

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：31303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560247

研究課題名(和文) ヒト細胞を用いた3次元脳組織のin vitro再構成への挑戦

研究課題名(英文) in vitro reconstruction of 3-dimensional brain tissue using human cells

研究代表者

鈴木 郁郎 (Suzuki, Ikuro)

東北工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90516311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体3次元神経組織モデルを構築する為に、脱細胞脳組織を足場とした3次元培養技術および神経細胞シートの積層化による3次元培養技術の開発を実施した。ブタ脳を用いて作製した脱細胞化脳組織にヒトiPS細胞由来ニューロンを播種したところ、脱細胞組織上および内部に神経ネットワークの形成を確認した。また、脱細胞脳組織の溶液がヒトiPS細胞由来ニューロンの生存率向上、神経突起の伸長を促すことがわかり、脱細胞組織を足場とした培養法の有効性が示された。更に、温度感受性基板を用いることで、機能を保った状態でヒトiPS細胞由来ニューロンシートを剥離できること、および積層化できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop the 3-dimensional culture techniques using decellularized brain tissue and layered neuronal sheet in order to construct a biological brain tissue model. We confirmed that human iPSC-derived neuronal networks were cultured on the prepared decellularized pig brain tissue. We also found that a solution of decellularized brain tissue promote the survival and the elongation of neurites in cultured human iPSC-derived neurons. These results suggest that the culture method using decellularized tissue are useful to 3-dimensional brain tissue model. Furthermore, we found that hiPSC-derived neuron sheet with maintain function can be detached and layered using temperature sensitive substrate.

研究分野：神経医工学

キーワード：ヒトiPS細胞由来ニューロン 3次元培養 脱細胞組織 神経細胞シート

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞の大量培養法や各種細胞への分化技術の発展により、ヒト細胞を用いた疾患メカニズムの解明や創薬分野における創薬スクリーニングおよび毒性・安全性試験への応用が期待されている。ヒト iPS 細胞から分化させた神経系においても、各種ニューロンの作製が進み、再生医療や創薬分野への応用がはじまりつつある。創薬分野でヒト iPS 細胞を用いる利点の一つは、従来の齧歯類で行っていた試験系をヒト細胞で実施することにより「種差の壁」を超える試験が実施できる点にある。しかしながら、ヒト iPS 細胞は培養細胞であり、生体組織環境を再現できていない点、および培養したヒト iPS 細胞由来ニューロンが未成熟である点など、解決すべき問題点がある。これらの問題点を解決する有効な手法として 3 次元培養法が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、2 次元培養下でのヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能的成熟化に要する時間を明らかにすると共に、生体 3 次元神経組織環境を再現するための新しい 3 次元培養法の開発を目的とした。具体的には、脳組織の構造と細胞外基質が豊富に保存されている脱細胞化した脳組織を足場とした 3 次元培養技術および神経細胞シートの積層化による 3 次元培養技術の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 2 次元培養下でのヒト iPS 細胞由来ニューロンの長期電気活動特性の評価

ヒト iPS 細胞由来大脳皮質ニューロン (Axol) を平面微小電極アレイ上に培養し、MED64 細胞外電位計測システム (MED64-basic, Alpha Med Scientific) にて長期自発活動計測および薬理試験を実施した。シナプス機能を確認するために、カイニン酸型グルタミン酸受容体のアゴニストとして、カイニン酸を用い、AMPA 型グルタミン酸アンタゴニストとして 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)、NMDA 型グルタミン酸のアンタゴニストとして D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-AP5) を用いた。また、GABA-A 受容体のアンタゴニストとして Bicuculline を用いた。これらの薬剤を投与し、投与前後の神経活動から、機能的なシナプス機能の評価を行った。得られた波形データの解析は Mobius (Alpha Med Scientific) を用いた。

(2) 脱細胞組織の作製と脱細胞組織を足場とした神経ネットワーク再構築の検討

ブタ脳組織を左右半球に切り分け、スライサーを用いて厚さ約 5cm のスライスを作製した。1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、1% TritonX-100 の界面活性剤が含まれる 0.9% 生理食塩水混合溶液に脳組織を浸漬させ、1 日毎に溶液交換し、5 日間処理した。次に、

細胞内の DNA を分解するために 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase を含む 0.9% 生理食塩水に浸漬させ、2 日毎に溶液交換でし、7 日間処理した。最後に、組織内に残存している細胞成分および油を除去するために 80% ethanol 溶液で浸漬処理した。

脱細胞化の評価の為に、HE 染色を行い、脱細胞化組織内の残存 DNA 量を確認するために、D Neasy Blood & Tissue kit (Qiagen) を使用した。吸光度計 (DU800 BECKMAN COULTER Inc.) にて、抽出された溶液内の DNA 量測定を行った。

脱細胞組織の細胞接着および成長の効果を調べるために、脱細胞組織を溶解し、細胞培養の足場材料とした。ヒト iPS 細胞由来ドーパミンニューロン (ReproCell) を播種し、生存率と神経突起の形態を評価した。

脱細胞ブタ脳組織 (界面活性剤 SDS で作製した脱細胞組織) を足場とした 3 次元培養を行うために、脱細胞組織の Coronal Section を作製し、35mm culture dish 中心部に固定した。脱細胞組織上に 1.0×10^6 cells/ml に調整した細胞懸濁液 (ヒト iPS 細胞由来ニューロン細胞) を 200 μl 滴下し、37°C、5% CO_2 環境下で培養した。培地は 7 日毎に半量交換した。また、共同研究として、東京医科歯科大学生体材料工学研究所物質医工学分野木村准教授と高静水圧処理により作製したラット脱細胞化脳スライス上に、ラット大脳皮質にニューロンを播種し、3 次元培養の評価を行った。脱細胞組織上の細胞培養評価は、免疫化学染色により評価した。

(3) 脱着可能な神経細胞シート法

温度感受性培養基板にヒト iPS 細胞由来中枢ニューロンおよびアストロサイトを 2 から 3 層になるように培養し、培養中に剥離して積層化する手法を試みた。

4. 研究成果

(1) 2 次元培養下でのヒト iPS 細胞由来ニューロンの長期電気活動特性の評価

ヒト iPS 細胞由来大脳皮質ニューロンの 300 日間の自発活動の経時変化を調べた結果、培養 120 日目 (約 4 ヶ月) までは、培養日数が経つにつれて、自発活動の発火頻度が上昇する傾向が見られた。また、培養 70 日目程度までは、個々の細胞が単独で活動している様子が観察され、培養 70 日目以降でシナプス伝播を介した同期的な神経活動が見られた。ラット胎児 (E18) 由来の大脳皮質や海馬ニューロンでは、培養 14 日目で既にシナプス伝播を介した同期神経活動が見られる。ヒト iPS 細胞由来ニューロンのシナプス伝播が見られるまでの培養日数はラットに比べて著しく長いことがわかった。

次に、シナプス機能に対する評価を行った。Fig. 1C は、培養 3~4 ヶ月目のサンプルに各種シナプス関連薬剤を投与した際に得られた同一電極の自発活動波形であり、Fig. 1D は

64 電極で得られた自発活動のラスタプロットを示している。抑制性シナプスの入力を Bicuculline によって阻害することにより、同期バースト発火が顕著にみられた。興奮性シナプス入力の割合が増加した為に起こった現象である。また、カイニン酸投与で活動頻度が上昇し、AMPA 型グルタミン酸受容体のアンタゴニストである CNQX、NMDA 型グルタミン酸受容体のアンタゴニストである D-AP5 の投与により顕著に活動頻度が減少した。これらの結果から、AMPA 型、NMDA 型、カイニン型グルタミン酸受容体および GABA 受容体が電気生理学的に機能していることが確かめられた。また、このシナプス受容体阻害剤による影響は、培養 100 日以前のサンプルに比べ、培養 240 日以降のサンプルで顕著に見られたことから、イオンチャンネルの機能的な成熟化には半年以上の培養が必要である可能性が示唆された。ヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能的成熟化（シナプス伝播）には少なくとも 3~4 ヶ月間の長期培養が必要であることがわかり、早期成熟化を促す培地や細胞培養環境の改良の必要性が示唆された。

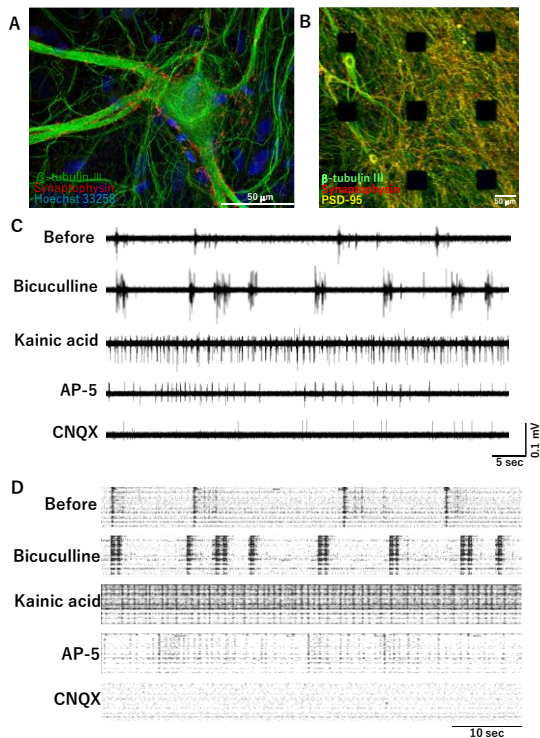


Fig.1 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの長期電気活動特性の評価

(A) 培養 300 日目の免疫染色画像。(B) 平面微小電極アレイに培養した培養 300 日目のヒト iPS 細胞由来ニューロン。(C) 各種薬剤投与による自発活動の変化。(D) 64 電極のラスタプロット。

(2) 脱細胞組織の作製と脱細胞組織を足場とした神経ネットワーク再構築の検討

界面活性剤を用いた脱細胞処理で組織から核を除去できているかを確認するために、HE 染色による評価、および残存 DNA 量を調べ

た。海馬領域においてコントロールおよび 1% Triton-X で処理したサンプルは、細胞体層に多くの核が残存していたが、1% SDS で処理したサンプルでは、細胞体層の核が抜けており、核が存在していた場所に小さな穴が観察された (Fig. 2)。また、大脳皮質領域では、1% SDS で処理したサンプルのみで、第 I 層から第 III 層の核が抜けていることがわかった。次に、海馬、大脳皮質、白質部位における残存 DNA 量を調べた。その結果、コントロールを 100% として、1% Triton-X 処理サンプル、1% SDS 処理サンプルの順に、海馬は 33%、24%、大脳皮質は 84%、27%、白質は 25%、15%、3 領域の合算は 46%、25% の割合で DNA が残存していることがわかった (Fig. 3)。これらの結果から 1% Triton-X 処理よりも、1% SDS 処理の方が脱細胞組織作製に適していることがわかった。

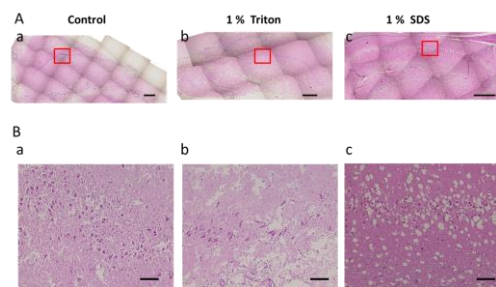


Fig.2 HE 染色を用いた脱細胞化の評価 (A) 海馬の全体像。Scale bar = 1 cm。(B) 海馬の一部 (赤枠) を拡大した画像。(a) Control。(b) 1% Triton。(c) 1% SDS。Scale bar = 100 μ m。

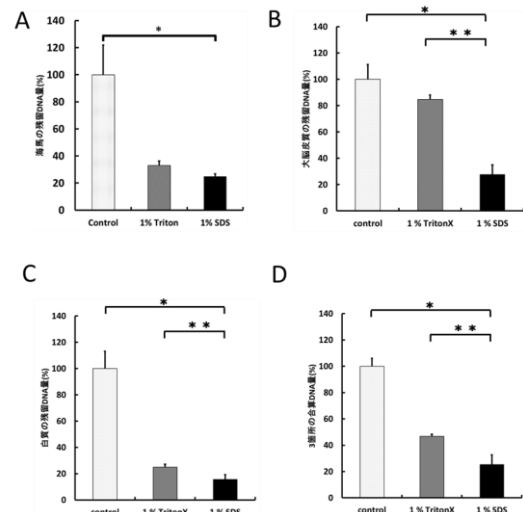


Fig.3 脱細胞化脳組織に残留する DNA 量 (A) 海馬における残存 DNA 量。n = 6。* P < 0.01。(B) 大脳皮質における残存 DNA 量。n = 3。* P < 0.01。** P < 0.01。(C) 白質における残存 DNA 量。n = 3。* p < 0.01。** P < 0.01。(D) 3 箇所合算 DNA 量。n = 15。* P < 0.01。** P < 0.01。

次に、脱細胞組織の細胞接着および細胞成長の効果を調べるために、脱細胞組織の溶解液をコートしたシャーレ上にヒト iPS 細胞由

来ニューロンを培養し、生存率、細胞形態、を調べた。単一細胞での培養と少数細胞でネットワーク形成する培養サンプルを用意し、培養 42 日目の生存率を、Calcein-AM を用いて評価した。播種した細胞数を 100%とした。脱細胞溶液の効果を知るために、(i)PEI/Laminin、(ii)PEI/Collagen gel、(iii)PEI/脱細胞溶解液混合 collagen gel の 3 つの条件を検討した。単一細胞での培養では、(i)2%、(ii)5%、(iii)20%の細胞が生存してた。少数のネットワークの培養では (i)5%、(ii)10%、(iii)50%の細胞が生存してた (Fig. 4)。これらの結果から、脱細胞溶液を混合した Collagen gel は低密度での長期培養が可能であり、従来の培養法に比べて、生存率が上昇することがわかった。

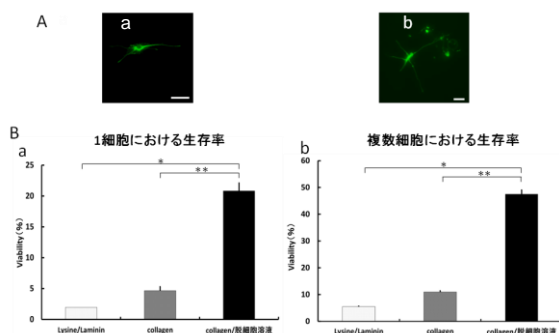


Fig. 4 ヒト iPS 細胞由来ニューロンの生存率 (A) 生細胞マーカー Calcein-AM を用いた培養 42 日目の染色画像。(a) 1 神経細胞。(b) 少数細胞でのネットワーク。Scale bar = 50 μ m。(B) 播種細胞数 1×10^3 cells を 100%としたときの生存率。(a) 1 神経細胞での生存率。n = 20。* P < 0.01。** P < 0.02。(b) 少数細胞ネットワークの生存率。n=20。* P < 0.01。** P < 0.02。

次に、細胞形態の違いを調べるために 1 細胞における神経突起の伸長と突起の数を 4 日目に調べた。

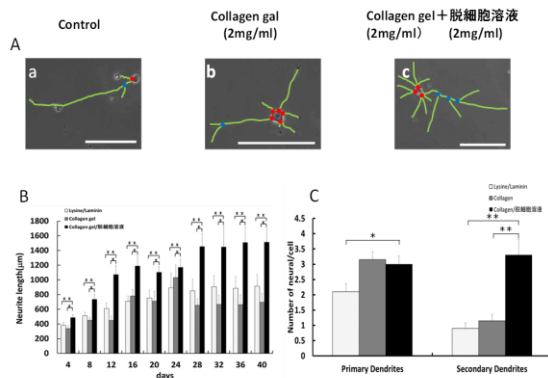


Fig. 5 脱細胞溶液を用いたヒト iPS 細胞由来ニューロンの神経突起の伸長と突起数 (A) 1 細胞で培養した様子。(a) PEI/Laminin コート。(b) Collagen gel。(c) Collagen gel + 脱細胞溶液。Bar = 50 μ m。(B) 培養日数と神経突起の長さ比較。n = 20。* P < 0.01。** P < 0.01。(C) 培養条件に依

した Primary Dendrites (赤●) と Secondary Dendrites (青●) の数。n=20。* P < 0.01。** P < 0.01。

Fig. 5 に示すように、脱細胞溶液を混合した Collagen gel は、有意に突起の伸長を促すことがわかった。また、細胞体から出ている突起の数を Primary Neurite、Primary Neurite から分岐している突起を Secondary Neurite としてカウントした。その結果、Primary Neurite は (i) 2.1 ± 0.2 本、(ii) 3.15 ± 0.2 本、(iii) 3 ± 0.2 本であり、Secondary Neurite は (i) 1.9 ± 0.1 本、(ii) 2.1 ± 0.2 本、(iii) 4.3 ± 0.5 本であった。このことから、脱細胞溶液は神経突起の分岐を促すことがわかった。これらの結果により、脱細胞組織には細胞培養に適した成分が含まれていること、および脱細胞組織を足場とした細胞培養の有効性が示唆された。

次に、脱細胞組織内での 3 次元培養の評価を行った。培養 14 日目に calcein-AM を用いて生細胞の確認を行った結果、脱細胞上での生細胞が確認され、組織内へ移動している様子も観察された (Fig. 6)。また培養 14 日目に免疫化学染色を行った結果、神経突起の形態が確認され、一部で、神経突起の伸長方向が揃っている箇所が見られた。

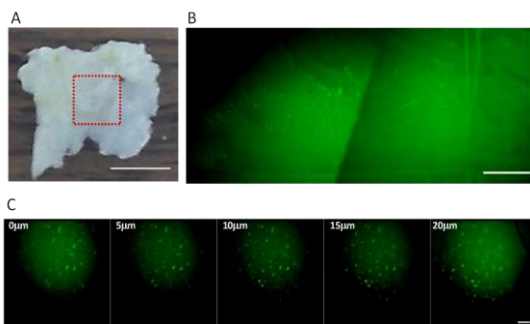


Fig. 6 脱細胞化脳組織に培養したヒト iPS 細胞由来ニューロンの生存確認

(A) ブタ脱細胞脳組織片。赤線部分をくり抜き、シャーレにマウントした。Scale bar = 1 cm。(B) 播種した箇所に細胞が培養されている様子。Scale bar=500 μ m。(C) Z 軸に焦点をずらして観察した様子。Scale bar = 50 μ m。

高静水圧処理により作製した脱細胞化脳上にラット初代神経細胞を培養したところ、海馬、髄質に比べ大脳新皮質に有意に接着し、神経突起が伸長している様子を共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。一部で、脱細胞化脳の構造を反映した神経ネットワークの形成が観察された。

(3) 神経細胞シートによる 3 次元培養法

ヒト iPS 細胞由来ニューロンとアストロサイトを細胞体が 2 ~ 3 層になるように温度感受性基板上で培養し、4 $^{\circ}$ C 下で基板から剥離させた。剥離させた神経ネットワークの機能を確認する為に、細胞外電位記録ができる平面微小電極アレイチップ上に載せたこと

る、ネットワーク全体から自発活動が観察された。また、剥離後の神経シートを免疫染色したところ、シナプス形成の維持も確認された。このことから、機能を維持した状態で神経細胞シートを剥離できることがわかった。また、シートの積層化および折り重ねることで、3次元化ができることが確かめられた (Fig. 7)。

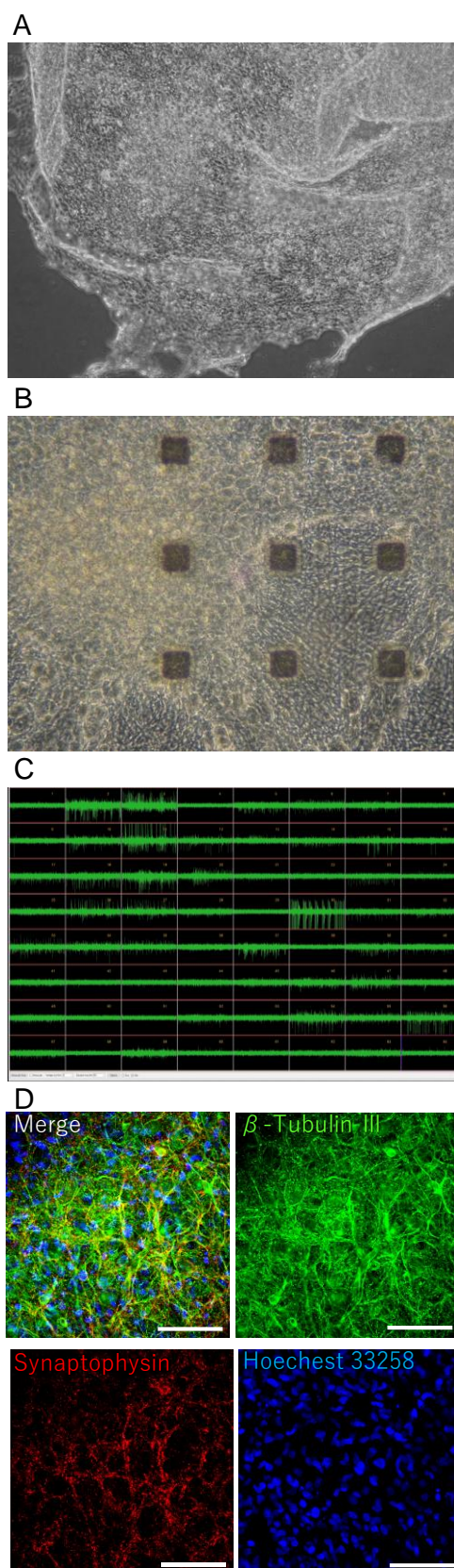


Fig.7 ヒト iPS 細胞由来神経シート (A)培養 119 日目に剥離したヒト iPS 細胞由来神経シート。(B) 剥離した神経シートを平面微小電極アレイにマウントした様子。(C) 神経シートから得られた自発活動波形。(D) 剥離後の神経シートの免疫化学染色画像。

脱細胞脳組織を用いた 3次元培養法の検討を行った。脱細胞組織の成分が生存率の向上と神経突起の伸長を促すことがわかった。成分の同定は今後の課題である。また、脱細胞組織上に神経ネットワークを培養できたことから、脳構造を模倣した 3次元神経組織モデルを構築できる可能性が示唆された。脱細胞組織内部への細胞注入などは今後の課題である。また、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能的な成熟化が脱細胞組織で培養することにより促進されるかなどの機能的なメトリックなどを今後確認する必要がある。

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 2 件)

- (1) Odawara A, Katoh H, Matsuda N, Suzuki I, Physiological maturation and drug responses of human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks in long-term culture., *Scientific Reports*, 6, 26181, 1-14 doi: 10.1038/srep26181.
- (2) Odawara A, Katoh H, Matsuda N, Suzuki I, Induction of long-term potentiation and depression phenomena in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons., *Biochem Biophys Res Commun.*, 469(4), 856-62 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.087.

著者名

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 鈴木郁郎, 創薬・再生医療への展開を目指したヒト iPS 細胞由来神経ネットワークの機能評価技術, 第 16 回 日本再生医療学会総会, 仙台, 2017-3-7
- (2) 木村剛, 猪狩優花, 中村奈緒子, 橋本良秀, 藤里俊哉, 小田原おあい, 鈴木郁郎, 岸田晶夫, 脱細胞化スライス脳を用いた in vitro 三次元脳組織の再構築, 第 16 回 日本再生医療学会総会, 仙台, 2017-3-7
- (3) I. Suzuki, A. Odawara, Y. Igari, N. Nakamura, A. Kishida, T. Kimura, Reconstruction of brain circuit using decellularized brain tissue., 第 1 回 生体医歯工学教頭研究拠点国際シンポジウム, 東京, 2017-11-10
- (4) 木村剛, 猪狩優花, 中村奈緒子, 橋本良

秀, 藤里俊哉, 鈴木郁郎, 岸田晶夫, In vitro 脳再構築を目指した脳 ECM での神経細胞培養, 第 37 回 日本炎症・再生医学会, 京都, 2016-6-16

- (5) A. Odawara, H. Katoh, N. Matsuda, I. Suzuki., Induction of long-term potentiation and depression phenomena in hiPSC-derived cortical neuronal networks., ISSCR International Symposium 2016, Kyoto, 2016-3-22
- (6) I. Suzuki. A. Odawara, H. Katoh, N. Matsuda., Electrophysiological maturation and drug responses in long-term culture of hiPSC-derived cortical neuronal networks., ISSCR International Symposium 2016, Kyoto, 2016-3-22
- (7) A. Odawara, H. Katoh, N. Matsuda, Y. Shi, Ryan Arant, H. Jiko, I. Suzuki., Pharmacological Responses in Cultured Human iPSC Derived Cortical Neurons Using Multi-Electrode Array., Society of Toxicology, New Orleans, USA, 2016-3-13
- (8) A. Odawara, Y. Shi, H. Jiko, I. Suzuki., Long-term electrophysiological activities and drug responses in cultured human iPSC derived neurons., Neuroscience 2015, Chicago, USA, 2015-10-17
- (9) I. Suzuki. A. Odawara, Y. Shi, H. Jiko., In vitro electrophysiological drug testing using human induced pluripotent stem cell-derived neurons. ISSCR 2015, Stockholm, Sweden, 2015-6-24

[図書] (計 2 件)

- (1) 鈴木郁郎, 特集: 創薬とバイオマテリアル ~現状の組織・臓器別モデルと新しい三次元組織構築技術の応用~ 「ヒト iPSC 細胞由来ニューロンの長期培養と薬効評価技術」, バイオマテリアル-生体材料-, 33(3), 224-231, 2015
- (2) 鈴木郁郎. 「iPS 細胞の安全・高品質な作製技術」第 3 章 iPS 細胞を用いた病態解明および医薬品評価技術の開発 第 6 節 “iPS 細胞を用いたニューロンの作製と薬効評価技術”, 139-148, 2016, 技術情報協会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 郁郎 (SUZUKI Ikuro)

東北工業大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 90516311

(4) 研究協力者

木村 剛 (KIMURA Tsuyosi)