

ITO ガラス電極を用いた細胞刺激デバイスの開発と 定量的電流刺激による海馬神経細胞ネットワークの解析

2015 年度

棚元 亮

学位論文 博士（理学）

ITO ガラス電極を用いた細胞刺激デバイスの開発と
定量的電流刺激による海馬神経細胞ネットワークの解析

2015 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

棚元 亮

主 論 文 要 旨

報告番号	○甲 乙 第	号	氏 名	棚元 亮
主 論 文 題 目 :				
ITO ガラス電極を用いた細胞刺激デバイスの開発と 定量的電流刺激による海馬神経細胞ネットワークの解析				
(内容の要旨) ITO(indium-tin-oxide)ガラス電極は透明性と導電性を併せ持つことから、これまで生命系の様々な分野において、電流刺激を与えながら同時に細胞を観察するためのツールとして用いられてきた。しかし、ネットワークを形成する複数神経細胞に定量的な電流刺激を与えながら、神経細胞の発火パターンを観察した例はほとんどない。本研究では簡単な電極構造で複数細胞に定量的な刺激を与えることが可能な実験系を ITO ガラス電極により開発し、海馬神経細胞のネットワーク接続関係について解析した。 第 1 章は緒言で、神経ネットワークを観察するためにこれまで用いられてきた電気生理学的手法や Ca^{2+} 蛍光イメージング法について述べた。細胞に電流刺激を与えながらその応答を Ca^{2+} イメージングにより観察するための手法として、ITO ガラス電極を用いた研究についていくつか紹介した。 第 2 章では、ITO ガラス電極を、対電極がない単一の形状にパターンニングし、細胞に刺激を与える系の確立について述べた。フォトリソグラフィの技術を用いて観察部が周囲に比べて細くなるようにして、強い電流刺激ができるように導電面をパターンニングした。この ITO ガラス基板上で Nerve growth factor (NGF) 分化 PC12 細胞を分散培養し、細胞へ加わる刺激の特性について議論した。形状パラメータとして細胞刺激領域の幅を変えることにより、応答細胞数がどのように変化するかを調べた。その結果、幅 0.1 mm 以下の電極では、幅が細いものほど応答細胞数の割合は上昇するのに対して、それより広い電極では、幅の影響はほとんど見られなかった。応答細胞率と測定電流値との関係を調べたところ、およそ 60 μA を閾値として応答が誘起されたことから、電極形状に関わらず電流値が応答を決定していたものと考えられる。さらに、電極上あるいは近傍の細胞のみしか応答を示さなかったことから、刺激の局所性を示せた。これらの結果より、作製した ITO ガラス電極は、対電極なしに電流値に依存した局所的な電流刺激を細胞に与えることが可能とわかった。 第 3 章では、海馬分散神経細胞を長期にわたって培養することによるネットワーク成熟の様子を調べるために、パターンニングした ITO ガラス電極の刺激による細胞の応答性と細胞間での協同性を議論した。培養日数と細胞応答との関係を調べたところ、培養開始 17 日目 (17DIV) を境として応答は異なった。電流刺激により応答する細胞の割合を調べたところ、17DIV 以降の細胞は有意に応答率は増した。17DIV 以降の細胞では、刺激強度を徐々に上昇させていくことによる応答細胞率累積値の上昇の仕方が S 字型のものと飽和型のものの 2 種類見られた。2 種類の応答について Scatchard プロットや刺激開始からの応答遅れ時間により違いを見い出した。17DIV 以降の S 字型の応答を示していた細胞に神経伝達物質グルタミン酸受容体である N-methyl-D-aspartate (NMDA) と α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) の阻害剤である D,L-2-amino-5-phosphonovalerate (AP5) と 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) を加えると、飽和型に変化することを、Scatchard プロット、応答遅れ時間、さらに Hill 係数により示した。これらの結果より、S 字型の応答を示した細胞間では、グルタミン酸による協同的なシナプス接続が起こっていたことが示された。 第 4 章では本論文の総括として本研究で用いた形状の ITO ガラス電極の今後の応用と可能性について述べた。				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name TANAMOTO, Ryo
Title Development of the device for stimulating cells with ITO glass electrode and its application to network analysis of hippocampal neurons		
Abstract Because ITO (indium-tin-oxide) glass electrode has both good transparency and high electrical conductivity, it has been used to electrically stimulate cultured cells and also observe the responses simultaneously. However, this tool has not been used to quantitatively stimulate neurons and observe the network behavior among them. In this study, we developed a system capable of electrically stimulating cells by simply patterned ITO glass electrode and we investigated the neural network connectivity in rat hippocampal neurons with this system. Chapter 1 introduces conventional electrophysiological methods and Ca^{2+} fluorescent imaging techniques observing the neural network activity. As a method to electrically stimulate cells and observe the responses of the cells with Ca^{2+} fluorescent imaging, studies on ITO glass electrode are described. Chapter 2 describes the fabrication of a quantitative current stimulation system without using a counter electrode. The middle region of the conductive area of the ITO glass electrode was designed and patterned with photolithographic and wet-etching procedure to stimulate cells with enough intensity. Nerve growth factor (NGF)-induced differentiated PC12 cells were cultured on an ITO single glass electrode, and the Ca^{2+} response to electrical stimuli was measured using fluorescent Ca^{2+} imaging. ITO electrode devices with a width less than 0.1 mm were found to evoke a Ca^{2+} response in the PC12 cells. We found that the stimulation of the cells was dependent on the electrical current, when greater than 60 μA, rather than on the Joule heat, regardless the width and length of the conductive area. Furthermore, only the cells located on or near the electrode were stimulated. A Ca^{2+} response was also evoked in hippocampal neurons when cultured on these devices. These results show that the ITO device developed in this study is considered to be a useful tool for evaluating the quantitative neural excitability of cultured neurons <i>in situ</i>. Chapter 3 describes the examination of the neural network maturation with days <i>in-vitro</i> (DIV) on the patterned ITO glass electrode, by observing responsivity and cooperativity between dissociated hippocampal neurons. The cumulative number of neurons with Ca^{2+} responses was low during the application of stepwise increase of electric current in short-term cultured neurons (less than 17 DIV). The neurons cultured over 17 DIV showed two-type curves of cumulative number of neurons with Ca^{2+} responses: S-shaped and monotonous saturated responses, and Scatchard plots well illustrated the difference of these two responses. The ratio of responses with delay time of several seconds to the onset of stimulation was larger in the neurons showing S-shaped responses than in those showing monotonous ones. Furthermore, S-shaped neural network responses over 17 DIV were altered to the monotonous saturated ones by the application of the mixture of D,L-2-amino-5-phosphono-valerate (AP5) and 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), specific blockers of <i>N</i>-methyl-D-aspartate (NMDA) and α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors, respectively. This alternation was also characterized by the change of Scatchard plot, delay time of responses and Hill coefficients. These findings indicate that the neural network with S-shaped responses has strong synergetic or cooperative synaptic connectivity <i>via</i> excitatory glutamate synapses. Chapter 4 describes the conclusion of this study and the possibility of this patterned ITO glass electrode for various applications in the neuroscience.		