

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2020C-18

課題名：高密度微小電極アレイによる小児期発症疾患・合併症培養評価システムの構築

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター
(所属・職名 氏名) 再生医療センター細胞医療研究部 宮本義孝

(研究成果の要約)

本研究の目的は、小児期発症疾患における合併症に注目し、高密度微小電極アレイ上での培養システムの構築を目指す。特に、正常マウスとノックアウト (KO) マウスを用いて、医学および分子生物学的研究、培養評価から有効な治療法や創薬開発の可能性を検討する。

本研究では、①小児期疾患モデルによる培養評価システム構築のための医学および分子生物学的研究、②高密度微小電極アレイによる培養評価システムの構築への可能性について検証する。

本研究では、小児期疾患モデルとして、クエン酸合成酵素 (eCs) を欠損させた KO マウスの出生後の体重を測定し、野生型 (WT) マウスと比較した。出産直後の KO マウスは健康であったが、体のサイズが小さかった。第1週から第2週まで、体重は KO マウスと WT マウス間で大きな差は見られなかった。第3週から第6週まで、KO マウスは WT マウスよりも体重が少なかった。第7週以降は、体重に差は見られなかった。また、eCs の発現が小脳皮質の狭い層、プルキンエ層で検出され、神経細胞の関与が推測された。以上より、小児期に、遺伝素因および発育不良による栄養不足、環境的要因のため、脳の発達に影響を及ぼす可能性があると考えられる。続いて、ラット神経細胞、およびラット脳組織切片を用いた電気活動を測定した。電気活動の計測方法として、微小電極アレイを用いることにより、電極が広範囲に配置され、多数の細胞の電気活動を同時に記録することができた。今後、様々な小児期発症疾患・合併症への応用が期待される。

1. 研究目的

本研究の目的は、小児期発症疾患における合併症に注目し、高密度微小電極アレイ上での培養システムの構築を目指す。特に、正常マウスとノックアウト (KO) マウスを用いて、医学および分子生物学的研究、培養評価から有効な治療法や創薬開発の可能性を検討する。

期待される成果として、予防医療、および治療戦略が抱える種々の医学的、経済的、社会的問題の改善に寄与し、国民の医療水準の向上に多大な貢献をなすこととなる。

2. 研究組織

研究者	所属施設
宮本 義孝	国立成育医療研究センター
宮戸 健二	国立成育医療研究センター
榛葉 健太	東京大学
研究協力者	
神保 泰彦	東京大学

八木 透	東京工業大学
康 宇鎮	国立成育医療研究センター
梅澤 明弘	国立成育医療研究センター

3. 研究成果

本年度の研究は、①小児期疾患モデルによる培養評価システム構築のための医学および分子生物学的研究、②高密度微小電極アレイによる培養評価システムの構築、への可能性について検証した。

1) クエン酸合成酵素を欠損させた KO マウスによる医学および分子生物学的研究

宮戸らは、これまでに精子の中にある「クエン酸合成酵素 (eCs)」がカルシウムオシレーションを誘導し、卵子を活性化させる精子ファクターとなる事を明らかにしてきた (図1)。本研究では、小児期疾患モデルとして、eCs を欠損させた KO マウスの出生後の体重を測定し、野生型 (WT) マウスと比

較した。出産直後の KO マウスは健康であったが、体のサイズが小さかった。第 1 週から第 2 週まで、体重は KO マウスと WT マウス間で大きな差は見られなかった。第 3 週から第 6 週まで、KO マウスは WT マウスよりも体重が少なかった。第 7 週以降は、体重に差は見られなかった。

また、固定化した脳組織より eCS の発現が小脳皮質の狭い層、プルキンエ層で検出され、神経細胞の関与が推測された。さらに、脳組織の固定を行わずに、SPiDER-βGal により β-ガラクトシダーゼ活性を検出することで、eCs 発現が確認できた。

以上より、小児期に、遺伝素因および発育不良による栄養不足、環境的要因のため、脳の発達に影響を及ぼしている可能性があると考えられる。

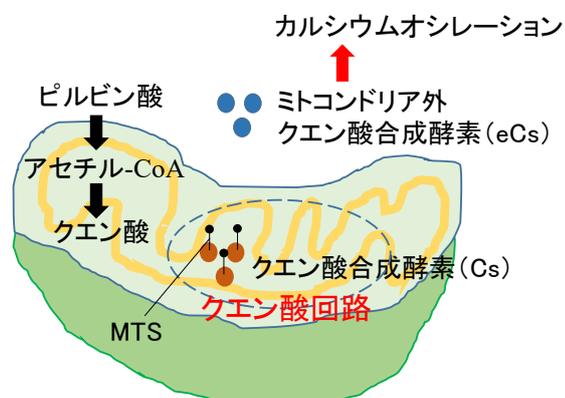


図 1. CS と eCS、2 つのクエン酸合成酵素からカルシウムオシレーションに至るまで

2) 細胞・組織による培養評価システムの構築

1) で得られた結果をもとに、小児期疾患モデルによる検討を行う。最初に、神経の培養評価システムを構築するために予備検討した。細胞は、SK-N-SH 細胞株 (ヒト神経芽細胞腫) を使用した。レチノイン酸を添加して、未分化 SK-N-SH 細胞から神経様細胞 (分化 SK-N-SH 細胞) に分化させ (図 2)、その機能を評価した。また、神経細胞 (ニューロン) の核に特異的に反応する神経細胞マーカー (NeuN) により、分化細胞の発現も確認した。

次に、電気活動の計測方法として、微小電極アレイを用いることにより、電極が広範囲に配置され、多数のラット神経細胞、および脳組織切片の電気活動を同時に記録することができた。図 3 上段の矢印は計測され

た細胞の位置を示す。下段は代表的な細胞外電位の波形を示す。

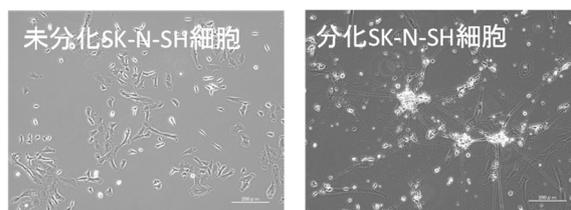


図 2. SK-N-SH 細胞の神経様細胞への分化

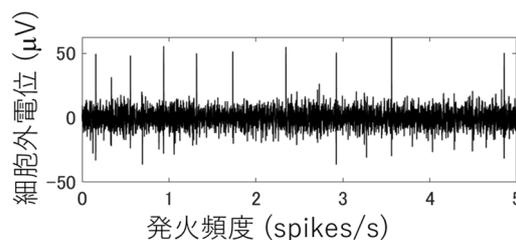
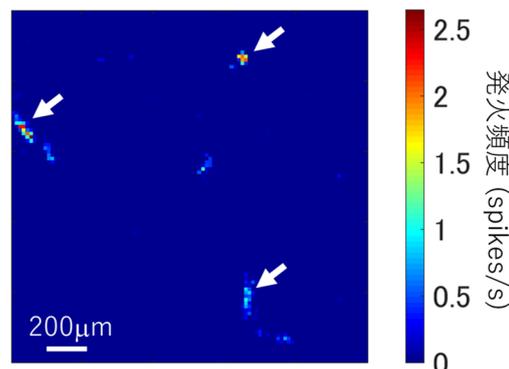


図 3. ラット脳組織切片からの活動計測

高密度微小電極アレイにより、多数のラット神経細胞、および脳組織切片の電気活動を記録できることから、様々な小児期発症疾患・合併症への応用が期待される。

4. 研究内容の倫理面への配慮

ヒト細胞を用いることに対する倫理的配慮: 本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究が予定されている。機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト間葉系細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている (国立成育医療研究センター受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承

認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、平成 18 年 6 月承認、受付番号 201、237、238、平成 19 年 6 月承認、受付番号 739、平成 25 年 10 月承認、受付番号 806、平成 26 年 10 月承認))。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

実験動物を用いることに対する倫理的配慮：実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 03-002、04-004、05-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。特に、本センター動物実験委員会 委員長 宮戸健二室長(分担研究者)に確認・計画を立て、動物実験を実施する。