

薄膜型 PDMS マイクロ流路を用いた微小神経細胞回路のパターン培養

Patterning mesoscale neuronal networks using thin PDMS microfluidic films

東北大通研¹ 東北大 AIMR²

○竹室汰貴¹, 山本英明¹, 佐藤茂雄¹, 平野愛弓^{1,2}

RIEC¹ and AIMR², Tohoku Univ.

○T. Takemuro¹, H. Yamamoto¹, S. Sato¹, A. Hirano-Iwata^{1,2}

E-mail: taiki.takemuro.p5@dc.tohoku.ac.jp

【背景・目的】PDMS (polydimethylsiloxane)マイクロ流路は、その安定性と再現性の高さから、細胞パターンニングを含むバイオエンジニアリング研究に広く用いられている(Zhang et al., Lab Chip 2017 など). しかし、マイクロ流路と溶液を結ぶ貫通孔はパンチャーなどを用いて作製されることが多く、数十から百個程度の細胞から構成される微小神経細胞回路をパターン培養するためのデバイスはあまり提案されてこなかった. 本研究では、百 μm 単位の微小貫通孔アレイを持つ薄膜型マイクロ流路をドロップキャスト法に基づいて簡便に作製するプロセスを確立した. そして、生体神経回路を特徴づけるモジュール構造を有する培養神経回路を作製し、その活動パターン構造依存性を解析した.

【実験方法】マイクロ流路を形成する際のモールドは、洗浄したシリコン基板にフォトレジスト(SU-8 3010 および 3050)をパターンニングして形成した(図 1a). このモールドにゲル状のPDMSを挿入し、熱硬化した後に剥離した. このPDMSフィルムを洗浄・UV滅菌し、poly-D-lysineをコートしたガラス基板に貼り付けることで細胞パターンニングのための基板(図 1b)を作製した. マイクロ流路の構造は先行研究(Yamamoto et al. Sci. Adv. 2018)に倣って、 $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ の正方形パターンや、 $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ の正方形4つを幅 $10 \mu\text{m}$ の直線流路で接続したモジュール構造型パターンを作製した. 作製したデバイス上に胎生18日ラット大脳皮質から採取した神経細胞を播種し(播種密度: $7.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$), 培養10日目に自発活動や刺激応答を蛍光カルシウムイメージング法により計測した.

【結果と考察】作製した薄膜型マイクロ流路を用いてパターンニングを行った培養神経回路を図 1(c)に示す. 回路を構成する細胞数にはばらつきがあったものの、おおよそ70-130細胞程度の範囲に収まっていた(100.4 ± 23.0 個). 正方形パターンとモジュール構造パターンの神経回路の自発活動を比較すると、正方形パターンにおいては回路内の神経回路が強く同期した活動が支配的であるのに対して、モジュール構造パターンでは、複数種類の部分同期が混在する複雑な発火様式が先行研究同様に測定された.

共焦点レーザー顕微鏡を用いて薄膜型マイクロ流路の3次元形状を計測したところ、PDMS膜厚は $96.0 \pm 19.4 \mu\text{m}$, 流路の線幅は $11.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ であり、デバイス作製における再現性の高さが示された. 神経軸索の成長本数はマイクロ流路の幅や高さにより制御可能なため(Peyrin et al. Lab Chip 2011), PDMSマイクロ流路を用いることにより、神経回路におけるモジュール間の相互作用を制御させられる可能性がある. 発表では、線幅の異なるマイクロ流路により結ばれた神経回路の活動についても報告する予定である.

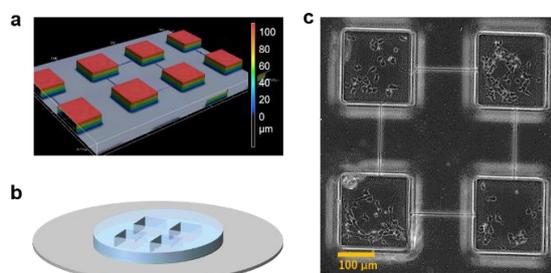


Fig. 1: (a) Master mold. (b) Schematic of the PDMS microfluidic film bonded onto a poly-D-lysine coated coverslip. (c) Primary neurons grown in a modular micropattern.