

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18360

研究課題名(和文) 灌流培養デバイスを用いた神経幹細胞ニッチ構築と血流刺激による幹細胞維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of interaction among shear stress, endothelial cells, and neural stem cells in vascular niche using perfusable microfluidic device

研究代表者

長田 翔伍 (Nagata, Shogo)

東京大学・生産技術研究所・特任研究員

研究者番号：40751441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳内には血管内皮細胞(ECs)から成る神経幹細胞(NSC)ニッチが存在しており、血流による流れ刺激を受けるECsがNSCsの幹細胞性や分化制御を行っている。本研究では、NSCs、ECs、および細胞外マトリクスから成るNSCニッチモデルをカルチャーインサート上に構築し、ECsへ流れ刺激を負荷可能なマイクロ流体デバイスを開発した。流れ刺激は、ECsの細胞機能への影響だけでなく、NSCsの幹細胞性の向上、およびグリア細胞系への分化抑制が誘導される可能性を示した。マイクロ加工技術により、生体模倣性の高いNSCニッチモデルを構築し、ECs、NSCs、流れ刺激の相互関係の一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経幹細胞(NSCs)は、血管内皮細胞(ECs)から成るNSCニッチに存在し、中枢神経系(CNS)の維持や組織障害後の再生を担っている。本研究では、これまでほとんど調べられてこなかったECsを介した血流刺激によるNSC制御機構を評価可能な培養システムを構築することに成功し、血流を模した流れ刺激は、ECsの代謝機能活性化を伴い、NSCsの幹細胞マーカーの発現上昇、およびグリア細胞マーカーの抑制を誘導することを見出した。これは、CNS恒常性維持や発生機構の解明のみならず、神経再生や神経疾患の病態機構の解明に寄与することが期待されている。また、神経再生誘導を目的とした創薬分野への貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In brain, vascular structure consisting of endothelial cells (ECs) and extracellular matrix functions as neural stem cell (NSC) niche. The ECs that are stimulated by the blood flow regulate the NSC characteristic including the stemness and differentiation potential. In this study, we constructed an NSC niche model consisting of NSCs derived from human pluripotent stem cells, human ECs, and extracellular matrix on a culture insert, and developed a microfluidic device that can apply shear stress to the ECs. We showed that the shear stress could induce not only the effects of ECs on cell function, but also the enhancement of stemness of the NSCs and suppression of differentiation into glial lineage. By using microfabrication technology, we were able to reconstruct a highly biomimetic NSC niche model, and clarify some of the interrelationships between ECs, blood flow, and NSCs.

研究分野：組織工学

キーワード：神経幹細胞 血管性ニッチ シェアストレス マイクロ流体デバイス 臓器チップ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト成体脳において、側脳室の脳室下帯、海馬歯状回や嗅球といった特定部位では血管周辺に神経幹細胞 (NSCs) が局在しており、血管構成細胞と相互作用しながら、その幹細胞性維持および神経細胞新生を行っている。それにより、中枢神経系 (CNS) の恒常性維持や、細胞障害時の組織機能再生を行っていることが明らかとなっている。このような NSCs 周辺の血管構造や細胞外マトリクス (ECM) を含む微小環境は神経幹細胞 (NSC) ニッチと呼ばれ、特に血管内皮細胞 (ECs) と NSCs との相互作用の理解は、CNS の恒常性維持や発生機構の解明のみならず、神経再生や神経疾患の病態機構の解明に寄与することが期待されている。

近年、NSC ニッチを *in vitro* で再現する培養系が様々検討され、特に ECs と NSCs の共培養の結果から、EC-NSC 間における NOTCH 経路を介した NSC 制御機構が明らかとなってきている。また、ECs は血流による流れ刺激 (shear stress) により、その細胞機能を発揮することが報告されてきており、血管性ニッチにおいても血流による ECs の細胞機能調節は重要であることが示唆されている。

### 2. 研究の目的

従来の ECs と NSCs の共培養系では、このような血流様の流れ刺激を再現できておらず、正確な生体内 NSC ニッチの再現には至っていない。そのため、流れ刺激下にある ECs と NSCs との相互作用に関する知見は得られておらず、その分子機構は未だ解明されていない。本研究では、ECs に流れ刺激を与えることが可能な ECs と NSCs との共培養系を構築し、NSC ニッチの構築、および NSC 維持および分化における流れ刺激の役割を明らかにする。特に流れ刺激を受けた ECs による NSCs への影響を分子的に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、還流デバイスとヒト人工多能性幹細胞 (iPSCs) 由来 NSCs (iPS-NSCs) を用いてヒト生体模倣性が高い NSC ニッチの再現、およびニッチ内における NSC 特性解析を行う。具体的には、下記の 2 項目を実施する。

(1) NSC ニッチ構造を模倣するため、ECs にのみ血流を模倣可能な流れ刺激を負荷可能な還流型流体デバイス構築し、VEC と NSCs の共培養系を構築する。具体的には、PDMS のような細胞傷害性のない素材を用いてマイクロ流路を作製し、その中にカルチャーインサート型の共培養機材を設置可能なデバイスを作製する。カルチャーインサート型の共培養機材を用いることで、血管構造を模倣した VECs から成る細胞層の構築が可能となり、さらにその VEC 層の直上に NSCs を播種することが可能となる。また、NSC ニッチにおける細胞周辺環境を正確に模倣するために、任意の ECM を組み込めるような培養系を構築する。

(2) カルチャーインサートを用いることで、共培養後の ECs と NSCs を個別に回収することが可能となるため、各細胞集団のタンパク質および遺伝子発現解析を行うことで、流れ刺激存在下での各細胞特性解析、および相互関係を評価する。

### 4. 研究成果

従来の NSCs と ECs の共培養研究においては、マウスやラット脳組織由来 NSCs が多く用いられてきたが、本研究では、ECs にはヒト臍帯静脈内皮細胞である HUVECs を用い、NSCs にはヒト iPSC 由来の神経上皮幹細胞を用いた。これにより、ヒト模倣性が高い NSC ニッチの構築が可能となった。図 1 で示すように、トランスウェル型のカルチャーインサートを設置可能な PDMS から成るマイクロ流体デバイスを作製し、カルチャーインサート底部に播種され生着している HUVECs にのみ流れ刺激を負荷可能な培養系を構築した。なお、流れ刺激 (せん断応力 (shear stress) として評価) は、マイクロデバイスに接続されたペリスタティックポンプの流速設定により制御可能となるようにした。さらに、従来は人工膜 (PET 膜など) から成るカルチャーインサートを用いた共培養系は広く利用されてきたが、本研究ではより生体内環境を模擬とするためにビトリ化コラーゲン膜からなるカルチャーインサートを用いて共培養が可能であることを明らかにした。これにより、細胞と ECM からのみなる層構造の構築と、血管内皮細胞層のみへの流れ刺激負荷が可能な新たな共培養系の構築に成功した (図 2)。流れ刺激の有無、および強弱による各細胞への影響を評価するために、静置培養条件、低刺激 (せん断応力:  $0.5 \text{ dyn/cm}^2$ ) 条件、高刺激 ( $5 \text{ dyn/cm}^2$ ) 条件下における細胞特性解析を行った。各種細胞のマーカータンパク質に対する免疫

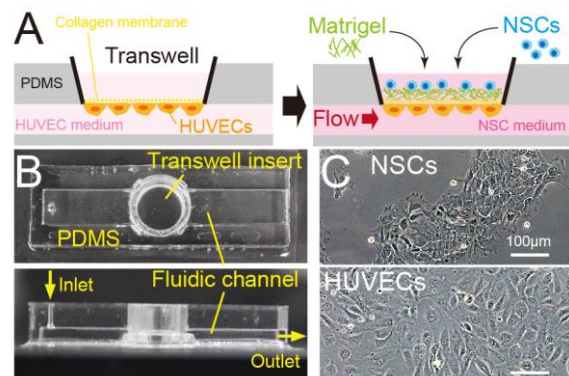


図 1. (A) トランスウェル型のカルチャーインサートが設置可能なマイクロ流体デバイスを用いた NSC ニッチの構築。(B) PDMS からなるマイクロデバイス。(C) 共培養に用いた HUVECs およびヒト iPSC-NSCs。



染色では、各流れ刺激負荷条件下において、HUVECs は CD31 や VECAD など EC マーカーが発現すること、NSCs では神経幹/前駆細胞マーカーである NESTIN が発現し、また神経分化マーカーである TUJ-1 も一部の細胞で発現することが確認できた(図 3)。このことから、流れ刺激による劇的な細胞変化(細胞死、脱分化や分化)は起こらず、それぞれの細胞特性を維持したまま培養できていることが明らかとなった。さらに、詳細に流れ刺激の細胞への影響を評価するために、定量的 RT-PCR により各細胞集団における遺伝子発現解析を行った。HUVECs では、流れ刺激の有無および強度に依存して、CYP1B1 などの代謝関連遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。さらに NSCs はそれに伴い、HES5 や ID1 などの NOTCH 経路下流遺伝子の発現が上昇し、グリアマーカーである GFAP の発現が低下することが明らかとなった

(図 4)。これは、流れ刺激が、HUVECs の活性変化を介して、近接する NSCs の幹細胞特性に影響を与えることを示唆しており、NSC ニッチにおける流れ刺激の役割および NSC 制御機構の一端を示すものである。

以上のことから、本研究では、これまでほとんど調べられてこなかった ECs を介した血流刺激による NSC 制御機構を評価可能な培養システムを構築することに成功した。さらにその培養システムを用いることで、血流を模した流れ刺激が、ECs の代謝機能を変化させそれに伴い、NSCs の幹細胞マーカーの発現上昇、およびグリア細胞マーカーの抑制を誘導することを見出した。更なる詳細な分子機構の解明が必要であるが、これは、流れ刺激による ECs の活性状態の変動に伴う液性因子分泌機能の変化により、何かしらの NSC 維持因子が放出されていることが予想される。従来研究からも NOTCH 経路を介した NSCs の維持や分化に関する報告はされており、本研究では、流れ刺激を受けた ECs から放出される NOTCH 経路活性化液性因子と、それによる NSC 制御機構の存在が明らかとなった。

これら得られた知見は、CNS 恒常性維持や発生機構の解明のみならず、神経再生や神経疾患の病態機構の解明に寄与することが期待できる。また、本培養システムは、神経再生誘導を目的とした創薬分野への応用も期待できるものであった。

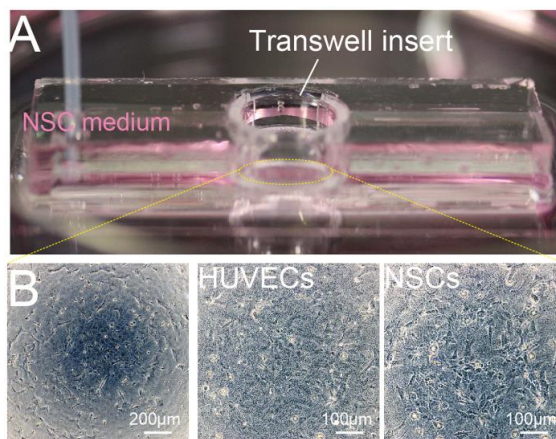


図 2. (A) マイクロ流体デバイスを用いた共培養。灌流には NSC 培地を用いた。(B) 共培養時の HUVECs および NSCs 観察像。透明度の高いビトリ化コラーゲン膜を挟んだ細胞層を構成しているため、観察焦点の深度調整により HUVEC 層と NSC 層それぞれを観察可能となった。

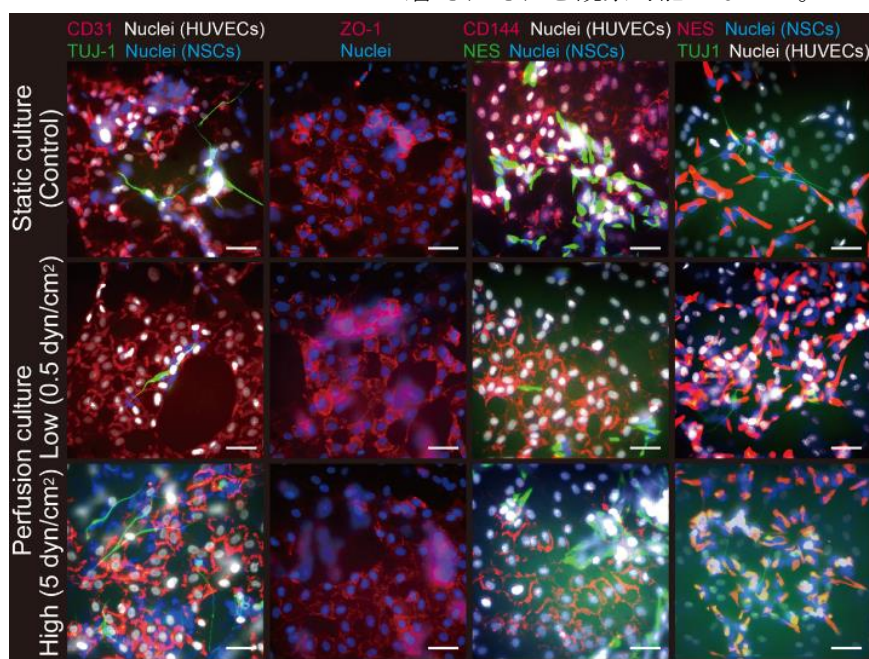


図 3. 各流れ刺激負荷条件下における免疫染色像。各条件で EC マーカー、NSC マーカーおよび神経細胞マーカー陽性の細胞群が確認できた。

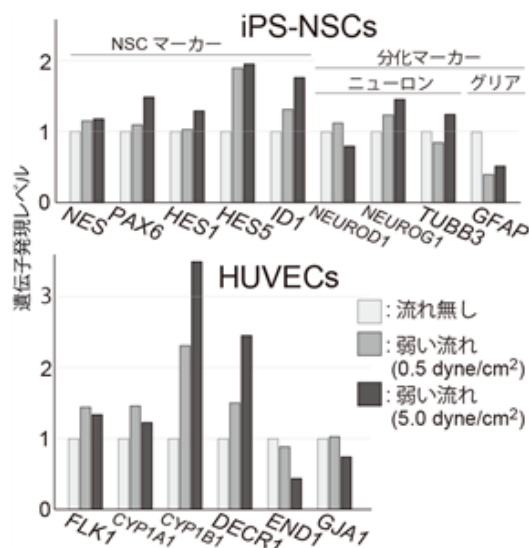


図 4. qRT-PCR による遺伝子発現解析。流れ刺激条件による発現パターンの違いを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 長田翔伍
2. 発表標題 Enhancement of iPSC-derived hepatocyte function through 3D culture using cell fiber technique
3. 学会等名 MicroTAS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長田翔伍
2. 発表標題 細胞ファイバ技術を用いたiPS細胞由来肝細胞の3次元培養法の開発
3. 学会等名 第38回 化学とマイクロ・ナノシステム学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長田翔伍
2. 発表標題 Fibrous neural organoid using cell encapsulation technique
3. 学会等名 ISSCR's International Symposia -Stem Cells & Organoids in Development & Disease- (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長田翔伍
2. 発表標題 Organoid engineering: Fibrous neural organoid formation using microfluidic device
3. 学会等名 4th Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----