

マイクロチャンバーを用いた神経突起の伸長 方向制御と一細胞を構成単位とする神経回路 の構築

鳥海, 早杜 / TORIUMI, Hayato

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

61

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2020-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00022952>

マイクロチャンバーを用いた神経突起の伸長方向制御と一細胞を構成単位とする神経回路の構築

CONTROLLING DIRECTION OF NEURITES ELONGATION WITH MICROCHAMBER AND CONSTRUCTION OF NEURAL NETWORK COMPOSED OF A SINGLE CELL AS A UNIT

鳥海早杜

Hayato TORIUMI

指導教員 金子智行

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Intravital neurons have dendrite and axon to form a complicated network and realize advanced functions as a brain. To elucidate these functions, there is a lot of scientific approach to the brain. As one of them, the activity of the brain have been observed at a single cell level. In this study, I constructed neural circuits with one cell as a unit to construct a neural network that visualizes individual cell activities. Agarose micro-chamber (AMC) was designed to fix the position of the cell body and agarose micro-path (AMP) to control the direction of neurites. It was found that the width of AMP elongating neurite exclusively was less than 8 μm . To construct the network, a neural circuit was constructed by arranging AMC and AMP in a circuit. As a result, two-cell circuit and three-cell circuit were successfully constructed. Synchronized changes in fluorescence intensity detected from the circuit by calcium imaging. This result indicates that the basic structure of the neural circuit in the living body could be reproduced by the shape of the cell adhesion surface.

Key Words : Single cell, Neuron, Neural network, Photothermal etching, Agarose, Calcium imaging,

1. 緒言

神経細胞は樹状突起と軸索の特異的な構造を有し、これらの構造が神経細胞同士の信号伝達を可能にしている。細胞間で伝達される信号は、高度な処理によって思考や感情など脳の機能として表現される。この機能を一細胞レベルで解明するために *in vivo* で個々の神経細胞を染色する Brainbow[1]や、*in vitro* で人工的な神経網を構築することで神経ネットワークでのシグナル解析を試みた研究[2]が行われている。しかし生体内で構成された神経回路において、細胞体および神経線維が密集していることから、回路の形状やこれに伴う細胞個々の活動を解析するには限界がある。

本研究室では加工柔軟性のあるアガロースを用いて細胞の位置を固定化する技術[3]があり、神経細胞の形状に適したアガロースマイクロチャンバー(AMC)と神経突起が伸長するアガロースマイクロパス(AMP)を作製することで、一細胞を構成単位とする神経回路の作製を目的とした。細胞体を AMC 内に制限し、一細胞単位を実現するためには、AMP に神経突起のみを伸長させる必要がある。本実験では 5~15 μm 幅の AMP を作製し、神経突起を特異的に伸長させる AMP の幅を解析した。これらの AMP を

直線状および回路状に構築し、神経突起の伸長に伴ってアガロースの追加加工を行うことによって一方向性の神経回路を作製した。

2. 実験方法

(1) AMC と AMP の設計

本実験では、神経細胞の形状に適した AMC+AMP 構造を設計した。Python および VBA を用いて加工プロセスを自動化することにより、設計した形状を任意の数で作製した(図1)。

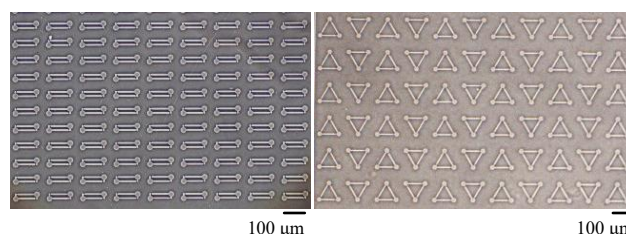


図1 自動加工による AMC と AMP の作製

神経細胞から伸長する神経突起の方向を制御するために、AMP の幅を変化させることで神経突起の伸長率と細胞の接着率を解析した。

(2) 追加加工による神経突起の接続

AMP 内部を伸長した神経突起と隣接する神経細胞を接続するために、波長 1480 nm の赤外線レーザーを用いて未加工部位に照射し、新たな AMP を作製した。

(3) 細胞間シグナルの検出

神経細胞の活動電位が神経突起で接続している細胞に伝導しているかを調べるために、Oregon green 488 bapta-1 AM を用いたカルシウムイメージングを行った。

3. 結果と考察

(1) AMP の幅の決定

5~15 μm の幅で直線状に AMP を作製し、100 μm ごとに直径 20 μm の AMC を配置した。コンフルエント状態となる細胞数を播種してから 1 時間後に余分な細胞を除去し 80 μm 単位の AMP に接着した細胞数を計測した。播種 6 日後、細胞が接着した AMC から AMP に伸長した神経突起の伸長度について、作製した AMP 幅ごとに測定した。

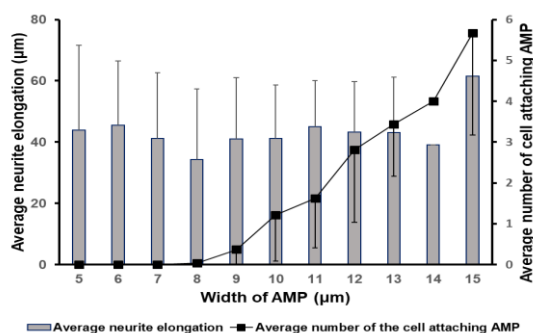


図2 AMP への神経突起の伸長度と細胞の進入数

本実験では AMP 幅の変化による神経突起の伸長度の明確な差が確認されなかった。さらに幅 8 μm 以下の AMP では神経細胞が接着しなかった。この結果から AMP の幅を制限することで神経突起のみを特異的に伸長させることが示された。以降、神経回路の作製に用いる AMP 幅は 8 μm 以下になるように加工した。

(2) 追加加工による直線状での細胞の接続

分散配置により一細胞が接着した AMC を選出し、神経突起が AMP の先端まで伸長していることを確認してから追加加工を行った(図3)。レーザー照射後、追加加工した部位に神経突起が伸長し、隣接する AMC に接続したことを確認した。この結果からレーザー照射による追加加工は神経突起の伸長方向の制御に有効であることが示された。

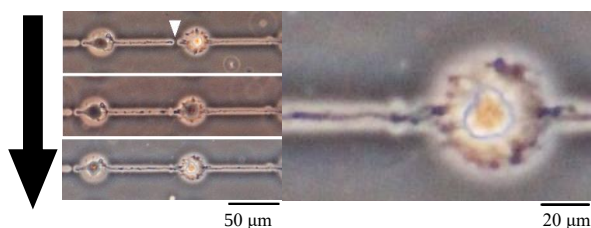


図3 AMP の追加加工と神経突起の細胞への接続

(3) 神経細胞による回路の作製

回路状に AMC と AMP を作製し、細胞播種後に一細胞が接着している AMC から、神経突起が AMP に伸長していることを確認した。この AMP を追加加工をすることで一方向性の回路を作製した。本実験では二細胞神経回路、三細胞神経回路の作製に成功した(図4)。

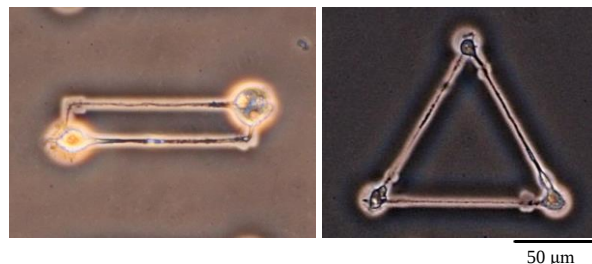


図4 追加加工によって方向性を制御した神経回路

(4) カルシウムイメージングによる回路内シグナル伝達の解析

作製した二細胞神経回路において、活動電位の細胞間伝達を調べるために、カルシウムイメージングによる細胞内カルシウム濃度の変化を解析した(図5)。

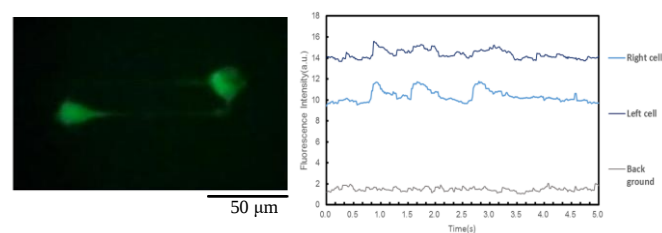


図5 カルシウムイメージングの蛍光強度の解析

蛍光色素が細胞内に取り込まれていることを確認し、細胞内における自発的な蛍光強度の変化を記録した。本研究では、神経突起で接続した二細胞によって協調した蛍光強度の変化を検出することができた。この結果から本研究で構築した神経回路は細胞間シグナル伝達の機能を保持していることが示唆された。

4. 結言

AMP の幅を制御することで神経突起のみを伸長させることができた。レーザー照射による追加加工は神経突起の伸長方向の制御に有効であった。作製した神経回路は細胞間シグナル伝達の機能を保持していた。AMC+AMP 構造は、一細胞を単位とした一方向性の神経回路の作製に有効であることが示された。

参考文献

- 1) R Sakaguchi, et al., *eLife*, e40350 (2018)
- 2) M Emanuele, et al., *PLoS ONE* 7(4), e34648 (2012)
- 3) H Moriguchi, et al., *Micro Total Analysis Systems* 2002. 1, 13-15 (2002)