

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700397
 研究課題名 (和文) アルギン酸カルシウムゲルを用いた中枢神経系細胞・血管内皮細胞複合組織シートの開発
 研究課題名 (英文) Development of a neural cell sheet with vascular endothelial cells using the transferring technique based on calcium alginate gel behavior
 研究代表者
 森 英樹 (MORI HIDEKI)
 大阪府立大学・理学系研究科・助教
 研究者番号：30450894

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、コラーゲンゲルに化学架橋処理を施す事によってゲルの剛性を高め、神経幹細胞/前駆細胞から分化誘導した細胞の展開率を改善し、さらにアルギン酸カルシウムゲルによるゲル膜剥離技術を用いてコラーゲン上で神経幹細胞/前駆細胞から分化誘導したニューロン・アストロサイト等の中枢神経系細胞を剥がし、培養した血管内皮細胞層へ重層化することによって、脳神経-血管組織構造のようなニューロン・アストロサイト-血管内皮細胞複合組織シートを製作した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we developed a neural cell sheet, differentiated from neural stem/progenitor cells on a collagen gel cross-linked with water-soluble carbodiimide for elastic modification and deposited on vascular endothelial cells using the transferring technique based on calcium alginate gel behavior, as an alternative functional model for the screening assay targeted delivery across the blood brain barrier.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳内にはいわゆる「血液脳関門」と呼ばれる血管内皮細胞による物質輸送の関所があり、脳組織への薬物輸送は生体内では最も難しいとされている。そのため、脳中枢神経

系に作用する薬剤の構造は制限され、脳疾患薬の薬剤開発を難しくしている要素のひとつである。脳血管から脳神経組織内への物質輸送モデルを構築することは脳疾患をターゲットにした薬剤スクリーニングシステム

の構築への応用が期待され脳疾患薬開発の迅速化に役立つと考えられる。本研究の目的は薬剤スクリーニングに使用できるような血管内皮細胞・アストロサイト・ニューロン複合組織を作製することである。

(2) 脳組織内の毛細血管周辺の構造は血管の周囲をアストロサイト等の中枢神経組織の細胞が覆った構造をしている。これまでの研究により血液脳関門の実体は脳毛細血管内皮細胞に多く発現するトランスポーター群の働きによると考えられており、血液脳関門モデルとしてウシ由来株化脳毛細血管内皮細胞などが使用されてきた。しかし、培養した株化細胞のトランスポーターの活性は *in vivo* の活性よりも弱い。この弱点を克服するためにセルカルチャーインサートを使用して不死化ラット脳毛細血管内皮細胞をアストロサイトと共培養を行い、トランスポーターの活性の向上させた報告もある (Brain Res.2007 1150 32-40)。しかし、近年、アストロサイト自身も多くのトランスポーターを有することが報告されており (Brain Res.2004 1021 1-13) また、神経前駆細胞が血液脳関門の構造に影響を与えるという報告 (Brain Res.2007 1159 67-76) もあることから、脳血管から脳神経組織内への物質輸送系を考える上では血管内皮細胞だけでなくアストロサイトやそれに接するニューロンまでを含んだ複合的なモデルを構築する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

(1) コラーゲンゲル上で分化誘導した神経幹細胞/前駆細胞が接着し、移動、展開する条件を決定する

(2) クエン酸のカルシウムイオンに対するキレート作用を利用し、コラーゲンゲル下層に作製したアルギン酸カルシウムゲルを溶解し、予め神経幹細胞/前駆細胞からの分化誘導によってニューロン・アストロサイトが接着・展開したコラーゲンゲルを剥離、血管内皮細胞層へ重層化する技術を開発することである。

3. 研究の方法

(1) 研究はコラーゲンゲル上にニューロン・アストロサイトを分化・培養し、血管内皮細胞上へ重層化するにあたり、以下の手順を進めた。

(2) 細胞は胎齢 14.5 日の ICR マウス終脳から樹立、B27 サプリメント、上皮増殖因子 (EGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) を添加した無血清培地で培養したものを用いた。分化培養には DMEM/F12 培地を基本培地として、1%ウシ胎仔血清および B27 サプリメントを添加した条件を用いた。

(3) 最初に、神経幹細胞/前駆細胞のコラー

ゲンゲル上における分化条件を決定した。足場材料となるコラーゲンゲルの弾性率を変化させるために、0-50 mM に調製した架橋剤カルボジイミド (EDC) 溶液をコラーゲンゲル上に添加し、24 時間作用させた、架橋処理後、架橋剤をブロッキングするためにグリシン溶液を添加によって架橋剤反応を停止させた。これらの化学架橋コラーゲンゲルは動的粘弾性測定装置で損失弾性率および貯蔵弾性率を測定した。また同時にこれらの化学架橋コラーゲンゲルを足場材料として神経幹細胞/前駆細胞の分化条件検討に用いた。

(4) 分化した細胞の細胞集の識別のために免疫染色を行った。4%パラホルムアルデヒドで固定した細胞にニューロンマーカー (Tubulin β III抗体)、アストロサイト (GFAP抗体)、による免疫染色、総細胞数を数えるための DAPI による核染色を行った。細胞の数や面積は蛍光顕微鏡写真を基に画像解析し、算出した。

(5) 分化細胞の薬剤排出能評価には蛍光色素 Rhodamin 123 の 90 分間の細胞内への取り込み量を測定した。Rhodamin 123 は薬剤排出トランスポーターの一つである ABCB1 の基質となることが知られている。このことにより ABCB1 の活性を比較できる。

(6) さらに、光増感反応後の細胞数の比較にはテトラゾリウム塩を用いて NADPH 量依存的に生成する水溶性ホルマザン量を比色測定する WST 法によって、総細胞を比較評価した。

(7) 細胞が展開したコラーゲンゲルを剥離するために底面に透過膜を有した培養容器 (セルカルチャーインサート) 内底面でアルギン酸カルシウムをゲル化させ、さらにその上層にコラーゲンゲルを作製した。アルギン酸カルシウムゲルは 1%アルギン酸ナトリウム溶液に塩化カルシウムを混合、静置することによって作製した。血管由来細胞としてヒトさい帯由来血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた。

4. 研究成果

(1) 胎齢 14.5 日のマウス終脳由来の神経幹細胞/前駆細胞を poly-L-ornithine コートしたガラス、未架橋のコラーゲンゲル上で、1%

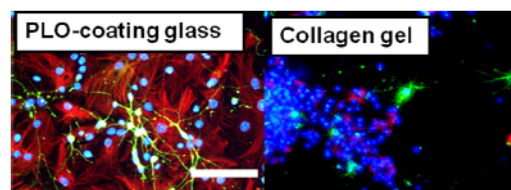


図 1. コラーゲンゲル上で神経幹細胞/前駆細胞から分化誘導した細胞の蛍光免疫染色像。緑：ニューロン、赤：アストロサイト、青：核

ウシ胎仔血清を含む培地下で分化誘導した。また、図1に示したようにコラーゲンゲル上では細胞が分化および展開しなかった。そこで、コラーゲンゲルの硬さ（弾性率）が細胞の分化および展開に影響しているのではないかと考え、化学架橋剤カルボジイミドでコラーゲンゲルを架橋し、弾性率の異なるコラーゲンゲルを調製した。動的粘弾性測定装置でコラーゲンゲルを貯蔵弾性率（ G' ）等を測定した。各々の弾性率を有するコラーゲンゲル上において分化誘導した細胞は、抗 Tubulin β III 抗体、抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体を用いて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡撮影装置から取得した画像をもとに分化率、伸展率を解析した。その結果を図2に示す。未架橋のコラーゲンゲル上で

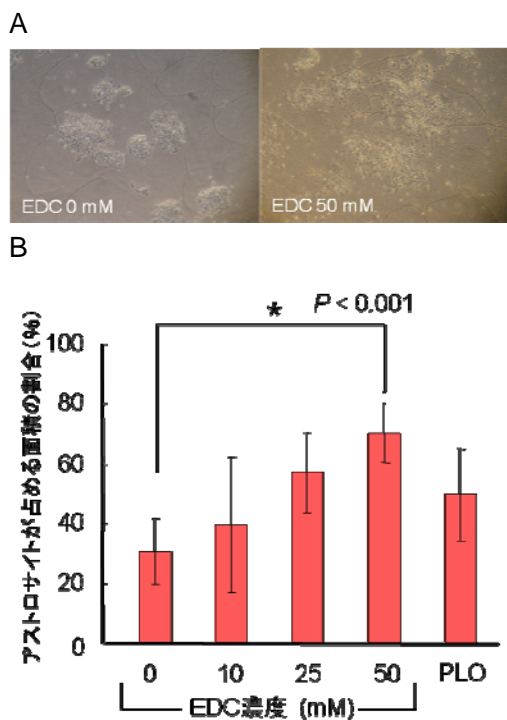


図2. 化学架橋コラーゲンゲル上における分化細胞 (A) と分化したアストロサイトの展開した面積の比較 (B)

は、分化細胞は見られたが、細胞の伸展率は低かった。化学架橋をおこなったコラーゲンゲルでは、架橋に用いた EDC 濃度に応じてコラーゲンゲルの G' が増加し、更に G' に応じて細胞の展開も促進された。

(2) さらに、神経幹細胞/前駆細胞から分化誘導した細胞の薬剤排出能を評価するために、分化誘導した細胞に対する光増感色素 Rhodamin 123 のみなし取込み量の経時変化を測定した。色素取込み量は取込み開始 90 分まで時間依存的に増加した。その結果、分化誘導細胞のほうが取込み量は大きかった (図3)。神経幹細胞/前駆細胞に ABC transporter の ABCB1 の阻害剤である

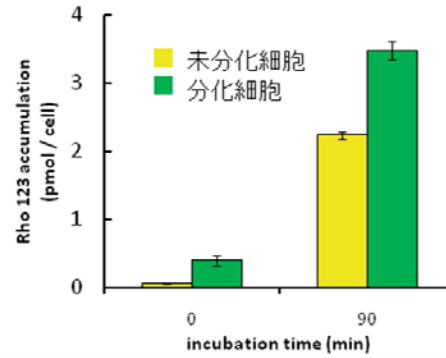


図3. 分化誘導細胞への蛍光色素 Rho123 取り込み量の変化

Cycrosporin A を与えた条件では色素取込み量は増加した。このことから ABC トランスポーター ABCB1 による色素排出であると考えられる。Rhodamin 123 の取込み処理をした神経幹細胞/前駆細胞およびその分化細胞に照射を行い照射時間と細胞生存率を解析し、細胞量の調節処理に利用を検討した。さらに免疫染色を行い、神経幹細胞/前駆細胞のマーカーとして Sox 2、CD133、Nestin を用いてポピュレーション解析も行った。照射時間に依存して生細胞数は減少した。生存細胞における神経幹細胞/前駆細胞の割合は約 50%程度残っており、照射時間に依存しなかった。これらの結果より、Rhodamin 123 は ABCB1 の活性により神経幹細胞/前駆細胞への取り込みは少ないものの、神経幹細胞/前駆細胞に対する光増感反応の影響を減じるほどではなかったと考えられる。

(3) 免疫染色の結果、化学架橋コラーゲンゲル上にて分化、展開した細胞の多く (80-90%) GFAP 陽性のアストロサイト、ニューロンは 5-10%程度であった。このコラーゲンゲル上にて分化、培養した細胞をコラーゲンゲルと一緒に剥離するために、予めアルギン酸カルシウムゲルをコラーゲンゲル下層

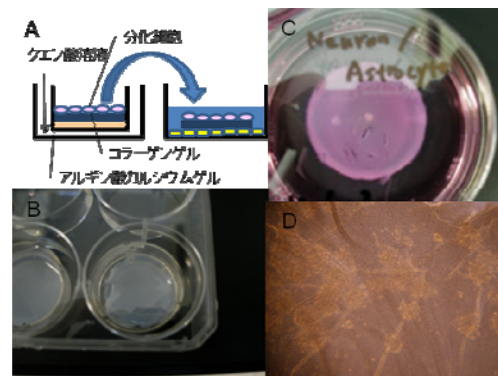


図4. アルギン酸カルシウムゲルを用いた分化細胞を有したコラーゲンゲル剥離、重層化工程

に作製した(図4A)。さらに、クエン酸溶液を底面に流し込むことによりアルギン酸カルシウムゲル内のカルシウムイオンをキレートし、溶解させた。その結果、神経幹細胞/前駆細胞から分化誘導したニューロン、アストロサイトが接着したコラーゲンゲル層を剥離できた。このコラーゲンゲル層は他の容器で培養されたヒトさい帯由来血管内皮細胞上へ移され重層化された(図5)。以上より中枢神経系の神経幹細胞/前駆細胞からの分化細胞有するコラーゲンゲルを重層化した構造を作製できた。今まで軟組織であるために加工が難しかった中枢神経系組織をシート状に加工するための重要な基礎技術になると考えられる。今後は、薬剤試験などの有用な手段として応用するために、詳細な機能評価を行っていく必要がある。

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3件)

- ① 後藤栄子、向澤正宏、森英樹、原正之、A rolled sheet of collagen gel with cultured Schwann cells: model of nerve conduit to enhance neurite growth、Journal of Bioscience and Bioengineering、査読有、Vol.109、2010、pp.512-518
- ② 吉田陽亮、森英樹、原正之、マウス神経幹細胞/前駆細胞のRhodamin123 排出能と光増感反応による殺細胞活性評価、放射線施設共同利用報告書、査読無、2009、39-39
- ③ 森英樹、原正之、光増感反応による神経幹細胞に対する殺細胞活性の評価、放射線施設共同利用報告書、査読無、2008、30-30

[学会発表] (計7件)

- ① 森英樹、マウス神経幹細胞の分化誘導に伴う形態変化に対する化学架橋コラーゲンゲルの影響、第9回日本再生医療学会総会、2010年3月19日、広島国際会議場
- ② 森英樹、マウス神経幹細胞の分化誘導に伴う形態変化に対する化学架橋コラーゲンゲルの影響、第61回日本生物工学会大会、2009年9月24日、名古屋大学東山キャンパス
- ③ 吉田陽亮、光増感色素を用いたマウス神経幹細胞に対する光線力学的効果、第61回日本生物工学会大会、2009年9月24日、名古屋大学東山キャンパス
- ④ 森英樹、Sensitivity of murine neural stem/progenitor cells to photosensitization by hematoporphyrin

and rhodamine123、International society for Stem Cell Research 7th Annual Meeting、2009年7月9日、Centre Convencions Internacional Barcelona

- ⑤ 森英樹、マウス神経幹細胞に対する光増感反応による殺細胞活性の評価、日本化学会第89春季年会、2009年3月27日、日本大学理工学部船橋キャンパス
- ⑥ 森英樹、マウス神経幹/前駆細胞に対する光増感反応の影響、第8回日本再生医療学会総会、2009年3月6日、東京国際フォーラム
- ⑦ 森英樹、Effect of cell density on human neural stem/progenitor cells (hNSPCs) differentiation、第31回日本神経科学学会大会、2008年7月11日、東京国際フォーラム

[図書] (計1件)

- ① 森英樹、金村米博、羊土社、改訂 培養細胞実験ハンドブック、2009、319-324

[その他]

ホームページ等

<http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/%7Ehara/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森英樹 (MORI HIDEKI)

大阪府立大学・理学系研究科・助教

研究者番号：

30450894

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：