

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04506

研究課題名（和文）iPS細胞由来ニューロンの単一細胞解析を可能とするデバイス構築

研究課題名（英文）Device development for single-cell analysis of iPS cell-derived neurons

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） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：微小孔アレイを有するSiN製の培養膜を製作し、このSiN膜を挟むように単一ニューロンとアストロサイトを共培養することで、微小孔アレイを通じた細胞間コミュニケーションにより単一ニューロンの生理活性を維持する技術を構築した。
さらに、SiN膜に微小孔アレイとともに微小電極を形成し、SiN膜の電極形成面にヒトiPS細胞由来ニューロンを、膜裏面にアストロサイトを培養することで、ニューロンの生理活性を維持しながらその細胞外電位を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

本研究では、デバイス上でヒトiPS細胞由来ニューロンを単一細胞レベルで解析する新たな方法論を導出した。疾患特異的iPS細胞由来のニューロンを本技術に適用すれば、難治神経疾患の発症機構などの新たな医学的知見の獲得や、革新的な神経疾患治療薬の開発への応用が可能となる。また、容易にこの単一ニューロン解析系を多数アレイ化することが可能であるため、薬の候補化合物から治療効果の高い化合物を探索するハイスループットな創薬スクリーニングへと発展させることができる。

研究成果の概要（英文）：A SiN culture membrane having a microhole array was fabricated, and a single neuron and astrocytes were co-cultured on both sides of the membrane. This successfully maintained the physiological activity of a single neuron by cell-to-cell communication through the microhole array.

In addition, microelectrodes were formed on a SiN membrane together with a microhole array, and human iPS cell-derived neurons were cultured on the electrode-formed surface of the membrane and astrocytes were cultured on the reverse side of the membrane. The extracellular potential of neurons was successfully measured while maintaining their physiological 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 微小孔 微小電極 ニューロン アストロサイト 共培養 単一細胞解析 細胞外電位計測

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導したニューロンの薬剤応答を解析することで、神経疾患の発症機構の解明や革新的な新薬の開発に結び付けることができる。しかしながら、多数のニューロンを培養すると、極めて複雑で不均一なネットワークが形成されるため、ネットワーク全体の挙動や個々のニューロン間のシナプス機能を再現性良く定量的に解析するには多大な困難を伴う。一方、単一のニューロンを培養すると、その軸索が自身の樹状突起と多数の自己回帰性シナプス(「オートプス」と呼ばれる)を形成する。このような単一ニューロン培養系においては、他のニューロンからのシナプス入力が存在しない単純な神経回路が形成されるため解析が容易となり、解析範囲が単一ニューロンに限定されるため定量性が格段に向上する。従来、単一ニューロン培養系を構築するには、アストロサイトを微小領域にパターン培養し、その上に単一ニューロンを培養する方法が採られてきた。しかし、この従来法では、長期に亘ってアストロサイトの微小パターンを維持することができないため単一ニューロンの長期培養が困難であり、平面微小電極により単一ニューロンの細胞外電位を計測することが困難であるという問題があった。特に、iPS 細胞由来ニューロンの成熟には長期の培養期間が必要であるため、従来法に代わる単一ニューロン解析法を開発する必要があった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、微小孔アレイを有する SiN (silicon nitride) 製自立膜を用いたニューロンとアストロサイトの共培養技術と、膜上に形成した微小電極を用いた細胞外電位計測技術を応用することで、単一ニューロンの長期培養技術と細胞外電位計測技術を実現し、これを iPS 細胞由来単一ニューロンの解析技術に発展させることである。

3. 研究の方法

(1) 半導体加工技術を利用して、SiN 製自立膜(一辺約 300 μm 、厚さ約 1 μm)を底面に有するマイクロウェルを 16 個 \times 16 個のマトリックス状にアレイ化し、SiN 膜に多数の微小貫通孔(孔径約 3 μm)を形成した。ウェルアレイの裏面にアストロサイトを大量に培養した後に、各ウェルの底面に単一ニューロンを培養することで、アストロサイトの微小パターンを用いることなく単一ニューロンの培養領域を区分けし、微小孔アレイを通じた細胞間コミュニケーションにより単一ニューロンの生理活性の維持を可能とした。さらに、各ウェルへの単一ニューロンの播種を容易にするために、同様のウェルアレイを形成し、その底面の SiN 自立膜(一辺約 150 μm 、厚さ約 1 μm)に単一の播種用微小孔(直径約 13 μm)を形成した。この播種用ウェルアレイを共培養用ウェルアレイの上に重ね(図 1A) 共培養用ウェルアレイの凸部に、播種用ウェルアレイの凹部をはめ込むようにして面内の位置合わせを行うとともに、上下の SiN 膜のギャップを約 175 μm になるように設定した(図 1B)。そして、播種用ウェルアレイの上部よりニューロンの

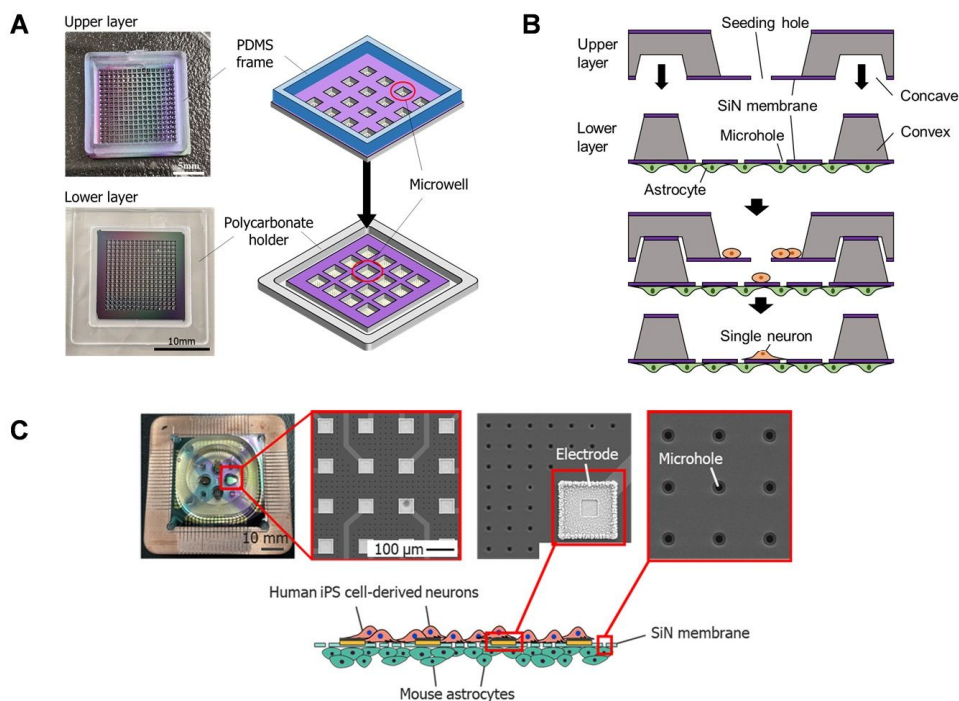


図 1 デバイス構造と細胞培養法の概要

細胞懸濁液を導入し、その各ウェル底面の単一微小孔を通じて単一ニューロンを落下させ、予め裏面に大量のアストロサイトを培養した共培養用ウェルアレイの各ウェル底面で共培養を開始した。本手法の有効性を評価するために、直径 13、25、37、49 μm の 4 種類の播種用微小孔を用意し、またニューロンを 1800、9000、18000 cells/cm² の 3 種類の密度で播種して、各条件において単一ニューロンを取得できたウェル数をカウントした。また、共培養 1 週目にニューロンの β -III tubulin とアストロサイトの GFAP (glial fibrillary acidic protein) を蛍光染色し、2 週目にシナプスに局在する VGLUT1 (vesicular glutamate transporter 1) も蛍光染色した。

(2) Si 基板で保持した SiN 製自立膜 (一辺約 2.5 mm、厚さ約 1 μm) を形成し、膜表面に白金黒製の微小電極 (一辺約 50 μm) を 4 × 4 個のアレイ状に配置し、膜内に金製の配線を形成して計測信号をアンプに接続できるようにした。そして、電極と配線を避けるように、多数の微小孔 (直径約 6 μm) を形成した。SiN 膜の両面に Poly-D-Lysine と Laminin を修飾した後に、マウス大脳皮質アストロサイトを膜裏面に培養し、ヒト iPS 細胞 (理化学研究所バイオリソース研究センター、201B7-Ff) からグルタミン酸作動性ニューロンへの分化途中の細胞を膜表面 (電極形成面) に培養した (図 1C)。共培養開始後、1 週間毎にニューロンの細胞外電位を計測した。さらに、単一ニューロンの細胞外電位を計測するために、一辺 60 μm の正方形を一辺 33 μm の正方形で開口した白金黒製の微小電極を SiN 自立膜上に形成し、電極開口部のみに微小孔アレイを形成した。このような電極構造を採用することで、SiN 膜裏面に培養したアストロサイトを求めて単一ニューロンが電極開口部に留まり、これにより安定した電位計測が期待できる。

4. 研究成果

(1) 4 種類の播種用微小孔径と 3 種類のニューロン播種密度の各条件で得られた単一ニューロン播種の成功率を比較したところ、微小孔径を 13 μm とすることで、播種密度に依存せずに安定して 20% 以上のウェル (1 デバイス内の 256 ウェル中 50 ウェル以上) で単一ニューロンを取得できることが分かった (図 2A)。また、共培養開始 1 週間後の蛍光観察によりニューロンの神経線維伸展を確認し (図 2B、赤:ニューロン、緑:アストロサイト、青:細胞核)、2 週間後の蛍光観察により神経線維に沿った多くのシナプス形成を確認し、単一ニューロンが高い生理活性を有していることが分かった。

(2) 微小電極アレイを用いたヒト iPS 細胞由来ニューロンの細胞外電位計測実験では、分化誘導開始後約 3 週間で、複数の電極においてニューロンのスパイク状の細胞外電位が観測された。そして、5 週目にほぼ全ての電極においてバースト状の発火が確認され、培養日数の経過とともにバースト発火の持続時間が増加した (図 2C)。一方、8 週目までスパイク数が急激に増加したものの、9 週目からスパイク数が減少し始め、12 週目にかけて大幅に減少した (図 2D)。今後、この原因の究明を行う。次に、開口型電極の開口部に単一ニューロンを留める効果を確かめるために、SiN 膜上の電極開口部に相当する箇所のみ微小孔を形成し、マイクロピペットを用いて単一ニューロンを微小孔上に播種して、その培養状態を観察した。単一ニューロンは軸索を広範囲に伸展させたものの、3 週間経過後も微小孔上に留まった状態を維持した。これにより、開口型電極を用いることで、単一ニューロンの細胞外電位を安定して計測できる可能性があることが分かった。

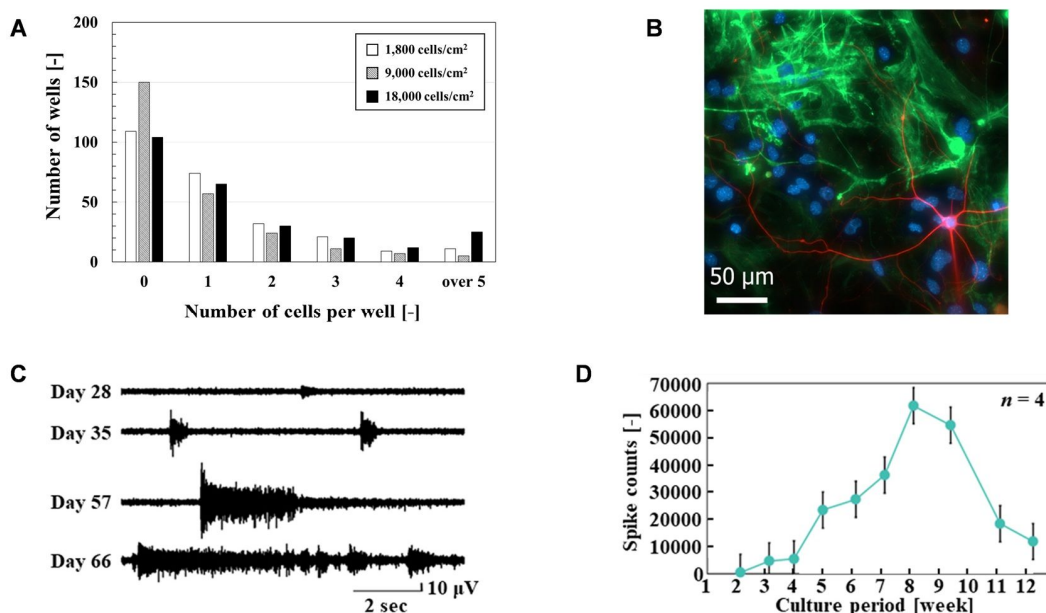


図 2 細胞培養実験及び電位計測実験の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Satoshi Yoshida, Takashi Yasuda	4. 巻 141
2. 論文標題 Back-to-back Layered Co-culture on a SiN Porous Membrane for Stable Measurement of Neuronal Extracellular Potentials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 215 ~ 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejsmas.141.215	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 -

1. 著者名 Ayaka Nakama, Takashi Yasuda	4. 巻 -
2. 論文標題 Two-layered Microwell-array Device for Preparation of Single-neuron Culture Samples	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Micromechanics and Microengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1361-6439/ad5b00	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18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Ayaka Nakama, Takashi Yasuda
2. 発表標題 Preparation of Single Neuron Samples Using a Two-layered Microwell-array Device
3. 学会等名 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayaka Nakama, Takashi Yasuda
2. 発表標題 Co-culture Device for Single Neuron Analysis Using a Microporous SiN Membrane
3. 学会等名 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satoshi Yoshida, Takashi Yasuda
2. 発表標題 Microelectrode Array with Back-to-back Layered Co-culture of Neurons and Astrocytes
3. 学会等名 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuntaro Iwai, Takashi Yasuda
2. 発表標題 Capture and Release of Single Cells Using Microholes for High Throughput Analysis of Single Neurons
3. 学会等名 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 細胞培養デバイス及び細胞培養方法	発明者 安田隆, 仲摩綾香	権利者 国立大学法人九州工業大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-082309	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞培養デバイス及び細胞培養方法	発明者 安田隆, 仲摩綾香	権利者 国立大学法人九州工業大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2023/011681	出願年 2023年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

九州工業大学 大学院生命体工学研究科 安田研究室ホームページ https://www.life.kyutech.ac.jp/~yasuda/jp/

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
研究分担者	廣瀬 伸一 (Hirose Shinichi) (60248515)	福岡大学・医学部・教授 (37111)	
研究分担者	桂林 秀太郎 (Katsurabayashi Shutaro) (50435145)	福岡大学・薬学部・教授 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関