

分化誘導細胞—生体由来細胞系共培養デバイスの開発

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 人間環境学専攻 2011年3月修了

学籍番号 47-096697 伊藤 宏樹
指導教員 神保 泰彦 教授

Transplantation of stem cell-derived neurons into the damaged neuronal tissue is one of the promising methods for the recovery of neuronal functions. However, little is known about the signal transmission between transplanted stem cell-derived neuronal networks and the host brain tissue during recovery. In this study, we developed microelectrode-array (MEA) substrates with multiple micro-chambers for cell cultures. Each micro-chamber consisted of 4 cell-plating spots with interconnecting conduits fabricated by polydimethylsiloxane (PDMS) lithography. The conduits had the tunneling structures, the height of which was approximately 6 μm , through which only neurites could grow into adjacent cell-plating spots. We cultured mouse cortical and stem cell-derived neurons in the subset of cell-plating spots. Here, we discussed this co-culture device utility for monitoring of transplantation processes *in vitro*.
Key words: microelectrode array, neuronal network, patterned culture, microstructure, tissue engineering

1 緒言

神経系は例外的な部位を除き神経細胞の新生が起こらないとされており、それだけにパーキンソン病等神経変性疾患に対する再生医療技術が確立されればその意義は大きい。近年、ES細胞(embryonal stem cells)やiPS細胞(induced pluripotent stem cells)が樹立され、これら多能性幹細胞を用いた神経再生医療の研究が加速しつつある^{1,2)}。細胞移植による治療を実現する上で重要な検討課題の1つは、移植された神経細胞と宿主側の神経ネットワークとの相互作用を明らかにすることである³⁾。組織として動作している神経系に注入された分化誘導細胞が神経回路に組み込まれる際にどのようなプロセスをたどるのか、分化誘導操作後どの時点で組織に注入するのが最適かといった課題に対する知見を得ることにより、神経再生医療実現に向けた新たな研究展開が期待できる。

分化誘導細胞と宿主側組織の細胞を区別して形態を観察し、活動の発生・伝搬を可視化するために有効な手法の1つは*in vitro*系の利用である。個々の細胞を可視化した状態でその位置と結合構造を人為的に制御する技術の開発が進められており⁴⁾、軸索投射やネットワーク構造のコントロール、細胞の成長評価などに関する報告がなされている⁵⁻⁷⁾。特に、近年厚型フォトレジストで作製した鋳型にシリコンゴムの一種である polydimethylsiloxane (PDMS) を注入して様々なマイクロ構造を作製する手法が確立され、ニューロンの細胞体や神経突起に対応したサイズの3次元構造が簡易なプロセスで実現できる利点を生かして、神経細胞とグリア細胞を分離した共培養系の構築⁸⁾、整列した神経回路網の形成⁹⁾、限定的な領域での神経細胞集団同士の結合¹⁰⁾、など様々な用途に応用が広がってきた。さらに、この手法を用いて幹細胞分化制御を目指すデバイスを試作した例が報告され¹¹⁾、注目を集めている。

本研究では、初代培養神経系に分化誘導神経細胞を注入した場合に起こる細胞間結合の形成、活動の発生と伝搬を経時的に観測するデバイスの開発を試みた。1枚の細胞培

養基板上に多数の細胞播種スポットを設け、スポット間はマイクロトンネルで連絡する構造とした。トンネル構造の利用により、各スポットに播種した細胞群の独立性を維持したまま、スポット間での神経突起を介したシナプス結合形成を導くことが可能になった。このデバイス上でマウス大脳皮質から採取した神経細胞を初代培養し、これにマウス胚性腫瘍細胞である P19 細胞から分化誘導した新生神経細胞を注入した際に両組織間に生じる形態的な結合形成を、蛍光色素による細胞ラベリングと免疫組織化学染色法を併用して確認した。さらに、自発神経回路活動の発生を微小電極アレイ (microelectrode array: MEA) による電気活動記録により可視化した結果を報告する。

2 共培養デバイスの作製と細胞培養

2.1 細胞群共培養基板の設計と製作

底面に電極を有する4つの細胞培養スポットから成るチャンバを9個(2×2のアレイパターン5か所、1×4のラインパターン4か所)集積化した細胞培養基板を設計・製作した。電極サイズは50×50 μm 、電極中心間距離は250 μm 、スポットサイズは120×120 μm である。4つのスポット間は幅50 μm 、高さ6 μm のマイクロトンネルにより連絡する構造とした。電極はガラス基板の透明導電性薄膜 (Indium-Tin-Oxide : ITO) をフォトリソグラフィによりパターンニングして製作した。電気信号記録に用いる50×50 μm の先端部分を除いてフォトレジストで被覆絶縁、電極先端部表面には白金黒を析出させた。細胞培養チャンバを製作してこの基板上に設置するプロセスを Fig. 1 に示す。

細胞培養チャンバは、ネガ型フォトレジストである SU-8 (日本化薬工業(株)) を成型した鋳型に PDMS を流し込んで硬化させることにより製作した。鋳型の作製は2段階のフォトリソグラフィからなる。各段階で用いる2種類のフォトリソグラフィは CAD ソフトによる描画、熱転写プリンタ (MD-5500; アルプス電気(株)) による透明フィルムへの出力、簡易マスク作製機 (NM-505; ナノテック(株)) による縮小投影露光の手順でエマルジョンマスクとして自作した。1段階目のフォトリソグラフィは細胞播種スポット間をつなぐトンネル構造を作るためのものである。76×52 mm のガラス基板 (micro slide glass : 標準

大型白緑磨 No.2; 松波硝子) 上に SU-8 3005 を 1,500 rpm で 30 秒間スピコートして厚さ 6 μm の SU-8 層を形成 (Fig. 1(a)), これに露光, 現像プロセスを適用して 5 個の四角形と 4 本の直線パターンを形成した (Fig. 1(b)). 2 段階目は細胞播種マイクロスポットのパターンである. 前者は縦横 120 μm , 高さ 100 μm の柱状構造が中心間隔 250 μm で 6 \times 6 のアレイ状に配列したものとした. トンネル構造が作製されたガラス基板上に粘性の高いレジスト材料である SU-8 3050 を 1,200 rpm, 85 秒の条件でスピコートして厚さ 100 μm の SU-8 層を形成 (Fig. 1(c)), これをパターニングすることによって鋳型を製作した (Fig.1(d)).

鋳型の上に犠牲層となるフォトレジスト (OFPR-800 ; 東京応化工業(株)) を塗布した後, PDMS (Silpot 184; 東レ・ダウコーニング) を 3,500 rpm, 85 秒の条件でスピコートした (Fig.1 (e)). これに厚さ約 1 mm, 内径 10 mm の PDMS フレーム (マイクロ構造マニピュレーションのための補強枠) を取り付け, 85 $^{\circ}\text{C}$ 1 時間の熱処理によって PDMS を硬化させた. 最後にアセトン(和光純薬) 浸漬によって OFPR 層を溶解させて鋳型から剥離し (Fig.1(f)), MEA 基板表面に固定した (Fig.1(g)). 固定の際は, 予め Poly-D-lysine (PDL; Sigma-Aldrich) をコーティングした MEA 基板表面に超純水を少量滴下し, PDMS マイクロ構造物を乗せ, 双眼実体顕微鏡下で MEA 電極と細胞培養スポットの位置合わせを行い, 超純水を吸引・乾燥することで接着させた.

2.2 細胞培養

本研究では, 初代培養神経系としてマウス大脳皮質細胞, 分化誘導神経細胞としてマウス胚性腫瘍細胞 P19 細胞を用いた.

初代培養は以下の手順で実施した. 胎生 16 日目の ICR mouse 胎児から大脳皮質組織を採取, コラゲナーゼを用いた酵素処理とピペッティングにより単離して細胞懸濁液を調整した. 調整した細胞懸濁液は 100 \times 15 mm のバクテリア培養ディッシュ (Fisherbrand) に入れ, Fig. 2 に示すセルマニピュレーションシステムを用いて培養基板の細胞スポットに播種した. セルマニピュレーションシステムは 3 次元マイクロマニピュレータに取り付けたガラスピペットとマイクロインジェクタ (Eppendorf) から成る. ガラスピペットは, 外径 1.5 mm, 内径 1 mm のガラス管を微小電極製作器 (Narishige) を利用して加工, 先端をマイクロフォーグ (Narishige) によって内径 70 μm

に成形した. 細胞播種前に紫外線照射によって滅菌し, 3 次元マニピュレータとマイクロインジェクタに接続した. 細胞懸濁液をバクテリア培養ディッシュから吸引してピペット内に充填, 位相差顕微鏡観察下で培養基板の細胞種スポットに注入した. 1 枚の基板の 9 個のチャンバそれぞれについて, 4 つの細胞スポットのうち 1-3 か所を選択して初代神経細胞の注入を行った. 培養液は播種後 24 時間を α -MEM (Invitrogen) で行い, その後は馴化培地 (Conditioned Medium ; CM) とした. CM の組成は 2 % (v/v) B-27 supplement (Invitrogen), 200 μM L-glutamine, 1 % (v/v) Penicillin/ Streptomycin (Pe/St; Sigma-Aldrich) を添加した Neurobasal Medium (NB) (Invitrogen) である. 調整した培地で別に用意したマウス大脳皮質細胞を 1 週間培養後回収, これをフィルタ滅菌したものを使用した. 1 週に一度, CM の半量を交換した. 試料は CO₂ インキュベータ (37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO₂, 水蒸気飽和) 内に保持した. 1 週間培養後, P19 細胞から分化誘導した神経細胞の追加播種を実施した.

P19 細胞の継代培養及び分化誘導の手法は Bain らの手法¹²⁾を基本として一部改変したものを用いた. 細胞非接着性のバクテリア培養ディッシュを用い, 10 % (v/v) Fetal bovine serum (FBS), 1 % (v/v) Pe/St, 1×10^{-6} M all-trans Retinoic Acid (RA ; Sigma-Aldrich) を含む α -MEM 培地 15 ml 中に 1×10^6 個の P19 細胞を播種し, 胚様体を形成させた状態で浮遊培養した. 培養 4 日目に細胞塊を回収して酵素処理により単離した後, さらに約 1 時間浮遊培養した. 初代培養細胞と識別するため蛍光色素 (PKH26; Molecular Probes) で染色, これをセルマニピュレーションシステムによって初代細胞を播種していない細胞スポットに注入した.

2.3 神経細胞活動の計測

神経細胞活動の可視化には, MEA による細胞電位変化記録を用いた. 細胞外電位変化は, 基板表面に集積化した 36 個の電極を利用した細胞外信号記録として行った. 細胞外記録では, 神経細胞が発生する活動電位が約 100 μV のスパイクとして検出される. 今回の実験では刺激は行わず, 培養細胞群が自発的に発生する活動の計測とした. 基板電極から導出される信号を, 遮断周波数 100 Hz のハイパスフィルタ, 5,000 Hz のローパスフィルタを通して帯域制限した後 10,000 倍に増幅, これを分解能 12 bit, サンプリング周波数 25 kHz で A/D 変換し, PC に記録した. データの記録には Lab VIEW (National Instruments) を

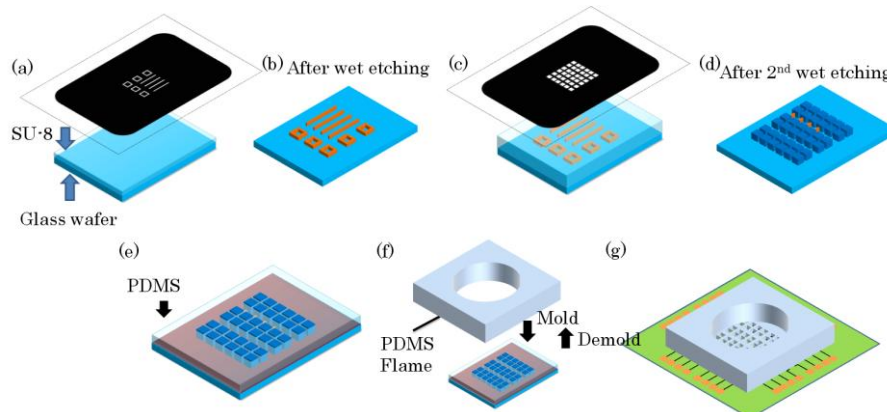


Fig.1 Fabrication steps of co-culture chamber

用いた。

2.4 免疫組織化学染色

マイクロ構造内での細胞群の成長とネットワーク形成を可視化するため、蛍光抗体法による免疫組織化学染色を行った。一次抗体として神経細胞のマーカーである anti-tubulin, beta-3 isoform C-terminus, clone TU-20 (容量比 1:400; Chemicon) を用いた。4% (v/v) Paraformaldehyde で試料を固定した後、0.25% (v/v) Triton-X100 (Calbiochem), 4% (w/v) ブロックエース(雪印乳業)による前処理を行い、4℃の環境下で一次抗体と1日反応させて標識した。さらに二次抗体として Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) を利用して標識、洗浄後、蛍光顕微鏡による観察を行った。

3 結果

3.1 共培養チャンバ

ソフトリソグラフィにより PDMS を成形して製作した細胞培養用マイクロチャンバアレイを MEA 基板表面に固定したデバイスを Fig.2 に示す。シャレ中央部を拡大した顕微鏡像において、6×6 のマトリクス状に配列した細胞注入用スポットが見える。細胞注入用スポットのうち 2×2 のアレイパターン、1×4 のラインパターン部分をさらに拡大すると、スポット間を結合する幅 50 μm の通路構造とスポット内の MEA 電極が認められる。今回採用した手法で MEA 電極とスポットの位置合わせが必要十分な精度で可能であることが確認された。さらに、PDMS 構造物の断面を位相差顕微鏡で観察した結果、スポット部分の深さは 50-70 μm であった。初代培養細胞播種の1週間後に分化誘導細胞の注入を行う際に、培養液環境下で新たに注入される細胞を安定に保持するのに十分な深さを有していると言える。

3.2 共培養チャンバを用いた培養

2×2 のアレイ状パターンにおいて、3か所に初代培養神経細胞を配置し、その培養開始から1週間後に分化誘導神経細胞を残りの1か所のスポット(右下)に注入して培養した例を Fig. 3 に示す。3つのスポットに接着している初代培養細胞群が影響を受けることなく分化誘導細胞の注入が行われたこと、その5日後には分化誘導細胞も注入したスポット内できちんと接着、成長している様子が認められる。

分化誘導細胞の注入から7日後の試料について形態観察を行った結果を Fig. 4 に示す。(a)は位相差顕微鏡像、(b),(c)は同じ視野についてそれぞれ PKH26 と beta-3 tubulin 染色に対する蛍光観察を行った結果である。(c)から、3か所のスポットに播種された初代培養神経細胞、残りの1つのスポットに注入された分化誘導神経細胞とも、細胞体はスポット内に維持されており、神経突起がトンネル構造内に侵入して隣接するスポットの細胞群の間で形態的な結合形成が起こっている様子がわかる。

3.3 培養細胞からの活動計測

初代培養細胞及び分化誘導細胞から細胞外電位変化が捉えられた。Fig.5 に初代培養細胞・分化誘導細胞の双方の電気活動が捉えられた様子を示す。図で、(a)は培養15日目の初代培養細胞であり、(b)は培養8日目の分化誘導細胞である。(a)と(b)が一部で同期した活動を示している

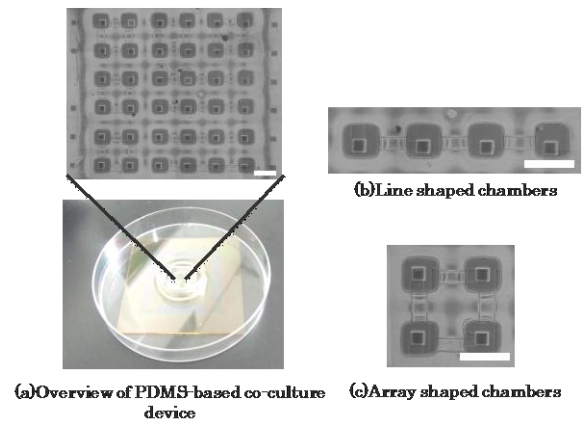


Fig.2 The PDMS-based co-culture device on an MEA substrate (scale bar : 100 μm)

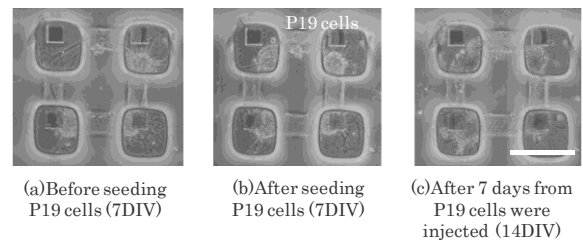


Fig.3 Culturing mouse cortical and P19 cell-derived neurons on the co-culture device

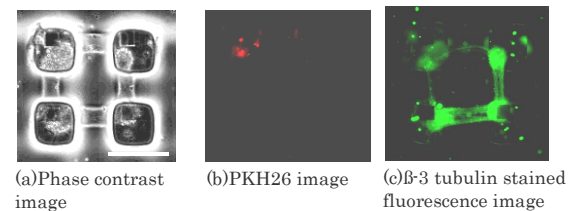


Fig.4 Fluorescence images of PKH26 and Beta-3 tubulin (scale bar : 200 μm)

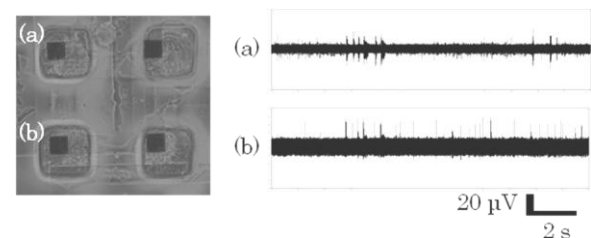


Fig.5 Spontaneous electrical activity recorded from mouse cortical neurons ((a) : 15 days after plating) and P19 cell-derived neurons ((b) : 8 days after injecting).

ことが分かる。60秒間の発火回数を比較した結果、初代培養細胞のみの系と、初代培養細胞-分化誘導細胞の系のいずれも13日目-17日目で発火回数が最大となり、P19細胞の注入が系の活動に影響しない可能性が示されたが、活動のパターンなどが特異的な試料もあり、さらに検討が必要である。

4 考察

4.1 共培養チャンバの作製

縦横120 μm 、深さ70 μm の細胞培養スポット4個から構成されるマイクロチャンバを9個集積化した細胞培養基板を設計、製作した。マイクロピペットに充填した懸濁液から選択したスポット内に選択的に細胞を注入し、培養できることが示された。初代細胞培養開始から1週間経過した時点で分化誘導細胞の追加注入を行い、移植の模範が可能であることが確認できた。スポット間に設けられた幅50 μm 、高さ6 μm のマイクロトンネルは、細胞体をスポット内に維持したまま神経突起の成長を導き、隣接するスポットに注入した細胞群の間のシナプス結合を誘導する有効なガイド構造として機能することを確かめた。細胞播種スポット底面に設けられた基板電極を通じた細胞電気活動の導出も可能であることが確認された。以上から、今回開発した集積化マイクロ細胞培養チャンバアレイ基板は、個々の細胞の形態と相互結合の状態を可視化し、発生する活動をモニタするデバイスとして有効であると言える。

細胞播種スポット間を連絡するトンネル構造のサイズについてはさらに検討を要する。トンネル部分に溶液が浸透しにくい場合がある一方で、細胞注入時の水圧によっては細胞自体が通路内に入り込む事例も観察された。また、培養時には神経突起だけでなくグリア細胞の侵入が起り増殖する結果、トンネル内の神経突起の観察が容易でない場合もあった。グリア細胞は神経細胞の周囲環境を最適に維持する等の役割があり、ネットワーク構造の成熟に関与している可能性もあるとされている。以上の条件を考慮し、製作プロセスの簡易性を損なわない範囲でトンネル構造のサイズについて今後最適化を進める必要がある。

4.2 共培養チャンバを用いた培養

MEA電極による細胞外記録を通じて、今回製作したマイクロチャンバ内で初代神経細胞、分化誘導細胞群が接着・成長し、神経回路として活動していることが確認された。少数の神経細胞を培養環境下で維持することは一般に必ずしも容易ではないとされているが、馴化培地の利用が有効に機能した結果、低密度細胞培養条件が確立されたと考えられる。

培養細胞から最長で31日間活動が計測され、これは本研究で作製したデバイスが細胞の成長過程のモニタリングに利用可能であることを示している。しかし、記録が可能であっても短期で活動が停止する試料もあった。これは、培地交換などの操作時に培養環境が変化したことや、共培養を行っているP19細胞由来神経細胞の影響が原因として考えられる。そのため、培養環境維持によりさらに長期の培養を可能にすることや、実際に移植が検討されている新生神経細胞を用いた実験を行うことが必要と考えられる。

5 結論

神経再生医療分野への応用を想定し、生体由来の神経細胞系に分化誘導細胞由来の神経細胞群を注入した際の結合形成、神経細胞活動を可視化する*in vitro*評価システムを構築した。PDMSを成形した3次元マイクロ構造と、ガラスピペットとマニピュレータ、インジェクタからなる単一細胞マニピュレーションシステムの組み合わせにより、両組織由来の細胞を分離した状態で神経突起の成長を導き、シナプス結合形成を誘導することが可能であることを確認した。長期培養を可能にする条件を確立し、分化誘導細胞群が生体由来の細胞組織に結合して融合した神経回路として動作するまでの過程を経時的に観測すること、その観測を通じて分化誘導細胞の移植時期等条件の最適化を行うことが今後の課題である。

文献

- 1) H Ulrich and P Majumder : "Neurotransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical applications", *Cell Prolif.*, Vol.39, pp. 281-300 (2006)
- 2) S Gögel, M Gubernator and SL Minger : "Progress and prospects: stem cells and neurological diseases", *Gene Therapy*, pp.1-6 (2010)
- 3) A Björklund and O Lindvall : "Cell replacement therapies for central nervous system disorders", *nature neuroscience*, Vol. 3, No.6 pp.537-544 (2000)
- 4) AM Taylor, M Blurton-Jones, SW Rhee, DH Cribbs, CW Cotman and NL Jeon : "A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport", *Nature Methods*, Vol.2, No.8, pp.599-605 (2005)
- 5) CD James, AJH Spence, NM. Dowell-Mesfin, RJ Hussain, KL Smith, HG Craighead, MS Isaacson, W Shain, and JN Turner : "Extracellular Recordings From Patterned Neuronal Networks Using Planar Microelectrode Arrays", *IEEE Trans. BME*, Vol. 51, No.9, pp. 1640-1648 (2004)
- 6) Y Nam, GJ Brewer and BC Wheeler : "Development of astroglial cells in patterned neuronal cultures", *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 18, No.8 pp.1091-1100 (2007)
- 7) S Kidambi, I Lee, and C Chan : "Primary Neuron/Astrocyte Co-Culture on Polyelectrolyte Multilayer Films: A Template for Studying Astrocyte-Mediated Oxidative Stress in Neurons", *Adv. Funct. Mater.*, Vol. 18, pp. 294-301 (2008)
- 8) J Park, H Koito, J Li, A Han, "Microfluidic compartmentalized co-culture platform for CNS axon myelination research", *Biomed Microdevices*, Vol. 11, pp.1145-1153 (2009)
- 9) L Griscom, P Degenaar, B LePioufle, E Tamiya, H Fujita : "Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays", *Sensors and Actuators B*, Vol. 83, pp.15-21 (2002)
- 10) R Morales, M Riss, L Wang, R Gavin, Jose Antonio Del Rio, Ramon Alcobilla and Enric Claverol-Tinture : "Integrating multi-unit electrophysiology and plastic culture dishes for network neuroscience", *Lab on a Chip*, Vol. 8, pp.1896-1905 (2008)
- 11) J Park, CH Cho, N Parashurama, Y Li, F Berthiaume, M Toner, AW Tillesa and ML Yarmush : "Microfabrication-based modulation of embryonic stem cell differentiation", *Lab on a Chip*, Vol. 7, pp. 1018-1028 (2007)
- 12) Y. Takayama, A. Saito, H. Moriguchi and Y. Jimbo : "Ensemble Stimulation of Embryoid Bodies using Substrate-Embedded Electrodes", *IEEJ Trans.*, Vol. 4, pp. 734-735 (2009)