

ヒト iPS 細胞由来ニューロンのエレクトロセンシング技術の開発

Development of electro-sensing techniques in human iPSC derived neurons

2041015



研究代表者

東北工業大学

講 師

鈴木 郁 郎

[研究の目的]

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、培養した神経細胞の機能に着目した評価系が確立していないことがボトルネックとなっている。本研究では、神経ネットワークの情報伝達場であるシナプス機能（プレシナプスから放出される神経伝達物質とポストシナプス電位）を培養細胞から非侵襲、長期間、リアルタイムに定量計測可能なオンチップエレクトロセンシング技術の開発を目的とする。具体的には、カーボンナノチューブ微小電極を用いた神経伝達物質計測技術と人工的に構築した3次元脳組織モデルによるシナプス後電位計測技術の開発である。

[研究内容, 成果]

1. 微小櫛型カーボンナノチューブ電極を用いた神経伝達物質のリアルタイム計測技術の開発

培養細胞から放出される神経伝達物質を計測するために、電極上に細胞を培養し、電気化学

計測にて計測する手法に着目した。微量な神経伝達物質をリアルタイムに計測するためには、高感度な電極を作製する必要がある。我々は、電極材料としてカーボンナノチューブ、電極構造として微小櫛型電極に着目し、独自に開発したカーボンナノチューブ電解めっき法を用いて電極の開発を行った。櫛型電極は、酸化電極と還元電極が交互に配置されており、電気化学活性種の酸化還元が繰り返し行われるレドックスサイクルにて、検出される電流値を増大させる技術である。

微細加工技術で作製した ITO 櫛型電極上に竹筒型構造を有している多層カーボンナノチューブを電解めっきによりコーティングした。作製した電極上にヒト iPS 細胞由来ニューロンを培養し、電気化学計測であるクロノアンペロメトリー法で計測を行った。図 1A はカーボンナノチューブ櫛型電極上に培養したヒト iPS 細胞由来ニューロンを計測後に免疫化学染色した画像である。神経細胞のマーカーとして MAP2 抗体 (緑), ドーパミンニューロンのマーカーとして Tyrosine Hydroxylase 抗体 (赤) を用いて染色した。約 20% のニューロンがドーパミンニューロンであり、電極上に培養されていることが確かめられた。図 1B はドーパミンの酸化電位である 0.3 V に片側の酸化電極を固定し、-0.25 V に対する還元電極を固定して電流計測した結果である。神経細胞からの

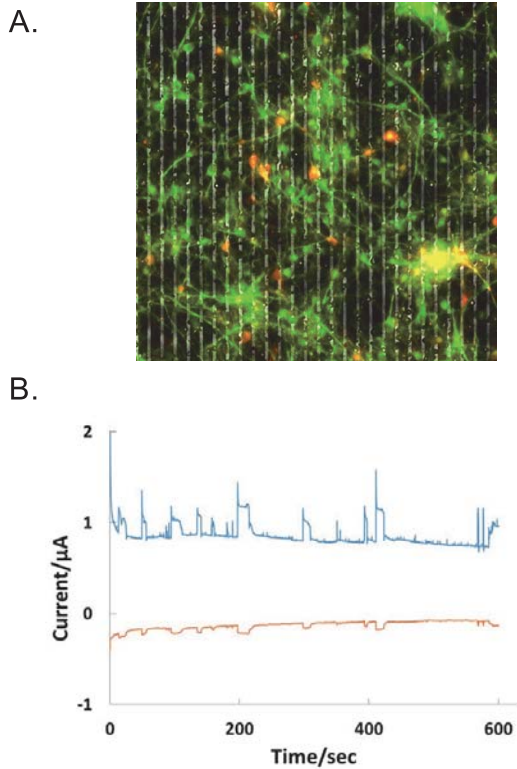


図1 カーボンナノチューブ微小櫛型電極上に培養したヒト iPS 細胞由来ニューロンとドーパミン放出のリアルタイム計測

ドーパミン放出が電流値の変化として観察された。青が酸化電極でオレンジが還元電極から得られた電流値である。0 V 固定化では電流値は得られず、ドーパミン取り込み阻害薬投与において、電流値の上昇が得られたこと、ドーパミンニューロンが混在しない、グルタミン酸ニューロンおよび GABA ニューロンからは電流値の変化は見られなかったことから、ドーパミンの反応であることがわかった。

これらの結果により、作製したカーボンナノチューブ微小櫛型電極によりヒト iPS 細胞由来ニューロンから放出されるドーパミンをリアルタイムかつ高感度に計測できることが示唆された。

2. 3次元人工脳スライスモデルを用いたシナプス後電位計測技術の開発

神経ネットワークの情報伝達場であるシナプス機能を調べる上で最も重要な計測としてシナ

プス後電位計測がある。しかしながら、培養細胞から非侵襲、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、本研究開発では、人工的に脳スライスモデルを3次元再構築することで、集合シナプス後電位を発生させ、細胞外で電位計測する技術の開発を行った。3次元組織化することで微弱なシナプス電流を集合させて計測するアイデアである。

コラーゲング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 $2 \times 2 \times 2$ 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°C 環境下で冷却しゼラチンをゲル化させた。次に、細胞を懸濁したゾル状のコラーゲンを PDMS チャンバ内に適量播種後、 CO_2 5%, 37°C 環境下で 30 分間インキュベーションした。ゼラチンがゾル化し、コラーゲンはゲル化することで人工3次元脳スライスを得ることができた。

ゲル内での細胞の生存と密度を確かめるために、切片を作製し、HE 染色を行った。(図2)

HE 染色の結果、厚さ約 2 mm の組織モデルであり、満遍なく細胞が分散し、3次元ゲル内に生存していることがわかった。また、密度を計算したところ $58,867 \pm 2,016 \text{ cell/mm}^3$ であり、ヒト大脳皮質の細胞密度 $30,000 \sim 80,000 \text{ cell/mm}^3$ と同等の細胞密度を有していた。

作製した人工脳スライスモデルから集合シナ

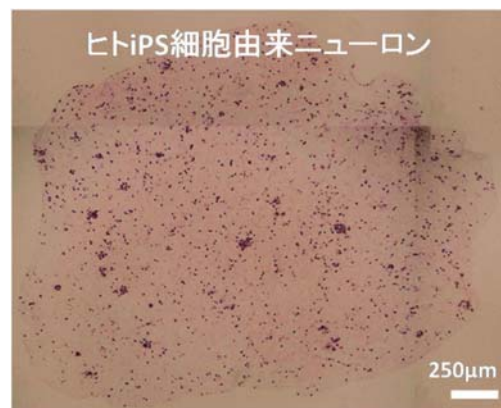


図2 人工3次元神経組織モデルのZ軸断面のHE染色画像

プス後電位 (fPSP) を計測するために、平面微小多電極アレイチップ上に脳スライスモデルをマウントし、計測した (図 3)。計測装置は MED64 (Alpha Med Scientific Inc.) を使用した。fPSP を計測するため、Low cut filter 1 Hz に設定し、37°C, CO₂ 5% のインキュベーター内で計測を行った。刺激応答実験は、Single Pulse 刺激を人工脳スライスに $-50 \mu\text{A}$ から $-70 \mu\text{A}$ の電流値で与え、刺激後の応答を計測した。また、取得波形が細胞由来であることを確かめるために、計測後、サンプルを 4°C で 1 時間冷蔵し、同様の計測を行った。図 3A は得られた自発活動データを示している。

自発活動計測をした結果、ゆったりとした成分の波形が観察された。緩やかな波形の変動中にスパイク成分 (活動電位) が観察されたこと、4°C では波形が見られなかったことから、細胞由来の波形であることが確認された。また、電気刺激計測においても、同様の波形成分が観察された。電気刺激に対する応答が観察されたことから、脳スライスで行われているシナプス後電位の解析と同様のことが、人工 3 次元神経組織モデルにおいてもできることが示唆された。

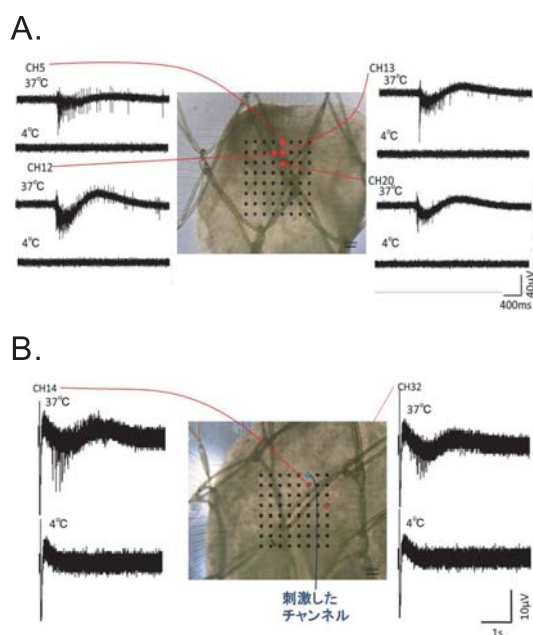


図 3 人工 3 次元神経組織モデルを用いた平面微小多電極アレイによる細胞外電位計測

得られた波形がシナプス活動の変化によってどのように変化するかを調べるために、代表的なシナプス受容体阻害剤の投与実験と高頻度電気刺激による効果を検討した。電気刺激に対する応答に着目して得られた波形 (緩やかな成分) の面積、高さ、深さ、傾きとスパイク成分であるスパイク数、バースト発火時間をそれぞれ比較解析した。

図 4 は、GABA-A 受容体の阻害剤である Bicuculline, NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害剤である D-AP5, AMPA 型グルタミン酸受容体の阻害剤である CNXQ を投与した時に得られた波形を解析した結果である。波形の面

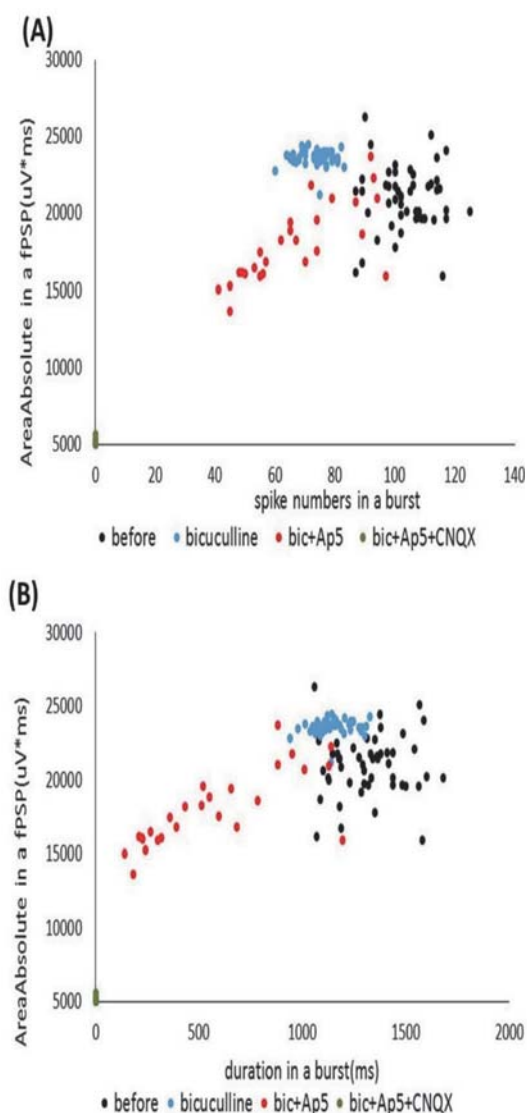


図 4 波形成分解析

積 v.s. スパイク数, 波形の面積 v.s. バースト発火時間を示しているが, スパイク成分と波形の面積には相関関係は見られなかった。また, 薬剤により, 分布が分かれていることがわかった。これらの結果より, 緩やかな波形成分はスパイク数に必ずしも依存しないことがわかり, シナプス電流由来である可能性が示唆された。

[今後の研究の方向, 課題]

カーボンナノチューブの電解めっき技術を用いて, カーボンナノチューブ微小櫛型電極を作製した。作製したカーボンナノチューブ櫛型電極チップ上にヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロンを培養したところ, 培養2週間目以降において, 細胞から放出されるドーパミンのリアルタイム計測に成功した。ヒト iPS 細胞由来ニューロンからの神経伝達物質をリアルタイムに計測した世界初の事例であり, 本技術は今後のヒト神経疾患メカニズムの解明や薬剤スクリーニング技術などへの応用が期待できると考えている。得られた波形からのドーパミン濃度の算出やより少数のドーパミンニューロンからの応答を検出することが今後の課題である。

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 fPSP 波形と類似の波形が観察された。

その波形は細胞由来の波形であり, 薬剤投与において変化が見られた。本研究により, 培養細胞からシナプス後電位を計測できる可能性が示唆された。今後, 得られた波形がシナプス後電流由来の波形であるかを脳スライスデータとの比較検証, およびパッチクランプ法との同時計測などによる直接的検証が必要であると考えている。

[成果の発表]

- (1) M. Fukuda, K. Shirakawa, H. Jiko, I. Suzuki: Carbon nanotube multi-electrode array chips for noninvasive real-time measurement of dopamine, action potentials, and postsynaptic potentials, 9th MEA meeting, 2014
- (2) I. Suzuki: Noninvasive real-time measurement of dopamine, action potentials, and postsynaptic potentials using carbon nanotube electrodes chip, 第52回日本生物物理学会, 2014
- (3) 長谷川裕士, 北村渉, 鈴木郁郎: 高感度神経伝達物質計測を可能にするカーボンナノチューブ平面微小電極アレイの開発, H27 年度東北地区若手研究者研究発表会
- (4) 港広大, 北村渉, 長谷川裕士, 鈴木郁郎: カーボンナノチューブ微小平面電極を用いた H₂O₂ の高感度計測法の開発, H27 年度東北地区若手研究者研究発表会
- (5) 船橋祐貴, 青木俊輔, 小田原あおい, 鈴木郁郎: 3次元人工脳スライスモデルの用いたシナプス後電位計測技術の開発, H27 年度東北地区若手研究者研究発表会