

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20656

研究課題名（和文）粒子化ハイドロゲルを用いた血管網を有する脳組織の構築

研究課題名（英文）Establishment of brain tissue with vascular network using particleized hydrogel.

研究代表者

谷川 聖（Tanikawa, Satoshi）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：00823353

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）：本研究は脳の欠損病変に対してハイドロゲルを用いた新しい治療アプローチを開発することである。欠損に充填する基質の物性として、神経細胞に適したハイドロゲルの表面電位は正電荷と負電荷が1:1割合で構成された中性電位であることを発見した。この表面電位を有する多孔質ゲルにてin vitroで神経の3次元培養が可能であり、マウスの脳内へ移植することで宿主脳からの神経、グリア細胞の浸潤を誘導し、さらにVEGFを浸漬させることで血管形成が可能であった。留置されたハイドロゲルに外部から神経幹細胞を注入すると多くの細胞の生存が確認され、ハイドロゲル移植と細胞移植を組み合わせた二期的な脳再生手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳は大事な臓器ですが、再生能力が低いいため一度損傷すると元には戻りません。外傷、脳梗塞などにより毎年たくさんの方が亡くなり、また重篤な後遺症を生じます。脳再生は未だ医療応用されうる方法がないのが現状です。今回我々は新たに開発した両電性の多孔質ハイドロゲルと神経幹細胞を用いて脳の組織損傷後に生じる空洞病変の再生を試みました。この多孔質ゲルを埋め込むことで周囲から神経グリア細胞が侵入し、血管網も形成されることが判明し、さらに移植した神経幹細胞はゲルの内部で定着することがわかりました。本研究では脳再生に対する基質の開発、そして移植方法の改良により、脳再生の実現化への新たな一歩を提案します。

研究成果の概要（英文）：This study is to develop a new therapeutic approach using hydrogel for brain defect lesions. We found that the surface potential of hydrogel, which is suitable for neurons, is neutral, consisting of a 1:1 ratio of positive and negative charges. The porous hydrogels with this surface potential can be used for 3D neuronal culture in vitro, and when implanted in the mouse brain, induces infiltration of nerve and glial cells from the host brain, and furthermore, when immersed in VEGF, enables blood vessel formation. When neural stem cells were externally injected into the implanted hydrogel, survival of many cells was confirmed, and a two-phase brain regeneration technique combining hydrogel transplantation and cell transplantation was developed.

研究分野：神経再生

キーワード：神経再生 再生医療 組織工学 神経組織工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳は重要な臓器であるが、神経細胞自体の分裂能が低いこと、さらに細胞の足場となる基質の産生も乏しいため、再生能力が極めて低い臓器である。一度損傷すると元には戻らず、外傷、脳梗塞などにより毎年たくさんの方が亡くなり、あるいは重篤な後遺症を生じる。脳は複雑な臓器であり再生は困難であり、臨床的な需要が高いにもかかわらず、未だ医療応用されうる方法がないのが現状である。一方、細胞の足場として近年ハイドロゲルが注目されている。ハイドロゲルはその構造の大部分を水で置換することができ、生理活性物質や酸素などの透過性に優れる点、接着因子や成長因子などを簡単に修飾できる点、そして形状、物性を変化させやすい点から細胞の足場として有用であるとされている。今回我々は、神経の足場として有用な新たなハイドロゲルを開発し、それを用いて神経再生へのアプローチ法について検討した。

2. 研究の目的

脳への移植に適したハイドロゲルの開発及び脳の空洞病変への治療法の開発

3. 研究の方法

1) マウス由来の神経幹細胞を用いて電荷の異なるハイドロゲルに対する接着実験を行い、神経細胞に最適な荷電を有するハイドロゲルを検討した。ハイドロゲルをクライオゲル化により多孔質化し神経幹細胞の3次元培養を行った。

2) 脳欠損マウスモデルを新たに作成し、欠損部に開発した多孔質ゲルを注入し、ホスト脳からの細胞浸潤の有無を検討した。VEGF をもちいてホスト脳からの血管新生の有無を検討した。

3) ゲル移植後に神経幹細胞を移植し、移植細胞の生着について検討した。

4. 研究成果

1) 神経培養に最適化したゲルの作製

細胞とゲルの接着に関係すると考えられるゲルの荷電状態に着目して、正と負に荷電したゲルの構成成分の単量体を様々な割合で混合したゲルを作製して検討したところ、正荷電と負荷電を1:1で混合して作製したC1A1 (Cation 1 : Anion 1) ゲルが神経幹細胞培養に最適なことを発見した(図1)。このC1A1ゲルを凍らせながら作成する手法(クライオゲル化)によって、多数の細胞がもぐり込めるような約100ミクロンまでの大きさの孔を作成した(C1A1多孔質ゲル)。C1A1多孔質ゲルを用いて *in vitro* で神経幹細胞を培養すると神経細胞とグリア細胞に分化し3次元構造を形成することを確認した(図2)。

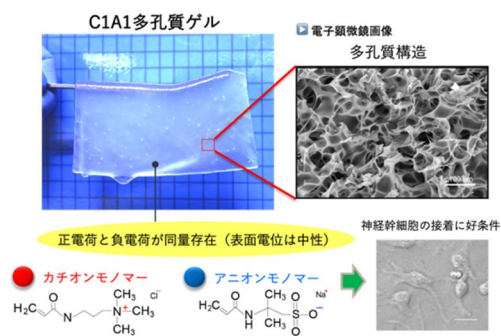


図1 開発したハイドロゲルの概要

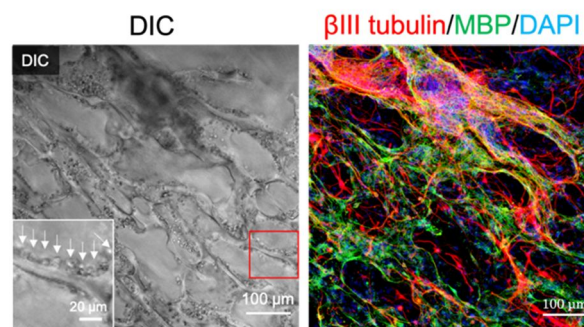


図2 神経細胞とグリア細胞の3次元培養

2) マウス脳損傷モデルの作製とゲルの埋め込みによる血管網の形成

アスピレーターをもちいてマウスの脳を直径約1mmの円柱状に欠損させる新たな疾患モデルを確立し、そこにC1A1多孔質ゲルを充填した(図3)。移植したゲルの内部には宿主由来の神経細胞、グリア細胞が観察された(図4)。また血管内皮細胞増殖因子をゲルにあらかじめ浸しておくことで、約2-3週間で周囲の正常脳組織からゲルの内部に向かって血管が延びて血管網の形成が確認された(図5)。

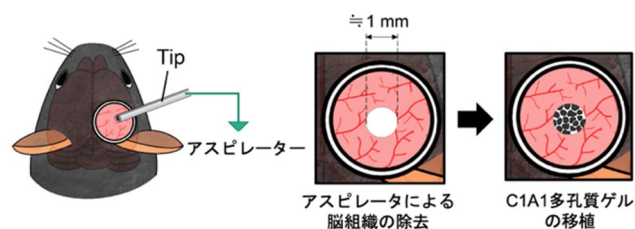


図3 脳欠損モデルと移植イメージ

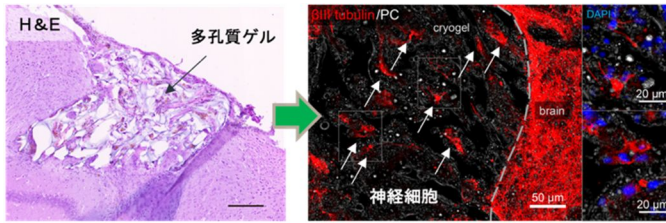


図4 多孔質ゲルへの宿主の細胞の浸潤

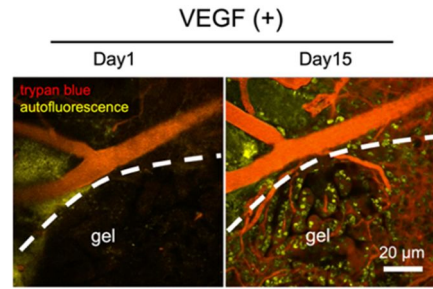


図5 ゲル内部での血管形成

3) C1A1 多孔質ゲル内へ神経幹細胞を注入することで神経組織を再構築する
 ゲルの周囲からゲル内に突起を伸ばす神経細胞が少数のため、ゲルを埋め込んでから約 3 週間後、十分な血管網がゲル内に広がったタイミングで、GFP でラベルした神経幹細胞 10 万個をゲルの中にシリンジで注入した(図6)。その後約 3 週間後にマウスの脳を取り出してゲルの内部を調べたところ、移植細胞の多くが生存しており、蛍光抗体法では チュブリン陽性の神経細胞、GFAP 陽性のグリア細胞への分化が一部で確認された(図7)。ゲル内では宿主由来の細胞と移植細胞が混在して存在し、脳組織の再構成が確認された。

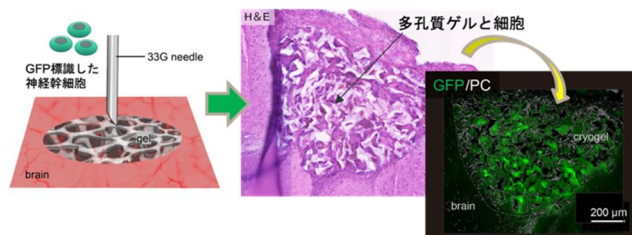


図6 移植モデルの概要と生着した移植細胞

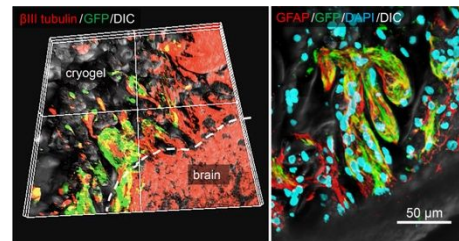


図7 移植細胞の分化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanikawa Satoshi, Ebisu Yuki, Tomas Sedlacik, Semba Shingo, Nonoyama Takayuki, Kurokawa Takayuki, Hirota Akira, Takahashi Taiga, Yamaguchi Kazushi, Imajo Masamichi, Kato Hinako, Nishimura Takuya, Tanei Zen-ichi, Tsuda Masumi, Nemoto Tomomi, Gong Jian Ping, Tanaka Shinya	4. 巻 13
2. 論文標題 Engineering of an electrically charged hydrogel implanted into a traumatic brain injury model for stepwise neuronal tissue reconstruction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-28870-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 谷川 聖, 戎 優樹, 仙葉 慎吾, 津田 真寿美, Tomas Sedlacik, 野々山 貴行, 高橋 泰伽, 根本 知己, Jian Ping Gong, 田中 伸哉
2. 発表標題 多孔ハイドロゲルを用いた神経組織再生への挑戦
3. 学会等名 第65回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoshi Tanikawa, Shingo Semba, Yuki Ebisu, Tomas Sedlacik, Takayuki Nonoyama, Lei Wang, Masumi Tsuda, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka
2. 発表標題 Development of the cryogel for neuronal tissue engineering.
3. 学会等名 The 38th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------