中心線から右寄りの底面に配置した。4 時間後，プレートを顕微鏡で観察し，境界から右側（磁石領域内：N_{in}）と左側（磁石領域外：N_{out}）の細胞数の比率を，1 ウェルあたり 3 箇所で測定した（mag（+）），磁石を置かない群（mag（−））も用意した。N_{in}と N_{out}の有意差は Student t-test により算出した。

・結果

磁性体粒子を培地に添加してから 24 時間後の細胞を観察したところ，粒子が核の周りに散らばっていることが観察された（図 6(a)）。また，中心線に沿って磁石がある側に細胞が集まっていることが確認された（図 6(b)）。磁石上の C2C12 細胞の数と，マグネタイトナノ粒子を含む培地で磁石を使わずに培養した細胞の数を数えた（n=3, SE; *p<0.01; 図 6(c)）。0.5-, 2.5-, 5 μl/ml のいずれの群でも，磁石あり（Magnet+，オレンジ色）の方が磁石なし（より細胞数が有意に多かった。磁石を下に置かなかったグループでは全群で変化がなかった。以上の結果から，磁気粒子を用いた手法が細胞接着の促進に有用であると考えられる。

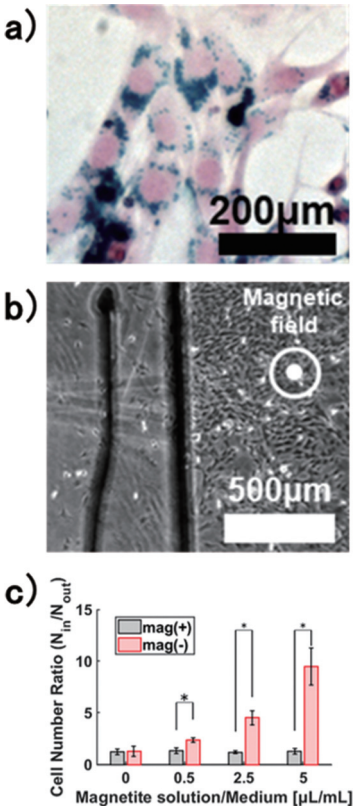

図 6　a）染色した C2C12 とマグネタイトナノ粒子。
b）中心線より右側に磁力によって集まった細胞。
c）磁石上に集まった C2C12 細胞の数の比。

［今後の研究の方向，課題］

本研究では，人と機械の融合を目指して「人工細胞膜と受容体タンパク質を利用した脳神経インタフェースの開発」を提案した。これまで，提案手法の実現に向け，A）：長期的な計測に適した機械的強度の高い人工細胞膜の形成，

B)：人工細胞膜上のナノチューブの物質透過性の評価，C)：細胞接着を促進する手法の開発の３つの要素技術に取り組み，一定性の成果をあげてきた。しかし，最重要課題である提案手法を用いた神経細胞の計測がまだ実現できていない。今後は，上記の３つの要素技術をもとに，提案手法を完遂し，脳神経インタフェースとしての有用性を評価していく。

［成果の発表，論文など］

［学術論文誌］

［１］ **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi. “A Study of the Effects of Plasma Surface Treatment on Lipid Bilayers Self-Spreading on a Polydimethylsiloxane Substrate under Different Treatment Times”, *Langmuir,* Vol. 141, vol. 37, 36, pp. 10732-10740, 2021. 8.

［２］ **Z. Peng**, K. Wada, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi. “Formation of Agarose-supported Liposomes by Polymer-assisted Method toward Biosensor”, *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, Vol. 141, No. 5, pp. 646-653, 2021.

［３］ S. Kanno, **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, T. Yagi. “Functional Analysis of Liposomes Containing Single-Walled Carbon Nanotubes (SWNTs) by Fluorescence Microscopy, “Formation of Agarose-supported Liposomes by Polymer-assisted Method toward Biosensor”, *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, Vol. 141, No. 5, pp. 620-626, May, 2021.

［４］ Y. Kirihara, H. Miyata, **Z. Peng**, K. Shimba, Y. Miyamoto, K. Shimizu, H. Honda, T. Yagi. “Effect of Magnetic Nanoparticle Internalization on Cell Density in Skeletal Muscle Tissue”, *IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering*, Vol. 141, No. 7, pp. 795-801, May, 2021.