



Title	神経幹細胞の足場としての高分子ハイドロゲルの解析 [全文の要約]
Author(s)	谷川, 聖
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13012号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70824
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。; 配架番号 : 2391
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Satoshi_Tanikawa_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文の要約

神経幹細胞の足場としての
高分子ハイドロゲルの解析

(Analysis of hydrogel function as a scaffold
for neural stem cell)

2018年3月
北海道大学
谷川 聖

学位論文の要約

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 谷川 聖

学位論文題名

神経幹細胞の足場としての高分子ハイドロゲルの解析
(Analysis of hydrogel function as a scaffold for neural stem cell)

【背景と目的】

再生医療とは、本人もしくは他人の細胞・組織を培養等加工し、障害のある臓器の代わりに用いることにより、失われた組織や臓器を修復・再生する医療である。中枢神経系においては、Cajal により成体哺乳類の中枢神経系は損傷を受けると二度と再生しないとされたが、1989年の成体ラットにおける神経幹細胞の同定、さらに1990年代の分離培養法の確立により再生医療の研究を可能とした。神経再生が期待される疾患として脳血管疾患、パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患、外傷に伴う脳挫傷が挙げられる。いずれの疾患日本の認知症患者は2012年の統計で462万人、さらに2025年には700万人に及ぶと推定されている。脳血管疾患の総患者数は117万9,000人に及び、死亡数は10万9,320人で男女共に死因の第4位であり、中枢神経の再生は重要な課題である。

神経再生は失われた神経細胞を、移植細胞、あるいは内在性の神経幹細胞からの新生ニューロンにより置き換えるという理念で研究が進められてきた。パーキンソン病では1987年 Olle Lindvall は胎児黒質領域の神経細胞をパーキンソン病患者の脳内へ移植すると細胞が生着し症状が改善すると報告し、この結果を元に2017年京都大学の高橋らのグループはiPS細胞から誘導したドパミン前駆神経をサルスの脳内へ移植する実験を行い、症状の改善と安全性を示し、臨床応用へ向けて大きく前進した。一方、脳血管障害においては梗塞部位への神経幹細胞の脳内への直接移植、また神経幹細胞の他、自己間葉系幹細胞や自己骨髄単核球の動脈内投与など様々な報告があるものの、未だ十分な機能改善効果を示すには至っていない。幹細胞移植の問題点は、移植した幹細胞は神経への分化が悪く、また分化した神経細胞は移植しても殆どが生着せず死滅してしまうことである。

これらの欠点を克服する新たなアプローチとして、1993年に提唱された tissue engineering の応用が検討されている。Tissue engineering は機能を喪失した組織や、臓器の代替を細胞、scaffold (足場)、成長刺激シグナルを組み合わせて創生することを目的とし、中枢神経領域においては2002年天然由来のコラーゲンゲルにラミニンとフィブロネクチンを合成した足場とマウスの神経前駆細胞を組み合わせた代替物が初めて報告された。その後もさまざまな代替物の作製が試みられているが、未だ十分な機能改善に至る例は報告がない。

細胞にとって足場は重要な役割を持つ。足場の特性として表面電位、親疎水性、硬さなどのファクターがあり、これらは細胞の接着、分化、シグナル伝達の変化に関与するとされている。近年では間葉系幹細胞の骨細胞への分化が基質の電位に制御されることが報告され、分化に関わる因子としても近年検討が進められている。

本研究では表面電位に着目し、神経幹細胞の足場として利用可能な物性を有する基質をハイドロゲルを用いて作成するとともに、その基質が神経幹細胞の分化に与える影響を検討することを目的とした。

【材料と方法】

負電荷を有するモノマーAと正電荷を有するモノマーBを異なる割合で重合させたコポリマーを作製した。ゲルの物性として、ゼータ電位、接触角、含水率、膨潤率、ヤング率を測定した。神経幹細胞はマウス胎児 14 日目の大脳基底核領域から分離培養し、各ゲルにおける神経幹細胞との接着実験を行った。さらに神経細胞の接着が確認されたゲルAとポリスチレン培養皿での単層培養との間の分化の差違について検討した。さらにゲルAをマウス脳内へ注入し安全性を検討した。

【結果】

ゲル表面のゼータ電位はモノマーのモル比に依存して表面電位が変化し、陰性～陽性まで表面電位の異なるゲルを6種類作製した。全てのゲルは親水性であるが、負電荷の多いゲルは特に高い親水性を示した。またいずれもハイドロゲルとしての高い含水率を有した。膨潤率は電荷によりやや差が生じた。硬さは脳よりは硬く、ポリスチレン培養皿よりは軟らかかった。これらのゲル上で神経幹細胞を播種し培養したところ、ゲルAにおいて神経幹細胞の接着、胞体の伸展が観察された。ゲルA上で神経幹細胞を培養するとポリスチレン培養皿と比較して神経細胞分化、アストロサイト分化が亢進し、オリゴデンドロサイト分化が抑制された。アストロサイト誘導のシグナルとしてはゲルA上の細胞でシグナル経路Aの関与が示唆された。オリゴデンドロサイトの減少についてはタンパク質Aの発現低下の関与が示唆された。脳内での免疫応答について、粉碎したゲルAをマウスの脳内へ注入したところ、1、2、4週間後の時点でマウスの行動異常は認めず、組織学的にゲルの周囲に特異的な炎症反応は惹起されなかった。

【考察】

細胞接着の差違について、表面電位と細胞表面の構成物質（細胞膜、膜タンパク質、糖鎖）との間の静電引力による接着、また表面電位と親疎水性によるタンパク質の吸着の変化が関与したと考える。表面電位による直接接着について、多くの細胞は表面電位が負であり、神経幹細胞を含めた多くの細胞は正電荷を有する基質に接着しやすく、ゲルA上に分布した正電荷は神経幹細胞との静電引力による接着を促進した可能性がある。ゲルAに於ける電荷の分布や親疎水性は神経幹細胞の接着に適切な電位であると考え。また、表面電位、親疎水性はタンパク質吸着に関与し、これらは細胞接着に関与すると報告されている。本研究においても神経幹細胞の接着に関わるタンパク質がゲルA上に特異的に吸着した可能性を考えたが pull-down assay では特異的なバンドを検出できず、感度の高い Western blotting による検討が必要であると考え。

分化の変化について、アストロサイト分化に関与するシグナル経路Aの上流因子、またオリゴデンドロサイト分化に関するタンパク質のゲルに対する吸着の差違、またはゲルからの刺激に伴う産生が増加した可能性がある。前述の通り pull-down assay 同定に至らなかった。また基質の硬さは分化に影響することが知られており、神経幹細胞においては基質が軟らかいほど神経細胞へ、硬ければグリア細胞へ分化が進むと報告されている。ゲルAは神経幹細胞にとって硬い基質であるが、より硬いポリスチレン培養皿と比較してアストロサイトへの分化が亢進したことから、分化の変化には硬さ以外の物性である表面電位や親疎水性が関与したものと考え。

ゲルAに対する中枢神経系における免疫応答に関してはゲルの生体内での分解を考慮した長期の安全性について組織学的所見を含め検討する必要があると考え。

アストロサイトの誘導の臨床的な意義について、アストロサイトは神経細胞の保護作用をもつことがこれまで数多く報告されている。例えば、アストロサイトの主要な代謝機構としてグルコース代謝、脂肪酸代謝、アミノ酸代謝があり、これらはそれぞれ虚血状態において神経細胞の保護をもたらす。さらにアストロサイトによるグリア瘢痕は炎症が周囲の脳組織へ及ぶのを防ぎ、アストロサイトの誘導は同時に誘導された神経細胞にとって不可欠と考える。ゲルA上で誘導されるアストロサイトは神経細胞の保護や突起の伸長にどのような影響を与えるか、組織学的検討を含めて評価していく必要がある。脳内にはもと

もと神経細胞と比べてグリア細胞の量が圧倒的に多く、組織を修復する上でどの程度の細胞構成が機能の改善に結びつくかの明らかになっていない。アストロサイト誘導の意義は *in vivo* 実験にて機能改善の面から検討していく必要がある。

【結論】

本研究で作製したゲル A は、神経幹細胞への接着性に富み、突起の伸長や遊走のための構造的な支えを提供した。神経幹細胞は 3 系統の神経系を構成する細胞へ分化し、特にアストロサイト分化が誘導されることが証明された。さらに *in vivo* において過剰な免疫応答を引き起こさず、新たな中枢神経の足場となる素材であると考ええる。