

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H03171

研究課題名(和文) 微小孔アレイと微小電極アレイを用いた細胞共培養と細胞外電位計測

研究課題名(英文) Co-culture and Extracellular Potential Measurement Using Microhole and Microelectrode Arrays

研究代表者

安田 隆 (YASUDA, Takashi)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授

研究者番号：80270883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：微小孔アレイを有する窒化シリコン(SiN)製の培養膜を製作し、このSiN膜の両面に神経細胞とアストロサイトをそれぞれ培養することで、微小孔アレイを通じた良好な細胞間コミュニケーションを実現し得る共培養技術を構築した。
さらに、SiN膜に微小孔アレイとともに微小電極アレイを形成し、SiN膜の電極形成面に神経細胞を、膜裏面にアストロサイトを培養して、神経細胞のネットワークが発する電気的信号を微小電極アレイにより多点で同時計測する技術を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、デバイス上でアストロサイトとの共培養を行うことで神経細胞の活性を長期に渡って維持しながら、神経細胞の電気信号を安定的に計測することが可能になった。この技術は、神経疾患の発症メカニズムの解明や神経疾患治療薬の薬効評価などに応用が可能である。特に、疾患特異的iPS細胞を利用した難治神経疾患の発症機構解明や創薬研究への貢献を期待できる。また、2種類の細胞の組み合わせを、例えば運動ニューロンと骨格筋細胞に変更すれば、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の発症メカニズムの解明や治療薬の開発に応用可能であり、本技術は様々な評価系に適用可能な発展性を有している。

研究成果の概要(英文)：We developed a technique for co-culturing neurons and astrocytes on both sides of a 1- μm -thick silicon nitride (SiN) membrane which has multiple microholes measuring 3 μm in diameter. By fluorescently staining synapses, we found that the number of synapses formed by a single neuron drastically increases within the first 2 weeks and keeps high values for weeks afterward. This experimental result means that intercellular communication through microholes enhances neuronal activity.

Moreover, we developed a novel microelectrode array device for multichannel measurement of extracellular potentials of neurons which are co-cultured with astrocytes. 64 microelectrodes were formed in an 8 \times 8 matrix on a SiN membrane of 1 μm in thickness having multiple microholes of 6 μm in diameter. Then, neurons and astrocytes were back-to-back co-cultured on both surfaces of the membrane. We succeeded in recording electrical signals caused by spontaneous neuronal activity.

研究分野：バイオマイクロデバイス

キーワード：マイクロデバイス 半導体加工 微小電極 共培養 電位計測 神経細胞 アストロサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体外のデバイス上で、培養細胞を用いた薬効評価や安全性試験、また再生医療研究等で必要な細胞機能解析や分化誘導を効果的に行うには、デバイス上の培養細胞が本来の機能(生体内の細胞に近い機能)を発現するように培養環境を整える必要がある。その方法の一つが、複数の異種細胞を接触または近接して培養する共培養法である。例えば、脳組織において神経細胞と血管とを接続するアストロサイト(グリア細胞の一種)は、神経細胞に栄養分を供給するとともに、神経細胞間のシナプスにおける信号伝達を調節する役割を担っているため、神経細胞とアストロサイトを共培養することで、神経細胞の生理活性を長期に渡って維持することが可能である。

(2) 一方、培養面に形成した微小電極アレイを用いて細胞の電気的信号である細胞外電位を多点で同時計測する技術は、神経生理学研究や、創薬分野での薬効評価、再生医療分野での細胞機能評価などの幅広い分野で利用されている。しかし、従来の微小電極アレイ上で神経細胞とアストロサイトの共培養を行うと、神経細胞が伸ばす軸索がアストロサイトの上に乗る現象や、細胞が凝集しスフェロイドを形成する現象が生じ、電極上への神経細胞の接着が阻害されるため、神経細胞の電気的活動を安定的に計測することが困難になるという問題が生じる。

2. 研究の目的

本研究では、神経細胞とアストロサイトを共培養する系において、神経細胞を微小電極表面に確実に接着させ、安定的な細胞外電気計測を実現することを目的に、以下の二つの技術を構築する。

(1) 半導体加工技術を用いて、微小孔アレイを有する窒化シリコン(SiN)製の培養膜を製作する。このSiN膜の両面に神経細胞とアストロサイトを培養することで、微小孔アレイを通じた良好な細胞間コミュニケーションを実現し得る共培養技術を構築する。

(2) さらに、SiN膜に微小孔アレイとともに微小電極アレイを形成する。SiN膜の電極形成面に神経細胞を、膜裏面にアストロサイトを培養することで、神経細胞を電極表面に確実に接着させ、神経ネットワークが発する電気的信号を微小電極アレイにより安定的に多点同時計測する技術を構築する。

3. 研究の方法

(1) SiN膜の微小孔アレイを通じた細胞間コミュニケーションの効果を定量的に評価するために、以下のようにしてSiN膜の片面に単一神経細胞を、別の片面にアストロサイト群を培養する技術を構築した。シリコン基板に異方性エッチングを施すことで、角型のマイクロウェルを13×13個のアレイ状に形成し、各ウェルの底面(一辺300μm)をSiN製の自立膜(厚さ約1μm)で構成した。このSiN膜に、直径約3μmの多数の微小孔をピッチ7.5μmで形成した(図1)。SiN膜の両面をUV殺菌した後に、アストロサイトを培養するSiN膜裏面にコラーゲンIを修飾し、神経細胞を培養するSiN膜表面にラミニンを修飾した。そして、SiN膜裏面にマウス大脳皮質由来アストロサイトを密度 7.7×10^4 cells/cm²で播種し37℃、CO₂濃度5%のインキュベータ内で7日間培養した後に、SiN膜表面にマウス海馬由来の神経細胞約6,000個を播種しインキュベータ内で培養した(図2(a))。なお、使用した神経細胞は一度凍結した後に解凍したものであり、その回復率が10%程度と低いため、169個のウェルに対して過剰な神経細胞を播種し、169個のウェルの中から単一の神経細胞のみが接着したウェルを選んで、その生理活性の評価を行った。比較実験として、神経細胞を培養したSiN膜から約1mm離れたディッシュ底面にアストロサイトを培養し、両細胞間に間隙を設けた状態での神経細胞の生理活性を評価した(図2(b))。

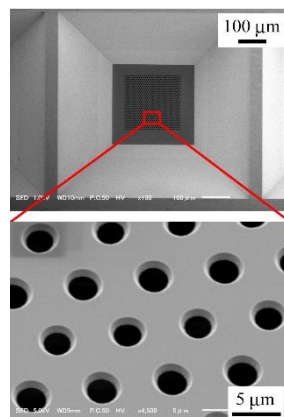


図1 微小孔アレイを有するSiN培養膜

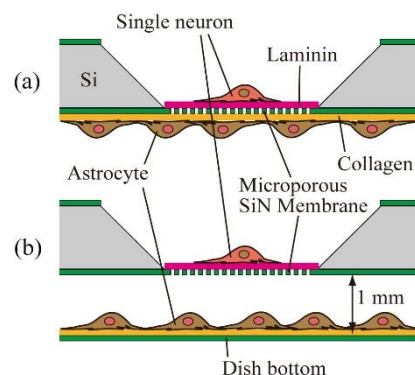


図2 共培養の方法

(2) アストロサイトとの共培養下において神経細胞の細胞外電位を安定的に計測する技術を構築するために、以下のようにして SiN 膜の両面に神経細胞とアストロサイトを培養する階層型共培養系 (図 3) を構築し計測実験を行った。シリコン製の矩形フレーム (厚さ 300 μm) で支持された SiN 製の自立膜 (辺長 5 mm, 厚さ 1 μm) を形成した。この SiN 膜の中央部の矩形領域 (辺長 1.1 mm) に 64 個の金製の微小電極 (一辺 54 μm) を 8 \times 8 個のアレイ状に配置し、その表面に白金黒を形成することで微小電極の表面積を増加させ 1 kHz におけるインピーダンスを 5 k Ω 以下まで低下させた。また、微小電極と配線を避けるようにして、SiN 膜を貫通する多数の微小孔 (孔径 6 μm) を形成した (図 4)。SiN 膜両面に真空紫外光を照射し親水化処理を行った後に、膜裏面にコラーゲン I を、電極形成面にラミニンを修飾した。次に、SiN 膜裏面にマウス大脳皮質由来アストロサイトを 1.5×10^4 cells/cm² の細胞密度で播種し 3 日間培養した後、電極形成面にマウス海馬由来神経細胞を 5×10^4 cells/cm² の細胞密度で播種した。共培養開始後 7、10、14、21 日目に神経細胞の自発的な活動電位を計測し、培養日数に伴うスパイクの数と振幅の変化を調べた。また、微小孔の無いデバイスを使用して、従来のように電極形成面上のみで共培養を行った系 (片面共培養系) で電位計測を行い、本研究で提案する階層型共培養系との比較を行った。

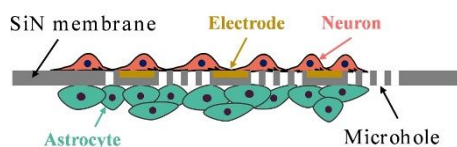


図 3 階層型共培養の概念図

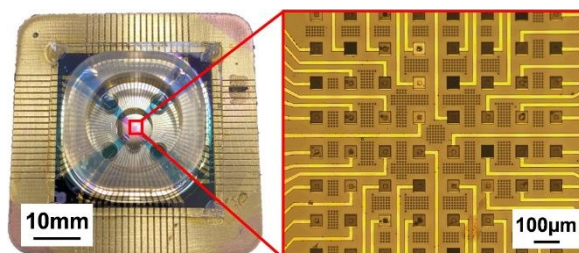


図 4 細胞外電位計測デバイス

4. 研究成果

(1) 微小孔アレイを有する SiN 膜上に培養した単一神経細胞の活性を定量的に評価するために、共培養開始から 1 週間経過毎に、神経細胞が有する β -tubulin III と、シナプスに局在する小胞型グルタミン酸トランスポーター VGLUT1 (Vesicular glutamate transporter 1) を免疫染色法により蛍光染色した。そして、VGLUT1 の光点をカウントすることでシナプス数を見積もり、神経細胞の生理活性を評価した。図 5 は、共培養開始から 2 週間経過後に β -tubulin III (緑) と VGLUT1 (赤) を二重染色した蛍光画像である (画像の外周がウェル底面の外周に相当する)。単一の神経細胞の線維状組織に沿って多数のシナプスが形成されていることが分かる。この蛍光画像はバックグラウンドノイズが高いため、そのままではシナプス数をカウントすることが困難であった。そこで、オリジナル画像から少しぼかした画像を差し引き、輝度の高い光点のみを抽出する DoG (Difference of Gaussians) 処理を行った。これにより得られた画像の中で 2 μm 以上の光点をシナプスと見なし、675 $\mu\text{m} \times 675 \mu\text{m}$ の領域におけるシナプス数をカウントした。同様の操作を共培養開始から 1 週間毎に異なるデバイスから得られた蛍光画像に対して行い、シナプス数の時間変化を求めた。その結果を図 6 に示す。グラフの縦軸は神経細胞 1 個当たりのシナプス数を意味する。共培養開始から 2 週間でシナプス数が急激に増加し、それ以降はシナプス数が高いレベルで維持され、1 か月以上の長期培養を行った後にも神経細胞の活性が落ちなかった。これに対して、ギャップ 1 mm を設けた系では、シナプス数がそれほど増加せず、2 週間経過以降には減少する傾向がみられた。以上の結果より、本研究で提案する共培養法の有効性を実証することができた。

(2) SiN 膜上に微小電極アレイを有する細胞外電位計測デバイスを用いて、本研究で提案する階層型共培養系と従来法の片面共培養系における神経ネットワークの細胞外電位を計測した。その結果、いずれの培養系においても培養日数の経過に伴いスパイクの頻度と振幅が増加した (図 7(a))。スパイクが検出された電極数の経時変化を調べたところ、階層型共培養系では培養日数の経過とともに増加したが、片面共培養系では 10 日から 14 日目にかけて 1 割程度減少した。また、1 分間当たりのスパイク数を比較すると、階層型共培養系の方が多いたことが分かった (図 7(b))。これは、片面共培養系よりも多くの神経細胞が電極に接着したためと考えられる。特に、片面共培養系では神経細胞とアストロサイトが凝集塊を形成する問題が発生し、これが神経細胞の接着数の違いに大きく影響したものと考えられる。さらに、いずれの培養系においても、培養 21 日目には多数の神経細胞がシナプス伝達により同期して活動するバースト発火が観察されるようになったが、階層型共培養系では片面共培養系の 2 倍の数以上の電極でバースト発火が観察された。以上のように、本研究の手法は、神経細胞と電極との確実な接着を実現し、従来法より優れた計測特性を示すことが分かった。

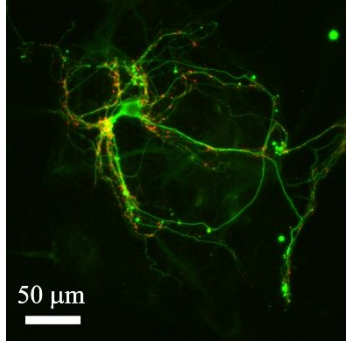


図5 神経細胞とシナプスの蛍光染色画像

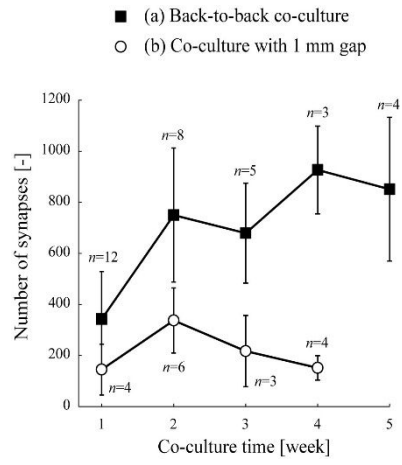


図6 シナプス数の経時変化

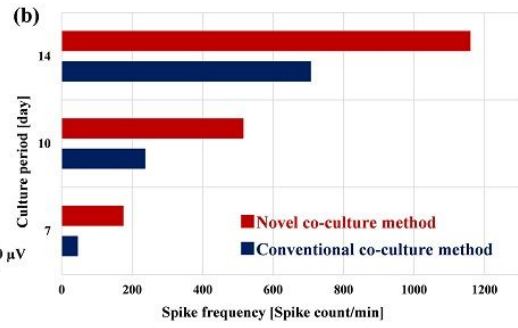
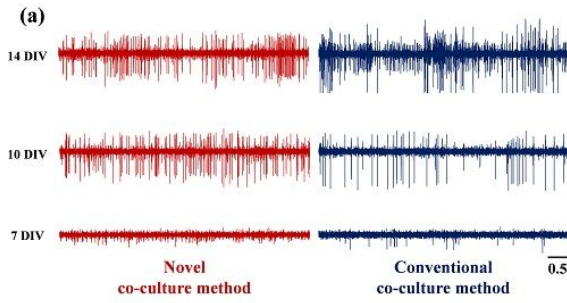


図7 細胞外電位波形の経時変化(a)と1分間当たりのスパイク数(b)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yusuke Zenmyo, Isamu Morisako, Takashi Yasuda	4. 巻 138
2. 論文標題 Long-term Culture of a Single Neuron using a Microwell with a Porous SiN Membrane	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 327-328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1541/ieejsmas.138.327	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 5件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤津恭介, 善明祐介, 森迫勇, 安田隆
2. 発表標題 窒化シリコン多孔膜へのニューロンとアストロサイトの共培養
3. 学会等名 電気学会 平成29年度E部門総合研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 善明祐介, 森迫勇, 安田隆
2. 発表標題 SiN多孔膜を有するマイクロウェルを用いたオータプスニューロンの長期培養
3. 学会等名 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤津恭介, 森迫勇, 赤瀬唯, 河野洋幸, 廣瀬伸一, 安田隆
2. 発表標題 微小孔アレイを有する窒化シリコン膜へのBack-to-back共培養
3. 学会等名 第33回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ayaka Nakama, Takashi Yasuda
2. 発表標題 Evaluation of Neuronal Activity in a Neuron-Astrocyte Co-culture System Using a Microporous SiN Membrane
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Yoshida, Takashi Yasuda
2. 発表標題 Back-to-back Co-culture of Neurons/Astrocytes on a Microporous SiN Membrane and Multichannel Measurement of Neuronal Potential Using a Microelectrode Array
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田悟志, 安田隆
2. 発表標題 SiN製多孔膜を介した階層型共培養と微小電極アレイを用いた培養ニューロンの細胞外電位計測
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----