

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32680

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14190

研究課題名(和文)炎症が惹起する神経変性機構解明のためのヒト血液脳関門の構築

研究課題名(英文)Construction of human blood brain barrier for research of neuroinflammation

研究代表者

根岸 みどり(加藤みどり)(NEGISHI, Midori)

武蔵野大学・薬学研究所・助教

研究者番号：30300750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性機構解明のために、神経組織中に神経細胞が高密度で均一に分布するような神経組織を神経幹細胞から作製する技術を開発した。本技術では、蓋付きアガロースゲルチャンバを用いることで、神経幹細胞を密閉した状態で分化誘導するため、組織の3次元形状が制御でき、分化誘導により神経細胞が高密度で均一に分布する組織作製を可能にした。また、ヒトiPS細胞由来神経幹細胞を用いてひも状のヒト神経組織を構築した。最終的に、神経組織をパターンニングしたデバイス中で血管内皮細胞と共培養することで、神経組織周辺部に血管内皮細胞による血管網の構築をした。また薬剤投与による神経変性を観察し、本系の薬物実験への有効性を確認した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we constructed three-dimensional (3D) tissue shape control of neural stem cells (NSCs) tissues by using closed agarose microchambers for in vitro effective differentiation induction of neurons. As a device for controlling the 3D tissue shape, we first prepared the agarose hydrogel microchambers and sheet. By closing the agarose microchambers with an agarose sheet, lane-shaped NSCs tissues were successfully induced differentiation to neurons and glial cells while maintaining their 3D tissue shape. The thin neural tissues in which neurons were uniformly distributed at high density, was successfully fabricated. We also fabricated the neural microfiber from the human iPS-derived neural stem cells and co-cultured with HUVEC. We successfully observed the vascularization of HUVEC in the 3D fibrin gel with human neural tissues. Finally, we observed that neuronal degeneration in 3D neural tissues by the exposure of glutamic acid.

研究分野：神経科学、マイクロデバイス

キーワード：マイクロデバイス 神経科学 再生医療 細胞・組織 マイクロマシン

1. 研究開始当初の背景

急激な高齢化社会が進行する現代、神経変性疾患に関する治療、創薬が大変注目を集めている。脱髄疾患とは、神経細胞の軸索の周囲を覆う髄鞘が変性を引き起こす神経変性疾患のことで、神経細胞の情報伝達速度の低下だけでなく軸索自体の変性を惹起する。本申請では、世界で約 250 万人もの患者がいるが、いまだその発症メカニズムの詳細が不明である多発性硬化症脱髄疾患に着目し、発症機構解明・創薬開発に利用出来るような神経組織の構築を目指す。申請者はこれまでにマイクロデバイスを利用した神経細胞の *in vitro* 立体組織化の研究に取り組んできた。特に 2013 年、神経細胞を直径 100 μm 程度の紐状にカプセル化し、立体組織化する「細胞ファイバ技術」の開発に成功し (*Nature Materials*, 2013)、これまでにマウス神経細胞ファイバ、ヒト iPS 細胞由来の神経ファイバの構築にも成功している。またマウス神経細胞ファイバに関しては、脊髄損傷モデルマウスへの移植に成功しており、移植した神経細胞ファイバの生着・細胞の分化を確認している。このようなこれまでの神経組織構築技術を利用し、創薬開発に向けた新しい神経-血管培養系を開発する。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、炎症作用が血管をから神経組織に入り神経変性が生じる際のメカニズムを解明するために、再生医療技術を利用しガラス基板上に「神経組織と毛細血管網の共培養系」を構築することである。具体的には、神経幹細胞から分化構築される神経組織が創薬開発に利用できるよう、神経細胞が組織内に高密度で均一に分布した組織構築条件を見だし、薬物投与による神経変性の誘導及び観察を行う。最終的に、ヒト神経組織と血管内皮細胞との共培養系を確立し、薬物投与による神経変性の誘導及び観察を行う。

3. 研究の方法

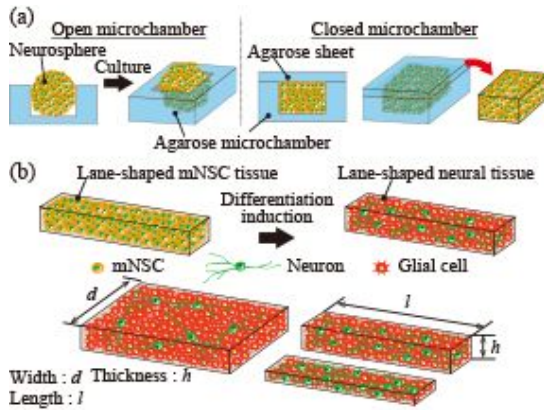
(1) 神経幹細胞から神経組織の構築及び評価

2重同軸層流マイクロデバイスを用いた神経ファイバの作製

2重同軸層流マイクロデバイスを用いて、アルギン酸ゲルで覆われたヒト iPS 細胞由来神経幹細胞とコラーゲンにより形成されるコアシェル型ハイドロゲルファイバを作成した。20 ng/mL bFGF 及び 10 ng/mL LIF を含む MHM 培地で培養を行い、培養 3-7 日、ファイバ内部が神経幹細胞で満ちた後に、bFGF、LIF を除去した培地で培養し、神経組織への分化を誘導した。神経ファイバの評価については、TUJ1、GFAP、Nestin などの遺伝子の発現を評価し、細胞の形態に関しては、免疫組織化学染色法を用いて観察した。

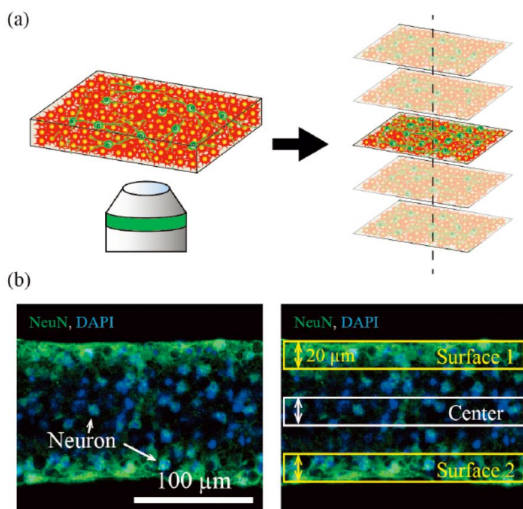
アガロースゲルチャンバを用いた神経組織の構築と評価

アガロースゲルの培養チャンバは poly (dimethylsiloxane) (PDMS) モールドパターンをアガロースゲルに転写することで作製した。アガロースチャンバ上に神経幹細胞を播種した後、アガロースゲルシート状をチャンバ上に被せることで密閉した状態で培養や神経組織への分化誘導を行い、神経組織を構築した (図 1)。作成された神経組織については、組織の透明化処理後、神経細胞のマーカー蛋白である NeuN や TUJ1 の抗体の他、グリア細胞のマーカー蛋白の GFAP の抗体で免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡観察することで、3次元組織内部での詳細な神経細胞の分布を評価した (図 2)。また、薬剤処理に伴う神経変性も、グルタミン酸処理後に神経細胞を TUJ1 の抗体で免疫染色し、細胞体からの神経突起数を計測することで観察した。



(図1)アガロースゲルチャンバ内部での神経組織構築法

(a)オープンマイクロチャンバと蓋付きのアガロースマイクロチャンバの組織形成の違い。
 (b) アガロースマイクロチャンバのデザインを変えることで、分化誘導後の神経組織の3次元組織形状を制御可能。



(図2)神経細胞数の計測方法 (a)共焦点レーザー顕微鏡による神経組織の観察例 (b)神経組織内部の神経細胞の割合の評価方法、組織の中央にあたる断面画像を抽出し、組織内における分布を評価した。

(2) 神経組織と血管内皮細胞の共培養

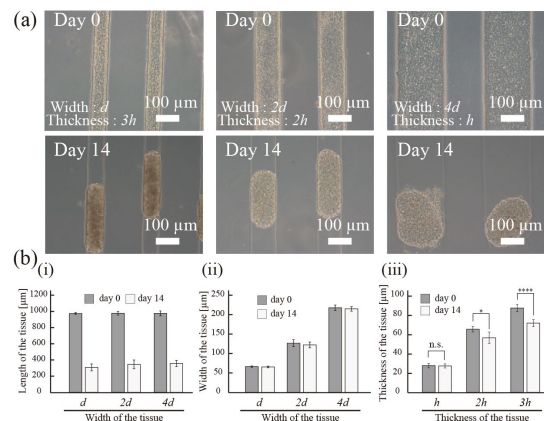
ヒト神経幹細胞より構築された神経組織をフィブリンゲル内で、血管内皮細胞とともに培養を行った。共培養後、血管内皮細胞から形成される管腔構造の観察、評価を行い、薬剤処理による神経細胞変性の観察を行った。

4. 研究成果

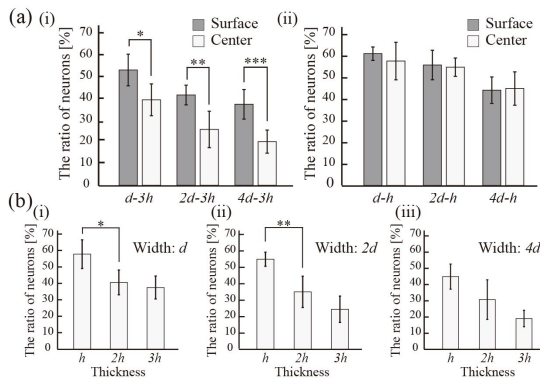
(1) 神経幹細胞から分化誘導で作製された神経組織のドラッグスクリーニングへの最適化

神経組織の3次元形状制御

フォトリソグラフィ技術を用いることで、平面幅50 μm - 1000 μm, 深さ30 μm, 60 μm, 90 μmの3種類の形状のアガロースチャンバを作製し、アガロースシートで密閉されたアガロースチャンバ内でマウス神経幹細胞(mNSC)を培養することで、棒形状のmNSC組織を作製することに成功した。分化誘導後、作製した神経組織内の神経細胞の組織内分布を評価した結果、厚みのある組織(Thickness > 60 μm)では表層と内部で神経細胞の割合に差が生じているのに対し、薄い組織(Thickness < 30 μm)では割合が同じだった(図3)。さらに薄い組織の方が神経細胞の組織内部での割合が高くなっていった。密閉されたアガロースチャンバ内でmNSCsを培養・分化誘導することで、高密度で組織中に神経細胞が均一に分布する組織を作製することに成功した(図4)。本研究成果は、査読付き学術誌 *Biotechnology and Bioengineering*(DOI: 10.1002/bit.26559, 2018)に報告した。



(図3)神経幹細胞組織の形状と分化誘導後の変化(a)厚さと太さの異なる神経幹細胞組織と分化誘導後の写真。(b)形状の異なる神経幹細胞組織を分化誘導した後の組織の厚みや太さ、長さの変化。



(図4)分化誘導後の形状の違いによる神経組織中の神経細胞の分布
 (a)形状の異なる神経組織中の内部及び表層における神経細胞の分布。(b)厚みの異なる神経組織における神経死亡の割合の比較。

ヒトiPS細胞由来神経幹細胞からのひも状神経組織の形成と評価

ヒトiPS細胞由来神経幹細胞をもちいてコアシェル型ハイドロゲルファイバを作製した。分化誘導後14日で、TUJ1, GFAPの陽性細胞が観察され、1ヶ月ほどでMBP陽性細胞を観察することが出来た。このことは、ヒトiPS細胞由来神経幹細胞が、ひも状組織内部で神経細胞、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトに分化していることを示唆している。さらに電子顕微鏡画像から、神経細胞の軸索は束になり長軸方向に伸展していること、ミエリン構造なども観察された。本研究内容に関しては、今後さらに実験を追加し、軸索バンドルがミエリン構造で覆われるような培養条件を見いだすことにより、*in vivo*に類似した神経組織を構築できるものと考えられる。

(2) 神経ファイバと血管内皮細胞の共培養

ヒトiPS細胞由来神経幹細胞で作製された神経ファイバをフィブリングル中で、血管内皮細胞とともに培養を行った。共培養24時間で、神経ファイバ周辺部に血管内皮細胞の管腔構造が観察された、培養の経過と共に血管網が構築された。現在までの成果で、物質を透過できるような血管網が構築されていない

が、今後培養条件の改良を重ねることで、*in vivo*のような神経組織周囲に存在する血管網を再現できると期待できる。

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)

Yuki Matsushiro, Midori Kato-negishi, Hiroaki Onoe, Differentiation of neural stem cells regulated by three-dimensional tissue shape, 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS), 査読有, 2017, DOI: 10.1109/TRANSDUCERS.2017.7994044.

Yuki Matsushiro, Midori Kato-negishi, Hiroaki Onoe, Differentiation of 3D-shape-controlled mouse neural stem cell to neural tissues in closed agarose microchambers, Biotechnology and Bioengineering, 査読有, 2018, DOI: 10.1002/bit.26559.

[学会発表](計3件)

Yuki Matsushiro, Midori Kato-negishi, Hiroaki Onoe, Differentiation of neural stem cells regulated by three-dimensional tissue shape, 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS), 2017.

松代悠暉、根岸-加藤みどり、尾上弘晃，多様な3次元形状の神経組織におけるニューロン分化率の評価，日本機械学会第8回マイクロ・ナノ工学シンポジウム，2017.

松代悠暉、根岸-加藤みどり、尾上弘晃，3次元的な組織形状の制御による神経幹細胞の分化，化学とマイクロ・ナノシステム学会

第 35 回研究会 (CHEMINAS35) , 2017.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

根岸 みどり (NEGISHI, Midori)

武蔵野大学・薬学研究所・助教

研究者番号 : 30300750

(2)研究分担者

尾上 弘晃 (ONOE, Hiroaki)

慶応義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号 : 30548681

三浦 重徳 (MIURA, Shigenori)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号 : 70511244