

バイオチップ技術を用いたヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能センシング

Functional sensing in human iPSC-derived neurons using bio-chip techniques

○ 鈴木 郁郎 (東北工大)

Ikuro SUZUKI, Department of Electronics and Intelligent Systems
Tohoku Institute of Technology

Abstract: Neuronal cells can be generated from Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), providing a very important alternative to studies of humans and model organisms, to facilitate a better understanding of the mechanisms of neurological diseases and identifying novel therapeutic avenues. However, the functional assays of cultured human iPSC-derived neurons have not been established. Here, we have developed the noninvasive and real-time cell sensing techniques of three fundamental function (1) action potential, (2) neurotransmitter release, and (3) post synaptic potentials. These techniques may be beneficial for clarifying the functions of human neuronal circuits and for drug screening applications.

Key Words: Human iPSC-derived neurons, Electro-sensing, Synaptic functions

1. Introduction

ヒト iPS 細胞の大量培養法と各細胞への分化技術の発展により、ヒト細胞を用いた疾患メカニズムの解明や創薬スクリーニング・毒性検査における動物実験を代替する評価モデルとしての応用が期待されている。ヒト iPS 細胞から分化させた神経系においても、その潜在需要は非常に高いが、培養ヒト iPS 由来ニューロンの機能に着目した評価系が未確立である点が基礎研究および応用研究を展開する上で大きなボトルネックとなっている。この問題点を解決するために、神経細胞の主要な機能である①活動電位、②神経伝達物質（プレシナプス機能）、③シナプス後電位（ポストシナプス機能）を非侵襲かつリアルタイムに計測可能な細胞センシング技術の開発を行った。平面微小多電極アレイチップとヒト iPS 細胞由来ニューロンの成熟化培養技術を組み合わせて、長期間（3ヶ月以上）にわたる活動電位の取得を実現した(1)。また、カーボンナノチューブ櫛型電極を開発し、ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンからリアルタイムにドーパミン放出を検出できた。更に、ゲル内に3次元培養した人工脳スライスモデル（3次元細胞ブロック）の作製により、これまで難しかった培養細胞からのシナプス後電位計測に成功した。本稿では、培養細胞からのポストシナプス電位の非侵襲計測法について述べる。

2. Materials and Methods

人工脳スライスから fPSP を計測するにあたり、

Rat 海馬初代培養細胞とヒト iPS 細胞由来ニューロン (iCell neurons; Cellular Dynamics International (CDI) Inc., USA)を用いた。人工脳スライスは、PDMS の鋳型に細胞入りコラーゲン（ゾル状）を流し込み、37°C下でゲル化させて作製した。作製した人工脳スライス内での細胞の生存および密度を計算するために、Hematoxylin-Eosin(HE)染色を行なった。

人工脳スライスからの fPSP 計測を行うために、平面微小多電極アレイ計測（アルファメッド・サイエンティフィック）を使用した。多電極アレイチップ（MED-P515A）上に人工脳スライスをマウントさせ、アンカーで接着させた状態で 37°C, CO25%のインキュベーター内で計測した。また、電気刺激による応答は、Mobius software(アルファメッド・サイエンティフィック)を用いた。薬剤投与による fPSP

の変化を調べるために、NMDA 受容体の選択的人工アゴニストである N-methyl-D-aspartic acid(NMDA)を投与し、前後の fPSP の値を比較した。

3. Results

ヒト iPS 細胞由来ニューロンおよび Rat 海馬初代培養細胞を用いた人工脳スライスを作製した。それぞれの明視野像、位相差像(Fig.1)を示している。

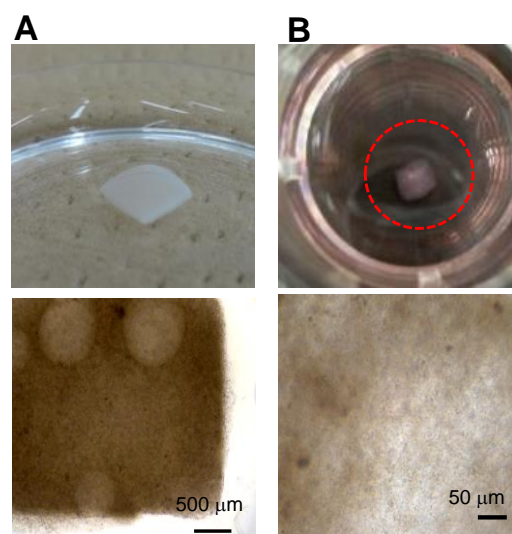


Fig.1 Artificial brain slices. (A) Rat hippocampal neurons. (B) Human iPSC-derived neurons.

次に、人工脳スライス内の細胞密度を調べるために、人工脳スライスの Z 軸断面の HE 染色を行なった。細胞密度を計算したところ、Rat 海馬初代培養細胞の人工脳スライスでは $51,749 \pm 1824$ cells/mm³ (Fig.2-A)、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの人工脳スライスでは $58,867 \pm 2016$ cells/mm³ (Fig.2-B)であった。ヒト iPS 細胞由来ニューロンは、培養 53 日目の結果であることから、長期培養が可能であることが示唆された。

人工脳スライスからの fPSP の計測を行うために、多電極アレイチップ上にスライスをマウントし LCF 1Hz で 5min 計測した。Fig.3 は、人工脳スライスで得られた自発活動波形である。

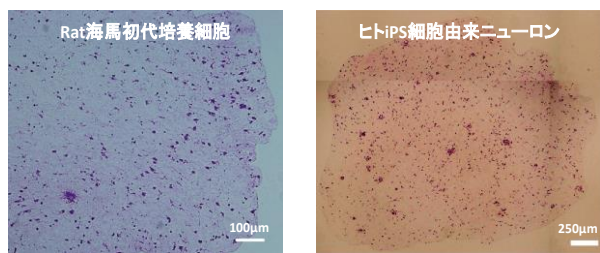


Fig.2 HE staining of Z-axis cross section of artificial brain slices. (A) Rat hippocampal neurons. (B) Human iPSC-derived neurons.

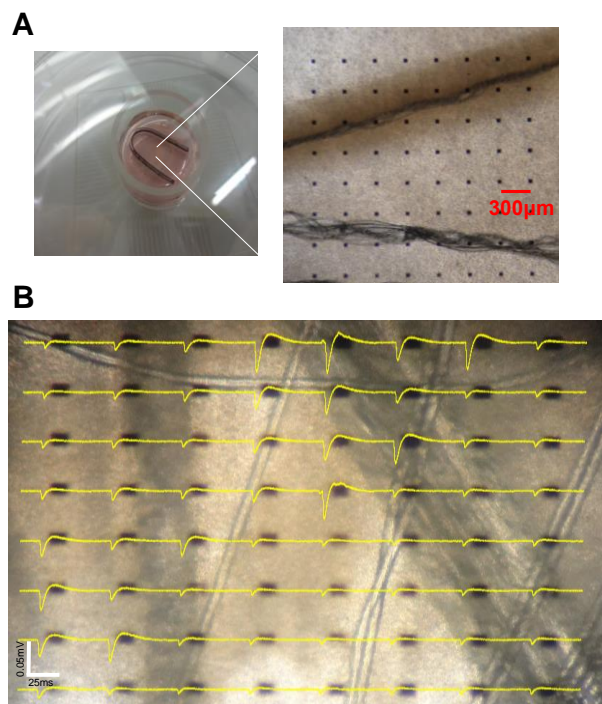


Fig.3 fPSP measurement in Spontaneous responses of artificial brain slice using MEA chip. (A) Artificial brain slice on the MEA chip. (B) Waveforms of fPSPs in spontaneous firings.

培養 21 日目の人工脳スライスを用いて電気刺激を行い、刺激応答を確認した。刺激電流値を $1\mu\text{A}$ から $+2\mu\text{A}$ ずつ上げていき、人工脳スライスの最大電流値を計測した。Fig.4 は最大電流値が $+14\mu\text{A}$ であることを示している。最大電流値の存在から、刺激によるアーチファクトではなく細胞の応答であることが示唆された。

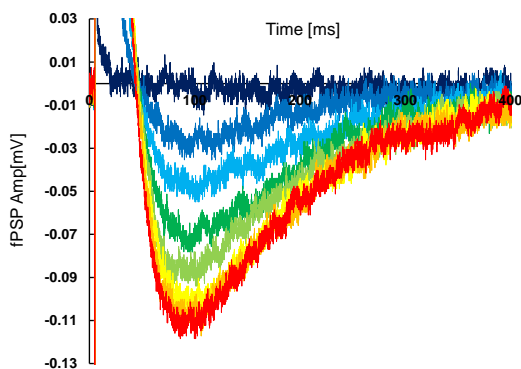


Fig.4 Evoked responses of fPSP by electrical stimulations.

人工脳スライスからの fPSP を指標として薬理応答が検出されるかを調べるために、培養 21 日目の人工脳スライスに

NMDA 受容体のアゴニストである NMDA を投与し、電気刺激計測により前後応答を計測した。Fig.5-A は NMDA 投与前、投与後の fPSP の振幅の経時変化を示している。また、Fig.5-B は振幅の平均値を示している。これらの結果から、薬剤投与による fPSP の変化（振幅の増大）を検出できることがわかった。

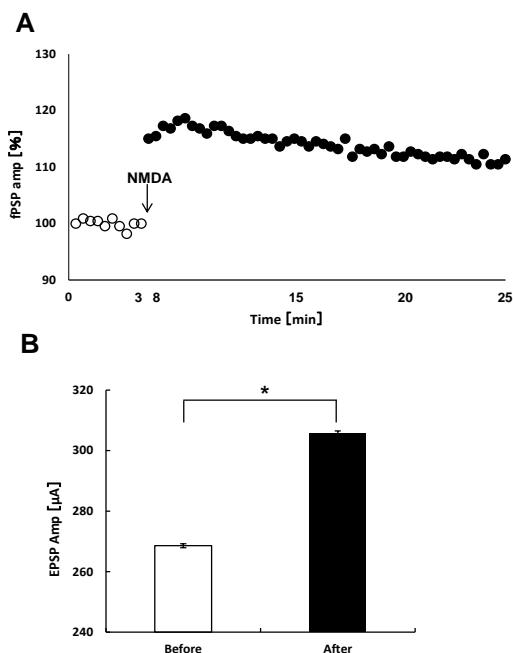


Fig.5 Pharmacological responses of fPSP in artificial brain slices. (A) Time course. (B) Average. * $P < 0.01$

4. Conclusion

ヒト iPSC 細胞由来ニューロンおよび Rat 海馬初代培養細胞を用いた人工脳スライスの作製および長期培養に成功した。生体脳の細胞密度は $30,000 \sim 80,000 \text{ cells/mm}^3$ であるため、今回作製した人工脳スライスは生体とほぼ同等の細胞密度を有していることがわかった。また、ゲル内に細胞を播種することで数 mm の厚みを持った人工脳スライスが作製できた。培養細胞から非侵襲かつリアルタイムにシナプス後電位を計測することはこれまで難しかった。細胞を集団化させ、シナプス後電流を積算化させる本手法によって、細胞外記録にて非侵襲かつリアルタイム計測に成功したことは、培養細胞を用いたシナプス機能解析において、今後の新しい計測手法となることが予想される。ヒト iPSC 細胞由来ニューロンの機能計測法として、神経疾患の解明研究や薬剤スクリーニング技術としての応用も多いに期待できる。

Reference

- (1) Odawara A, Saitoh Y, Alhebshi AH, Gotoh M, Suzuki I. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014, 443(4), 1176-81