

再生脳組織構造体誘導における神経機能情報解析

[1] 組織

代表者：木田 泰之

(産業技術総合研究所)

対応者：小椋 利彦

(東北大学加齢医学研究所)

神経機能情報分野)

分担者：

高山 祐三 (産業技術総合研究所)

榎筒 博子 (産業技術総合研究所)

渋谷 陽一郎 (産業技術総合研究所)

研究費：物件費 93,800 円，旅費 305,200 円

[2] 研究経過

近年、iPS 細胞からの網膜組織の樹立やその実用化研究が進められるなど、3 次元組織の構築とその応用が注目されている。また、腸管上皮などでは自家細胞からの組織構造体の培養が可能となり、今後は患者由来の組織構造体を用いた創薬スクリーニングや疾患メカニズムの研究が発展すると期待されている。

我々がこれまでに研究を行ってきた脂肪組織は、多様な細胞種への分化能を有する間葉系幹細胞を多く含み、かつ組織採取が比較的容易という特徴を持っている。現在までにマウス脂肪組織由来の細胞から3次元スフェロイド形成を介してダイレクトに神経細胞を誘導することができている。よって本研究の目的は、我々が作製したスフェロイドに対して適切な撹拌を与えることでスフェロイド内部に分化・発生を制御するオーガナイザー細胞（司令塔細胞）を誘導することであり、本共同研究では、小椋利彦研究室の胎児体外培養装置を用いてマトリゲルなどで包埋したスフェロイドを適切に撹拌し、栄養分や酸素をスフェロイド内部まで浸透させること、これにより神経幹細胞ニッチとしてのスフェロイド環境を整え、神経細胞のインサイド・アウトパターンによる大脳皮質6層構造を *in vitro* の系で再構築することを目指し研究を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。マウス脂肪由来またはマウス線維芽細胞のスフェロイドの撹拌培養を行った。この際、細胞を蛍光色素にてラベル化

し、スフェロイドが形成される様子をタイムラプスイメージングにて観察・撮影した。また、作製したスフェロイドをマトリゲルにて包埋し、長期撹拌培養を行い、神経細胞への分化効率や3次元の構築を検討した。

図：スフェロイドのマトリゲル包埋での撹拌培養の



写真。左；明視野像。右；神経幹細胞および成熟神経マーカーである Nestin 遺伝子の発現を模す GFP 蛍光像。撹拌培養では配列をもって GFP 陽性細胞が内側から外側（矢印方向）に並ぶことが確認できた。

研究打ち合わせは、東北大学加齢医学研究所神経機能情報分野にて、神経組織の3次元化の様子や新しい分化方法についてミーティングを行った。また、本誘導メカニズムの解明に向けて、神経機能情報分野にて、蛋白質2次元電気泳動による機能性因子の同定についての条件検討も行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、スフェロイドを効率よく形成し、マトリゲルにて包埋できる条件を確定した。具体的には、以下のプロトコルである。

- ・培養液を除去したスフェロイド上部にマトリゲルを 50-100 μL 程度を滴下し、気泡が入らないように軽くピペッティングして、スフェロイド全体をマトリゲルで包む。

- ・37°Cでマトリゲルを固めた後、培地を添加して培養を行う。

- ・数日間の培養後、マトリゲルを崩さないように気をつけながら、ピペッティングによりプレート底面からマトリゲルを剥がし、振とう培養用容器に移して振とう培養を行う。振とう条件は、3回転/分間程度が適している。

第 2 に、スフェロイドの培養期間について検討し、以下のプロトコルが最も良いことが分かった。

- ・スフェロイド形成させるため、non-treated 96 well-plate を用い、 5×10^4 cells/well 程度の細胞数で 6 日間程度の浮遊培養を行う。
- ・non-treated 24 well-plate に移して 5 日間程度の浮遊培養を行う。
- ・スフェロイドをマトリゲルで包埋後、培地を添加して 4 日間程度の培養を行う。
- ・プレート底面からマトリゲルを剥がし、振とう培養用容器に移し、1 ヶ月程度の振とう培養を行う。

第 3 に、神経分化によって蛍光を発するマウスを用いて、神経分化の効率と 3 次元化を検討した結果、3 次元化に関しては比較的乏しいことが半明したが、ある程度の整列が認められた (図 1)。ただ、おそらく酸素供給等により細胞が死滅していると考えられるので、今後は酸素や栄養を供給できる血管系組織の構築を視野に入れ、スフェロイドからの細胞分化を検討する。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、加齢医学研究所神経機能情報分野だけでなく、東北大学工学部との交流も活性化できた。再生医療応用の実現化、特に臓器形成・再生という 3 次元化においては医工学連携が必須であり、微細加工など今後の連携が期待できる。

[4] 成果資料

(1) ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency
Yasuyuki S. Kida, Teruhisa Kawamura, Zong Wei, Takahiro Sogo, Sandra Jacinto, Asako Shigeno-Kamitsuji, Eiji Yoshihara, Christopher Liddle, Joseph R. Ecker, Ruth T. Yu, Annette R. Atkins, Michael Downes and Ronald M. Evans
Cell Stem Cell. 2015. *in press*

(2) Methylome, transcriptome, and PPAR(γ) cistrome analyses reveal two epigenetic transitions in fat cells.
Takada H, Saito Y, Mituyama T, Wei Z, Yoshihara E, Jacinto S, Downes M, Evans RM, Kida YS.
Epigenetics. 2014 Sep;9(9):1195-206.

(3) Simple micropatterning method for enhancing fusion efficiency and responsiveness to electrical stimulation of C2C12 myotubes.

Takayama Y, Wagatsuma A, Hoshino T, Mabuchi K.
Biotechnol Prog. *in press*.

(4) Induced Current-Pharmacological Split Stimulation System for Neuronal Networks.
Atsushi Saito, Yuzo Takayama, Hiroyuki Moriguchi, Kiyoshi Kotani, Yasuhiko Jimbo,
IEEE Transactions on Biomedical Engineering.
Vol. 61, No. 2, pp. 463-472, (2014).