

## ヒト神経細胞コロニー間のニューロンネットワーク形成に及ぼす動的力学刺激の影響評価

## Effects of dynamics stimulation in neuronal networking between human neuronal colonies

○ 大西 敬太 (山形大院) 菊池 駿佑 (ワールドインテック (株))

小沢田 正 (山形大) 馮 忠剛 (山形大)

Keita ONISHI, Yamagata University  
Shunyu KIKUCHI, WORLD INTEC CO., LTD.  
Tadashi KOSAWADA, Yamagata University  
Zhonggang FENG, Yamagata University

**Abstract:** In this study, we investigated the effects of dynamics stimulation in neuronal networking between human neuronal colonies. First, we evaluate the influence of the length of neurites. Comparing the static culture group with the stimulation culture group, it is found that the neurites of stimulation culture group extended. We compared the length of the cell side with the anti-cell side, and found that the length of the cell side extended longer than the other side. Secondly, we evaluated the growth period of neurites. It is observed that neurites grew up actively until 12 hours from the start of adhesion culture and grew up gradually 12 hours after then. Thirdly, we evaluated the number of neurites. Outbreak and growth of the cell side neurites were promoted by the dynamic stimulation. It can be said that dynamic stimulation promotes growth of neurites and neural networking.

**Key Words:** Human iPS cells, Motor neuron, Dynamic stimulation, Neurites, Neuronal networking.

## 1. 緒言

2014年9月, 加齢黄斑変性症の移植手術でiPS細胞から作製された網膜色素上皮細胞シート(RPE細胞シート)の移植手術が世界で初めて行われた。再生医療が大きな一歩を踏み出した事例と言えるが, この移植手術には大きく3つの要素が挙げられる。1つ目はiPS細胞から移植細胞への分化, 2つ目は細胞同士のネットワーク形成, そして3つ目は細胞組織の生着である。1つ目の移植細胞への分化については, 神経細胞に力学刺激を付加することでその成長や分化を促進させる効果が確認されている<sup>(1)</sup>。次のステップへ進むためには2つ目の要素である細胞同士のネットワーク形成に目を向けなければならない。数ある細胞の中でも特に神経細胞は細胞同士の情報のやり取りの頻繁さから, かなり煩雑にニューロンネットワークを展開している。従って, この2つ目の要素は神経細胞にとって非常に重要なファクターであると言える。力学刺激が神経細胞のニューロンネットワーク形成に及ぼす影響を調査することで力学刺激の新たな有効性を見出すことが出来るかもしれない。

そこで本研究では, ヒトiPS細胞から運動神経細胞に分化させた後に, ニューロンネットワークを形成する過程において動的力学刺激を付加し, 神経細胞の成長・分化及びニューロンネットワークの形成に及ぼす影響を評価した。

## 2. 実験細胞

### 2.1 ヒトiPS細胞

本研究は, 実験細胞としてヒトiPS細胞<sup>(2)</sup>(理研BRCより入手, Resource No.RBRC-HPS0002, Resource name:253G1, Lot No.20,21)を用いた。ヒトiPS細胞の培養は, マイトマイシンC処理を施したSNL76/7STO細胞をフィーダー細胞として共培養することで未分化維持培養を行う(Fig.1)。

### 2.2 運動神経細胞への分化誘導

力学刺激を付加するために, 準備段階としてヒトiPS細胞から運動神経細胞へと分化誘導させる<sup>(3)</sup>。分化誘導法はSFEBq法を用いた。SFEBq法は血清や増殖因子など神経分化阻害効果のある成分を含まない培養液に浮遊させて培養する手法である。ヒトiPS細胞培養開始から5,6日経過後,

共培養していたフィーダー細胞を剥離させ, ヒトiPS細胞のみ浮遊培養へと移行させる。分化誘導開始から7日後, 細胞は球状の胚様体を形成させ, 接着培養に移行する。分化誘導開始から31日目に, 大きく成長した細胞を剥離させ, 細かい細胞片に砕き2回目の浮遊培養に移行していく。分化誘導開始から35日目, 再び接着培養に移行し運動神経細胞へと分化誘導させる。iPS細胞から運動神経細胞へと分化誘導させる過程の概略図をFig.2に示す。

## 3. 動的力学刺激付加システムの概要

細胞に刺激を付加する装置として, 本研究室で開発した「超小型ピエゾ振動ステージ」を用いた。この振動ステージは曲げ加工やねじり加工を施していない単純な片持ちはり構造になっており, 安定した水平一軸方向の振動を発生させること, そして大きな振幅を発生させることに焦点をおいて作成された装置である。大きい振幅を出せるように圧電素子をステージ梁部の表と裏の両方に貼り付けたバイモルフ構造をとっている。また, ステージ梁部の長さを調節することで付加可能な振動数を調整することが出来る。振動ステージへの信号入力はFFT Analyzerで任意の振動数及び電圧を定め, Amplifierで電圧を増幅させ, Switching hubを介してインキュベーター内の振動ステージへと信号を伝えていく。実験システム全体の概要図をFig.3に示す。

## 4. 実験方法

本実験では, 2つの神経細胞コロニーがニューロンネットワークを形成する際に動的力学刺激を付加し, 3つの評価方法でその影響を評価した。振動刺激の条件は振動数15Hz, 振幅30 $\mu$ m, 振動方向を細胞コロニー同士の中心を結んだ水平1軸方向, 振動時間を4.6,8時間と設定した。2回目の接着培養を行う35日目以降に, 2つの細胞コロニーを1つのディッシュに播種する。この時, 2つの細胞コロニー間を適切な距離になるようにピペットで誘導しながら接着培養へと移行する。ディッシュに細胞を播種してから約2時間後, 底面に細胞が生着していることを確認し, それぞれの条件で振動刺激を付加した。また, 振動刺激の影

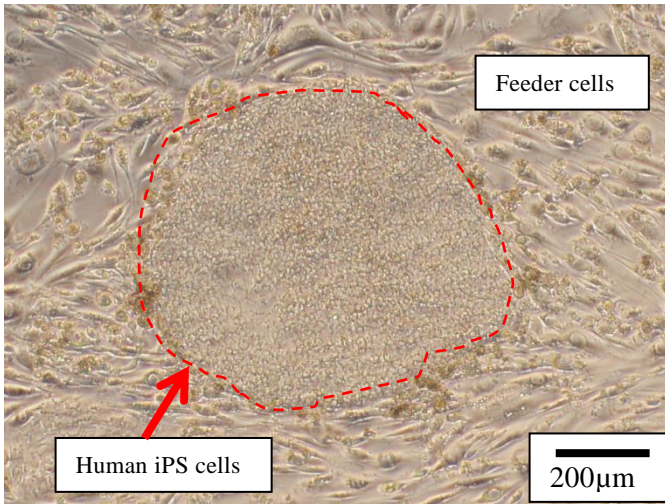


Fig.1 Colony of human iPS cells.

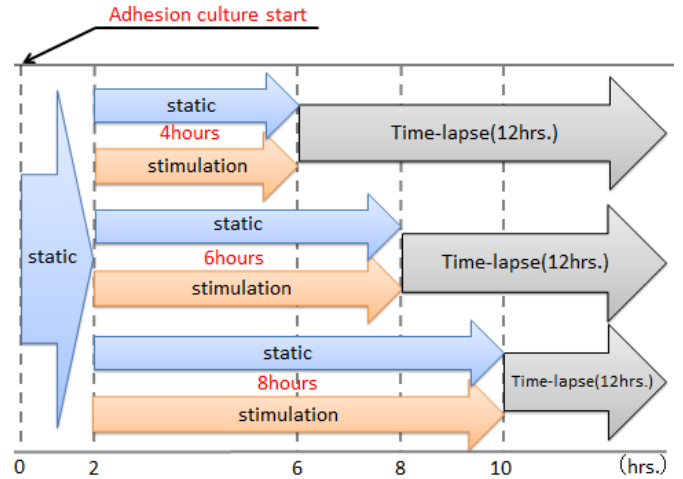


Fig.4 Experimental schedule

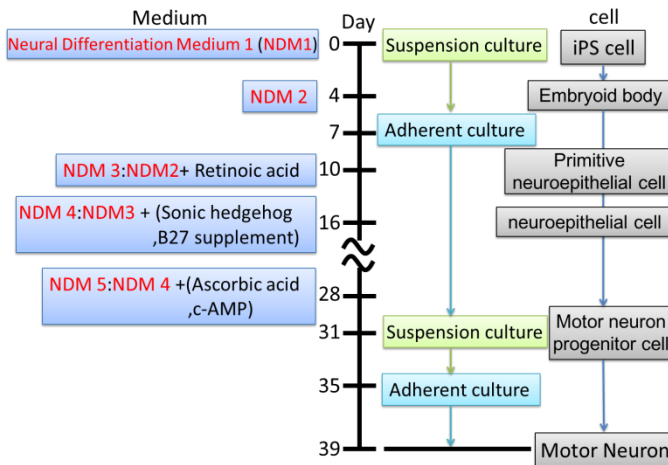


Fig.2 Schematic diagram of the induction of neural differentiation

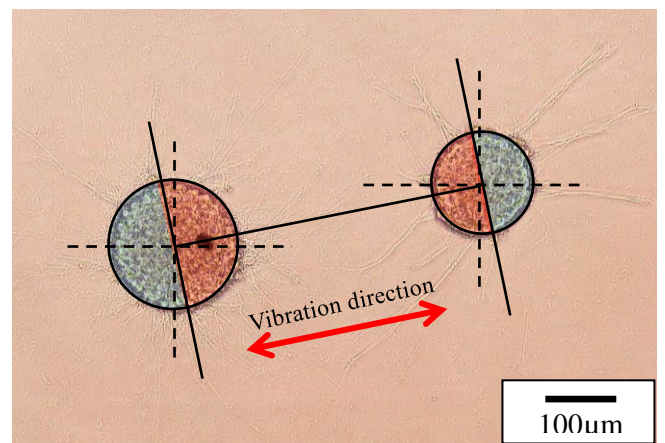


Fig.5 Cell side (red area) and anti-cell side (blue area)

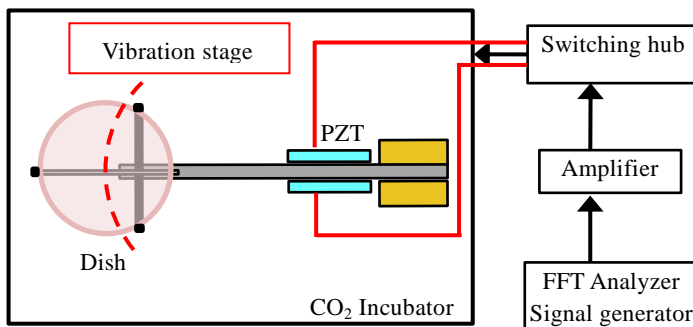


Fig.3 Schematic diagram of experimental set-up

響を確認するために 4,6,8 時間の静置培養を行い同様に評価を行った. 実験のタイムスケジュールを Fig.4 に示す.

5. 評価方法及び実験結果

5.1 神経突起の伸展長さに及ぼす振動刺激の影響評価

5 分間隔で計 12 時間のタイムラプス撮影を行い, 細胞コロニーから伸展している神経突起の伸展長さを 50 分置き

に測定し評価した. またニューロンネットワークの形成に関与して, 神経突起の伸展方向を細胞側と反細胞側の 2 つに分け, それぞれの伸展長さの比較も行った. 細胞側と反細胞側の参照図を Fig.5 に示し, 実験結果を Fig.6~Fig.8 に示す. Fig.6 は細胞側, Fig.7 は反細胞側における伸展長さを静置培養群と刺激付加培養群で比較したものであり, Fig.8 は神経突起の伸展方向に関わらず, 全ての神経突起の伸展長さを静置培養群と刺激付加培養群とで比較したものである. n は検体数, エラーバーは標準偏差を表している.

Fig.6, Fig.7 を見ると, 全ての時間において振動刺激を付加した方が神経突起の伸展が大きくなっていることが分かる. 力学刺激を付加することでニューロンネットワーク形成に関与する細胞側の神経突起の伸展を促進していることから, 動的力学刺激はニューロンネットワークの形成に有効であるということが言える.

次に Fig.8 を見ると, 同様に全ての時間で振動刺激を付加した方が神経突起の伸びが大きいことが読み取れる. 特に 4 時間の振動刺激を付加した際は約 2 倍の伸展を示す結果となった. 次に時間に着目すると, 8 時間培養時が 1 番伸展している結果となった. 培養期間が長くなるほど成長すると思われたが 6 時間培養では 4 時間培養より低い値をとった. このことから神経突起の成長には成長期と停滞期のようなものが存在するのではという疑問が生じた. そこで, 5.2 では神経突起の成長時期について考察を行った.

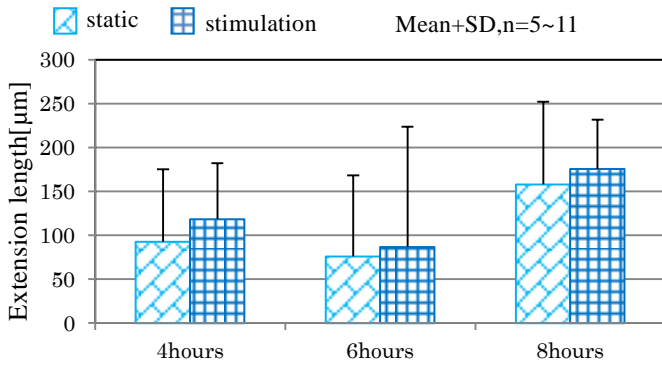


Fig.6 Extension length of cell side neurites

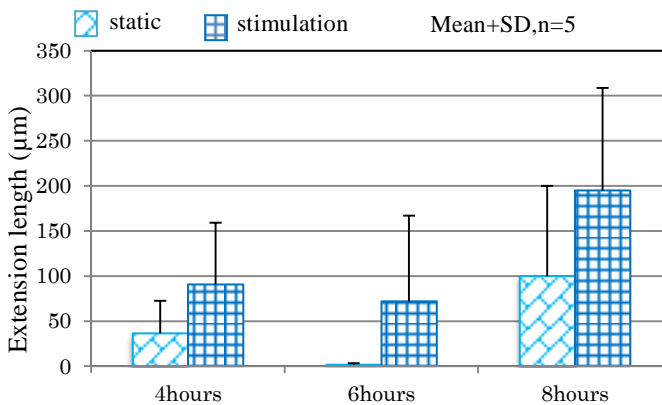


Fig.7 Extension length of anti-cell side neurites

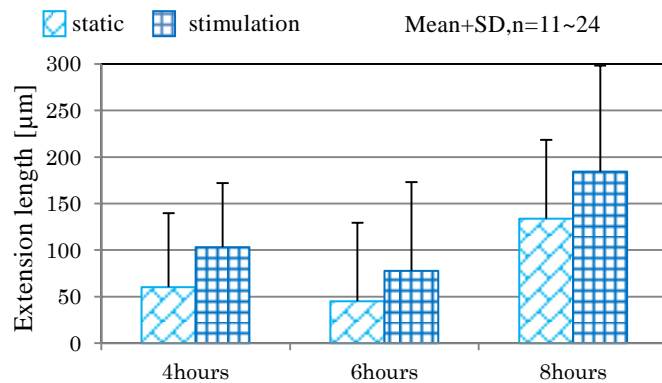


Fig.8 Extension length of all neurites

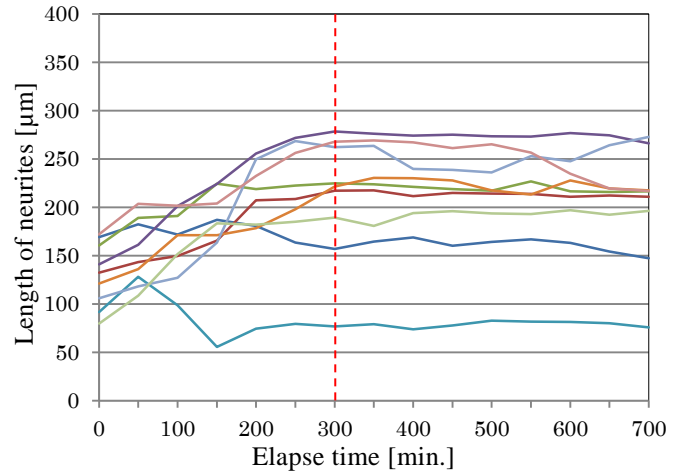


Fig.9 Changes of neurites length (6hours, stimulation)

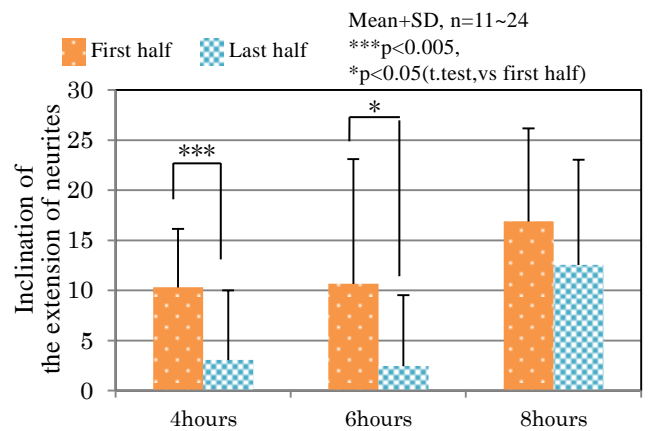


Fig.10 Inclination of extension of neurites (stimulation)

(4hours: first half 0~400min. last half 400~700min./  
6hours: first half 0~300min. last half 300~700min./  
8hours: first half 0~200min. last half 200~700min.)

## 5.2 神経突起の成長時期に関する考察

神経突起の伸展長さについて評価を行う中で、神経突起の伸展には成長期と停滞期があるのではという疑問が生じた。そこで神経突起の伸展長さの推移を見ると、ある時間から神経突起の伸展が緩やかになっている傾向が示唆された。その傾向が顕著に表れている6時間の刺激付加培養群のグラフを Fig.9 に示す。

Fig.9 のグラフを見ると、タイムラプス開始から約 300 分辺りで大半の神経突起の伸展が緩やかになっている傾向が見られる。時間のずれを考慮すると、接着培養開始から約 12 時間までは神経突起は成長期にあり、12 時間を超えると停滞期に入るのではないかと推測した。そこで、伸展の成長期と停滞期の境になっていると思われるタイムラプス開始から 4 時間では 400 分、6 時間では 300 分、8 時間では

200 分で前半と後半に分け、神経突起の伸展の傾きについて評価を行った。得られた実験結果を Fig.10 に示す。Fig.10 は刺激付加培養群の前半、後半を比較したグラフである。n は検体数、エラーバーは標準偏差、また前半と後半の間で t 検定を行い、統計学的有意差が得られたものには\*を示している。

Fig.10 を見ると、4,6 時間において前半の神経突起の成長が非常に大きくなっており、後半との間に 3 倍以上の違いが見られた。8 時間でも僅かではあるが、前半の方が大きい値を示した。加えて 4 時間と 6 時間では有意差も確認する事ができ、神経突起の伸展には成長期と停滞期が存在している可能性が示唆された。

今回の実験では、停滞期に入る接着培養開始から 12 時間後には振動刺激を付加していない。そのため、停滞期に入ってから力学刺激を付加し、神経突起の伸展を停滞させることなく成長させることが出来ないか検証する必要があると思われる。経過時間による神経突起の成長に関する知見が得られれば、伸展が停滞している期間に力学刺激のような人為的アプローチを行うことで停滞期を迎えることなく成長をより促進させる可能性が考えられる。

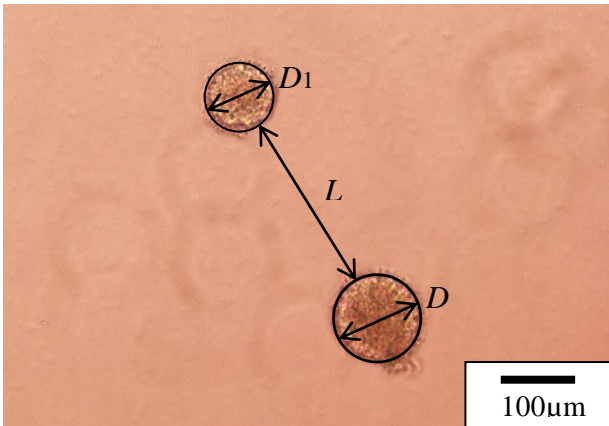


Fig.11 Diameter of initial colony and distance of colonies

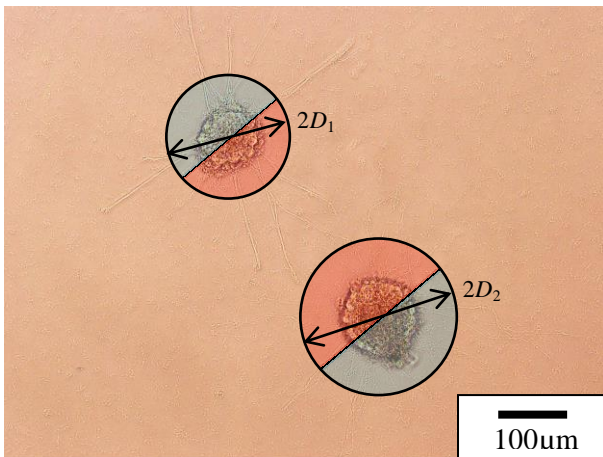


Fig.12 Diameter twice as long as that of initial colonies and the cell side(red area) and the anti-cell side (blue area)

### 5.3 神経突起の発生数及び伸展に及ぼす振動刺激の影響評価

動的力学刺激がニューロンネットワークの形成に及ぼす影響として神経突起の伸展本数に関して評価を行った。接着培養に移行した際の細胞コロニーの直径を  $D$  とし、2つの細胞コロニー間距離を  $L$  とした(Fig.11)。12時間のタイムラプス撮影後、最初に測定した直径の2倍の円を設定し(Fig.12)、その円を超えて伸展していた神経突起の本数  $N$  をカウントした。評価するパラメータは神経突起の本数に加え、環境パラメータとして細胞コロニーの直径  $D$  と距離  $L$  を踏まえた NNN(Neuron networking number)の値を用いて評価を行った。NNN の定義を式(1)に示し、得られた実験結果を Fig.13 に示す。Fig.13 は神経突起の伸展方向に関わらず静置培養群と刺激付加培養群で NNN を比較したグラフである。  $n$  は検体数、エラーバーは標準偏差を示している。また静置培養群と刺激付加培養群の間で  $t$  検定を行い、統計学的有意差が得られたものには\*を示している。

$$NNN = \frac{L}{Dn} \times N \quad (n = 1,2) \quad (1)$$

Fig.13 を見ると、4,6 時間において刺激付加培養群の NNN の値が大きくなっている。しかし、8 時間においては静置培養群の方が高い値をとっており統計学的有意差が示された。ここで伸展長さを示す Fig.8 のグラフを参照すると、刺激付加培養群の方が静置培養群を上回っている。このことから神経突起の伸展本数の促進という観点では静置培養

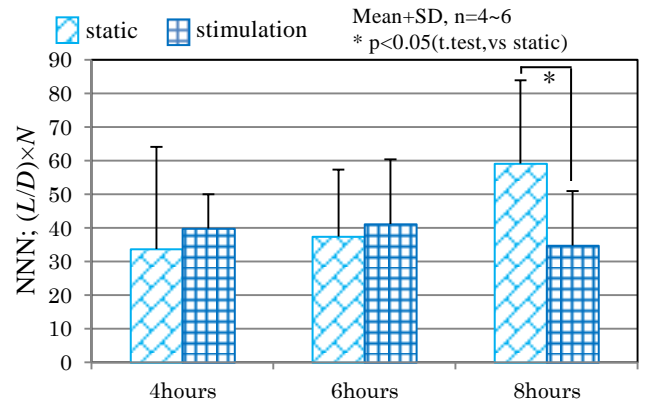


Fig.13 Neuron networking number in all directions

が有効であると考えられ、伸展長さの促進という観点では力学刺激が有効であると考えられる。

### 6. 結言

本研究では、ヒト iPS 細胞から運動神経細胞へと分化誘導させニューロンネットワーク形成過程において振動刺激を付加し、神経細胞の伸展長さ、成長時期及び発生に及ぼす影響を評価した。得られた知見を以下に示す。

- (1) 全ての振動時間において、振動刺激を付加することで神経突起の伸展は促進されることが示唆された。
- (2) 細胞側では振動刺激の付加に関わらず神経突起の伸展は高い値となることが示された。反細胞側では静置培養群の神経突起の伸展は細胞側と比べ低い値となったが刺激付加培養群の伸展は高い値を示した。
- (3) 接着培養開始から約 12 時間までは神経突起は成長期にあり、12 時間以降は停滞期に入る可能性が示唆された。
- (4) 4, 6 時間振動刺激を付加した場合、神経突起の発生数及び伸展は促進され、8 時間では刺激付加培養群との間に有意差が示された。

### 7. 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。記して謝意を表す。

### 参考文献

- (1) Tadashi, Kosawada, Tomoyuki Koizumi, Kazuya Ugajin, Zhonggang Feng, Kaoru Goto: "Novel three-dimensional micro vibration actuator for imposing dynamic stimulations to promote differentiation of iPS cells", *Microsystem Technologies* 22, (2016), pp.45-56
- (2) Takahashi K, Tanabe K, Ohuchi M, Narita M, Chisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S: "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors", *Cell* 131, (2007), 861-872.
- (3) 菊池駿佑, 早坂紘旗, 佐野聖人, 小沢田正, 馮忠剛: "ヒト iPS 細胞の神経細胞への分化及び成長に及ぼす動的力学刺激の影響評価", *Dynamics and Design Conference 2015 USB 論文集*, No.15-7, 6 pp. (2015)