

微小神経回路の構築のための単一神経細胞プレート

著者	吉田 昭太郎
学位授与年月日	2016-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00074007

論文の内容の要旨

論文題目 微小神経回路の構築のための単一神経細胞プレート

氏名 吉田 昭太郎

1. 序論

本研究の目的は、培養した単一神経細胞の軸索・樹状突起・細胞体の位置を制御することで、単一神経細胞からなる微小神経回路を形成可能にするデバイス:単一神経細胞プレートを構築することである。

多数の種類 of 神経細胞が複雑な回路を作る脳において、神経細胞同士が相互作用する仕組みは未だ多くが知られていない。In vivo実験系では、一つの空間に対して多数の細胞と化学信号が存在するため、単一細胞同士の寄与を切り分けて相互作用計測することが難しい。一方、in vitro実験系では、環境要因を制御して計測することが可能である。特に、通常の培養皿よりも個々の細胞の位置を制御可能なマイクロ加工技術を用いたパターンニング技術によって、単一神経細胞レベルで神経回路内の相互作用を計測可能になると考えられる。しかしながら、過去の研究においては単一細胞の配置の精密性に問題があった。細胞体は多細胞の集合体を形成しやすく、神経突起は伸張・縮退を繰り返すため、特定の位置へ細胞体・神経突起を制御することが困難であった。

そこで本研究では、パターンニング技術を用いた神経回路構築における上記の問題を解決するために、神経細胞の細胞体のある数の神経突起を伸ばした状態で特定の場所に精密に配置するための技術「単一神経細胞プレート」を提案する(図1)。これは先行研究において構築された、一細胞~数十細胞ほどの大きさの円形あるいは四角形の微小な板で、接着性細胞のハンドリングを可能にする「マイクロプレート」を神経回路の構築のために拡張し応用するものである。本研究では、マイクロプレートの形状を一つの円とそこから伸びるいくつかの線を持つようにし、それが単一神経細胞の形態を制御し神経回路構築へ応用可能にするようにした。単一神経細胞プレートによって細胞体、神経突起の制御された単一神経細胞を培養することができ、それらを隣接させて組み合わせることによって神経回路を構築できることを示す。本技術により、形態の決まった神経細胞の位置を生きたまま培養中に変更することを初めて可能にし、あたかも電子部品を組み合わせる電子回路を作るかのように、望みの形状の神経細胞を組み合わせる神経回路を作るといった新たな神経回路構築の手法を可能にする。

2. 単一神経細胞プレートの設計と構築

単一神経細胞プレートは、マイクロ加工技術を用いて製作した(図2)。単一細胞の細胞体の大きさの円と神経突起の大きさの線の形状を持つように設計し、本研究で神経細胞のモデルとして用いるPC12細胞と初代培養海馬神経細胞それぞれの大きさに適したプレートを構築した(図3, 4)。さらに、これらのプレートの上に細胞接着のためにパターンニングしたタンパク質がプレート上のみに存在することを免疫染色法によって確認した(図5)。

3. 単一神経細胞プレート上での神経細胞の培養

PC12細胞をプレート上で培養したところ、細胞体が円に、神経突起が線に接着した単一細胞が得られた(図6)。神経突起の本数は数が少ないほど制御に成功する確率が高いことがわかった。また、ラットより採取した初代培養海馬神経細胞をプレート上で培養したところ、PC12細胞と同様に形態制御された単一細胞が得られた(図7)。さらに、プレートの線の部分の長さによって神経突起の機能的な区別である長い軸索・短い樹状突起がプレートの形状によって制御されうることを示した。

4. 単一神経細胞プレートを用いた神経回路構築

マイクロマニピュレーションによってPC12細胞、海馬神経細胞それぞれが接着したプレートを培養中にハンドリングすることが可能であることがわかった(図8, 9)。また、それらを回路上に組み立てて経時的に培養することができた(図10)。特に初代培養神経細胞を回路状にアセンブリした場合(図11)、神経細胞間に機能的な神経回路の接続点であるシナプスが構築されることが免疫染色によってわかった(図12)。さらに、カルシウムイメージング法により神経細胞の活動を計測したところ、アセンブリした神経細胞の細胞内カルシウム上昇が同期した(図13)。これらから本研究で提案する単一神経細胞プレートによって神経回路が構築可能であることが示された。

5. 結論

本研究では、単一神経細胞を形態制御し操作可能にするデバイス「単一神経細胞プレート」を構築し、それをアセンブリすることでシナプス結合をもつ神経回路を単一細胞・単一突起の解像度で設計し構築する手法を実証した。本研究で提案する単一神経細胞プレートによって、自在に形態を制御した単一神経細胞を培養液中で自在に動かすことができ、神経回路を構築することができる。電子部品を組み合わせて電子回路を作るように、自在に神経回路を設計・構築して回路の挙動を解析することができるデバイスとして、神経科学におけるシナプス形成機構の基礎研究、また神経回路がどのように情報伝達を行うかを調べる神経情報学へ貢献すると期待できる。

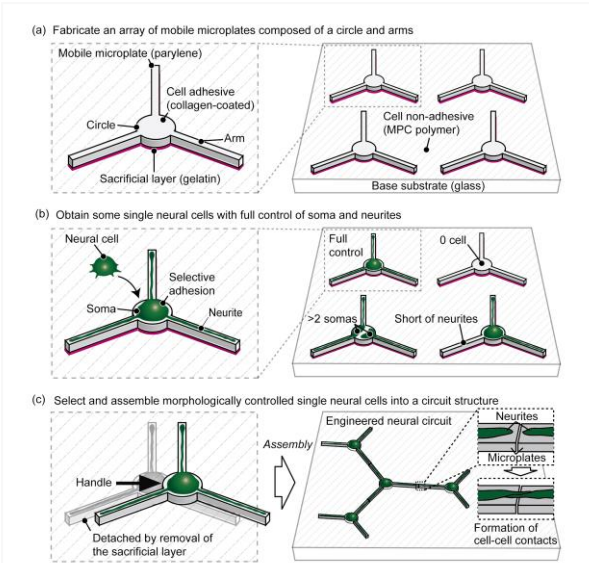


図 1 本研究のコンセプト。

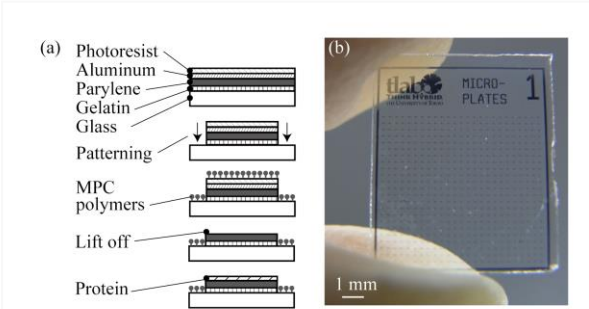


図 2 単一神経細胞プレートの製作プロセス。

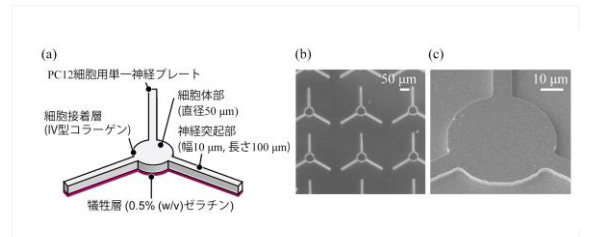


図 3 PC12 細胞のための単一神経細胞プレートの設計。

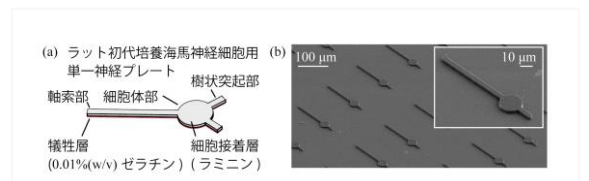


図 4 初代培養海馬神経細胞のための単一神経細胞プレートの設計。

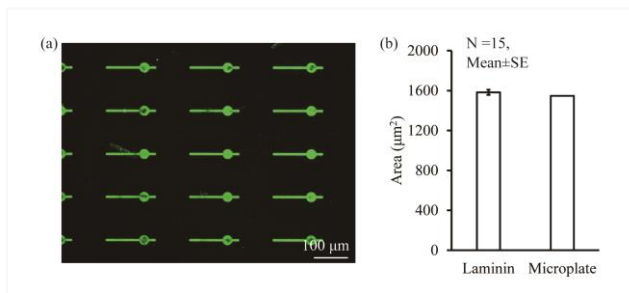


図 5 免疫染色によるラミニンの評価。

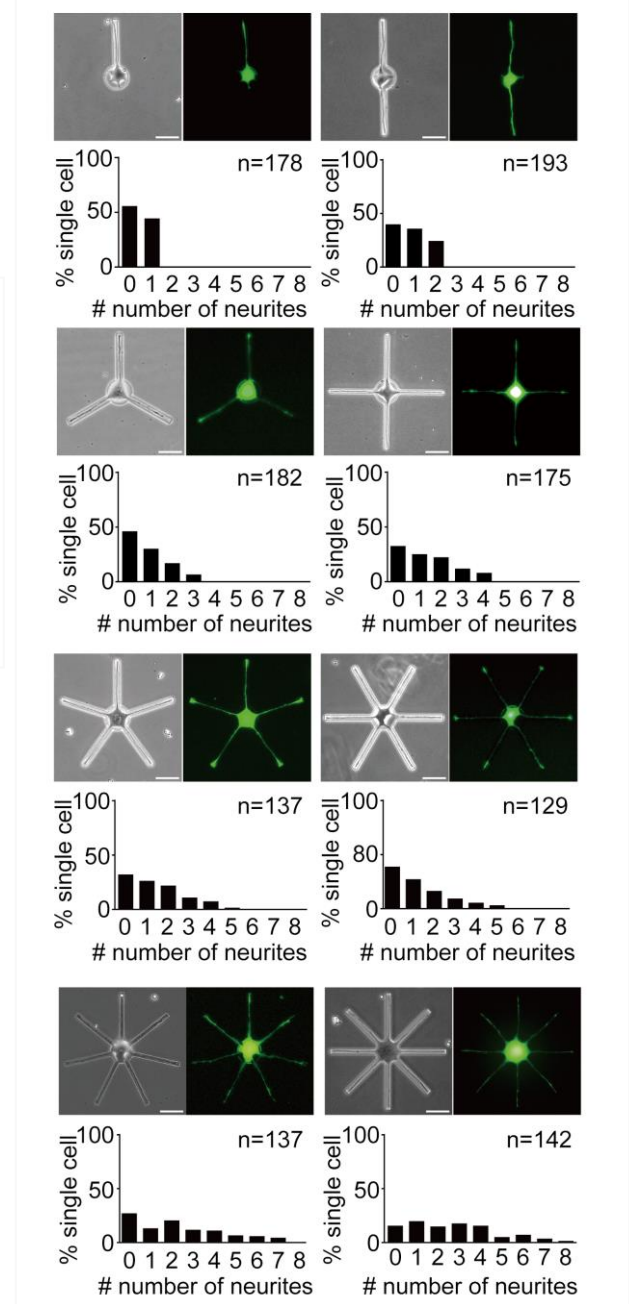


図 6 単一 PC12 細胞の形態制御。

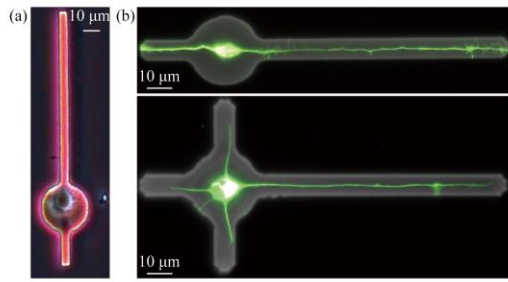


図 7 初代培養海馬神経細胞の形態制御。

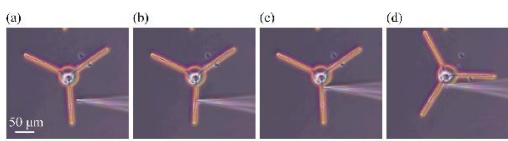


図 8 PC12 細胞のハンドリング。



図 9 初代培養海馬神経細胞のハンドリング。

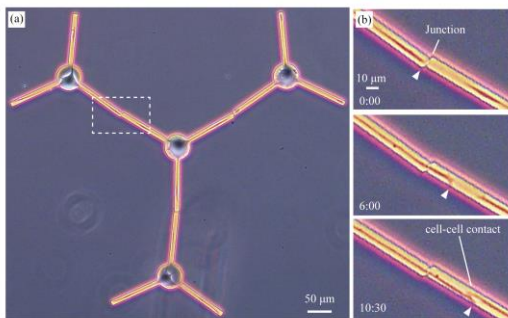


図 10 PC12 細胞のアセンブリ。

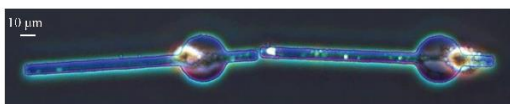


図 11 初代培養海馬神経細胞のアセンブリ。

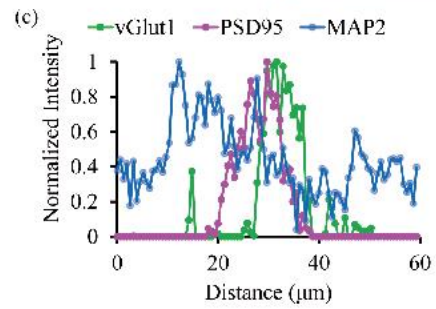
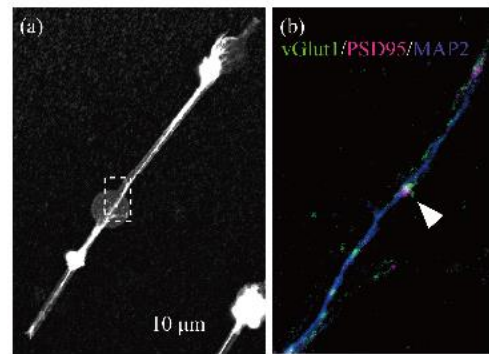


図 12 免疫染色による初代培養海馬神経細胞のアセンブリ後のシナプス形成の評価。

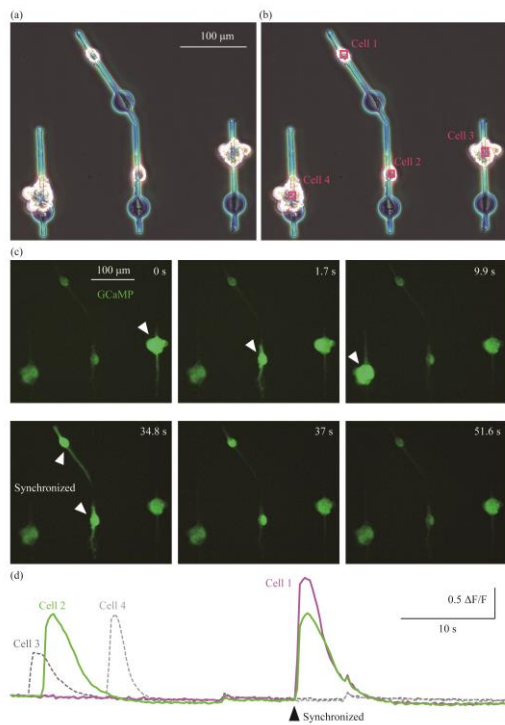


図 13 免疫染色による初代培養海馬神経細胞のアセンブリ後のシナプス形成の評価。