

動的力学刺激環境及び包埋ゲル空間によるマウスニューロンネットワークの3次元的形成

Effects of dynamic stimulations on 3-D networking of mouse neurons with gel-embedded culture

○ 登坂 勇紀（山形大院） 金子 暢生（テルモ（株））

小沢田 正（山形大） 馮 忠剛（山形大）

Yuki NOBORISAKA, Yamagata University
Nobuo KANEKO, TERUMO CORPORATION
Tadashi KOSAWADA, Yamagata University
Zhonggang FENG, Yamagata University

Abstract: In this study, the influence of vibration stimulation to cultured mouse neurons (differentiated from mouse iPS cells) is investigated. Mouse neurons form 3-D neuronal networking by gel-embedded culture. The mouse neurons are applied dynamic stimulation by using a vibration stage, and we investigate effect of the stimulation on 3-D neuronal networking. We define ratio of colony area on 0th day and neuronal networking area on 8th day as differentiation-growth efficiency. As a result, it was suggested that interval stimulation is effective for differentiation of mouse neurons and continuous stimulation is effective for growth of them.

Key Words: Mouse iPS cell, Neuron, 3-D neuronal networking, Gel-embedded culture, Dynamic stimulation.

1. 諸言

iPS 細胞(人工多能性幹細胞 : induced Pluripotent Stem Cell)⁽¹⁾は生体内の様々な組織の細胞へと分化できる幹細胞であり, ES 細胞に次ぐ再生医療の切り札として実用化に向けた研究が世界中で行われてきた。しかし, 各細胞への最適な分化誘導法や分化後に生体組織を構築する手法は未だ確立されていない。本研究は, 2 つのアプローチによって前述の手法の確立を目指すものである。

1 つ目のアプローチは, 足場材料を用いた 3 次元培養である。本来, 人体を構成する細胞は 3 次元的な組織を構築しているが, 通常の培養法はディッシュの底面に細胞を播種する 2 次元的なものである。そのため培養環境に違いが生じてしまう。したがって, 本研究では足場材料としてコラーゲンを包埋したゲル包埋培養を導入することで神経細胞の 3 次元包埋培養を行い, 生体内に近い環境で細胞を成長させることを試みた。

2 つ目のアプローチは, 動的力学刺激の付加である。生体内の細胞は, 拍動による振動刺激等, 常に何らかの力学刺激を受けている。物理刺激が細胞の分化コントロールを最適化し得るという報告⁽²⁾もあることから, 本研究では培養中の細胞に動的力学刺激を与え, 細胞の分化や成長にどのような影響が表れるのかを評価した。

2. 実験細胞

本研究ではマウス iPS 細胞 (審査を経て理化学研究所より入手, Cell No. APS0001, Cell name : iPS-MEF -Ng-20D-17, Lot No.013)をマウス神経細胞へと分化誘導させ, 実験細胞として使用した。ヒトではなくマウスの細胞を用いる理由は 2 つ挙げられる。1 つは, ヒト iPS 細胞よりもマウス iPS 細胞の研究の方が先行しているため, もう 1 つは, ヒト iPS 細胞と比べて培養が比較的容易であるためである。

マウス iPS 細胞から神経細胞への分化誘導には SFEBq 法 (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates with quick reaggregation)を用いる。この方法によってマウス iPS 細胞を 5 日間浮遊培養させ, マウス神経前駆細胞へと分化させた後に, コラーゲンゲル内で接着培養を行うことでマウス運動神経細胞へと分化させる。

3. ゲル包埋培養

コラーゲンゲルを 3 次元培養のための足場材料として使用した場合, コラーゲンゲルの透明度の高さから, 培養過程におけるどの時点でも神経細胞の様子を観察することができる。Fig.1 にゲル包埋培養の作製手順を, Fig.2 にゲル包埋培養中のディッシュの概要図を, Fig.3 にゲル包埋培養を行っているマウス神経細胞の培養過程を示す。本研究室の従来の研究では 3 次元的な足場材料としてポリ乳酸多孔質体を用いており, マトリゲルコートをしたポリ乳酸多孔質体上に神経細胞を接着させることで 3 次元培養を可能にしていた。しかしポリ乳酸多孔質体は不透明であるため, 接着させた神経細胞の培養過程における様子はほとんど観察することができなかった。また, ポリ乳酸多孔質体はその連続孔によって 3 次元培養を可能にしているため, 連続孔によって樹状突起の伸展コースが制限されてしまう恐れがある。対して, ゲル包埋培養を導入した場合は, 培養過程でも細胞の全体像をはっきりと確認できる。Fig.3 に示す神経細胞はコラーゲンゲル内部のものであるが, 軸索が放射状に伸びている様子まではっきりと確認できることがわかる。また, コラーゲンゲルにはポリ乳酸多孔質体のような連続孔により, ネットワーク伸展のコースを制限されることもない。これらの観点から, 本研究ではコラーゲンゲルによって神経細胞を包埋し, 3 次元的なネットワークを形成させ, 動的力学刺激の影響の評価を目指していく。

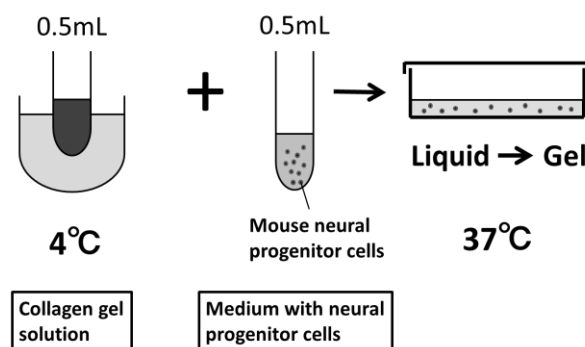


Fig. 1 Process of gel-embedded culture.

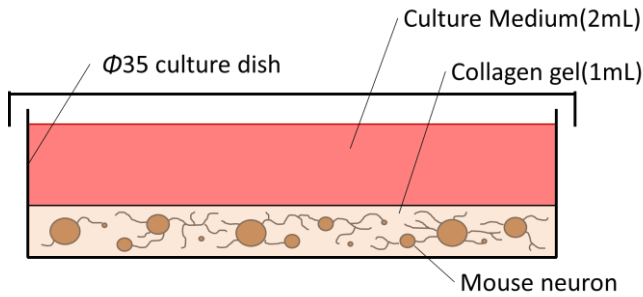


Fig. 2 Schematic of gel-embedded culture

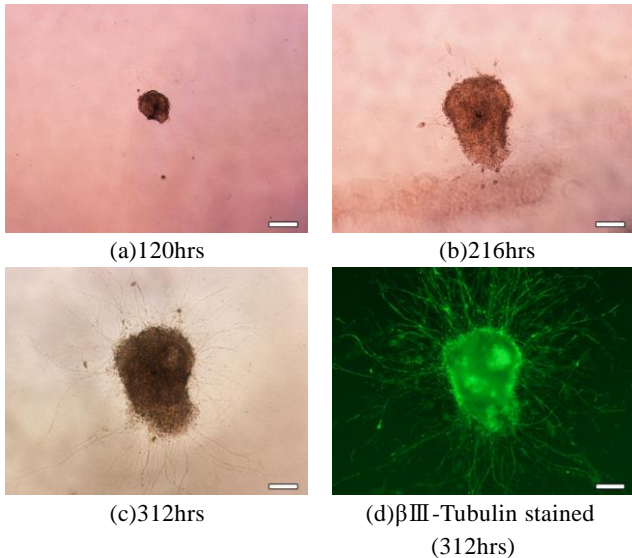


Fig. 3 The change of the morphology with the differentiation from mouse iPS cell to the neuron at the time of adhesion culture. (scale bars 200µm)

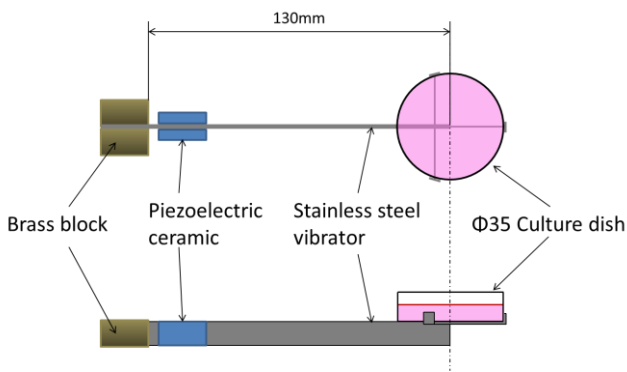


Fig. 4 Construction of the micro vibration stage.

4. 実験システム

動的力学刺激の付加には本研究室で開発された「超小型ピエゾ振動ステージ」を用いる。Fig.4 超小型ピエゾ振動ステージの概略図を示す。この装置を使用することで、ゲル包埋培養中のディッシュを任意の振幅及び周波数で振動させることができる。Fig.5 に実験システムの概要図を示す。振動ステージへの信号入力にはFFTアナライザの信号発信機能を用いた。発信された信号はアンプによって増幅された後、スイッチングハブを介して振動ステージへと入力される。

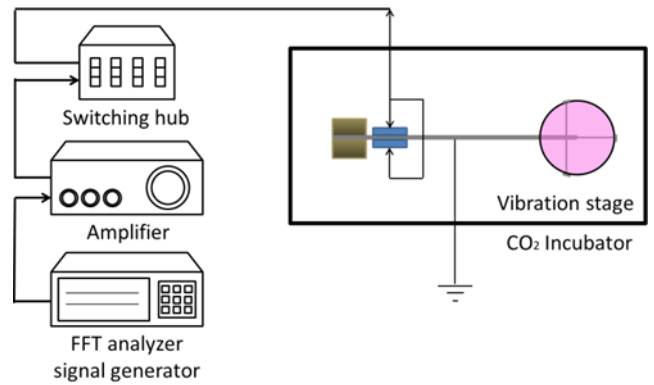


Fig. 5 Schematic diagram of the experimental set-up.

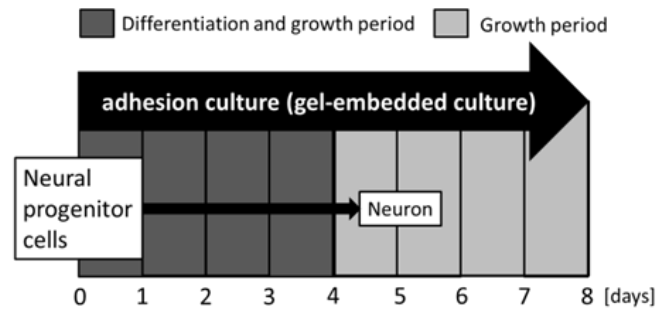


Fig. 6 Differentiation, growth period of mouse neural progenitor cells into neuron.

5. 実験方法

本研究では、5 日間の浮遊培養でマウス iPS 細胞を神経前駆細胞へと分化させた後、コラーゲンゲルによる包埋培養へと移行する。次いで、ゲル包埋培養中のディッシュに振動刺激を付加することによって、動的力学刺激が神経細胞の分化やネットワーク形成に与える影響を評価する。

ゲル包埋培養の全期間は 8 日間とし、それぞれ Fig.7, Fig.8 に示す期間に連続刺激とインターバル刺激を与えた。全振幅及び周波数は Fig.7, Fig.8 の両実験ともに 60 µm, 5Hz の条件を導入している。また、本研究では 8 日間のうち前半 4 日間を分化・成長期間、後半 4 日間を成長主体の期間と想定している(Fig.6)。これは、マウス神経前駆細胞が分化誘導開始から早ければ 5 日程度で運動神経細胞へと分化することに由来している。このことから、本来であれば分化期間を 5 日間と設けるべきであるが、実際の分化期間は細胞によって個体差がある点などを考慮し、分化・成長期間を区切りのいい 4 日間と仮定した。

振動刺激を付加後、Fig.7, Fig.8 に示すタイミングで蛍光染色を施す。ゲル包埋培養中でも神経細胞の様子は観察できるが、神経細胞に特異的に発現するタンパク質 βIII-Tubulin を蛍光染色することによってより明瞭な観察が可能になる(Fig.3)。ここで、βIII-Tubulin が染色されたネットワークの投影面積を A_{β} とし、ゲル包埋培養移行直後に取得した細胞コロニーの初期面積を A_0 とする。 A_{β}/A_0 を算出することで、形成された神経ネットワークの分化・成長率を示すことができる。この手法によって、力学刺激が神経細胞の 3 次元ネットワークの形成に及ぼす影響の評価を試みる。

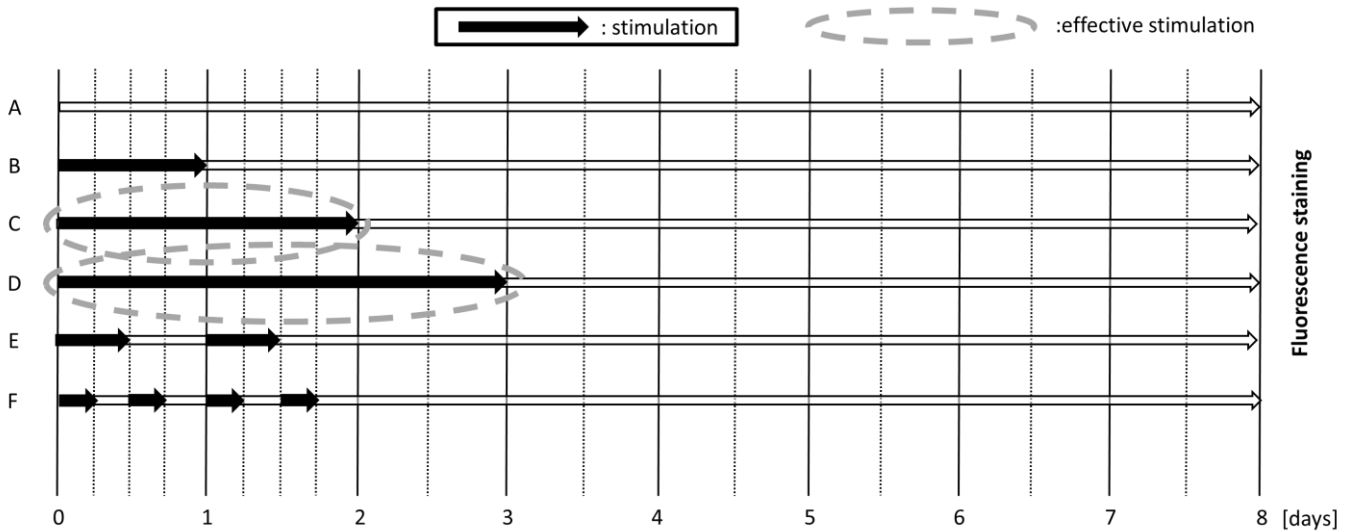


Fig. 7 Experiment procedure of the dynamic stimulation(1).

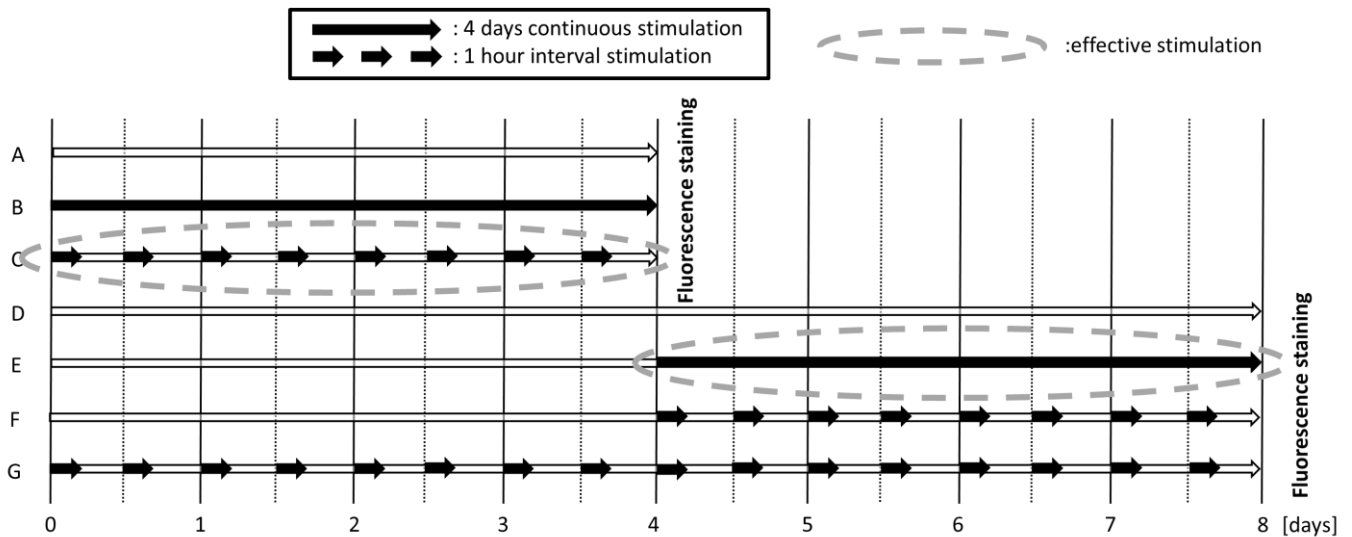


Fig. 8 Experiment procedure of the dynamic stimulation(2).

6. 実験結果及び考察

各実験結果を Fig.9~12 に示す. 縦軸は 5 節で述べたニューロンネットワーク分化・成長率を, 横軸は振動を与えた期間を表している. Fig.9, Fig.10 は Fig.7 の実験, Fig.11, Fig.12 は Fig.8 の実験結果を示している. 実験の結果, 振動刺激を付加したものが static の値を上回り, 振動刺激がネットワークの分化・成長に効果的であったと考えられる条件は, (a) 連続刺激(72 時間), 全振幅 30 μ m, 周波数 10Hz (Fig.7), (b) 連続刺激(48 時間), 全振幅 60 μ m, 周波数 5Hz (Fig.7), (c) 連続刺激(後半 4 日間), 全振幅 60 μ m, 周波数 5Hz (Fig.8), (d) インターバル刺激(前半 4 日間), 全振幅 60 μ m, 周波数 5Hz (Fig.8) の 4 つであった. 効果的であった刺激付加の時間帯を Fig.7, Fig.8 に破線で示す. ただ, 条件(a), (b)に関しては Fig.7 の手法によって行った実験であることに注意する必要がある. すなわち, Fig.7 の実験では刺激を付加しているのは全体のうち始めの 12.5~37.5%のみであり, その後の蛍光染色まで 62.5~87.5%の時間が空

いている. このため, 振動刺激がネットワークの分化・成長に及ぼした影響が埋没してしまい, 条件(a), (b)はデータとして不十分である可能性が残る.

一方, その問題を考慮して行った Fig.8 の実験では, 培養期間内で振動刺激を均等に付加し, 付加が終了した時点でそれぞれ蛍光染色を施した. Fig.13 に Fig.8 の各条件における結果値を static の結果値で正規化したグラフを示す. これによると, 分化・成長期間である前半 4 日間ではインターバル刺激が 15%効果的で, 成長主体の期間である後半 4 日間では連続刺激が 24%効果的であることが示された. 推測となるが, 前半 4 日間において細胞は分化と成長という 2 つのプロセスを経なければならず, 休むことなく振動を与えてしまうと細胞にとって過度なストレスとなり, 結果的に分化や成長を止めてしまうのではないかと考えられる. 対して, 後半 4 日間は分化が完了し成長主体の期間となるため, 前半とは逆に絶え間なく振動を与え続ける方が細胞に良い影響もたらされるのではないかと考えられる.

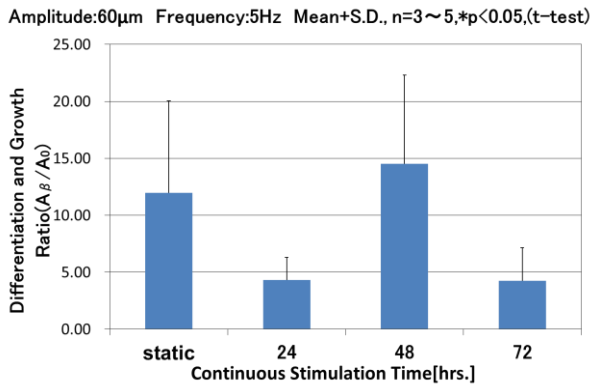


Fig. 9 Relationship between continuous stimulation time and differentiation and growth efficiency.

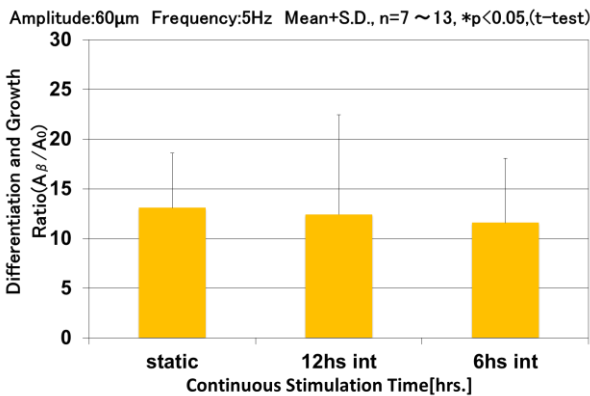


Fig. 10 Relationship between continuous stimulation time and differentiation and growth efficiency.

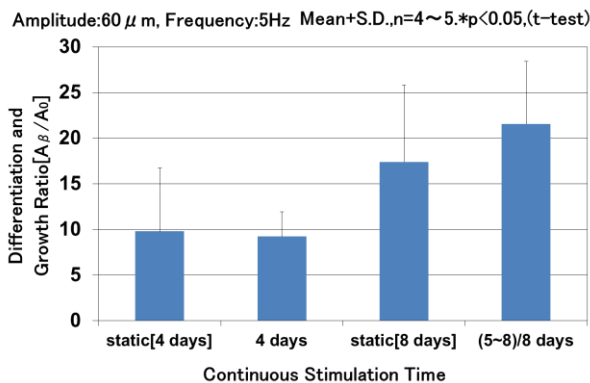


Fig. 11 Relationship between continuous stimulation time and differentiation and growth efficiency.

7. 結言

本研究では、コラーゲンゲル内で3次元的に展開したマウスニューロンネットワークに振動による力学刺激を付加し、神経細胞の分化及びネットワーク形成に与える影響を評価した。以下に得られた知見を示す。

- (1) SFEBq法の接着培養移行時にゲル包埋培養法を導入することで、3次元的な神経ネットワークを構築させる手段を開発した。
- (2) 8日間の培養期間のうち、前半4日間を分化・成長期間、後半4日間を成長主体の期間と想定し、それぞれの期間に分けた力学刺激の付加手法を提案した。

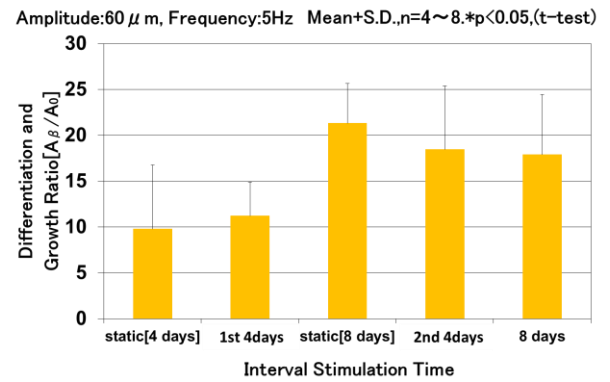


Fig. 12 Relationship between continuous stimulation time and differentiation and growth efficiency.

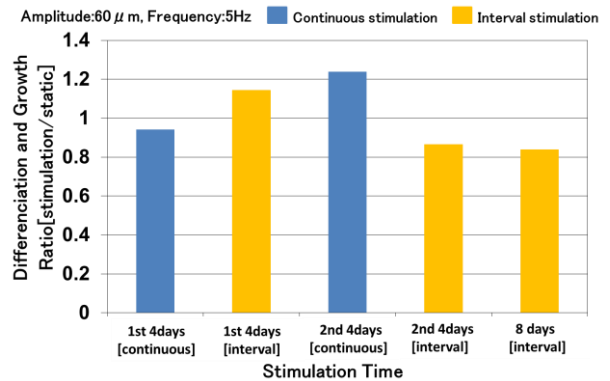


Fig. 13 Relationship between interval stimulation time and differentiation-growth ratio.

- (3) マウスニューロンネットワークを分化・成長させる場合はインターバル刺激が、成長させるのみである場合は連続した振動刺激が効果的であることが示唆された。

8. 謝辞

本研究の一部は科学研究費補助金 24656150, 15K13894, 16H04289の助成により行われた。記して謝意を示す。

参考文献

- (1) Kazutoshi Takahashi, Shinya Yamanaka : “Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors”, Cell 126, (2006), pp.663-676.
- (2) 牛田多加志 : “再生医療における3要素+1要素”, 日本機械学会誌 第117巻 1142号, (2014), pp.12-15.
- (3) Tadashi Kosawada, Tomoyuki Koizumi, Kazuya Ugajin, Zhonggang Feng, Kaoru Goto : “Novel three-dimensional micro vibration actuator for imposing dynamic stimulations to promote differentiation of iPSCs”, Microsystem Technologies 22, (2016), pp.45-56.
- (4) 金子暢生, 大西敬太, 登坂勇紀, 小沢田正, 馮忠剛 : “ゲル包埋培養を用いたマウス神経細胞の3次元ネットワーク形成に及ぼす動的力学刺激の影響” Dynamic and Design Conference 2015 USB 論文集 No.15-7, No.229. 10pp. (2015)