

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26702015

研究課題名(和文) 膵細胞・自律神経細胞の人工作製と神経インターフェース化

研究課題名(英文) Production of pancreatic beta cells/neurons in the autonomic nervous system and neural interface application

研究代表者

高山 祐三 (Takayama, Yuzo)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：60608438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では幹細胞より作製した膵β細胞と自律神経細胞の共培養を行うことでインスリン分泌の人為的制御手法を目指した。まずヒト自律神経の安定的作製を行うために、ヒト多能性幹細胞からの自律神経の誘導技術を開発した。また、多能性幹細胞からの細胞作製の課題を補完する技術として、低分子化合物を用いた細胞加工技術による神経堤細胞・末梢神経細胞の作製技術の開発を同時に行った。こうして誘導した細胞を用い、微細加工技術を用いて作製したPDMSベースの神経共培養チャンバを用いることで、ヒト末梢神経と他細胞組織との機能的接続を行った。以上の通り、末梢神経シグナルを用いた細胞機能制御の基盤を構築できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a method for regulating insulin secretion by co-culturing pancreatic beta cells and neurons in the autonomic nervous system (ANS) derived from human pluripotent stem cells. First, in order to stably prepare human neurons in the ANS, we developed a technique for inducing neurons in the ANS from human pluripotent stem cells. In addition, as a technique to complement problems of cell production from pluripotent stem cells, we also performed small molecular-based cell conversion from mouse somatic cells into neural crest cells / peripheral neurons at the same time. By using the induced cells we prepared, we aimed to reconstruct the functional connection between human peripheral neurons and other cellular tissues by using PDMS-based neuronal co-culturing chamber fabricated with microfabrication technique. As described above, we believe that we could establish the basis of cell function control using peripheral nerve signals.

研究分野：細胞工学、神経工学

キーワード：再生医工学 糖尿病 微細加工 幹細胞 自律神経

1. 研究開始当初の背景

膵臓内のβ細胞は血液中のグルコース濃度を感知してインスリンを分泌し体内血糖値を調整している。この膵β細胞からのインスリン分泌量が低下、もしくはインスリン抵抗性が上昇することで発症する糖尿病の治療法はインスリン注射が一般的であるが、日常的な自己管理の困難さや注射時の痛みが大きな問題となっている。こうした問題に対してヒトiPS細胞を利用したインスリン分泌細胞誘導・培養技術の開発は、膵β細胞の自家移植を可能とする次世代糖尿病治療法として注目を集めている。しかしながら、一方で生体における血中インスリン濃度は自律神経信号や各種ホルモン作用により厳密な制御を受けているのに対して、多能性幹細胞より誘導・培養した膵β細胞はこれら制御機構とは独立しており、また細胞自体のインスリン分泌のグルコース応答性といった特性が劣る等その機能には不十分な点があり、実際に幹細胞由来膵β細胞を用いた移植治療の実現には至っていない。

こうした背景に基づき、研究代表者は「神経インターフェース技術を利用した工学的アプローチにより膵β細胞のインスリン分泌を制御する手法開発と移植デバイス化」を行うことを最終的な目標とした。生体内の膵β細胞は自律神経系的作用によりインスリン放出活性化(アセチルコリンシグナル)と抑制化(ノルアドレナリンシグナル)が行われており、生体外においても自律神経シグナルの人為的制御を介したインスリン分泌機能の精密調節が期待できる。これに基づき、幹細胞より誘導した膵β細胞と自律神経細胞を集積したデバイスを構築し、血糖値変化に基づいた電気刺激を自律神経組織に加えそのシグナルにより膵β細胞のインスリン分泌を制御することで、新規糖尿病治療確立を見据えた新規実験プラットフォームとして確立することを目指した。

本研究で重要となる基盤技術として、1)自家移植可能な生体組織として構築するための十分数かつ安全な細胞ソースとして、自前の体細胞や幹細胞より膵β細胞・自律神経を作製する細胞工学技術、2)自律神経組織活動の電気シグナルをリアルタイムに計測・評価し、同時に電気刺激を加えることで自律神経組織活動を制御する神経インターフェース技術、の2つが挙げられる。研究代表者はこれまでに電極付き細胞培養基板を用いた神経回路発達過程の解析、微細加工技術を用いた組織レベル共培養チャンバの作製、及びその細胞組織間の相互作用解析実験系への応用を行っており上記2)の神経インターフェース技術に関して多くの技術と業績を得てきた。また現在の研究チームにおいて、従来の遺伝子操作による細胞分化誘導手法に加えて、より迅速かつ安全性の高い細胞作製法として、低分子化合物を用いた神経細胞への分化転換手法を同時に検討している。以上に

記したこれまでの研究代表者の研究成果と予備実験により、研究代表者は上記2つの基盤技術に関して十分な能力を有している。これらの基盤技術を応用することで幹細胞より作製した自律神経組織と膵β組織の共培養系を構築し、自律神経組織の活動評価と制御を介した膵β組織のインスリン分泌について検討を行うことで、膵β組織のインスリン分泌の人為的誘導とその最適化を目指す。更に神経組織と膵β組織をパッケージ化したデバイスの開発と基礎評価を試みる。

2. 研究の目的

1.の背景に基づき、本研究では「糖尿病治療のための新規実験プラットフォームを構築」することを目的とする。これまでに糖尿病治療の重要ステップとして幹細胞から膵β細胞の誘導が行われてきたが、生体外で誘導される膵β細胞は自律神経系や各種ホルモン系とは独立しておりそのインスリン分泌制御は困難であった。そこで研究代表者は本研究で「神経インターフェース技術により膵β細胞のインスリン分泌を制御する手法開発とデバイス化」を行う。幹細胞から膵β細胞と自律神経細胞を作製・共培養を行い、電気刺激による神経細胞活動制御を介した膵β細胞のインスリン分泌制御を目指す。更に両細胞を用いたデバイス化を行い、糖尿病治療のための生体組織移植・創薬研究のためのデバイスとして発展させていくことを視野にいれている。

3. 研究の方法

本研究は、幹細胞・体細胞より材料となる膵β細胞・自律神経を効率的に作製する技術開発、及び作製した細胞を用いた共培養手法の開発、のステップで行った。

(1) ヒト多能性幹細胞からの自律神経誘導手法開発

本研究提案で主要となるのは、膵β細胞に自律神経系を接続することで、神経由来シグナルによりインスリン分泌を制御することである。よってヒト多能性幹細胞より自律神経を安定的・大量に作製する技術が必要となる。しかし、これまでヒト多能性幹細胞より自律神経を選択的に誘導する技術は存在しなかった。そこで、まずマウス等で報告されている自律神経の発生経路に関わるシグナリングをリサーチし、各シグナル経路を活性化もしくは抑制化させる低分子化合物群を選択した。この情報を基に、ヒト多能性幹細胞に自律神経系への誘導を促す低分子化合物群の添加タイミング・濃度を最適化しながら添加し、誘導される細胞の性質を評価していった。

(2) 低分子化合物を用いた細胞加工による末梢神経系細胞の誘導技術開発

ヒト多能性幹細胞からの細胞誘導技術は

目的となるヒト細胞を安定的に作製する技術、疾患モデルを作製する技術として非常に有望であるが、一方で培養・分化誘導に長時間・高コストがかかること、特にiPS (induced pluripotent stem: 人工多能性幹)細胞を用いた場合には遺伝子導入によるDNAダメージ等が課題として挙げられている。こうした背景に基づき、将来的な応用への障壁を下げることを目的とし、遺伝子導入を用いない新規の細胞誘導手法開発を目指した。具体的には、まずマウス線維芽細胞を対象に、計7種の低分子化合物群(ヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬であるバルプロ酸や、GSK3を阻害することでWNTシグナルを活性化させるCHIR99021等)を3日間添加し、その後神経分化を促す神経培養用培地で培養を行った。低分子化合物群による細胞加工前後での性質変化をDNAマイクロアレイ、免疫染色等で評価を行った。

(3) 微細加工技術を用いた神経共培養チャンパの作製

作製した神経系細胞と接続対象となる膵β細胞等の他組織とを共培養を行う際に求められるのは、各種組織をネットワークレベルで結合させる構成的な培養手法である。これは、特に神経系において、生体内で見られる臓器機能は単一細胞ではなく細胞集団組織において発現することに因る。

上記を鑑みて、研究代表者は神経共培養を行うための微細加工チャンパの作製を試みた。具体的には、生体適合性を有するシリコンゴム材料であるPDMS(ポリジメチルシロキサン)を用い、高さ5μmの微小トンネル構造で結合した2つの培養部を有する培養チャンパを作製した。高さ5μmのトンネル構造は細胞体の通過を阻害しながら、神経細胞から伸展する軸索は通過させる構造となっている。よってこの微細加工チャンパを用いることで、神経組織と標的組織を区画して培養しながらトンネル構造を介して神経接続を構築することが可能となる。この培養デバイスを用い、ヒト多能性幹細胞由来の神経細胞と標的組織の共培養を行った。

4. 研究成果

(1) 上述した通りの段階的な分化誘導後、神経分化を行うことで誘導された神経細胞は2~3週間で神経節様の構造を形成した。この神経節様構造を形成する神経細胞の中で、60%を越える領域が交感神経マーカーであるTH陽性であった。一方で、既存技術に倣い誘導した神経堤細胞から作製したコントロール試料においては、TH陽性を示す細胞は2%程度であった。また、本手法で誘導した神経細胞は末梢神経マーカーであるPERIPHERINに陽性を示すとともに、自律神経マーカーであるPHOX2A, PHOX2Bに対しても陽性を示すことを確認した。また、交感神経マーカーであるTHに陽性を示す末

梢神経細胞と共に、副交感神経マーカーであるCHATに陽性を示す末梢神経細胞を確認している。以上の結果より、本手法によりヒト多能性幹細胞から自律神経系細胞を高効率で誘導可能であることがわかった。なお、本手法によるヒト多能性幹細胞からの自律神経細胞誘導はヒトiPS細胞2株(201B7, 253G1)及びヒトES細胞1株(H1)の計3系統で行えることを確認している(図1)。

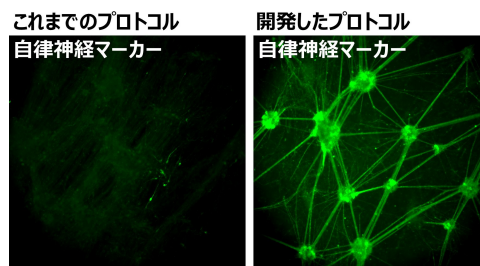


図1 ヒト自律神経誘導技術の開発

自律神経系は交感神経/副交感神経に分類され、標的組織に対して拮抗した作用を与えることで生体恒常性を維持している。よって、誘導した自律神経を今後応用していくには交感神経と副交感神経を選択的に回収もしくは誘導する技術が必要不可欠である。そこで著者らは胚様体への自律神経誘導後の神経分化期間に注目し、細胞密度及び神経栄養因子をパラメータとして誘導プロトコルの改良を試みた。改良前の自律神経培養条件(神経細胞播種密度: 1×10^5 cells/cm²; NMに10 ng/mL BDNF, GDNF, NGF, NT-3を添加した培地)においては、交感神経細胞と副交感神経細胞の割合は約1:1であった。これに対して、交感神経細胞を選択的に誘導するには細胞密度が重要なパラメータとなることがわかった。 2×10^5 cells/cm²以上の高密度条件において、TH陽性の神経細胞の占める面積が低密度条件(1×10^5 cells/cm²以下)と比較し25倍以上となった。一方、高濃度のBDNFとCNTFの2種の神経栄養因子が副交感神経細胞の選択的誘導の重要なパラメータとなることを見出した。100 ng/mLのBDNF, CNTFの存在下においてCHAT陽性神経細胞の数が2.4-4倍となることを確認した。興味深いことにTH陽性の神経細胞の割合はBDNF, CNTFの存在量には影響を受けず、またCHAT陽性の神経細胞の割合は細胞密度に依存しなかった。以上の結果より、細胞密度及び神経栄養因子濃度(BDNF及びCNTF)をパラメータとすることで、交感神経/副交感神経細胞の高効率な選択的誘導が可能となることが示された。

以上のヒト多能性幹細胞からの自律神経系誘導技術は産業財産権として出願を行っている。

(2) 上述の通り、マウス線維芽細胞に対し7種の低分子化合物を3日間作用させることで、

まずは末梢神経系の前駆細胞となる神経堤細胞へと誘導されるかについて評価を行った。DNA マイクロアレイによる解析を行った結果、低分子化合物を添加により線維芽細胞特異的な遺伝子群が顕著に発現低下すると共に、神経堤細胞特異的な遺伝子群が顕著に発現上昇することがわかっている。こうして誘導した神経堤様の細胞を各種培養液内で分化させることで神経堤由来細胞である平滑筋細胞や骨細胞、および末梢神経細胞へと誘導できることを免疫染色及びカルシウムイメージングによる細胞活動機能解析により確認している。

この成果は雑誌論文 として成果発表を行っている。

(3) 研究方法で記述した手法で作製したPDMS ベースの神経共培養チャンバ内で、まずはヒト iPS 細胞由来の中枢神経細胞と末梢神経細胞を共培養し、神経系同士の接続能について評価を行った。免疫染色及びカルシウムイメージングによる形態・機能評価を行い、ヒト中枢-末梢神経系のネットワークレベルでの機能的接続を行えることを確認した。

更に、ヒト末梢神経による神経支配を *in vitro* 系にて再構築することを鑑み、ヒト末梢神経と膵β細胞および心筋細胞との共培養についても行い、ヒト末梢神経と各種組織の共培養系構築について知見を得ている。特に、膵β細胞と共培養を行い、末梢神経を電気刺激することで、膵β細胞の活動が影響を受ける現象を見出した。これにより、微細加工チャンバを用いることで神経シグナルによる膵β細胞の活動制御の基盤技術を構築できたと考えている (図2)。

この成果は雑誌論文 として成果発表を行っている。

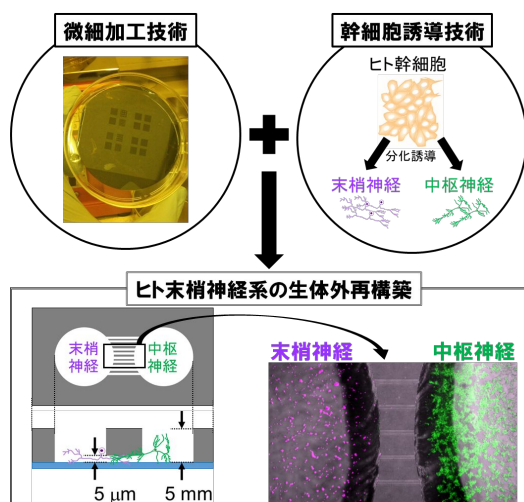


図 2 微細加工技術を応用した神経共培養技術の開発

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)

Yuzo Takayama, Tamami Wakabayashi, Hiroko Kushige, Yutaka Saito, Yoichiro Shibuya, Shinsuke Shibata, Wado Akamatsu, Hideyuki Okano, Yasuyuki S. Kida, Brief Exposure to Small Molecules Allows Induction of Mouse Embryonic Fibroblasts into Neural Crest-like Precursors, FEBS Letters, vol. 591, pp. 590-602, 2017.

DOI: 10.1002/1873-3468.12572

Yuzo Takayama and Yasuyuki S. Kida, In Vitro Reconstruction of Neuronal Networks Derived from Human iPS Cells Using Microfabricated Devices, PLOS ONE, vol. 11, e0148559, 2016.

DOI: 10.1371/journal.pone.0148559

〔学会発表〕(計9件)

高山祐三、他、ヒト多能性幹細胞からの自律神経細胞誘導とその応用、平成 29 年電気学会電子・情報・システム部門大会、2017 年

Yuzo Takayama et al., Brief Exposure to Small Molecular Compounds Allows Induction of Mouse Embryonic Fibroblasts into Neural Crest-Like Precursors, ISSCR2017, 2017 年

高山祐三、木田泰之、微細加工技術を用いた末梢神経細胞と膵β細胞との共培養、第 16 回日本再生医療学会総会、2017 年

若林玲実、高山祐三、他、薬剤によるマウス胎児線維芽細胞(MEFs)からの神経堤細胞の分化誘導法の開発、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

高山祐三、木田泰之、微細加工培養デバイスを用いたヒト末梢神経系の *in vitro* 再構築、BMB2015, 2015 年

Yuzo Takayama, Yasuyuki S. Kida, Constructing *in vitro* networks between peripheral neurons and insulin-producing cells using microfabricated devices, Keystone Symposia; Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies, 2015 年

高山祐三、他、神経インターフェース技術に基づくインスリン分泌制御手法の開発とデバイス化、第 13 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会、2015 年

Yuzo Takayama et al., Brief Exposure to Small Molecules Allows Conversion of Fibroblasts into Neurons, The 9th FENS forum of European Neuroscience, 2014 年

高山祐三、他、精密工学技術に基づく *in vitro* 神経回路活動の計測と制御、第 53 回日

本生体医工学会大会、2014年

〔図書〕(計1件)

高山祐三、木田泰之、他、シーエムシー出版、臓器チップの技術と開発動向、2018、293

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：神経堤細胞から自律神経系の細胞への分化誘導方法

発明者：木田泰之、高山祐三

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：PCT/JP2016/063006

出願年月日：2016年4月26日

国内外の別：国外

名称：神経堤細胞から自律神経系の細胞への分化誘導方法

発明者：木田泰之、高山祐三

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2015-112237

出願年月日：2015年6月2日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/yuzotaka0124/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高山 祐三 (TAKAYAMA, Yuzo)

産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：60608438