

マイクロパターン上での培養による興奮性-抑制性神経細胞の非標識判別

Specific developmental timings of excitatory and inhibitory neurons cultured on micropatterns

早大理工¹, 早大高等研², 早大ナノテク³ ◯櫛田昂歳¹, 河野 翔¹, 山本英明^{2,3}, 谷井孝至^{1,3}

Waseda Univ. ◯Takatoshi Kushida, Sho Kono, Hideaki Yamamoto, Takashi Tanii

E-mail: h-yamamoto@ruri.waseda.jp

【背景・目的】 大脳皮質の主要な神経回路はグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞と GABA 作動性の抑制性神経細胞からなる。興奮性細胞と抑制性細胞はそれぞれ特異的な遺伝子発現パターンを有するため、その違いに基づいて両者を判別できるが、そのためには免疫染色法や遺伝子導入といった化学固定や蛍光標識を前提とする手法に頼らざるを得なかった。分散培養系において神経細胞の種類を、生かした状態で、かつ非標識で判別できれば、単一細胞内の分子イメージングや神経細胞回路を再構成する際に大きな利点となる。

これまでに、興奮性細胞と抑制性細胞とでは極性形成時期に差があることが知られている[1]。また、異なる長さを持つ複数のラインパターンに沿ってある細胞の神経突起を伸長させると、最も長いラインに沿って伸長した突起が将来軸索になることを私たちは見出している[2]。前者は興奮性細胞と抑制性細胞の判別の基準として、後者は非標識で軸索を判別するのに活用できる。そこで今回、両者を組み合わせた新しい判別法—マイクロパターン上で神経細胞を培養し、ラインパターンに沿って伸長する軸索の伸長速度を計測するだけで、その神経細胞が興奮性／抑制性細胞のどちらであるかを判別する方法—を実験的に検証した。

【実験方法】 電子線リソグラフィーを用いて、カバーガラス上に poly-D-lysine (細胞接着領域) と mPEG シラン膜(接着抑制領域)とからなるパターン(図 1a)を作製した。神経細胞は胎生 18 日目のラット大脳皮質より採取し、MEM/N2.1 培地でグリア細胞と共培養した。培養開始から 2-7 日目において、24 時間毎に細胞の形態を観察し、軸索の伸長速度を計測した。その後、MAP2 (全神経細胞)と GAD67 (抑制性 (GABA 作動性) 神経細胞)を用いた免疫蛍光染色を施し、最終的に各細胞が興奮性／抑制性細胞のどちらであるかを決定した。

【結果・考察】 興奮性細胞と抑制性細胞の成長の様子を、それぞれ図 1 b, c に示す。この様な観察に基づいて、興奮性細胞 ($n=17$ 細胞)と抑制性細胞 ($n=4$ 細胞)の培養日数と軸索の長さの関係を求めたところ、抑制性神経細胞の軸索伸長速度が興奮性神経細胞の軸索伸長速度よりも遅いことが分かった(図 2)。また、軸索長による判別時期を培養 6 日目に設定し、なおかつ閾値を 120 μm にすると、興奮性と抑制性の軸索長に対する統計的有意差が最大となった。マイクロパターンを活用して培養神経細胞の形状を描えたことが、軸索成長速度の違いを明確にし、有効な統計的優位差をもたらしたと考えている。

本研究は、科研費・研究活動スタート支援ならびに早稲田大学・特定課題研究の支援を受けて行われた。

参考文献: [1] K. Hayashi *et al.*, J. Cell Sci. 116 (2003) 4419. [2] H. Yamamoto *et al.*, J. Neurochem. 123 (2012) 904.

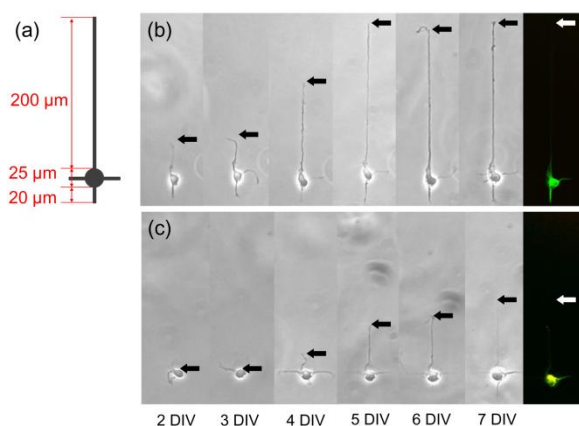


図1. マイクロ加工基板上で培養した神経細胞。(a) パターン形状。興奮性(b)と抑制性(c)細胞の位相差像と免疫染色像(緑:MAP2, 赤:GAD67)。

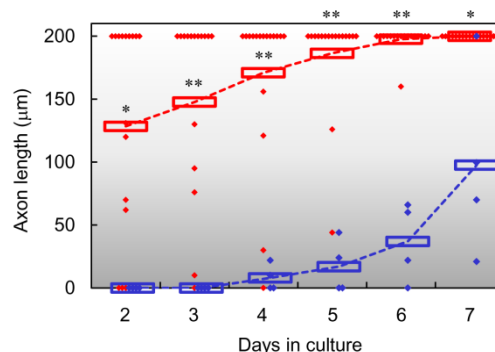


図2. 興奮性(赤)と抑制性(青)神経細胞の培養日数と軸索長の関係。プロットは各細胞の長さを、横棒は平均値を表す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney U-test).