

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04289

研究課題名(和文) 3D動的マイクロ力学刺激による中枢神経回路網のアクティブ誘導制御・再生移植支援法

研究課題名(英文) Active guidance and control in regenerative transplantation treatment for central nervous network with the aid of three-dimensional micro-dynamic stimulations

研究代表者

小沢田 正 (Kosawada, Tadashi)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：10143083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞を用いた中枢神経系の再生移植治療に貢献するために、培養細胞に対し3次元の動的力学刺激を自在に付加し得るピエゾバイモルフカンチレバーを用いた超小型3D振動ステージシステムを新規開発した。これを独自のゲル包埋3D培養法と融合させることにより、3次元中枢神経回路網のアクティブ立体誘導制御・構築を可能とする革新的デバイスシステムを創製した。構築された3次元中枢神経回路網を用いて、脊髄損傷再生移植治療を模擬する移植モデルの開発を試みた。次いで上記3D振動ステージを用い移植施術後のニューロンの生着性、連結融合性を促進する最適な3D動的力学刺激環境を明確化し、再生移植治療支援への有用性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生移植治療は、人間の医療の行方のみならず人間の生き方をも左右する重要な技術で、早期実用化が切望されている。本研究で開発を目指した3次元動的マイクロ力学刺激付加デバイスシステムによるiPS細胞からの中枢神経回路網立体誘導制御、移植適合性事前評価法は、脊髄損傷、パーキンソン病、ALSなど重篤な神経系難病の治療法開発に新たな糸口をもたらす点で、学術的にも社会的にも極めて意義が大きい。その根幹をなす「3次元動的力学刺激環境のアクティブ応用」という技術は今後、細胞、組織、臓器レベルにわたる全く新たな次元の操作、制御、計測、治療のための手段となり得る可能性を秘めている点で極めて大きな波及効果を有する。

研究成果の概要(英文)：A novel small sized bimorph-piezoelectric cantilever type 3-D vibration table is developed to impose 3-D dynamic stimulations on cultured living cells in order to support regenerative transplantation treatment for central nervous network with the aid of iPS cells. Together with original gel-embedded 3-D culture, these devices provide us active guidance, control and construction of 3-D cultured central nervous networks. A simulated transplantation treatment model of spinal cord injury is developed by utilizing the constructed 3-D central nervous networks. Using the developed 3-D vibration table, appropriate 3-D dynamic stimulations are applied upon the transplantation treatment model to promote engraftment and fusion of the neurons, and that usefulness of the present study as a supporting means for the neuronal regenerative transplantation treatment has been confirmed.

研究分野：機械力学，医用生体力学

キーワード：iPS細胞 分化・成長誘導制御 3次元ゲル包埋培養 超小型3次元振動ステージ 3次元動的力学刺激 中枢神経細胞 3次元ニューロンネットワーク 移植モデル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

事故、疾病などによって損傷、損失した細胞、組織あるいは臓器の根治的治療は再生移植治療によらねばならず、我国で開発された iPS 細胞(S.Yamanaka et al., Cell 126:663-76, 2006 & 131:1-12, 2007)は、あらゆる組織や臓器の細胞に変化し得る多能性のゆえに、再生移植医療実現の究極的手段と目されている。ただし、その実用化には、各種細胞への分化誘導法の確立や、ガン化防止の安全性確保、また特に3次元構造を有する組織、臓器への立体培養法の開発は最大かつ最後の障壁として残されたままであり、早急なブレイクスルーが切望されている。

2014年9月に我国で実施された iPS 細胞による加齢黄斑変性への網膜移植再生の臨床研究に続き、今後間もなくパーキンソン病、脊髄損傷への中枢神経細胞移植の臨床研究が予定されている。この再生治療では、移植神経回路網の生着および周辺神経回路網とのネットワーク機能の連結、適応融合などの移植適合性が最大の課題とされている。

申請者は、これまで動的力学刺激による細胞、組織の損傷治療法および細胞生理と力学特性の計測評価に関する研究を行ってきた。その過程で、細胞は生体内では静的ではなくむしろ種々の動的力学刺激環境下であり、その刺激が最適な時に活性化され成長することに着目し、これを細胞組織、特にニューロンの立体構築誘導制御に応用できるのではないかと全く新たな着想を得た。

一方で、もし3次元振動台を圧電振動子等を駆使し超小型化できれば、培養容器内細胞の力学環境をアクティブにコントロールし生体内の動的力学刺激環境をシミュレートしつつ、細胞を所望の方向へ成長誘導・制御できるのではないかと全く新たなアイデアを得た。さらに、3次元ゲル空間の中に「ゆるやかに」包埋培養した神経細胞をこの振動台に設置することで、細胞にとって理想的な力学環境を実現できるのではないかと新たな発想を得た。以上に基づき、動的力学刺激による iPS 細胞の神経細胞への分化誘導および立体神経回路網構築に関する研究の過程で、神経機能計測による移植適合性評価の可能性を探ってきた。

2. 研究の目的

再生移植治療の早期実用化には、広範な専門分野の総力結集が必要不可欠である。本研究は、機械力学の原理に基づく iPS 細胞、神経回路網のアクティブ力学操作・コントロール・計測評価を通し、細胞移植再生治療を機械工学の分野から支援するというこれまでにない全く新たなアプローチ・手段の提言をめざすものである。以下、具体的な研究目的は

- 1) iPS 細胞を用いた再生移植治療に貢献するため、生きている培養細胞に対し3次元の動的力学刺激を自在に付加し得る高機能超小型3次元振動ステージを開発し、ゲル包埋培養法と融合させることで、ニューロンネットワーク構造体のアクティブ立体誘導制御・構築を可能とする革新的デバイスシステムの創製をめざす。
- 2) 誘導される3次元中枢神経回路網を用いて、脊髄損傷再生移植治療を模擬する移植モデルを新たに構築する。上記3次元振動ステージを用い、移植施術後のニューロンの生着性、連結融合性を促進する最適な3次元動的力学刺激環境の同定をめざす。
- 3) ハイブリッド電気・力学神経生理機能計測評価用3次元マイクロアクチュエータを独自に開発し、移植神経突起へのマイクロ力学、電気刺激の発現付加、応答計測を行い、神経回路機能の結合性、反応特性、電気活動性に基づく移植適合性事前計測評価・再生治療支援法の開発をめざす。

3. 研究の方法

1) 高機能超小型 3 次元振動ステージの開発 :

本研究で提案する超小型 3 次元振動ステージの機構概略は、圧電素子を利用した微小一体型振動子とこれに付随する 35mm 標準培養ディッシュ用 3 点支持ステージ部から成るシンプルな構造を有している。1 枚のステンレス板に曲げ加工とねじり加工を施し、立体ねじれ V 型カンチレバー状に加工した振動子に、直交 3 軸方向それぞれの変位が制御できるように 3 箇所複数の圧電素子を接着し製作する。これらの圧電素子に所望の信号を入力することによりステージ部変位(各軸約 30 μm)を制御でき、3 次元動的力学刺激付加が可能となる。本振動ステージを複数個インキュベータ内に組み込むことにより、個々のディッシュの細胞群に対し独立して種々の 3 次元動的力学刺激環境を設定し、組織的培養コントロールを行うことが可能となる。現時点ではまだ開発段階にある超小型 3 次元振動ステージについて、有限要素解析を駆使した振動特性の最適化により、培養細胞への付加加速度および周波数帯域を大幅に改善し、かつ制御機能を付与することで、動的力学刺激付加機能の広帯域化、高精度化を図る。

2) 3 次元アクチュエータ、マイクロ電極・力学プローブの開発 :

開発する個別細胞力学刺激用 3 次元アクチュエータは、立体ねじれ Z 型カンチレバー状に加工した振動子に、直交 3 軸方向それぞれの変位が制御できるように複数の圧電素子を装着し構築する。このアクチュエータをマイクロマニピレータに接続し、さらに先端のマイクロプローブに薄膜マイクロ電極処理を施すことで個別細胞の任意の点に対しアクティブかつ選択的に 3 次元動的力学刺激、電気刺激を付加可能とする。

すなわち、神経突起へのマイクロ力学、電気刺激による神経細胞の可塑的变化を、GFP または Ca イオン感受性蛍光色素 Fluo4-AM のタイムラプス計測法を用いて計測可能となる。これにより、神経細胞の情報伝達・電気活動をリアルタイムで計測、評価できる。以上の手法は、パッチクランプ法に力学的刺激計測機能を融合させたハイブリッド電気・力学神経生理機能計測評価デバイスとして機能する画期的なシステムである。

3) 動的力学刺激による iPS 細胞の神経細胞への分化誘導促進 :

特に中枢神経細胞移植を念頭におき、iPS 細胞から神経幹細胞へ分化誘導し、次いで神経幹細胞から中枢神経細胞およびグリア細胞への分化誘導を試みる。生化学的分化誘導因子のみの場合と開発した振動ステージによる 3 次元動的力学刺激環境を複合させて用いる場合について比較実験を行う。さらに分化誘導効率、分化所要時間、分化細胞の健全性について比較検証を行う。iPS 細胞から分化誘導された神経細胞系と臨床的に直接採取された神経細胞系とでは、性質や力学刺激に対する挙動が異なることが予想されるため、その差異を精査、検証する。iPS 細胞から神経細胞への分化誘導には各々最短で数ヶ月を要するため、以後の研究フェイズには 3 年間を確保する。

4) 動的力学刺激による機能的神経回路網の構築 :

冷却した温度依存性コラーゲン・ゲル (Cellmatrix Type P, 新田ゼラチン(株)) 混合溶液に分化誘導した神経細胞を素早く混合した後、この培養ディッシュをインキュベータ内(37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 :5%, O_2 :3%) に設置することでゲル化し細胞の「ゆるやかな足場」が形成される。この包埋培養ディッシュを 3 次元振動ステージ上に設置し 3 次元動的力学刺激を組織的に作用させることにより、ニューロンネットワークの 3 次元化を段階的に誘導・制御し、構築していく。ニューロンは 3 次元ゲル空間において、付加された力学刺激を感知、反応しつつ、随時伸展方向や速度、神経突起密度などを選択し 3 次元的に成長し、ネットワークを形成していくものと予想

される。この挙動の蛍光染色・分子イメージングによる詳細な観測により、ニューロンのネットワーク機能を司る軸索および樹状突起の3次元的形成率、伸展成長率、指向性、分岐密度などに及ぼす動的力学刺激の方向、形態、変位量、周波数、インターバル、時間数などの影響の組織的計測・評価が可能となる。これら力学刺激パラメータを組織的にブレンドし比較実験を積み重ねることにより、機能的ニューロンネットワークの誘導制御、構築促進を試みる。なお、ゲルによる培養が十分機能しない場合には、神経細胞培養実績があり生体親和性の高いポリ乳酸多孔質体:PLA(大阪大学 宇山研究室開発,提供)を代替の培養足場として用いる予定である。

5) 脊髄損傷治療の簡易移植モデル構築と動的力学刺激による生着・融合促進:

4)で開発した手法によりコラーゲン・ゲル足場内に誘導した3次元中枢神経回路網構造体を用いて、脊髄損傷移植治療を想定した簡易モデルを構築する。個別培養した生体由来の神経回路網構造体に対し脊髄損傷の模擬施術を行い、次いで本手法で別途iPS細胞から分化誘導された神経回路網構造体を移植し、共培養を行う。さらに振動ステージによる3次元動的力学刺激環境を付加し、移植系の生着およびネットワークの融合・連結の促進を試みる。促進に關与する動的力学刺激の方向、形態、変位量、周波数、インターバル、時間数などの最適条件を探索する。

6) マイクロ力学、電気刺激による神経機能計測と移植適合性評価法開発:

2)で開発した3次元アクチュエータを用いて、生体由来側と分化誘導側の神経突起間で相互に発現させたマイクロ力学、電気刺激によるCa²⁺イオン応答の伝播挙動を蛍光染色・タイムラプス計測を行う。加えて、両者間の活動電位の計測を行う。これらにより、神経ネットワークの自己組織化・機能的適合性を検証する。損傷部断面の形状、面積、長さ等が異なるマウスおよびヒト神経細胞の種々の脊髄損傷治療モデルに対して実験の積み重ねおよび比較精査を行う。以上を統合し、神経機能の結合性、反応特性、電気活動性に基づく移植適合性事前計測評価・再生治療支援法としての完成をめざす。

4. 研究成果

iPS細胞を用いた再生移植治療に貢献するため、生きている培養細胞に対し3次元の動的力学刺激を自在に付加し得る高機能超小型振動デバイスを開発し、ゲル包埋培養法と融合させることで、ニューロンネットワーク構造体のアクティブ立体誘導制御・構築を可能とする革新的デバイスシステムの創製をめざし以下のように研究を実施した。

立体ねじれV型カンチレバーおよび立体1/2ねじれバイモルフカンチレバーを用いた3次元振動ステージシステムを開発し、これまでより大変位化、広帯域化の可能性を見出した。また、コラーゲン・ゲルを用いた「ゆるやかな足場」による神経細胞3次元包埋培養法の確立に近づいた。ただし、蛍光観察の鮮明性には依然として難点が存在するため、ゲル濃度の調整・最適化による改善が必要である。この包埋培養ディッシュを開発した上述の超小型3次元振動ステージ上に設置し、3次元動的マイクロ力学刺激を組織的に作用させることにより、ニューロンネットワークの3次元化を段階的に誘導する手法開発を行った。

誘導される3次元中枢神経回路網を用いて、脊髄損傷再生移植治療を模擬する移植モデルを新たに構築した。開発した3次元振動ステージを用い、移植施術後のニューロンの生着性、連結融合性を促進する最適な3次元動的力学刺激環境の同定をある程度行うことができた。

また、ハイブリッド電気・力学神経生理機能計測評価用3次元マイクロアクチュエータプローブをMEMS技術を応用し独自に開発しており、移植神経突起へのマイクロ力学、電気

刺激の発現付加，応答計測を可能とするシステムの構築に近づくことができた。

以上，今年度までの研究により，神経回路機能の結合性，反応特性に基づく移植適合性事前計測評価法の構築および神経細胞再生移植治療支援法の基盤技術を創出することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shin, H, Haga, J.H., Kosawada, T., Kimura, K., Li, Y.S., Chien, S., Schmid-Schönbain, G.W.	4. 巻 18-1
2. 論文標題 Fine control of endothelial VEGFR-2 activation: caveolae as fluid shear stress shelters for membrane receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomechanics and Modeling in Mechanobiology	6. 最初と最後の頁 5-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10237-018-1063-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tadashi Kosawada, Keita Ohnishi, Hiroaki Satoh, Zhonggang Feng, Kaoru Goto	4. 巻 24-1
2. 論文標題 Novel Methods to Apply Micro Dynamic Stimulations on Cultured Adhesive Cells and Its Application in Constructing Gel-embedded Three-dimensional Neuronal Structures Differentiated From Human iPS Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microsystem Technologies	6. 最初と最後の頁 625-638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00542-017-3399-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kyohei Fujita, Zhonggang Feng, Daisuke Sato, Tadashi Kosawada, Takao Nakamura, Yasuyuki Shiraishi, Misuo Umezu	4. 巻 5-1
2. 論文標題 Modulation of the mechanical properties of ventricular extracellular matrix hydrogels with a carbodiimide crosslinker and investigation of their cellular compatibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 AIMS Materials Science	6. 最初と最後の頁 54-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3934/matricsci.2018.1.54	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhonggang Feng, Tadashi Kosawada, Takao Nakamura, Daisuke Sato, Tatsuo Kitajima, Mitsuo Umezu	4. 巻 4-3
2. 論文標題 Review: Theoretical methods and models for mechanical properties of soft biomaterials	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 AIMS Materials Science	6. 最初と最後の頁 680-705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3934/matricsci.2017.3.680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tadashi Kosawada	4. 巻 34
2. 論文標題 Active three-dimensional dynamic stimulations on cultured iPS cells to develop three-dimensional neuronal structures to be provided for regenerative medicine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Research papers of the Suzuken memorial foundation	6. 最初と最後の頁 85-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masato Kikuchi, Zhonggang Feng, Tadashi Kosawada, Daisuke Sato, Takao Nakamura, Mitsuo Umezu	4. 巻 27
2. 論文標題 Stress relaxation and stress-strain characteristics of porcine amniotic membrane	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 BIO-MEDICAL MATERIALS AND ENGINEERING	6. 最初と最後の頁 603-611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tadashi Kosawada, Tomoyuki Koizumi, Kazuya Ugajin, Zhonggang Feng, Kaoru Goto	4. 巻 22
2. 論文標題 Novel Three-dimensional Micro Vibration Actuator for Imposing Dynamic Stimulations to Promote Differentiation of iPS Cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Microsystem Technologies	6. 最初と最後の頁 45-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00542-015-2644-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tetsuya Kaneko, Tadashi Kosawada, Zhonggang Feng
2. 発表標題 A New In-Vitro Micro Transplantation System between 3-D Neuron Cells Colonies Differentiated from iPS Cells
3. 学会等名 The 6th Int. Conf. on Smart Systems Engineering 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumika Hamada, Kyouhei Fujita, Hiroaki Itoyama, Shunsuke Higuchi, Tadashi Kosawada, Daisuke Sato, Takao Nakamura, Yasuyuki Shiraishi, Mitsuo Umezu, Zhonggang Feng
2. 発表標題 Differentiation of subtype cardiomyocytes derived from human iPS cells on extracellular matrix hydrogels
3. 学会等名 The 6th Int. Conf. on Smart Systems Engineering 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤巻 匠, 赤間 広輔, 小沢田 正, 馮 忠剛
2. 発表標題 3次元ゲル包埋培養ヒト神経細胞の分化・成長に及ぼす動的力学刺激の影響
3. 学会等名 Dynamics and Design Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋内 琢, 佐藤 拓亮, 小沢田 正, 馮 忠剛
2. 発表標題 マウス神経細胞の簡易移植システム構築及び
3. 学会等名 Dynamics and Design Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤間 広輔, 大西 敬太, 小沢田 正, 馮 忠剛
2. 発表標題 ゲル包埋培養によるヒトニューロンの3次元構造形成に及ぼす動的力学刺激の影響評価
3. 学会等名 Dynamics and Design Conference 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 拓亮, 登坂 勇紀, 小沢田 正, 馮 忠剛
2. 発表標題 マウスニューロンネットワーク間の融合に対する動的力学刺激の影響について
3. 学会等名 Dynamics and Design Conference 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小沢田 正
2. 発表標題 iPS細胞の基礎と細胞培養技術及び実用化のためのニーズと課題
3. 学会等名 R&D SUPPORT CENTER主催セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大西 敬太, 菊池 駿佑, 小沢田 正, 馮 忠剛
2. 発表標題 ヒト神経細胞コロニー間のニューロンネットワーク形成に及ぼす動的力学刺激の影響評価
3. 学会等名 LIFE 2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 登坂 勇紀, 金子 暢生, 小沢田 正, 馮 忠剛
2. 発表標題 動的力学刺激環境及び包埋ゲル空間によるマウスニューロンネットワークの3次元形成
3. 学会等名 LIFE 2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Z. Feng, Y. K. Fujita, T. Kosawada, D. Sato, T. Nakamura, Y. Shiraishi, T. Kitajima, M. Umezu
2. 発表標題 Biomechanics of Collagen-Based Hydrogels as Tissue Engineering Scaffolds,
3. 学会等名 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小沢田 正
2. 発表標題 iPS細胞の効率的な培養のための支援デバイスの開発
3. 学会等名 技術情報協会主催セミナー (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Z Feng, K Fujita, T Kosawada, D Sato, T Nakamura, T Kitajima, M Umezu
2. 発表標題 The mechanical properties of biohydrogels and the applications for tissue engineering
3. 学会等名 EMN Meeting on Hydrogel Materials 2016 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小沢田 正	4. 発行年 2017年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 526(10)
3. 書名 動物細胞培養・自動化におけるトラブル発生原因と対策 (7-2: 「細胞培養技術・機器・装置開発へのニーズと細胞の基礎」担当)	

1. 著者名 千葉 正克, 小沢田 正	4. 発行年 2016年
2. 出版社 共立出版	5. 総ページ数 228
3. 書名 構造振動学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Kosawada "Biomechanics" Lab. Website http://kosawada-lab.yz.yamagata-u.ac.jp/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	馮 忠剛 (Feng Zhonggang) (10332545)	山形大学・大学院理工学研究科・准教授 (11501)	