

3次元組織モデル構築による培養神経細胞からの非侵襲シナプス後電位計測技術の開発

The development of non-invasive post-synaptic potential measurement technology from the
3-dimensional tissue model construction by cultured neurons

○菊地 毅(東北工業大学 工学部 知能エレクトロニクス学科)

小田原 あおい(東北大学 大学院医工学研究科)

鈴木 郁郎(東北工業大学 工学部 知能エレクトロニクス学科)

Takeshi KIKUCHI (School of Engineering, Tohoku Institute of Technology)

Aoi ODAWARA (Graduate school of Biomedical Engineering, Tohoku University)

Ikuro SUZUKI (School of Engineering, Tohoku Institute of Technology)

Abstract: Post-synaptic potential measurement methods are critical methods to elucidate the neuronal network function and evaluate the drug responses. However, the measurement technique of post-synaptic potential possible to non-invasive, real-time, and long-term recording in cultured neuronal network in vitro have been not developed yet. The purpose in this study is to develop the measurement method of post-synaptic potentials in cultured neuronal networks with non-invasive and real time. For the this purpose, we constructed 3-dimensional integrated cultured cells, because 3D cultured cells are able to generate the field post synaptic potentials, which consisted of a lot of mono-synaptic potentials. Using this artificial 3D brain slice model and multi-electrode array system, we have been succeeded in recording of field post synaptic potentials (fPSP) from rat hippocampal and cortical cultured neurons. Our method is useful to evaluate the function of post-synaptic potential and the drug responses in cultured human iPSC-derived neurons. Key Words: Artificial brain slice model, planar multi-electrode array chip, sharp wave ripples

1.はじめに

1-1 背景

脳神経系の情報処理は、神経細胞から発せられる活動電位が細胞間のシナプス結合を介して伝搬した活動電位の発火パターンにより行われている。、神経ネットワークの情報伝達場であるシナプス部分では、プレシナプスにおける神経伝達物質の放出、ポストシナプスにおけるシナプス後電位の変化が行われており、神経回路の主要な機能であると共に、多くの神経疾患においてシナプス機能の異常が見られる。近年のヒト iPSC 細胞の発見により、疾患ヒト神経細胞を培養することが可能となり、ヒト細胞のシナプス機能解析によるヒト神経疾患のメカニズム解明、創薬スクリーニングや毒性評価などへが期待されている。しかしながら、培養細胞からポストシナプス電流を非侵襲、長期間、リアルタイム計測できる技術はなく、長期的な薬剤効果や神経回路動態を評価することはできない。そこで本研究では、培養細胞からポストシナプス電流を非侵襲リアルタイム計測できる方法論の開発を目的とした。

1-2 目的

具体的には、脳スライスなどの集合シナプス電流を細胞外で電位変化として検出できる平面微小電極アレイに着目した。2次元の平面培養では、微弱なシナプス後電位を取得することが難しいため、本研究では、培養細胞を3次元集積した組織モデルを用いることで、微弱な単一シナプスの応答を加算した集合シナプス後電位を発生させて、平面微小電極アレイで培養細部からシナプス後電位を取得する技術開発を目的とした。

2.方法

2-1 3次元人工脳スライスモデルの作成方法

コラーゲンゲルとゼラチンの相転移温度を利用して人工脳スライスを作製した。PDMS シートに3×3×2 mm のマイ

クロチャンバを作製し、チャンバ内の壁面にゾル状のゼラチン溶液を薄く塗布後、4℃環境下で冷却しゼラチンをゲル化させた。次に、ゾル状のコラーゲンゲル内にラット胎児から採取した海馬および大脳皮質初代培養細胞を入れよく混和させた後に、先に用意した PDMS チャンバ内に適量播種後、CO₂5%、37℃環境下で90分間インキュベーションした。このときゼラチンはゾル化し、コラーゲンはゲル化することで人工脳スライスを得た。この時の細胞密度は Sample A:90,000 ± 4,000 cells/mm³、Sample B:60,000 ± 4,000cells/mm³、Sample C:30,000 ± 4,000 cells/mm³、コラーゲンゲル濃度は1.6 mg/ml となるように作製した。また、3次元人工脳スライスモデルとの比較するためにコラーゲンゲルのみのスライスを作製した。

2-2 培養

人工脳スライスモデルを Neurobasal Medium、Neuro Brew-21 混合培地を使い、CO₂5%、37℃環境下で培養を行った。

2-3 平面微小電極アレイを用いた機能計測

作製した人工脳スライスモデルから fPSP を計測するために、平面微小電極アレイチップ(MEA:Alpha Med Scientific Inc.)上に脳スライスモデルをマウントし(Fig.1)、その上から錘で押さえつけ計測した。計測には Med 64(Alpha Med Scientific Inc.)を使用し、条件は Low cut filter 0.1Hz で行った。

3.結果と考察

3-1 3次元人工脳スライスモデルの構築

コラーゲンゲル内に神経細胞を内包させて培養したところ、神経突起の伸長が見られ、どの密度においても1か月以上の培養が確認された。また、コラーゲンゲルに内包されている為、培養中に随時平面微小電極アレイ上にマウントできることがわかった。

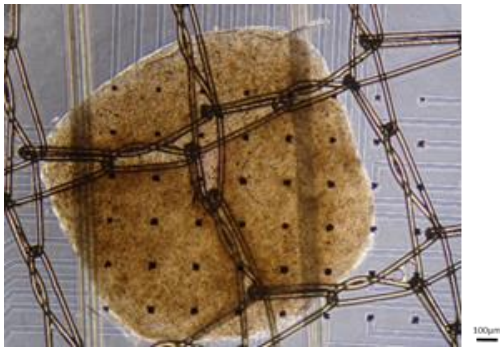


Fig.1 Artificial brain slices on the electrode.
(Sample A: 培養 12 日目)

3-2 fPSP 成分の検出

培養 2 週間前後の Sample A の密度の人工脳スライスから、自発活動計測において活動電位成分ではない数百 ms のゆったりとした電位波形が検出された。また、培養 3 週間前後の Sample B の密度の人工脳スライスからも同様の電位波形が検出された。コラーゲンゲルのみのスライスの反応を計測したところ、これらの遅い成分が検出されなかったことから(Fig.2)、細胞由来の波形であることが確認できた。また、脳スライスで見られるリップル波形も観察された。

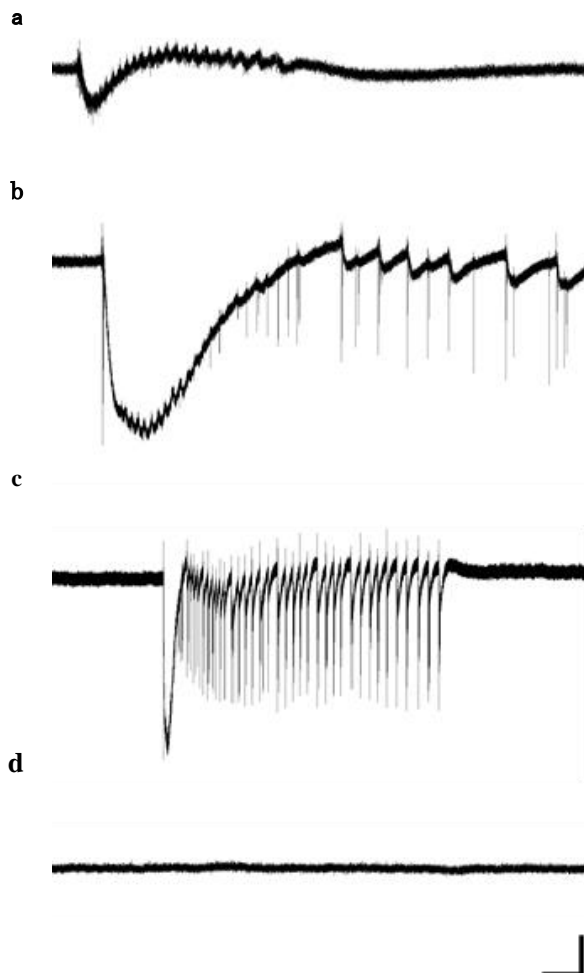


Fig.2 Raw waveform of spontaneous activity.

a :3 次元人工脳スライスから得られた波形(Sample A: 培養 12 日目)b, c :3 次元人工脳スライスから得られた波形(Sample B: 培養 18 日目)d: コラーゲンゲルのみで得られた波形 Scale

bars=50µV/500ms(a,b),50µV/5s(c), 50µV/500ms(d)

4.まとめ

Rat 海馬初代培養細胞を用いた 3 次元人工脳スライスの作製および 3 次元培養に成功した。生体の大脳皮質の細胞密度は 30,000~80,000cells/mm³ であることが分かっているため、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。また、作製した人工脳スライスは 3 次元構造であり、厚みのあるものを作製した。厚さが 150µm 以上を有すると酸素や栄養が供給されなくなり、細胞が死んでしまうといわれているが、今回のサンプルはコラーゲンゲルの支持体があるため、細胞間の隙間に培地が還流したため 150µm 以上のサンプルが培養できたものと考えられる。厚さ 1mm の人工脳スライスにおいて、1 か月以上の培養および自発活動の取得が確認されている。

計測については、人工的に神経細胞を集積化させた 3 次元脳スライスモデルを用いることで、脳スライスで見られる集合シナプス後電位波形と類似の波形が観察された。今回得られた波形は脳スライスで見られるリップル波形も観察された。

波形解析を進めると共に、人工脳スライスと実際のスライスでの応答比較を行い、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた計測法へと展開する予定である。将来的には、疾患患者由来の細胞を用いた人工脳スライスの作製を行い、ヒト神経疾患の解明研究や薬剤評価技術に有効な手段として確立したい。