

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26420799

研究課題名(和文) 神経幹細胞に由来するヘテロ細胞集団をパターンニングするための弾性足場作製技術の開発

研究課題名(英文) Development of techniques for patterning of differentiating cells derived from neural stem cells

研究代表者

森 英樹 (Mori, Hideki)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30450894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンゲル上に紫外線を照射することによって、コラーゲン分子間に架橋を施し、ゲルの粘弾性を変化させることができた。コラーゲンゲル表面を短冊状にマスキングした状態で紫外線照射を施すことによって、紫外線照射部の短冊状パターンを作製、その上で脳毛細血管内皮細胞株(bEnd.3)を培養した。bEnd.3細胞はコラーゲンゲル上の紫外線照射部に接着し、増殖した。更に、ニューロスフェアを形成したマウス神経幹細胞/前駆細胞を播種し、分化誘導培地で培養することによりbEnd.3細胞と神経幹細胞/前駆細胞からの分化細胞とのパターンを作製することができた。

研究成果の概要(英文)：Collagen gels were irradiated by ultra violet (UV) light for intermolecularly-cross-linking. Young's modulus of collagen gels increased after UV-irradiation. Collagen gels were irradiated with stripe pattern using photo-masking materials. Brain capillary endothelial cells (bEnd.3) were cultured on the UV-irradiated collagen gels. bEnd.3 cells were adhered on UV-irradiated collagen gel with stripe pattern. Next, mouse neural stem/progenitor cells formed neurosphere were seeded on UV-irradiated collagen gels with stripe patterned bEnd.3 cells. After the incubation with the differentiation medium for one week, stripe pattern consisted of bEnd.3 cells and differentiating cells form neural stem/progenitor cells were formed on UV-irradiated collagen gels.

研究分野：生物学、幹細胞生物学

キーワード：neural stem cell viscoelasticity collagen gel endothelial cell UV-irradiation cell patterning

1. 研究開始当初の背景

(1)日本では中枢神経疾患の患者数は年々増加傾向にあり、脳血管障害を含めると総患者数は160万人以上にのぼる。近年、その解決手段として神経変性疾患や脊髄損傷等によって神経組織の一部が失われた患者に対する幹細胞移植治療法が注目される一方で、中枢神経疾患治療薬の開発も盛んにおこなわれている。神経幹細胞は自己増殖能とニューロン、アストロサイトやオリゴデンドロサイトといった中枢神経を構成する細胞に分化誘導できることから、中枢神経疾患治療薬を生体外で試験する標的細胞として様々な利点を有する。ニューロンの新生やシナプス結合を介したニューロンのネットワーク形成、神経伝達の活性化や抑制等が治療薬の標的として考えられる。また、ニューロンだけでなくアストロサイトも神経伝達や血管収縮等の調節に関与しており、中枢神経系機能を考える場合にはアストロサイトとニューロンさらに血管を構成している血管内皮細胞を合わせた標的細胞モデルの構築が必要である。

(2)中枢神経疾患治療薬の標的細胞モデルの作製には神経幹細胞から分化誘導したニューロンとアストロサイトや血管内皮細胞をパターンニングする技術が必要となる。我々は神経幹細胞から分化誘導する細胞の足場として化学架橋を施し粘弾性の異なるコラーゲンゲルを用いた結果、アストロサイトへ分化した細胞の移動、伸展が足場の弾性(硬さ)の低下に伴い抑制された(Mori *et al.*, *Neurosci. Lett.* 555, 1 (2013))。そこで、細胞足場材料の硬さの違いを神経幹細胞から分化誘導した細胞さらには脳毛細血管内皮細胞の接着、移動の制御に応用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は細胞足場材料となるハイドロゲル(コラーゲンゲルや合成高分子ゲル)の粘弾性を調節し、ハイドロゲル上にニューロン、アストロサイト、神経幹細胞、血管内皮細胞をパターンニングし、中枢神経モデルを作製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)紫外線照射によるコラーゲンゲルの弾性の調節

0.5%コラーゲン溶液に10×PBSを加え、37℃下に静置し、コラーゲンゲルを作製した。このコラーゲンゲルに波長254nmの紫外線を5分間照射した。

(2)合成高分子を用いた細胞足場材料の作製

ポリビニルアルコール(PVA)の溶液を作

製し、10-40kGyの線を照射することによって粘弾性の異なるPVAゲルを作製した。

(3)ハイドロゲル上に接着した細胞の解析
細胞はE14 ICRマウス的大脑由来の神経幹細胞/前駆細胞およびATCCから購入した脳毛細血管内皮細胞株であるbEnd.3細胞を用いた。神経幹細胞/前駆細胞の培養にはDMEM/F12培地にB27サプリメント、EGF、bFGFを添加した培地、bEnd.3細胞の培養には10%FBSを含んだDMEM培地を用いた。細胞増殖を調べるためにハイドロゲルからトリプシン等によって細胞を剥がし、血球計算盤で細胞密度を測定した。接着した細胞の接着関連の遺伝子発現をリアルタイムPCRで調べた。

4. 研究成果

(1)コラーゲンゲルに紫外線を照射することによって分子間架橋が生じ、表面の粘弾性が変化した。紫外線照射時間を変えた条件のコラーゲンゲルを蒸留水やデタージェントに溶解し、溶け残ったものの乾重量および溶けたものをSDS-PAGEにかけたところ照射時間30分程度まではコラーゲン分子同士の架橋が確認された。圧縮試験の結果から求めたコラーゲンゲルのヤング率は紫外線照射することによって約2倍高くなった。

紫外線照射コラーゲンゲル上に神経幹細胞/前駆細胞を播種したところ、紫外線照射を施していないコラーゲンゲルと比べて接着性細胞数に大きな違いは見られなかった。一方でbEnd.3細胞を播種した場合、紫外線照射を施していないコラーゲンゲルには細胞があまり接着しなかったのに対し、紫外線照射コラーゲンゲルには多くの細胞が接着し、増殖した。

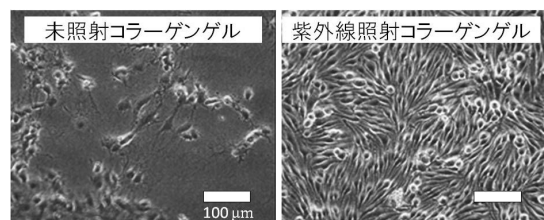


図1 紫外線照射コラーゲンゲル上で培養したbEnd.3細胞の位相差画像

(2)コラーゲンゲル上に紫外線照射を施す際にコラーゲンゲル表面をマスキングし、一つのコラーゲンゲル上に紫外線照射によって架橋される部分とそうでない部分を作製した。コラーゲンゲル上におよそ500μmの幅をもった短冊状の照射パターンが作製できた。その短冊状に紫外線照射を施したコラーゲンゲル上にbEnd.3細胞を播種したところ、紫外線照射部にそって細胞が接着し、5日間の培養で短冊状のパターンができた。さらに、その上に神経幹細胞/前駆細胞の培養によって形成されたニューロスフェアを播種したところ、紫外線照射が施されていない部分に多くのニューロスフェアが接着した。

10%FBSを含むDMEM培地で培養したところニューロスフェアから分化したニューロンやアストロサイトが観察された。bEnd.3細胞上にも一部のニューロスフェアは接着していたが、細胞が移動し大きく伸展する様子は見られなかった。ニューロンの分化率が低く、アストロサイトの割合が多かったが、コラーゲンゲル上に脳毛細血管内皮細胞株であるbEnd.3細胞と神経幹細胞から分化したアストロサイトのパターン構造を作製できた。

(3)濃度の異なるPVAに γ 線を照射し、膨潤率等を考慮してPVAゲルの作製条件を設定した。最終的に膨潤率が同程度であった3.75%、7.5%、15%PVAに対し照射線量10kGy、20kGy、40kGyで γ 線を照射することによって作製したPVAゲルを細胞培養実験に用いた。各々PVAゲルの粘弾性は3.75%PVAゲル<7.5%PVAゲル<15%PVAゲルであった。セルラインの多くはこれらのPVAゲルには接着しなかったが、細胞神経幹細胞/前駆細胞は接着し、ニューロスフェア様のクラスター状に増殖した。

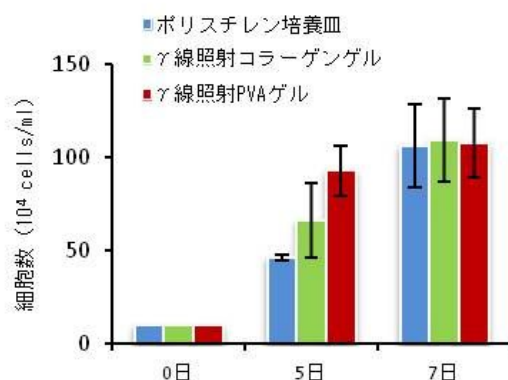


図2 PVAゲル上における神経幹細胞/前駆細胞の増殖の比較

15%PVAゲルでは接着した細胞が細胞クラスターから放射状に展開する様子が見られた。一方で最も軟らかい3.75%PVAゲルではあまり細胞の移動・伸展は見られなかった。

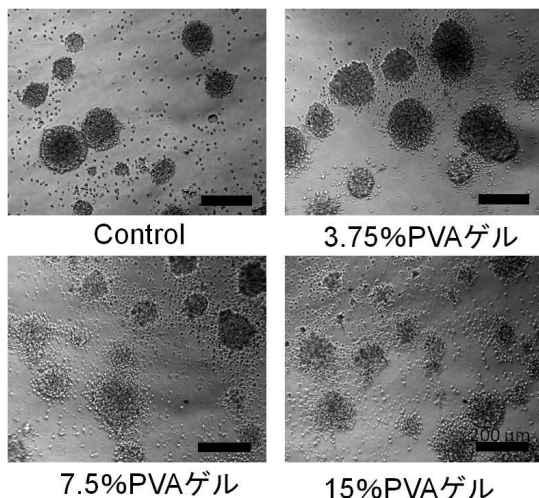


図3 PVAゲル上で培養した神経幹細胞/前駆細胞の位相差画像

神経幹細胞マーカーとなるnestinの発現を比較したところ3.75%PVAゲルが最も高く、神経幹細胞維持培養には最も適していると考えられる。

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 2件)

Mayu Nishikawa, Hideki Mori, Masayuki Hara, Analysis of ZIP (Zrt-, Irt-related protein) transporter gene expression in murine neural stem/progenitor cells, Environmental Toxicology and Pharmacology, 査読有, Vol. 53, 2017, 81-88

Hideki Mori, Masayuki Hara, Clusters of neural stem/progenitor cells cultured on a soft poly(vinyl alcohol) hydrogel crosslinked by gamma irradiation, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, Vol. 121, 2016, 584-590

[学会発表](計 9件)

森 英樹, 土岐 麻菜, 原 正之, コラーゲンゲル表面の紫外線架橋による血管内皮細胞の接着性の調節, 第16回日本再生医療学会総会, 2017年3月7日~2017年3月9日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

土岐 麻菜, 佐藤 綾香, 森 英樹, 原 正之, 紫外線照射コラーゲンゲル上で培養した脳毛細血管内皮細胞におけるインテグリン遺伝子の発現解析, 第68回日本生物工学会大会, 2016年9月28日~2016年9月30日, 富山国際会議場(富山県・富山市)

森 英樹, 藤田 雅徳, 原 正之, ポリアミド繊維上における神経幹細胞/前駆細胞の接着と三次元的な伸展, 第68回日本生物工学会大会, 2016年9月28日~2016年9月30日, 富山国際会議場(富山県・富山市)

Hideki Mori, Masayuki Hara, proliferation of neural stem/progenitor cells on poly(acrylic acid)-grafted polyamide fibers, ISSCR2016, 2016年6月22日~2016年6月25日, San Francisco (USA・CA)

Hideki Mori, Masayuki Hara, Preparation of poly(vinyl alcohol) hydrogel by γ -irradiation for cluster culture of neural stem cell, PACIFICHEM2015, 2015年12月15日~2015年12月20日, Honolulu (USA・HI)

中村 泰斗, 森 英樹, 原 正之, ポリビニルアルコールゲルに接着した神経幹細胞/前駆細胞の分化関連遺伝子の発現解析, 日本バイオマテリアル学会大会, 2015年11月9日~2015年11月10日, 京都テルサ(京都府・京都市)

森 英樹, 佐藤 綾香, 原 正之, 紫外線照射コラーゲンゲルに対する脳毛細血管内

皮細胞の接着性の解析、第 67 回日本生物工学会大会、2015 年 10 月 26 日～2015 年 10 月 28 日、城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)
森 英樹、原 正之、軟質ポリビニルアルコールゲル上におけるマウス神経幹細胞 / 前駆細胞の接着と増殖、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 日～2014 年 10 月 18 日、京都国際会館(京都府・京都市)

Hideki Mori、Masayuki Hara、
Proliferation of murine neural stem/progenitor cells on polyvinyl alcohol hydrogels、12thISSCR、2014 年 6 月 18 日～2014 年 6 月 21 日、Vancouver(Canada)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：神経幹細胞の新規マーカー
発明者：森 英樹、原 正之、西川 麻裕
権利者：公立大学法人大阪府立大学
種類：特許
番号：特願 2016-161359、
出願年月日：2016 年 8 月 19 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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~hara/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 英樹(MORI, Hideki)
大阪府立大学・理学系研究科・准教授
研究者番号：30450894

(2) 研究分担者

原 正之(HARA, Masayuki)
大阪府立大学・理学系研究科・教授
研究者番号：50344172

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし