

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15209

研究課題名(和文) 生体外神経幹細胞ニッチECMモデルによる神経幹細胞の幹細胞性維持機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism analysis of neural stem cell maintenance using an in vitro neural stem cell niche ECM model

研究代表者

干場 隆志 (Takashi, Hoshiba)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：00469769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞(NSC)は生体内において幹細胞ニッチと呼ばれる特殊な環境にてその性質が維持されている。特にNSCの幹細胞ニッチにはfractonesとよばれる特殊な細胞外マトリックス(ECM)があり、NSCの幹細胞性の維持に寄与している。しかしながら、fractonesの役割は完全には明らかになっていない。そこで本研究では、NSCの培養と脱細胞化技術を用いることにより、培養細胞由来の脱細胞化マトリックスとして、生体外fractonesモデルの作製を行った。本研究で作製した脱細胞化マトリックスはNSCの接着性、増殖性を有し、また神経細胞への分化を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neural stem cells (NSCs) maintain their stemness in a special architecture called as "stem cell niche". Particularly, stem cell niche for NSCs contains a specific ECM structure called as "fractones" and fractones contribute to NSC maintenance. However, it remains unclear how fractones maintain NSC stemness. Here, an in vitro fractones model is prepared by the culture of NSCs and decellularization techniques. Prepared fractones model possessed cell adhesion ability and cell proliferation ability. Also, the model suppressed NSC differentiation into neural cells.

研究分野：生体材料

キーワード：細胞外マトリックス 神経幹細胞 幹細胞ニッチ 脱細胞化

1. 研究開始当初の背景

神経の再生には神経幹細胞(NSC)の応用が期待されている(K Reekmans, Regen Med, 2012)が、そのためには生体外で幹細胞性を維持したまま増殖させる必要がある。生体内で NSC は幹細胞ニッチ内で増殖する。特に NSC の幹細胞ニッチは「fractones」と呼ばれる細胞外マトリックス(ECM)により構築され、幹細胞性を維持している (F Mercier, J Comp Neurol, 2002)。一方で、fractones は、生体内の限定された領域にしか存在せず、生体外モデルも存在しないため、fractones ECM による NSC の幹細胞性維持等の機能制御機構に関する解析は進んでいない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに細胞培養および脱細胞化技術を用いて、間葉系幹細胞が骨/脂肪細胞へと分化する際の ECM を模倣した生体外 ECM モデルを、脱細胞化マトリックスとして作製してきた。そこで本研究では、NSC を生体外で培養し ECM を形成させた後に、脱細胞化処理を行うことにより、生体外 fractones モデルの作製を試みた(図 1)。

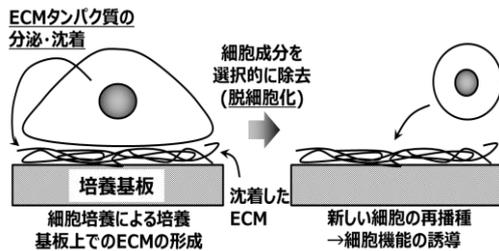


図 1: 脱細胞化技術による生体外 ECM モデルの作製

また、作製した生体外 fractones モデルを用いて、NSC を培養し、その機能および機能発現メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ECM の形成

マウス NSC モデル細胞株である MEB5 細胞を接着培養用培地 RHB-A 培地中で、ラミニン、ポリリン(PLL)、フィブロネクチン、組織培養用ポリスチレン(TCPS)で播種密度を変えながら培養し、ECM の形成を行った。ECM の形成後、0.5% Triton X-100 および 20 mM NH₄OH を含む PBS 中で処理後、さらに DNase I、RNase A 処理を行うことにより、脱細胞化を行った。

脱細胞化の確認は Alexa488 結合ファロイジンおよびヘキスト 33258 によりアクチン線維および細胞核を標識後、蛍光顕微鏡により観察することにより確認した。

また、ECM 形成中に MEB5 が分化していないか確認するために、神経分化マーカーである

NeuroD1(ニューロン)および *Gfap*(アストロサイト)遺伝子の発現を RT-PCR 法により確認した。

さらに脱細胞化処理後も ECM が残存しているか確認するために、脱細胞化マトリックス中のフィブロネクチンおよびラミニン α 3 鎖を免疫染色法により検出した。

同時に MEB5 細胞が発現する ECM 遺伝子を RT-PCR 法により確認した。

(2) 脱細胞化マトリックス上での NSC の培養

作製した脱細胞化マトリックスが接着活性を有するか確認するために、ニューロスフェア培養用の培地中における MEB5 細胞の 1 および 3 時間後の接着数を、クリスタルバイオレット染色により細胞を可視化後、光学顕微鏡下で計測した。

さらに脱細胞化マトリックス上で細胞が増殖するか確認するために、培養中の MEB5 細胞を位相差顕微鏡下で観察後、WST-8 法により増殖細胞数を計測した。

脱細胞化マトリックス上における MEB5 細胞の分化能を確認するために、MEB5 細胞を分化誘導培地中で培養し、培養 2 日後における細胞形態を位相差顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) ECM 形成時における培養条件の最適化

ECM 形成時における培養基板を最適化するために、各種の培養基板上で MEB5 細胞を RHB-A 培地中で培養した。TCPS 上で細胞は速やかにニューロスフェアを形成した。また、フィブロネクチン上では 2 日後までは接着していたが、5 日後には剥離し、ニューロスフェアを形成していた。一方、ラミニンおよび PLL 上では細胞は接着を維持しながら増殖し、基板一面に伸展した。以上の結果から、ECM 形成時における初期の培養基板としてラミニンおよび PLL が最適であった(図 2A)。そこで本研究では初期の培養基板としてラミニンを用いて今後の検討を行った。

さらに、細胞密度についても最適化を図ったところ、 2×10^4 個/cm² 以上で、1 週間後、基板を完全に被覆することができた(図 2B)。そこで、本研究では、播種密度を 2×10^4 個/cm² として、今後の検討を行った。

また、ECM 形成のための培養中に MEB5 細胞が分化していないか確認するために、*NeuroD1* および *Gfap* の発現を検出したところ、接着培養下においても、MEB5 細胞内においてこれらの神経分化マーカー遺伝子の発現は確認されなかった(図 2C)。この結果は、ECM 形成時における培養中において、MEB5 細胞は未分化状態を維持していることを示している。

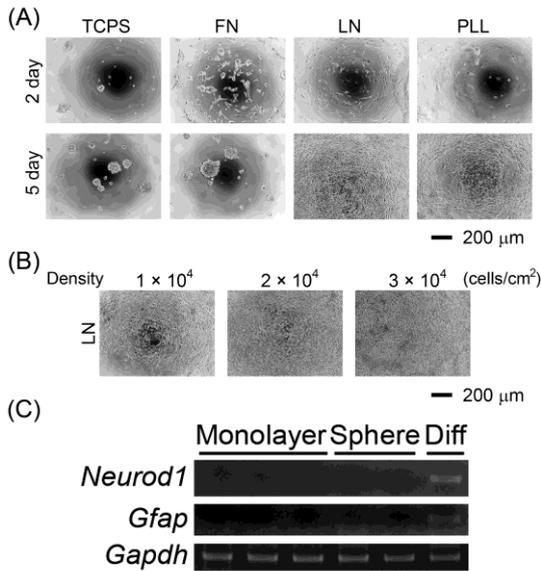


図 2 : ECM 形成のための培養条件の最適化 (A) 培養基板の比較、(B) 播種密度の比較、(C) 培養中の分化状態の確認。FN : フィブロネクチン、LN : ラミニン、Monolayer : 接着培養 (ECM 形成培養)、Sphere : ニューロスフェア培養、Diff : 分化誘導培養

(2) 脱細胞化マトリックスの調製

細胞が除去されたか確認するために、アクチン線維および細胞核の観察を行ったところ、脱細胞化後のサンプルではアクチン線維および細胞核は観察されなかった (図 3A)。また脱細胞化処理後においても ECM が残存しているか確認するためにフィブロネクチンおよびラミニン $\alpha 3$ 鎖の免疫染色を行ったところ、脱細胞化後のサンプルにおいてフィブロネクチンおよびラミニン $\alpha 3$ 鎖が検出された (図 3B)。以上の結果から、MEB5 細胞由来の脱細胞化マトリックスを調製できたことを確認した。

さらに、脱細胞化マトリックス中に含まれる ECM を検討するために、MEB5 細胞が発現する ECM 遺伝子を検出したところ、fractones を構成するラミニン、IV 型コラーゲン、ニドゲン、パールカンの発現を確認できた (図 3C)。この結果は、作製された MEB5 細胞由来の脱細胞化マトリックスは fractones の組成に近いことを示唆している。

(3) 脱細胞化マトリックス上での MEB5 細胞の機能

作製された脱細胞化マトリックスが細胞接着活性を有するか確認するために、細胞接着実験を行ったところ、脱細胞化マトリックス上では時間経過とともに細胞の接着が確認された。一方、陰性対照であるアルブミン塗布基板では細胞は接着しなかった (図 4)。本結果は、作製された脱細胞化マトリックスは細胞接着活性を有することを示している。

さらに作製された脱細胞化マトリックス上では、MEB5 細胞はコロニーを形成しながら

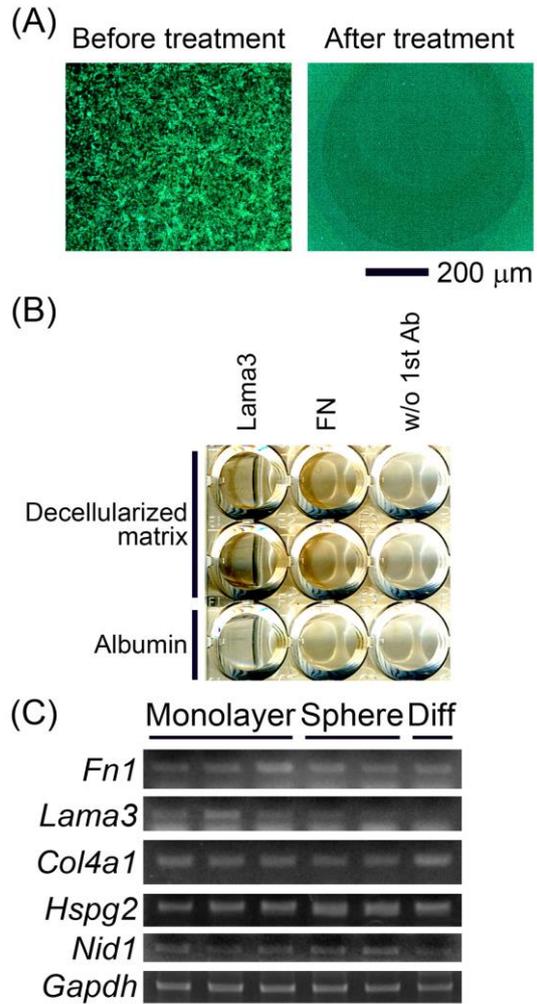


図 3 : 脱細胞化マトリックスの作製 (A) 細胞除去の確認、緑 : アクチン、青 : 細胞核 (B) 沈着した ECM タンパク質の検出。Lama3 : ラミニン $\alpha 3$ 鎖、FN : フィブロネクチン (C) MEB5 細胞が発現する ECM 遺伝子。Monolayer : 接着培養 (ECM 形成培養)、Sphere : ニューロスフェア培養、Diff : 分化誘導培養

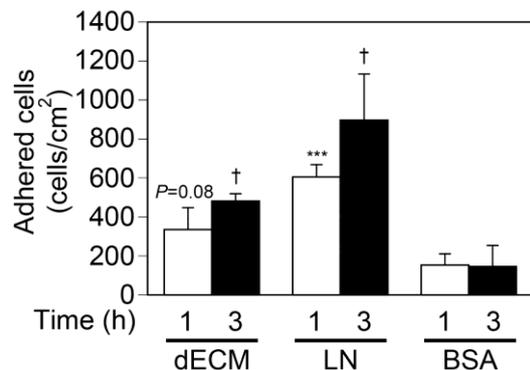


図 4 : 脱細胞化マトリックス上への細胞接着
dECM : 脱細胞化マトリックス、LN : ラミニン、BSA : アルブミン (陰性対照)

増殖する様子が確認された (図 5)。

さらに、MEB5 細胞を分化誘導培地中で培養したところ、ラミニン上では神経突起の伸長が確認されたが、脱細胞化マトリックス上で

は抑制されていた(図 6)。この結果は、作製した脱細胞化マトリックス上では神経細胞への分化が抑制されることを示唆している。

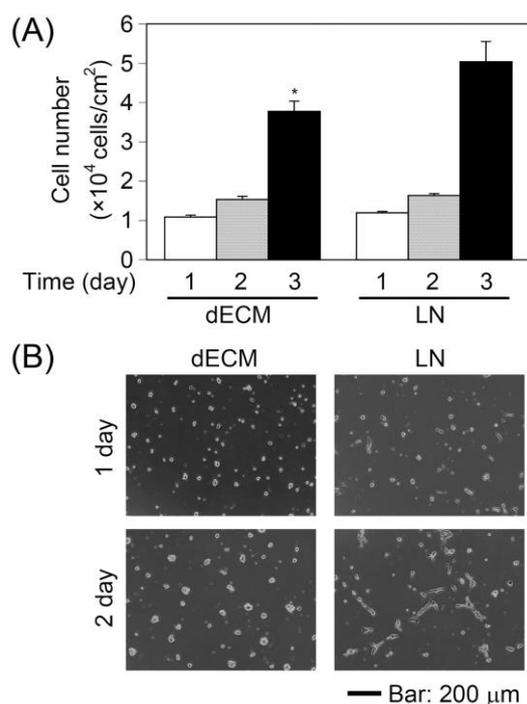


図 5：脱細胞化マトリックス上での細胞増殖 (A) 細胞増殖数、(B) 細胞形態

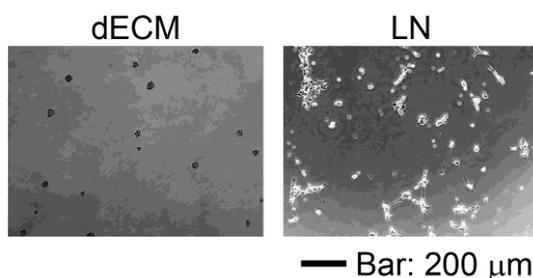


図 6：分化誘導培地中で培養した MEB5 細胞の形態

以上の結果から、MEB5 細胞を接着培養後、脱細胞化処理を行うことで、生体外 fractones モデルが作製されたことを示唆している。本研究結果は現在論文投稿中である。

また、一方で、細胞接着活性が低いことが今後の課題であり、現在、作製方法の改良に取り組んでいる。

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 7 件)

1. T. Hoshiba, J. Gong. Fabrication of cell-derived decellularized matrices on three-dimensional (3D)-printed biodegradable polymer scaffolds. *Microsyst Technol*, 24, 613-617 (2018) (Corresponding author). doi: <https://doi.org/10.1007/s00542-017-3470>

-1 【査読有】

2. T. Hoshiba. Cultured cell-derived decellularized matrices: A review toward the next decade. *J. Mater. Chem. B*, 5, 4322 - 4331 (2017). (Corresponding author) (Themed collection: Emerging Investigator 2017, Selected as a HOT paper 2017). doi: 10.1039/C7TB00074J 【査読有】

3. T. Hoshiba, M. Tanaka. Decellularized matrices as in vitro models of extracellular matrix in tumor tissues at different malignant levels: Mechanism of 5-fluorouracil resistance in colorectal tumor cells. *BBA -Mol. Cell Res.* 1863, 2749-2757 (2016). (Corresponding author). doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.08.009 【査読有】

[学会発表] (計 23 件)

1. T. Hoshiba, Cultured cell-derived decellularized matrices for tissue engineering. 18th International Union of Materials Research Societies International Conference in Asia (IUMRS-ICA2017) (招待講演), 2017 年 11 月 5 日-9 日, Taipei Nangang Exhibition Hall (Taipei, Taiwan).

2. T. Hoshiba, Chemoresistance of tumor cells on decellularized matrices derived from tumor cells with different malignant levels. 6th Asian Biomaterials Congress (招待講演), 2017 年 10 月 25 日-27 日, Apollo DIMORA, Thiruvananthapuram (Thiruvananthapuram, India).

3. T. Hoshiba, Tumor cell-derived decellularized matrices for tumor tissue engineering ~Application for tumor biology and anti-cancer drug screening~ TERMIS-AP2017 (招待講演), 2017 年 9 月 21 日-24 日, Jinshi International Hotel (Nantong, China).

4. T. Hoshiba, Cell-derived decellularized matrix mimicking native ECM dynamics during tumor progression for tumor tissue engineering. TERMIS-AP2016 (招待講演), 2016 年 9 月 3 日-6 日, Fullon Hotel Tamsui Fisherman's Wharf (Taipei, Taiwan)

[図書] (計 1 件)

1. T. Hoshiba, N. Kawazoe, and G. Chen, Preparation of cell-derived decellularized matrices mimicking native ECM during the osteogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells. In "Methods in Molecular Biology", 印刷中. DOI: https://doi.org/10.1007/7651_2017_62

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：神経幹細胞の培養方法及び神経幹細胞用培養基材
発明者：干場隆志
権利者：干場隆志
種類：特許
番号：特願 2017-114289
出願年月日：2017 年 6 月 9 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等
<https://th-lab.wixsite.com/matrix-eng>

（受賞）

以下、すべて研究室においてインターンシップに参加した高校生の受賞

1. 平成 29 年度山形県サイエンスフォーラム 高等学校文化連盟科学専門部の部 最優秀賞(横山夏海「筋肉細胞が分化する際の細胞外マトリックスの再構築」)(高校インターンシップ生の受賞)
2. 第 61 回日本学生科学賞 山形県審査【高校】 最優秀賞(※県知事賞、チノー賞)(横山夏海、菅野友紀「神経幹細胞用の新しい培養基板の研究」)(高校インターンシップ生の受賞)(2017 年 11 月 4 日、読売新聞山形版・朝刊 25 面掲載)
3. 第 41 回全国高等学校総合文化祭 みやぎ総文 2017 自然科学部門 ポスター(パネル)発表 文化連盟賞(菅野友紀「神経幹細胞用の新しい培養基板の研究～生体内環境模倣への挑戦～」)(高校インターンシップ生の受賞)
4. 平成 28 年度山形県サイエンスフォーラム 高等学校文化連盟科学専門部の部 最優秀賞(菅野友紀「生体を模倣した神経幹細胞の培養」)(高校インターンシップ生の受賞)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

干場隆志 (Takashi Hoshiba)
山形大学・有機材料システム研究推進本部・
プロジェクト教員(准教授)
研究者番号：00469769

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

陳国平(Guoping Chen)
物質・材料研究機構・生体組織再生材料グループ・グループリーダー

伊藤嘉浩 (Yoshihiro Ito)
理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・主任
研究員