HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13012
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88839
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Tanikawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

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

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

目　次

発表論文目録および学会発表目録 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁

緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・

実験結果 ・・・

考察 ・・・

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の雑誌に投稿中である。

Satoshi Tanikawa, Shingo Semba, Masumi Tsuda, Lei Wang, Mishie Tanino, Yusuke Ishida, Hirokazu Sugino, Jun Suzuka, Shinya Tanaka.
Development of bipolar charge hydrogel for neuronal tissue engineering
The American Journal of Surgical Pathology

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 谷川　聖、仙葉　愼吾、津田　真寿美、王　磊、野々山　貴行、黒川　孝幸、龔　剣萍、田中　伸哉
   高分子ゲルが神経幹細胞へ与える影響
   第 13 回 日本病理学会カンファレンス、2016 年 7 月 29 日–7 月 30 日、神戸

2. Satoshi Tanikawa, Shingo Semba, Masumi Tsuda, Lei Wang, Takayuki Kurokawa, Takayuki Nonoyama, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka.
   Development of novel substrate gel for neural stem cell culture
   The First International Symposium on Advanced Soft Matter: Celebrating the Kick-off of Global Station for Soft Matter, GI-CoRE, Hokkaido University、2016 年 6 月 13 日-6 月 15 日、札幌

3. 谷川　聖、仙葉　愼吾、津田　真寿美、王　磊、黒川　孝幸、野々山　貴行、龔　剣萍、田中　伸哉
   高分子ゲルによる神経幹細胞の分化制御の解析
   第 97 回北海道医学大会病理分科会・第 50 回北海道病理談話会 2017 年 10 月 14 日、札幌

緒言

神経再生

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。1957 年、E. Donnall Thomas が報告した造血幹細胞移植による血液疾患の治療法が幹細胞を用いた再生医療の最も初期の報告とされる[1]。1973 年には Reznikoff CA によるマウス間葉系幹細胞[2]、1981 年 Evans による ES 細胞[3]、さらに 2006 年山中による iPS 細胞が報告され[4]、全身の様々な臓器において幹細胞を用いた再生医学の研究が進められてきた。

中枢神経系において、1928 年 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、その認識は近年変化しつつある。再生医療の鍵となる幹細胞は、自己複製能と様々な細胞に分化する多分化能を持つと定義され、中枢神経においては自己増殖能に加え、脳を構成する神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化能を有する細胞と定義される(図 1)。1989 年の成体ラットにおいて初めて神経幹細胞が同定され[5]、1990 年代には分離培養法が確立された[6, 7]。神経幹細胞の発見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[8]。脳血管疾患の総患者数は 117 万 9,000 人に及び[9]、死亡数は 10 万 9,320 人で男女共に死因の第 4 位である[10]。介護の面から見ると、要介護等の介護が必要になった主な原因のうち脳血管疾患は第 1 位で 17.2%、また第 2 位が認知症で 16.4%である[8]。

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[11]、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カニクイザル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[12]、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[13]、また神経幹細胞の他、自己間葉系幹細胞[14, 15]や自己骨髄単核球の動脈内投与[16]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[17]、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[18]。これらのことから、近年では中枢神経の損傷における機能改善には幹細胞の局所移植による神経新生だけではなく、移植細胞による成長因子分泌，抗炎症作用，免疫調整作用によって、神経保護、神経血管再生を促す[19]といった間接的な効果も検討されている。

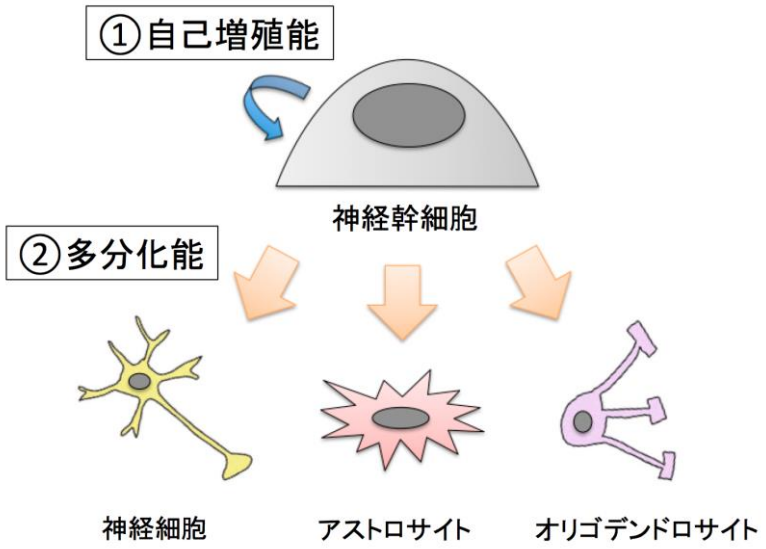


図 1. 神経幹細胞の定義と細胞系譜。神経幹細胞は自己複製能に加え、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化を可能とする多分化能により定義される。

Tissue engineering の概要

1993 年、工学者の Langer R 博士と医師の Vacanti JP により、機能を喪失した組織や、臓器の代替を生命科学、工学といった複数に渡る分野を組み合わせて創出する、tissue engineering という概念が提唱された[20]。細胞、scaffold (足場)、成長刺激シグナルは tissue engineering における 3 要素であり、これらを組み合わせて、周囲の環境の保護、維持、機能の改善を目指すことが目的とされ、これまで軟骨[21]、皮膚[22]、さらには膀胱[23]といった臓器への応用が報告されている。

Scaffold は細胞外基質が有する役割を兼ね備えることが理想とされ、細胞が接着、伸長、遊走するための構造的な支えを提供すること、組織としての硬さなど物理的な特性を提供すること、細胞の活動を制御する生理活性シグナルを

提供すること、成長因子などの生理活性物質を貯蔵すること、血管新生や組織のリモデリングを可能とする分解性の物理環境を与えることなどが重要とされる[24–27]。Scaffold の原料は生体由来成分と無機物質に分けられ、それぞれ利点と欠点がある。生体由来成分は細胞の接着、成長、生存性といった機能性に優れる一方、硬さや構造など物理的な特性を容易に変えられない欠点をもつ[28]。無機物質による scaffold は物理的特性を容易に変えられる一方、接着性などの生体適合性が低い[28]。またいずれの物質も拒絶反応や急性、または長期における不適切な免疫応答を引き起こす可能性がある。様々な特性を有するマテリアルを用いて、前述した細胞外基質の機能を有し、安全性の高い scaffold の開発が求められている。

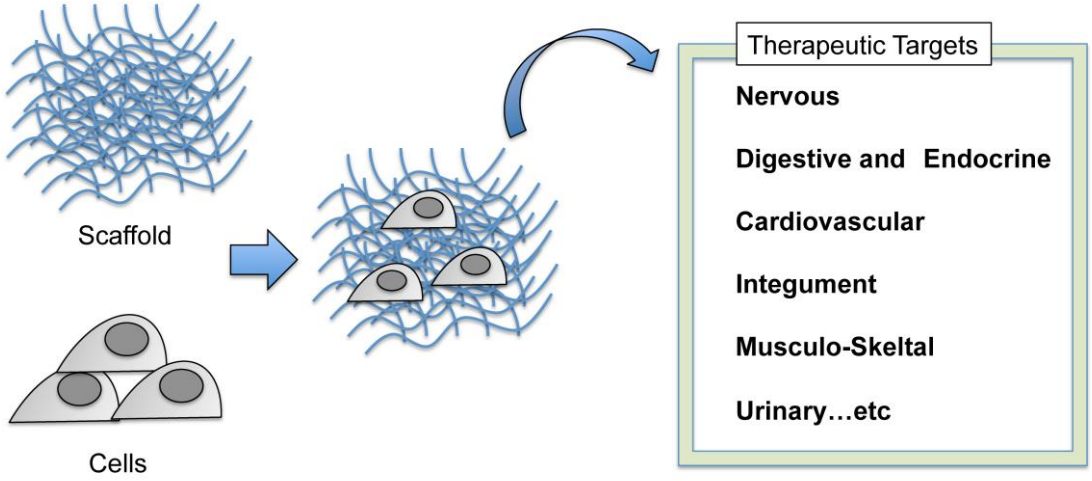


図 2. Tissue engineering の概要。Scaffold と細胞により構成される代替品を組織欠損部位に移植することによる機能の改善を目的とする。

細胞が接着するメカニズムと細胞への影響

Scaffold と細胞との接着性、接着に伴う細胞への影響は最も考慮すべき要因の一つである。動物性細胞は血液細胞を除いてその大部分が足場依存性の接着性細胞であり、浮遊状態では生存できない[29]。また基質と細胞の接着性はメカノストレスに影響を与え、生存や分化に関与する様々なシグナル経路を変化させる[30]。細胞接着には細胞接着分子、基質表面の電荷、親疎水性、硬さなどが複雑に関与するとされている。例えば培養皿にはポリスチレンが使用されることが多いが、ポリスチレン自体は疎水性が高く、殆どの細胞が接着しない。一般的な培養皿は表面にプラズマ表面処理を施し、親水性官能基を導入して適度な親水性、負電荷を持たせる組織培養処理が施された培養皿が用いられる[31]。

それでも接着しない細胞種の場合、フィブロネクチン[32, 33]やラミニン[34]などの細胞外マトリックスをコーティングする手法が用いられる。また動物細胞の細胞膜表面はリン脂質、糖鎖、タンパク質の持つ電荷により総合的に負電荷を帯びており[35]、オルニチン、リジンなどのタンパク質[36]でコーティングすることで細胞接着性を高める手法も用いられている。またスルホン基やアミノ基、カルボキシル基などの官能基により表面電荷や親疎水性を変化しそれにより細胞接着性が変化することも報告されおり[37, 38]、様々な視点から検討されている。

Scaffold としての高分子ハイドロゲル

Tissue engineering における scaffold の材料として高分子ゲルがある。高分子とは分子量が大きい分子で、分子量が小さい分子から実質的または概念的に得られる単位の多数回の繰り返しで構成した構造と定義されている[39]。高分子ゲルとは高分子が化学的、あるいは物理的に架橋を形成し、その内部に液体を含んだものである[40]。液体が水の場合をハイドロゲルと呼ぶ[41]。ジメチルアクリルアミドや N-ビニル-2-ピロリドンを用いて合成したハイドロゲルはソフトコンタクトレンズとして、また高吸収性高分子を用いたハイドロゲルは生理用品、また創傷被覆剤として広く実用化されており[42]。近年では drug delivery system への応用[43]、そして tissue engineering における scaffold としての応用[44]が期待されている。ハイドロゲルはその構造の大部分を水で置換することができ、生理活性物質や酸素などの透過性に優れる点[45]、接着因子や成長因子などを簡単に修飾できる点[46]、そして形状、物性を変化させやすい点[47]から scaffold として有用であるとされている。これまで様々な報告があるものの未だ実用化された例は少ない。また近年では性質の異なる 2 種類の高分子ゲルを重合した double network gel 上にて軟骨再生が起こるといった報告もあり[48]、再生医療を含めた様々な分野でハイドロゲルを用いた研究が進められている。

中枢神経における tissue engineering

細胞移植や内因性の神経幹細胞の活性化だけでは中枢神経の機能改善は限局的で、tissue engineering による新たな戦略が模索されている。

中枢神経領域における tissue engineering は、2002 年 Tate と Shear によって初めて報告された。彼らは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 にマウスの神経前駆細胞を加え、Traumatic brain

injury (TBI)マウスへ移植しするモデルを報告した[49]。天然成分としてはその後、Yu らによる 1 型コラーゲンによる scaffold とラットの神経幹細胞を middle cerebral artery occlusion (MCAO)モデルラットへ移植する報告[50]、Jin らによる Matrigel とヒト由来神経幹細胞を MCAO モデルラットへ移植する報告[51]などがなされて、一定の効果を報告している。一方、合成物質としては poly glycolic acid (PLGA)[52]、self-assembling peptide[51]などがこれまで検討され、これらも一定の治療効果が報告されている。多くの報告があるものの未だ十分な機能改善に至った例は報告がない。

表 1. Neuronal tissue engineering の報告。参考文献 28 より改変。

Author	Scaffold material	Cell source	injury model
Natural materials			
Tate et al. 2002.	Collagen gel + laminin/fibronectin	Mouse NPs	TBI (fluid percussion)
Yu et al. 2010.	Collagen type 1 gel	E14 Rat NPs	Ischemic Stroke (MCAO)
Elias et al. 2012.	Collagen scaffold	Adult hippocampal NPs	TBI (penetrative)
Jin et al. 2010.	Matrigel™	Human NPs derived from ESC line	Ischemic Stroke (MCAO)
Liang et al. 2013.	Hyaluronic acid	C17.2 cell line, ReNcells, and GRPs	None
Wang et al. 2013.	Decellularized and lyophilized Porcine Urinary Bladder	Rat NPs	TBI
Synthetic materials			
Park et al. 2002.	Fibrous PLGA	C17.2	Ischemic Stroke (MCAO)
Bible et al. 2009.	ppAm-PLGA microparticles + fibronectin	MHP36 cell line	Transient stroke (MCAO)
Cheng TY et al. 2013.	$RADA_{16}$-IKVAV self- assembling nanofiber	Rat neuronal progenitor cell line HCN-A94-2	Biopsy punch
Incorporation of growth factor			
Bible et al. 2012.	PLGA + VEGF	Human cell line from 12 wk. old fetus (ReNeuron)	Ischemic Stroke(MCAO)
Skop et al. 2013.	Chitosan-Heparin (genipin crosslinked) + fibronectin + FGF-2	E13.5 Rat NPs	TBI (CCI)

本研究の目的と概要

本研究では神経幹細胞の足場となりうる基質を作製することを目的とし、接着が可能な基質の物性の検討、さらに神経幹細胞の分化に与える影響を検討した。

細胞接着に関わる因子として電荷に着目し、負電荷をもつ官能基のスルホン基 (–SO^{3-})を有する 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 (–$N(CH_3)_3$)を有する APTMA を 1:0、5:1、3:1、1:1、1:3 の割合で重合させたゲルを作製した。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 の比を表し陰性ゲル 1 (S1A0)、陰性ゲル 2 (S5A1)、陰性ゲル 3 (S3A1)、中性ゲル (S1A1)、陽性ゲル (S1A3)とした。ゲル表面のゼータ電位を測定したところモノマーのモル比に依存して表面電位が変化し、陰性ゲル 1 (S1A0)、陰

性ゲル 2 (S5A1)、陰性ゲル 3 (S3A1)は負電位、陽性ゲル (S1A3)は正電位、中性ゲル (S1A1)、電荷を持たないモノマーで作製した対照ゲル (PDMAAm)は中性となった。全てのゲルは概ね親水性であるが、負電荷の多いゲルは特に高い親水性を示した。これらのゲル上に胎生 14 日目のマウス基底核領域から分離し培養した神経幹細胞を播種したところ、中性ゲル (S1A1)において神経幹細胞の接着、胞体の伸展が観察された。また中性ゲル (S1A1)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 Jak/Stat 経路の関与が示唆された。オリゴデンドロサイト分化の抑制については Olig2 の発現低下の関与が示唆された。中枢神経における中性ゲル (S1A1)による免疫応答について、粉砕した中性ゲル (S1A1)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。組織学的には第 1 週で針の刺入による炎症反応を認めたが、特異的な炎症は惹起しなかった。中性ゲル (S1A1)は新たな中枢神経系の scaffold となる素材である可能性が示された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

AMPS	2-Acrylamido-2-methyl-1- propanesulfonic acid
APS	Ammonium persulfate
APTMA	(3-Acrylamidopropyl) trimethylammonium chloride solution
b-FGF	basic fibroblast growth factor
BIS	*N,N'*- Methylenebisacrylamide
DMAAm	*N,N'*- Dimethylacrylamide
DMEM/F12	Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 Dulbecco's
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HBSS	Hanks' balanced salt solution
Jak	Janus kinase
L-Glu	L-Glutamine
MBP	Myelin basic protein
NSC	Neural stem cell
O/F	poly-L-ornithine/ human fibronectin
Olig2	Oligodendrocyte transcription factor 2
PAMPS	poly(2-acrylamido-2-methyl- propanesulfonic acid)
PBS	Phosphate buffered saline
PDMAAm	poly-dimethylacrylamide
PDGFRa	Platelet-derived growth factor receptor alpha
P/S	Penicilin/Streptmycin
Stat	Signal Transduction and Activator of Transcription
SHH	Sonic hedgehog
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine

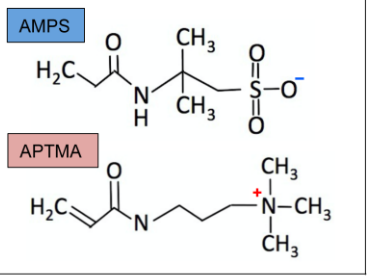
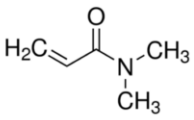
実験方法

1. 高分子ゲルの合成とゲルの名称

電荷の異なる官能基を有する 2 種類のモノマーを準備した。負電荷のモノマーとして 2-Acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS)、正電荷モノマーとして(3-Acrylamidopropyl)trimethylammonium (APTMA)、また電荷を持たないモノマーとして N,N-Dimethylacrylamide (DMAAm)を使用した。これらのモノマー溶液は順に 2-Acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid sodium salt solution 50 wt. % in H_2O (製品番号 655821, Sigma, St. Louis, USA)、(3-Acrylamidopropyl) trimethylammonium Chloride 74-76% in Water (製品番号 A1493, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)、N,N-Dimethylacrylamide 99%, contains 500 ppm monomethyl ether hydroquinone as inhibitor (製品番号 274135, Sigma)を購入し使用した。また架橋剤として N,N'-methylene-bis-acrylamide (製品番号 146072, Sigma)を使用した。アクリルアミドの総量 1 mol/l となるように AMPS、APTMA をそれぞれ 1:0、5:1、3:1、1:1、1:3 の割合で混合した溶液を作製した。また DMAAm もアクリルアミドの総量が 1mol/l となるように調整した溶液を作製した。これらのモノマー溶液に BIS 4 mol%、重合開始剤の Ammonium persulfate (APS) 0.4 v/v、N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) 0.1 v/v となるように混合し、1 mm 幅に固定した 2 枚のガラス板の間へ流し込み、室温で一晩静置しラジカル重合させ高分子ゲルを作製した。ゲルの名称、AMPS、APTMA の割合、化学構造式、電荷配列のイメージを図 3 に示す。ゲルの正式名称を *p*(AMPS-co-APTMA)とし、各ゲルの名称はモノマーの比をスルホン基の S、トリメチルアンモニウム基の A で表した陰性ゲル 1 (S1A0)、陰性ゲル 2 (S5A1)、陰性ゲル 3 (S3A1)、中性ゲル (S1A1)、陽性ゲル (S1A3)とする。陰性ゲル 1 (S1A0)、陰性ゲル 2 (S5A1)、陰性ゲル 3 (S3A1)は負電荷の割合が多く、陽性ゲル (S1A3)は正電荷の割合が多い。また中性ゲル (S1A1)と PDMAAmはいずれも中性であるが中性ゲル (S1A1)は両性、対照ゲル (PDMAAm)は電荷を持たない中性である。作製した中性ゲル (S1A1)の写真を図 4 に示す。ゲルは未重合のアクリルアミドを除くため、大量の PBS 中に浸し、1 日 1 回 PBS を交換し、1 週間洗浄した。洗浄後、各々の培養皿の大きさにゲルを切り抜き、120℃、20

分オートクレーブにて滅菌した。細胞培養前にはPBSを培養液に置換し、37℃、5% CO_2の条件下で一晩維持したものを使用した。

表 2 作製したゲルの情報。
上段: 本文中における各ゲルの名称、表面電位、AMPS と APTMA の割合、電荷配列のイメージ、化学構造式。下段: PDMAAm の表面電位、電荷配列のイメージ、化学構造式。AMPS: 2-Acrylamido-2-methyl-1- propanesulfonic acid、APTMA: (3-Acrylamidopropyl)trimethylammonium、PDMAAm: poly- dimethylacrylamide。PDMAAm は陰性対照として用いた。

ゲルの名称 (表面電位)	AMPS: APTMA 比率	電荷配列のイメージ	化学構造式
陰性ゲル1 (S1A0、負電位)	1:0		
陰性ゲル2 (S5A1、負電位)	5:1		
陰性ゲル3 (S3A1、負電位)	3:1		
中性ゲル (S1A1、中性:両性)	1:1		
陽性ゲル (S1A3、正電位)	1:3		
対照ゲル (PDMAAm、中性)			

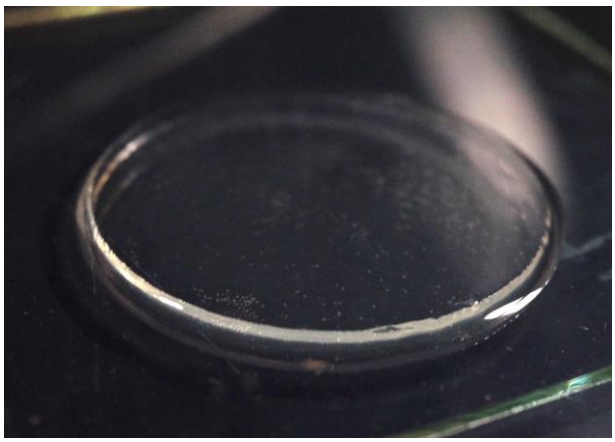


図 3. 作製した中性ゲル (S1A1)を直径 6 cm の型でくり抜いたもの。

2. ゲルの物性の検討

1) ゼータ電位

ゲル表面の電位として Zeta potential を測定した。Zeta potential and submicron particle size analyser (Delsa Nano HC, Beckman Coulter, USA)を

使用した。流路を有する石英ガラス上に PBS に浸したゲルを乗せ、流路内に polystyrene-latex のコアと hydroxypropyl cellulose の外殻で構成された standard particle suspension (500–600 nm in diameter; Otsuka Electronics, Japan)を PBS で 300 倍に希釈した粒子液を流し、石英上とサンプル上の粒子の速度変化を laser-Doppler electrophoretic light scattering (ELS)で測定し、Zeta potential を算出した（図 4)。

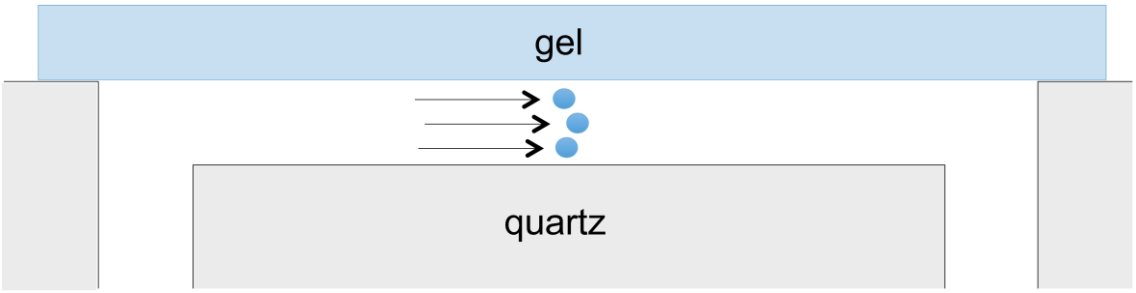


図 4 ゼータ電位の模式図。
ゲルと石英の間に標準粒子を流し、それぞれの表面電位による粒子速度の変化を測定する。石英の表面電位は既知であり、その値からゲルの表面電位を相対的に算出する。

2) Energy Dispersed X-ray Analysis

ゲル上の元素分布を走査型電子顕微鏡、energy dispersed X-ray analyser (JSM-6010LA JOEL, Tokyo, Japan)を用いて測定した。凍結乾燥させたゲルのサンプルを真鍮の台座に Carbon の両面テープを用いて固定し、表面を Au-Pd イオンで sputtering した（E-1010 ion sputter, Hitachi, Japan)。走査型電子顕微鏡と EDX mapping はそれぞれ電子銃の加速電位を 20 kV、spot size を 71、作動距離を 10 mm で施行した。

3) 接触角

PBS との親和性の検討のため、接触角の測定を行った。それぞれのゲルをセルロースワイパーで十分に拭き、ゲル上にチップを付けて 2.0 µl の PBS を 1 滴下し、水滴の辺縁の角度を測定した。測定には contact angle recorder (Dropmaster300, Kyowa Interface Science Co., Ltd., Japan)を使用した（図 5)。

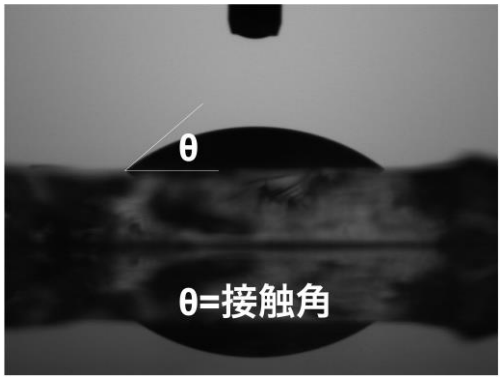


図 5 Contact angle の模式図。
ゲル表面に PBS を滴下しゲル面と水滴の形成する角度を計測した。

4) 含水率

PBS に浸した状態のゲルの重量 (wet wt)を乾燥させたゲルの質量 (dry wt)で引いて、wet wt で割った数値を 100 倍しゲルの質量中の水分の質量パーセントを算出した。ゲルの乾燥は drying by the moisture balance (MOC-120H, Shimadzu Co., Japan)を用い 120℃で 30 分加熱して作製した。含水率の計算には以下の式を用いた。

$$W_{H20}\,[wt\%] = (w_{wet} - w_{dry})/w_{wet} \times 100$$

5) 膨潤度

ゲルの膨潤度を測定した。PBS に浸したゲルの厚さ (t)の 3 乗を作成時のゲルの厚さ (t as prepare=1)の 3 乗で割り、ゲル体積の膨潤度を計測した。以下の式を用いた。

$$Q = (t_{swollen})^3/(t_{as\ prepared})^3$$

6) ヤング率

ゲルの圧縮試験によるヤング率を測定した。測定には tensile-compressive tester (Tensilon RTC-1310A, Orientic Co., Japan)を使用した。10 mm 大にくり抜いたゲルは PBS で平衡化した。圧縮速度は 0.5 mm/min でそれぞれのゲルについて 3 回計測した。

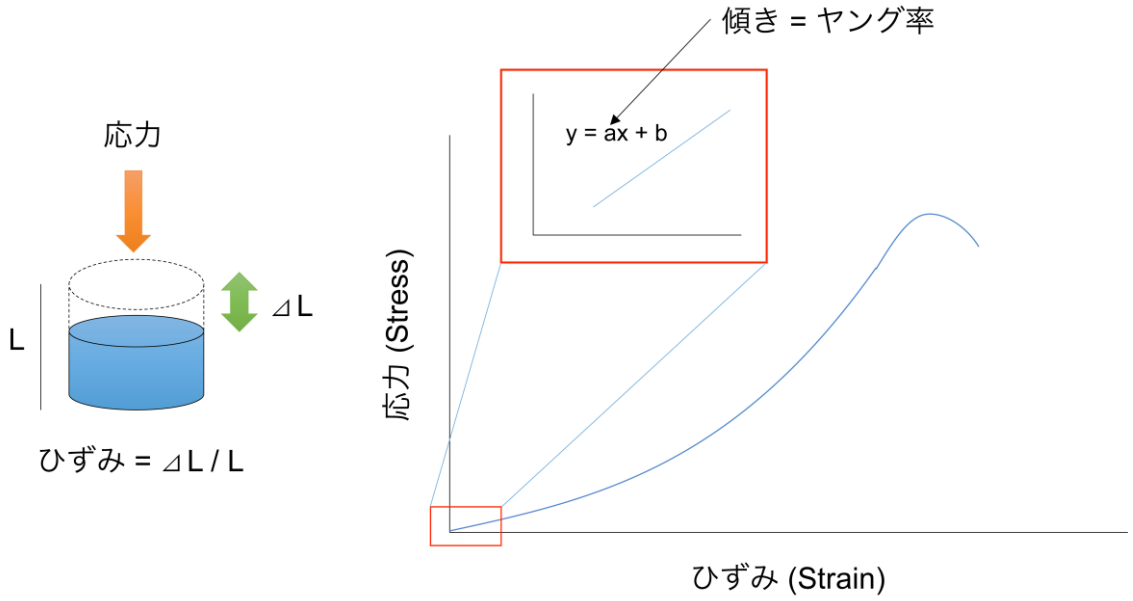


図 6 ヤング率の概要図。
応力-ひずみ曲線における初期の傾きをヤング率として測定した。L: 物質の長さ、⊿L: 長さ変化の差分。応力: Pa。

3. 神経幹細胞の分離

動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。既報のプロトコールに順じ [53, 54]、神経幹細胞を胎児マウスから分離した。Jcl: ICR マウス (CLEA Japan,Inc., Tokyo, Japan)の妊娠 14 日胎児マウスの大脳基底核を分離し、DMEM/F12、1% N2 supplement、P/S、L-Glu を添加した培養液（以下 N2 培養液)中で懸濁させ、500 × g、3 分間遠心した。沈殿したペレットは再び同様の培養液中で懸濁させ、poly-L-ornithine (Sigma)、human fibronectin (Peprotech)でそれぞれコーティングした Polystyrene dish (以下 O/F coated dish)上に撒き、37℃、5 % CO2 の条件下で 5 日間単層培養した。培養液には初日に bFGF を 20 ng/ml、翌日からは毎日 10 ng/ml 添加しした。増殖した細胞は培養液を除いた後 HBSS 10 ml を入れ 2 分間インキュベートし、pipetting にて回収、バンバンカーを用い−80℃にて保存した。

4. 細胞培養、細胞回収

分離培養した細胞を 2 種類の培養液中で培養した。1 つは N2 培養液、もう一つは DMEM/F12 に 1% FBS、P/S、L-Glu を添加した培養液（以下 1%FBS 培養液)を用いた。1×10^5 cells/ml の密度で細胞を播種し 1、3、7 日後に回収した。

培養液は7日目の回収分のみ3日目の時点で交換した。Real-time PCR、Western blotting に使用した細胞は、培養液を除いた dish に 0.1% BSA を加えた PBS を 1 ml 入れ、シリコンゴムのスクレーパーにて剥がした後、1.5 ml チューブへ移して 500 × g、4℃で沈殿させることで回収した。

5. 細胞接着実験

O/F coated dish、陰性ゲル 1 (S1A0)、陰性ゲル 3 (S3A1)、中性ゲル (S1A1)、陽性ゲル (S1A3)、対照ゲル (PDMAAm)上に、分離した神経幹細胞を 1×10^4 cells/ml の密度で播種し、1、3 日後に形態観察した。また培養液を捨てた後トリプシン-EDTA を加え pipetting にてゲル上の細胞を回収した。回収した細胞を 500 × g、3 分間遠心し、沈殿した細胞をトリパンブルーで処理した後 hemocytmeter を用いて細胞数をカウントした。細胞数は培養面積 1 mm^2 で標準化した。

6. Pull- down アッセイ

神経幹細胞の細胞膜画分は以下の手順で調整した。培養皿上の細胞を PBS で１回洗浄後、スクレーパーで剥離し PBS に懸濁した後、マイクロチューブに回収した。500 × g、3 分間遠心し上清を捨てた後、沈殿した細胞の重量を測定した。沈殿に 10 倍重量の低張細胞可溶化液（10 mM NaCl、20 mM Tris-HCl （pH 7.5)、5 mM EDTA、50 mM NaF、1 mM sodium orthovanadate、complete protease inhibitor cocktail (Roche、Switzerland))を加え、27G の注射針をつけたシリンジで 20 回出し入れすることで細胞を破砕した。これを 10,000 × g で 10 分間遠心して得られた上清をさらに 125,000 × g で 1 時間超遠心した。得られた沈殿を可溶化バッファー（0.5% TritonX-100、20 mM Tris-HCl （pH7.5)、150 mM NaCl、2 mM EDTA、10% glycerol、50 mM NaF、1 mM sodium orthovanadate、complete protease inhibitor cocktail)に良く懸濁したものを細胞膜画分とした。Pull- down アッセイは以下の手順で行った。中性ゲル (S1A1)、陰性ゲル 1 (S1A0)、および対照ゲル (PDMAAm)の粉砕は、27G の注射針をつけたシリンジに 3 回通すことで作製した。100 µl (タンパク質重量として約 100 µg)の細胞膜画分に 20 µl の粉砕ゲルを加え、ローテーターを用いて 4°C で一晩穏やかに混合した。混合物に 1 ml の洗浄バッファー（0.5% TritonX-100、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl)を加えて軽く混合した後、500 × g で 5 分間

遠心して上清を取り除いた。これを 5 回繰り返すことでゲルに結合しなかったタンパク質を除去した。ゲルと同体積の 2 × サンプルバッファー (0.125M Tris-HCl (pH 6.8)、10% 2-mercaptoethanol、4% SDS、0.01% bromophenol blue (BPB)、20% glycerol)を加え 98°C で 5 分間加熱することでゲルに結合したタンパク質を溶出した。溶出したタンパク質溶液 SDS-PAGE にて電気泳動し、PlusOne Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare, Little Chalfont, England)を用いてゲルを染色した。

7. 中性ゲル (S1A1)の脳内注入

中性ゲル (S1A1)を 30G の注射針に通るまで粉砕し、PBS と粉砕中性ゲル (S1A1)を混合してのスラリーとした。マウスは C57BL/6JJcl (CLEA Japan, Inc.)の 7 週齢、メスを使用した。マウスを固定し 1.75%イソフルラン (60 mg/kg) にて吸入麻酔をかけ、皮膚切開後、頭蓋骨を電動ドリルにて穴をあけ、そこから 30G の針で右大脳実質内に 10 µl のスラリーを注入した。皮膚を縫合し経過を観察した。第 1 週、2 週、4 週の時点でマウスを安楽死させ、脳を取り出して割を入れた後、Hematoxylin and eosin (H&E)染色、また GFAP に対する免疫染色を施行した。コントロールとしてゲルを注入せず、針を刺しただけのマウスの脳を同様に標本化した。

8. 蛍光免疫染色

培養液を除去し PBS にて 1 回洗浄した後、3% paraformaldehyde にて 15 分固定した。さらに 0.1% Triton-X 100 in PBS で 4 分間膜透過処理を行い、PBS で洗浄し、1% BSA で 20 分間ブロッキングした。PBS で 2 回洗浄後 PBS + Triton X-100 (PBT)にて 5 分間洗浄し、それぞれの一次抗体を PBT にての表 3 の濃度に希釈し加え、4℃で一晩反応させた。翌日一次抗体を PBT にて 3 回洗浄し、2 次抗体を加えた。2 次抗体には Alexa-488 anti mouse IgG antibody (1:250, Thermo fisher scientific)、Alexa-594 anti rabbit IgG antibody (1:250, Thermo fisher scientific)を使用し、BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan)を使用して観察した。標的タンパク質と抗体情報を以下に示す。Nestin (10C2, mouse, monoclonal, Santa cruz, USA, 1:100)、βIII-tubulin (rabbit, polyclonal, Abcam, Cambridge, England, 1:1000)、GFAP (rabbit, polyclonal, Dako, Tokyo, Japan, Diluted)、Myeline basic protein (mouse, monoclonal, Abcam, 1:1000)。

9. Real-time PCR

Total RNA は RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いプロトコールに従い抽出し、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) にて濃度測定した。抽出した total RNA 600 ng を用いて、SuperScript VILO (Invitrogen) により cDNA を作製した。cDNA の quality 評価として、glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内因性コントロールに使用した。使用したプライマー配列は表 2 に示す。cDNA を含む各 RT 反応液 1 µl に、SYBR Green Premix, Ex Taq II (Takara)10 µl、10 µM forward プライマー 0.4 µl, 10 µM reverse プライマー 0.4 µl、滅菌蒸留水 8.2 µl を添加し、各反応液を 95 ℃にて 3 分反応させた後、95 ℃にて 30 秒、58 ℃にて 30 秒、72 ℃にて 30 秒の条件で 40 サイクル反応させ、最後に 72 ℃にて 5 分反応させた。それぞれの mRNA 発現量は 0 日目のサンプルを 1 として比較定量した。遺伝子とプライマー配列を以下に示す。*βIII tubulin*：5'-AAC ATG ATG GCT GCC TGT GA -3' (forward)、5'-ACG TTG TTG GGG ATC CAC TC-3' (reverse)、*GFAP*：5'-ACC ATT CCT GTA CAG ACT TTC TCC-3' (forward)、5'-AGT CTT TAC CAC GAT GTT CCT CTT-3' (reverse)、*S100B*：5'-AGA GGG TGA CAA GCA CAA GC-3' (forward)、5'-TTG TCC ACC ACT TCC TGC TC-3' (reverse)、*PDGFRa*：5'-CAA ACC CTG AGA CCA CAA TG-3' (forward)、5'-TCC CCC AAC AGT AAC CCA AG-3' (reverse)、*MBP*：5'-AAA GAA GAG AAG CGT GGG CA-3' (forward)、5'-TGT GCT TGG AGT CTG TCA CC-3' (reverse)、*Gapdh*：5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' (forward)、5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' (reverse)。

10. Western blotting

回収した細胞は lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Triton X-100、0.5% NP-40、0.1% SDS、50 mM sodium fluoride、1 mM sodium orthovanadate、protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland)) を加えボルテックスし、−80℃ deep freezer へ入れ凍結・融解を 3 回繰り返した後、sonication した。溶解液は 20,000 × g、4℃の条件下で 10 分間遠心し上清を回収して蛋白濃度を測定した。総タンパク量 10 µg で sample buffer を加え調整し、5-15% gradient gel を用い電気泳動し、PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA, USA)へ転写した後、各種抗体を用いて目的のタンパク質を検出した。検出には

peroxidase-conjugated secondary antibody さらに ECL reagents (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England)を用いた。標的タンパク質と抗体情報を以下に示す。Nestin (10C2, mouse, monoclonal, Santa cruz, 1:100)、βIII-tubulin (rabbit, polyclonal, Abcam, 1:1000)、GFAP (rabbit, polyclonal, Dako, Diluted)、PDGFRα (D1E1E, rabbit, monoclonal, Cell signaling technology, Danvers, USA, 1:1000)、Olig2 (rabbit, immune-biological laboratories Co., Ltd., Fujioka, Japan, 2 μg/ml)、MBP (mouse, monoclonal, Abcam, 1:1000)、Stat3 (124H6, mouse, monoclonal, Cell signaling, 1:1000)、phosphate Stat3 (Tyr705, D3A7, monoclonal, Cell signaling, 1:1000)、β-actin (C4, mouse, monoclonal, Millipore, Billerica, USA, 1:1000)。

実験結果

1. 作製したゲルの物性

作製した高分子ゲルの物性について、ゲルの表面電位としてゼータ電位、ゲル面におけるモノマーの分布、濡れ性の検討として接触角の測定、含水率・膨潤率の測定、硬さの評価としてヤング率を測定した。

1) ゼータ電位

ゲルの表面電位としてゼータ電位を測定した（図 7)。陰性ゲル 1 (S1A0)は −245.9 ± 14.2 mV、陰性ゲル 2 (S5A1)は−113.6 ± 4.6 mV、陰性ゲル 3 (S3A1)は−76.3 ± 8.0 mV、中性ゲル（S1A1)は−5.9 ± 6.0 mV、陽性ゲル（S1A3)は 100.0 ± 22.9 mV、対照ゲル（PDMAAm)は 2.1 ± 1.47 mV であった。表面電位は負、正電荷をもつモノマーのモル比に依存し変化した。中性ゲル（S1A1)では表面電位は概ね 0 mV であった。電荷を持たないモノマーで合成した対照ゲル (PDMAAm)も同様に表面電位は 0 mV 付近となった。

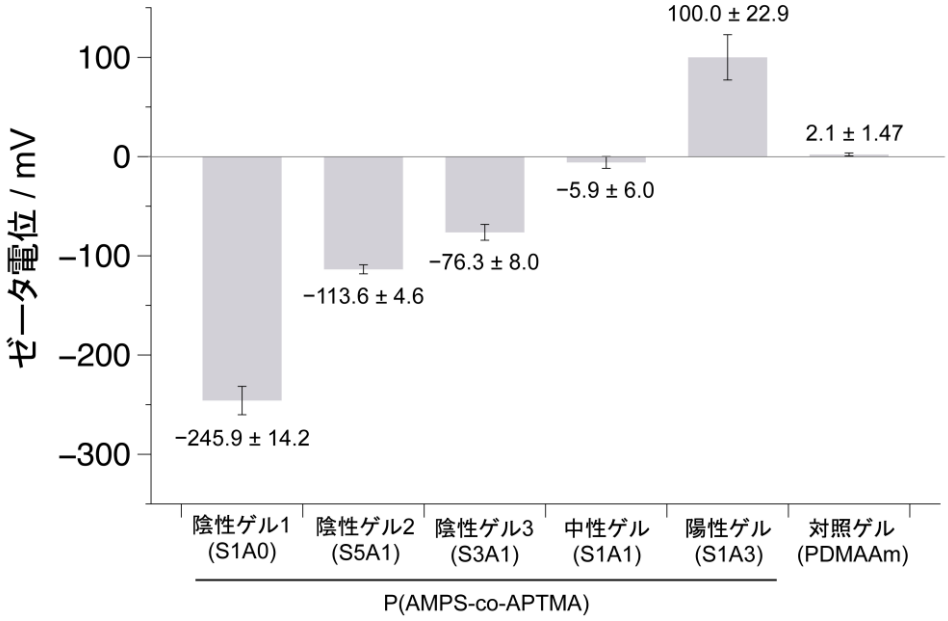


図 7 ゼータ電位。

2) Energy Dispersed X-ray analysis

モノマーの分布は陰性ゲル 1 (S1A0)、陰性ゲル 2 (S5A1)、中性ゲル（S1A1)の 3 つで検討した。それぞれ走査型電子顕微鏡画像（Scanning Electron Microscope: SEM)、炭素元素の分布（Carbon、赤色)、硫黄元素の分布（Sulfer、

緑色)、これら 3 つを重ねた画像 (overlay)を示す (図 8)。それぞれのモノマーはゲル上で概ね均一に分布していた。

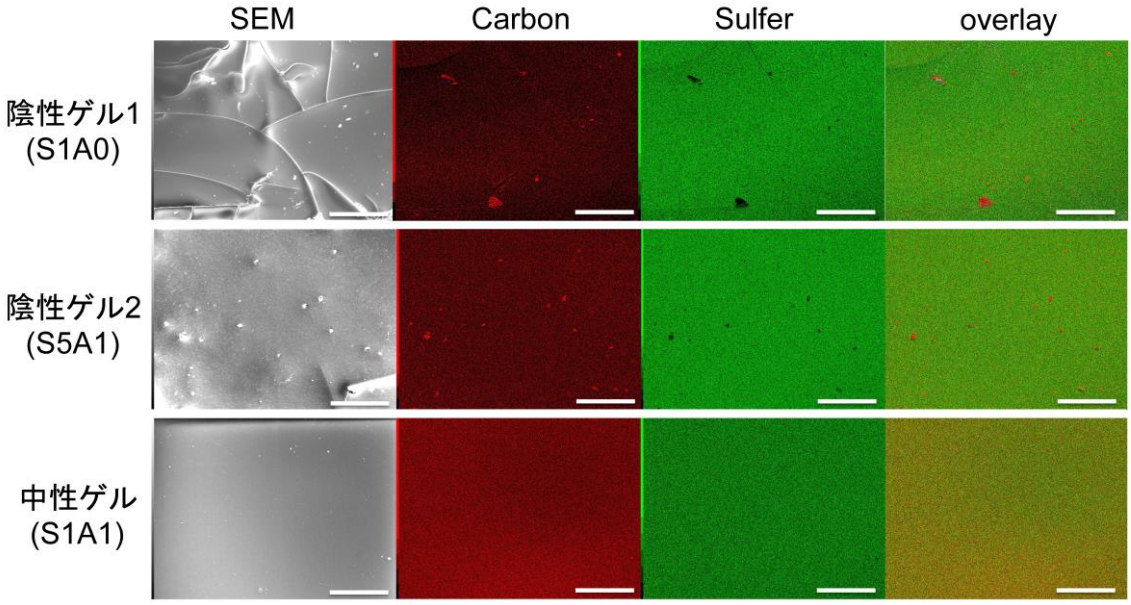


図 8 元素マッピング。
上段: 陰性ゲル 1 (S1A0)、中段: 陰性ゲル 2 (S5A1)、下段: 中性ゲル (S1A1)。それぞれ左から走査型顕微鏡画像 (SEM)、炭素元素の分布 (Carbon、赤色)、硫黄元素の分布 (Sulfer、緑色)、これら 3 つを重ねた画像 (overlay)。Scale bar: 300 μm。

3) 接触角

濡れ性の検討として PBS に対する接触角を測定した。陰性ゲル 1 (S1A0)は 12.6 ± 0.8°、陰性ゲル 2 (S5A1)は 10.4 ± 2.2°、陰性ゲル 3 (S3A1)は 14.9 ± 0.9°、中性ゲル (S1A1)は 21.4 ± 0.7°、陽性ゲル (S1A3)は 30.7 ± 0.8°、対照ゲル (PDMAAm)は 38.1 ± 1.5°であった (図 10)。いずれも親水性の高い表面であるが、負電荷を豊富に有する陰性ゲル 1 (S1A0)、陰性ゲル 2 (S5A1)、陰性ゲル 3 (S3A1)ではより接触角が小さく、親水性が高かった。正電荷の多い陽性ゲル (S1A3)では接触角はやや大きく、中性ゲル (S1A1)ではその中間程度であった。電荷を持たない対照ゲル (PDMAAm)は接触角が最も大きかった。

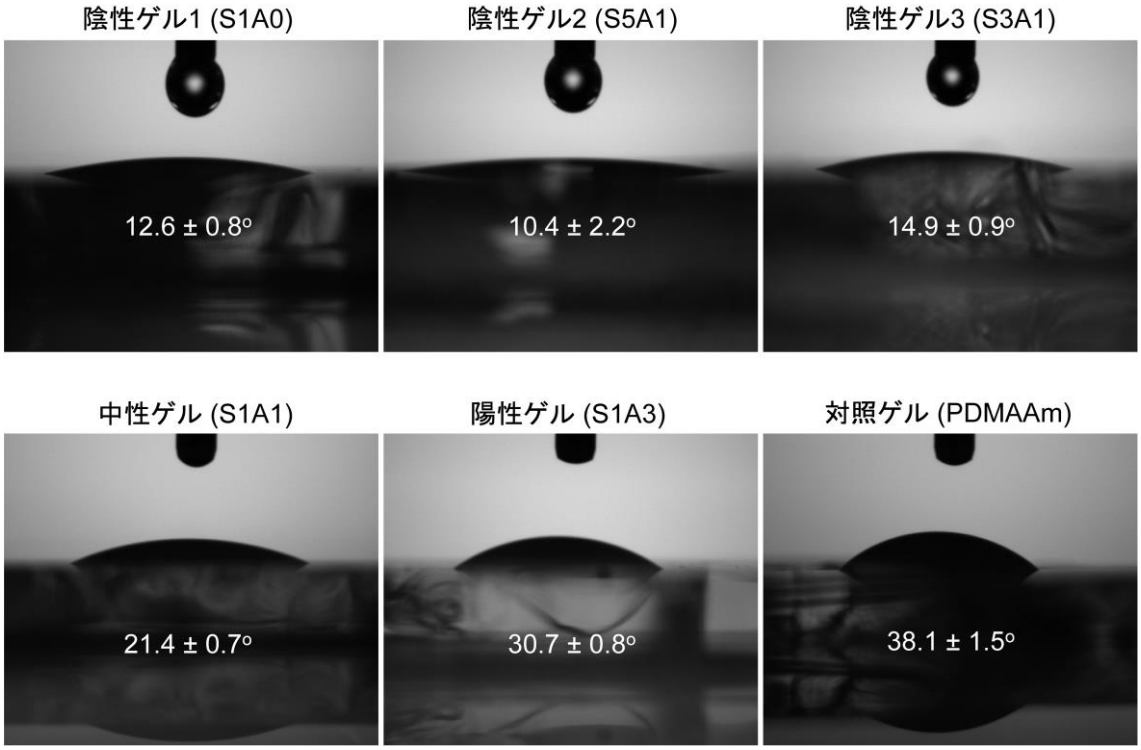


図 9 PBS に対する接触角。
上段左: 陰性ゲル 1 (S1A0)、中: 陰性ゲル 2 (S5A1)、右: 陰性ゲル 3 (S3A1)、下段左: 中性ゲル (S1A1)、中: 陽性ゲル (S1A3)、右: 対照ゲル (PDMAAm)。

4) 含水率、膨潤率

含水率、膨潤率はそれぞれ陰性ゲル 1 (S1A0)は 94.2 wt%、1.51 ± 0.01、陰性ゲル 2 (S5A1)は 93.7 wt%、1.35 ± 0.01、陰性ゲル 3 (S3A1)は 93.1 wt%、1.37 ± 0.02、中性ゲル (S1A1)は 88.9 wt%、1.07 ± 0.01、陽性ゲルは (S1A3)は 93.3 wt%、1.34 ± 0.01、対照ゲル (PDMAAm)は 88.5 wt%、0.84 ± 0.01 であった (図 10)。含水率と膨潤率はゲル中の電荷の偏りが大きい陰性ゲル 1 (S1A0)、陰性ゲル 2 (S5A1)、陰性ゲル 3 (S3A1)、陽性ゲル (S1A3)に比べ、電荷の偏りがない中性ゲル (S1A1)、電荷を持たない対照ゲル (PDMAAm)では小さかった。

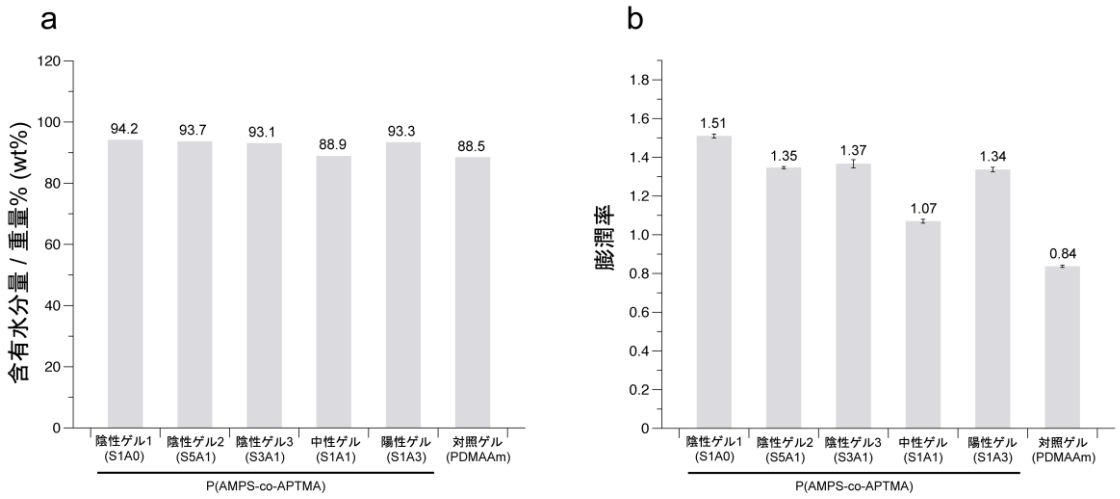


図 10 含水率、膨潤率。
(a) 含水率、(b) 膨潤率。

5) ヤング率

硬さの評価としてヤング率を測定した。陰性ゲル 1 (S1A0)は 65.2 ± 4.5 kPa、陰性ゲル 2 (S5A1)は 109.6 ± 15.8 kPa、陰性ゲル 3 (S3A1)は 99.7 ± 4.9 kPa、中性ゲル (S1A1)は 145.7 ± 9.1 kPa、陽性ゲル (S1A3)は 161.0 ± 33.2 kPa、対照ゲル (PDMAAm)は 115.6 ± 9.9 kPa であった (図 11)。

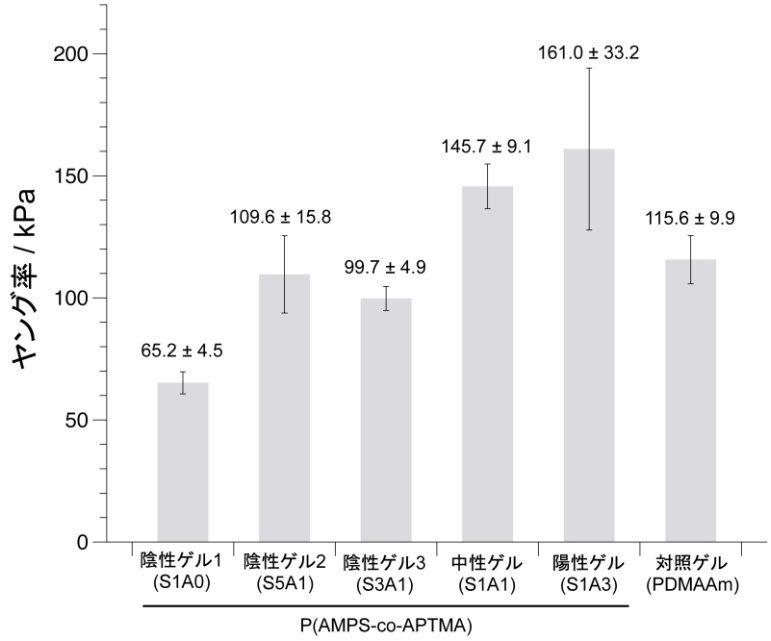


図 11 ヤング率。

負、正電荷をもつ官能基を有する 2 種類のモノマーから表面電位の異なるゲルを作製した。表面電位はモノマーのモル比に依存して変化し、ゲル面でそれぞれのモノマーはおおよそ均一に分布した。ゲルは全て親水性だが、負電荷を豊富に有するゲルは特に接触角が小さかった。

2. 分離した細胞の特性の検討

マウスから分離培養した細胞分画は神経幹細胞の定義である自己増殖能と多分化能を有しているか、形態観察、免疫染色にて検討した。

1) 自己増殖能の検討

分離した細胞を N2 培養液に bFGF 10 ng/ml/day を添加した培養液、O/F coat dish 上で培養し 1、5 日目で細胞数の変化を観察した。bFGF は毎日同量追加した。1 日目と比べ 5 日目は細胞密度が上昇し、細胞の自己増殖が確認された (図 12)。

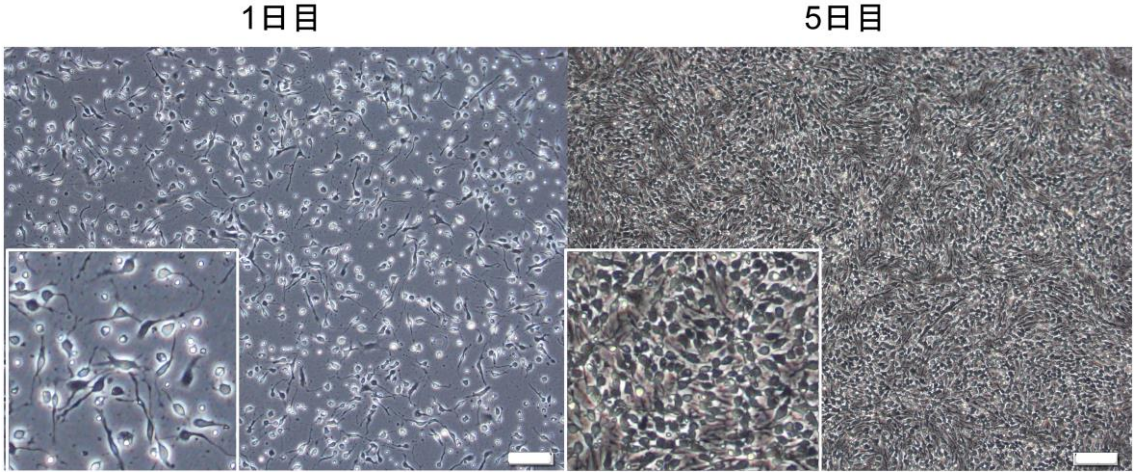


図 12 分離・培養した神経幹細胞。
左: 1 日目、**右**: 5 日目。Scale bar: 100 μm。

2) 多分化能の検討

N2 培養液中、O/F coat dish 上で 7 日目まで培養した神経幹細胞を βIII tubulin (神経細胞分化マーカー)、GFAP (アストロサイト分化マーカー)、MBP (オリゴデンドロサイト分化マーカー)の抗体でそれぞれ蛍光免疫染色を施行し陽性細胞の有無を検討した。いずれの陽性細胞も培養細胞中に確認された (図 13)。分離した細胞は神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化が確認され、多分化能を有することが示された。

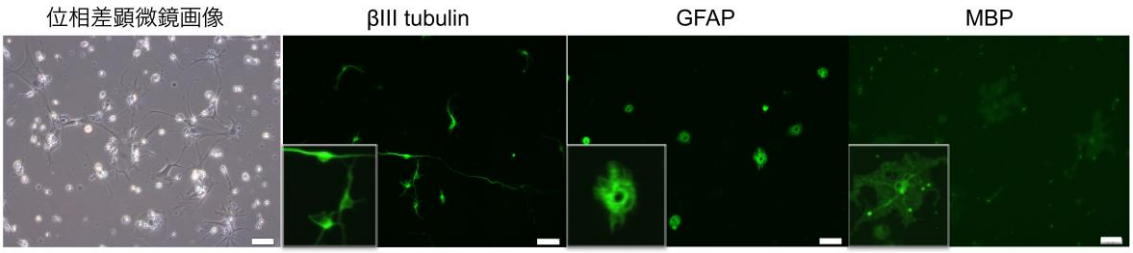


図 13 培養 7 日目の蛍光免疫染色画像。
左から位相差顕微鏡画像、βIII tubulin、GFAP、MBP。Scale bar: 50 μm。

分離・培養した細胞は自己増殖能、多分化能を有する神経幹細胞を含む細胞集塊であることが確認され、以下の全てのアッセイに使用した。

3. ゲルと神経幹細胞の接着性の検討

細胞と基質の接着性の検討のため、分離した神経幹細胞をゲル上で培養し、接着細胞数、細胞形態を比較した。

1 日目の単位面積当たりの接着細胞数は O/F coat dish で 86.29 ± 4.52 cells/mm^2、陰性ゲル 1 (S1A0)で 40.00 ± 4.25 cells/mm^2、陰性ゲル 3 (S3A1)で 2.00 ± 0.97 cells/mm^2、中性ゲル (S1A1)で 33.00 ± 4.26 cells/mm^2、陽性ゲル (S1A3)で 3.00 ± 1.22 cells/mm^2、中性ゲル (PDMAAm)で 1.00 ± 0.67 cells/mm^2 となった。3 日目では上記の順に 106.42 ± 6.21 cells/mm^2、22.00 ± 2.0 cells/mm^2、3.00 ± 1.43 cells/mm^2、31.00 ± 2.15 cells/mm^2、2.67 ± 1.35 cells/mm^2、1.33 ± 0.62 cells/mm^2 であった。O/F coated dish、陰性ゲル 1 (S1A0)、中性ゲル (S1A1)、陽性ゲル (S1A3)で神経幹細胞の接着が確認された (図 14)。

細胞形態について、O/F coated dish、中性ゲル (S1A1)において胞体の伸展を認めたが、陰性ゲル 1 (S1A0)上では大部分の細胞の胞体が伸展せず、円形の細胞形態のまま接着していた (図 15)。また陽性ゲル (S1A3)上では細胞が接着するが接着細胞はトリパンブルー陽性で、viable な細胞は認めなかった。

中性ゲル (S1A1)は神経幹細胞への接着性があり、胞体の広がり、突起の伸長が可能であった。以下のアッセイは中性ゲル (S1A1)を使用した。

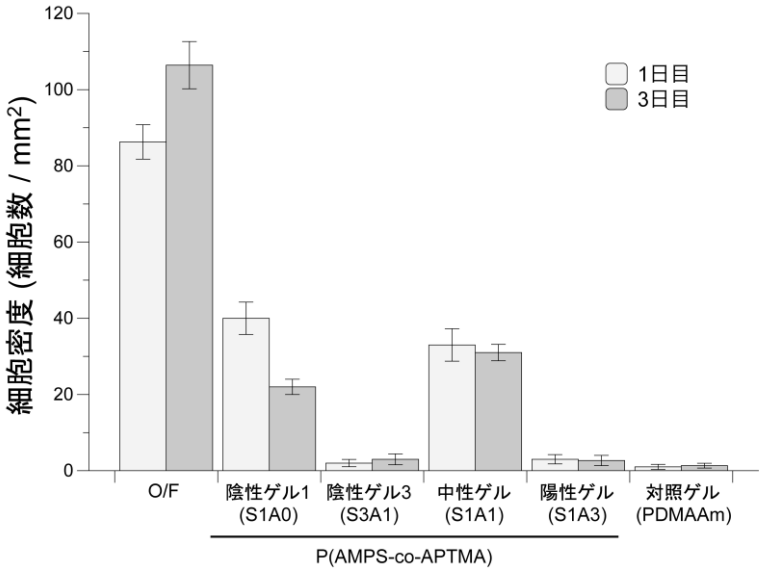


図 14 ゲルと神経幹細胞の接着実験。
ゲル上の細胞はトリパンブルーで処理し、陰性細胞のみカウントした。白 bar: 1 日目、灰色 bar: 3 日目。

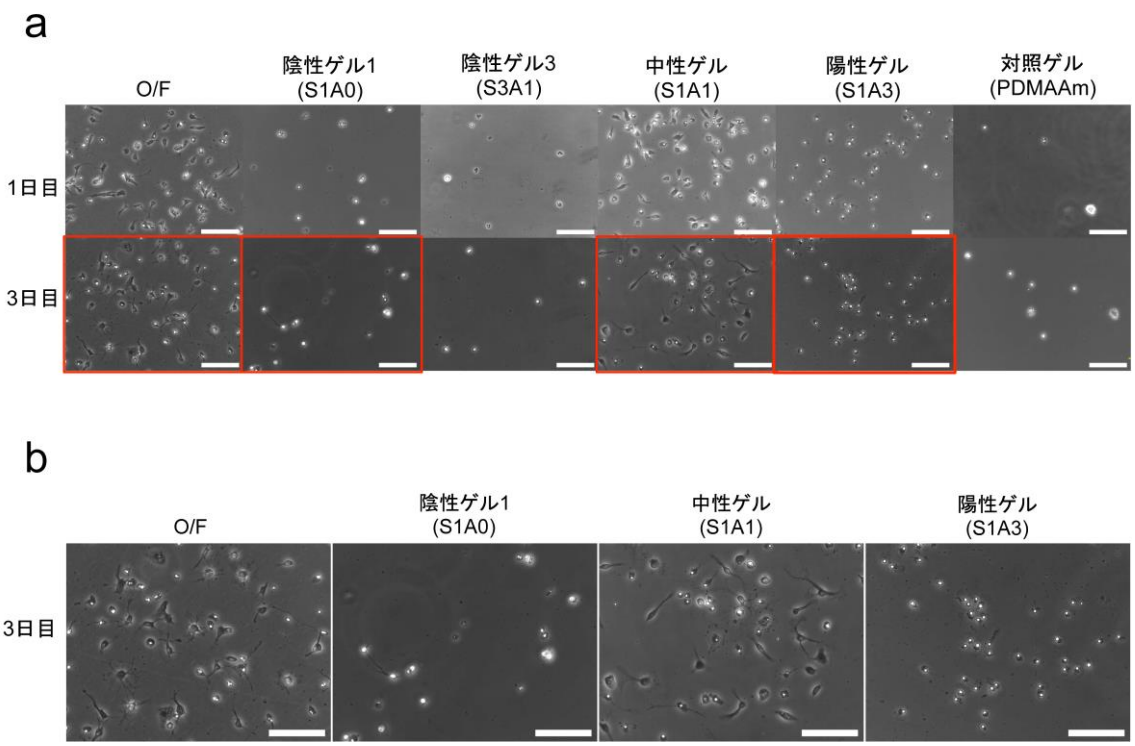


図 15 各ゲル上での神経幹細胞の形態。
(a) 検討した全てのゲル上での神経幹細胞の形態。赤枠は接着が確認されたゲル。(b) (a) 赤枠の拡大。Scale bar: 20 μm。

4. Pull- down assay による中性ゲル (S1A1)への吸着タンパク質の検討

中性ゲル (S1A1)に特異的に吸着するタンパク質を同定するため、pull- down assay を行った。左から control として Precision Plus Protein Standards (C, Bio-Rad)、神経幹細胞の膜画分 (membrane fraction: MF)、ゲルに接着しなかったタンパク質として膜画分と粉砕ゲルのスラリーの混合液の上清 (un-bound: UB)、接着したタンパク質として粉砕ゲルから抽出したタンパク質 (bound: B)をそれぞれ電気泳動した。陰性ゲル 1 (S1A0)の bound には多くのタンパク質バンドが検出された。対照ゲル (PDMAAm)、中性ゲル (S1A1)は陰性ゲル 1 (S1A0)と比べてバンドの検出が少なく、また中性ゲル (S1A1)に特異的なバンドは検出されなかった (図 16)。

本検討において中性ゲル (S1A1)に特異的な接着タンパク質の同定には至らなかった。

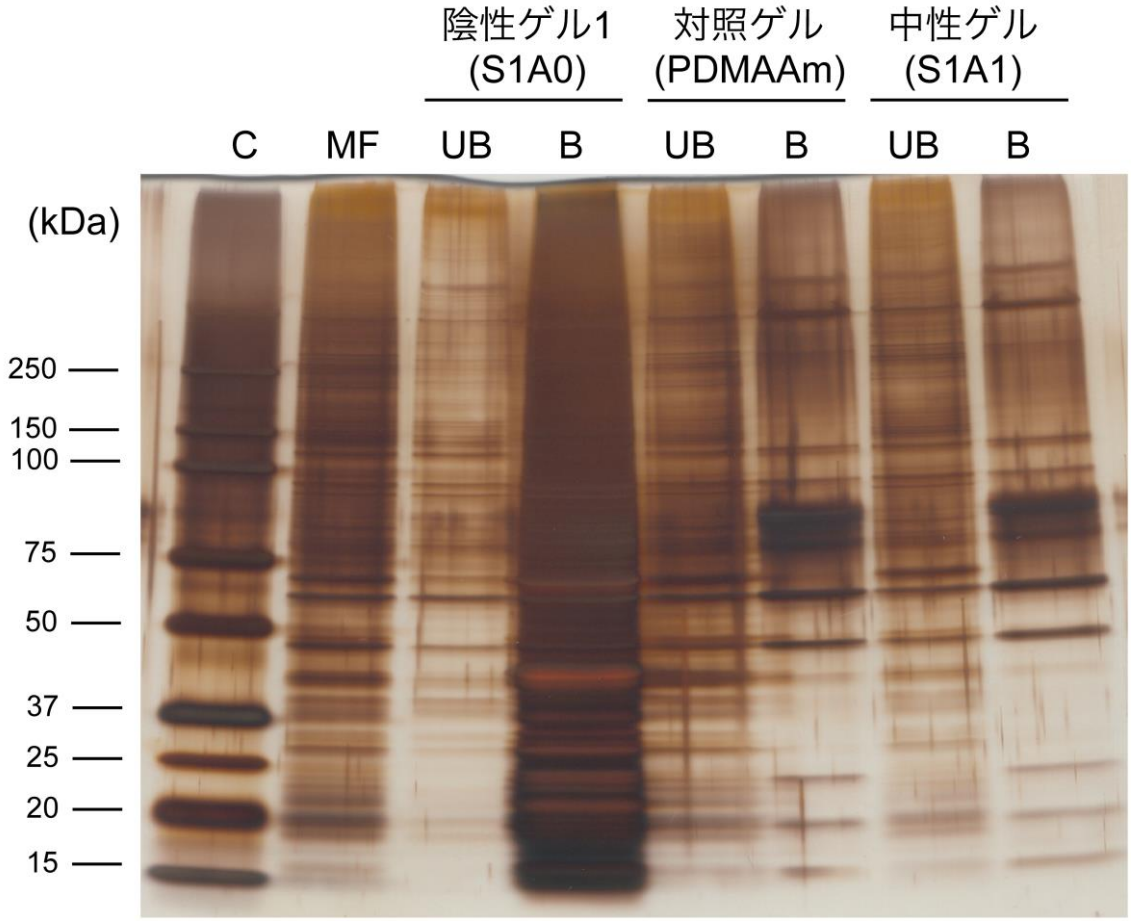


図 16 Pull- down assay。
C: control、MF: membrane fraction、UB: un-bound、B: bound。

5. 中性ゲル (S1A1)の脳内注入による免疫応答の検討

中性ゲル (S1A1)を注入したマウスは観察した 4 週間でいずれも行動異常を起こさなかった。組織学的には、第 1 週にてゲルの周囲に単核球など全身免疫による炎症細胞浸潤を軽度認めた。免疫組織学的には針の刺入部に一致して反応性アストロサイトの出現を認めた (図 17)。これは針のみを刺した control と同様の反応であった。第 2、4 週ではアストロサイトの増生も認めなかった。

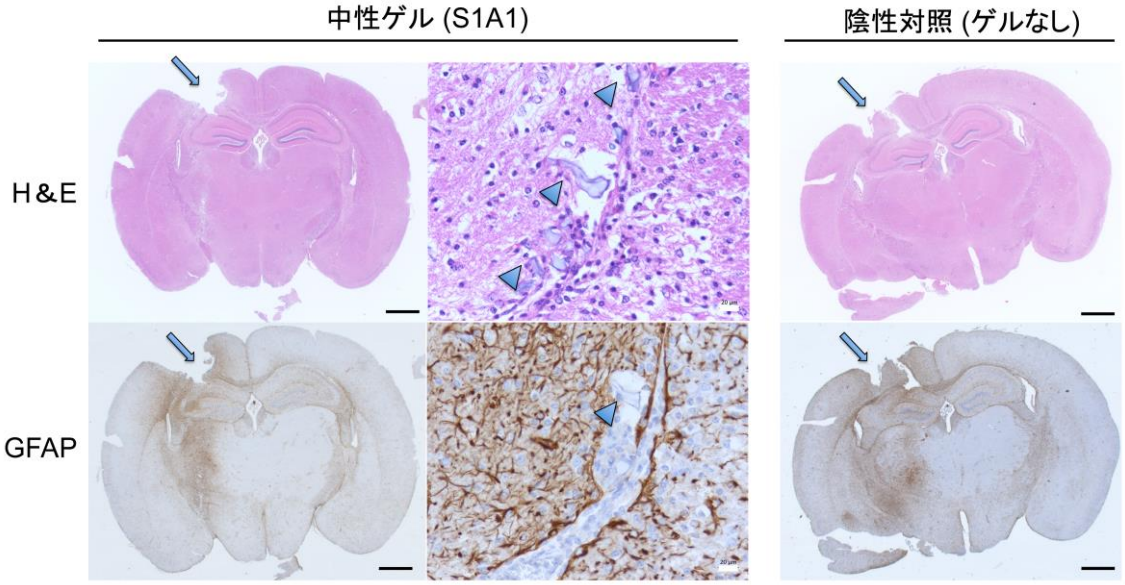


図 17 中性ゲル (S1A1)を注入、または陰性対照として針のみ刺入したマウス脳の第 1 週目における組織所見と GFAP の免疫染色。
矢頭: 中性 (S1A1)ゲル、矢印: 針刺入部位、Scale bar 黒: 1 mm、白: 20 um。

6. 中性ゲル (S1A1)上における神経幹細胞の分化の解析

神経幹細胞との接着性が確認された中性ゲル (S1A1)が分化へ与える影響を検討した。O/F coated dish、中性ゲル (S1A1)上で神経幹細胞を培養し、分化マーカーの mRNA 発現を real-time PCR にて比較、またタンパク質の発現を Western blotting、および蛍光免疫染色にて比較した。培養液は N2 培養液、1%FBS 培養液の 2 種類を用い、N2 培養液は 0、1、3 日目、1%FBS 培養液では 0、1、3、7 日目で比較した。分化マーカーは神経細胞分化マーカーとして βIII tubulin、アストロサイト分化マーカーとして GFAP、S100B、オリゴデンドロサイト分化マーカーとして MBP、PDGFRα を用いた。

1）Real-time PCR による mRNA 発現の検討

N2 培養液において、βIII tubulin、GFAP、S100B は中性ゲル（S1A1)上で発現が亢進した。特に GFAP は著明な差を認めた。PDGFRα は差がみられず、MBP は中性ゲル（S1A1)上で発現が低下した（図 18a)。

1%FBS 培養液において、βIII tubulin は 1、3 日目では O/F coated dish 上で発現が高く、7 日目では差を認めなかった。GFAP はいずれも中性ゲル（S1A1）上で発現が著明に亢進した。S100B は 1、3 日目では中性ゲル（S1A1)上で発現が低下し、7 日目のみ亢進した。PDGFRα、MBP は中性ゲル（S1A1)上で発現が低下する傾向にあった（図 18b)。

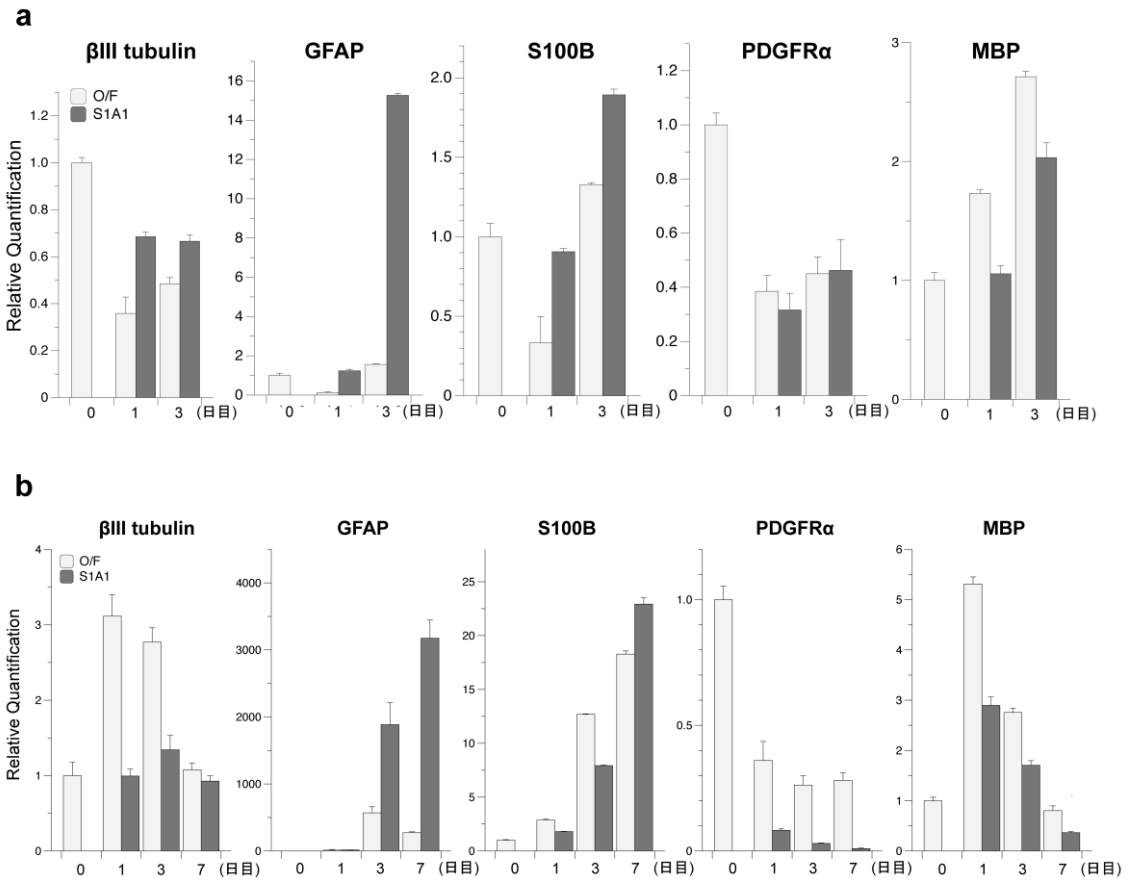


図 18 O/F coated dish と中性ゲル (S1A1)上での分化マーカーの mRNA 発現の比較。(a) N2 培養液、(b) 1%FBS 培養液。白 bar: O/F coated dish、黒 bar: 中性ゲル (S1A1)。

2）Western blotting によるタンパク質発現の検討

N2 培養液において、βIII tubulin の発現量は 1、3 日目いずれも中性ゲル(S1A1)上でやや亢進した。GFAP 発現は 1 日目において中性ゲル（S1A1)上で増加したが、3 日目では差は認めなかった。PDGFRα は中性ゲル（S1A1)上で発現が低下した。MBP は発現を認めなかった（図 19a)。

1%FBS 培養液において、βIII tubulin の発現量は 1、3、7 日目のいずれも明らかな差を認めなかった。GFAP は 3、7 日目において中性ゲル（S1A1)上で発現の増加を認めた。PDGFRα は 1、3、7 日目のいずれでも中性ゲル（S1A1)上で発現が低下した。MBP は 1、3 日目では発現を認めないが、7 日目において中性ゲル（S1A1)上での発現が O/F coated dish と比較して低下した（図 19b)。

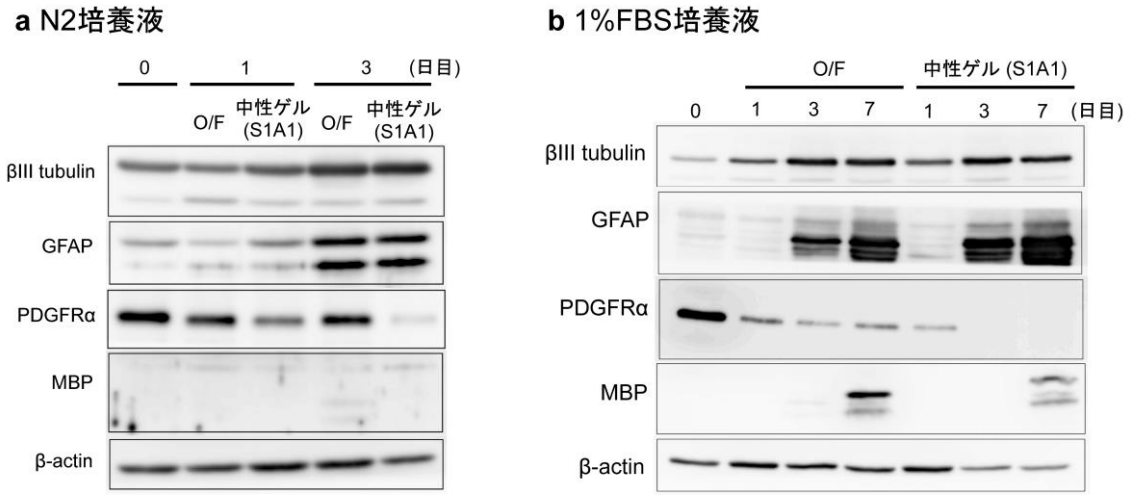


図 19 分化マーカーの Western blotting。(a) N2 培養液、(b) 1%FBS 培養液。

3）蛍光免疫染色によるタンパク質発現の比較

培養 7 日目における蛍光免疫染色と陽性細胞数の比較を図 20 に示す。右側のグラフについて、各抗体の陽性細胞数は DAPI 陽性細胞数で割り標準化した。

N2 培養液において、βIII tubulin 陽性細胞は O/F coated dish で 13.0 ± 1.0 cells、中性ゲル（S1A1)上で 18.9 ± 1.8 cells となり多い傾向にあった。GFAP 陽性細胞は O/F coated dish で 4.9 ± 2.1 cells、中性ゲル（S1A1)上で 4.3 ± 1.5 cells で差違は認めなかった。MBP 陽性細胞は O/F coated dish で 2.9 ± 1.7 cells、中性ゲル（S1A1)上で 0.3 ± 0.4 cells と中性ゲル（S1A1)上では少ない傾向にあった（図 20a)。

1%FBS 培養液において、βIII tubulin 陽性細胞は O/F coated dish で 1.6 ± 0.9 cells、中性ゲル（S1A1)上で 4.1 ± 0.9 cells となり中性ゲル（S1A1)上で多い傾

向にあった。GFAP 陽性細胞は O/F coated dish で 26.7 ± 5.6 cells、中性ゲル (S1A1)上で 34.4 ± 6.9 cells となり中性ゲル (S1A1)上で多い傾向にあった。MBP 陽性細胞は O/F coated dish で 3.7 ± 1.1 cells、中性ゲル (S1A1)上で 1.5 ± 0.5 cells となり中性ゲル (S1A1)上で少ない傾向にあった。また中性ゲル (S1A1)上の GFAP 陽性細胞は蛍光強度が強かった (図 20b)。

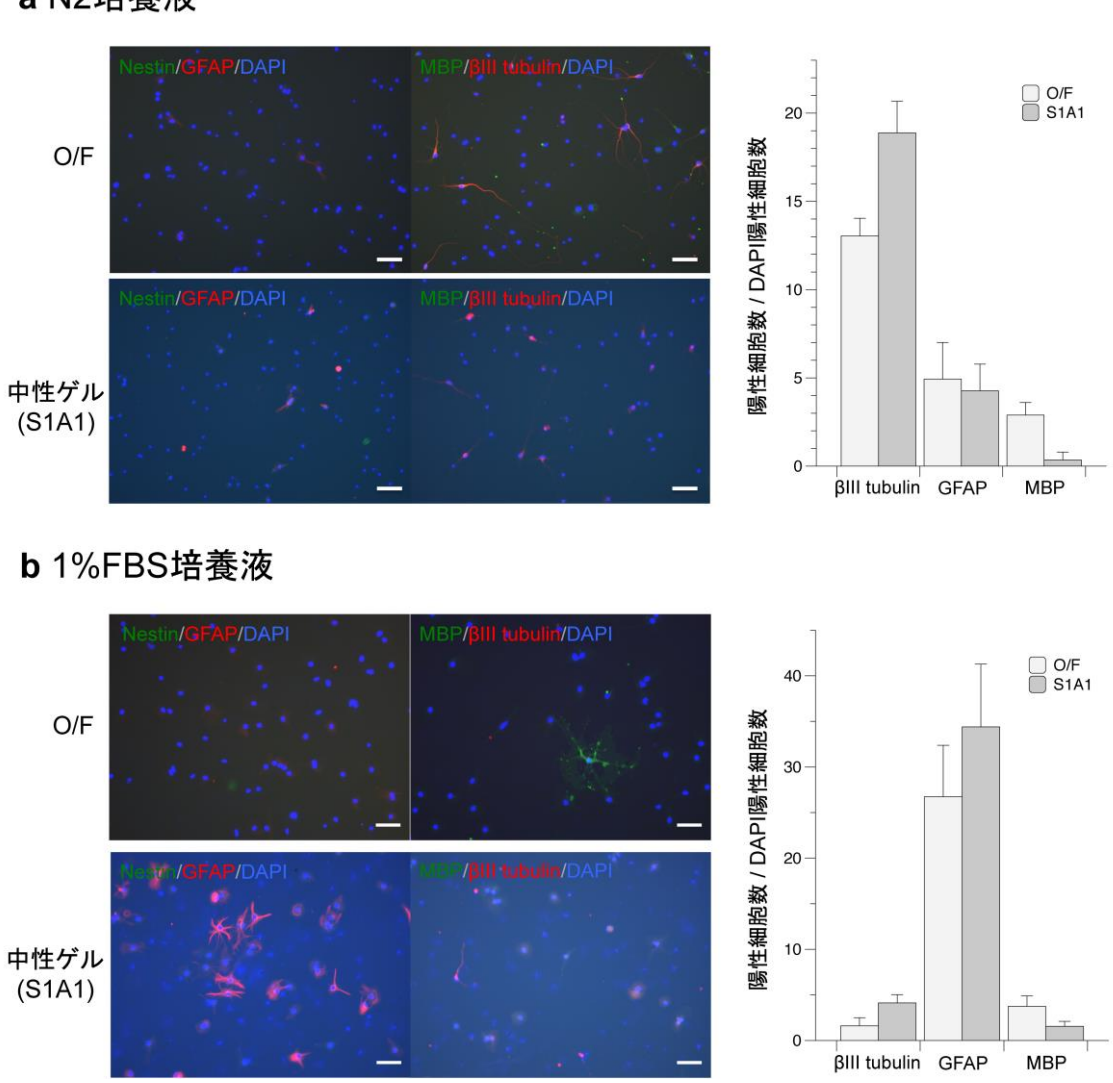


図 20 培養 7 日目における各分化マーカーの蛍光免疫染色画像と陽性細胞数の比較。右側のグラフについて、各抗体の陽性細胞数は DAPI 陽性細胞で標準化した。(a) N2 培養液、(b) 1%FBS 培養液。Scale bar: 50 μm。

中性ゲル (S1A1)上では神経幹細胞の 3 系統への分化が確認され、O/F coated dish と比べ、アストロサイト分化が亢進し、オリゴデンドロサイトへの分化が抑制されることが示された。

7. シグナル伝達の解析

中性ゲル（S1A1)上では O/F coated dish と比べ神経幹細胞の分化の方向に差がみられた。アストロサイト分化について、Jak/Stat 経路は GFAP 発現に関与すると報告されている[55]。O/F coated dish、中性ゲル（S1A1)上における Stat3 の発現量および活性化の変化を Western blotting にて検討した。また Jak 阻害薬処理により Stat3 の発現量および活性化、GFAP の発現量を Western blotting にて、また GFAP は蛍光免疫染色も併せて検討した。オリゴデンドロサイト分化の抑制について、特異的な転写因子として知られている Olig2[56, 57] の発現量を Western blotting にて検討した。

1）Jak/Stat 経路の検討

i) Western blotting によるタンパク質発現の検討

O/F coated dish、中性ゲル（S1A1)上にて、N2 培養液、1%FBS 培養液を用いて神経幹細胞を培養し、N2 培養液は 1、3 日目、1%FBS 培養液は 1、3、7 日目でタンパク質を回収し Stat3 の発現量およびリン酸化量を検討した。

N2 培養液において、中性ゲル（S1A1)上では Stat3 の総量、またそのリン酸化が亢進した（図 21a)。アストロサイト分化培地である 1%FBS 培養液では N2 培養液と比較し Stat3 の総量、またリン酸化はいずれも亢進するが（N2 培養液の 0 日目を基準として)、特に中性ゲル（S1A1)で発現の亢進を認めた（図 21b)。

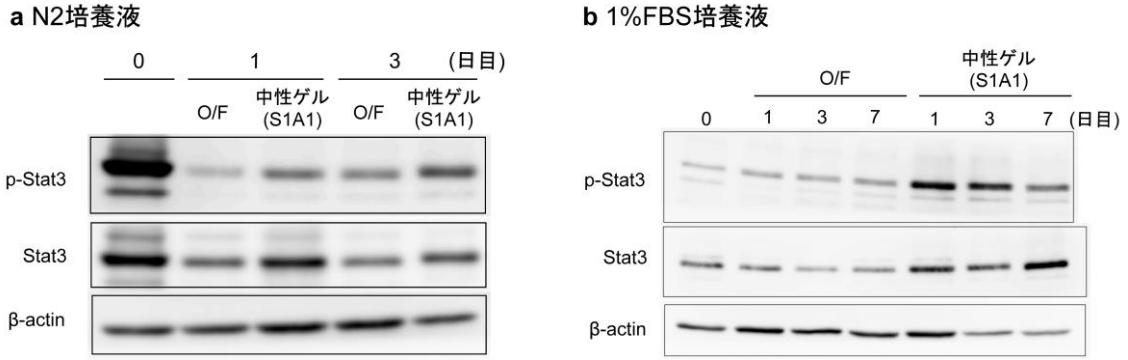


図 21 Stat3 およびリン酸化 Stat3 の Western blotting。
(a) N2 培養液、(b) 1%FBS 培養液。

ii) Jak 阻害薬処理による形態変化、Stat3 およびリン酸化、GFAP 発現量の検討

1%FBS 培養液に Jak 阻害薬（Calbiochem, 420097)を 0 μM、0.3 μM、1 μM、3 μM の濃度で添加した培養液を用い、中性ゲル（S1A1)上で神経幹細胞を培養

し、3 日目にて細胞形態の観察、Western blotting によるタンパク質発現量の検討、さらに 7 日目において免疫染色を施行し GFAP 発現の変化を比較した。

a）形態の変化

Jak 阻害薬で処理し、3 日目における位相差顕微鏡画像を図 22 に示す。アストロサイト様の太くて長い放射状の突起を有する細胞の数が減少し、また突起の長さが短縮した。細胞数の変化は認めなかった。

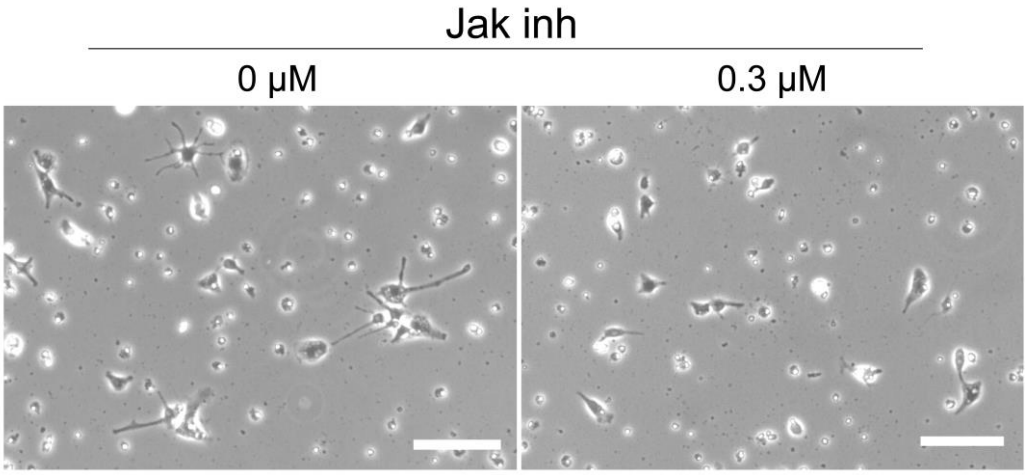


図 22 1%FBS 培養液、中性ゲル (S1A1)上で 3 日間培養した神経幹細胞の位相差顕微鏡画像。
Jak 阻害薬の濃度は 0 μM (無添加、左)、0.3 μM (右)。Scale bar: 50 μm。

b）Western blotting による Stat3 のリン酸化、GFAP 発現の変化

Jak 阻害薬を添加しない場合、中性ゲル（S1A1)上で、Stat3 および Stat3 のリン酸化、GFAP 発現量が亢進した。Jak 阻害薬を 0.3 μM 加えると O/F coated dish、中性ゲル（S1A1)どちらも Stat3 および Stat3 のリン酸化、GFAP 発現量が減少した。中性ゲル（S1A1)上では Stat3、GFAP の発現が僅かに残存した。1 μM 以上加えると、どちらも Stat3 のリン酸化、GFAP 発現がほぼ消失した。Stat3 は僅かに残存した（図 23)。

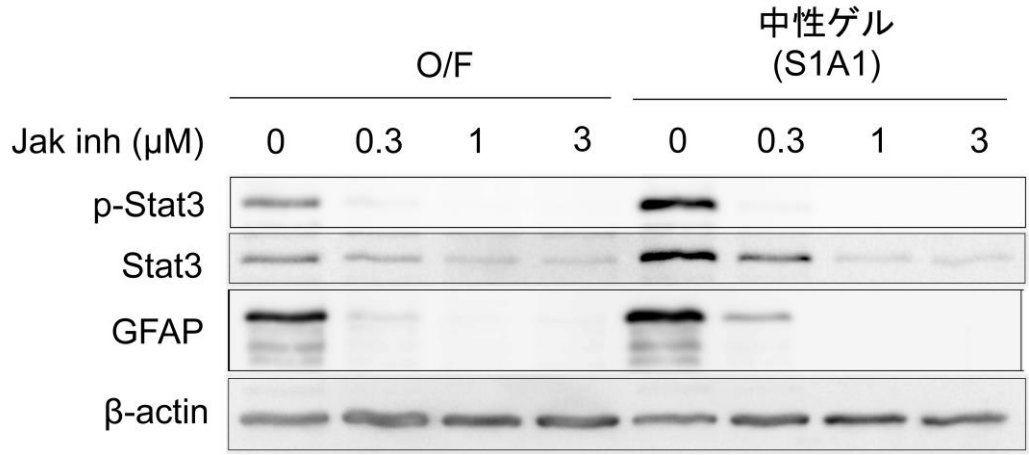


図 23 3 日目における Stat3 および Stat3 のリン酸化、GFAP の Western blotting。
培養液は 1%FBS 培養液を用い中性ゲル (S1A1)上で培養した。Jak 阻害薬の濃度は 0 μM、0.3 μM、1 μM、3 μM。

c) 蛍光免疫染色による GFAP 発現の変化

中性ゲル (S1A1)上で 7 日間培養した神経幹細胞の GFAP に対する蛍光免疫染色画像を図 24 に示す。

Jak 阻害薬を添加していない場合、GFAP が強陽性となる細胞が多数出現した。0.3 μM 添加時においても、数が減少したものの GFAP 陽性細胞が散見された。1 μM 以上添加した場合、GFAP 陽性細胞は認めなかった。

S1A1 ゲル上でのアストロサイト分化誘導は Jak/Stat 経路の関与が示唆された。

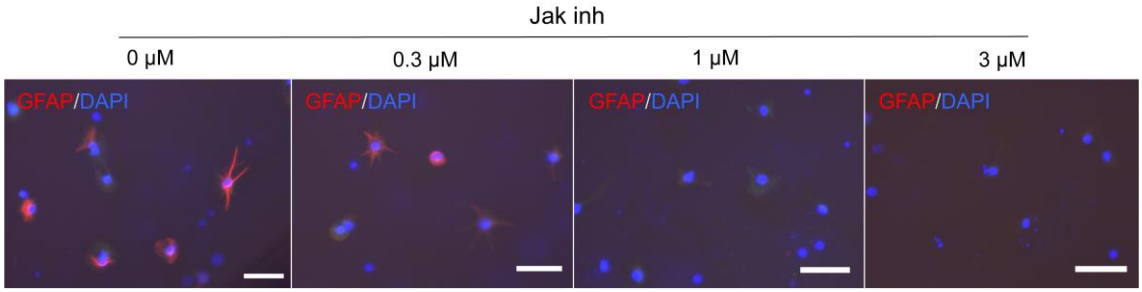


図 24 Jak 阻害薬を添加した培養液における GFAP の発現変化。
Jak 阻害薬の濃度は左から 0 μM (無添加)、0.3 μM、1 μM、3 μM。Scale bar: 50 μm。

2) Western blotting による Sonic hedgehog 経路の検討

O/F coated dish、中性ゲル (S1A1)上にて、N2 培養液、1%FBS 培養液を用いて神経幹細胞を培養し、N2 培養液は 1、3 日目、1%FBS 培養液は 1、3、7 日目で回収し Olig2 の発現量を検討した。

N2 培養液、1%FBS 培養液のいずれでも 3 日目から Olig2 の発現が低下した(図 25)。

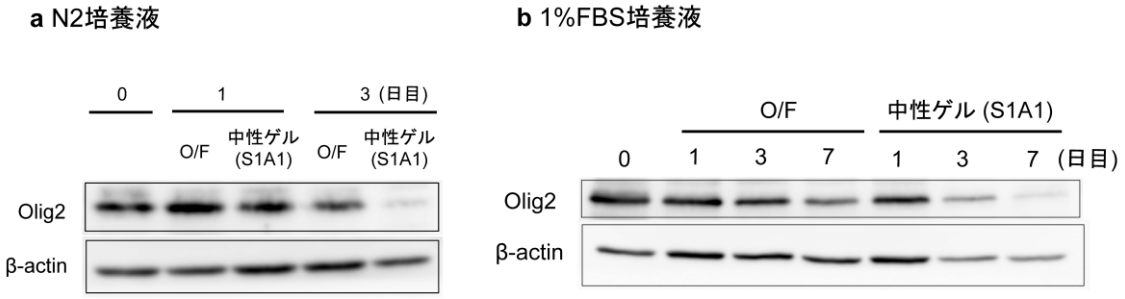


図 25 Olig2 の Western blotting。
(a) N2 培養液、(b) 1%FBS 培養液。

考察

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 としての素材となる可能性が示された。

1) ゲルの物性と神経幹細胞接着の考察

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（図 27)。

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、中性ゲル(S1A1)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中性ゲル (S1A1)は神経幹細胞の接着に適切な電位であると考える。正電荷のモノマーによる細胞死について、既報の論文ではアミノ基を有する高分子は細胞膜と強く相互作用することで凝集して細胞膜を破壊するとされており、細胞毒性が生じた結果と考える [58]。

表面電位、親疎水性はタンパク質吸着に関与し [59, 36]、これらは細胞接着に関与するとされている。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中性ゲル (S1A1)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 による検討が必要と考える。

負電位で親水性の高いポリスチレン組織培養皿には神経幹細胞は接着しない。本検討においても同様に負電位で親水性の高い陰性ゲル 1 (S1A0)、陰性ゲル 2 (S5A1)、陰性ゲル 3 (S3A1)では神経幹細胞の接着と胞体の伸展は確認されなか

った。一方でマウス間葉系幹細胞である C3H10T1/2 は組織培養皿や負電位の陰性ゲル 2 (S5A1)、陰性ゲル 3 (S3A1)、また陽性ゲル (S1A3)に接着する一方で中性ゲル (S1A1)には殆ど接着しなかった (結果は省略する)。細胞の種類によって基質との接着性は異なり、神経幹細胞にとって中性ゲル (S1A1)の有する中性–両性の表面電位と適度な親水性は接着に適した条件であると考える。

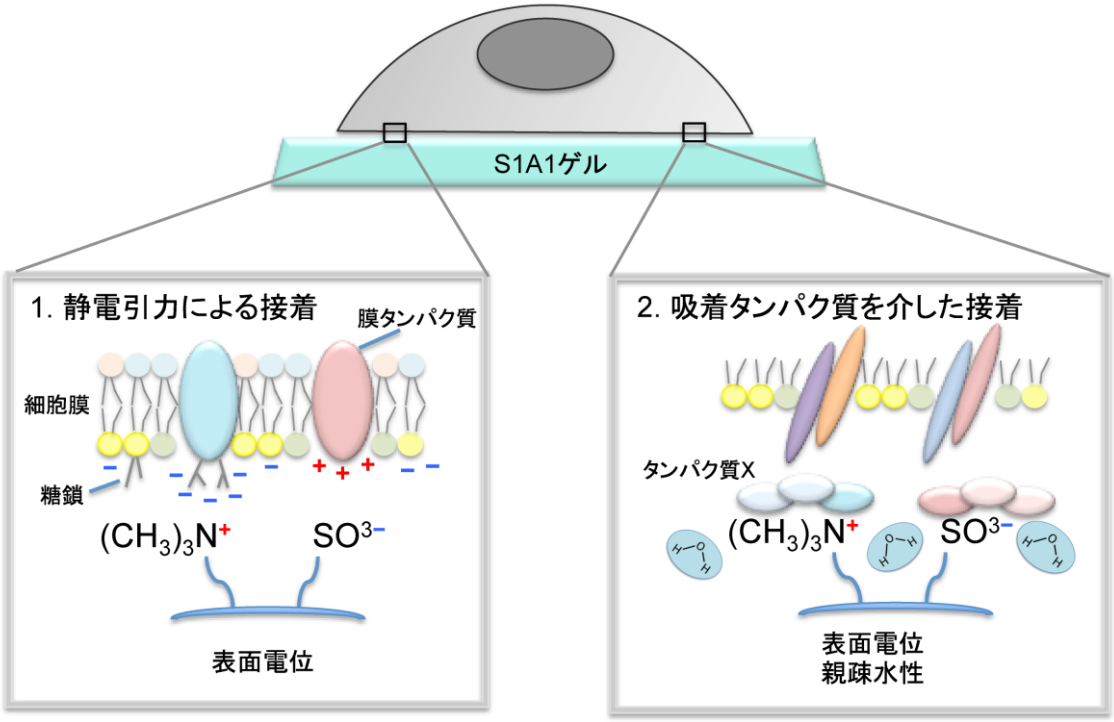


図 26 中性ゲル (S1A1)と神経幹細胞の接着の機序の考察。
1. 静電引力による接着。基質表面の電荷と膜タンパク質、糖鎖、細胞膜の有する電荷とのイオン結合による接着が想定される。2. 吸着タンパク質を介した接着。細胞接着タンパク質の吸着により接着が促進されることが想定される。

2) ゲルの物性と分化への影響の考察

アストロサイト分化には Jak/Stat 経路の関与が示唆された。Jak/Stat 経路の上流因子には IL-6、Leukemia Inhibitory Factor (LIF)が知られている [60]。これらの分子のゲルへの吸着し、IL-6 レセプターや LIF レセプターを介して Jak/Stat 経路を活性化した可能性がある (図 25)。

また N2 培養液に比べ 1%FBS 培養液での GFAP 発現の上昇が高度であったことから、FBS 中に含まれるタンパク質の吸着が経路の活性化により寄与した可能性がある。しかし pull- down assay ではゲル上への特異的なタンパク質の吸着は明らかではなく、より感度の高い Western blotting による検討を今後の課題とする。

オリゴデンドロサイト分化の抑制にはOlig2の発現低下の関与が示唆された。Olig 2 発現の経路としてSonic Hedgehog経路が報告されている[61, 62]。Sonic hedgehogが中性ゲル（S1A1)には吸着せず、Protein patched homolog (PTCH)を介したシグナルが抑制されることなど予想されるが、Sonic hedgehog経路の解析については今後の検討課題とする（図25)。

基質の硬さは細胞の分化に影響するとされている[63]。間葉系幹細胞において、1 kPa以下では神経へ、10 kPa付近では筋細胞、100 kPa前後では骨細胞への分化が誘導される[64]。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[65]。脳の硬さはおおよそ0.5-1 kPaとされており[66, 67] 一方ポリスチレン培養皿は1-2 GPaと極めて硬い。今回作製したS1A1ゲル（145 kPa)は神経幹細胞にとって硬い基質であるが、さらに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。これにはこれまで述べた表面電位と親疎水性による何らかのタンパク質吸着が関与した可能性がある。またこれらのシグナル経路に加え、近年注目されているインテグリン、タリン、フィラミン、アクチン、Piezo1などを介した機械的刺激ついても検討する必要がある[68]。

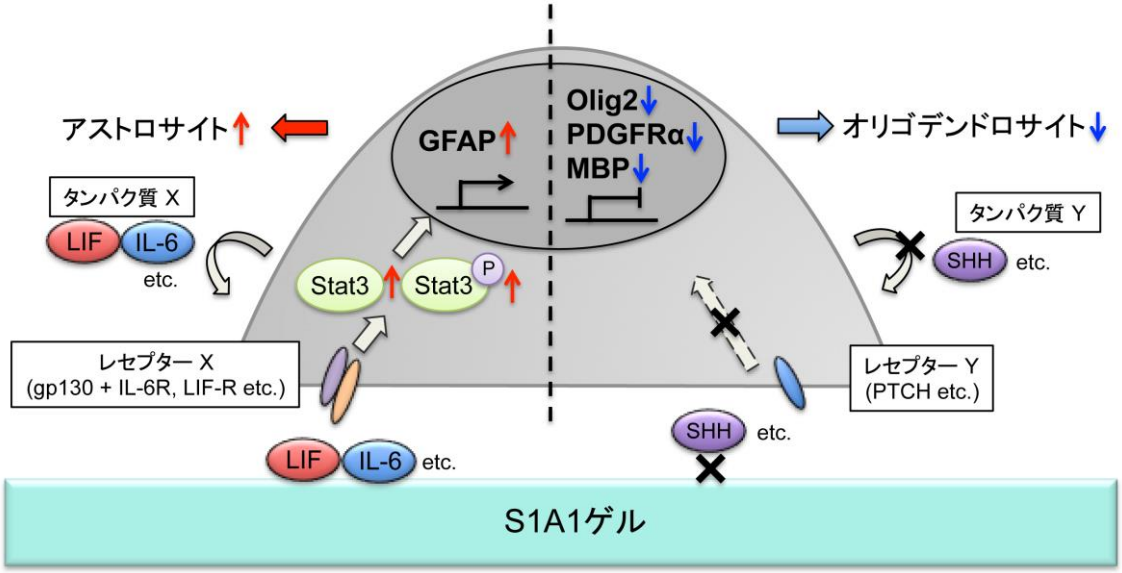


図27 中性ゲル (S1A1)による神経幹細胞へのシグナル伝達の考察。
左: GFAP発現に関わるJak/Stat経路の上流因子であるLIFやIL-6などのゲルへの吸着による活性化、あるいは自己分泌が促進されることによりアストロサイト分化が誘導されると想定される。右: Olig2発現に関わるSonic hedgehog経路の上流因子であるSonic hedgehogがゲルに吸着しない、あるいは自己分泌が抑制されることによりオリゴデンドロサイト分化が抑制されることが想定される。

3) 臨床的意義についての考察

本検討で作製した中性ゲル (S1A1)はneuronal tissue engineeringのscaffoldとして脳血管疾患、変性疾患に対する神経移植の材料となる可能性がある。アストロサイトの誘導について、アストロサイトのもつ神経細胞の保護作用は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[69, 70, 71]。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[72]、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。グリア瘢痕は一方で神経の伸長を阻害するという報告もあるが、近年ではグリア瘢痕を構成するChondroitin-sulfated proteoglycans (CSPG)、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチンのうち、CSPG以外の3つは軸索伸長を促進する作用をもち[73, 74, 75]、またDaviseらはある種のアストロサイトは、CSPGをほとんど産生しないグリア瘢痕を形成し軸索伸長を促進すると報告している[76, 77]。中性ゲル (S1A1)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。

総括

本研究において得られた新知見は、以下の通りである。

1) 負電荷を有する官能基−SO^{3-}と正電荷を有する官能基−$N(CH_3)_3$をもつモノマーを 1:1 で合成したゲル上にて神経幹細胞が接着し培養可能であった。
2) 中性ゲル (S1A1)はマウス脳内で特異的な炎症所見を惹起せず、マウスの行動異常も観測されなかった。
3) 中性ゲル (S1A1)上では神経幹細胞は 3 系統に分化する。ポリスチレン培養皿上と比べ、神経細胞分化、アストロサイト分化は亢進し、オリゴデンドロサイトへの分化は抑制された。アストロサイト分化は Jak/Stat 経路の活性化の活性化が示唆された。オリゴデンドロサイト分化の抑制は Olig2 の発現低下が関与した可能性が示唆された。

以上の結果から、中性ゲル (S1A1)は neuronal tissue engineering における新たな scaffold の素材となる可能性が示された。

謝辞

本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室田中伸哉教授に深く感謝致します。また、適切な助言と直接の御指導を賜りました仙葉愼吾先生、津田真寿美先生、近藤亨先生、野々山貴之先生、龔剣萍先生に心から感謝致します。

最後に、本研究に当たってご指導･ご協力を頂いた、腫瘍病理学教室の全ての皆様に、心よりお礼申し上げます。

【引用文献】

1. Thomas, E. D., Lochte Jr, H. L., Lu, W. C. & Ferrebee, J. W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *The New England journal of medicine* **257,** 491–496 (1957).
2. Reznikoff, C. a, Brankow, D. W. & Heidelberger, C. Establishment and Characterization of a Cloned Line of C3H Mouse Embryo Cells Sensitive to Postconfluence Inhibition of Division Establishment and Characterization of a Cloned Line of C3H Mouse Embryo Cells Sensitive to Postconfluence Inhibition of. *Cancer Res.* **33,** 3231–3238 (1973).
3. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292,** 154–156 (1981).
4. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126,** 663–676 (2006).
5. Temple, S. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature* **340,** 471–473 (1989).
6. Reynolds, B. A. & Weiss, S. Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science (80-.).* **255,** 1707–1710 (1992).
7. Palmer, T. D., Takahashi, J. & Gage, F. H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **8,** 389–404 (1997).
8. 平成28年版 高齢社会白書（全体版）.
9. 平成26年患者調査の概況.
10. 平成28年人口動態統計（確定数）の概況.
11. Lindvall, O., Backlund, E. -O, Farde, L., Sedvall, G., Freedman, R., Hoffer, B., Nobin, A., Seiger, Åk. & Olson, L. Transplantation in Parkinson's disease: Two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Annals of Neurology* **22,** 457–468 (1987).
12. Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Magotani, H., Onoe, H., Hayashi, T.,

Mizuma, H., Takara, S., Takahashi, R., Inoue, H., Morita, S., Yamamoto, M., Okita, K., Nakagawa, M., Parmar, M. & Takahashi, J. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* **548,** 592–596 (2017).

13. Kondziolka, D., Steinberg, G. K., Wechsler, L., Meltzer, C. C., Elder, E., Gebel, J., DeCesare, S., Jovin, T., Zafonte, R., Lebowitz, J., Flickinger, J. C., Tong, D., Marks, M. P., Jamieson, C., Luu, D., Bell-Stephens, T. & Teraoka, J. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a Phase 2 randomized trial. *J. Neurosurg.* **103,** 38–45 (2005).
14. Bang, O. Y., Lee, J. S., Lee, P. H. & Lee, G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.* **57,** 874–882 (2005).
15. Honmou, O., Houkin, K., Matsunaga, T., Niitsu, Y., Ishiai, S., Onodera, R., Waxman, S. G. & Kocsis, J. D. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain* **134,** 1790–1807 (2011).
16. Battistella, V., de Freitas, G. R., da Fonseca, L. M. B., Mercante, D., Gutfilen, B., Goldenberg, R. C., Vieira Dias, J., Kasai-Brunswick, T. H., Wajnberg, E., Rosado-de-Castro, P. H., Alves-Leon, S. V, Mendez-Otero, R. & Andre, C. Safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with nonacute ischemic stroke. *Regen. Med.* **6,** 45–52 (2011).
17. Lindvall, O. & Björklund, A. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx* **1,** 382–93 (2004).
18. Fricker-Gates, R. A., Shin, J. J., Tai, C. C., Catapano, L. A. & Macklis, J. D. Late-stage immature neocortical neurons reconstruct interhemispheric connections and form synaptic contacts with increased efficiency in adult mouse cortex undergoing targeted neurodegeneration. *J Neurosci* **22,** 4045–4056 (2002).
19. Bersano, A., Ballabio, E., Lanfranconi, S., Boncoraglio, G. B., Corti, S., Locatelli, F., Baron, P., Bresolin, N., Parati, E. & Candelise, L. Clinical studies in stem cells transplantation for stroke: a review. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **8,** 29–34 (2010).

20. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science (80-.).* **260,** 920–926 (1993).
21. Richardson, J. B., Caterson, B., Evans, E. H., Ashton, B. A. & Roberts, S. Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J. Bone Joint Surg. Br.* **81,** 1064–1068 (1999).
22. Hernon, C., Dawson, R., Freedlander, E., Short, R., Haddow, D. B., Brotherston, M. & MacNeil, S. Clinical experience using cultured epithelial autografts leads to an alternative methodology for transferring skin cells from the laboratory to the patient. *Regen. Med.* **1,** 809–821 (2006).
23. Atala, A., Bauer, S. B., Soker, S., Yoo, J. J. & Retik, A. B. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* **367,** 1241–1246 (2006).
24. Badylak, S. F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl. Immunol.* **12,** 367–377 (2004).
25. Piez, K. A. History of extracellular matrix: A personal view. *Matrix Biol.* **16,** 85–92 (1997).
26. Robert, L. Matrix biology: Past, present and future. *Pathol. Biol.* **49,** 279–283 (2001).
27. Chan, B. P. & Leong, K. W. Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *Eur. Spine J.* **17,** 467–479 (2008).
28. Skop, N. B., Calderon, F., Cho, C. H., Gandhi, C. D. & Levison, S. W. Improvements in biomaterial matrices for neural precursor cell transplantation. *Mol. Cell. Ther.* **2,** 19 (2014).
29. Frisch, S. M. & Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interaction induces apoptosis. *J. Cell. Biol.* **124,** 619–626 (1994).
30. Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V. & Janmey, P. A. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60,** 24–34 (2005).
31. Curtis, A. S. G., Forrester, J. V., McInnes, C. & Lawrie, F. Adhesion of cells to polystyrene surfaces. *J. Cell Biol.* **97,** 1500–1506 (1983).

32. Yamada, K. M., Yamada, S. S. & Pastan, I. Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness, and contact inhibition of movement to transformed fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73,** 1217–1221 (1976).
33. Pierschbacher, M. D. & Ruoslahti, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309,** 30–33 (1984).
34. Ido, H., Nakamura, A., Kobayashi, R., Ito, S., Li, S., Futaki, S. & Sekiguchi, K. The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin ?? chains in integrin binding by laminins. *J. Biol. Chem.* **282,** 11144–11154 (2007).
35. Bondar, O. V., Saifullina, D. V., Shakhmaeva, I. I., Mavlyutova, I. I. & Abdullin, T. I. Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta Naturae* **4,** 78–81 (2012).
36. Mazia, D., Schatten, G. & Sale, W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine: Applications to electron microscopy. *J. Cell Biol.* **66,** 198–200 (1975).
37. Lee, J. H., Jung, H. W., Kang, I.-K. & Lee, H. B. Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups. *Biomaterials* **15,** 705–711 (1994).
38. Arima, Y. & Iwata, H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* **28,** 3074–3082 (2007).
39. Jenkins, A. D., Kratochvíl, P., Stepto, R. F. T. & Suter, U. W. Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl. Chem.* **68,** 2287–2311 (1996).
40. 廣川能嗣．共焦点レーザースキャン顕微鏡法による高分子ゲルの構造解析．高分子 **48,** 400–403 (1999).
41. 田畑泰彦．ハイドロゲル．再生医療 **11,** 57–59 (2012).
42. Caló, E. & Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* **65,** 252–267 (2015).

43. Bierbrauer, F. Hydrogel drug delivery ：Diffusion models. *Sch. Math. Appl. Stat. Univ. Wollongong, Aust.* 1–31 (2005).
44. Place, E. S., George, J. H., Williams, C. K. & Stevens, M. M. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chem. Soc. Rev.* **38,** 1139–1151 (2009).
45. Nisbet, D. R., Crompton, K. E., Horne, M. K., Finkelstein, D. I. & Forsythe, J. S. Neural tissue engineering of the CNS using hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **87,** 251–263 (2008).
46. Ta, H. T., Dass, C. R. & Dunstan, D. E. Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy. *J. Control. Release* **126,** 205–216 (2008).
47. Peng, H. T. & Shek, P. N. Development of in situ-forming hydrogels for hemorrhage control. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **20,** 1753–1762 (2009).
48. Yasuda, K., Kitamura, N., Gong, J. P., Arakaki, K., Kwon, H. J., Onodera, S., Chen, Y. M., Kurokawa, T., Kanaya, F., Ohmiya, Y. & Osada, Y. A novel double-network hydrogel induces spontaneous articular cartilage regeneration in vivo in a large osteochondral defect. *Macromol. Biosci.* **9,** 307–316 (2009).
49. Tate, M. C., Shear, D. A., Hoffman, S. W., Stein, D. G., Archer, D. R. & LaPlaca, M. C. Fibronectin promotes survival and migration of primary neural stem cells transplanted into the traumatically injured mouse brain. *Cell Transplant.* **11,** 283–295 (2002).
50. Yu, H., Cao, B., Feng, M., Zhou, Q., Sun, X., Wu, S., Jin, S., Liu, H. & Lianhong, J. Combinated Transplantation of Neural Stem Cells and Collagen Type I Promote Functional Recovery After Cerebral Ischemia in Rats. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* **293,** 911–917 (2010).
51. Wang, J. Y., Liou, A. K. F., Ren, Z. H., Zhang, L., Brown, B. N., Cui, X. T., Badylak, S. F., Cai, Y. N., Guan, Y. Q., Leak, R. K., Chen, J., Ji, X. & Chen, L. Neurorestorative effect of urinary bladder matrix-mediated neural stem cell transplantation following traumatic brain injury in rats. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **12,** 413–425 (2013).
52. Park, K. I., Teng, Y. D. & Snyder, E. Y. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat. Biotechnol.* **20,** 1111–1117 (2002).

53. Nakashima, K. Synergistic Signaling in Fetal Brain by STAT3-Smad1 Complex Bridged by p300. *Science (80-.).* **284,** 479–482 (1999).
54. Setoguchi, T. & Kondo, T. Nuclear export of OLIG2 in neural stem cells is essential for ciliary neurotrophic factor-induced astrocyte differentiation. *J. Cell Biol.* **166,** 963–968 (2004).
55. Wang, T., Yuan, W., Liu, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Zhou, X., Ning, G., Zhang, L., Yao, L., Feng, S. & Kong, X. The role of the JAK-STAT pathway in neural stem cells , neural progenitor cells and reactive astrocytes after spinal cord injury (Review). *Biomed. Reports* **3,** 141–146 (2015).
56. Lu, Q. R., Yuk, D. I., Alberta, J. A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A. P., Stiles, C. D. & Rowitch, D. H. Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **25,** 317–329 (2000).
57. Takebayashi, H., Yoshida, S., Sugimori, M., Kosako, H., Kominami, R., Nakafuku, M. & Nabeshima, Y. I. Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: Implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3. *Mech. Dev.* **99,** 143–148 (2000).
58. Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. & Kissel, T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **24,** 1121–1131 (2003).
59. Webb, K., Hlady, V. & Tresco, P. A. Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization. *J. Biomed. Mater. Res.* **41,** 422–430 (1998).
60. Sriram, K., Benkovic, S. A., Hebert, M. A., Miller, D. B. & O'Callaghan, J. P. Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: Key signaling pathway for ast. *J. Biol. Chem.* **279,**

19936–19947 (2004).

61. Ortega, J. A., Radonjić, N. V. & Zecevic, N. Sonic hedgehog promotes generation and maintenance of human forebrain Olig2 progenitors. *Front. Cell. Neurosci.* **7,** 1–12 (2013).
62. Agius, E., Soukkarieh, C., Danesin, C., Kan, P., Takebayashi, H., Soula, C. & Cochard, P. Converse control of oligodendrocyte and astrocyte lineage development by Sonic hedgehog in the chick spinal cord. *Dev. Biol.* **270,** 308–321 (2004).
63. Butcher DT, Alliston T, W. V. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* **9,** 108–122 (2009).
64. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126,** 677–689 (2006).
65. Saha, K., Keung, A. J., Irwin, E. F., Li, Y., Little, L., Schaffer, D. V. & Healy, K. E. Substrate Modulus Directs Neural Stem Cell Behavior. *Biophys. J.* **95,** 4426–4438 (2008).
66. Levental, I., Georges, P. C. & Janmey, P. A. Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* **3,** 299–306 (2007).
67. Gefen, A. & Margulies, S. S. Are in vivo and in situ brain tissues mechanically similar? *J. Biomech.* **37,** 1339–1352 (2004).
68. Roca-Cusachs, P., Conte, V. & Trepat, X. Quantifying forces in cell biology. *Nat. Cell Biol.* **19,** 742–751 (2017).
69. Takahashi, S., Izawa, Y. & Suzuki, N. Astrogliopathy as a loss of astroglial protective function against glycoxidative stress under hyperglycemia. *Rinsho Shinkeigaku* **52,** 41–51 (2012).
70. Puchowicz, M. A., Zechel, J., Valerio, J., Emancipator, D., Xu, K., Pundik, S., LaManna, J. C. & Lust, W. D. Neuroprotection in Diet Induced Ketotic Rat Brain Following Focal Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **28,** 1907–1916 (2008).
71. Ren, T. J., Qiang, R., Jiang, Z. L., Wang, G. H., Sun, L., Jiang, R., Zhao, G. W. & Han, L. Y. Improvement in Regional CBF by L-Serine Contributes to Its Neuroprotective Effect in Rats after Focal Cerebral Ischemia. *PLoS One* **8,** e67044 (2013).
72. Shinozaki, Y., Shibata, K., Yoshida, K., Shigetomi, E., Gachet, C.,

Ikenaka, K., Tanaka, K. F. & Koizumi, S. Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation. *Cell Rep.* **19,** 1151–1164 (2017).

73. Bellail, A. C., Hunter, S. B., Brat, D. J., Tan, C. & Van Meir, E. G. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36,** 1046–1069 (2004).
74. McKeon, R. J., Schreiber, R. C., Rudge, J. S. & Silver, J. Reduction of Neurite Outgrowth in a Model of Glial Scarring Following CNS Injury Is Correlated With the Expression of Inhibitory Molecules on Reactive Astrocytes. *J. Neurosci.* **11,** 3398–3411 (1991).
75. Bonneh -Barkay, D. & Wiley, C. Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathol.* **19,** 573–585 (2009).
76. Yang, C. Y., Song, B., Ao, Y., Nowak, A. P., Abelowitz, R. B., Korsak, R. A., Havton, L. A., Deming, T. J. & Sofroniew, M. V. Biocompatibility of amphiphilic diblock copolypeptide hydrogels in the central nervous system. *Biomaterials* **30,** 2881–2898 (2009).
77. Davies, J. E., Pröschel, C., Zhang, N., Noble, M., Mayer-Pröschel, M. & Davies, S. J. Transplanted astrocytes derived from BMP- or CNTF-treated glial-restricted precursors have opposite effects on recovery and allodynia after spinal cord injury. *J. Biol.* **7,** 24 (2008).