

ハイドロゲル膜を用いた神経細胞-グリア細胞の接触共培養系の確立

A neuron-glia coculture system with direct cellular contact using hydrogel sheet

○松村 亮佑^{1,4}, 山本 英明^{2,5}, 平野 愛弓^{1,5}, 庭野 道夫^{1,3,5}

(1. 東北大院医工, 2. 東北大学際研, 3. 東北大通研, 4. 学振 DC1, 5. CREST-JST)

○Ryosuke Matsumura^{1,4}, Hideaki Yamamoto^{2,5}, Ayumi Hirano-Iwata^{1,5}, Michio Niwano^{3,5}

(1. Grad. Sch. Biomed. Eng., 2. FRIS, 3. RIEC, Tohoku Univ., 4. JSPS, 5. CREST-JST)

E-mail: ryosuke.matsumura@bme.tohoku.ac.jp

【緒言】生体医学や薬理学研究において生体組織の *in vitro* (生体外) モデルが求められている。脳のモデルを構築する際には、その機能素子である神経細胞を構造化しながら、神経系の支持細胞であるグリア細胞 (アストロサイト) を共培養することが望ましい。共培養法には、単層培養したアストロサイトの上に神経細胞を培養する手法[1]や、両者を別々の基板上で育て、それらを 0.5 mm 程度のスペーサを介して向かい合わせて培養する手法[2]などが用いられることが多い。しかし、前者では神経細胞の配置制御をアストロサイトが妨げるという問題、また後者では、神経細胞のシナプス接合の形成と成熟化を促すアストロサイトとの物理的な接触がないという問題がある。そこで本研究では低分子を透過させるハイドロゲル上にアストロサイトを育て、それを神経細胞の上に被せて培養するという新しい共培養系を提案する。

【実験】I 型コラーゲンのゲルシートを作製し[3], アストロサイトをその上に播種した。2 日間培養した後、ラット海馬神経細胞の上に、アストロサイトが神経細胞に直接接触するようにコラーゲンシートを被せた。

【結果・考察】アストロサイトは通常、基板上で扁平な形態を取るが、コラーゲンシート上では伸展せずに複数の細胞が丸い塊を形成した(Fig. 1a)。そこでコラーゲンシートに別の細胞培養支持分子であるポリリジンを吸着させたところ、アストロサイトを正常な形態で培養できた(Fig. 1b,c)。さらに培養を続けるとアストロサイトは増殖し、コラーゲンシート上に密に存在するようになる。これを神経細胞の上に被せたところ、12 日間に渡って神経細胞を培養できることを確認した(Fig. 2)。対照実験としてコラーゲンゲルの代わりにカバーガラス上に培養したアストロサイトを神経細胞に被せて培養したところ、数日以内に全ての細胞が死滅した。コラーゲンゲルを用いた場合では、その物質透過性によって、酸素やグルコースなどの細胞の成長に必要な低分子の供給が妨げられなかったため、神経細胞が安定に培養ができたと考えられる。この培養法では、事後的にアストロサイト層を剥離し、神経細胞の純粋培養系を取り戻すことができるため、例えば神経活動計測などの実験において有用である。

[1] H. Kawano, S. Katsurabayashi *et al.*, *PLoS ONE*, **7**, e48034 (2012). [2] S. Kaech, G. Banker, *Nature Prot.*, **1**, 2406-2415 (2006). [3] T. Takezawa, K. Ozaki, A. Nitani, T. Shimo-Oka, *Cell Transplant*, **13**, 463-473 (2004).]

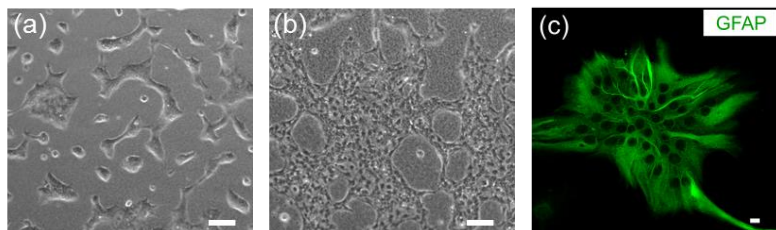


Fig. 1 (a,b) Bright-field images of astrocytes on collagen sheet at 1 DIV (a) without and (b) with poly-lysine treatment. (c) Fluorescent micrograph of astrocytes at 5 DIV on collagen sheet with poly-lysine stained with an astrocyte marker, GFAP. Scale bars, 10 μ m.

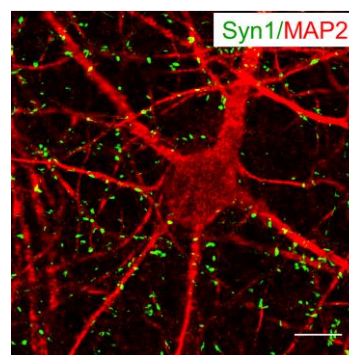


Fig. 2 Fluorescence micrograph of a rat hippocampal neuron (12 DIV) stained with MAP2 (neuronal marker) and Syn1 (presynaptic marker). The cell was cocultured with astrocytes on hydrogel sheet for 10 days. Scale bars, 10 μ m.