

神経細胞遊走制御のためのセルケージパターンを有する培養基板の作製とその性能評価

Manufacturing of culture substrates with cell-cage patterns to enclose neuronal cells and their evaluation

名大¹, JST-CREST², 東大³, 分子研⁴

○西藤(後藤) 美穂^{1, 2}, 王 志宏^{1, 2}, 楠本 康司^{1, 2, 3}, 高田 紀子⁴, 村上 真菜^{1, 2},

長岡 靖崇^{1, 2}, 鈴木 好則^{1, 2}, 宇野 秀隆^{1, 2}, 宇理須 恒雄^{1, 2}

Nagoya Univ.¹, JST-CREST², The Univ. of Tokyo³, I.M.S.⁴

○M. Goto-Saitoh^{1, 2}, Z.-H. Wang^{1, 2}, K. Kusumoto^{1, 2, 3}, N. Takada⁴, M. Murakami^{1, 2},

Y. Nagaoka^{1, 2}, Y. Suzuki^{1, 2}, H. Uno^{1, 2}, T. Urisu^{1, 2}

E-mail: saito-goto.miho@nanobio.nagoya-u.ac.jp

神経ネットワークの構造とそのダイナミクスを対応付けて明らかにすることは、脳の活動を理解する上で有効な手法である。本グループでは神経ネットワークにおける多点細胞内電流計測が可能な培養型多点プレーナリーパッチクランプの開発に取り組んできた。これは、培養底面に作製された直径 2 μm の微細貫通孔を通して細胞内電流を測定する手法であり、微細貫通孔の上に神経細胞を培養することが要求される。しかし、神経細胞の培養環境に対する繊細さや遊走活動により神経細胞を微細貫通孔の位置に固定しながら培養することが困難であるという課題があった。そこで、本研究では、微細貫通孔の周りに円柱型の微細構造を持つパターン(セルケージパターン)付培養基板を作製し、これらの円柱で細胞の運動可能領域を制限する方法を考案した。

パターン付培養基板の作製は、(1) ポジレジスト AZ-P4903 を用いた金型マスターモールドの作製、(2) ポリメタクリル酸メチル樹脂(Poly-methyl methacrylate; PMMA) 上へのホットエンボスを用いた転写、(3) 基板底面への Deep X-ray Lithography を用いた微細貫通孔の作製の順に行う。細胞播種には、胎生 17 日目のラット脳から大脳皮質及び海馬由来の神経細胞を採取した。11 mm 角の基板中央に 2×10^5 個の細胞を播種した。神経ネットワークの形成過程を観察す

るために、顕微鏡下に専用の培養環境を構築し、タイムラプスによる観察を行った(図 1)。

播種直後から 2 DIV までのネットワーク形成の様子を図 2 に示す。細胞がパターンの中で成長しネットワークを形成している様子が分かる。パターン付基板を用いた培養では、細胞が微細貫通孔の上に存在する割合が多いことを確認しており、パターンは細胞の遊走活動の抑制に一定の効果があるものと考えられる。本発表では、パターンの有無による細胞運動の範囲の違いを評価し比較した結果について報告する。

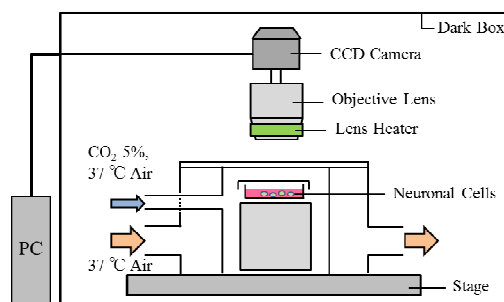


Fig. 1 A schematic of time-laps microscopy.

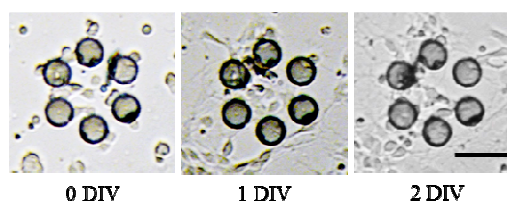


Fig. 2 Neuronal cells cultured in a cell-cage pattern.