

近赤外レーザー照射による脳神経ネットワークの刺激技術の開発

Development of a spot stimulation technique for neuronal network using near-infrared laser irradiation

○ 布志木雄士 鈴木郁郎 後藤正男

(東京工科大学大学院バイオ・情報メディア研究科バイオニクス専攻)

Yuji Fushiki Ikuro Suzuki Masao Gotoh

(Department of Bionics, Graduated School of bionics, computer and media science, Tokyo University of Technology)

Abstract: We have developed a photo-thermal stimulation technique for neuronal networks. This method enables flexible and precise heating for a neuron, neurite and glial cell by the laser irradiation through microscopic observation and enables activation of cells without electrodes and caged compound. In this study, we prepared the ITO glass substrate that generates heat by the laser irradiation and cultured Rat hippocampal cells on the ITO glass. With adequate laser power, we stimulated a neuron, neurite and glial cell in cultured hippocampal neuronal network. Using this procedure, we can observe the evoked Ca^{2+} oscillations in case of a soma, dendrite and glial cell respectively and also the activities that propagated to the entire neuronal network after laser irradiation. These results demonstrate the potential of a non-invasive and simplified novel stimulation technique for neuronal networks.

Key Words: thermal stimulation, near-infrared laser, ITO glass, neuron, soma, neurite, glial cell, calcium imaging

1. 序論

神経ネットワーク中の任意の神経細胞やグリア細胞、及び神経突起やシナプスを自在に刺激できる技術は、神経ネットワークの機能解析や治療法として有用な技術となる。脳神経ネットワークの局所刺激法について、これまで電極を用いた電気刺激やケージド化合物を用いた光刺激技術が開発され、神経細胞機能メカニズムの解明やブレインマシンインターフェースなどへの応用が成されてきた⁽¹⁾⁽²⁾。しかしながら、電極を用いた刺激では、空間分解能が低いことや *in vivo* 刺激の場合には侵襲性があるなどの問題点がある。また、ケージド化合物を用いた刺激技術は、刺激できる細胞種が限定されることやヒトへの応用が難しいこと、二光子励起顕微鏡が必要であることや各ケージド化合物が高価であるなどといった問題点がある。このような背景の下、本研究では、生体組織にダメージが少ない近赤外レーザーを用いた局所熱によって神経細胞を刺激できる技術の開発を行うこととした。培養神経ネットワークを用いて、1064nm レーザ照射により、神経細胞の細胞体、神経突起、グリア細胞が刺激されるかを Ca^{2+} イメージング法にて評価した。

2. 方法

2-1 ITO 培養基板の作成

われわれは神経細胞を刺激するための媒体として、透明素材である ITO ガラスを用いた。この ITO ガラスは、近赤外光に吸収特性を有するため、レーザー照射位置で発熱する。ITO ガラス上に神経ネットワークを培養すれば、顕微鏡下で細胞および神経突起にレーザー照射することができ、局所的な熱刺激が可能となる。

基板作成は以下の方法で行った。35mm シャーレの中心に ITO 表面が上になるように配置し、1cm 四方にカットした ITO ガラスの四隅を PDMS (Polydimethylsiloxane) で固定した。作製した ITO 基盤に細胞接着基質である poly-d-lysine (50 μ g/ml) をコートした。

2-2 海馬初代培養細胞の調整

妊娠 18 日目の Wistar Rat 胎児から採取した海馬神経細胞を用いた。取り出した脳から海馬を切り取り、酵素処理後、細胞密度 1.2×10^6 cell/ml の細胞懸濁液を作製した。得られた細胞を ITO 基板に蒔き、MACS Medium (B27 supplement, Penicilline-Streptomycin, L-Glutamine, FBS2%) にて、37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5% 下で培養を行った。

2-3 Ca^{2+} イメージング計測

Ca^{2+} 指示薬として Oregon Green488 BAPTA-1 (Invitrogen) を使用した。Oregon Green488 BAPTA-1 を Neurobasal82 μ l/DMSO8 μ l/F-127 2 μ l (DMSO20%) に加え溶解し、培養 5 日目~21 日目のサンプルに対して最終濃度 3.5 μ M で投与した。37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5% 下で 60 分間静置することにより、Oregon Green488 BAPTA-1AM を細胞外から負荷した。その後、新しい培地 2ml に入れ替え AM 基を切り離すため、60 分静置した後、培地を除き、人工脳髄液 (ACSF: NaCl 127, KCl 1.5, NaHCO₃ 26, KH₂PO₄ 1.3, CaCl₂ 2.4, MgSO₄ 1.4, D-Glucose10 (mM)) 下で観察した。

Ca^{2+} 輝度の動態は、EMCCD カメラ (Andor) を用いて記録した。レーザー照射による輝度変化を排除するために、EMCCD カメラ接続部に 1064nm カットフィルターを装着し、顕微鏡光路から入るレーザー光を遮断した。実験は、室温 28 $^{\circ}$ C 下で行なった。

2-4 1064nm レーザ照射による局所熱刺激

1064nm レーザを備えた光ピンセットレーザーマニピュレーションシステム (シグマ光機) を用いた。局所熱刺激による神経細胞、神経突起、グリア細胞の応答を調べるために、レーザーパワー10.0-11.5mW で 1 秒間照射し、照射後の Ca^{2+} 動態を観察した。

2-5 データ処理及び解析

近赤外レーザー照射による刺激応答を評価するために、Image J で各照射部位および近傍の神経細胞、神経突起、グリア細胞における輝度変化の様子を解析した。

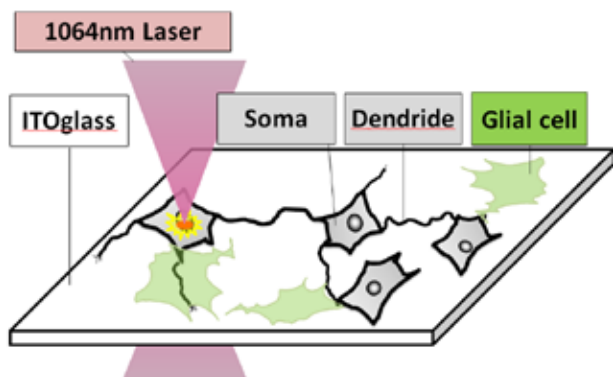


Fig. 1 Schematic drawing of a stimulation using 1064nm laser irradiation.

3.結果・考察

3-1 神経細胞の細胞体へのレーザー局所加熱

神経細胞への局所熱刺激に対する応答を調べるために、細胞体へレーザー照射した。その結果、照射直後に Ca^{2+} オシレーションが発生することおよび活動がネットワークに伝播する様子が観察された。図 2 は、レーザー照射後に近傍の細胞の Ca^{2+} 輝度が上昇し、5 秒後に同期した Ca^{2+} オシレーションが観察されたデータである (Fig. 2B)。レーザー照射部位 (→●: 細胞体) および輝度解析部位 (①~⑤) を Fig. 2A に示す。

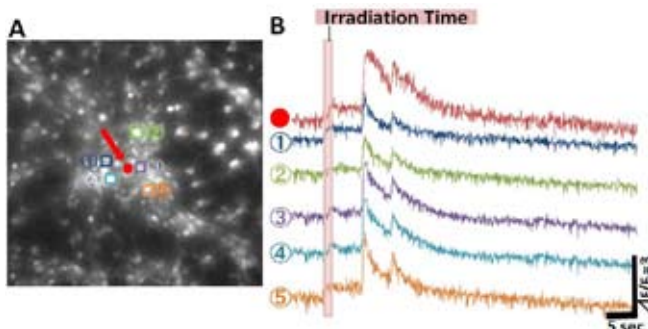


Fig. 2 Evoked responses by irradiating soma. (A) Fluorescent image of stimulus site and analyzed cells. (B) Ca^{2+} wave forms.

3-2 神経突起へのレーザー局所加熱

次に神経突起へのレーザー局所加熱による誘発応答を調べた。Fig. 3 に神経突起の照射部位 (→●: 神経突起) と輝度解析した細胞体を示す。神経突起に照射した直後に Ca^{2+} オシレーションが観察された。①の細胞は、②~④の細胞とは異なったタイミングで発火している様子から、シナプス結合を介して伝播したものと考えられる。

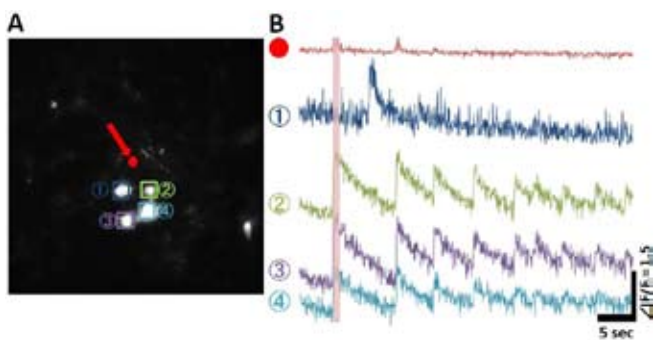


Fig. 3 Evoked responses by irradiating neurite. (A) Fluorescent image of stimulus site and analyzed cells. (B) Ca^{2+} wave forms.

3-3 グリア細胞へのレーザー局所加熱

グリア細胞が局所熱に反応するかを調べるために、グリア細胞に照射した。照射部位 (→●: グリア細胞) と Ca^{2+} 変化を Fig. 4 に示す。レーザー照射によりグリア細胞の Ca^{2+} 輝度が上昇し、数 100ms 遅れてニューロンが活動している様子が観察された (Fig. 4B②)。Fig. 4B の①の Ca^{2+} 波形はグリア細胞を示しており、神経細胞と同期してオシレーションしていることがわかる。これらの結果から、グリア細胞への刺激が近傍の神経細胞およびグリア細胞に伝播することがわかった。

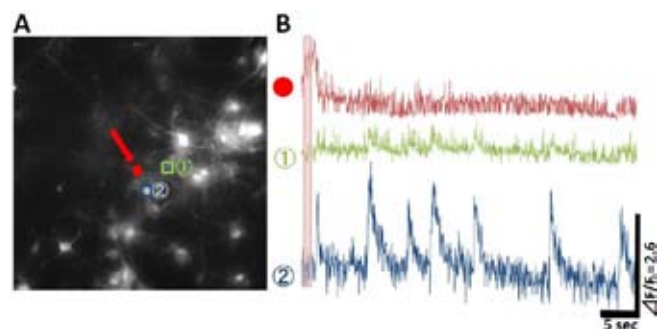


Fig. 4 Evoked responses by irradiating glial cell. (A) Fluorescent image of stimulus site and analyzed cells. (B) Ca^{2+} wave forms.

4.結論

神経ネットワークの任意の細胞、任意の神経突起を 1064nm レーザを用いて局所加熱した結果、局所熱で神経活動を誘発できること、およびその活動がネットワーク全体に伝播することが Ca^{2+} イメージングによりわかった。また、神経細胞の細胞体のみならず、神経突起への照射においても活動を誘発することに成功したため、本技術は、特定の軸索、神経突起、シナプスを刺激できる空間分解能に優れた刺激技術になることが期待される。更に、グリア細胞の刺激により、グリア細胞が局所熱によって刺激されること、およびグリア細胞の応答によって近傍の神経細胞やグリア細胞の活動が誘発されることがわかった。しかしながら、何度の温度上昇で神経細胞およびグリア細胞の活動が誘発されるのか、また局所熱によって誘発されるメカニズムに関してはわかっていない。今後、温度変化測定と細胞内外の Ca^{2+} チャンネルの動態に着目して、熱応答に対するメカニズムを調べてゆく予定である。

5.まとめ

本研究成果により、近赤外レーザー照射による局所熱刺激法は非侵襲かつ高空間分解能を有する新たな神経ネットワーク刺激技術になることが期待され、神経細胞ネットワークの情報伝達制御機構を解明するための有効な手段になると期待している。

参考文献

- (1) Amorn Wongsarnpigoon, Warren M. Grill, Computer-based model of epidural motor cortex stimulation: Effects of electrode position and geometry on activation of cortical neurons, *Clinical Neurophysiology*, Vol. 123, no. 1, pp. 160-172, 2012.
- (2) Edward M Callaway, Rafael Yuste, Stimulating neurons with light, *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 12, no. 5, 1, pp. 587-592, 2002.