



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	谷川, 聖
Description	配架番号 : 2391
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13012号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70527
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Tanikawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

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。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は中枢神経における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。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。

内因性神経幹細胞は欠損を修復するのに十分な量が動員出来ないことや、幹細胞移植においても移植した細胞の殆どが生着せず死滅してしまう問題点が報告され、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 **scaffold** 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。

Scaffold について、足場依存性細胞の生存や突起の伸展のための構造的な支えを提供する接着性、またタンパク質吸着や硬さに依存した分化への影響など、**Scaffold** の物性と細胞への影響は重要な検討課題である。表面電位は接着性に加え、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2015年に報告され、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、神経幹細胞と接着が可能な基質の表面電位の検討、さら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】

負電荷をもつ官能基のスルホン基 ($-\text{SO}_3^-$) を有するモノマーの 2-Acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS)、正電荷をもつ官能基であるトリメチルアンモニウム基 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3$) を有する (3-Acrylamidopropyl)trimethylammonium (APTMA) を 1:0、5:1、3:1、1:1、1:3 の割合で重合させたコポリマーを作製した。各ゲルの名称はスルホン基の S、トリメチルアンモニウム基の A の比を表し P(AMPS-co-APTMA)-S1A0、S5A1、S3A1、S1A1、S1A3 とした。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 S1A1 ゲルとポリスチレン培養皿での単層培養との間の分化の差について検討した。さ

らに S1A1 ゲル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、S1A0、S5A1、S3A1 は負電位（それぞれ -245.9 mV、-113.6 mV、-76.3 mV）、S1A3 は正電位（100.0 mV）、S1A1 また電荷を持たないモノマーで作製した PDMA ゲルは中性付近の電位（それぞれ -5.9 mV、2.1 mV）となった。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。これらのゲル上で神経幹細胞を播種し培養したところ、S1A1 ゲルにおいて神経幹細胞の接着、胞体の伸展が観察された。S1A1 ゲル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 S1A1 ゲル上の細胞で Stat3 の発現とそのリン酸化が亢進し Jak/Stat 経路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 Olig2 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、S1A1 ゲル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、S1A1 ゲル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。正電荷のアミノ基を有するモノマーの割合増やすと細胞接着は確認されたが、接着したまま死滅したことや、負電荷の多いゲルには神経幹細胞は殆ど付着しなかったことから正電荷と負電荷が 1:1 で混合し、ゼータ電位が中性となる S1A1 ゲルは神経幹細胞の接着に適切な電位であると考えられる。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 S1A1 ゲル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。

分化の変化について、アストロサイト分化に関与する Jak/Stat 経路の上流因子である IL-6 や LIF、またオリゴデンドロサイト分化に関する上流の Sonic hedgehog の S1A1 ゲルに対する吸着の差違が影響した可能性がある。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。S1A1 ゲル (145 kPa) 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、分化の変化には表面電位や親疎水性が関与したものと考える。

S1A1 ゲル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る。

【結論】

本研究で作製した AMPS、APTMA を用いた P (AMPS-co-APTMA)-S1A1 ゲルは、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 scaffold となる素材であると考えられる。