

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの培養条件に依存した電気生理学的特徴解析

Electrophysiological effects of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture

○ 小田原あおい（東京工科大学，日本学術振興会特別研究員） 鈴木郁郎（東北工業大学）

Aoi ODAWARA, Tokyo University of Technology, Japan Society for the Promotion of Science

Ikuro SUZUKI, Tohoku Institute of Technology

Abstract: Human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons may be effectively used for drug discovery and cell-based therapy. However, the immaturity of cultured human iPSC-derived neurons and the lack of established functional evaluation methods are problematic. We here used a multi-electrode array (MEA) system to investigate the effects of the co-culture of rat astrocytes with hiPSC-derived neurons. The co-culture facilitated the long-term culture of hiPSC-derived neurons for >3 months and long-term spontaneous firing activity was also observed. After >3 months of culture, we observed synapse transmission. Compared with rat neurons, hiPSC-derived neurons required longer time to mature functionally. Furthermore, addition of the synapse antagonists induced significant changes in the firing rate. In conclusion, we used a MEA system to demonstrate that the co-culture of hiPSC-derived neurons with rat astrocytes is an effective method for studying the function of human neuronal cells, which could be used for drug screening.

Key Words: Human induced pluripotent stem cell derived neuron, astrocyte co-culture, multi-electrode array system

1. Introduction

ヒト iPS 細胞からニューロンへの分化技術が進んだことから、アルツハイマー病などの神経疾患メカニズムの解明や動物実験を代替する評価モデルへの応用が期待されている。しかしながら、シャーレ上で培養したニューロンが未成熟であること、培養神経ネットワークの機能評価系が未確立であることなどが問題となっている。そこで本研究は、グリア細胞の液性因子の追加およびグリア細胞共培養系を構築し、培養条件の違いに依存した電気生理学的特性と薬理応答性を評価した。

2. Materials and methods

2-1 活動特性の評価

電気生理学的特性と薬理応答性を調べるために、活動電位をネットワークレベルで非侵襲かつリアルタイムに計測できる平面微小多電極アレイ(Multi-electrode array (MEA))を用いた。

2-2 細胞培養

ヒト iPS 細胞由来神経細胞 (hiPSC-derived neuron)は iCell neuron (Cellular Dynamics International, Inc.USA)を使用した。MEA 上に細胞を培養するために、0.05-0.1% PEI (Poly-Ethylenimine Imine) solution を室温で1時間コート、滅菌水で4回洗浄後、電極表面をクリーンベンチ内で一晩十分に乾かす。次に、 $5 \mu\text{g/ml}$ の Laminine solution を電極上部のみに滴下し、 37°C , 5% CO_2 環境下で1時間インキュベート。細胞播種直前に Laminine を除去し、乾燥しない内に素早く電極上に細胞を播種し、 37°C , 5% CO_2 環境下で培養を行った。

2-3 培養条件

培養条件に依存した長期自発活動特性および薬理応答性を評価するために Fig. 1 に示す通り 3つの条件を検討した。基礎培地には iCell neuron maintenance medium に iCell Neurons medium supplement、 100U/ml Penicillin/Streptomycin を加えたものを用い、従来の培

養法である基礎培地を用いてニューロンのみで培養するサンプル、Rat astrocyte の液性因子を追加するサンプル、液性因子の追加および Rat astrocyte を共培養するサンプルを用意した。Rat astrocyte は、1か月以上培養した Rat 海馬初代培養細胞を用いた。液性因子は、Rat astrocyte を培養している培地 (Neurobasal medium) に 2% v/v B27 supplement、10% v/v FBS、 0.074mg/ml L-glutamine、 100U/ml Penicillin/Streptomycin から採取し、基礎培地に 1/4 混ぜて hiPSC-derived neuron を培養した。Rat astrocyte の共培養は、 1×10^3 cells/MEAchip で hiPSC-derived neuron と共培養した。

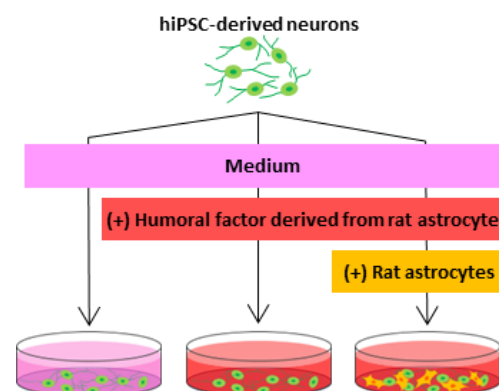


Fig. 1 Schematic image of different culture condition of hiPSC-derived neuron.

3. Result

3-1 免疫化学染色による形態比較

培養条件に依存した培養形態の違いを評価するために、培養42日目に免疫化学染色を行った。アストロサイトマーカーである GFAP で染色したところ、ニューロンのみと液性因子追加の場合はネガティブであったが(Fig. 1a,b)、Rat

astrocyte との共培養系において、ポジティブであり、多電極アレイ上に培養されていることが確かめられた (Fig. 2-a)。また、Fig. 2-b は、hoechst33258 による核染色を行ったところ、液性因子の追加および Rat astrocyte の共培養に比べて、ニューロンだけの培養は核が断片化している様子が観察され、培養 42 日目でダメージがあることがわかった。Fig. 2-c は神経細胞マーカーである β -tubulin III で染色した画像を示している。液性因子追加と Rat astrocyte 共培養においては、神経突起がダメージレスに伸長していたのに対し、ニューロンのみでは突起がシュリンクしたダメージが見られた。ア Rat astrocyte 共培養においては、液性因子追加に比べ、神経突起が密度している様子が観察されたことから、より成熟化していることが示唆される。また、シナプス結合の形成を調べるために、プレシナプスのマーカーであるシナプトフィジンで染色したところ、全ての培養条件において、シナプスの発現を確認した。特に、Rat astrocyte 共培養において、密なシナプス発現を確認した (Fig. 2-d)。

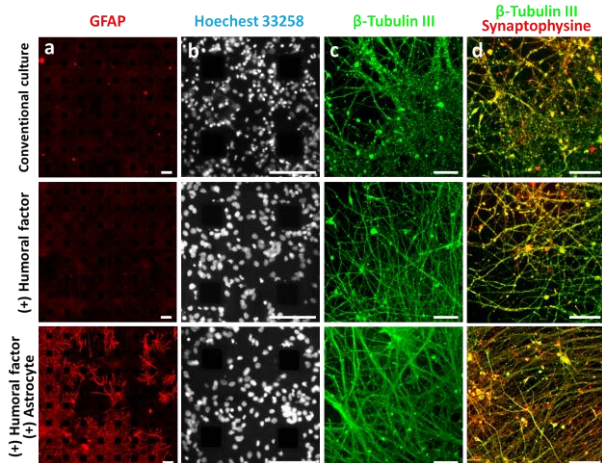


Fig.2 Immunofluorescent analysis of conventional culture (top panel), added humoral factors derived from astrocytes (middle panel) and astrocyte co-culture (bottom panel) after culture for 42 days.

3-2 培養条件に依存した電気生理学的特徴

培養条件に依存した長期的な自発活動特性を調べるために、平面多電極アレイを用いて 1 週間ごとに 10 分間の計測を行った。Figure 3 は 3 つの培養条件による自発活動が検出された電極数と発火頻度をマッピングしたものである。液性因子の追加、グリア細胞共培養系、ニューロンだけの培養共に、培養 7 日目から活動頻度の減少が見られたが、液性因子の追加およびグリア細胞共培養系においては、培養 3 週目以降から活動頻度の上昇が見られた。また、グリア細胞共培養系においては、120 日以上長期培養に成功し、培養 90 日目以降において、神経ネットワーク内で同期した活動が見られた。

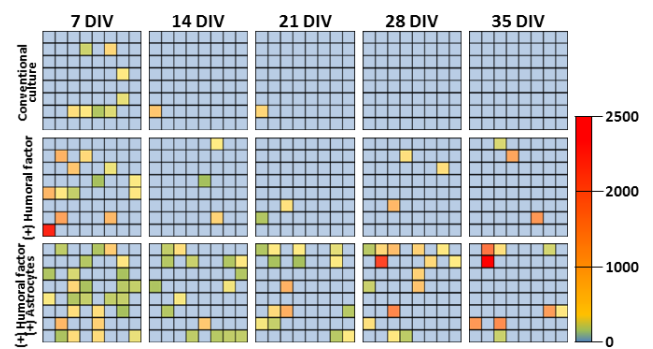


Fig.3 Grids showing the 64 electrodes where colored electrodes detected signals. Electrodes that detected a higher firing frequency are shown in red.

3-3 薬理試験

培養 37 日目に GABAA 受容体のアンタゴニストである Bicuculline と AMPA 受容体および Kinase 受容体のアンタゴニストである CNQX を用いて薬理試験を行った。その結果、ニューロンのみおよび Rat astrocyte 液性因子追加サンプルにおいては顕著な応答は観察されなかったが、Rat astrocyte 共培養系において、Bicuculline 投与で自発活動の波形の振幅および発火頻度が増大し、CNQX 投与で活動が消失する顕著な応答を示した (Fig. 4)。また、培養 92 日目にも同様の薬理試験を行ったところ、37 日目に比べより顕著な応答が観察された。

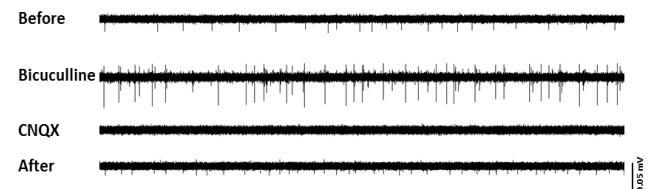


Fig.4 Effects of drugs in hiPSC-derived neurons with astrocyte co-culture. The waveforms represent typical changes in the spontaneous firing patterns detected by the same electrode.

4. Conclusion

Rat astrocyte との共培養は、自発活動を長期的 (120 日間以上) に活性化させること、および機能的な成熟化を促すことがわかった。また、薬理試験で典型的な薬理応答が観察されたことから、機能的なイオンチャンネルが形成されていることがわかった(1)。これらの結果より、平面微小多電極アレイを用いた astrocyte 共培養ヒト iPS 細胞由来ニューロンの計測手法は、ヒト神経回路機能の解明研究や薬剤スクリーニングなどの評価技術として大いに応用が期待される。

参考文献

- (1) 1. A. Odawara, Y. Saitoh, AH. Alhebshi, M. Gotoh, I. Suzuki, Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture, BBRC 443, 1176-1181, 2014.