

課題番号 16

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 27 万 3080 円，旅費 7 万 5920 円

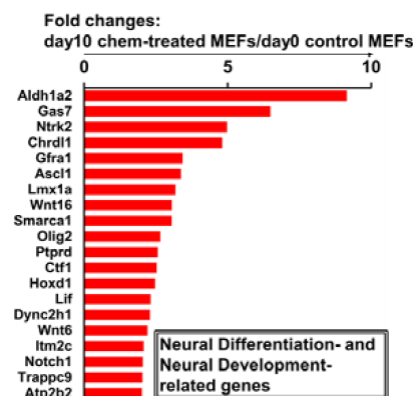
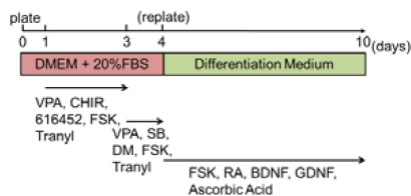
[2] 研究経過

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、攪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。昨年度までに、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実験を行い、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可能となってきた。本年度は、このようなデバイスにマウスおよびヒト細胞のダイレクトリプログラミング技術による培養方法の開発をゴールとし、疾患メカニズムの解析や創薬スクリーニングを行うことができると革新的技術の開発を目標とした。

以下、研究活動状況の概要を記す。

組織構造体を誘導する際の材料として iPS 細胞等の多能性幹細胞を介さない直接誘導法 (ダイレクトリプログラミング法) が提唱されており、迅速な細胞加工法として期待されている。我々はマウス線維芽細胞をモデルとして、低分子化合物のみによる細胞の運命転換を行った。その際、7 種の化合物を使用した。加えて、ヒト線維芽細胞やヒト成体間葉系幹細胞を用いたダイレクトリプログラミング技術の開発も進めた。



図：細胞の加工方法の図。マウス線維芽細胞に 5 種の低分子化合物を加え 3 日間培養を行った。次いで一部の異なる薬剤による 5 種類の化合物によってさらに 1 日間の培養を行い、その後に神経分化培地で 1 週間の培養を行った。下図は培養後の遺伝子発現解析による特徴的変化遺伝子の発現量を示している。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析から、対照群に比べて多くの神経特異的遺伝子の発現上昇が確認できた。

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、神経細胞の機能解析について、染色方法や遺伝子発現、また遺伝子改変方法も含めてミーティングを行った。

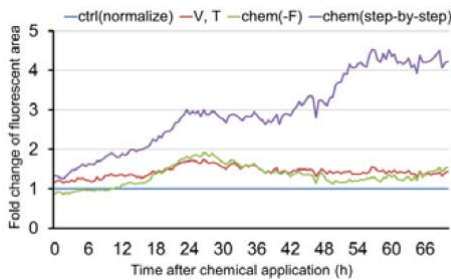
[3] 成果

(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、神経幹細胞マーカーである Nestin 遺伝子の蛍光発現マウスからの初代培養細胞にて、約20種以上の低分子化合物のスクリーニングを行った。その結果、7種程度に絞り込まれ、次いで暴露期間と濃度の最適化を進めた。具体的には以下の方法を行った

・Nestin 遺伝子の Neural-enhancer を組み込まれたトランスジェニックマウスから、胎児線維芽細胞を得た。この細胞で化合物のスクリーニングを行った結果、図に示すように Nestin 遺伝子発現を上昇させる化合物の組み合わせを見出すことができた。

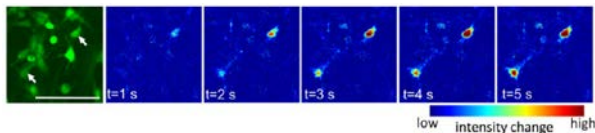


図：化合物添加による Nestin 遺伝子の発現上昇のタイムラプス撮影図による発現上昇度の解析図。異なる組み合わせによる3日+1日間の薬剤添加 (step-by-step) による暴露が神経幹細胞マーカーを最も強く誘導することが分かった。

第2に、ダイレクトプログラミング技術によって誘導した神経細胞について、神経細胞マーカーによる確認を行った。具体的には以下の方法を行った。

・神経細胞の成熟マーカーである Synapsin1、Map2、NeuN による抗体染色を行い、誘導された細胞の蛋白発現および細胞形態から神経細胞であることを確認した。

・神経細胞の機能的評価としてカルシウム応答能の評価を行った。細胞内カルシウム量の変動には Fluo4/AM プローブを用い、電気刺激およびタイムラプス撮影の組み合わせから、誘導細胞の細胞内カルシウム活動を蛍光強度として計測した。



図：細胞内カルシウム活動の計測。カルシウムプローブの蛍光輝度変化を計測し、電気刺激によって神経細胞様の細胞内カルシウム活動を確認することができた。

(3-2) 波及効果と発展性など

継続した3年間の本共同研究では、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も期待できる。

[4] 成果資料

(1) Brief exposure to small molecules allows induction of mouse embryonic fibroblasts into neural crest-like precursors.

Takayama Y, Wakabayashi T, Kushige H, Saito Y, Shibuya Y, Shibata S, Akamatsu W, Okano H, Kida YS.

FEBS Lett 2017.591(4):590-602.

(2) ERRγ Is Required for the Metabolic Maturation of Therapeutically Functional Glucose-Responsive β Cells.

Yoshihara E, Wei Z, Lin CS, Ahmadian M, Kida YS, Little C, Downes M, Evans RM.

Cell Metabolism. 2016. 23(4):622-634

(3) A novel postoperative immobilization model for murine Achilles tendon sutures.

Shibuya Y, Takayama Y, Kushige H, Jacinto S, Sekido M, Kida YS.

Lab Anim. 2016.50(4):308-11

(4) 産業財産権 (特許) : 出願番号 : PCT/JP2016/063006 出願人 : 国立研究開発法人産業技術総合研究所.W I P O出願日 : 2016/04/26.発明の名称 : 神経堤細胞から自律神経系の細胞への分化誘導方法. 発明者 : 高山祐三、木田泰之