

## 論文の内容の要旨

論文題目     マイクロデバイスを利用した分化誘導神経系発達・  
機能発現過程の評価

氏   名     榛葉 健太

神経系細胞を用いた再生医療は、多能性幹細胞から分化誘導した神経系細胞を患部に移植することにより、失った機能の回復や疾患の根治を目指す治療法である。中枢神経系の神経細胞は再生能力が低いため、疾患により失った神経細胞が自発的に補填される可能性は低い。従来の中枢神経疾患に対する治療法では、薬剤の投与により病態の進行を抑制することやリハビリテーションにより疾患で失った機能を別の領域で代替することが意図されていた。しかし、従来の治療法では、疾患進行の抑制や機能の代替は可能でも、疾患の根治は困難であった。一方、再生医療では、新たな神経系細胞を移植することにより、移植細胞が放出する成長因子による内在性細胞の機能改善や神経細胞の補填による機能の回復が意図される。成功した場合に期待される治療効果から、再生医療による中枢神経患の根治が期待されている。

人工多能性幹 (induced pluripotent stem; iPS) 細胞を用いた再生医療が実現した場合、治療は5つのステップにより構成される。以下に、それぞれのステップの概要と課題について述べる。1つ目のステップは、iPS細胞の樹立・収集である。本ステップでは、転写因子により体細胞を初期化しiPS細胞を樹立する。その後、樹立したiPS細胞を凍結保存し、収集する。本ステップで重要な点は、移植に適用できる品質のiPS細胞の樹立と、適用範囲が広いiPS細胞の収集である。2つ目のステップは、iPS細胞の分化誘導である。発生過程を模擬することにより、様々な種類の神経細胞への分化誘導法が開発されている。一方で、iPS細胞の株ごとに分化誘導条件を最適化する場合には、より制御性に優れた分化誘導手法が求められる。しかし、精密に制御された時間窓で、培養液に誘導因子を添加することは困難である。また、従来手法では、複数の条件の網羅的解析には、多大なコストがかかる。そこで、制御性に優れ、一度に多くの条件検討が可能な分化誘導手法の開発が重要である。3つ目のステップは、分化誘導した細胞の機能評価である。iPS細胞から神経細胞を分化誘導した場合、臨床の場において用いる前に、機能評価を行う必要がある。中枢神経系において移植した神経細胞が獲得すべき機能とは、周囲の神経細胞と協調動作し、脳の機能を

維持することである。しかし、成熟に長期間を要するヒト細胞について、神経回路網レベルから分子レベルまでのスケールで機能評価を行った例はない。4つ目のステップは、移植細胞の純化である。腫瘍形成や移植片の壊死を防ぐため、移植に用いる細胞集団から、未分化細胞や目的外の細胞を除外する必要がある。現在、純化に有用な表面抗体の開発が精力的に行われている。5つ目のステップは、移植である。再生医療においては、移植細胞が神経細胞に分化し、ホスト回路網と結合することが肝要である。しかし、患部の環境は通常の培養皿とは異なるため、環境の違いが移植治療を困難にする可能性がある。細胞の移植と同時に薬剤等による補助が必要になることが考えられる。補助的な治療法の最適化には、移植環境を模擬した実験系を用いることが有効である。

以上の背景から、中枢神経系に対する再生医療の実現に向けた課題として、幹細胞の精密な分化誘導法の開発、分化した細胞の回路網レベルや分子レベルでの機能評価手法の開発、および移植を模擬した実験系の構築が挙げられる。上記の課題に対しては、工学分野の技術を応用することが有効な解決策であると考えられる。そこで、本研究では、神経再生医療の実現に向けて、幹細胞から神経系細胞までの分化過程、神経系細胞の発達過程、および幹細胞由来の神経組織とホスト組織の間に形成される機能的な結合について、工学的アプローチから評価および制御を行う技術を提供することを目的とした。目的を達成するために、ヒトiPS細胞および神経系細胞におけるCa変動の可視化、発達段階に依存した活動パターン変化の評価、活動パターンに依存した伝導速度変化の評価、および再生医療モデルの開発を行った。以下に、本研究で得られた結果を述べる。

物理的刺激を用いた分化誘導法の開発を目指し、未分化状態および分化初期のヒト iPS 細胞において起こる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変動 (Ca 変動) を可視化した。前脳背側の神経系細胞への分化過程において Ca imaging を行った結果、分化誘導前および3日目では、個々の細胞が独立に Ca 変動を示す様子が観察された。6日目には、個々の細胞の Ca 変動ではなく、Ca wave の発生が観察された。Ryanodine 受容体の阻害下においても Ca wave が発生したこと、および IP3 受容体の阻害下で Ca wave が発生しなかったことから、IP3 受容体が Ca wave の伝播に重要であることが示された。以上から、ヒト多能性幹細胞が神経分化過程において Ca 変動のパターンを変化させることが示唆された。さらに、未分化状態のヒト iPS 細胞に対して、核染色画像を用いた細胞周期解析と Ca imaging を行った。結果、G2/M 期の細胞の割合が高い細胞集団においては、Ca 変動を示す細胞の割合が有意に低かった。また、未分化状態の iPS 細胞において発生する Ca 変動は、IP3 の産生を阻害する U73122 の添加により発生頻度が有意に低下した。以上から、ヒト iPS 細胞において、細胞周期のステージに依存して Ca 変動が発生することが示唆された。

発達段階に依存したヒト iPS 細胞由来神経細胞の活動パターン変化の評価を行った。最初に、従来手法である微小電極アレイ (microelectrode array; MEA) を用いて 50 日目から

280日目まで10日ごとに自発活動を計測した。結果、70日目において長い持続時間とバースト間隔を有する活動パターンが観測された。また、日数の経過に伴い、同期バーストの持続時間とバースト間隔が減少傾向を示し、バーストの発生頻度と全スパイクに対するバースト内のスパイク数の比は増加傾向を示した。同期バーストの変化の過程は、マウスやラットの初代培養神経細胞を評価した先行研究と同様の傾向を示した。さらに、提案手法である axon MEA を用いて60日目から10日ごとに自発活動を計測したところ、70日目において、従来手法を用いて観察されたパターンと同様の同期バーストが、全ての試料で観察された。また、axon MEA を用いることで、従来手法と比較して多くの電極から活動を計測できることが示された。以上より、成熟に長期間を要するヒト細胞の神経回路網レベルでの機能評価において、MEA を用いた細胞外電位計測が有効であることが示された。

MEA を用いて軸索における伝導を計測することで、従来手法で取得できる発火時刻の情報に加えて、伝導時間と方向の情報を取得可能である。無髄線維では軸索の直径やイオンチャネルの密度に応じて伝導時間が決まるため、伝導時間を評価することで細胞内のタンパク質発現を反映した情報を得られることが期待される。そこで、自発活動および電気刺激に対する応答から、大脳皮質神経細胞 (cortical neuron; CX) の活動パターンに依存した伝導時間の変化を評価した。最初に、自発活動から軸索を伝導する活動を検出し、バースト活動による伝導時間の変化を評価したところ、バースト活動に応じて軸索の伝導時間が増加することが示された。また、伝導時間の変化率は、培養日数に応じて変化した。次に、軸索に対して連続的な電気刺激を印加したところ、刺激に応じて伝導時間が増加した。h 電流を阻害した条件では、伝導時間の増加率が高い傾向が観察された。また、100 Hz の頻度で200回刺激した場合には、刺激の影響から回復するまでに50秒を要した。次に、様々な頻度で刺激を印加した結果、20 Hz で刺激した際に、75番目の刺激までは低い頻度で刺激した場合と比較して伝導時間の変化が小さいという結果が得られた。また、上記の刺激頻度依存性は、h 電流の阻害によって観測されなくなった。以上より、ヒト細胞のサブ細胞レベルでの機能評価において、MEA を用いた軸索からの活動計測が有効であることが示された。

神経系細胞の移植を模擬した実験系の構築を目指し、多能性幹細胞由来の神経回路網と初代培養神経回路網間の結合形成に伴う同期活動の変化を評価した。最初に、多能性幹細胞由来の神経系細胞のモデル細胞である P19 細胞由来神経細胞 (P19 cell-derived neuron; P19-neuron) と CX を ring MEA 内で共培養した。Calcein を用いた染色から、両細胞が互いに軸索を投射したことを示した。次に、共培養の条件を変えることにより、伝導を指標として細胞体が存在する区画を識別可能であることを示した。続いて、発達過程におけるクラスタ数の変化を評価した。結果、CX のクラスタは、14日目まで増加傾向を示した後、減少傾向を示した。一方、P19-neuron のクラスタは8日目において初めて検出され、20

日目まで増加傾向を示した。また、神経回路網間における同期率を評価することにより、両者のクラスタの数が増加した時期から、神経回路網全体での同期活動の割合が上昇したことが示された。以上より、軸索から計測された活動を指標とすることで、結合の形成過程を定量的に評価できることが示唆された。さらに、マウス iPS 細胞由来神経細胞 (mouse iPS cell-derived neuron; miPS-neuron) と CX を共培養した。miPS-neuron が発現した緑色蛍光タンパク質を観察したところ、神経突起が CX 側の区画まで伸長したことが確認できた。また、軸索から計測した活動においては、5 日目では CX からの伝導のみが観察されたが、10 日目には同一の微小トンネルから双方向の伝導が観察された。以上から、細胞培養系における共培養が、移植細胞とホスト細胞の機能的結合の評価に有効であることが示された。

以上の結果が得られたことから、設定した 4 点の検討課題に対する研究を基に、幹細胞から神経系細胞までの分化過程、神経系細胞の発達過程、および幹細胞由来の神経組織とホスト組織の間に形成される機能的な結合について、工学的アプローチから評価を行う技術が実現され、神経系の疾患に対する再生医療の実現に向けて有用な知見が得られる可能性を示した。