

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03197

研究課題名(和文) 創薬評価のための血液脳関門(BBB)を有する神経組織アレイ

研究課題名(英文) Neural tissue array with blood brain barrier (BBB) for the drug screening assay

研究代表者

根岸 みどり(加藤みどり)(Negishi, Midori)

武蔵野大学・薬学部・助教

研究者番号：30300750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：膨大な種類の薬剤や毒性物質の神経細胞に対する影響を短時間で解析するためにドラッグスクリーニングに適した3次元組織アレイを作成した。紐状の神経組織を利用して作製した3次元組織アレイは、組織中心部での細胞死が観察されない、細胞数が均一、アッセイに必要な細胞数がある、形状が均一などの特徴を有していた。z'-factorが0.5以上で薬剤スクリーニングの受け入れ基準をクリアすることができ、細胞死や細胞増殖の評価に用いることができることが示唆された。また神経組織と血管内皮細胞の灌流培養系も確立した。今後は、本系を利用することで神経疾患の新規薬物の探索につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2次元培養と組織では薬物の効果が異なることが報告されており、ドラッグスクリーニングに適した3次元組織アレイの開発が求められていた。これまで3次元組織アレイとしては、スフェロイドを利用した抗がん剤のスクリーニングが主流であったが、本研究で開発した3次元組織アレイは、薬剤スクリーニングの受け入れ基準をクリアし、細胞死や細胞増殖の評価を行うことができる新規の組織アレイである。神経組織アレイと血管内皮の共培養系を利用することで、血液中からの組織への薬物取り込みを評価することが可能となり、将来的には大量の薬物スクリーニングに利用できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in fabricating a 3D tissue array suitable for drug screening to analyze the effects of a vast array of drugs on neural tissue in a short time. The 3D tissue arrays constructed using nerve tissue with a tubular-like structure had the following characteristics: no cell death was observed at the tissue center, the number of cells was uniform, there were enough cells for the assay, and the shape was uniform. The drug assay using this 3D tissue array was able to pass the acceptance criteria for drug screening. It was also suggested that the assay could be used to evaluate cell proliferation as well as cell death. We also established a perfusion culture system for neural tissue and vascular endothelial cells. In the future, this system will be used to search for novel drugs for neural diseases.

研究分野：神経科学

キーワード：マイクロデバイス 組織チップ 薬剤スクリーニング 神経科学

## 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患とは脳や脊髄などで特定の神経細胞が死んでいく病気である。この疾患の多くは、神経組織の再生が難しいため難治性疾患であり、本質的な治療法がなく、治療法の確立、特に創薬開発に向けた評価技術の開発が強く望まれている。神経変性疾患は、疾患の種類により変性が生じる神経細胞が異なることが特徴である。例えばアルツハイマー病では海馬、大脳皮質の神経細胞が損傷を受けるが、パーキンソン病では、中脳の黒質と大脳基底核の線条体に異常がおこることが知られている。また近年、2次元培養と3次元培養組織では薬物応答性が異なることが報告され、2次元組織を利用したドラッグスクリーニングの開発が求められている。そのため、創薬評価には次のような評価系が必要になると考えられる。①神経幹細胞及び各脳組織由来の神経細胞から形成される神経組織の構築、②神経変性を効率よく評価できる観察系の確立③生体内で薬剤は血管から血液脳関門を通過し神経組織に持ち込まれるため、血管内皮細胞との共培養系の評価が必須④評価薬剤の量を少量にすることで薬剤の開発コストを削減

これまでに、ラット初代培養大脳皮質細胞や海馬細胞、マウスやヒトの神経幹細胞を利用して、紐状の神経組織(細胞ファイバ)を構築し、これらの神経組織の特性を評価してきた。そこで、細胞ファイバを利用した3次元組織アレイを構築し、血管内皮細胞との共培養系の確立を進めドラッグスクリーニングへの利用の可能性を探ることとした。

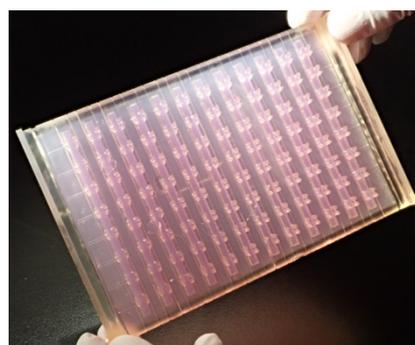
## 2. 研究の目的

本研究課題では、膨大な種類の薬剤や毒性物質の神経細胞に対する影響を短時間で解析するためにこれまでほとんど報告のない神経組織のドラッグスクリーニングに適した3次元組織アレイを作成する。また、神経組織と血管内皮細胞との共培養を行うことで、灌流培養可能な神経組織を構築する。βアミロイドタンパク質による神経細胞死が検出されるアルツハイマー病モデル組織を構築し、3次元組織で評価を行う。

## 3. 研究の方法

### (1)3次元組織アレイ作製

2重同軸層流マイクロデバイスを用いて、アルギン酸ゲルで覆われた細胞ファイバを視床下部神経細胞株(GT1-7)、がん細胞(HeLa)、神経幹細胞より作製した。細胞ファイバを切断し96ウェルプレートに転写するためのデバイスは、3Dプリンタで作成したフレームを紫外線とオゾンガスで滅菌後、3%(w/v)アガロースを流し込み作製した(図1)。細胞ファイバをデバイス上に固定し、マイクロトームブレードを用いて切断、デバイスを裏返し培地を含んだ96ウェルプレート上に置くことで細胞ファイバ片をウェルに移した3次元組織アレイを作製した。



M. K-N, et al., *Scientific reports*, 12, 7870 (2022)より引用

(図1) 3次元組織アレイ作製用デバイス  
デバイスは3Dプリンタで作成したフレームとアガロースで作製された。

### (2)3次元組織アレイの均一性評価

3次元組織アレイ作製用デバイスを利用して作製された組織片(細胞ファイバ片)の均一性を評価するために、3次元組織の形状を顕微鏡下で計測するとともに細胞数の計測も行い、細胞死の有無をlive/dead assayで評価した。

### (3)3次元組織アレイを利用したドラッグスクリーニング

薬物スクリーニングには、96ウェルプレート中の細胞ファイバ片をアルギナーゼで処理し、アルギン酸ハイドロゲルを除去したものを用いて実施した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、抗がん剤のドキソルビシン、β-estradiolで処理後の細胞の生存率について、CellTiter-Glo3Dを用いて測定した。3次元組織アレイがドラッグスクリーニングに適しているかどうかを、アッセイ系の最適度を表す指標であるz'-factorを算出することで評価した。

### (4)血管内皮細胞と3次元組織の共培養

インサート膜を介して神経組織をチャンバウェル下部に上部に血管内皮細胞を播種し、灌流培養を行った。薬剤の透過性を観察評価した。

### (5)3次元組織を利用した病態モデル組織の構築

スフェロイドや細胞ファイバにβ-アミロイドタンパク質(Aβ<sub>1-40</sub>, Aβ<sub>1-42</sub>)を投与し、神経細胞の変性を免疫組織化学染色とCellTiter-Glo3Dで評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 3次元組織アレイの評価

3次元組織アレイ作製用デバイスを利用することで、細胞ファイバから均一な長さの細胞ファイバ片が切り出され、96 ウェルプレートに転写されるかを評価した。長さ  $5.18 \pm 0.45$  mm (mean  $\pm$  SD)、CV = 8.7%, n = 96) のファイバ断片が96 ウェルプレートに転写効率100%で転写され、3次元組織アレイを作製することに成功した(図2)。

視床下部神経細胞由来の細胞株である GT1-7 細胞で作製した細胞ファイバアレイでは、1本の細胞ファイバ片の細胞数は  $1.2 \pm 0.1 \times 10^5$  (mean  $\pm$  SD)であり、変動係数は小さかった (CV = 9.9%)。バイオルミネッセンスアッセイは、細胞数が  $10^3$  個を超える組織で広く用いられていることを考えると、細胞ファイバで作製された3次元組織アレイは、十分な細胞数を有していることが示唆された。さらに、細胞ファイバ片は実験直前までアルギン酸の殻で覆われていたため、実験時の形状は均一であり、live/dead assay の結果から組織中心部の細胞死も観察されなかった。これらの結果から、細胞ファイバで作製したアレイは組織の中心で細胞死が観察されず、細胞数が均一で、アッセイに十分な細胞があり、形状が均一という薬剤スクリーニングに適した3次元組織アレイの特徴を示していることが示唆された。

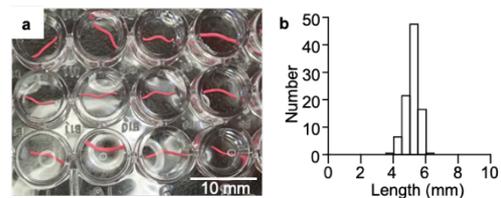
##### (2) 3次元組織アレイを利用したドラッグスクリーニング

GT1-7 細胞とマウス神経幹細胞から作製した細胞ファイバ片のアレイを利用し、 $H_2O_2$  に対する薬剤応答アッセイを実施した。GT1-7 細胞ファイバ片のアレイでは、 $H_2O_2$  を24時間処理すると、濃度依存的に細胞死を誘導した(図3a)。 $H_2O_2$  の EC50 は 0.84 mM であった。バイオルミネッセンスアッセイにおいて、GT1-7 細胞ファイバ片での感度 (シグナル/バックグラウンド比 (S/B)) は 1000 以上あった。また、アッセイ性能や品質の指標である z'-factor を算出した結果、3回の独立した測定で、z'-factor は、それぞれ 0.7、0.8、0.9 であった。一方、 $\beta$ -estradiol で48時間処理すると、発光として検出される ATP 量が増加し、100 ppb  $\beta$ -estradiol では  $123.4 \pm 28.3\%$  (mean  $\pm$  SD) となり(図3b)、この ATP 量の増加は細胞増殖を示唆していた。マウス神経幹細胞ファイバ片のアレイを24時間  $H_2O_2$  処理したところ、0-1 mM  $H_2O_2$  の範囲では細胞生存率が維持された(図4a)。一方、マウス神経幹細胞ファイバの分化を誘導後に  $H_2O_2$  で24時間処理したところ、GT1-7 細胞と同様に濃度依存的に細胞死を誘導した(図4b)。EC50 は 0.47 mM であり、z'-factor は 0.5 であった。

これらの結果から、神経系の細胞ファイバ片のアレイは薬剤スクリーニングの受け入れ基準 (z'-factor  $\geq 0.5$ ) をクリアすることができ、細胞死や細胞増殖の評価に用いることができることが示唆された。

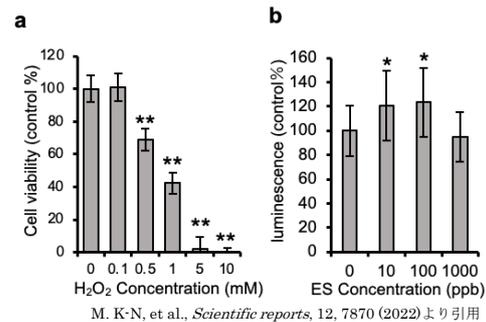
##### (3) 血管内皮細胞と3次元組織の共培養と病態モデル組織の構築

インサート膜を介して神経組織をチャンバウエル下部に、上部に血管内皮細胞を播種し、灌流培養を行った結果、灌流による蛍光物質の移動が観察できた。また、A $\beta_{1-40}$ 、A $\beta_{1-42}$  による神経細胞変性も確認することが出来た。今後は、共培養系での TEER の測定も行い BBB のバリア機能の評価を進め、また A $\beta_{1-40}$ 、A $\beta_{1-42}$  による神経細胞変性や ROS などによる神経細胞変性が、血管内皮細胞を通過した薬で抑制されるか評価を行い神経疾患治療に対する新規薬物の探索につなげていく予定である。



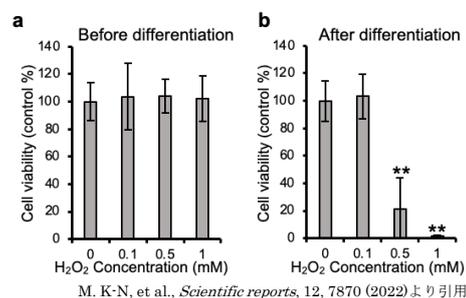
M. K-N, et al., *Scientific reports*, 12, 7870 (2022)より引用

(図2) 3次元組織アレイの均一性評価  
(a) 96 well plate に転写されたファイバの写真、  
(b) 転写されたファイバの長さのグラフ



M. K-N, et al., *Scientific reports*, 12, 7870 (2022)より引用

(図3) GT1-7 細胞ファイバアレイを利用した  $H_2O_2$  および  $\beta$ -estradiol (ES) 処理後の細胞生存率  
(a)  $H_2O_2$  で24時間処理後の細胞生存率  
(b)  $\beta$ -estradiol (ES) で48時間処理後の ATP 量の変化



M. K-N, et al., *Scientific reports*, 12, 7870 (2022)より引用

(図4) マウス神経幹細胞ファイバアレイを利用した  $H_2O_2$  処理による細胞生存率変化  
(a) 分化誘導前の神経幹細胞への  $H_2O_2$ 、24時間処理後の細胞生存率  
(b) 分化誘導後の神経幹細胞への  $H_2O_2$ 、24時間処理後の細胞生存率

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kawahara M, Kato-Negishi M, Tanaka KI	4. 巻 25
2. 論文標題 Amyloids: Regulators of Metal Homeostasis in the Synapse.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25061441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 2. Kawahara M, Sadakane Y, Mizuno K, Kato-Negishi M, Tanaka KI	4. 巻 21
2. 論文標題 Carnosine as a Possible Drug for Zinc-Induced Neurotoxicity and Vascular Dementia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Midori Kato-Negishi, Jun Sawayama, Masahiro Kawahara, Shoji Takeuchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Cell fiber-based 3D tissue array for drug response assay	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-11670-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Masahiro Kawahara, Ken-ichiro Tanaka, Midori Kato-Negishi	4. 巻 1
2. 論文標題 Neurotoxicity of aluminum and its link to neurodegenerative diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metalomics Research	6. 最初と最後の頁 47-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11299/metallomicsresearch.MR202104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masahiro Kawahara, Ken-ichiro Tanaka, Midori Kato-Negishi	4. 巻 22
2. 論文標題 Copper as a Collaborative Partner of Zinc-Induced Neurotoxicity in the Pathogenesis of Vascular Dementia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7242 ~ 7242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22147242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 根岸 みどり、澤山 淳、川原 正博、竹内 昌治
2. 発表標題 ハイスループットスクリーニングのための3次元組織アレイ
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Midori Kato-Negishi, Jun Sawayama, and Shoji Takeuchi
2. 発表標題 Fiber-shaped 3D tissue in a 96 well plate for high-throughput drug screening
3. 学会等名 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Morimoto, M. Kiyosawa, M. Kato-Negishi, S. Takeuchi
2. 発表標題 Formation of coaxial hierarchical-layered cell-laden fiber
3. 学会等名 22th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Science (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根岸みどり、松代悠暉、尾上弘晃
2. 発表標題 神経幹細胞を利用したドラッグスクリーニングのための3次元神経組織構築
3. 学会等名 日本薬学会第138年回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 根岸みどり、竹内昌治
2. 発表標題 機能的な3次元神経組織構築のための細胞ファイバ技術
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 川原正博、根岸みどり、田中健一郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 亜鉛栄養治療	5. 総ページ数 10
3. 書名 脳血管性認知症発症における亜鉛と銅のクロストーク	

1. 著者名 根岸みどり、森本雄矢、竹内昌治	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 203
3. 書名 再生医療・創薬のための3次元細胞培養技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	尾上 弘晃  (Onoe Hiroaki)  (30548681)	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授    (32612)	
研究分担者	川原 正博  (Kawahara Masahiro)  (40224828)	武蔵野大学・薬学部・教授    (32680)	
研究分担者	森本 雄矢  (Morimoto Yuya)  (60739233)	東京大学・大学院情報理工学系研究科・准教授    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関