

感覚情報に対する DRG ニューロンの応答評価系の構築

Construction of electrophysiological evaluation system against sensory information
in cultured DRG neurons

○飯田拓也(東北工業大学 知能エレクトロニクス学科)

三澤 大地(東北工業大学 知能エレクトロニクス学科)

松田 直毅(東北工業大学 大学院工学研究科 電子工学専攻)

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 知能エレクトロニクス学科)

Takuya Iida, School of Engineering, Tohoku Institute of Technology,

Daichi Misawa, School of Engineering, Tohoku Institute of Technology,

Naoki Matsuda, Graduate 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: The DRG neurons are sensory nerve cells, in which take a role to transmitting sense information such as a chemical compound, temperature, pressure and pH from a peripheral nerve system into the central nerve system. These cells are evaluated for the studies such as a pain or the toxicological assay of new compounds. However, electrophysiological assay in cultured DRG neurons has not established yet. In this study, we performed electrophysiological measurement in cultured DRG neurons against chemical compounds and temperature changes using planar microelectrode array (MEA) system. We detected the clear electrophysiological responses against capsaicin, menthol, and temperature changes with concentration dependent manner and dependent on neuronal cell types. These results suggested that MEA measurement in cultured DRG neurons are useful to drug screening and toxicological assays.

Key Words: DRG Neuron, MEA, Temperature, Menthol, Capsaicin

1. 背景

脊髄後根神経節 (DRG) ニューロンは化学物質, 温度, 圧力, pH などの感覚情報を末梢神経から中枢神経へ伝える役割を担っている。また, この DRG ニューロンは, 感覚情報毎に関与するニューロンの種類が異なることが報告されており, 痛み研究や化学物質の毒性評価の対象となっている。しかしながら, DRG ニューロンの電気活動を指標にした評価系は確立していない。痛み関連分子による各種 DRG ニューロンの電気活動を非侵襲的に計測できれば, ニューロン種依存的な電気生理学特性および候補薬剤による応答性を評価でき, 痛み研究や創薬開発を加速するものと考えられる。

2. 目的

本研究では, 神経回路の活動電位を非侵襲多点同時計測できる平面微小電極アレイ (MEA) を用いて, 成体ラット DRG ニューロンの温度変化, メンソール, カプサイシンに対する電気活動の検出を目的とした。

3. 方法

3.1 成体 DRG ニューロンの培養

成体ラット (10 週齢以上) から DRG ニューロンを採取し, laminin-511 コーティングした MEA 上に播種した。Neuro medium (Life tech) に, ウシ胎仔血清 10%, 神経成長因子 100 ng/ml を加えた培地を使い 37°C, CO₂ 5% 下で培養し, 培地交換は 2 日に一度行った。

3.2 活動電位計測法

培養 4 日目, 8 日目に 37°C から 46.5°C まで温度の変化及び, メンソール 100 μM, 200 μM, カプサイシン 100 nM, 200 nM になるように, 投与し, 37°C, 5% CO₂ 下で自発

活動計測を行った。

3.3 解析

電気活動の記録及び取得後のスパイクソーティング, 解析は, Mobius を使用した。生波形抽出には MED64 conductor を使用した。

4 結果

4.1 MEA 上に培養した成体 DRG ニューロン

成体 DRG ニューロンを電極基板上に高密度培養することに成功した。(Fig.1A)。培養 4 日目には, MEA 上の隙間を埋め尽くすように神経突起の伸長が確認され, 電気活動も観測された。また, 培養 2 週間以上の生存を確認した。

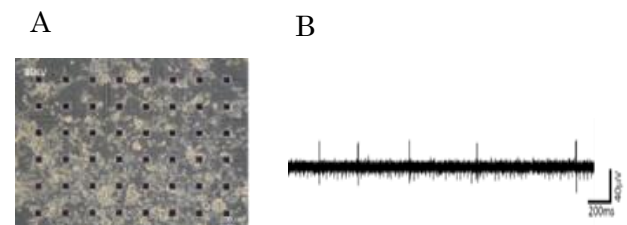


Fig.1 Spontaneous firings in cultured DRG neurons (A)Phase contrast image in cultured DRG neurons on the MEA. (B)Typical Spontaneous firings before drug administration

4.2 温度変化に対する応答

温度を 37°C から 46.5°C まで温度を上昇させていき, 自発活動を計測した (Fig.2)。Figure2 は電極で得られた自発活動の

ラスタープロット表示である。温度上昇とともに自発活動頻度の上昇が見られた (Fig.2).

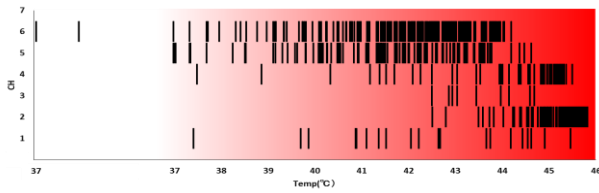


Fig.2 Increase in number of spikes with temperature changed.

4.3 化学物質に対する応答

メンソール投与実験では, 100 μ M, 200 μ M の濃度になるように投与した. その結果, 投与後に顕著に発火頻度が上昇した. Figure3A は, Menthol 100 μ M 投与後の自発活動変化をラスタープロット表示したグラフであり, 3B は典型的な生波形データを示している.

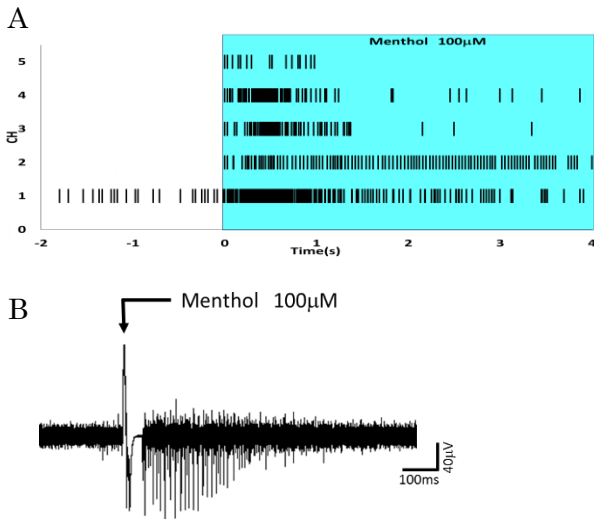


Fig.3 Responses against menthol. (A) Raster plots before and after menthol 100 μ M administration. (B)Typical raw waveform.

カプサイシン投与実験では, 100 nM, 200 nM の濃度になるように投与した. メンソールと同様に投与後顕著に発火頻度の上昇が見られた (Fig.4) .

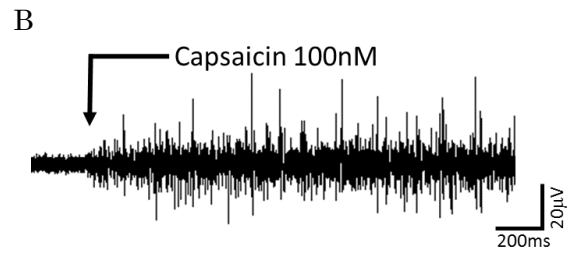
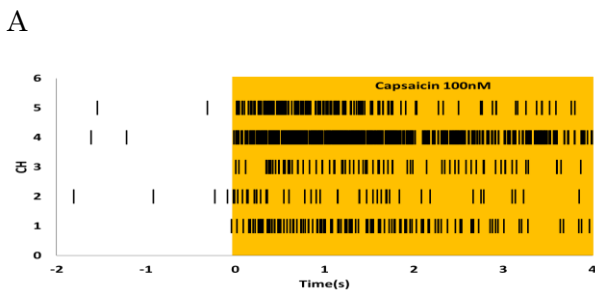


Fig.4 Responses against capsaicin. (A) Raster plots Before and after capsaicin 100 nM administration. (B)Typical raw waveform.

4.4 活動パターンの分類

個々のニューロンによる発火パターンの変化を解析したところ, 投与後に初めて活動を示すニューロン(Type1), 5Hz以下の発火が投与前に認められたニューロン(Type2), 5Hz以上の発火が投与前に認められたニューロン(Type3), 周期的な発火を示すニューロン(Type4)の大きく4つに分類された. Type1, 2はメンソール投与直後に活動が上昇し, 1分以内に減少する発火を示した. Type3は投与直後の顕著な発火数の上昇は見られなかった. Type4は周期が早くなったり, 乱れたりする現象が観察された. Figure5にはメンソールを使用した, カプサイシンでも Type 別の応答を観察することができた.

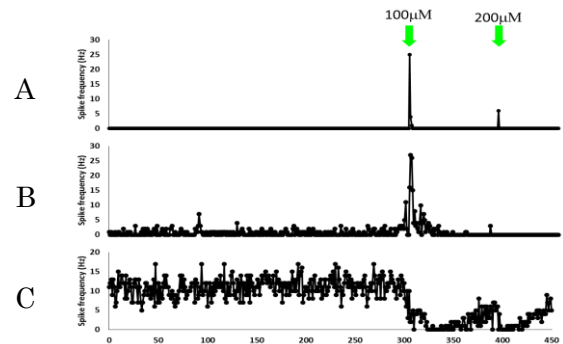


Fig.5 Menthol response dependent on firing pattern before administration. (A)Type1 neuron, (B)Type2 neuron, (C)Type3 neuron.

5 まとめ

メンソール投与実験では, 100 μ M, 200 μ M, カプサイシン投与実験では, 100 nM, 200 nM の濃度において, 顕著に活動頻度が上昇した. また, 温度上昇と共に活動頻度の上昇を検出した. これらの結果から, カプサイシンや 42°C で応答する TRPV1 チャンネル, およびメンソールなどの冷刺激に応答する TRPM8 チャンネルに対する応答が平面微小電極アレイで取得できることがわかった. 電気的応答は個々の細胞で異なり, DRG ニューロンの細胞種に依存した痛みおよび温度感受性の電気生理学的特性を効率的かつ即日計測できることがわかった. 平面微小電極アレイを用いた DRG ニューロンの化合物応答評価法は, 痛み研究および化合物の毒性評価法として有効であることが示唆された.