

新規開発したゲルを用いて脳の神経組織の再構築に成功

～将来の脳損傷の新治療法開発への貢献に期待～

ポイント

- ・神経幹細胞を培養可能なゲルの作製に成功。
- ・マウスの脳内にゲルを埋め込み、その後神経幹細胞を注入することで脳組織を創出。
- ・将来の脳損傷治療へ繋がる基礎技術となることを期待。

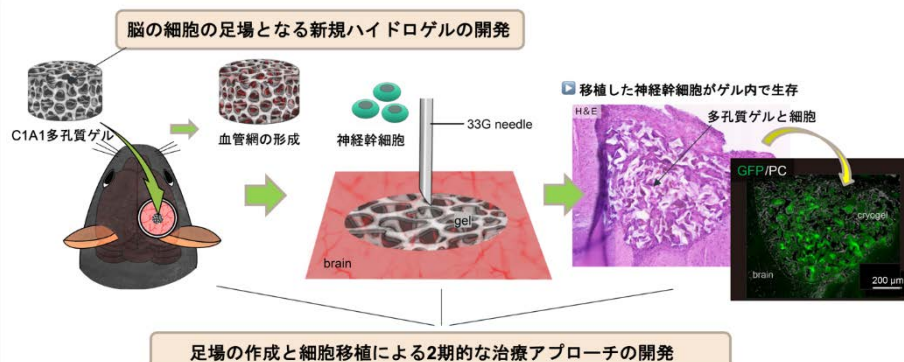
概要

北海道大学大学院医学研究院、同大学創成研究機構化学反応創成研究拠点（WPI-ICReDD）の田中伸哉教授、同大学大学院医学研究院の谷川 聖客員研究員、同大学大学院先端生命科学研究院の龔剣萍教授らの研究グループは、ハイドロゲル（以下ゲル）をマウスの脳の欠損部に埋めて、その後神経幹細胞をゲル内に注入することで脳組織を再構築させる技術を開発しました。

近年、再生医療が進んでいますが、頭部の外傷、脳梗塞、脳腫瘍摘出などで脳を大きく損傷した場合、脳組織は自然に再生しません。その原因は脳に存在する細胞は損傷部分を埋めるいわゆる”カサブタ”の役割を果たす細胞の足場が作成できないこと、そして神経細胞自身が増殖する能力に乏しいことです。その結果、損傷した部分では空洞ができてしまい、脳組織にある神経細胞やグリア細胞が移動したり、血管を伸ばしたりできなくなってしまう。そこで研究グループは、脳の空洞にゲルを充填して、細胞の足場を作ることで、神経組織を再構築する技術を開発しました。

まず、神経系の細胞の元となる神経幹細胞がよく接着して足場にできるゲルを作りました。ゲルの元となる正電荷を持つ単量体と負電荷を持つ単量体を様々な割合で混ぜ、重合させて調べたところ、1:1で等量混合したゲル（C1A1ゲル）に神経幹細胞が接着しました。このC1A1ゲルをベースに細胞が潜り込める孔を無数に開けた構造C1A1多孔質ゲルを作りました。続いて、脳損傷モデルとしてマウスの脳に直径1mmの空洞を開け、この空洞部にC1A1多孔質ゲルを埋め込みました。約2週間で、埋めたゲルの中には周囲の脳組織から血管が延びてきて、さらにマクロファージなどの炎症細胞が移動してきました。血管網が形成された後、ゲル内に神経幹細胞を注入すると、約3週間後には神経細胞やグリア細胞が血管網の中に確認され、ゲルを足場とした神経組織の再構築に成功しました。

なお、本研究成果は、2023年2月14日（火）公開のScientific Reports誌にオンライン掲載されました。



本研究の概要図

【背景】

近年、再生医療が発展しており、軟骨・皮膚・肝臓など様々な臓器の再生方法が報告され医療応用されてきていますが、脳の再生は未だ困難です。脳は一度大きく損傷すると空洞ができてしまい、細胞が増えるための足場を失うためです。

脳は生きていくためにとても大事な臓器です。頭部の外傷、脳梗塞、脳腫瘍摘出後など、傷害の場所によっては重大な障害が生じます。脳組織の再生のために様々な方法が試されていますが、未だ医療応用されている方法がないのが現状です。個々の神経系の細胞の再生は iPS 細胞などを用いて報告されてきていますが、組織構築の再生法は確立されていないのが現状です。今回、研究グループは脳に生じた空洞をゲルで埋めて、「ゲルが細胞の足場を作ることで脳組織が再生する」という仮説を立て、検証しました。

【研究手法】

マウス由来の神経幹細胞の培養に最適なゲルを、ゲルの荷電に着目して作りました。これが C1A1 ゲルです。次に、その C1A1 ゲルを細胞が潜り込める孔が無数に開いた構造にします。この C1A1 多孔質ゲルは、凍結させて作るためクライオゲルとも呼ばれます。

そして、脳損傷モデルマウスの脳の空隙にこのゲルを埋め込み、さらに約 2 週間後、ゲルの内部に神経幹細胞を注入しました。宿主由来の細胞の侵入や血管形成の有無、さらに移植した細胞の生存について、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、2 光子顕微鏡を用いて多孔質ゲルの内部を観察し評価しました。

【研究成果】

1) マウスの神経幹細胞の培養に最適化したゲルの作製

細胞とゲルの接着に関係すると考えられるゲルの荷電状態に着目して、正と負に荷電したゲルの構成成分の単量体を様々な割合で混合したゲルを作製して検討したところ、正荷電と負荷電をちょうど 1 : 1 で混合して作製した C1A1 (Cation 1 : Anion 1) ゲルが神経幹細胞培養に最適なことを見出しました (図 1)。この C1A1 ゲルを凍らせながら作成する手法 (クライオゲル化) によって、多数の細胞が潜り込めるような約 100 ミクロンまでの大きさの孔を作りました (C1A1 多孔質ゲル)。C1A1 多孔質ゲルを用いて *in vitro*^{*1} で神経幹細胞を培養すると神経細胞とグリア細胞に分化し 3 次元構造を形成することを確認しました (図 2)。

2) マウス脳損傷モデルの作製とゲルの埋め込みによる血管網の形成

アスピレーターを用いてマウスの脳を直径約 1 mm の円柱状に欠損させる新たな疾患モデルを確立し、そこに C1A1 多孔質ゲルを充填しました (図 3)。移植したゲルの内部には宿主由来の神経細胞、グリア細胞も移動していき、神経細胞も突起をゲルの中へ伸ばしていきます (図 4)。また血管内皮細胞増殖因子をゲルにあらかじめ浸しておくことで、約 2-3 週間で周囲の正常脳組織からゲルの内部に向かって血管が伸びて血管網が形成されます (図 5)。

3) C1A1 多孔質ゲル内へ神経幹細胞を注入することで神経組織を再構築する

ゲルの周囲からゲル内に突起を伸ばす神経細胞が少数のため、ゲルを埋め込んでから約 3 週間後、十分な血管網がゲル内に広がったタイミングで、GFP でラベルした神経幹細胞 10 万個をゲルの中にシリンジで注入しました (図 6)。その後、約 3 週間後にマウスの脳を取り出してゲルの内部を調べたところ、移植細胞の多くが生存しており、蛍光抗体法では β チュブリン陽性の神経細胞、GFAP 陽性のグリア細胞への分化が一部で確認されました (図 7)。ゲル内では宿主由来の細胞と移植細胞が混在して存在し、脳組織の再構成が確認できました。

【今後への期待】

今回の研究結果から、脳の損傷後に空洞ができた場合でも C1A1 多孔質ゲルを埋め込むことで周囲からグリア細胞が侵入してきて、さらに血管網も形成されることが判明しました。その後さらに時間をおいて神経幹細胞を注入することで、移植細胞が定着することが分かりました。ゲルの中で神経組織が再構成されたことにより、ゲルが神経組織再構築の足場として有用であると考えられます。

次の段階では、マウスの脳損傷による運動神経障害などの機能障害をゲルで治療することができれば将来の実用性に近づくことが期待されます。

論文情報

論文名	Engineering of an electrically charged hydrogel implanted into a traumatic brain injury model for stepwise neuronal tissue reconstruction (荷電ハイドロゲルによる外傷性脳損傷モデルに対する段階的脳組織再構築)
著者名	谷川 聖 ^{1, 2} 、戎 優樹 ¹ 、Tomáš Sedláčik ³ 、仙葉慎吾 ¹ 、野々山貴行 ³ 、黒川孝幸 ³ 、廣田 聡 ² 、高橋泰伽 ⁴ 、山口和志 ⁴ 、今城正道 ² 、加藤日奈子 ³ 、西村拓哉 ³ 、種井善一 ¹ 、津田真寿美 ^{1, 2} 、根本知己 ⁴ 、龔 劍萍 ^{2, 3} 、田中伸哉 ^{1, 2} (1北海道大学大学院医学研究院、2北海道大学化学反応創成研究拠点 (WPI-ICReDD)、3北海道大学大学院先端生命科学研究所、4自然科学研究機構生理学研究所)
雑誌名	Scientific Reports (SpringerNature 社が発行する自然科学・生物学・医工学の専門誌)
D O I	10.1038/s41598-023-28870-z
公表日	2023年2月14日(火)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院医学研究院/化学反応創成研究拠点(ICReDD) 教授 田中伸哉 (たなかしんや)
T E L 011-706-5052 F A X 011-706-5902 メール tanaka@med.hokudai.ac.jp
U R L (医学研究院) <http://patho2.med.hokudai.ac.jp>
(ICReDD) <https://www.icredd.hokudai.ac.jp>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)
T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

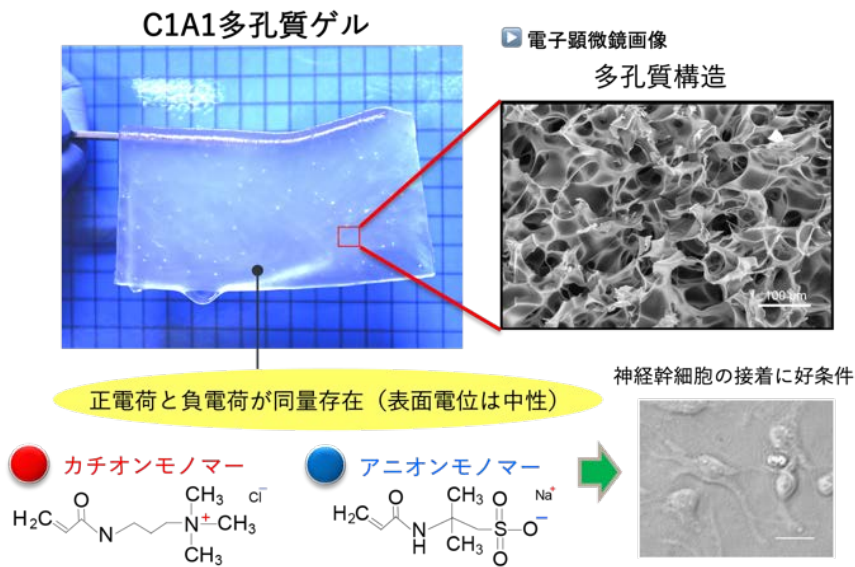


図 1. C1A1 ゲルの構成成分。正荷電の単量体（赤）、負荷電の単量体（青）。電子顕微鏡でみると多数の孔が確認できる。

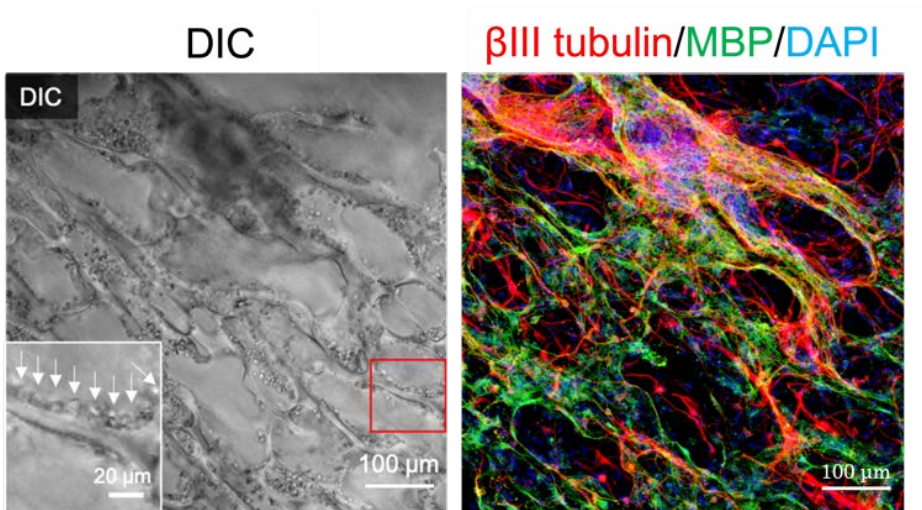


図 2. C1A1 多孔質ゲルに接着する細胞（左）およびゲル内部で 3 次元構造を形成する神経細胞（赤）とグリア細胞（緑）（右）

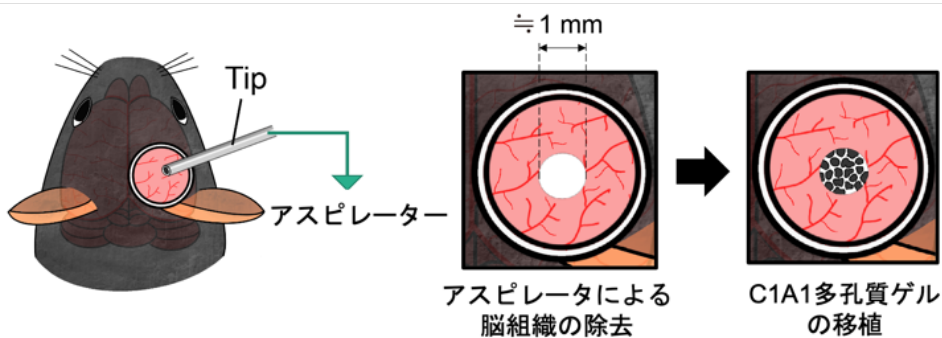


図 3. マウス脳損傷モデルの作製と C1A1 多孔質ゲルの埋植の模式図。脳欠損は頭蓋骨を円形にくり抜いて脳を吸引することで作製する。

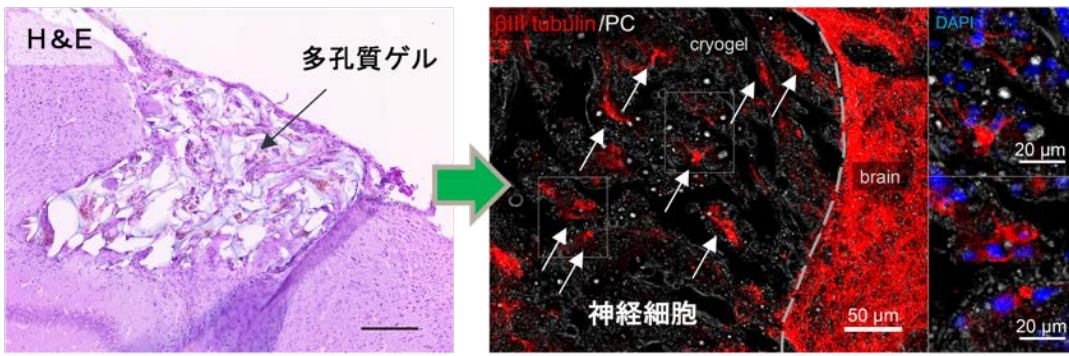


図 4. C1A1 多孔質ゲルの内部に宿主由来の細胞が侵入している。

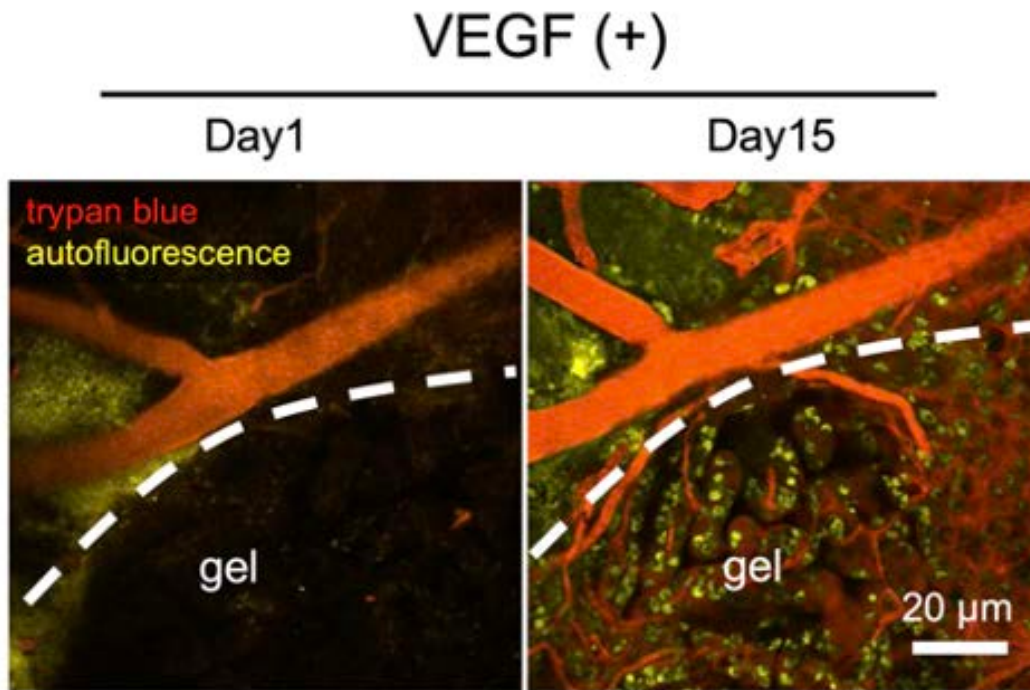


図 5. C1A1 多孔質ゲル内へ周囲の脳組織から血管が侵入する。2 光子顕微鏡画像。

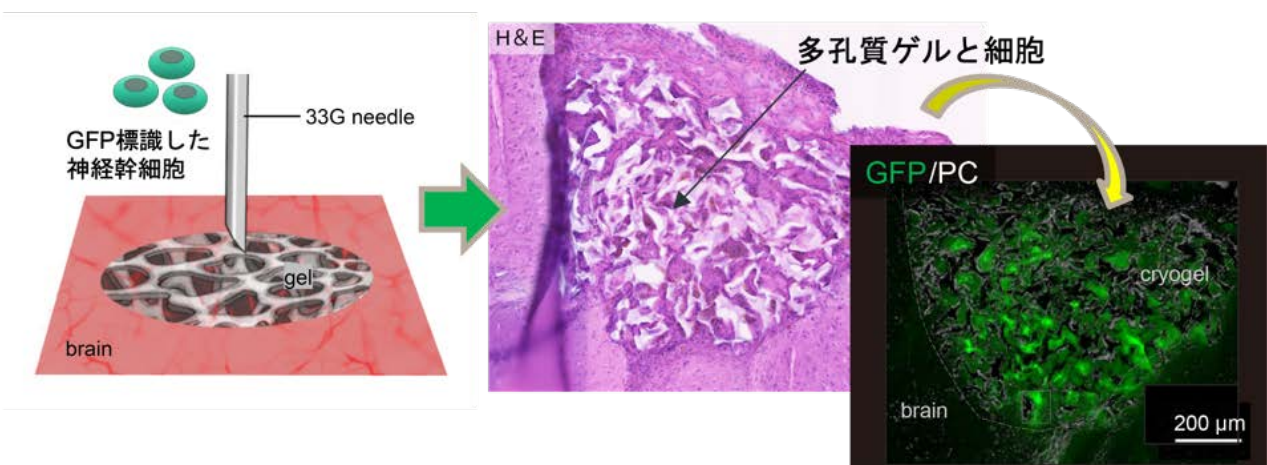


図 6. クライオ C1A1 ゲルの内へ神経幹細胞を注入する模式図 (左図)。移植 3 週間後、注入された細胞の生存を確認 (右)。

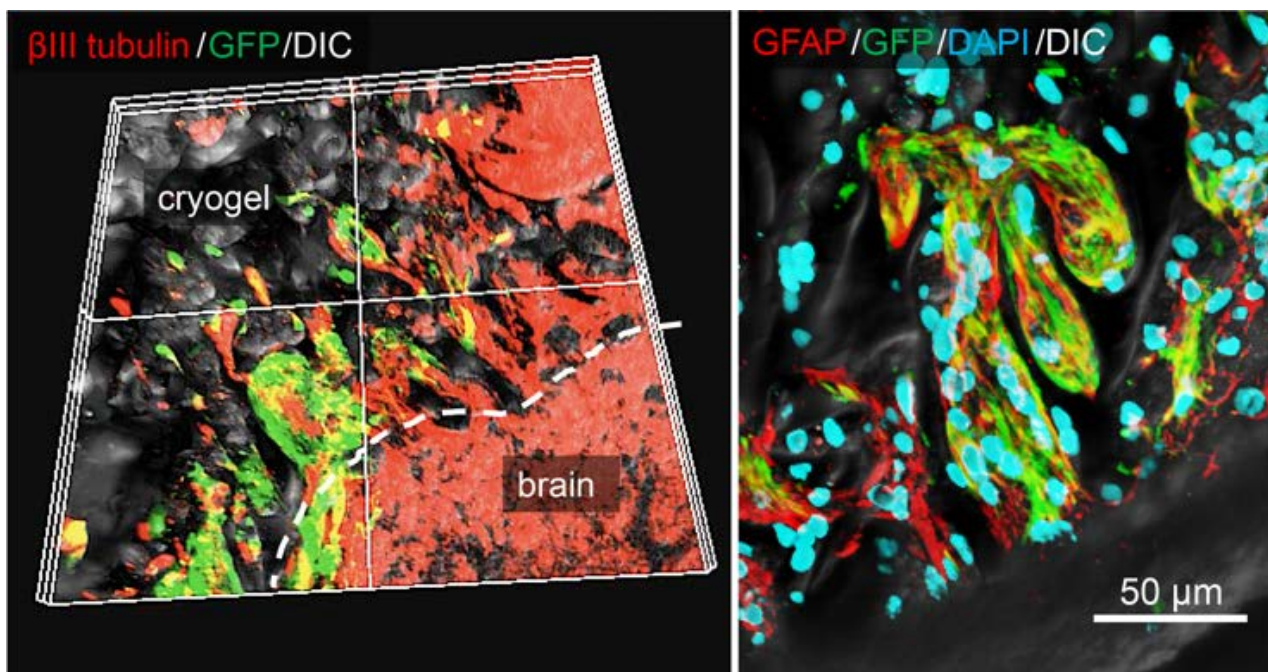


図 7. 移植した神経幹細胞の神経細胞への分化 (左) およびアストロサイトへの分化 (右)。

【用語解説】

*1 *in vitro* … 試験管内で、シャーレの上で。生体外での実験という意味。それに対して、生物の生体内での実験は *in vivo* と称する。

【WPI-ICReDD について】

ICReDD (Institute for Chemical Reaction Design and Discovery, アイクレッド) は、文部科学省国際研究拠点形成促進事業費補助金「世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI)」に採択され、2018 年 10 月に本学に設置されました。WPI の目的は、高度に国際化された研究環境と世界トップレベルの研究水準の研究を行う「目に見える研究拠点」の形成であり、ICReDD は国内にある 14 の研究拠点の 1 つです。

ICReDD では、拠点長の下、計算科学、情報科学、実験科学の 3 つの学問分野を融合させることにより、人類が未来を生き抜く上で必要不可欠な「化学反応」を合理的に設計し制御を行います。さらに化学反応の合理的かつ効率的な開発を可能とする学問、「化学反応創成学」という新たな学問分野を確立し、新しい化学反応や材料の創出を目指しています。

