

令和 2 年 6 月 6 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：18K18362
研究課題名（和文）マイクロ流体デバイスによるヒト大脳皮質発生の2次元モデル化

研究課題名（英文）Modeling human cortical development with microdevice

研究代表者
榎葉 健太（Shimba, Kenta）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：80792655
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）：大脳皮質様の構造を培養皿の中で再現するための基盤技術の開発に取り組み、神経細胞の移動制御において重要な神経幹細胞の突起の伸長方向をコントロールするための技術、および神経細胞に対して対象とした部位に選択的に液性の因子を作用するための技術を開発した。これらの技術は、今後大脳皮質モデルの開発に重要な役割を果たすことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した手法は、神経細胞の移動方向において重要な、神経幹細胞の突起構造の位置を制御するための技術である。本技術は、今後大脳皮質構造を培養皿の中で再現していく際の基盤技術となりえる。大脳皮質のモデル化は、正常/異常な神経発生が起こる原因の解明に向けた重要な研究であり、基礎分野のみならず、疾患の治療法開発や創薬という実社会への貢献にもつながる点で意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：In order to develop fundamental techniques for modeling the layer structure of cerebral cortex, we developed two methods; 1) a method for controlling process elongation of neural stem cells, which is important for guiding neuron migration; 2) a microfabrication-based method for treating neural cells with pharmacological reagent. These techniques will contribute to develop a cerebral cortex model in a dish.

研究分野：神経工学

キーワード：大脳皮質 マイクロ加工 パターニング

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は認知や情動といった脳機能にかかわる部位であり、特徴的な6層構造をもつ。この6層構造は、新たに生まれた神経細胞が神経幹細胞の突起を伝って移動し、**Reelin** と呼ばれる因子の作用で移動を終えることで形成される。大脳皮質の構造異常は、てんかんなどの疾患を引き起こすため、形成機序の理解は疾患の原因解明や創薬において重要な課題である。疾患のメカニズム解明や創薬応用を目指し、細胞の3次元凝集塊を用いたモデルが開発された。しかし、大脳皮質構造が凝集塊内部に形成されるため、栄養分不足や代謝不良により細胞死がおこる点、および外部からの薬理刺激が困難である点が課題であった。

本研究では、マイクロ加工技術を駆使し2次元平面上での大脳皮質モデル構築を目指す。大脳皮質様の構造とは、神経幹細胞より分化した神経細胞が一方向に移動し、深層・浅層神経細胞が **Reelin** により異なる位置で移動を終えることで層構造を形成した状態とする。研究の核心をなす問いは、神経系細胞が大脳皮質構造を形成するために必要最低限の要因は何かである。答えの探索は、正常/異常な発生が起こる原因の解明につながり、基礎分野のみならず、疾患の治療法開発や創薬という実社会への貢献にもつながる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロ加工技術を利用し2次元培養環境において大脳皮質モデルを形成することである。目的達成に向け、1)神経幹細胞の突起および神経細胞の移動をガイドするためのルール、および2)神経細胞に対して任意の位置で液性因子を作用させるためのマイクロ流体デバイス、という2つの要素技術を開発する。さらに、大脳皮質様の構造を自発的に形成させることができる手法である大脳オルガノイドを形成し、本手法と組み合わせることができるかの検討も行う。本研究の遂行により、大脳皮質の層構造を形成するために必要な要素技術が開発できる。その先には、実際に大脳皮質様なモデルを構築し、てんかんや統合失調症、ダウン症といった神経疾患の発症メカニズム解明や創薬に貢献するという目標を持つ。

3. 研究の方法

本研究は、1)神経幹細胞の突起と神経細胞の移動をガイドするためのパターンニング技術の開発、および2)局所的に液性の因子を用いて薬理刺激するためのマイクロデバイスの開発、3)大脳オルガノイドの試作の3点から構成される。

4. 研究成果

研究の方法において述べた2点の実験について、実験の概要と具体的な手順、および得られた成果を述べる。

1) 神経幹細胞の突起と神経細胞の移動をガイドするためのパターンニング技術の開発

神経発生において、新たに産生された未熟な神経細胞は、神経幹細胞の突起を伝って移動する。そのため、生体を模した大脳皮質構造の形成には神経幹細胞の突起をガイドすることが重要であると考えた。そこで、神経細胞と培養器材の接着を促進することで知られるタンパク質 **laminin** を、培養底面にストライプ状に塗布することで神経幹細胞

の突起がガイドできることを確認した。

ヒト iPS 細胞より分化誘導した神経幹細胞を、マイクロ加工によりストライプ状に Laminin を塗布した培養皿内で培養した。形成した laminin パターンと神経幹細胞および神経細胞の形態は、免疫組織化学染色法を用いて観察した。また、神経細胞の移動をタイムラプスイメージングにより観察した。

最初に、ストライプ状のパターンが形成されたこと、および神経細胞の軸索が laminin パターンによって影響されることを確認した。図 1 に結果を示す。赤色が laminin、緑色が神経突起を示す。図より、laminin がストライプ状に存在したこと、および神経突起がストライプの方向に伸長した

ことが示された。さらに、ストライプ状に神経幹細胞を多く含む細胞凝集塊を播種し、培養した。

結果を図 2 に示す。図 2 より、赤色で示す nestin 陽性の細胞の突起がストライプの方向(白矢印)に伸びている様子が見られた。以上より、laminin のパターンを用いることで神経幹細胞の突起伸長を制御できることが示唆された。

最後に、位相差顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングにより細胞の移動を評価した。パターンニングにより突起伸長を促進した方向では、垂直な方向と比較して移動距離が長いことが示唆された。以上は、表面パターンングが神経細胞の移動制御に有効であることを示唆する。

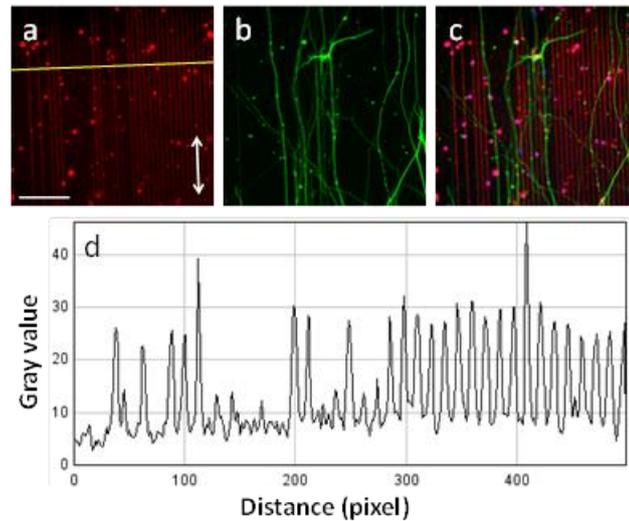


図 1 laminin と神経突起の方向

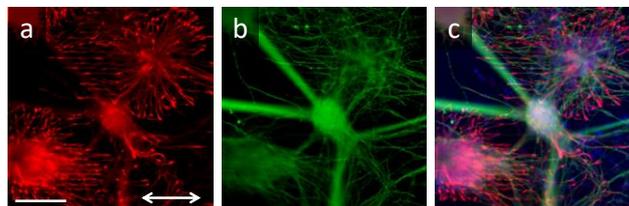


図 2 laminin パターン上の神経幹細胞。

2) 局所的に液性の因子を用いて薬理刺激するためのマイクロデバイスの開発

上記の laminin パターンとマイクロ加工を組み合わせ、神経細胞に対して局所的に液性の因子を作用させるためのデバイスを開発した。構造の検証のため、神経細胞の軸索に対して局所的に Na チャネルの阻害剤である TTX を作用させた。結果、軸索を伝導する信号の伝導時間が濃度依存的に上昇した。伝導時間の延長は、伝導速度の低下を示すため、Na チャネルが部分的に阻害されたことで信号の伝播速度が低下したと考えられる。さらに、同様の機構を持ちながらも、作用する濃度が

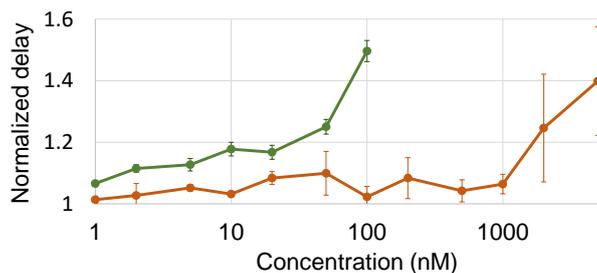


図 3 濃度と伝導時間の関係。緑色が TTX、オレンジ色が lidocaine の影響。

異なる Na チャネル阻害剤 lidocaine を作用させたところ, TTX と比較して高い濃度で作用する様子が観察された. 以上は, 本デバイスが軸索に対して選択的な薬理刺激を行い, その影響を細胞の機能から検討することに適することを示す.

3) 大脳オルガノイドの試作

ヒト iPS 細胞と大脳オルガノイドの形成キットを用いて, 上記の開発した手法と組み合わせることができるかを検討するために大脳オルガノイドを形成した. 分化誘導から 30 日目の染色像を図 4 に示す. 赤色が神経幹細胞を示す nestin, 緑色が神経細胞を示す beta 3 tubulin, 青色が細胞核である. 図より, 中央に空洞があり, 神経幹細胞の突起が空洞から外側に向けて伸びている様子が見られた. また, 神経細胞は主に構造の外側に集積していた. 以上は, 神経発生初期の構造に類似した構造である. 大脳皮質を再現していくために必要な要素が分化誘導した細胞集団に含まれることが示された. 一方, 凝集塊の中央部では細胞死が起こった様子が観察され, 上記の構造が形成された部分は凝集塊の一部であった. 今後は, より凝集塊のサイズを小さくすることで生存率と形成効率の高い方法を構築する必要性が示唆された.

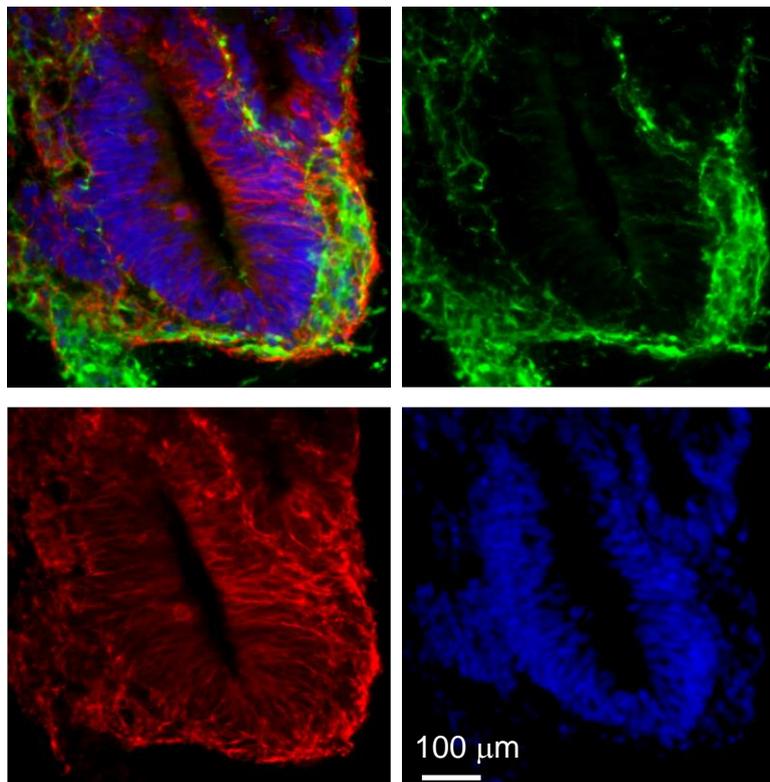


図 4 ヒト iPS 細胞より形成された大脳皮質様の構造.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kenta Shimba, Koji Sakai, Shoko Iida, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Long-term developmental process of the human cortex revealed in vitro by axon-targeted recording using a microtunnel-augmented microelectrode array	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEE Transaction on Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1109/TBME.2019.2891310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 榛葉健太, 浦田康快, 小谷潔, 神保泰彦	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 アミロイド オリゴマーによる培養神経回路網の自発活動変化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 電気学会論文誌C	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kenta Shimba, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo
2. 発表標題 Microtunnel-Based Recording for Evaluating Axon Conduction Change after Chemical Treatment
3. 学会等名 11th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Shimba, Koji Sakai, Kiyoshi Kotani, Tohru Yagi, Yasuhiko Jimbo
2. 発表標題 Microelectrode array with microtunnel structures for recording axon conduction from neuronal networks
3. 学会等名 Volga Neuroscience Meeting 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Shimba, Koji Sakai, Kiyoshi Kotani, Tohru Yagi, Yasuhiko Jimbo
2. 発表標題 Axon Conduction Changes by Partial Blockade of Na ⁺ Channels Revealed with Microtunnel-Coupled MEA
3. 学会等名 11th International Meeting on Substrate-Integrated Microelectrode Arrays (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Shimba, Koji Sakai, Kiyoshi Kotani, Tohru Yagi, Yasuhiko Jimbo
2. 発表標題 Microdevice for elucidating axonal conduction during partial blockade of na ⁺ channels
3. 学会等名 FENS Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Shimba, Yasuyoshi Urata, Shoko Iida, Koji Sakai, Kiyoshi Kotani, Tohru Yagi, Yasuhiko Jimbo
2. 発表標題 Excitation-inhibition balance dependent synchronous activity in mouse iPSC-derived neurons
3. 学会等名 ISSCR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----