

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630088

研究課題名(和文)再生医療技術を利用したファイバー型バイオ神経インターフェース

研究課題名(英文)Construction of the neural interface (neural microfiber bundle) by using the regenerative medicine

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究課題では、移植医療に応用できるように神経細胞と生体適合性材料から形成される直径100-200 μm 、長さ数メートルのバイオ神経インターフェースの構築を目指した。最初にマウスの神経幹細胞から形成される神経ファイバーの安定的な構築方法を確立した。次に、神経細胞ファイバー48本から形成される神経ファイバーバンドルを作製し、脊髄損傷モデルマウスへの治療効果を確認するため移植実験を行った。移植した神経ファイバーバンドル内部の神経幹細胞は、マウス脊髄に生着し術後2ヶ月で神経細胞、グリア細胞、オリゴデンドロサイト細胞に分化していることが確認できた。

研究成果の概要(英文): In this research, we tried to make a neural interface which is formed from a neurons /neural stem cells and a biocompatible material for medical transplantation. We first established a stable construction method of the neural microfibers. Neural microfibers had the structure of the meters length and 100-200 μm diameter. Then, the bundles of 48 neural microfibers were made with collagen solution (collagen bundle), a combination of Na-alginate and amphiphilic chitosan solution (chitosan bundle), or fibrin sealant (fibrin bundle), cultured for 6 days after microfiber formation, and transplanted into the transected mouse spinal cord. The survival rate of the neural stem cells were monitored by in vivo bioluminescence imaging for 6 weeks after transplantation. Immunohistochemistry analysis demonstrated that the transplanted neural stem cells survived and migrated into the host spinal cord. The surviving neural stem cells differentiated into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes.

研究分野：マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ・ナノデバイス マイクロマシン 再生医療 神経移植

1. 研究開始当初の背景

特定の神経細胞や感覚細胞の発する信号を捉え、他の神経組織や筋肉組織、義手や義足といった外部機器に伝えるための神経インターフェースが、失われた生体の機能を再現させるため近年盛んに開発されている。しかし既存の神経インターフェースでは、電極などの異物を生体に移植する必要性が生じ、生体内で長期間安定した機能を保持させることが難しい。そこで申請者は、再生医療技術を利用したファイバー型バイオ神経インターフェースの開発を目指した。申請者はこれまでに、アルギン酸ゲル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開発し、内部に神経細胞を封入、培養する事に成功している。この神経細胞ファイバーにより、電極などの異物を保持せず、神経細胞のみから形成されるバイオ神経インターフェースとして、神経組織間や神経-筋肉などの異組織間に神経信号を伝達する事が可能となるのではないかと考え、本研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

本研究課題では、再生医療技術を利用し、神経細胞と生体適合性材料から形成される直径100-200 μm、長さ数メートルの「ファイバー型バイオ神経インターフェース」を提案する。ファイバー内部では神経細胞が長期間成育でき、神経細胞から数十センチ以上の軸索伸展が可能である。また複数の神経細胞ファイバーを束ねることで、長期間十分な強度と安定的な信号伝達能力を保持し、生体内の異なる領域間を人工的な神経系の信号で結ぶことが可能なシステムを構築する。

3. 研究の方法

①マウス神経幹細胞から安定した神経細胞ファイバーの作成

アルギン酸ゲル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するための2重同軸層流マイクロデバイスをを用いて、内部にマウス神経幹細胞を封入し、Neurobasal-A培地に20 ng/mL bFGF、20 ng/mL hEGF と B27 without vitamin A を含む Neurobasal-Aで培養を行った。培養3-7日後、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。神経ファイバーの直径を変化させた時の分化誘導の傾向について、TUJ1, GFAP, Nestinなどの遺伝子の発現変化をリアルタイムPCRで評価した。また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。

②神経細胞ファイバーバンドルの製作

ガラス棒を用いて、2~48本の神経細胞ファイバーを表面張力を利用し、生体適合性の高い材料(フィブリンやキトサン、コラーゲンPEGなど)で被覆することで神経バンドルを構築した。被覆後の神経バンドル内部の神経幹細胞の増殖をタイムラプスシステムで観察し、分化誘導を免疫組織化学染色で確認した。また、神経ファイバーバンドルのピンセットによる操作性を確認し、ファイバー内部の神経幹細胞の変性の有無を観察した。

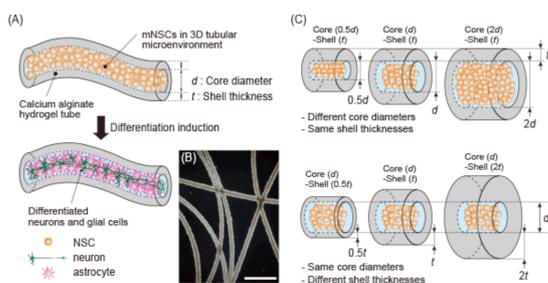
③神経細胞ファイバーバンドルの脊髄損傷モデルマウスへの移植

マウス神経幹細胞ファイバー48本から形成される神経ファイバーバンドルを作成し、脊髄損傷モデルマウスへの移植実験を行った。移植された神経ファイバーバンドル内部の細胞数の変化はフォトンカウントを用いて、2ヶ月間行った。移植2ヶ月後に、移植した細胞の生着率や神経細胞、グリア細胞への分化誘導を免疫組織化学染色により評価した。

4. 研究成果

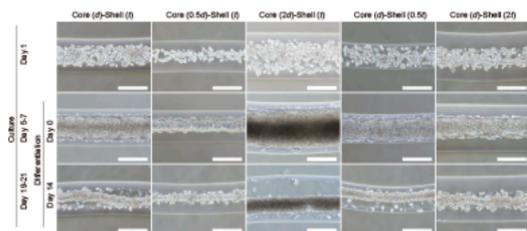
①マウス神経幹細胞ファイバーからの分化誘導による神経ファイバーの作製

2重同軸層流マイクロデバイスを用い、マウス神経幹細胞を封入したコアシェル型のゲルファイバーを作製した。ファイバーの形状により分化誘導される神経細胞ファイバーの特性をリアルタイムPCRと免疫染色法を用いて評価した(図1、2、3)。

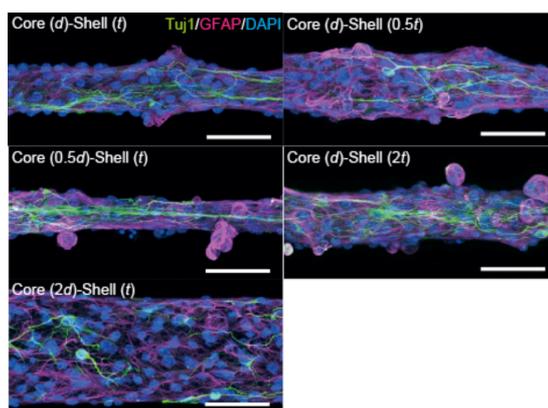


(図1)2重同軸層流マイクロデバイスを用いて構築した神経ファイバーのコア(細胞及びコラーゲン)部分とアルギン酸シェル部分の形状

ファイバーの形状に関わらず、分化誘導後2週間で幹細胞が神経細胞、アストロサイトに分化する事を確認した。一方、ファイバーの形状の違いにより神経細胞への分化の傾向と神経突起の配向性に差が生じることが判明した。神経ファイバーの形状が細いほど神経細胞への分化誘導率が高く、神経突起の配向性も高いことが判明した(図3)。本研究成果は海外の学術論文Advanced Healthcare Materialsに「Differentiation Induction of Mouse Neural Stem Cells in Hydrogel Tubular Microenvironments with Controlled Tube Dimensions」というタイトルで報告した。本研究成果は、今後神経幹細胞だけでなく、他の幹細胞からの紐状組織構築を行う上で基礎的な知見になると考えられる。



(図2)形状の異なる神経ファイバーの内部での細胞増殖と分化誘導後の形状変化

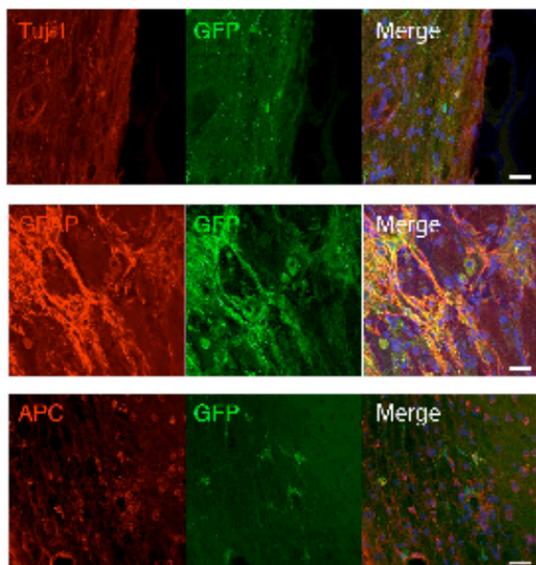


(図3)形状の異なる神経幹細胞ファイバーを分化誘導した後の神経細胞マーカー(TUJ1)とグリア細胞マーカー(GFAP)の免疫組織化学染色。コアが細いものは神経突起が長軸方向に配向している。

③神経細胞ファイバーバンドルの脊髄損傷モデルマウスへの移植評価

最初に移植後の神経信号伝達の安定化のための神経ファイバーを束ねたバンドル構造の構築に取り組んだ。神経細胞ファイバー48本を生体適合性の高い材料(フィブリンやキトサン、コラーゲン、PEG)で被覆し神経バンドルを構築することに成功した。形成された神経バンドル内部で神経幹細胞が神経系の細胞に分化し数週間以上生存する事を確認した。また、コラーゲンバンドル以外のバンドルはピンセットによる保持が可能であり、移植時の取り扱いが容易であることが判明した。これらの生体適合性材料で神経細胞ファイバー48本から形成される神経ファイバーバンドルを作成し、脊髄損傷モデルマウスの治療効果を確認するため移植実験を行った。移植実験に関しては、慶應義塾大学医学部整形外科、中村教授の研究室と共同で研究が行われた。コラーゲンで被覆化した神経ファイバーバンドルが移植後の細胞の増殖率が高かった。また移植した神経ファイバーバンドル内部の神経幹細胞は、術後2ヶ月でマウス脊髄に生着し図5のように神経細胞、グリア細胞、オリゴデンドロサイト細胞に分化することが確認できた。残念ながら、今回の実験ではマウスの運動機能改善は

観察されなかったが、その成果に関しては学術論文 *Journal of Neuroscience Research* に「Neural stem/progenitor cell-laden microfibers promote transplant survival in a mouse transected spinal cord injury model」というタイトルで報告した。



(図5) 脊髄損傷マウスに神経ファイバーバンドルを移植、2ヶ月経過後の移植された神経幹細胞の分化の様子を免疫組織化学染色法により観察した画像。移植された神経幹細胞は、マウス生体内に生着し、神経細胞(TUJ1)、アストロサイト(GFAP)、オリゴデンドロサイト(APC)に分化した。

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 Hiroaki Onoe, Midori Kato-Negishi, Akane Itou and Shoji Takeuchi, Differentiation Induction of Mouse Neural Stem Cells in Hydrogel Tubular Microenvironments with Controlled Tube Dimensions, *Advanced Healthcare Materials*, DOI: 10.1002/adhm.201500903, 2192-26592016, 査読有, (H.O. and M.K.N. contributed equally to this work).

② Keiko Sugai, Soraya Nishimura, Midori Kato-Negishi, Hiroaki Onoe, Shintaroh Iwanaga, Yoshiaki Toyama, Morio Matsumoto, Shoji Takeuchi, Hideyuki Okano, and Masaya

Nakamura: Neural Stem/Progenitor Cell-Laden Microfibers Promote Transplant Survival in a Mouse Transected Spinal Cord Injury Model, *Journal of Neuroscience Research*, vol. 93(12), pp. 1826–1838, DOI: 10.1002/jnr.23636, 2015, 査読有.

[学会発表] (計3件)

① M. Kato-negishi, H. Onoe, S. Takeuchi, Formation of complex 3D neural network by neural microfiber, *Neuroscience* 2014, 30.23, 2014, Washington D.C, USA

② K. Hori, S. Nishimura, M. Kato-Negishi, H. Onoe, Y. Kobayashi, G. Itakura, H. Iwai, S. Takeuchi, H. Okano, Y. Toyama, M. Nakamura, Neural stem/progenitor cells-laden microfibers promote survival of transplants in mouse transected spinal cord injury model, ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 12th Annual Meeting, 2014, Vancouver, Canada.

③ K. Hori, S. Nishimura, M. Kato-Negishi, H. Onoe, Y. Kobayashi, G. Itakura, H. Iwai, S. Takeuchi, H. Okano, Y. Toyama, M. Nakamura, Survival of neural stem/progenitor cells is promoted when cells are loaded in artificial microfibers in mouse complete spinal cord injury model, *Biotronics* 2014, Seoul, Korea.

[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 (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

(2) 研究分担者

尾上 弘晃 (Hiroaki Onoe)

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：30548681

(3) 連携研究者

()

研究者番号：