

# 細胞接着制御による神経細胞のモデル作製と融合方法の検討

Cell fusion of adhering cells as the model of nerve cells controlling cell extension

学籍番号 37-126821 氏名 大政直也

指導教員 鷲津正夫 教授

概要：神経が破断した際、外科的処置により軸索周辺の組織を接続することで治療を行っているが、神経内部に存在し、信号伝達を担う軸索の融合が起きず、神経機能が回復しない。したがって破断した軸索を接続する方法の一つに、細胞融合技術が検討されている。しかし、細胞膜が露出している通常の細胞とは異なり、軸索は周辺組織に覆われているため融合が難しい。そこで、本研究では、通常の接着細胞を用いて軸索の融合条件を検討することとした。微細加工により作製した微細メッシュシートを培養液中に宙づりに設置し、細胞接着領域の制限された環境下で接着細胞を培養することにより、軸索のモデルとなる細長い細胞の作製に成功した。また、接着したままの細胞を融合できる条件検討のため、電極間に接着させた接着細胞に対し、浸透圧の調整とトリプシン処理を施すことにより、接着したままの細胞同士を融合させることに成功した。この知見を活かし、今後メッシュパターン上で作成した細長い細胞同士の融合を検討し、その条件を元に切断した神経軸索の融合方法を確立させる。

## 1. 緒言

### 1.1 神経軸索について

神経が事故等で破断した場合、神経細胞体から末端側に向かって伸びている神経軸索も破断してしまう。図1に示すように、神経軸索は束となっており、外科的処置を施して神経を再接続しても、軸索を1本1本接続することは不可能であるため、周囲組織が接続されるだけで、神経機能が再建されないことが問題となっている。そこで、破断神経を電氣的に融合する技術として修復する方法が検討されている。

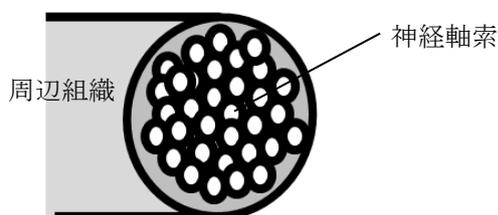


図1：神経軸索の束

### 1.2 電氣的細胞融合と神経接続について

電氣的細胞融合技術とは、接触する2つの細胞に直流電圧を印加することにより電氣的に融合

させる方法である。その原理は、2個以上の接触細胞に直流電圧を印加することで細胞膜に電圧が印加され、細胞膜に可逆的破壊が発生し、その後の修復過程で膜同士が融合する。

一方、神経軸索膜は細胞膜と同じ脂質二重膜に覆われているため、通常の細胞と同様に電氣的融合させることが出来るのではないかと期待されている。本研究の最終的な目標は医療技術として電氣融合を用いた神経軸索の再接続、および機能の即時再建を試みることである。

## 2. 実験原理および方法

### 2.1 神経軸索融合の原理

通常の細胞と同様に神経細胞に対して電氣的細胞融合を用いることを想定し、図2に示すように神経細胞と電極を配置し、接点の神経細胞膜を

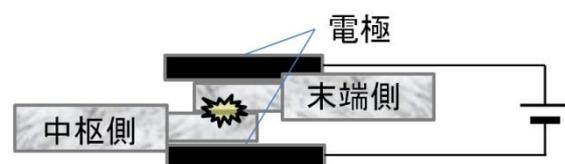


図2：神経細胞融合の概要図

破壊することで、破断した神経細胞の融合を行うことが可能となると考えられる。

本研究では、融合の確認を容易にするため、軸索径が  $500\mu\text{m}$  程と人間と比較して非常に大きな神経軸索を持つイカの神経軸索を使用した実験を行った。一方、人間の神経細胞体は  $3\sim 18\mu\text{m}$  であるため、接着性細胞を用いて神経細胞のモデル作製を行い、それを用いて融合方法の検討を行った。接着領域の制限を行うことで細胞の形状を制御し、神経細胞として模擬させ、それらを融合させる実験を行った。

## 2.2 神経軸索の染色方法

イカの神経軸索を使用した実験については、融合実験を行う前に、神経接続の確認の手法の検討を行った。神経細胞内では軸索輸送が起こっており、内部物質を染色すれば、神経が接続されている箇所まで内部物質が輸送されるため、その様子を確認することが出来れば、神経が接続されていると断定が可能となるためである。軸索内の物質の輸送速度はおよそ  $35\sim 140(\mu\text{m}/\text{min})$  であるため、顕微鏡で十分に観察することが可能な速度である。図 3 に示すように、神経軸索をイカから切り離し、染色液を神経軸索にインジェクションした。染色対象をミトコンドリアとリソソームとし、ミトコンドリアの染色については MitoTracker Orange を使用、リソソームの染色については HMGR, HMSiRCOH を使用した。

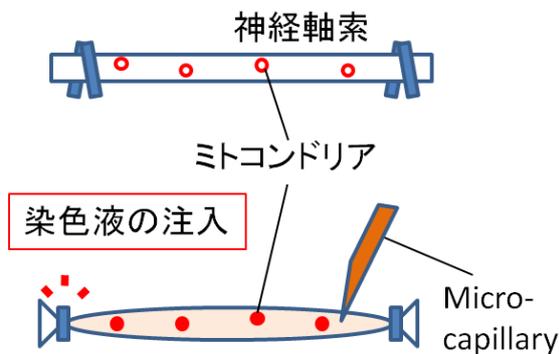


図 3 : 染色液の注入の概要図

## 2.3 微細メッシュパターンによる神経モデル細胞の作製

図 4 に示すように、イカの神経軸索はシュワン細胞等の周辺組織で覆われており、軸索膜同士を接触させることが困難である。また、培養神経細胞を用いて融合方法の検討を行うことも可能ではあるが、神経細胞の培養が困難であった。そこで、本研究では、通常の細胞を用いて融合方法の検討を行うこととした。通常の細胞を用いて神経細胞の形状を模擬するため、微細加工を用いて作製した微細メッシュシートを利用して通常の細胞の形状を制御し、細長い形状の細胞を作製することとした。先行研究では、細胞接着に必要なタンパク質であるフィブロネクチンを培養皿の底面にスタンプすることで細胞の接着箇所を制限し、形状の制御を行っていたが、この手法では接着タンパクが付着していない箇所においても細胞が接着・伸展してしまうといった問題があった。

そこで、本研究では図 5 に示すように、格子状の SU-8 メッシュシートを培養皿の底面から浮かせた状態で配置し、この状態で MEF 細胞の播種を行った。

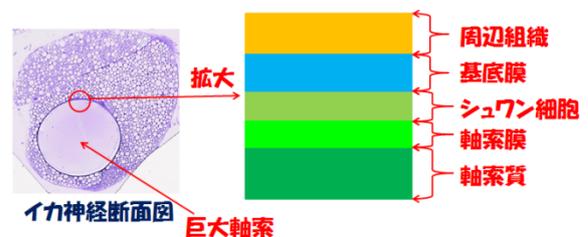


図 4 : イカの神経軸索について

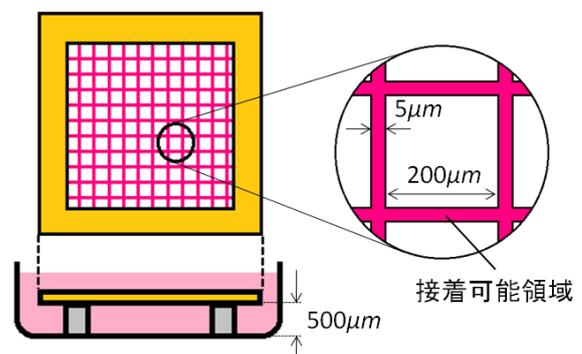


図 5 : 作製したデバイスの概要図

細胞の接着可能領域を高さによって区別するこの手法については、細胞接着タンパクをスタンブする手法と比較して、必要な箇所のみ細胞を接着させることが可能となる。問題点としては、細胞が極小な接着領域に置かれるため、分裂・伸展といった細胞の機能が正常に発現するかどうかであった。

## 2.4 融合方法の検討

接着領域を制限した状況における接着細胞が融合する条件の検討のため、浮遊細胞、接着細胞、SU-8 シートに接着させた細胞に対しての融合を試みた。手法として、まず細胞培養ディッシュにアルミを蒸着させ、そこに細胞を播種し、誘電泳動電圧、パルス電圧を印加して融合実験を行った。融合の有無を検討するため、緑と赤に染色した細胞を同時に播種、あるいは緑と無色の細胞を同時に播種し、接着細胞である MEF（マウス胎児線維芽細胞）を浮遊させた状態において融合実験を行った結果として、誘電泳動電圧を印加し、膜を破壊するためのパルス電圧条件を 20~40V、100 $\mu$ sec とし、誘電泳動電圧を 2.0V 1MHz とし、電極間距離を 50~100 $\mu$ m、浸透圧条件は 100mM とし、細胞融合が発生したかどうかの確認を行った。

## 3. 実験結果と考察

### 3.1. 神経軸索の染色の結果

先行研究においては融合の確認手段として、筋電図測定を行っていたが、これは筋線維から発生する活動電位を測定しており、水中における測定のため測定結果に対する確実性が欠けていた。したがって本研究では神経軸索内に存在するミトコンドリアやリソソームを染色し、軸索輸送の確認を行うこととした。図 6 は神経軸索内に存在するミトコンドリアやリソソームを染色した結果である。軸索内部全体に赤く蛍光した点が点在しているため、染色自体には成功した。この手法により水中であっても確実に神経軸索の接続箇

所を確認することが可能となった。

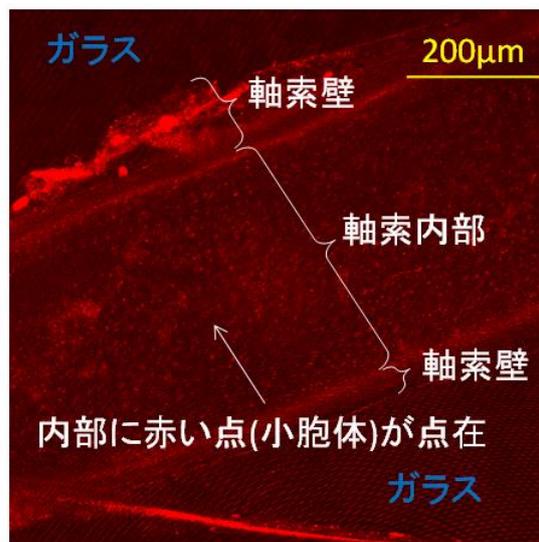


図 6 : 神経軸索の染色の結果

一方、軸索輸送の確認についてであるが、軸索内の物質の輸送速度はおよそ 35~140( $\mu$ m/min) であるため、軸索輸送が起きているならば蛍光のドットが動くはずであるが、経時観察を行った結果、蛍光ドットの動きは見られなかった。原因としては、軸索がイカから切り離された状態であったため、それにより軸索輸送が起きなかったと考えられた。以上より、軸索が接続されている箇所、軸索の機能が生きているかを確認することが出来るようになったと考えられる。

### 3.2 細胞形状制御実験の結果

図 7 は MEF をシート上に播種した結果である。細胞直径は約 10~20 $\mu$ m であり、格子線幅は約 5 $\mu$ m と、細胞直径の半分以下となっているが、SU-8 シート上に細胞が接着し、SU-8 シートの

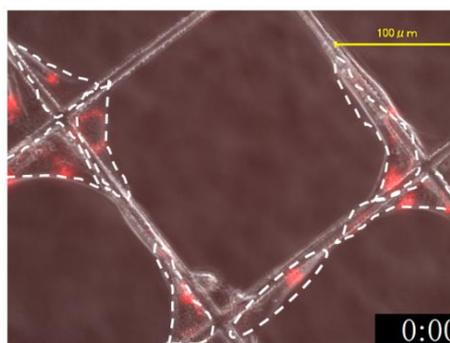


図 7 : 接着領域制限を行った結果

形状に沿って細胞が分裂・伸展した。細胞の直径は約  $20\mu\text{m}$  程であるが、図 8 においては細胞が、長いものは約  $100\mu\text{m}$  程まで伸展しており、目的であった細長い形状の細胞を作製出来た。これより、通常のディッシュで培養した場合と変わらず、細胞分裂や伸展が起きることを確認したため、接着領域を制御することで、細胞の形状も制御が出来るといった結果となった。

### 4.3 細胞融合実験の結果

#### 4.3.1 接着細胞の融合の結果

図 8 は接着状態の MEF 細胞に誘電泳動電圧を加え、 $20\text{V}, 100\mu\text{sec}$  の電圧を印加した前後の結果である。接着状態においても融合を確認。誘電泳動による影響については、接着状態にある細胞は、浮遊細胞ほどの変形は見られなかった。その原因として、細胞が接着していない箇所だけに誘電泳動力が働き、その部分のみを電極側へ引き寄せたためであると考えられる。

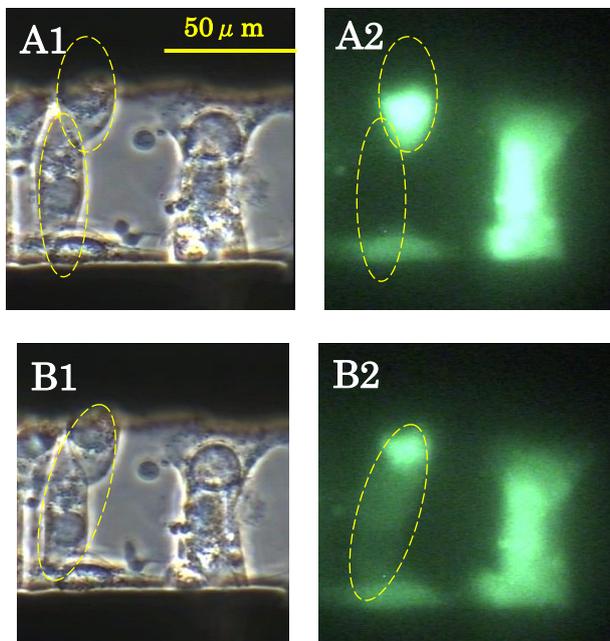


図 8：電極間における付着細胞の融合

誘電泳動電圧のみを印加した明視野(A1), 蛍光観察(A2), パルス電圧印加後の明視野(B1), 蛍光観察(B2)

#### 4.3.2 SU-8 シート上における融合の結果

図 9 は  $40\text{V}, 100\mu\text{sec}$  の電圧を印加した結果である。電極上で気泡が発生し、細胞融合は確認できなかった。原因として、SU-8 シート上の細胞はシートからはがれやすく、それにより細胞洗浄が不十分となり、洗浄しきれなかった培地に含まれる NaCl との電極反応によりアルミ電極の融解が発生していたと考えられた。この問題については、細胞の洗浄をしっかりと行うことで、SU-8 シート上で培養した細胞に電圧を印加しても、通常培養している細胞に電圧を印加した時と同じような結果が得られると考えられた。

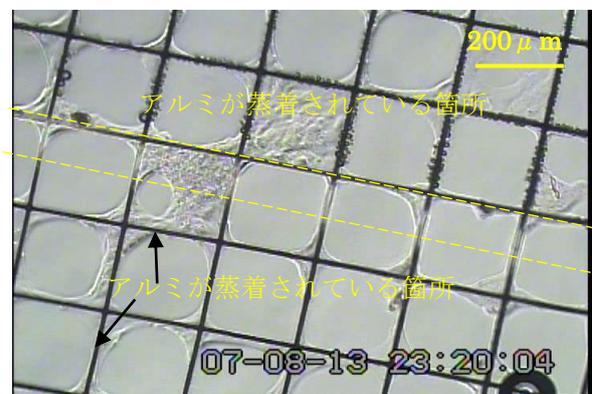


図 9：SU-8 シート上における細胞融合の結果

## 5. まとめ

軸索の染色実験については、軸索内部の物質の染色には成功したが、それらを運ぶ軸索輸送については確認することができなかった。細胞形状制御の実験については、接着領域を制限することで目的の形状の細胞を得ることに成功した。細胞融合実験については、接着状態の細胞についても融合を確認。これにより SU-8 シート上でも融合が起きる可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究の遂行に当たりご指導いただいた東京大学医学部附属病院の成島三長先生に深く謝意を表したい。