

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630096

研究課題名(和文) ナノファイバー及びマイクロ電極を用いた神経系疾患薬剤の評価法

研究課題名(英文) Development of evaluation method for hiPSC-derived neuron function using nanofiber devices-based neuron chip

研究代表者

陳 勇 (Chen, Yong)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：70512458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト多能性幹細胞は神経疾患の創薬スクリーニング分野で注目されている。しかし、現状では、多能性幹細胞から得られた神経細胞にダメージを与えずに、リアルタイムに薬剤応答を評価する方法はない。本研究では、申請者らはパターン化したナノファイバーを用いて、神経細胞用チップを作製し、そのチップ上で神経細胞を分化誘導しながらマルチチャンネル電極で機能評価システムを開発した。このチップにより、神経ネットワークを構成しながら、リアルタイムに神経ネットワークの電生理信号を検出することができた。最終的には薬剤スクリーニングによる神経変性疾患に対する新規薬剤の同定に応用する。

研究成果の概要(英文)：In vitro study of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs)-derived neuron has great importance for biomedical research and for understanding of information processing of central and peripheral nervous systems. In this study, hiPSCs are differentiated toward neurons by using a culture patch devices made of crosslinked monolayer gelatin nanofibers. Comparing to the conventional culture dish method, the nanofiber devices method is more effective for culture and differentiation of stem cells. Then, neurons were obtained and used directly for electrophysiological measurement with a commercial MEA device, showing characteristic neuron activities. Thus, the patch method is advantageous over the conventional dish method for both motor neuron differentiation and electrophysiological measurements, providing a novel and powerful way for neuron based assays for the benefit of plug-and-play users.

研究分野：マイクロエンジニアリング

キーワード：神経細胞 ナノファイバー 薬剤評価

### 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患(アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症など)は治療薬がなく、新規薬剤の開発が急務となっている。また、ヒト多能性幹細胞(ES/iPS細胞)は神経細胞の創薬スクリーニング分野で注目されている。現在、多能性幹細胞から神経細胞への分化効率が(~90%)大幅に改善されたが、得られた神経細胞の機能性を評価するために酵素処理し、もう一度蒔き直すことになるため、神経軸索が損傷している可能性がある。このことから、同じ基板上で、神経細胞へ分化誘導させながら、リアルタイムに神経細胞電生理機能进行评估するシステムが必要である。

一方、マルチチャンネルマイクロ電極システムは、心筋、神経細胞の電気生理学的研究用ツールとして使われている。しかし、現状では、多能性幹細胞から分化した神経細胞の電位信号を検出することは困難である。これは、低分化効率、細胞と金属電極との低接着性、電気信号の低検出などが原因と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、申請者らはパターン化したナノファイバーを用いて、神経細胞用チップを作製し、そのチップ上で神経細胞を分化誘導しながらマルチチャンネル電極で機能評価システムを開発する。そして、このチップにより、神経ネットワークを構成しながら、リアルタイムに神経ネットワークの電生理信号を検出する。最終的には薬剤スクリーニングによる神経変性疾患に対する新規薬剤の同定に応用する。

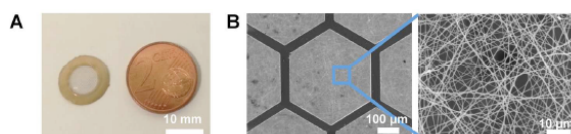
### 3. 研究の方法

申請者はこれまでに、ナノファイバーを用いたマウス ES 細胞の未分化維持

の新規手法に成功している (Liu et al., Micro and Nanosystems 2010, Liu et al., Biotechnol. Lett. 2012)。また、配向性ナノファイバーは、マウス ES 細胞から神経細胞の軸索と樹状突起を伸ばす方向を誘導させることを確認できた。本課題では、改善策の一つとして、申請者は考えた案では、ナノファイバーを幹細胞の足場材料として神経細胞への分化誘導を制御する新規手法が挙げられた。

### 4. 研究成果

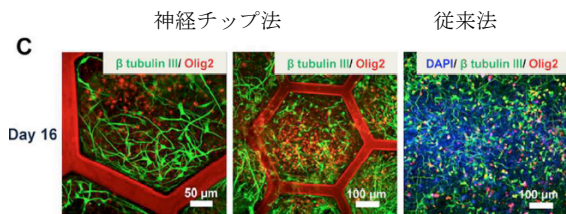
本研究において、ヒト ES/iPS 細胞から神経細胞への分化誘導を高効率に行う方法を確立するために、ナノファイバーを用いて分化誘導条件の最適化を行った。その結果、複数の材料を検討した結果、ナノファイバーの材料はゼラチンに選定した。そして、パターンのタイプを検討した結果、配向性ではなく、ランダム構造したファイバーの方は作製しやすく、神経ネットワークの形成にいいことがわかった。さらに、神経チップの操作性がもっとよくするため、マイクロ加工技術を用いて、蜂の巣の形のデバイスとナノファイバーに融合した基板を開発した。それによって、大幅に操作性を改善した(Fig.1)。



**Fig.1 (A)神経チップの外観 (B)蜂の巣構造したデバイスとナノファイバー融合した神経チップの構造**

その後、神経チップを用いて、ヒト iPS 細胞から神経細胞分化誘導効果を検証するために、実際にチップ上でヒト iPS 細胞を培養及び運動神経細胞へ分化誘導を行った。その結果、従来法と比較

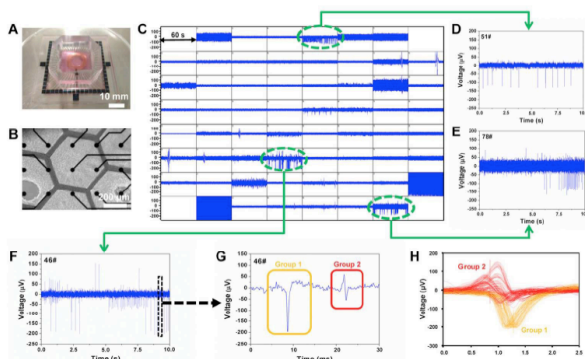
して、運動神経のマーカーである Olig2 の発現はチップ上で上昇されたことを明らかになった。つまり、ナノファイバー上で運動神経細胞への分化誘導は効率よくできるようになった (Fig.2)。さらに、神経のネットワークを形成したことも確認できた。



**Fig.2 ナノファイバー上でヒト iPS 細胞から運動神経細胞への分化誘導**

最後に、神経チップとマルチチャンネルマイクロ電極システムを用いた神経細胞薬剤応答評価を行った。神経チップの良い操作性を利用して、分化誘導された神経細胞を再びマルチチャンネルマイクロ電極チップ上に蒔き直す必要なく、直接神経細胞チップを電極チップの上に設置するだけで、神経細胞の電気生理学機能評価することができるようになった。その結果、従来法の測定法と比較して、神経細胞特異的な電気信号を分化誘導の早い段階で、多く検出することができた (Fig.3)。つまり、機能性持つ運動神経細胞の作製ができるようになった。

**Fig.3 マルチチャンネルマイクロ電極システムによって、神経チップ上の運**



**動神経細胞の電気生理学評価を行い、電気信号を検出した。**

今後、本研究課題で開発した神経チップを用いて、運動神経だけではなく、ほかの神経細胞への応用も可能になることを予想する。さらに、将来に薬剤スクリーニングのために運動神経変性疾患に対する新規薬剤の同定に応用することが期待されている。

#### 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 1 件)

- ① Yadong Tang, Li Liu, Junjun Li, Leqian Yu, Francesco Paolo Ullo Severino, Li Wang, Jian Shi, Xiaolong Tu, Vincent Torre, Yong Chen “Effective motor neuron differentiation of hiPSCs on a patch made of crosslinked monolayer gelatin nanofibers”, Journal of Materials Chemistry B, accepted (2016). In press 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

陳 勇 (CHEN, Yong)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号： 7 0 5 1 2 4 5 8

##### (2) 研究分担者

劉 莉 (LIU, Li)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点

点・助教

研究者番号：50380093

饗庭 一博 (AIBA, Kazuhiro)

研究者番号：30564752

京都大学・物質-細胞統合システム拠点  
点・準教授