

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25886006

研究課題名(和文)低酸素ストレス負荷アルツハイマー病態モデル系の開発とその解析

研究課題名(英文)Analysis platform of in vitro alzheimer's disease models under low oxygen stress

研究代表者

眞下 泰正 (Yasumasa, Mashimo)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20707400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性アルツハイマー病における神経細胞死は、低酸素刺激により発現誘導される因子が小胞体機能を障害するために生じる。本研究では、当仮説を基に、治療法・治療薬開発に必要な本疾患のin vitroモデルの構築に向け、低酸素刺激下での神経細胞の長期培養、及び、多数のサンプルを効率的に処理・解析するためのシステム開発を目的とした。

平成25年度には、自動化が可能な神経細胞の3次元長期培養システムをマイクロ流体デバイス・ナノファイバーを組み合わせることにより開発した。平成26年度には、本システムより得られる多次元のデータを、自己組織化マップを用い効果的に解析する手法を検討した。

研究成果の概要(英文)：The death of neural cells observed in tissues of patients with sporadic alzheimer's disease (SAD) occurs due to functional impairment of endoplasmic reticulum by unknown factors induced under low oxygen stress. In this study, we aimed to develop cell culture/analysis system to enable long-term culture of neural cells under low-oxygen stress, effectively handle many samples and analyze multi-dimensional data set, for construction of in vitro SAD disease models.

In 2013, we fabricated a microfluidic device for 3D long-term culture of neural cells which can be applied in automated cell culture system. Three-dimensional culture was achieved with electrospun nanofibrous scaffolds. In 2014, we examined a method to analyze and visualize the similarity/dissimilarity of a number of samples in the microfluidic device with self-organizing map, in addition of comparison of expression level of marker proteins, for gaining deeper insight from each data value.

研究分野：ナノ・マイクロ加工技術

キーワード：ナノファイバー iPS細胞 マイクロ流体デバイス 自己組織化マップ

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は最も患者の多い神経変性疾患であり、中でもアルツハイマー型認知症(DAT)はADの大半を占めるにもかかわらず不明な点が多い(Zhang et al., *Exp. Neurol.*, 2010)。近年、DATが遺伝要因と環境要因の相互作用で発症し、特に低酸素ストレスが、アミロイドβ(Aβ)の沈着、リン酸化タウの凝集、血液脳関門の異常、ニューロンの変性などADの病理学的特徴を促進することが報告されているが、一方でAβの沈着抑制・糖代謝の向上による神経細胞生存率の向上も報告されており、一定の見解を得られていない。これを解明するためには、*in vitro*で低酸素-病態モデルを作製(Kondo et al., *Cell Stem Cell*, 2013)、細胞応答を定量的に解析、得られた知見を*in vivo*試験に反映、することが重要であるが、従来のマクロな細胞実験系では、をハイスループットに行うことが非常に難しい。また、*in vitro*での解析は病態機構解明だけでなく、新規薬剤・治療法開発にも応用可能である。そこで本研究では、ハイスループットな細胞操作を可能とする細胞培養デバイスを作製し、DATの病態機構を定量的に解析することを目的とする。研究代表者はこの目的を達成するために、酸素の厳密制御を行うためにマイクロ流体技術、及びADモデル作製にヒトiPS細胞を用いることにした。研究代表者が現在所属するYong Chen教授のグループは、多様な細胞外環境を内部に作製したマイクロ流体デバイス(μFD)を用いヒトES/iPS細胞培養・実験系を世界に先駆けて開発してきた。この技術を用いれば、細胞外環境とヒトES/iPS細胞の同時制御が可能になり、酸素濃度が厳密制御された条件でヒトiPS細胞由来ADモデルを解析できる。また、研究代表者は生物発光技術(BLT)・等温核酸増幅技術(iNAT)を用い、核酸・タンパク質を高感度・定量的に閉鎖系(同一チューブ内)で検出する技術を開発してきた(Mashimo et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011; Mashimo et al., *Bioconjug. Chem.*, 2012)。この研究成果を発展させ、本研究ではBLT・iNATを用いたAD病態の指標であるAβの高感度・定量的*in situ*測定法を開発し、さらにμFDに搭載しAβ検出系をハイスループット化、効率的なADモデルの病態評価に応用し、低酸素ストレスとAD発症・進行の相関関係について明らかにする。

2. 研究の目的

マイクロ流体テクノロジー、及びiPS細胞を駆使して、細胞外環境ストレスにより発症する疾患モデルの創出およびハイスループット細胞アッセイ系の開発を行い、細胞外環境ストレスによるアルツハイマー病(AD)発症・進行機構の解明を目的とする。

具体的には、A. 低酸素ストレスを再現できるマイクロ流体デバイス(μFD)の開発、B. 高感度な*in situ*Aβ検出系の開発とμFDへの搭載、C. 低酸素ストレス負荷ADモデルの作製と、定量的にAD病態機構を解明する。

3. 研究の方法

上で記した研究背景を基に、本研究では、アルツハイマー病(AD)の低酸素ストレスによる病態形成に着目し、μFDとヒトiPS細胞を用いて*in vitro*で再現された低酸素ストレス負荷ADモデルを駆使することにより、病態形成機構を解明する。また、研究代表者が行ってきたこれまでの研究・成果を基に、生物発光技術(BLT)・等温核酸増幅技術(iNAT)から成るAβ検出系をμFDに搭載し*in situ*・ハイスループットなADモデルの病態評価を行う。そこで、研究期間内に以下の項目について研究開発・解明を行う。

- 酸素濃度を厳密制御できる酸素濃度制御型マイクロ流体デバイス(OC-μFD)の開発。
- ホタルルシフェラーゼ(FLuc)およびRolling Circle Amplification(RCA)を組み合わせた高感度・洗浄作業不要な*in situ*Aβ検出系の開発と、当Aβ検出系のOC-μFDへの搭載。
- OC-μFDおよびAβ検出系を用いた低酸素ストレス負荷ADモデルの作製・評価。また、AD発症・進行における酸素の定量的な機能解明に向け、遺伝子発現、タンパク質発現、エピジェネティクス変化などの多角的な分子生物学的解析を行う。

4. 研究成果

平成25年度は、ハイスループットな細胞表現型解析のために必要となる細胞培養デバイス()を開発した。具体的には、以下3項目を達成した。

48個のマイクロ流路(単一流路につき2ウェル)を有するプレート(HT-μFD)を、3Dプリンタを活用して作製した。3Dプリンタの活用により、簡便にマイクロ流体デバイスを作製することが可能となった他、この細胞培養デバイスは、通常の96ウェル細胞培養プレートと同様のシステムを用いた実験自動化が可能である。

HT-μFDの各流路にナノファイバーを有するナノファイバースクリーニングデバイスを開発した。ナノファイバーを組み込むことにより、各流路において、3次元培養が可能となる。神経細胞は従来の2次元平面上では長期培養が困難であるため、ナノファイバーを細胞足場として利用することによりこの問題の解決を図った。さらに、ナノフ

ファイバーは、表面を様々な生体分子で修飾した細胞機能制御を目的とした細胞外マトリクスとしても活用可能であり、ADの原因となる細胞外環境構築に応用できる (Fig. 1、Fig. 2)

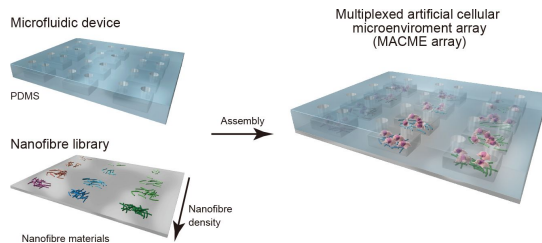


Fig. 1. スクリーニングデバイスの全体図。アレイ化したナノファイバーにPDMS製のマイクロ細胞培養チャンバーを装着した。これにより、可溶性因子（成長因子、低分子化合物等）、細胞外マトリクス（ECM）細胞間相互作用を各チャンバーで条件を変えて検討できる。

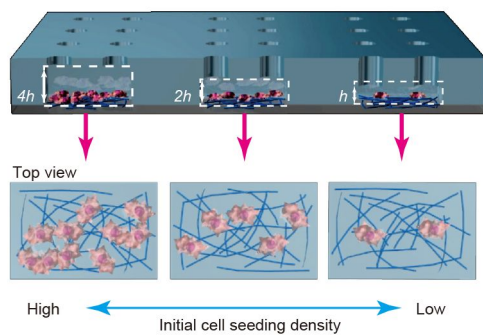


Fig. 2. 細胞間相互作用は各チャンバーの高さを変えることにより制御した。

開発した細胞培養デバイスでの無血清・非ヒト由来成分不含の条件下での細胞培養に成功した。

平成 26 年度では、刺激に対する培養細胞の効率的かつ効果的な 1 次スクリーニング法の検討、iPS 細胞からの神経細胞の取得を行った。

48 種類の培養条件の異なるサンプルについて、核、多能性、細胞死、細胞増殖の 4 種類の表現型発現について免疫染色を行い、得られた画像から、画像解析により発現量を定量し、このデータをさらにコホネンの自己組織化マップにより 2 次元平面に非線形写像することにより、細胞の不均一性 (heterogeneity) を含めた定量的評価を行った (Fig. 3)。さらに、クラスタリング解析により、複数の培養条件 (19 種類) をグループ化し (Fig. 4)、各グループについて RT-PCR による詳細な

解析を実施し、1 次スクリーニング法の効果の検証を行った。

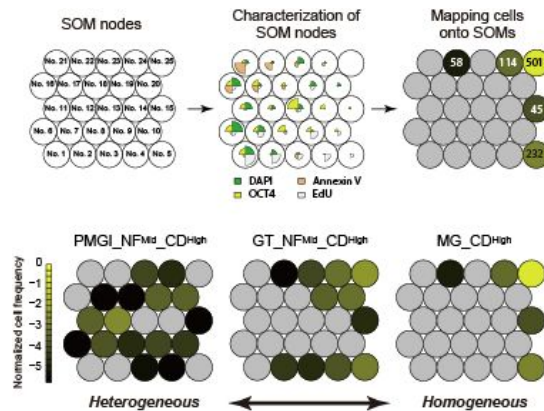


Fig. 3. 代表的なサンプルにおけるコホネンの自己組織化マップ。イメージング画像内の各細胞の蛍光強度を定量し、蛍光強度のバラつき（不均一性：Heterogeneity）を定量化し評価した。

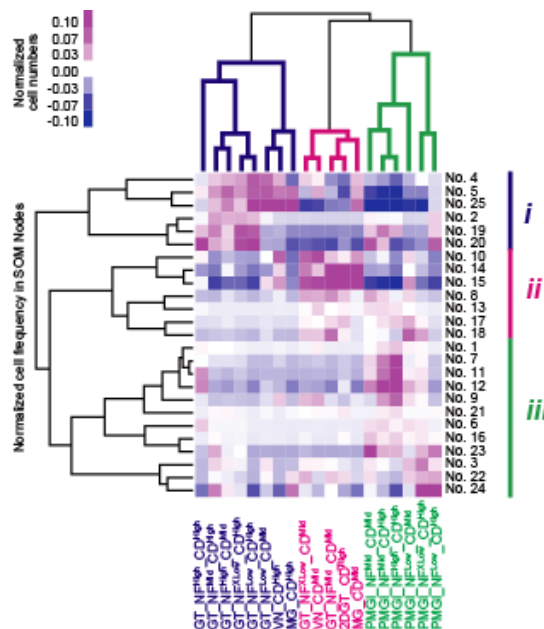


Fig. 4. 各サンプルの自己組織化マップの定量化データを基にしたクラスタリング解析。大きく 3 種類のグループに分かれた。

マウス iPS 細胞を、4 種類のシグナル経路阻害剤を用いて、高効率に神経系細胞へと分化させた。

今後は、開発した細胞培養デバイス (Fig. 3) iPS 細胞より分化させた神経細胞、の活用により、酸素濃度制御下での神経細胞の長期培養・ハイスループット解析を行う。

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 4 件)

1. **Yasumasa Mashimo**, Ken-ichiro Kamei, Liu Li, Christopher Fockenberg, Norio Nakatsuji, Eng Siew How, Motonari Uesugi and Yong Chen. "Nanofiber array embedded in high-throughput microfluidic device to create multiplexed artificial cellular microenvironments" ISSCR 12th Annual Meeting, Jun. 18-21 (2014), Vancouver (Canada)
2. **Y. Mashimo**, K. Kamei, C. Fockenberg, L. Li, and Y. Chen. "Platform for creating artificial microenvironment to control human pluripotent stem cells" The 94th Annual Meeting of CSJ, Mar. 27-30 (2014), Nagoya University (Aichi, Chikusa-ku)
3. **Y. Mashimo**, K. Kamei, C. Fockenberg, L. Li, and Y. Chen. "Investigation of nanofibrous scaffolds for maintenance of pluripotency of ES/iPS cells with a high-throughput microfluidic device" The 13th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine, Mar. 4-6 (2014), Kyoto International Conference Center (Kyoto, Sakyo-ku)
4. **Y. Mashimo**, K. Kamei, C. Fockenberg, L. Li, Y. Koyama, and Y. Chen. "High-throughput screening platform for engineered microenvironments for human pluripotent stem cells", The 10th MicRO Alliance Meeting, Nov. 21-22 (2013), Kyoto University (Kyoto, Nishikyō-ku)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：細胞培養足場基材、マイクロ流体デバイス及びそれを用いたハイスループットナノファイバースクリーニング方法

発明者：亀井 謙一郎、**眞下 泰正**、劉 莉、陳 勇

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：2013-263585 号

出願年月日：2013 年(平成 25 年)12 月 20 日

国内外の別： 国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

眞下 泰正 (MASHIMO, Yasumasa)

東京工業大学・総合理工学研究科・助教

研究者番号：20707400

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：