

学 位 論 文 題 名

Regulation of neural cell morphologies and differentiation by patterned polymer films

(パターン化高分子膜による神経細胞の形態および分化制御)

学位論文内容の要旨

ドナーより提供された臓器の移植や人工臓器を用い、事故や疾患により機能不全に陥った臓器の治療が行われている。臓器移植治療の問題点はドナー不足と術後免疫抑制剤を術後服用し続けなければならないことである。このような問題点の解決策として、患者本人の細胞から生体組織を再生する組織工学研究が活発に行われている。特に、細胞が組織を形成するための足場材料の開発が極

めて重要である。現在、様々の組織再生が試みられているが、神経組織の再生は、これまで困難であると考えられていた。しかし、1991年に神経幹細胞が見出されたことにより、これを用いた神経再生治療への期待が高まっている。神経幹細胞の組織工学による神経再生治療の実現には、1) 神経突起のガイディング (形態制御)、2) 神経回路網の形成 (機能制御)、3) 採取量に限度のある神経幹細胞の増殖方法の確立が大きな課題となっている(図 1)。

本研究では、これらの課題の解決を目指して、自己組織化プロセスを利用して作製したハニカムフィルム、ストライプフィルム、及びナノインプリント法によるナノピラーフィルムを足場材料 (培養基材) (図 2)として、胎生 14 日目のマウス胎仔の脳皮質組織から調製した神経幹細胞を培養し、足場表面の規則的の微細構造によって神経幹細胞の分化と増殖、及び神経突起のガイディングと神経回路網の形成がどの様に制御されるかについて研究を行った。

本論文は、八章から構成されている。

第一章では、損傷した組織、器官を再生するための組織工学の概要と足場材料について紹介した。また、これまでの神経再生医療と課題について述べ、本研究の目的について記した。

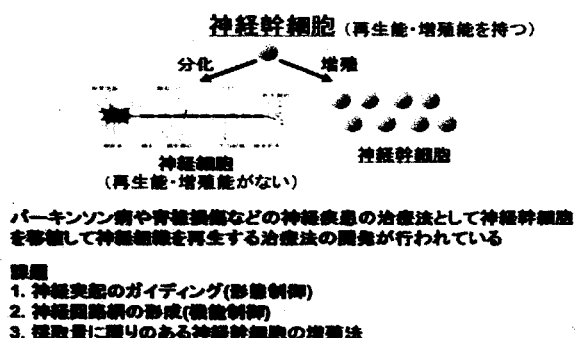


図1 神経再生の組織工学

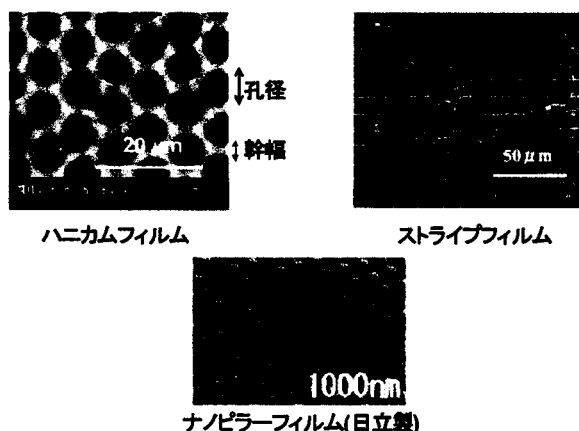


図2 規則的の表面構造を持つ足場材料

第二章では、ハニカムフィルム上の神経細胞の接着形態および神経突起伸展について記した。神経幹細胞は、孔径 5 μm 以上のハニカムフィルム上で神経細胞に分化し、ハニカムフィルムの孔径を変化させることによって、神経突起数、分枝数、突起長およびガイディング数を制御できることを見出した。特に、孔径 10 μm 以上のハニカムフィルム上では、神経突起はハニカムの幹に沿って伸展する傾向が高いという結果が得られた。

第三章では、神経幹細胞の直径よりも小さな孔径(3 μm)のハニカムフィルム上では、スフェロイド(細胞凝集塊)が形成されることを見出した。神経幹細胞のマーカーである Nestin 抗体染色法によるスフェロイド構成細胞の分化レベルと BrdU ラベリングによる増殖性の評価およびスフェロイド分散細胞の再培養による機能評価を行い、スフェロイドを構成する細胞は神経幹細胞が未分化状態を保ったまま自己増殖したものであることを見出した。また、他の微細構造基材上での培養実験によって、この現象は孔径 3 μm のハニカムフィルム特有の現象であることを明らかにした。従来の神経幹細胞増殖法は、浮遊培養を行ってさらに増殖因子を加えることによってのみ神経幹細胞の増殖が可能となっているが、本結果は、増殖因子フリーでも足場材料の表面形状のみで神経幹細胞の分化と増殖が制御できることを初めて明らかにした。

第四章では、ストライプフィルム上の神経細胞および神経突起形態について述べた。スライド法により、自己組織化によって基板上に高分子のストライプパターンを作製し、そのストライプパターンの間隔を変えることによって神経細胞形態と神経突起伸展方向を制御できることを見出した。また、パターン間隔が狭くなるほど、神経細胞体は細長い形態になり、神経突起伸展の配向性が高くなることを明らかにした。

第五章では、ナノインプリント法で作製されたナノピラーフィルム上の神経細胞および神経突起伸展について述べた。ナノピラーの直径、間隔を変えることによって、神経細胞体の形態、神経突起数、分枝数、突起長および突起伸展の配向性を制御できることを明らかにした。また、神経細胞の四方をピラーによって囲まれると、神経突起伸展が抑制されることを見出した。

第六章では、ハニカムフィルムおよびストライプフィルム上の神経ネットワークの機能をカルシウムイメージング法によって検討した。第二章、第三章の結果において、それぞれのフィルム上の神経突起伸展形態が明らかになった。そこで、その神経回路の機能に関しては、カルシウムウェーブの同期率を求めて評価した。ハニカムフィルムにおいては、孔径が大きくなるに伴い神経回路の機能が上がる傾向を示し、孔径 10 μm で神経回路の機能が最も高くなる結果が得られた。また、ストライプパターンに沿って配向した神経回路は、平膜上のランダムな神経回路よりも高い機能を示した。神経細胞の形態と機能の相関から、どのような神経突起形態が神経回路機能発現に重要かを初めて明らかにした。

第七章では、ハニカムフィルム上での神経細胞とアストロサイトとの共培養について述べた。神経組織は、神経細胞とグリア細胞から構成されており、神経再生には、グリア細胞が大きな役割を果たしていることが報告されている。グリア細胞であるアストロサイトのハニカムフィルム上での培養では、突起をハニカムパターンの幹に沿って伸展させ、さらに延伸させたハニカムフィルム上では、細胞および突起の配向性を制御することができた。神経組織再生を意図して、ハニカムフィルムを足場材料としてアストロサイトと神経幹細胞とを共培養した研究では、配向したアストロサイト上において、神経幹細胞は神経細胞に分化し、神経突起をアストロサイトに沿って伸展することを見出し、ハニカムフィルムを使用した両面培養や三次元培養による神経組織構築が可能であることを示した。

第八章では、本論文全体の総括を行い、今後の課題と展望について述べた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 居 城 邦 治
副 査 教 授 下 村 政 嗣
副 査 教 授 村 越 敬
副 査 教 授 矢 澤 道 生

学 位 論 文 題 名

Regulation of neural cell morphologies and differentiation by patterned polymer films

(パターン化高分子膜による神経細胞の形態および分化制御)

事故または疾病による組織や器官の損傷、機能不全の治療には、外科的移植や人工臓器による代替が行われている。近年、ドナー不足などから患者本人の細胞から生体組織を再生する組織工学が注目されており、細胞が組織を形成するための足場となるバイオマテリアルの開発が極めて重要となっている。足場表面の微細構造によって細胞の成長、増殖や機能に大きな影響を及ぼすことが報告されている。神経組織の再生においては、神経幹細胞を用いた治療が可能になりつつあり、これまでに神経再生を目指して、足場表面に微細加工技術を用いて様々なマイクロパターンを作製することにより、神経細胞接着制御による細胞のパターニングや神経突起伸展の制御が行われてきた。

本論文は、自己組織化の過程を利用して作製したハニカムフィルム、ストライプフィルムおよびナノインプリント法によって作製したナノピラーフィルムを足場材料として、神経幹細胞を培養し、足場表面の規則的な微細形状による神経幹細胞の分化と増殖、および神経突起伸展と神経回路網の形成への影響について報告している。自己組織化ハニカムフィルム上では、孔径(幹幅)変化により、神経突起数、分枝数、突起長およびガイディングを制御できることを明らかにし、神経突起伸展形態と神経回路機能との相関性を見出した。また、孔径 3 μm のハニカムフィルム上においては、スフェロイドが形成されることを見出した。このスフェロイド形成は、神経幹細胞が未分化性を維持しながら増殖したものであることを明らかにした。加えて、ハニカムフィルムを用いた神経細胞とグリア細胞との共培養の可能性と、ストライプパターンおよびナノピラーパターンフィルムによる神経細胞と神経突起伸展形態制御を報告している。

本研究により、足場材料表面の微細形状のみで神経幹細胞の分化、増殖を制御できることが初めて示され、このことは、足場材料による神経組織構築の可能性を他に先駆けて示した同時に、増殖因子を必要としない安全な神経幹細胞増殖法開発の手がかりを見出したものであり、神経組織工学に対して貢献するところ大いなるものがある。

よって、著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格のあるものと認める。