

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12887

研究課題名(和文) In vitro交感神経-血管モデル構築による血管疾患メカニズムの解析

研究課題名(英文) Reconstruction of sympathetic neuron-vascular interactions in vitro and its applications

研究代表者

高山 祐三 (Takayama, Yuzo)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：60608438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では自律神経と血管系細胞(HPA-SMC)との共培養を行うことで、血管収縮系のin vitroモデルの構築を目指した。HPA-SMCの機能確認を行うためノルアドレナリンを添加した際のカルシウムイメージングを行い、その応答性を確認した。次に、自律神経とHPA-SMCの共培養を行い自律神経作用の影響を調べる実験を行った。自律神経と共培養した際の細胞骨格への影響を現在解析中であり、まとめしだい成果発表を行う予定である。以上の通り、血管収縮系への自律神経作用を評価するための有用なin vitroモデル構築に向けたデータを得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to construct an in vitro model of vasoconstriction system by co-culturing neurons in the autonomic nervous system (ANS) with smooth muscle cells (HPA-SMC). In order to confirm the function of HPA-SMC, we performed calcium imaging with application of noradrenaline, and confirmed its response capability. Then, we carried out co-culture of neurons in the ANS and HPA-SMC to examine the effects of ANS signals to vasoconstriction system. The influence of ANS signals on the cytoskeleton is currently being analyzed. As described above, we believe that the co-culture system will be a useful in vitro model for evaluating the ANS effect on the vasoconstrictor system.

研究分野：細胞工学、神経工学

キーワード：ヒトiPS細胞 自律神経 血管 微細加工 生物・生体工学

## 1. 研究開始当初の背景

収縮期血圧 140mmHg 以上および拡張期血圧 90mmHg 以上は高血圧状態とされ、様々な疾患の要因になると考えられている。我が国において高血圧患者は予備軍を含めて数百万人以上存在するとされており、血管疾患の治療・予防は今後の大きな課題である。血管疾患は遺伝的性質や代謝状態等の生体内環境要因とストレスや食生活等の生体外環境要因とが複合的に重なることで発症するとされているが、それゆえに発症メカニズムを解析することは困難である。血圧制御システムの一つとして近年注目を集めており、メカニズム解析が進んでいるのが交感神経作用である。血管への交感神経作用は性別および年齢により変化が起きることが知られており、血圧制御と疾患による機構破綻に重要な役割を果たしていると考えられている。複合要因による作用を解析するのに有効な手段として培養細胞モデルを構築することが挙げられる。培養液への添加物や濃度を調節することで生体内環境を適宜模擬することが可能であり、特定の要因による生体機能変化を詳細に調べることが可能となる。特に近年はヒト iPS (induced pluripotent stem: 人工多能性幹)細胞の利用により様々なヒト細胞種を取り扱うことが可能となり、培養細胞モデルによる疾患メカニズム解析研究は広く用いられはじめている。以上の見地に基づき、研究代表者はヒト iPS 細胞より交感神経-血管周皮細胞-血管内皮細胞を誘導し、構築した交感神経-血管モデルシステムを用いた血圧制御とその破綻メカニズムの解析を行うことを目指した。

本研究は交感神経細胞の血管制御システムを生体外で再構築することを目指しており、神経科学・循環器学の融合的な研究である。また、生体外再構築には細胞種を区画化して共培養を行う、構成的な培養技術が必要であり、微細加工技術の応用が不可欠である。研究代表者はこれらの微細加工・神経工学をバックグラウンドとしており本研究の遂行に最適な人材である。ヒト細胞を用いた交感神経-血管モデルの作製は疾患メカニズムを解析するための実験ツール、新規薬剤・化合物の有効性試験のためのスクリーニングデバイスなど基礎・応用研究の両面への発展が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目標は交感神経細胞・血管周皮細胞・血管内皮細胞の複合組織により行われる血圧制御等の血管機能を生体外にて再構築した *in vitro* モデルを構築することである。血管疾患は生体内環境要因と生体外環境要因とが複合的に重なることで発症するとされており発症メカニズムを解析することは難しく、高血圧に限定しても 90%以上の患者が原因不明とされている。研究代表者は本研究において、特に交感神経細胞の血管制御シ

ステムに着目し、ヒト多能性幹細胞を用いた交感神経-血管モデルを構築することでその発症メカニズムを解析するための *in vitro* 実験ツールを構築することを最終的な目標としている。その先には新規薬剤・化合物の有効性試験のためのスクリーニングデバイスへの応用を見据えている。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料細胞の確保と機能確認

本研究提案の主要材料となる各種細胞を如何にして準備するか、及び各種細胞の機能が十分かを最初の課題とした。ヒト自律神経、特に交感神経に関してはヒト多能性幹細胞より選択的に誘導した例は報告されておらず、また生体内での数量の都合より初代培養細胞としての利用も困難である。そこで、まずマウス等で報告されている自律神経の発生経路に関わるシグナリングをリサーチし、各シグナル経路を活性化もしくは抑制化させる低分子化合物群を選択した。この情報を基に、ヒト多能性幹細胞に自律神経系への誘導を促す低分子化合物群の添加タイミング・濃度を最適化しながら添加し、誘導される細胞の性質を評価していった。

血管周皮細胞に関しては、市販細胞である HPA-SMC (ヒト肺動脈平滑筋細胞)を用いることを想定し、モデル細胞としての使用が可能であるかの機能的評価を行うために、複数回継代した後に、交感神経が放出する神経伝達物質であるノルアドレナリンへの反応性をカルシウムイメージングにより計測・解析を行った。

### (2) ヒト自律神経と周皮細胞との共培養

自律神経由来のシグナルによる HPA-SMC への作用を評価するために、同一 dish 上でまず HPA-SMC を播種し、数日間培養を行った後に、HPA-SMC 上にヒト自律神経前駆細胞を播種し共培養を行った。自律神経との共培養を行ったサンプル、行っていないサンプル、それぞれでファロイジンによるアクチン染色を行い、HPA-SMC の細胞骨格への影響を調べた。

## 4. 研究成果

(1) これまでに報告されているヒト多能性幹細胞からの神経堤細胞誘導法とそこからの神経分化法により誘導される末梢神経細胞は多くが感覚神経細胞であり、自律神経細胞の作製効率は 5%以下であることがわかっている。ヒト多能性幹細胞から神経堤細胞を誘導する際には WNT シグナルの活性化が重要であることが示唆されている。しかし一方で、WNT シグナルの活性化は神経堤細胞から感覚神経細胞/前駆細胞への分化過程に関連していることがわかっている。以上より、研究代表者は継続的な WNT シグナル活性化がヒト多能性幹細胞から末梢神経系の中で選択的に感覚神経細胞への誘導に働いてい

たと仮定し、ヒト自律神経細胞を作製するには WNT シグナル活性化による神経堤細胞の誘導と、その後 WNT シグナル抑制化による自律神経系への分化誘導を行う、という段階的なプロセスが必要と考えた。

以上を踏まえ研究代表者が提案した新規の誘導プロトコルを用いた神経分化を行うことで誘導された神経細胞は 2~3 週間で神経節様の構造を形成した。この神経節様構造を形成する神経細胞の中で、60%を越える領域が交感神経マーカーである TH 陽性であった。一方で、既存技術に倣い誘導した神経堤細胞から作製したコントロール試料においては、TH 陽性を示す細胞は 2%程度であった。また、本手法で誘導した神経細胞は末梢神経マーカーである PERIPHERIN に陽性を示すとともに、自律神経マーカーである PHOX2A, PHOX2B に対しても陽性を示すことを確認した。また、交感神経マーカーである TH に陽性を示す末梢神経細胞と共に、副交感神経マーカーである CHAT に陽性を示す末梢神経細胞を確認している。以上の結果より、本手法によりヒト多能性幹細胞から自律神経系細胞を高効率で誘導可能であることがわかった。次に、誘導した神経細胞機能を解析するためにカルシウムイメージングによる細胞活動計測を行った。誘導した神経細胞は自発活動をほぼ示さないが、電気刺激等の外部刺激には再現性良く反応を示した。また、細胞活動時のカルシウム信号の立ち上がりから収束までは 10sec 程度の変化であった。これらの特性から誘導した神経細胞は末梢神経細胞に特徴的な活動を有していると判断できる。更に、誘導した神経細胞に対して薬理試験による特性解析を行った。誘導した神経細胞は感覚神経細胞のアゴニストである menthol や capsaicin の添加に対しては顕著な活動を示さなかったが、自律神経のアゴニストである nicotine 添加に対して顕著な応答を示すことを確認した。以上より誘導した神経細胞は自律神経系の特性と機能を有していることが示された。更には自律神経前駆細胞の誘導後、神経成熟過程における培養環境を制御することで、交感/副交感神経の選択的作製技術に関して検討を行った。その結果、細胞密度・神経栄養因子 (BDNF, CNTF) の濃度をパラメータとすることで、交感/副交感神経を選択的に誘導できることを見出した。以上の成果は、産業財産権①として成果発表を行っている。

また、HPA-SMC に関しては数回の継代培養を行い試料が安定化した後に、カルシウムイメージングによる活動解析を行った。その結果、HPA-SMC はノルアドレナリン添加に反応して、顕著なカルシウム応答を示すことを確認し、本研究の目的とする交感神経-血管モデル構築に向けて有用な細胞であることを確認できている (図 1)。

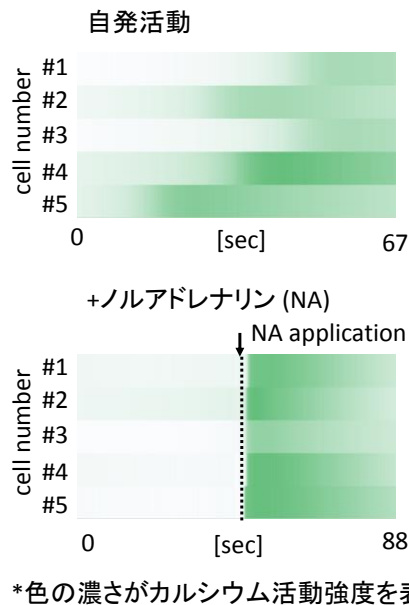


図 1 HPA-SMC のカルシウムイメージング

(2)(1)で記述した自律神経と HPA-SMC との共培養を行い、自律神経作用の影響を調べた。自律神経との共培養サンプルにおけるアクチン染色画像の取得を行い、常に自律神経と共培養を行ったサンプルにおける交感神経作用を解析中である (図 2)。この解析を終わり次第、自律神経作用の血管収縮系への影響に関して学会発表等を行う予定である。また、HPA-SMC 以外にも骨格筋細胞である C2C12 細胞に対する自律神経作用についてもデータを得ている。これらの結果と解析により、自律神経作用の筋肉系細胞への作用について有用なデータを得ることができたと考えている。

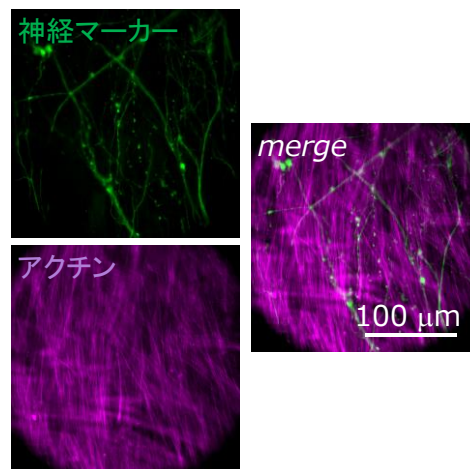


図 2 自律神経と HPA-SMC の共培養

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

①高山祐三、他、ヒト多能性幹細胞からの自律神経細胞誘導とその応用、平成 29 年電気学会電子・情報・システム部門大会、2017 年

②Yuzo Takayama et al., Brief Exposure to Small Molecular Compounds Allows Induction of Mouse Embryonic Fibroblasts into Neural Crest-Like Precursors, ISSCR2017, 2017 年

〔図書〕(計1件)

①高山祐三、木田泰之、他、シーエムシー出版、臓器チップの技術と開発動向、2018、293

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

①

名称：神経堤細胞から自律神経系の細胞への分化誘導方法

発明者：木田泰之、高山祐三

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2016/063006

出願年月日：2016 年 4 月 26 日

国内外の別： 国外

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/yuzotaka0124/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

高山 祐三 (TAKAYAMA, Yuzo)

産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：60608438