

[研究助成 (C)]

カーボンナノチューブを利用した電気シナプス型電極による
神経インタフェースの実現

Realization of neural interface using electric synapse-like electrodes based on carbon nanotubes

2227004



研究代表者

東京工業大学・
日本学術振興会特別研究員 (PD)
(助成金受領時：東京工業大学 大学院工学院機械系)

菅 野 翔一郎

[研究の目的]

刺激型の神経インタフェースは、体内に埋植した刺激電極で神経細胞を電気刺激することで、神経系の機能不全が原因で喪失した感覚機能を補う。理想的な神経インタフェースの実現には単一細胞を刺激できる程に電極を微細化する必要がある。しかし微細化した電極は電荷注入能力が低く、通電した際に体内で電気分解が生じる。電気分解を防ぐためには、細胞膜の内側への電荷注入により刺激閾値の低減が可能な細胞内刺激が有効である。

細胞内刺激のアプローチとしては、長らくガラスピペット電極を用いた電気生理学的な手法が行われてきた。しかし電荷注入のために細胞膜に形成する孔の大きさは、細胞の 1/10 程度と大きく、機械的損傷により細胞はやがて死滅してしまう。近年では細胞体に密着させたナノピラー電極から電流を流し、細胞膜に数 nm の孔（ナノポア）をあける細胞内刺激が試みられている（電気穿孔）。孔の大きさは細胞膜に存在する膜貫通小孔（膜タンパク質）と同程度であるため、機械的損傷を抑えることができる。しかし、電気穿孔であけた孔は膜の自然修復によって 20 分以内に塞がるため、長時間の連続した刺激はできない。以上のように、神経インタフェースに細胞内刺激を適用するには、細胞内への長時間安定したシグナル伝達系の構築が課題となっている。

そこで本研究では生体中の神経系におけるシグナル伝達系の一つである電気シナプスを模した系を構築し、上記の課題解決を図る。電気シナプスでは、細胞間が膜タンパク質によるナノポアで連絡されており、ナノポアを介したイオン電流によって細胞間での高速な信号伝達が行われる。したがって、この電気シナプスの「膜タンパク質に支持されたナノポア構造」を模倣することにより、安定したシグナル伝達系を構築できると考えられる。一方で膜タンパク質は生体中で分解されやすく、合成も煩雑である。そこで膜タンパク質より化学的分解に強いナノサイズの管状構造体を細胞膜に挿入することで、長時間の細胞内刺激を実現する電気シナプス

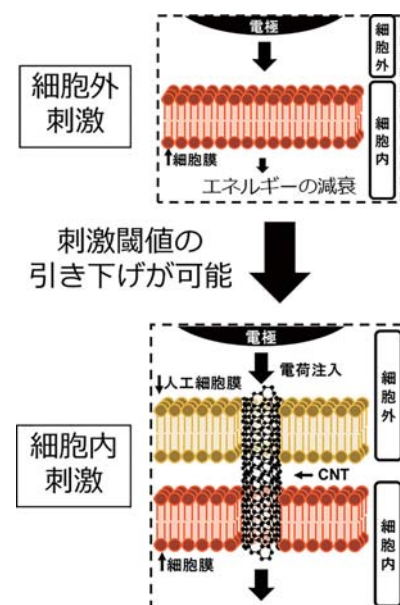


図1 提案手法の概要

型電極（図1）を提案する。管状構造体として注目したのが、単層カーボンナノチューブ（CNT）である。CNTは、1）機械的・化学的に堅牢な管状構造体であり、2）直径1~2 nmという孔の大きさによって細胞の機械的損傷を抑えたナノポアを細胞膜に形成できる。

したがって本研究では、カーボンナノチューブ（CNT）を用いたシグナル伝達系を実現し、細胞内刺激によって刺激閾値を下げて電気分解の問題を解決する電気シナプス型の微細電極の実現を目的とする。

その成果は、神経インタフェースによる視覚、聴覚、触覚といった感覚機能の高度な再現を可能にし、人間と機械の調和を促進することができる。

[研究の内容、成果]

提案手法の実現に向け、以下3点の実験に取り組んだ。

- A) CNT 挿入が細胞膜形態に及ぼす影響の評価
- B) 細胞・電極間を連結するDNA 管状構造体の構築
- C) 接着細胞の位置制御のための培養基板の作製

以下にそれぞれの詳細を示す。

A) CNT 挿入が細胞膜形態に及ぼす影響の評価 背景

提案手法で用いるCNTは細胞膜・人工細胞膜を崩壊・変形させる場合がある。これらの現象は数百 nm~数 μm の長さのCNTにて報告されてきた。一方で膜にナノポアを形成するCNTは、脂質による被覆と数~数十 nm 長への切断がなされており、膜への挿入とそれに伴う膜への転移の過程が異なるとされている。そのためナノポアを形成可能なCNTは既存のCNTと違った膜との相互作用をすることが予想される。しかしCNTが膜形態に及ぼす影響

についての研究報告はない。そこで、ナノポア形成CNTが膜形態に与える影響を評価するため、細胞膜モデルに利用される巨大人工細胞膜小胞（giant unilamellar vesicle; GUV）にCNTを曝露し、膜形態変化を蛍光顕微鏡によって評価した。

手法

CNTの挿入による膜形態への影響を評価するために、作製したGUVにCNTを曝露し、蛍光顕微鏡で膜の形態を観察した。

CNTは数~数十 nm の長さ切断するためにCNTをリン脂質（1, 2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOPC）とともに水溶液中で超音波破碎した。両親媒性であるリン脂質の表面吸着によって疎水性のCNTは水溶液中に分散する。GUVは、ポリビニルアルコール（PVA）ゲルを用いたポリマーフィルム水和法を用いて作製した。まず、5.0 w/w% PVA 水溶液 50 μL をカバーガラス上に広げ、塗布したPVAゲルを50℃で2時間以上乾燥させた。次に、乾燥したゲル膜上に脂質溶液 10 μL を塗布した。脂質溶液は、クロロホルム中 1.0 mg/mL のDOPCに対し、モル比 100:1 になるように蛍光色素標識脂質（Texas Red™ 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt; Texas Red DHPE）を混合した。その後カバーガラスを真空チャンバ内で15分間静置し、残留溶媒を完全に蒸発させた。最後に 10 mM HEPES (pH 7.3) を 150 μL 加え、脂質を水和させてGUVを作製した。

観察の際は、3.0 μL のGUV溶液を観察用チャンバに加えた後、1.0 μL のCNT分散液をチャンバに加え、CNTをGUVに曝露させた。撮影には、共焦点スキャナユニット（CSU-X1, Yokogawa Electric）に接続した蛍光顕微鏡（IX70, Olympus）を用いた。使用した対物レンズの倍率は10倍である。561 nm のレーザーでTexas Redを励起し、CCDカメラ（BU-60, BITRAN）で蛍光を検出した。画像は、CNT

曝露後 29 分間、10 秒/フレームの速度で記録した。

結果

蛍光顕微鏡観察の結果、図 2 に示すように当初球形であった GUV が時間の経過とともに扁平な形状に変形し、最終的には二つ以上の小胞が連結した形状に変形した。この変形を、GUV を楕円近似した際の長軸と短軸のアスペクト比で定量評価した結果を図 3 に示す。図 3 は各 CNT 濃度における GUV の平均アスペクト比の時間変化のグラフである。横軸は CNT 曝露後からの経過時間を示している。CNT の曝露によって変形が誘引されたことがわかった。さらにこの変形を膜全体の弾性エネルギーによる膜変形モデルと比較することで、GUV の膜面積と曲率の増加が CNT の膜挿入により発生していることが示唆された。このことからナノポア形成 CNT では、CNT や CNT に付着した脂質分子の膜への挿入が変形に寄与していること

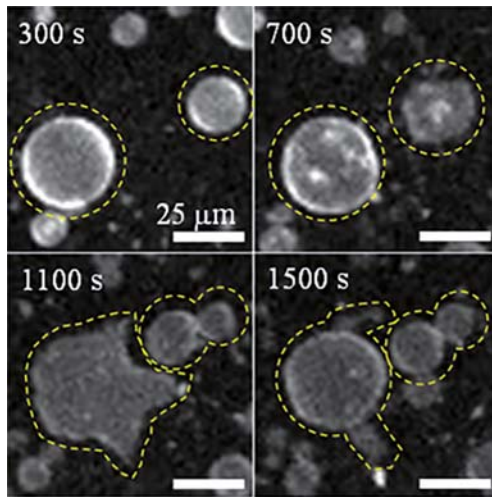


図 2 CNT 曝露による変形 GUV の蛍光顕微鏡画像^[1]

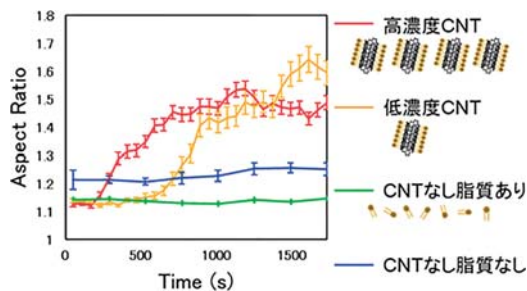


図 3 GUV の平均アスペクト比の時間変化^[1]

が考えられる。以上により GUV への CNT 組み込み時における膜変形を制御するための知見を得ることができた。

B) 細胞・電極間を連結する DNA 管状構造体の構築

背景

CNT の曝露が膜変形を誘引することを考慮すると、他の材料で作製した管状構造体も同様の膜変形を誘引して、シグナル伝達系を実現できない可能性がある。DNA はその塩基対の特異的な水素結による管状構造体の形成および、膜へのナノポア形成が可能であることが知られている。そこで、本実験では、電極側と細胞側を接続できるように、互いに連結する一対の DNA 管状構造体を作製し、その性能について評価した (図 4)。

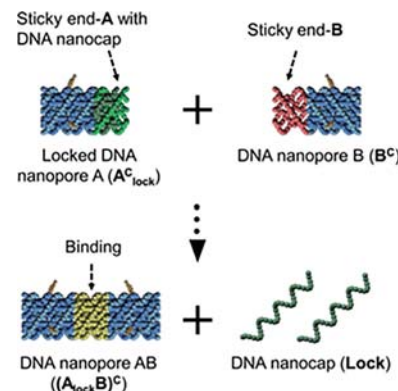


図 4 作製した DNA ナノポアの概略図^[2]

手法

DNA 管状構造体は、先行研究 (Göpfrich, *et al.*, 2015) の構造に基づき、核酸塩基間の水素結合を介して 6 本のらせん束構造を形成する 9 本の一本鎖 DNA で構成された。さらに一対の DNA 管状構造体 (A^C , B^C) を互いに接続するために、それぞれの端部に相補的な配列の一本鎖 DNA である粘着末端を用意した。また A^C には、 B^C との連結前での物質透過を阻害するために、一本鎖 DNA による蓋 (Lock) を用意した。Lock によって閉塞された A^C (A^C_{lock}) は、 B^C と混合すると、Lock を放出し B^C と連結

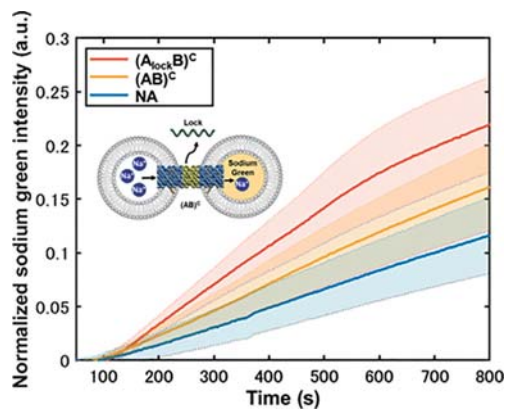


図5 SUV 間の Na^+ 透過測定における sodium green の蛍光強度時間変化^[2]

するように設計した。

A^C , B^C の連結と物質透過性について評価するため、それぞれの DNA 管状構造体を挿入したサブミクロンサイズの人工細胞膜小胞 (large unilamellar vesicle; LUV) グループ間における Na^+ 透過を、 Na^+ の蛍光指示薬である sodium green を用いた測定で評価を行った (図5 内イラスト)。まず A^C または A^C_{lock} を、300 mM NaCl を内包した LUV (送信 LUV) と体積比 1:1 で混合した。同様に B^C を、それぞれ 10 μM sodium green, 300 mM KCl を内包した LUV (受信 LUV) と混合した。混合中、 Na^+ は A^C からのみ漏出するため、 A^C_{lock} を組み込んだ LUV の Na^+ 濃度は A^C を組み込んだ LUV よりも高くなる。30 分の静置後、等量の送信側および受信側 LUV を混合した。送信・受信 LUV が A^C と B^C の連結により接続されると、 Na^+ が送信 LUV から受信 LUV へ伝達される。 A^C_{lock} を組み込んだ LUV は A^C を組み込んだ LUV より内部 Na^+ 濃度が高く、sodium green の蛍光強度のより大きな増加として反映される。蛍光強度は蛍光分光光度計によって計測した。

結果

図5に sodium green の蛍光強度の時間変化を示す。予想どおり、 A^C_{lock} を組み込んだ受信 LUV は 20 ± 4.4 ポイントの蛍光強度増加を示した。これは、 A^C のある受信 LUV の 14 ± 3.7

ポイントの蛍光強度増加、および DNA 管状構造体を含まない受信 LUV の 10 ± 3.2 ポイントの増加よりも高かった。別途行った透過型電子顕微鏡観察において、 A^C と B^C の連結による LUV の融合が観察されなかったため、sodium green の蛍光強度増加は小胞融合に寄与していなかった。すなわち以上から、DNA 管状構造体が、互いに連結し隣接する LUV を介して直接的な分子伝達経路を構築したことを実証できた。今後は、DNA 管状構造体の膜形態への影響を評価する必要がある。

C) 接着細胞の位置制御のための培養基板の作製背景

提案手法で細胞刺激を行うには、電極近傍まで細胞を移動させる必要がある。接着細胞の位置制御技術の1つに、マイクロサイズの細胞培養基板を動かすことで細胞位置を制御するものがある。基板は水流や機械的刺激によって制御可能であるが、制御が困難であり、汚染の可能性がある。そこで本研究では磁力で接着細胞の位置を容易に制御可能な基板を作製した。磁性粒子を含有させることで磁性を付与した培養基板上で細胞を培養することにより、基板位置の外部磁場制御が可能である (図6)。

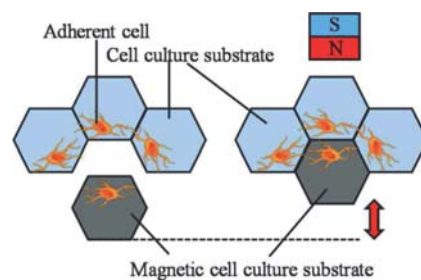


図6 磁力による培養基板の位置制御の概略図^[3]

手法

培養基板にはポリジメチルシロキサン (PDMS) を、磁性粒子にはマグネタイト粒子 (EM Japan) を使用した。まず PDMS 主剤と硬化剤を 10:1 の割合で混合して予備硬化溶液を調製した。カバーガラス上に型を置き、細胞培養基板と磁性細胞培養基板の予備硬化溶液を

流し込むことで基板を作製した。作製した基板に対し、518 mT のネオジム磁石を近傍に設置し、2% w/v Pluronic F-127 溶液中で磁性培養基板の磁気反応性を調べた。

さらにこの基板表面をポリドーパミンとコラーゲンでコーティングすることで PDMS の細胞接着性を向上させた。接着細胞として、C2C12 マウス線維芽細胞をコーティングした基板上に播種した。成長培地には、ウシ胎児血清 10%, ペニシリンストレプトマイシン 1% を含む D-MEM (High Glucose) を利用した。細胞播種の翌日、細胞を固定し、Phalloidin-iFluor 555 Reagent と DAPI を使用して F-アクチン染色と核染色を行った。観察には、正立共焦点蛍光顕微鏡 (LSM780, Carl Zeiss Microscopy) を使用した。

結果

図 7 は磁性培養基板に磁力を (a) 上面と (b) 底面に加えた際の画像である。磁石を上

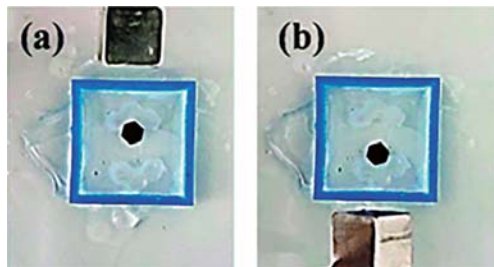
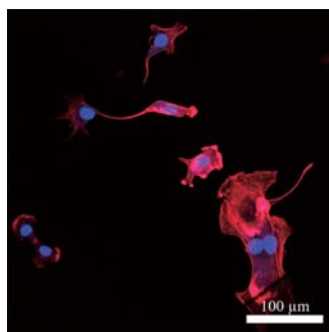


図 7 磁性基板の (a) 上面、(b) 底面に磁力印加した際の画像^[3]



(赤：F-アクチン，青：細胞核)

図 8 磁性培養磁性培養基板上で培養した接着細胞の共焦点蛍光顕微鏡像^[3]

は上に移動し、磁石を下に置いた場合 (図 7 (b)), 磁性基板の場所は下に移動した。

図 8 に磁性基板上で培養した C2C12 細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。図より磁性基板上で細胞接着と増殖が観察された。以上より磁性基板上で細胞培養することで、磁力で細胞位置を制御可能であることが示された。

[今後の研究の方向，課題]

本研究は高性能な神経インタフェースの実現に向け、カーボンナノチューブを利用した電気シナプス型電極を提案した。これまで、提案手法の実現に向け、A) CNT 挿入が細胞膜形態に及ぼす影響の評価、B) 細胞・電極間を連結する DNA 管状構造体の構築、C) 接着細胞の位置制御のための培養基板の作製の 3 つの要素技術に取り組んだ。一方で提案手法を用いた神経細胞の刺激がまだ実現できていないため、今後は上記の要素技術をもとに研究を継続し、提案手法の実現を目指す。

[成果の発表，論文など]

- [1] 菅野翔一郎, 彭祖癸, 榛葉健太, 宮本義孝, 八木透: 脂質二重膜への超短カーボンナノチューブ挿入が及ぼす膜形態への影響, 電気学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌), Vol. 144, No. 5, pp. 424-430, May 2024
- [2] Zugui Peng, **Shoichiro Kanno**, Kenta Shimba, Yoshitaka Miyamoto and Tohru Yagi: Synthetic DNA nanopores for direct molecular transmission between lipid vesicles, Nanoscale, Vol. 16, Issue 25, pp. 12174-12183, Jun 2024
- [3] Yuya Shimomura, **Shoichiro Kanno**, Kenta Shimba, Yoshitaka Miyamoto and Tohru Yagi: Position-controllable cell culture substrate for adherent cells, 2023 15th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON), Nov 2023