「様式３－A」

課題番号 21

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：
髙山 祐三（産業技術総合研究所）
櫛筒 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）

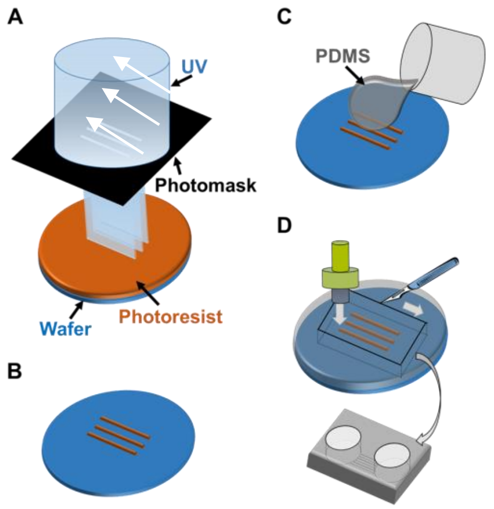
研究費：物件費 16 万 8 千 2 百円，旅費 23 万 1 千 8 百円

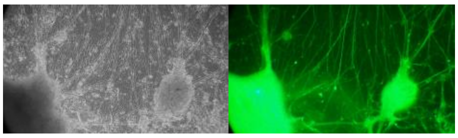
［2］研究経過

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神経細胞を誘導することができている。そこで、このスフェロイドをマトリゲルなどで包埋し、撹拌培養することでスフェロイド内部の神経幹細胞を刺激して脳組織の分化・発生を誘導できないかと考えた。特に今年度においては、工学系の微細加工技術も取り入れることからさらに発展した組織分化誘導を行うことを目標とした。スフェロイド培養後の再生脳組織から延びる神経軸索同士を接続することにより、脳の構造的および機能的障害を再現することができるかもしれない。このような培養技術とデバイスを用いることで、疾患メカニズムの解析や核酸医薬などの創薬スクリーニングを行うことができると期待される。

以下，研究活動状況の概要を記す。昨年度に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。加えて本年度は微細加工技術を利用した新規の細胞培養デバイスを開発し、デバイス上での再生脳組織構造体の誘導を行った。





図：培養デバイスの加工方法の図。スフェロイドを培養する 2 穴の領域を作製する。材料は、通気性の高い PDMS（ジメチルポリシロキサン）を用いた。写真の左；スフェロイド培養後の再生脳組織をデバイスに播種した様子。右；神経細胞特異的蛍光発現により確認した神経軸索。

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、遺伝子改変方法も含め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、東北大学工学部も交えたデバイス作製方法について討議を行った。

［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，これまでのスフェロイド培養方法を改良した。具体的には、昨年度のプロトコルに加え以下の方法を追加した。
・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から５回転／分間程度が適している。特にスフェロイドの大きさを考慮することが必要であった。
・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、15 日から１ヶ月程度の振とう培養を行うのが良い条件であった。

第２に，スフェロイド培養後の培養方法の開発を検討し、適切な培養デバイスを作製することができた。培養に際しての条件は、スフェロイドを培養することができる一定の面積を有すること。また、スフェロイドから伸長する神経軸索を可視化できる工夫があることを想定し、加工の容易な PDMS を材料とした培養デバイスを作製した。実際に作製したデバイスは、２つの直径 8mm の円柱領域と、その間に高さ 5um のトンネル構造を有するものである。細胞体は少なくとも 10um 以上の高さを持つことから、このトンネル構造では神経軸索のみが通過できるようになっている。

第３に，スフェロイド培養後に、前項のデバイス作製方法によって作られた培養デバイスを用いることで、神経軸索の可視化と機能的接続を確認できた。この接続培養によって、電気刺激した再生脳組織のシグナルが他方で伝播する様子が、カルシウムセンサーによる蛍光測定で確認することができた。

（３－２）波及効果と発展性など
本共同研究では、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。特に神経軸索を可視化できるデバイスの開発として形成外科領域への貢献が期待できる。

［４］成果資料

(1)ERRγ is required for the metabolic maturation of therapeutically functional glucose-responsive β cells
Eiji Yoshihara, Zong Wei, Chun Shi Lin, Sungsoon Fang, Maryam Ahmadian, Yasuyuki S. Kida, Tiffany Tseng, Yang Dai, Ruth T. Yu, Christopher Liddle , Annette R. Atkins, Michael Downes and Ronald M. Evans
Cell Metabolism. (in press)
(2)*In vitro* reconstruction of neuronal networks derived from human iPS cells using microfabricated devices.
Yuzo Takayama and Yasuyuki S. Kida.
PLOS ONE (in press)
(3)A novel postoperative immobilization model for murine Achilles tendon sutures.
Yoichiro Shibuya , Yuzo Takayama, Hiroko Kushige, Sandra Jacinto, Mitsuru Sekido, Yasuyuki S. Kida
Lab Anim. (in press)
(4)ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency
Yasuyuki S. Kida, Teruhisa Kawamura, Zong Wei1, Takahiro Sogo, Sandra Jacinto, Asako Shigeno-Kamitsuji, Eiji Yoshihara, Christopher Liddle, Joseph R. Ecker, Ruth T. Yu1, Annette R. Atkins1, Michael Downes and Ronald M. Evans
Cell Stem Cell. 2015. 16(5):547-555. 2015