

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16779

研究課題名（和文）全脳透明化・脳切片培養による腫瘍幹細胞・iPS細胞由来神経幹細胞の時間空間的解析

研究課題名（英文）Visualization of spatiotemporal dynamics of human glioma stem cell invasion and iPSC-derived neural stem cell

研究代表者

藏成 勇紀（KURANARI, Yuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：90815309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、脳切片培養に全脳透明化技術を組み合わせることで、脳内の移植細胞の挙動を広範囲かつ3次元的に捉えることに成功した。脳切片培養によるtime-lapse imaging及び全脳透明化技術による3次元的评价により、グリオーマ幹細胞はグリオーマ細胞とは異なり、線条体のAxon bundleをつたうように浸潤する性質をもち、また脳梁を介して対側にまで浸潤する像を撮影することに成功した。さらに、NSCがグリオーマ幹細胞に遊走・集簇する様子をとらえることにも成功した。生体内での移植細胞の挙動を明らかにすることは、あらゆる疾患に対する幹細胞を用いた再生医療を飛躍的に促進させる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞移植治療をさらに確固たるものにするためには、脳内の移植細胞の挙動を3次元的に長期間捉える必要である。現在までに脳切片培養を行い、脳内におけるGSCの挙動を長期に渡り捉えることに成功した。一方で、神経線維が絡む脳内での挙動には3次元を考慮した解析が必要である。申請者は、NSC及びGSCに対して脳切片培養及び透明化技術を駆使してこの課題に挑んだ。今までに移植細胞に対して類似のアプローチをとった報告はなく、独自性が高い。この挙動を明らかにすることは、脳腫瘍に対する治療のみならず、脳梗塞、脊髄損傷等あらゆる疾患に対する幹細胞を用いた再生医療を飛躍的に促進させる可能性があり、学術的意義が高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we visualized the spatiotemporal dynamics of invasion of human glioma stem cells (GSCs) in an orthotopic xenograft mouse model using time-lapse imaging of organotypic brain slice cultures and three-dimensional imaging of optically cleared whole brains. GSCs implanted in the striatum exhibited directional migration toward axon bundles. GSCs migrated in a helical pattern around axon bundles in the striatum and invaded broadly in both the rostral and caudal directions. GSCs in the corpus callosum migrated more rapidly and unidirectionally toward the contralateral side with pseudopod extension. Organotypic brain slice culture also demonstrated that hiPSC-NSCs exhibit directional migration toward GSCs-derived tumors. Furthermore, hiPSC-NSC migration toward GSCs was determined by optical clearing of brain tissues. Spatiotemporal visualization techniques can contribute to the elucidation of the mechanisms underlying GSC invasion and NSC migration.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：悪性神経膠腫 iPS細胞 神経幹細胞 脳切片培養 透明化

様 式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、現在自殺遺伝子（yCD：酵母シトシンデアミナーゼ）を導入したヒト induced pluripotent stem cell (iPS 細胞)を作製し、分化誘導した Neural stem cell (NSC)の腫瘍への遊走性を利用することで、悪性神経腫瘍（グリオーマ）の難治性の根源であるグリオーマ幹細胞（GSC）に対して、高い抗腫瘍効果を生み出している。しかし実際に細胞移植治療を実現するためには、「脳内の長期にわたる NSC の挙動」「脳内の GSC 浸潤のメカニズム」は確実に明らかにしなければならない要素である。本研究課題は脳腫瘍のみならず、脳梗塞、脊髄損傷、変性疾患等様々な細胞移植治療の分野に対して、明らかにすべき重要な課題となる。

NSC の遊走機序は、stromal cell-derived factor 1(SDF1)-CXC-chemokine receptor 4(CXCR4) シグナル伝達系等の関与が報告されている。また GSC の浸潤には、それらのシグナル伝達系に加え、血管周囲腔との関与等の報告も散見される。これらの細胞の挙動の多くは、in vitro (2D 基質上や 3D バイオマトリックスゲル上)でイメージングしたものであるが、生体内を完全に反映できていない。特に、中枢神経系は無数の神経細胞から構成され、それぞれの神経細胞はシナプス入力を受けており、非常に複雑な構造を呈する。移植細胞が示す脳内の挙動を真に解明するためには、時間空間的な解析が必須であるが、脳内の構造を可能な限り保持しながら、長期間リアルタイムに観察することは容易ではない。移植幹細胞の挙動を評価するために、脳切片培養が非常に魅力的なツールであることを我々は証明してきた一方で、制限された厚みのため、脳内のグローバルな挙動を解析することが課題として残された。

2. 研究の目的

近年、透明化技術により大規模な三次元構造解析が可能となり、新たなブレイクスルーをもたらすと期待されている。そこで、申請者は、本研究課題により、脳切片培養を行いリアルタイムに時間軸に沿った解析を行い、またそれに透明化技術を駆使することで、3次元空間的な解析を合わせる。本研究課題により、細胞移植治療にとって解明すべき問題である、移植細胞のグローバルな挙動を追求することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 移植細胞の可視化

まず、申請者は iPS 細胞由来の自殺遺伝子導入 NSC の可視化のため Humanized Kusabira-Orange (hK01) 蛍光タンパク質遺伝子を用いる。ヒトグリオーマ細胞株 (U87) 及び GSC 株 (hG008) には、ffLuc 発現レンチウイルスベクター (CSII-EF-ffLuc) を感染させ、セルソーターによるクローンソートを行い、ffLuc が安定高発現する細胞株を得る。

(2) 脳スライス培養 (brain slice culture) :

脳スライス培養作成は、T cell-deficient mouse (U87 細胞株、hG008 細胞株や NSC を右線条体に移植) を非灌流下で断頭し Vibratome で 200 μ m 厚の脳切片を作成し、Millipore 社の sterile porous (0.4 μ m) insert membranes にのせ、培養液入りの Glass base dish に浮かす。その後 dish を、共焦点レーザー顕微鏡の C02 チャンバー内に入れ、timelapse で撮影を行う。

本研究ではまず U87 を、 1×10^5 個 T cell-deficient mouse の右線条体に定位的に移植し 7 日後に、また、hG008 を 1×10^5 個同様に移植した 30 日後に、上記 hK01 で標識された NSC 1×10^6 個を、腫瘍移植部位の上方 1mm に定位的に移植する。コントロールとして、NSC のみを同部位に移植した mouse も準備する。その翌日に上記方法にて脳切片培養を開始し、timelapse で最大 7 日間の撮影を行う。こうして、「NSC のグリオーマ細胞及び GSC への明らかな指向性や、生体内での遊走」をリアルタイムに解析した。

(3) 透明化 (Whole-brain clearing)

passive CLARITY 法を用いて、透明化を行う。上記同様の条件で腫瘍細胞及び NSC を移植した後、遊走期間を置き、4%PFA にて同様に灌流固定する。その後、それぞれの脳組織は 3 日間 4℃で hydrogel solution (4% (wt/vol) PFA, 4% (wt/vol) acrylamide, 0.25% (wt/vol) VA044 in PBS) につけ、その後 Polymerization を同じ hydrogel solution により 37℃で行う。clearing solution (sodium borate buffer 200 mM, pH 8.5 containing 4% (wt/vol) SDS) には、2 時間 37℃につける。その後再度 clearing solution に 5 日間～7 日間 48℃でつけ、透明化の具合を確認し、撮影に移る。撮影に際しては、具体的には、グリオーマ細胞及び GSC の浸潤、さらに NSC の遊走を特に脳の領域ごとに詳細に解析する予定である。以上を合わせて、移植細胞の脳内における時間空間的な挙動を明らかにする。

4. 研究成果

本研究課題では、脳切片培養に全脳透明化技術を組み合わせることで、脳内の移植細胞 (iPS 細胞由来細胞やグリオーマ幹細胞) の挙動を広範囲かつ 3 次元的に捉えることに成功した。脳切片培養による time-lapse imaging 及び全脳透明化技術による 3 次元的評価により、グリオーマ幹細胞はグリオーマ細胞とは異なり、線条体の Axon bundle をつたうように浸潤する性質を多く保ち、また脳梁を介して対側にまで浸潤する像を示した。線条体、脳室周囲、皮質、脳梁と各部位でのグリオーマ幹細胞の浸潤速度を定量解析すると、脳梁が他部位より有意に早い速度で浸

潤することを明らかにした。また、我々の作製した自殺遺伝子導入 iPS 細胞由来 NSC は、グリオーマ幹細胞の放出するリガンドに対する受容体を有し、指向・遊走する性質がある。本研究では、同様に脳切片培養・全脳透明化技術を用いて、NSC がグリオーマ幹細胞に遊走・集簇する様子をとらえることに成功した。NSC も同様に axon bundle をつたう様に遊走する性質があることが明らかとなり、対側に移植した場合でも 2 週間程度の期間をかけ、脳梁を越えて対側のグリオーマ幹細胞部位に集簇することができた。また、同様に脳梁を遊走する際には最も早い速度を示す事がわかった。その速度は、グリオーマ幹細胞よりも有意に速かった。

以上の結果により、非常に強い浸潤性を示すグリオーマ幹細胞に対して NSC は良好な Cellular delivery vehicle として機能しうると言える。また、本研究で樹立した評価系は、その他さまざまな移植細胞療法に応用することができる。生体内での移植細胞の挙動を明らかにすることは、脳腫瘍に対する治療のみならず、あらゆる疾患に対する幹細胞を用いた再生医療を飛躍的に促進させる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------