

セルケージ構造を用いた基板上で規則的に配置された *in vitro* 神経細胞ネットワークの
カルシウムイメージング
Calcium imaging of *in vitro* neural network regularly arranged on a substrate
with cell-cage pattern

名大革新ナノバイオデバイス研究センター¹, JST-CREST², 名大環境医学研究所³

○長岡靖崇^{1,2}, Wang Zhi-hong^{1,2}, 小松由紀夫³, 宇理須恒雄^{1,2}

Nagoya Univ. FIRST Research Center for Innovative Nanobiodevices¹, JST-CREST², Nagoya Univ. RIEM³

○Y. Nagaoka^{1,2}, Z-H.Wang^{1,2}, Y. Komatsu³, T. Urisu^{1,2}

E-mail: nagaoka.yasutaka@j.mbox.nagoya-u.ac.jp

筋萎縮側索硬化症(ALS)やアルツハイマー病は長年にわたる研究にもかかわらず、未だ原因も確たる治療法も不明の難病である。このような状態にある理由は、一つは、患者の存命中に患部である脳の神経細胞を採取できないため、研究の大きな障害となっていることが挙げられるが、この点は、最近の iPS 細胞や ES 細胞の研究の進展により大幅に改善される可能性が見えてきた。これらの神経変性疾患の研究が遅れているもう一つの大きな理由は、*in vitro* の神経細胞ネットワークの形成法や研究手法が非常に遅れていることが挙げられる。神経細胞ネットワークの特性を解析するためには、電気生理的計測法が非常に重要であるが、神経細胞の多点で同時にイオンチャンネル電流を計測できる手法は開発されていない。この点については、我々のグループでは最近培養型プレーナーパッチクランプ法を開発し、ラット大脳皮質の初代培養神経細胞ネットワークからのイオンチャンネル電流の計測に成功しており、多点計測が原理的に可能な手法であることから、近い将来、多点計測が実現すると予測される。すると最後に残る課題は、どのようなネットワークを形成すれば、疾患即ち神経細胞ネットワークの異常を表現できるかという問題である。先に神経細胞のカルシウムイメージング実験において、細胞密度が高いと、多数の細胞が同期して自然発火をし始めることを報告したが、このような高密度なネットワークでは、疾患の初期症状のようなネットワークのわずかな異常を表現することは難しいと考えられる。また、逆に密度が低すぎて、自然発火がほとんど起こらないような構造においても、わずかな異常を反映することは困難と考えられる。本研究では、この適切な細胞密度を探す目的で、色々なネットワークを形成する手法を用いて、このネットワークにおける神経細胞の活動の様子をカルシウムイメージングによって調べる実験を行った。

我々は先に、細胞体の位置を固定してネットワークを形成し、1ヶ月以上の長期の培養が可能な基板構造として、セルケージパターンを有する基板を提案し利用している。培養基板にはセルケージ構造の配置密度の異なる複数のエリアがあり、意図的に調節された多様なネットワーク密度の神経細胞を観察することが可能である。培養基板にはラットの大脳皮質細胞を分散播種し、2週間培養を行って神経ネットワークを形成させた。細胞にカルシウム感受性蛍光色素 Oregon green BAPTA-1 を取り込ませた後、蛍光顕微鏡下でカルシウムイメージングを行った(Fig. 1)。基板上にはセルケージが 2mm 四方内に縦横 5×5 個、7×7 個、9×9 個配置された領域が存在し、それぞれの領域で密度の異なる神経細胞ネットワークが形成され、神経細胞が活動する様子を観察することに成功した。自然発火によるものと

考えられる短いピークを持つシグナルや、細胞内小器官のカルシウム放出によると考えられる幅広いピークを持つシグナルが観察された。

この手法は細胞の密度・配置が同程度に調節された神経ネットワークを複数回再現することが可能であり、今後多様な密度の神経細胞ネットワークの活動を比較することで、適切なネットワーク構造を統計的に模索・検討することが出来ると期待される。

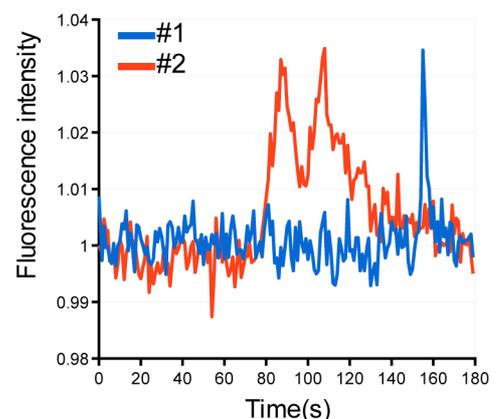
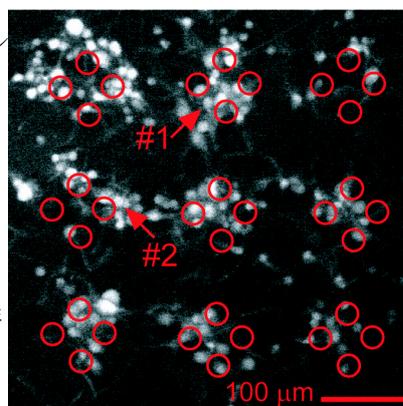


Fig. 1. Left: Fluorescence image of nerve cells with Oregon green BAPTA-1 on a PMMA substrate. Red circles shows pillars of cell-cage structures. 9×9 cages are arranged in 2×2 mm square-shaped area. Right: Time-lapse changes of fluorescence intensity of 2 cells indicated by arrows in left figure.