

ECM模倣基材と薄層ゲル培養系を併用した神経毒性バイオアッセイデバイス構築に関する研究

水町, 秀之

<https://hdl.handle.net/2324/1500690>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



論文の要約

区分 : 甲

論文提出者 : 水町秀之

論文題名 : ECM 模倣基材と薄層ゲル培養系を併用した
神経毒性バイオアッセイデバイス構築に関する研究

中枢神経系は思考、感情、生命維持などを司る重要器官であり、損傷すると重篤かつ不可逆的な障害につながる。しかしながら、ヒトは 10 万種類以上の化学物質と日々接触していると報告されており、これにより中枢神経系も様々な危険にさらされている。これら化学物質の毒性評価として中心的役割を担うのが動物実験であるが、時間的かつコスト的負荷が大きいことに加え、特に動物愛護の観点から、動物実験廃止の動きは世界的に高まっている。このような背景および世界情勢から、信頼性が高く、時間的かつコスト的負荷が小さい代替法の開発が強く望まれている。これに対し、培養細胞を用いた動物実験代替技術の研究が行われているが、既往の報告では神経系細胞にとって非生理的な二次元培養が主流となっている。二次元培養はハイスループット性と再現性が高い評価が可能であるという大きな利点はあるものの、神経細胞などの機能性細胞を二次元培養すると、組織特異的機能や細胞挙動が変化することが知られている。これにより偽陰性や偽陽性の結果が生じることが強く懸念され、動物実験への強い依存を解消できていない。この解決のためには細胞外マトリックス(ECM)に囲まれた生理的三次元環境、および細胞応答を簡便かつ正確に評価できる培養系の構築が必要となる。以上の背景から、本研究では、生体内模倣環境を構築することで細胞の生体内類似応答が得られ、さらにそれを簡便・正確に評価できる新規神経系細胞培養法を構築し、神経毒性バイオアッセイデバイスとして確立することを目的とした。

生体内模倣環境構築において、本研究では神経系 ECM の重要な働きを担うコラーゲンおよびヘパラン硫酸に着目し、ヘパラン硫酸の一種であるヘパリンをコラーゲンに導入することで ECM 模倣基材を作製した。本基材は一般的な培地添加系と比較して 10 倍量以上の各種増殖因子を固定化できることが確認され、また固定化増殖因子の生理的活性の保持を培養評価で確認できた。続いて、固定化増殖因子で最も懸念される培養条件下での生理的安定性について、細胞の増殖応答を指標とした定量評価を試みた。その結果、固定化増殖因子の安定性定量評価に成功し、またそれにより本基材への固定化による増殖因子の安定性向上効果も確認できた。そこで、発達中枢神経系の主要細胞である神経幹細胞を包埋し、神経発達に重要な bFGF を培地添加して培養を行ったところ、ヘパリン培地添加条件や bFGF ゲル固定化条件などと比較して細胞増殖および神経細胞分化が最も旺盛となることを確認した。これにより、生体内模倣培養系の構築が期待された。そこで本培養系を用いて麻酔薬の毒性試験を行ったところ、一般的に使用される二次元培養およびコラーゲンゲル包埋培養と比較して神経幹細胞の薬剤感受性が最も高まり、さらに生体内での細胞挙動と

同等となることが示唆された。

続いて、細胞応答の簡便かつ正確な評価のために、共焦点顕微鏡や切片作製などを用いずにゲル包埋細胞を *in situ* で評価できる培養系として、厚さ 100 μm 程度の薄層ゲル培養系を構築した。シリコーンゴム製のスペーサーを用いることで任意の厚みの薄層ゲルが作製可能であることを確認した。また、神経細胞のモデル細胞を用いた培養評価により、三次元的に伸長した神経突起長さを位相差観察で定量評価できた。続いて混合した蛍光標識抗体のゲルからの洗浄除去を試みた結果、一般的な厚さ 2 mm 程度のゲルでは数日を要するのに対し、薄層ゲルでは 1 時間以内に非結合抗体を除去できることを確認した。そこで内皮細胞を薄層ゲル包埋し、酵素標識抗体により内皮細胞特異的マーカーである CD31 の直接検出を試みたところ、包埋細胞数に応じた明瞭なシグナルを得られた。また免疫蛍光染色により、細胞の形態や分化シグナルを一般的な蛍光顕微鏡で容易に観察可能であることを確認した。以上より、*in situ* 評価における有効性を証明した。

生体内模倣培養系の構築が期待され、さらに薄層ゲル培養系の有用性を確認したことから、続いて生体内模倣培養系を薄層ゲルにて作製することで、バイオアッセイデバイスのプロトタイプを構築した。神経幹細胞を 7 日間培養後、シナプスマーカーの免疫蛍光染色を行うことで、シナプス結合と期待される多くの光点を *in situ* で観察できた。また Ca^{2+} イメージングを用いた *in situ* live cell imaging により、グルタミン酸添加による活動電位の発生が期待された。以上より、包埋細胞の神経特異的な機能を *in situ* で評価できることが強く期待された。

以上をまとめると、ECM 模倣基材を用いて発達中枢神経系の模倣培養系を構築することにより、一般的な培養系と比較して細胞の挙動や薬剤感受性が生体内類似のものになることが期待された。またこの培養系を薄層ゲルで構築することにより、包埋細胞の分化、突起伸長、シナプス結合の形成、神経伝達物質応答、活動電位の発生を End-point とした毒性試験を *in situ* で行えることが示唆された。これにより、目標とするバイオアッセイデバイスの構築が期待できる重要な知見を得ることができた。