

マイクロパターン培養神経回路に対する光摂動系の構築

An optical perturbation system for micropatterned neuronal networks

東北大通研¹, 東北大院医工², 東北大院薬³, バルセロナ大⁴, 東北大 AIMR⁵

○竹室汰貴^{1,2}, 山本英明¹, 脇村桂^{1,2}, 住拓磨^{1,2}, 金野智浩³, 佐藤茂雄¹, Jordi Soriano⁴, 平野愛弓^{1,2,5}

RIEC¹, Grad. Sch. Biomed. Eng.², Grad. Sch. Pharm. Sci.³, Tohoku Univ., Univ. Barcelona⁴, AIMR, Tohoku Univ.⁵

T. Takemuro^{1,2}, H. Yamamoto¹, K. Wakimura^{1,2}, T. Sumi^{1,2}, T. Konno³, S. Sato¹, J. Soriano⁴, A. Hirano-Iwata^{1,2,5}

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

【背景・目的】哺乳類の脳において、知覚情報処理は大腦皮質で担われている。感覚器からの信号の多くは視床と呼ばれる皮質下領域を介して大腦皮質に入力されるが、近年の大腦生理学の研究により、感覚器からの入力が無い状態でも、視床から大腦皮質に対して相関の低い信号が送られていることが示された (Lampl et al., Nature Commun. 2016)。しかし、このバックグラウンドの入力の機能的な役割は明らかになっていない。そこで本研究では、回路の性状が厳密に規定されたマイクロパターン神経回路に対する光摂動系を構築し、時空間的に無相関な入力信号が神経回路の活動パターンに及ぼす影響を解析したので、その結果を報告する。

【実験方法】ガラス基板上に細胞接着阻害膜としてシランカップリング型 MPC(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)ポリマー (Y. Xu et al., Lab Chip 2006) を修飾し、細胞接着領域として poly-D-lysine と細胞外基質ゲルをパターンニングすることで、細胞培養のためのテンプレート基板を作製した (H. Yamamoto et al., Sci. Adv. 2018)。この基板上にラット大腦皮質神経細胞を播種し、培養 4 日目にアデノ随伴ウイルスを使用して蛍光 Ca プローブ GCaMP6s と赤色光応答型カチオンチャンネル ChrimsonR を遺伝子導入した。神経活動計測は、培養 10, 11 日目に蛍光 Ca イメージング法 (励起波長 470-495 nm, 蛍光波長 510-550 nm) を用いて行った。倒立型蛍光顕微鏡の落射照明ポートにパターン光照射装置を設置し、中心波長 623 nm の LED 光を神経細胞に照射することにより光応答性イオンチャンネルを活性化させ、神経細胞を刺激した。

【結果と考察】今回の実験では、一辺の長さが 400 μm の正方形マイクロパターンを使用した (図(a))。正方形の下部から ChrimsonR が発現している細胞を 10 個選択し、刺激対象とした。各細胞を 40% の確率でランダムに選ぶことで 750 枚の光照射パターンを生成し、これを 400 ms 間隔で切り替えて細胞に照射した (図(b))。蛍光 Ca イメージングで計測した神経活動データを解析したところ、刺激印加前後の自発活動時に比べて、刺激印可時には神経細胞間の平均相関係数が有意に低下し ($p < 0.05$)、また神経活動の複雑性の指標である functional complexity の値も刺激印加時に有意に上昇した ($p < 0.05$) (図(c))。興味深いことに、高濃度 K⁺刺激によりすべての神経細胞の興奮性を一斉に上昇させた場合には、平均相関係数が逆に上昇し、functional complexity が低下した。この結果は、視床から大腦皮質への投射を切断すると大腦皮質が過剰に同期することを示した先行研究 (Chang et al., Epilepsia 2011) とも整合するものであり、視床からのバックグラウンド入力是大腦皮質において同期抑制を通じて統合分離均衡(integration-segregation balance)を調整している可能性を示唆している。

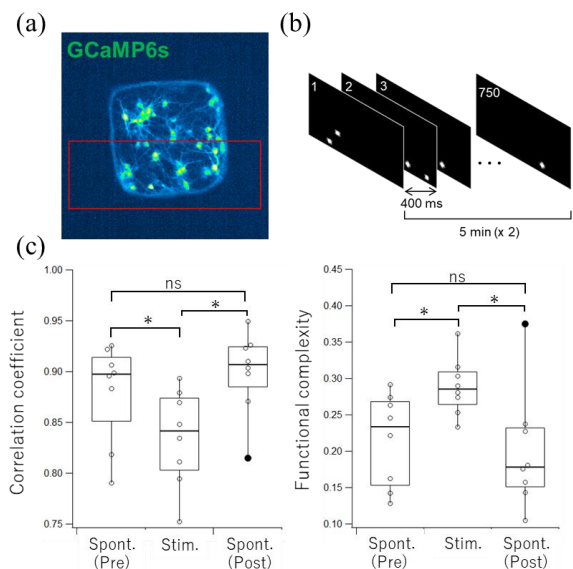


Fig. (a) Micropatterned cortical network. (b) Photo-stimulation patterns. (c) Mean correlation coefficient (left) and functional complexity (right). Spont.: Spontaneous activity; Stim.: During stimulation.