

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05236

研究課題名（和文）新奇なオンゲル共培養法を用いた脳スフェロイドへの血管網構造構築原理の探索

研究課題名（英文）A novel method of co-culturing cerebral spheroids and vascular endothelial cells on gels to explore the conditions for capillary network formation

研究代表者

森 英樹（Mori, Hideki）

大阪公立大学・大学院理学研究科 ・准教授

研究者番号：30450894

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）：本研究では、脳オルガノイド内に血管網を構築する方法の糸口を見つけるために、ハイドロゲル上で脳スフェロイド（ニューロスフェア、脳オルガノイド）と血管形成細胞の共培養・浸潤アッセイ系を作製し、脳スフェロイドへの血管形成細胞の浸潤などの細胞形態の変化を調べた。足場材料となるコラーゲンゲル表面へのUV架橋の有無によって、脳スフェロイドと共培養した血管内皮細胞の増殖および移動、伸展に変化があることを見つけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞から培養によって形成された脳オルガノイドには毛細血管構造がなく、脳のモデルとして血管を導入することが課題であった。しかし、単に血管を形成している血管内皮細胞と共培養しただけでは血管網を構築することは難しく、その培養条件を探る必要があった。本研究におけるコラーゲンゲルを足場とした共培養技術はオルガノイドへの血管内皮細胞導入するため足掛かりとなる結果を示した。

研究成果の概要（英文）： In this study, to find a clue to how to construct a capillary network in brain organoids, we prepared a co-culture system of brain spheroids (neurospheres and brain organoids) and vascular endothelial cells on hydrogel and examined changes in cell morphology such as adhesion and elongation of vascular endothelial cells to the brain spheroids.

We found that the proliferation, migration, and elongation of vascular endothelial cells co-cultured with brain spheroids changed depending on the presence or absence of UV cross-linking on the collagen gel surface.

研究分野： 生物学

キーワード： コラーゲンゲル 粘弾性 血管内皮細胞 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、研究が盛んに行われている脳オルガノイドは、中枢神経系の初期発生モデルとして生体外で発生初期過程における脳構成細胞の動きを解析するための強力なツールとなっている。しかし、生体組織と同じように血管内皮細胞からなる毛細血管網を脳オルガノイド内に構築できていないことが、酸素や栄養の中心部への供給が必要となるオルガノイドの大きさの拡大維持だけでなく、細胞の移動を伴う中枢神経発生後期過程の脳組織構造への移行を難しくしている。現時点では脳組織にあるような血管構造を有した脳スフェロイドはまだ開発されていない。その理由として血管形成細胞と神経幹細胞を混ぜてスフェロイド形成を誘導しただけでは血管形成細胞が安定して存在できず、スフェロイド内には血管網や血管内皮細胞の網目状構造はできないことが挙げられる。どのようにしたら脳スフェロイド内部に血管網を構築できるのか？本研究では、スフェロイド内部への毛細血管形成には、土台となる細胞足場材料の粘弾性が重要なのではないかと考え、スフェロイドへの血管形成細胞の接着、浸潤条件の探索を試みた。

2. 研究の目的

本研究は、脳オルガノイド内に血管網を導入する方法の培養足場条件を見つけるために、ハイドロゲル上で脳スフェロイド（ニューロスフェア、脳オルガノイド）と血管形成細胞の共培養・浸潤アッセイ系を作製し、脳スフェロイドへの血管形成細胞の浸潤および血管網構造形成条件を探索することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 希塩酸に溶けた 0.5% I型コラーゲン溶液を中和し、繊維化コラーゲンゲルを作製した。さらに、紫外線 (254 nm) を 15 分間照射することによって UV 照射コラーゲンゲルを作製した。動的粘弾性試験によって、UV 照射前のコラーゲンゲルと UV 照射コラーゲンゲルの貯蔵弾性率 (G') と損失弾性率 (G'') を測定した。

(2) UV 照射していない UV 未照射コラーゲンゲルと UV 照射コラーゲンゲル上で、マウス脳毛細血管内皮細胞である bEnd.3 を培養し、細胞接着、増殖、形態変化について比較した。また、定量的 RT-PCR 法によって接着関連遺伝子の発現傾向を解析した。また、UV 照射コラーゲンゲルとそのままの未照射コラーゲンゲル上で培養した脳毛細血管内皮細胞の上に、更にコラーゲンゲルを被せた状態で培養を続け、其々の条件での細胞の形状の変化を解析した。

(3) E14 マウス大脳由来神経幹/前駆細胞 (NSPC) が形成するニューロスフェアおよびヒト iPS 細胞由来大脳オルガノイドのポリビニルアルコール (PVA) ゲル、ナイロンメッシュに対する接着特性を解析した。

(4) UV 未照射コラーゲンゲルと UV 照射コラーゲンゲル上で bEnd.3 を培養、さらにその上に、E14 マウス大脳由来 NSPC が形成するニューロスフェアあるいはヒト iPS 細胞由来大脳オルガノイドを播種し、培養経過に伴う bEnd.3 細胞の形態、浸潤の変化を観察した。

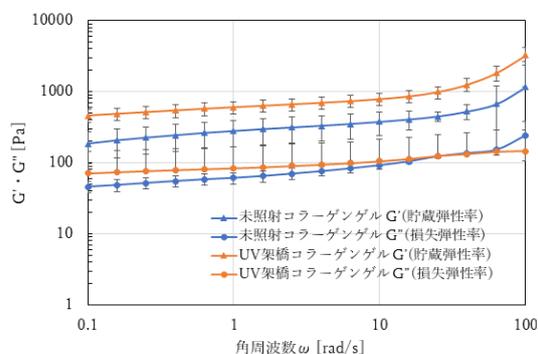


図 1. コラーゲンゲルの動的粘弾性

4. 研究成果

(1) UV 照射していない未照射コラーゲンゲルと UV 照射コラーゲンゲルの動的粘弾性を図 1 に示した。UV 照射コラーゲンゲルの貯蔵弾性率 (G') は角周波数 1 rad/s では未照射コラーゲンゲルの 2.2 倍程度であった。

(2) UV 照射コラーゲンゲル上の方に bEnd.3 は多く接着し、さらに UV 照射コラーゲンゲル上の方が bEnd.3 の増殖率は高かった (図 2)。細胞の形態は、未照射コラーゲンゲル上の細胞は UV 照射コラーゲンゲル上の細胞に比べて突起が多く、細長い形状であった。蛍光ファロイジン染色による F-アクチンの観察では、UV 照射コラーゲンゲル上で培養した bEnd.3 において、より太い

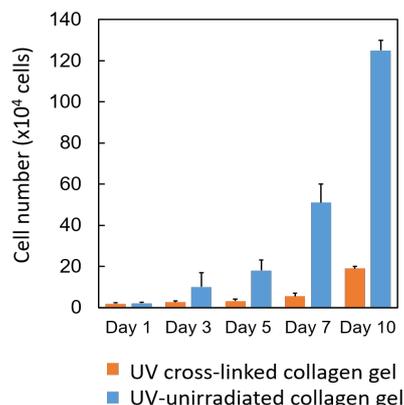


図 2. コラーゲンゲル上における bEnd.3 の増殖

ストレスファイバー様のアクチン線維とスポット状の F アクチンが多数観察された。接着関連遺伝子の発現解析では、UV 照射コラーゲンゲル上で培養した bEnd.3 では未照射コラーゲンゲルと比較してタイトジャンクション形成に関わる *Tjp1* およびコラーゲン分子との接着と血管新生に関連した *Itga2*, *Mmp14*, *Tks5* の発現が低下していた。コラーゲンゲルを上から被せた b.End3 培養では、下のゲルが未照射コラーゲンゲルである場合の方が、多数の糸状仮足が観察された (図 3)。以上のことから、コラーゲンゲル表面の粘弾性 (硬さ) の変化による物理化学的刺激が、脳毛細血管内皮細胞の接着や増殖、細い形態やネットワーク構造形成に影響を与えたと考えられる。また、UV 未照射コラーゲンゲルの方が、血管形成を誘導する材料として適している可能性がある。

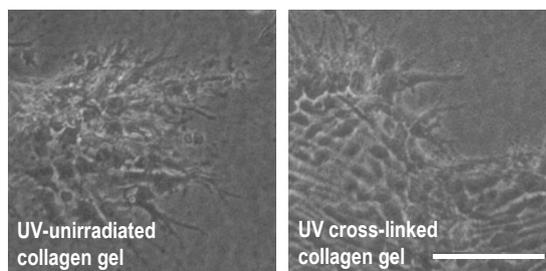


図 3. bEnd.3 の位相差顕微鏡像 bar=100 μm

(3) 放射線架橋 PVA ゲル上にマウス大脳由来 NSPC が形成するニューロスフェア様の細胞集塊は接着し、増殖できた。一方、ヒト iPS 細胞由来大脳オルガノイドは、PVA ゲル上で培養しても十分に接着できず、剥がれてしまった。細胞集塊を 3 次元的に固定するためにナイロンメッシュを用いて、マウス大脳由来 NSPC やヒト iPS 細胞由来 NSPC の培養を試みた。ナイロンメッシュはポリアクリル酸 (PAA) をグラフト重合したもの、さらに細胞外マトリクス成分を含むマトリゲルを修飾したものを用いた。マトリゲルを修飾したナイロンメッシュ上に接着したマウス由来 NSPC の増殖率は高く、速く増殖した。しかし、メッシュ上で増殖したマウス NSPC は移動し、細胞はメッシュ上に伸展したため、厚みのある細胞集塊を形成しなかった (図 4) ヒト iPS 細胞由来 NSPC でも概ね同様の結果であった。

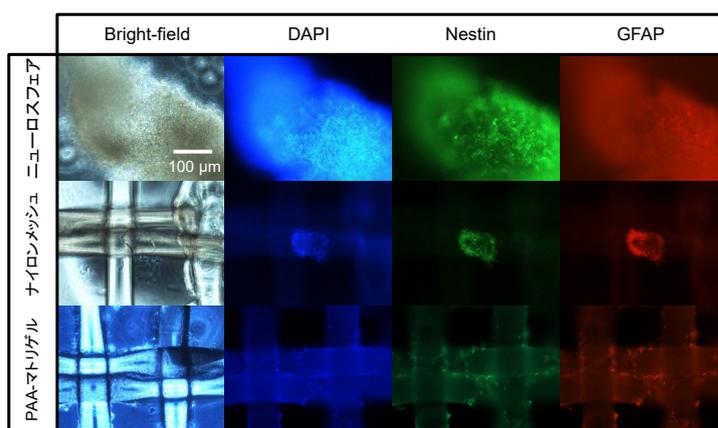


図 4. ナイロンメッシュ上で培養したマウス大脳由来 NSPC

(4) コラーゲンゲル上で bEnd.3 を予め培養した上に、マウス NSPC によって形成されたニューロスフェアを播種したところ、UV を照射していない未照射コラーゲンゲル上のニューロスフェアは接着したが丸い形態を維持し、bEnd.3 の著しい浸潤は見られなかった。一方、UV 照射コラーゲンゲル上ではニューロスフェアは増殖した bEnd.3 と接触し、丸い形態は細長くなった。しかし、3 週間培養を続けても NSPC と b.End3 は細胞同士が均一に混ざり合うことはなかった。ヒト大脳オルガノイドを、其々のコラーゲンゲル上で培養した bEnd.3 の上で培養したところ、培養皿や UV 照射コラーゲンゲル上の bEnd.3 と大脳オルガノイドの接着は 1 ヶ月間の培養でも見られなかったが、未照射のコラーゲンゲル上の bEnd.3 は大脳オルガノイドへの浸潤が認められ (図 5)、bEnd.3 と大脳オルガノイドは接着し、ディッシュ上を浮遊することがなくなった。これらのことから、ヒト大脳オルガノイドへの毛細血管構造を導入するためには、UV 照射処理を施していない I 型コラーゲンゲルの条件の方が良いと考えられる。大脳オルガノイド内に血管構造の形成を確認するには、培養期間などの更なる詳細な条件検討が必要である。



プラスチック培養皿

未照射コラーゲンゲル

UV照射コラーゲンゲル

図 5. ヒト大脳オルガノイドと共培養した bEnd.3 の明視野画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hideki Mori, Koki Tominaga, Kae Shimogama, Masayuki Hara	4. 巻 203
2. 論文標題 Different mechanical properties of the gamma-irradiated gelatin gels prepared through the different cooling processes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Radiation Physics and Chemistry	6. 最初と最後の頁 110604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.radphyschem.2022.110604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori Hideki, Naka Ryosuke, Fujita Masanori, Hara Masayuki	4. 巻 131
2. 論文標題 Nylon mesh-based 3D scaffolds for the adherent culture of neural stem/progenitor cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 442 ~ 452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2020.12.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下釜香枝, 森英樹, 原正之
2. 発表標題 血管内皮細胞の接着・剥離挙動を利用した細胞転写培養ゲルの設計
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田結衣, 森英樹, 原正之
2. 発表標題 画像解析に基づいたポリピニルアルコールゲル上における神経幹/前駆細胞の移動能の評価
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上聖巴, 鈴木咲紀, 森英樹, 原正之
2. 発表標題 紫外線架橋コラーゲンゲルに接着したマウス脳毛細血管内皮細胞の形態変化の解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 喜多美月, 森英樹, 原正之
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来神経幹/前駆細胞の生存・分化に対するカドミウムの影響評価
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森英樹, 鈴木咲紀, 原正之
2. 発表標題 紫外線架橋コラーゲンゲル上で培養した血管内皮細胞の接着特性の解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会 (オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山悠孝, 森英樹, 原正之
2. 発表標題 ガンマ線架橋ポリビニルアルコールゲル上におけるマウス神経幹/前駆細胞の接着挙動の解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会 (オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森英樹、原正之
2. 発表標題 紫外線架橋コラーゲンゲルに対する脳毛細血管内皮細胞の接着性
3. 学会等名 日本化学会101春季年会（オンライン）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森英樹、李ユウナ、前田結衣、原正之
2. 発表標題 放射線架橋PVAゲル上におけるマウス神経幹/前駆細胞の移動と集塊形成挙動の解析
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪公立大学 大学院理学研究科 生物化学専攻 細胞組織工学研究室のホームページ https://www.omu.ac.jp/sci/cell-tissue/</p>

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
---------	---------