

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289060

研究課題名(和文) マイクロファイバーワイヤリングによる血管-神経網の構築

研究課題名(英文) Construction of vascularized nerve tissue by a 3D co-culture system consisting of cell microfibers

研究代表者

根岸 みどり(加藤みどり)(Negishi, Midori)

東京大学・生産技術研究所・研究員

研究者番号：30300750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、神経細胞、血管内皮細胞を細胞ファイバーとし、デバイス中でアセンブリすることにより3次元的な血管-神経網を構築することを目指した。神経幹細胞ファイバーは、直径が細かいほど分化誘導後に神経細胞の割合が高く、高配向性となることがわかった。神経ファイバーから数mmの神経ユニットを作製し、アセンブリによる神経回路構築法を確立した。一方、HUVECからは血管新生能を有する血管内皮細胞ファイバーの作成に成功した。最終的に、神経ファイバーをフィブリンゲル内部でデバイスにより固定し、血管内皮細胞と3次元共培養することで神経ファイバー周辺部に血管網を有するような血管-神経網の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we constructed 3D vascularized nerve tissue by co-culture of cell microfibers. We first evaluated the characteristics of neural microfiber. In the neural stem cell microfiber, the tubular microenvironment with a core diameter of less than ~100 um contributed to forming highly viable and aligned neural tissue after differentiation induction. Then, we constructed 3D neural networks using the "neural tissue units", which were prepared by cutting the long neural microfibers in an accurate and reproducible manner. Meanwhile, HUVEC fiber was also fabricated. We found that tubular structure with a monolayer of cells along the direction was formed and observed blood vessel sprouting. To observe the vascularization of HUVEC in the neuron-HUVEC coculture system, we then developed a 3D co-culture device in which neural microfibers can be immobilized. Finally, we successfully observed the vascularization of HUVEC in the 3D fibrin gel with neural microfibers.

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 マイクロマシン 再生医療 細胞・組織 神経科学

1. 研究開始当初の背景

近年再生医工学分野では、一つもしくは複数の細胞の塊をユニットとして複雑な3次元組織を人工的に構築していくボトムアップ型アプローチが盛んに研究されている。これまで、細胞塊(スフェロイド)、細胞シート、細胞ファイバーなど様々な細胞ユニットが開発されており、最近では細胞ユニットから複雑な3次元組織を構築する方法や、構築された組織の機能性向上に研究内容がシフトしている。ボトムアップ型の組織構築とは、機械部品を組み立てるように細胞ユニットを組み上げ組織を構築していく技術と例えられているが、生きている細胞を取り扱うため、その組み立て作業は単純でなく、細胞独自の特性や、細胞間の相互作用を考慮した上でその機能を保持したまま組み立てることが重要である。これは細胞ユニットを単純に組み合わせることでは、複雑な構造体である3次元組織を形成することが難しいという事を意味しており、細胞ユニットを組み合わせることで機能性を保持する、もしくは向上させるような組織パーツを構築する技術の開発が求められている。そこで申請者はこの課題に対し、生体内のあらゆる組織において組織機能の根幹を支える基盤となる血管-神経網の構築を提案する。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、血管内皮細胞および神経細胞をファイバー形状のユニット「細胞ファイバー」とし、それらを利用し「3次元的な血管-神経網」を構築する手法を提案することである。形成される血管-神経網は、血管腔を有し、神経信号の伝達機能も保持する生体内と類似した組織的特徴・機能的作用を有する3次元組織とする。具体的には、神経細胞及び血管内皮細胞から構築される細胞ファイバー作製法の確立と作成された細胞ファイバーの機能評価を行い、神経ファイバーのアセ

ンブリによる3次元立体神経回路の構築技術を確立し、最終的に神経ファイバーと血管内皮細胞の共培養系を確立、血管-神経網の3次元共培養系を評価する。

3. 研究の方法

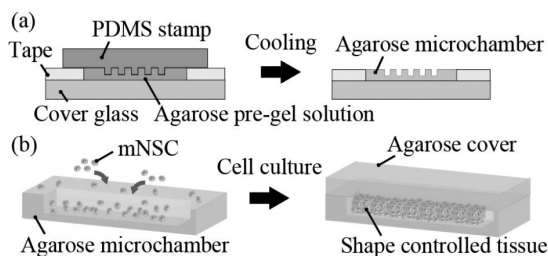
(1) 神経細胞ファイバーの作製と評価

2重同軸層流マイクロデバイスを用いた神経ファイバーの作製

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初代大脳皮質細胞(ラット胎児脳由来)、初代海馬細胞(ラット胎児脳由来)、マウス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ーを作成した。初代培養細胞は、10% FBS及びB27を添加したDMEM-F12培地で培養を行い、神経幹細胞は20 ng/mL bFGF、20 ng/mL hEGFとB27 without vitamin Aを含むNeurobasal-A培地で培養を行った。神経幹細胞で構築された細胞ファイバーに関しては、培養3-7日、ファイバー内部が神経幹細胞で満ちた後に、bFGF及びhEGFを除去した培地で培養し、神経細胞への分化を誘導した。神経ファイバーの評価については、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。さらに、神経細胞のネットワーク形成評価については細胞内Ca²⁺イメージングを行った。

アガロースゲルチャンバを用いた神経ファイバーの作製

アガロースゲルによる3次元培養チャンバはpoly(dimethylsiloxane)(PDMS)モールドのパターンをアガロースゲルに転写することで作製し、アガロースチャンバ上に神経幹細胞を播種した後、シート状のアガロースゲルをチャンバの上に被せることで密閉した状態で培養を行い、神経ファイバーを構築した(図1)。作成された神経ファイバーについては、と同様に細胞の評価を行った。



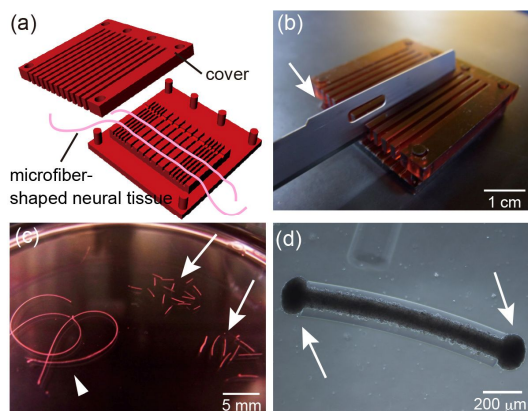
(図1)アガロースゲルチャンバを用いた神経細胞の3次元培養法

(2) 血管ファイバーの作製

2重同軸層流マイクロデバイスと3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血管内皮細胞(HUVEC)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ー(HUVECファイバー)とHUVECの周囲に平滑筋細胞を含有する細胞ファイバー組織を構築し、培養を行った。

(3) 神経細胞ファイバーのアセンブリ

細胞ファイバーを同一長で切り出す、ファイバーカッティングデバイスを用いて、1-3 mmの神経細胞ファイバー(神経ユニット)を作製した(図2)。この神経ユニットをPDMSモールド上で培養することで、2-5個の神経ユニットからなる3次元神経組織を構築し、神経回路構築を細胞内Ca²⁺イメージング法と免疫染色法を用いて評価した。



(図2)ファイバーカッティングデバイスを用いた神経ユニットの作製 (a), (b)ファイバーカッティングデバイス、(c)細胞ファイバーとカッティングデバイスにより作製された神経ユニット、(d)24時間培養した神経ユニット

(4) 神経細胞ファイバーと血管内皮細胞の共培養

神経ファイバーをデバイス上に固定した状態で、血管内皮細胞とともにフィブリンゲル内で培養を行った。共培養後、血管内皮細胞から形成される管腔構造の観察、評価を行った。

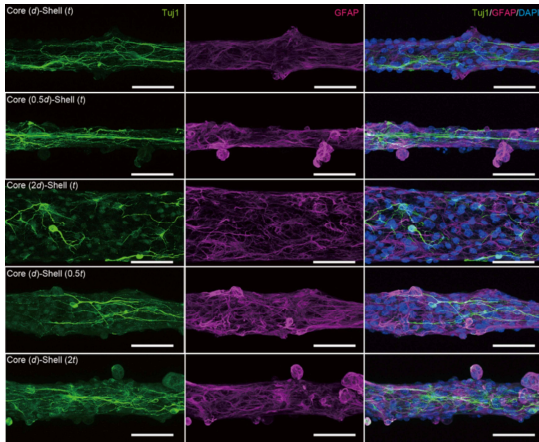
4. 研究成果

(1) 神経細胞及び血管内皮細胞から構築される細胞ファイバー作製法の確立と作成された細胞ファイバーの機能評価

神経幹細胞ファイバーの形状が及ぼす分化誘導率、神経細胞の形態変化

直径の異なるマウス由来の神経幹細胞ファイバーを分化誘導すると、直径の細いファイバーほど神経細胞への分化誘導率が高く、ファイバーの長軸方向に神経細胞が配向した3次元組織を構築することが出来た(Advanced Healthcare Materials, vol.11, 2016, pp. 1104-1111)(図3)。本研究成果から、直径50-100 μmの神経幹細胞ファイバーを利用する事で、形態的に配向した神経細胞を効率よく入手できる手法を確立する事が出来た。

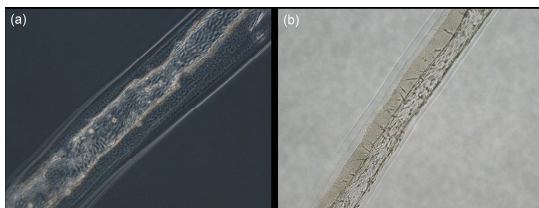
また、2重同軸層流マイクロデバイス以外にもアガロースゲルによる3次元培養チャンバを用いて神経ファイバーを構築する技術を開発した。本技術は神経幹細胞の形状を固定した状態のまま分化誘導できるシステムであり、非常に細く小さい神経ファイバーのハンドリングに適していると考えられる。本成果は現在までに国内学会及び国際学会で発表を行っており、今後学術論文として発表する予定である。



(図3)マウス神経幹細胞ファイバーを作製し、分化誘導することで得られた神経ファイバー。分化誘導時に神経幹細胞ファイバーの直径が細いほど神経細胞の長軸方向への配向性が高い

血管内皮細胞を用いた血管ファイバーの構築

HUVECと平滑筋細胞を3重同軸層流マイクロデバイスを用いてファイバー化する事でHUVECの周囲に平滑筋細胞が存在するような血管ファイバーの構築に成功した(図4a)。さらにHUVEC細胞から作られた血管ファイバーからは血管新生を観察する事が出来た(図4b)。

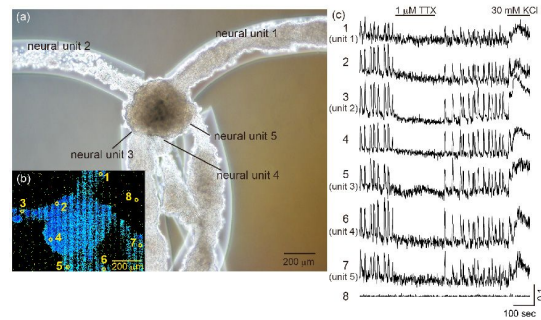


(図4)HUVEC細胞から作製した血管ファイバー (a) 3重同軸層流マイクロデバイスを用いた HUVEC と平滑筋細胞の共培養 (b) 血管ファイバーからの血管新生

神経ファイバーのアセンブリによる3次元立体神経回路の構築

生体内のように複雑な神経ネットワークを構築するため、メートルの長さを有する神経ファイバーを長さ数 mmのファイバーに切断することで神経ユニットとし、それらを接続することで複雑な神経回路を構築することに成

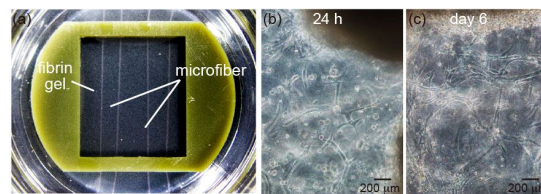
功した。初代大脳皮質細胞(ラット胎児脳由来)、初代海馬細胞(ラット胎児脳由来)、マウス神経幹細胞を用いて、神経ユニットを構築し、チャンバー上でアセンブリすることで、お互いにシナプスを介した神経回路を構築することが可能となった(Advanced Healthcare Materials, 2016, DOI:10.1002/adhm.201700143)(図5)。



(図5)ラット初代大脳皮質培養細胞から作製された5つの神経ユニットをアセンブリすることにより構築された神経回路

神経ファイバーと血管内皮細胞の共培養系の確立と評価

デバイスを用いて神経ファイバーをフィブリンゲル中で固定し、血管内皮細胞とともに培養を行った。共培養後、神経ファイバー周辺部で優位に血管内皮細胞の管腔構造が観察された(図6)。



(図6)神経ファイバーと血管内皮細胞との共培養 (a) 神経ファイバー固定用デバイス中で培養した神経ファイバー、神経ファイバーとHUVECを共培養し、24時間後(b)と6日後(c)の神経ファイバー周辺部での血管網の形成

本研究成果で構築された神経ファイバーと血管ファイバーを用い、血管内皮細胞の管腔構造形成が盛んに生じる共培養系を利用するこ

とで *in vitro* でも生体のような複雑な血管-神経網が構築できると考えられる。

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6件)

Midori Kato-negishi, Hiroaki Onoe, Koji Sato, Shoji Takeuchi, Neural matchsticks for 3D neural network assembly, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2014, Chemical and Biological Microsystems Society proceedings, 査読有, 2014, pp. 992-993.

Midori Kato-negishi, Hiroaki Onoe, Akane Itou, Shoji Takeuchi, Neuronal alignment in a 3D neural microtube, The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, MicroTAS 2015, Chemical and Biological Microsystems Society proceedings, 査読有, 2015, pp. 847-848.

Hiroaki Onoe*, Midori Kato-negishi*, Akane Itou, Shoji Takeuchi (*equal contribution), Differentiation Induction of Mouse Neural Stem Cells in Hydrogel Tubular Microenvironments with Controlled Tube Dimensions, Advanced Healthcare Materials, 査読有, vol.11, 2016, pp. 1104-1111. DOI: 10.1002/adhm.201500903. Epub 2016 Feb 25.

Yuki Matsushiro, Midori Kato-negishi, Hiroaki Onoe, Three dimensional closed microchamber for evaluation of shapes effect on stem cell differentiation, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, μ TAS 2016 Conference

proceedings, 査読有, 2016, pp. 449-450.

Ryo Sato, Hiroaki Onoe, Fiber-shaped artificial tissue with microvascular networks for bottom-up tissue reconstruction, 2017 IEEE 30th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, MEMS 2017, Publisher Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc. 査読有, 2017, pp. 247-250.

Midori Kato-negishi, Hiroaki Onoe, Akane Itou, Shoji Takeuchi, Rod-shaped neural units for aligned 3D neural network connection, Advanced Healthcare Materials, 査読有, DOI:10.1002/adhm.201700143.

[学会発表](計7件)

Midori Kato-negishi, Hiroaki Onoe, Koji Sato, Shoji Takeuchi, Neural matchsticks for 3D neural network assembly, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2014, サンアントニオ, アメリカ.

Hiroaki Onoe, Midori Kato-negishi, Shoji Takeuchi, Differentiation induction of neural stem cell microfibers, Society for Neuroscience 2014, ワシントン DC, アメリカ.

Midori Kato-negishi, Hiroaki Onoe, Akane Itou, Shoji Takeuchi, Neuronal alignment in a 3D neural microtube, The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2015, キョンジュ, 韓国.

Yuki Matsushiro, Midori Kato-negishi, Hiroaki Onoe, Three dimensional closed microchamber for evaluation of shapes effect on stem cell differentiation, The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and

Life Sciences, 2016,ダブリン,アイルランド.

Ryo Sato, Hiroaki Onoe, Fiber-shaped artificial tissue with microvascular networks for bottom-up tissue reconstruction, 2017 IEEE 30th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2017,ラスベガス,アメリカ.

Ryo Sato, Hiroaki Onoe, Microfiber-shaped hepatic tissue with microvascularized network, International Symposium on Micro-Nano Science and Technology 2016, Tokyo, 2016,東京,日本.

佐藤龍, 尾上弘晃, ツインコアシェル型マイクロゲルファイバによる共培養系の構築, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 33 回研究会(CHEMINAS 33), 2016,東京,日本.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

根岸 みどり (NEGISHI, Midori)

東京大学・生産技術研究所・特任研究員

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