

VERITAS SCIENCE LETTER

Vol. **22**
2021.04

BrainPhys Primary Neuron Kit を 用いたアプリケーション

ラット初代培養皮質神経細胞の神経活動および 薬物応答性に与える培地条件の検討

小島 敦子^{1,2}, 小田原 あおい¹, 田辺 岳海^{1,2}, 宮本 憲優¹

1 エーザイ株式会社, 高度バイオシグナル安全性評価部

2 株式会社テクノプロ テクノプロ・R&D 社, 事業統括部つくば支店

はじめに

鈴木らがヒト iPS 細胞由来神経細胞の分散培養系で微小電極アレイ (MEA) を用いた神経細胞活動電位記録の手法を発表して以来¹⁾, この手法が薬物誘発痙攣評価に活用できるのではないかと注目されている。この MEA を用いた薬物誘発痙攣評価法の確立に向けて、国内では“ヒト iPS 細胞応用安全性コンソーシアム (CSAHi)”において、米国では Health and Environmental Science Institute (HESI) の The Translational Biomarkers of Neurotoxicity (NeuTox) Committee による MEA Subteam においてコンソーシアムによる共同研究が展開されている。鈴木らは、スパイクや痙攣徴候とされる空間的に離れた神経細胞の同期バーストフェノタイプ²⁾が出現するまでの培養期間が、ラットアストロサイトとの共培養、あるいはラットアストロサイト培養液中の可溶性因子で短縮できることを示している³⁾。また、コンソーシアムでの共同研究では、培地組成の異なる培地を使用した施設間で、定常状態での同期バースト頻度に差がある結果が得られている。これらのことは、同期バーストが出現するための神経細胞同士のシナプス形成が、培地組成によって大きく影響されることを示唆している。BrainPhys Neuronal Medium は、Bardy らの報告⁴⁾に基づいて開発された脳の生理条件を再現した無血清培地であり、げっ歯類の初代培養神経細胞の播種および培養に適した BrainPhys Primary Neuron Kit が準備されている。そこで我々は、初代培養神経細胞での MEA 試験に本キットを用いた場合の神経活動発現の特徴を調べた。

方法および材料

動物実験は、エーザイ株式会社筑波研究所の実験動物委員会に実験計画を申請し許可を得た後、「エーザイ動物実験指針」及び日本実験動物学会の策定した「動物実験に関する指針」に従い行った。妊娠 18 日目の Wistar ラット (日本チャールズリバー社) 胎仔から摘出した大脳皮質細胞を、CytoView MEA 48 Plate (Axion BioSystems) に 8.7×10^4 cells/well、MED-Q2439M (Alpha MED Scientific Inc.) に 4.55×10^4 cells/well となるよう、BrainPhys Primary Neuron Kit (ST-05794、STEMCELL Technologies) 中の 2% NeuroCultTM SM1 Neuronal Supplement を添加した NeuroCultTM Neuronal Plating Medium を用いて播種し、37℃、CO₂ インキュベータ下で培養した。培養 5 日目に、同 Kit 中の 2% NeuroCultTM SM1 Neuronal Supplement を添加した BrainPhysTM Neuronal Medium で半量交換を行い、以降週 2 回培地の半量交換を行った。一方、2% B-27 Supplement (Thermo Fisher Scientific) 及び 1% GlutaMAX-I (Thermo Fisher Scientific) を添加した Neurobasal (Thermo Fisher Scientific) 培地で同プレートに播種した細胞は、播種以降週 2 回培地の半量交換を行った。播種後培養 19 日目に、薬物添加実験を行った。痙攣誘発陽性薬に 4-Aminopiridine (Sigma, 275875)、Picrotoxin (Sigma, P1675)、Strychnine (Wako, 195-11151) を、陰性薬に Acetaminophen (Sigma, A7085) を、バックグラウンドコントロールとして溶媒である DMSO (Sigma, D2650) を用いて神経活動に対する用量依存性を電気生理的に確認し

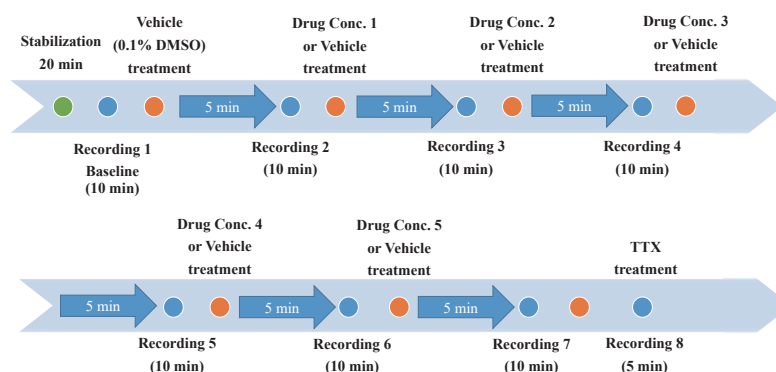


図 1. 累積法による薬物添加および細胞外電位記録プロトコル

た。Maestro Pro (Axion BioSystems) に MEA Plate を設置後 20 分間静置して安定化させ、累積法により薬物添加を行った。図 1 に示したように、各濃度での薬物添加 5 分後から 10 分間細胞外電位を記録した。データ解析は、AxIS, Neural Metric Tool と Metric Plotting Tool (Axion BioSystems) および Spotfire (PerkinElmer) を用いておこなった。

結果

1. 定常状態における自発活動パターン

図 2A および 2B は、1 ウェル中に存在する 16 個の電極を縦方向に並列に並べ、薬物を処置する前の定常状態でのスパイク率を 180 秒間示したラスタープロットと、16 個の電極のスパイク率の総和である Population Histogram を示した図である (2A : Neurobasal Medium、2B : BrainPhys Primary Neuron Kit)。培養 14 日目に自発活動を計測したところ、薬物による増減で痙攣徴候の有無を判定する指標となる同期バーストが観察された。中でも、BrainPhys Primary Neuron Kit で培養したサンプルは Neurobasal Medium サンプルに比べ優位に、総発火数 (図 2C)、同期バーストの頻度 (図 2D) およびバースト内の発火数 (図 2E) が高く、電気活動が活性化していることがわかった。

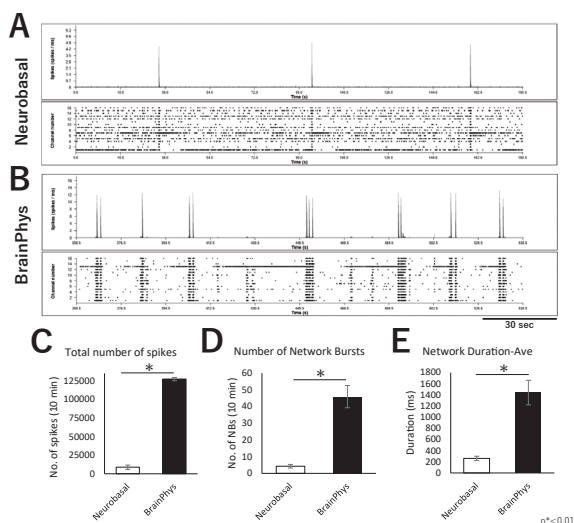


図 2. 培養 14 日目のラット初代培養皮質細胞の定常状態での自発活動のラスタープロットおよび Population Histogram

(A) Neurobasal Medium, (B) BrainPhys Primary Neuron Kit, (C) 10 分間の総発火数, (D) 同期バースト発火数, (E) 同期バースト内の発火数の平均値

2. 溶媒 DMSO の影響及び痙攣陽性薬の応答検知

図 3 は、Neurobasal 又は BrainPhys で培養したニューロンの、Picrotoxin と Acetaminophen の応答を、溶媒である DMSO の同じ累積濃度に合わせて総発火数をプロットした図である。Neurobasal で培養した場合、DMSO の累積でも総発火数が上昇したが、BrainPhys で培養したニューロンは、DMSO による影響が Neurobasal で培養した時より小さく、ばらつきも少なかった。痙攣陰性薬の Acetaminophen の応答は、DMSO によるバックグラウンドの応答にほぼ重なり、痙攣陽性薬の Picrotoxin (図 3) および 4-Aminopyridine (図 4) の応答が際立った。また、Strychnine の応答は、Neurobasal

コンディションでは、DMSO と痙攣陰性薬の Acetaminophen と差を示すことが出来なかったが、BrainPhys 条件では DMSO と Acetaminophen とは異なり用量変化をはっきりと捉えることが出来た。

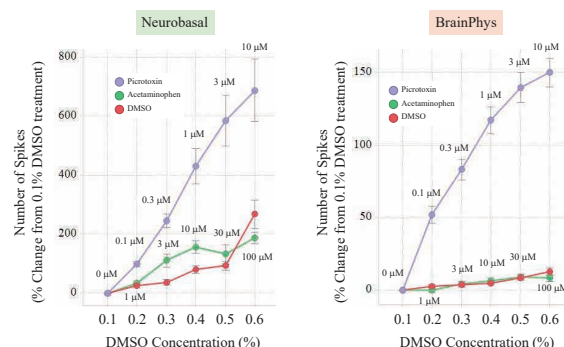


図 3. 培養 19 日目のラット初代培養皮質細胞の Picrotoxin に対する総発火数の変化

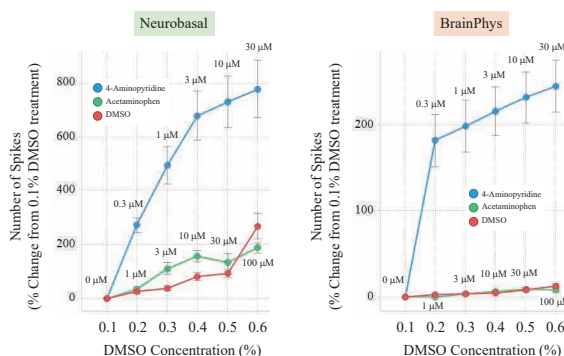


図 4. 培養 19 日目のラット初代培養皮質細胞の 4-Aminopyridine に対する総発火数の変化

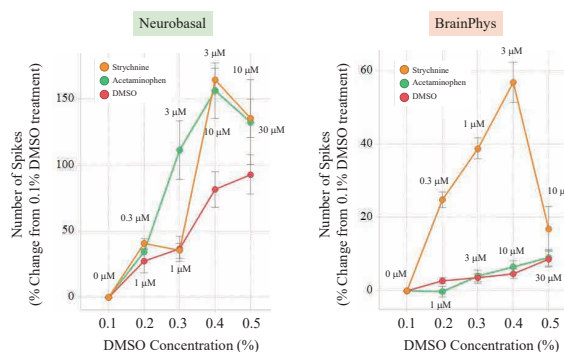


図 5. 培養 19 日目のラット初代培養皮質細胞の Strychnine に対する総発火数の変化

結論

ラットプライマリー皮質ニューロンを BrainPhys Primary Neuron Kit を用いて播種及び培養することによって、溶媒である DMSO の濃度依存的なスパイク数に及ぼす影響を排除でき、痙攣誘発薬の用量依存的な応答を明瞭に示すことが可能となった。



参考文献

1. Odawara, A., Saitoh, Y., Alhebshi, A.H., Gotoh, M. and Suzuki, I. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response in human induced pluripotent stem cell derived neuron and astrocyte co-culture. *Biochem Biophys Res Commun.* **24**; 443 (4): 1176-81, 2014.
2. Matsuda, N., Odawara, A., Katoh, H., Okuyama, N., Yokoi, R. and Suzuki, I. Detection of synchronized burst firing in cultured human induced pluripotent stem cell-derived neurons using a 4-step method. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **497** (2): 612-18, 2018.
3. Bardy, C., Hurk, M.v.d., Eames, T., Marchand, C., Hernandez, R.V., Kellogg, M., Gorris, M., Galet, B., Palomares, V., Brown, J., Bang, A.G., Mertens, J., Böhnke, L., Boyer, L., Simon, S. and Gage, F.H., Neuronal medium that supports basic synaptic functions and activity of human neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112** (20): E2725-34, 2015.

ご利用いただいた試薬

商品コード	商品名	梱包単位
ST-05794	BrainPhys Primary Neuron Kit	kit
ST-05790	BrainPhys Neuronal Medium	500 mL
ST-05711	NeuroCult SM1 Neuronal Supplement	10 mL
ST-05797	NeuroCult Neuronal Plating Medium	100 mL

* ST-05794 は ST-05790、ST-05711 および ST-05797 から構成されるキットです。

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14
住友東新橋ビル3号館5階
TEL.03-5776-0078(代) FAX.03-5776-0076
E-mail: veritas@veritastk.co.jp
<https://www.veritastk.co.jp/>

ベリタスサイエンスレターは株式会社ベリタスが最新の情報のエッセンスを著者の了解を得てお届けしています。

ご質問・ご意見は弊社バイオサイエンス本部技術グループ (TEL: 03-5776-0040 E-Mail: Tech_support@veritastk.co.jp) までお願いいたします。

RSTL-21-0992