

O2-1

細胞の空間配置を自在に制御した脳神経ネットワークの3D再構成技術の開発

3D reconstruction of the neuronal network controlling the spatial arrangement of cells

○小田原あおい^{1,2} 鈴木郁郎¹ 後藤正男¹

1.東京工科大学 2.バイオ情報メディア科 バイオニクス専攻

Aoi ODAWARA, Ikuro SUZUKI, Masao GOTOH
Tokyo University of Technology

Abstract: We have developed the 3D reconstruction techniques of neuronal network using the collagen gel photo-thermal etching method and the orientation method of collagen fibers. The advantage of these methods are that it allows control of the cell numbers and the position of synaptic connections during cultivation through photo-thermal etching where a portion of the collagen gel layer is melted with a 1064nm infrared laser beam, and that it allows control of cell position and direction of neurite in 3D through the PDMS micro chamber and the orientation of collagen fiber. Using these methods, we have constructed the 3D neuronal network model with multiple layers, and confirmed the function of it by Ca²⁺ imaging. These techniques can potentially be used for regenerative medicine and development of drug screening model, as well as research in basic neural biology.

Key Words: 3D reconstitution, Collagen gel, 1064nm laser, fiber orientation, Ca²⁺ imaging

1. Introduction

生体組織を人工的に3次元再構成する技術は、医薬品開発の評価モデルや再生医療分野で未来の移植技術として期待されている[1, 2]。これまでに、細胞から組織を人工的に創る研究は、心臓などの組織を対象に研究が進み細胞シートを使った移植治療が行われてきた。

本研究は、生体組織の中でも最も再構成することが難しいとされている脳組織に着目し、神経ネットワークの細胞数制御技術および脳神経回路機能で重要となる情報の伝達方向(神経突起の伸長方向)を3次元で制御した培養技術の開発を行った。

2. Materials and methods

2-1 cell culture

ラット胎児(E18)から海馬神経細胞を採取し、neurobasal Medium (Invitrogen)、B27 Supplement (Invitrogen)、CO₂5%37°C下で培養をおこなった。

2-2 Photo Thermal Collagen Gel Etching method

細胞数や異種細胞の細胞間相互作用を培養中に自在に制御できる技術として、コラーゲンゲルレーザー加工技術を開発した。ITO ガラス上にコラーゲンゲルをコートし、その上から調整した細胞を播種し、その後、1064nm レーザで任意の細胞を選んで細胞の周りをレーザー加工した(Fig. 1)。

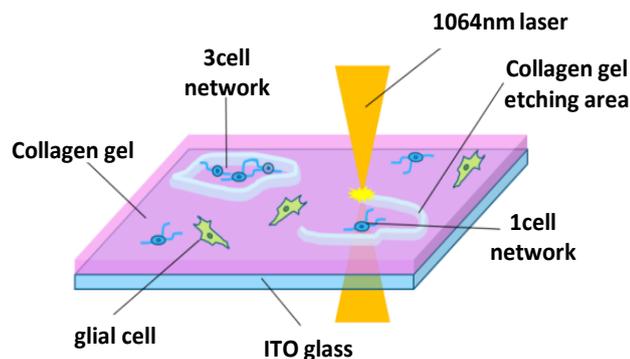


Fig.1 Photo Thermal Collagen Gel Etching method

2-3 Orientation control of collagen gel fiber

細胞の空間配置と情報の伝達方向を制御した3次元培養技術として、コラーゲン繊維配向技術を開発した。PDMS マイクロ加工技術による、細胞体の位置制御と組み合わせると多層構造の3次元脳回路モデルを構築した(Fig. 2)。

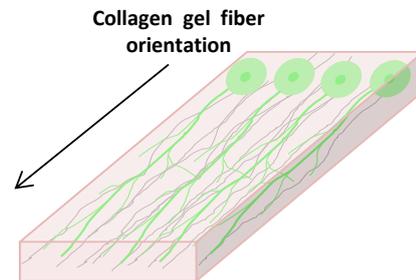


Fig.2 Orientation control of collagen gel fiber

3. Results

3-1-1 Photo Thermal Collagen Gel Etching method

細胞播種後に任意の細胞を選択し、レーザー加工を施した結果、細胞数を制御した培養に成功した。免疫化学染色法により、レーザー加工した部分のみ Collagen gel が排除されていることが観察された (Fig. 3. a)。単一孤立培養だけでなく、Fig. 3 は 1 細胞レベルで細胞数を制御した培養結果を示している (Fig. 3. e~h)。

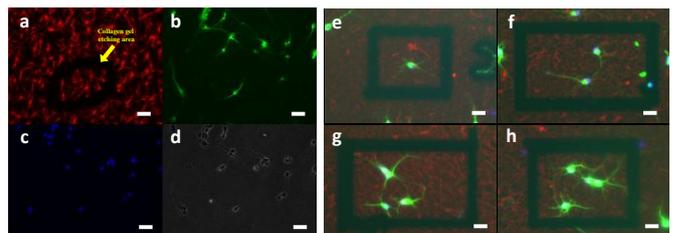


Fig.3 control of cell numbers

(a)Collagen type I (b)MAP2(c)Hoechst33258
(d)Phase contrast(e)1cell(f)2cell(g)3cell(h)5cell

Scale bars=20µm

3-1-2 Control of neural elongation

脳神経回路機能で最も重要となる情報を担う神経突起の方向を任意の方向に誘導し結合させることができた。培養2日目にレーザ加工により伸長可能なエリアを制御した。培養3日目(加工2日後)(Fig. 4. a)に伸長可能なエリアに沿って伸長している様子が観察され、培養4日目(加工後3日目)(Fig. 4. b)に。細胞間での結合を確認することができた。

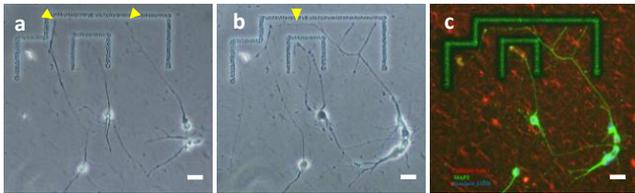


Fig.4 control of neural elongation

(a)加工2日後(DIV3) (b)加工3日後(DIV4)

(c)免疫化学染色画像(Red: Collagen type I Blue: Hoechst 33258、Green:MAP2) Scale bars=20μm

3-2-1 Orientation control of collagen gel fiber

PDMS マイクロ加工技術とコラーゲン繊維の配向技術を用いた結果、細胞体の位置と突起の伸長方向を制御することができた(Fig. 5)。細胞体の位置を制御し、そこからコラーゲン繊維に沿って伸長突起が一方向に伸びている様子が観察された。さらに、顕微鏡観察下でZ軸の方向に焦点をずらしていくと、伸長突起が3次的に伸長している様子が確認された。

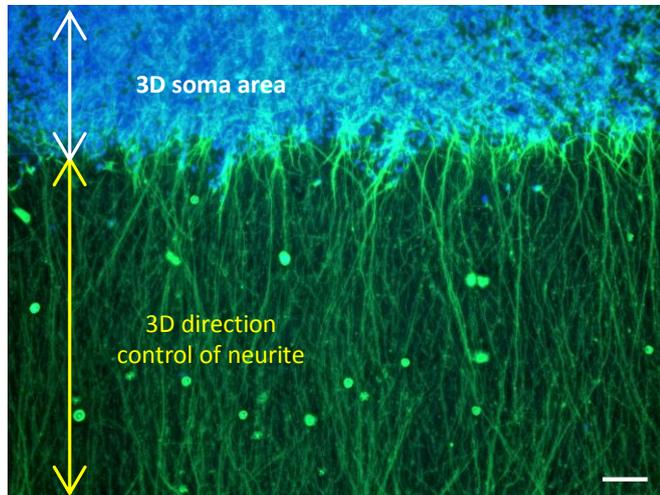


Fig5. 3D reconstructed neuronal circuits

免疫化学染色画像 (Blue: Hoechst 33258、Green:MAP2) Scale bars=100μm

3-2-2 3D neuronal circuits with multiple layers

PDMS マイクロチャンバにより細胞体の位置を制御した結果神経突起の伸長方向を制御した多層での3次元脳回路を再構築することができた(Fig.6.A)。

構築した多層脳回路モデルの機能評価としてCa²⁺イメージングを行った。その結果、層間で活動が伝播している様子が観察された(Fig.6.B-b)。

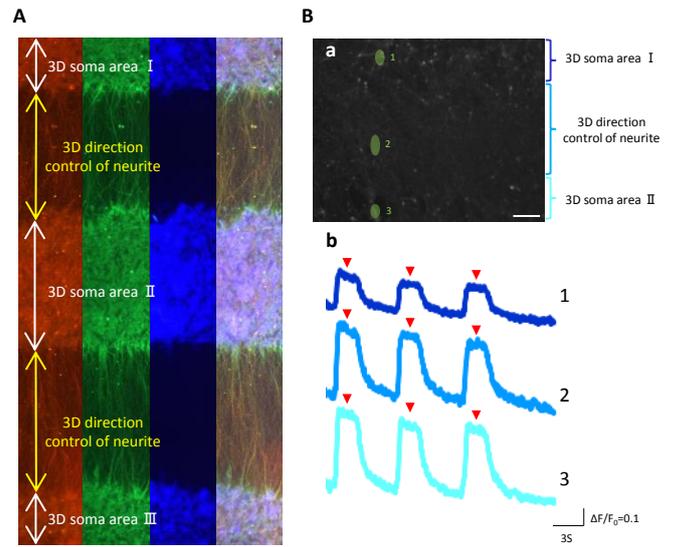


Fig6. 3D neuronal network with multiple layers

(A)免疫化学染色画像 (B)Ca²⁺ imaging (Red: Tau1、Green:MAP2、Blue: Hoechst 33258) Scale bars=100μm

4. Summary

4-1 Photo Thermal Collagen Gel Etching method

コラーゲングルレーザ加工技術を用いて、培養中に細胞数を制御した脳神経ネットワークの構築、および突起伸長方向を任意の方向に誘導することに成功した。

この技術の特徴は、①細胞播種後に細胞数・種類を制御できる②培養中に任意形状にコントロールできること(シナプス位置の制御ができる)ことである。

4-2 Orientation control of collagen gel fiber

PDMS マイクロ加工技術とコラーゲン繊維配向技術を用いて、3次的に多層構造の脳回路を再構築することに成功した。また、Ca²⁺イメージングにて再構築したモデルの機能を確認することができた。

この技術の特徴は、①細胞体位置と伸長方向の制御②多層構造の再構築を3次元脳回路の再構成であることである。

これらの開発した技術は、神経細胞の厳密な細胞間相互作用解析、再生医療や薬剤評価モデルへの応用が期待される。

5. References

- [1]Tao Xu, Peter Molnar, Cassie Gregory, Mainak Das, Thomas Boland, James J. Hickman. Electrophysiological characterization of embryonic hippocampal neurons cultured in a 3D collagen hydrogel. Biomaterials 30 (2009) 4377- 4383.
- [2]Anja Kunze, Michele Giugliano, Ana Valero a, Philippe Renaud. Micropatterning neural cell cultures in 3D with a multi-layered scaffold. Biomaterials 32 (2011)2088-2 098.