

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05294

研究課題名（和文）エクソソームが誘導する筋組織委縮メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of exosome-induced muscle tissue atrophy

研究代表者

茂木 克雄（Katsuo, Mogi）

東京電機大学・工学部・教授

研究者番号：20610950

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、エクソソームの生体への影響を可視化するため、生体模倣システムを構成する「流路構造」および、「細胞培養技術」、「送液機構」の研究開発に取り組んだ。流路構造については、3Dプリンタを用いた手法を考案し、高精度かつ容易にサブミリスケールの構造を製作できるようにした。細胞培養技術については、遠隔で監視制御が行える小型培養器を試作し、複数種類の細胞の繊細な培養環境を制御することができた。また、送液機構にパッシブポンプを取り入れて、安定した定流量の送液を実現した。今後は、開発した要素技術を統合し、エクソソームの生体への影響を可視化するための生体模倣システムの開発を着実に進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、エクソソームの関わる生体内現象の可視化システムにとって最も重要な、マイクロ流体デバイスの基盤技術を開発した。この基盤技術により、複数種類の細胞を整列させた状態で培養し、経時観察することができるようになった。これまで実証困難であったサブミクロンスケールのエクソソームの生体内での作用についても直接的に明示できるようになった。本研究で得られた成果技術は、倫理的にも学術的にも優れているため、動物実験を必要としない新しい生体内現象の可視化技術として、広く利用されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In order to visualize the effects of exosomes on living organisms, we have engaged in research and development of three component technologies that constitute a Microphysiological System. One of these is the fabrication of flow channel structures. Using a 3D printer, we have become able to easily fabricate precise submillimeter-scale structures. The other of these is the development of cell culture technology. We have prototyped a small incubator that can be monitored and controlled remotely, and have been able to control the delicate culture environment of multiple types of cells. The last of these is the development of a liquid delivery system. Using a passive pump for liquid delivery, we were able to achieve a stable low flow rate.

研究分野：マイクロ流体デバイス

キーワード：エクソソーム イオン濃度分極 マイクロ流路 細胞培養 ナノ粒子分離

1. 研究開始当初の背景

末期がん患者の多くは、全身の筋力低下を伴う「がん悪液質」を発症することで肉体的にも精神的にも苦痛を受ける。がん悪液質とは、がんの末期症状として発症する筋細胞組織の萎縮を伴う複合的な代謝障害症候群であり、特徴として腫瘍に隣接しない臓器や骨格筋、脂肪組織などに萎縮症状が現れる。全身にわたって現れる症状の発症メカニズムについては未知の点が多く残されていたが、最近になりがん細胞から分泌されるエクソソームが骨格筋の萎縮に大きく関与していることが明らかになった (Zhang et al, Nat Commun 2017)。

エクソソームとは、生体内を循環する 40nm から 200nm 程の微小な細胞外小胞であり、健康や疾患に関わる様々な核酸やたんぱく質を届ける細胞間のコミュニケーションツールとしての役割を担っている (Valadi et al, Nat Cell Biol 2007)。エクソソームの中でも、がん悪液質の誘導性腫瘍細胞から分泌されるエクソソームには、ヒートショックプロテインの Hsp70 が過剰に含まれており、このエクソソームが骨格筋の近傍に存在すると、筋細胞の萎縮が亢進する(図1)。そのため、エクソソームが輸送する Hsp70 に、骨格筋萎縮を誘導する何らかの役割があると考えられるようになってきている。

一方で、骨格筋近傍まで到達するエクソソーム数は、萎縮する筋細胞の数に対して極端に少ないため、エクソソームが筋細胞に効率よくアプローチするための未知の作用の存在が示唆されている。この未知の作用には Hsp70 をはじめとする膜たんぱく質が大きく関与していると考えられるが、近年盛んに行われている分子生物学的な解析方法では液中を浮遊するエクソソームの動的挙動について実証することが困難となっている。そのため、エクソソームに関連する流体現象を可視化するような直接的な解析技術が必要とされている。

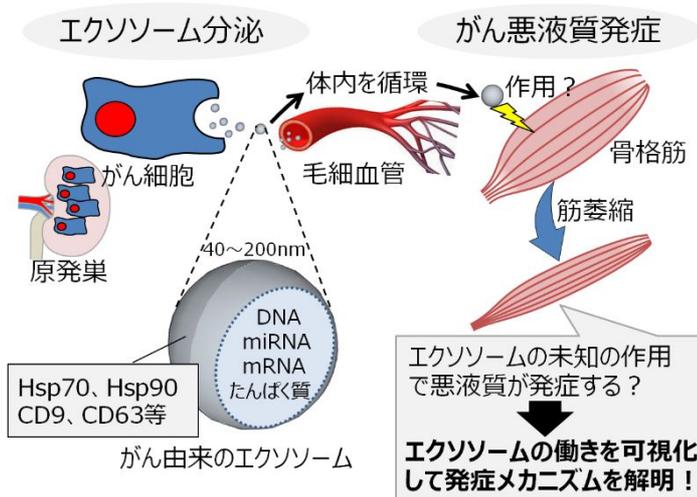


図1. がん悪液質発症メカニズムと本研究の目的

2. 研究の目的

本研究の目的は、エクソソームによって引き起こされるがん悪液質の発症メカニズムの詳細を解明することである。そのため、精良なエクソソームサンプルの精製技術、生体内模擬デバイスの製作技術および、微小現象の可視化技術の3つの技術を融合した骨格筋周辺の生体内現象の可視化システムを開発し、そのシステムにより筋細胞組織へのエクソソームの作用を可視化する。

3. 研究の方法

本研究では、エクソソームが筋細胞に接着して骨格筋組織を萎縮させる経時的な現象を直接可視化するために、マイクロ流体デバイスと超解像度顕微鏡技術を融合させた他に類を見ない生体内組織の可視化システムを構築しようとしている。本システムで用いるエクソソームサンプルについては、研究代表者が独自に開発したイオン濃度分極を利用した技術で精製する。これにより、既存技術では得られない、破損の少ない良質な高濃度エクソソームサンプルを使用することができる。このサンプルを用いることで、夾雑物やエクソソームの破損断片等によるノイズを排除した精緻な実験が行えるため、生体内の現象の詳細を鮮明に捉えることができる。

システムの主要部位として開発するマイクロ流体デバイスは、本研究代表者が考案した独創的な細胞整列機構 (Mogi & Fujii, Lab on Chip, 2010) を内蔵した画期的なデバイスである。図2は、その細胞整列機構で血管内皮細胞 HUVEC を5列に整列

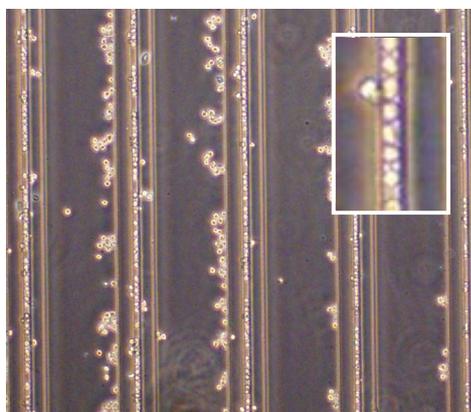


図2. 細胞の5列培養の実施例

させた実験例である。この流路は送液圧力のみを駆動源としており、細胞に過剰な負荷を与えることなく瞬時に積層組織を形成できる。本研究期間では、この生体内現象の可視化システムにとって最も重要な、安定したマイクロ流路への低流量送液を実現するために、パッシブポンプ機構を利用した送液基盤技術の開発に注力した。この基盤技術により、これまで実証困難であったサブミクロンスケールのエクソソームの生体内での作用について直接的に明示できるようになる。本研究で得られる成果技術は、倫理的にも学術的にも優れているため、動物実験を必要としない新しい生体内現象の可視化技術として、広く利用されることが期待できる。

4. 研究成果

本研究では、マイクロ流体デバイスを用いた細胞培養に取り組んでおり、独自の細胞整列技術によって図2に示すような整列培養に成功している。この成果については、国際学会 IEEE SCS12022 で発表している。また、複数種類の細胞を培養する際に必要な温度やCO₂ガス濃度の調整を高精度で行うために、独自のCO₂インキュベータを開発している。この成果についても、2023年の横浜ロボットワールドで展示し広く発信している。開発したCO₂インキュベータはサイズが30×20×20cm³しかない上に、バッテリー駆動が可能のため、培養細胞を様々な医療機関や研究機関にインキュベータごと持ち込むことができる。これにより、その研究環境でしかできない固有の実験に、マイクロ流体デバイスで培養中の細胞組織をそのまま使用することができる。

細胞を整列培養するためのマイクロ流路形状についても、本研究期間中に改良を重ね、細胞の培養環境に適したサブミリスケールの流路構造が製作できるようになった。また、本研究期間中に、サブミリスケールの構造を高精度かつ容易に製作するための新しいファブリケーション手法を考案しており、その成果について2023年の科学とマイクロ・ナノシステム学会の研究会で発表した。このファブリケーション手法は、図3に示す光学式の3Dプリンタ(SpaceArt、カンタツ社)を用いてフォトリソグラフィーのプロセスを行うもので、3Dプリンタ内のプロジェクトでクロムフォトマスク上のフォトレジストAZP1350に流路パターンを投影して感光させている。この手法で製作できる構造の分解能と形状については、現像後のパターンの顕微鏡画像から検証した。検証に用いたテストパターンは、線幅が10μmから1mmまでの直線流路と、角度が30°と90°に屈曲した流路である。図4はその検証結果を示しており、数秒間の露光時間で30°の鋭角形状や線幅500μm以上の流路形状が現像できていた。また、フォトマスクの製造だけでなく流路の鋳型を直接3Dプリンタで製作することにも成功している。以上のことから、3Dプリンタならではのサブミリスケールの立体的な構造を伴う複雑なマイクロ流路の製作が可能になった。

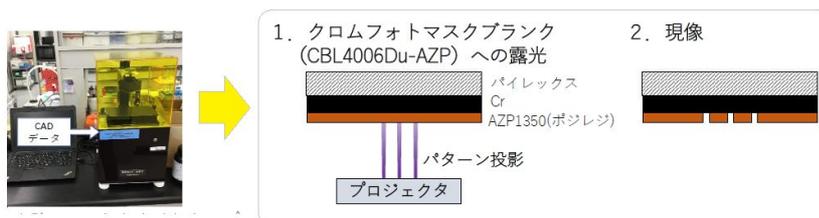


図3. 実験に用いた光造形方式3Dプリンタ(SpaceArt、カンタツ社製)およびそれによるフォトマスク製作プロセス

| 露光時間 | 60 sec. | 5 sec. | 2 sec. | 1 sec. | 0.5 sec. |
|---------|---------|--------|--------|--------|----------|
| 外観 | | | | | |
| ①線幅&間隔 | - | | | | |
| ②鋭角 30° | - | | | | |
| ③直角 90° | - | | | | |

図4. 露光時間ごとの検証用パターンの現像結果(パターンの線幅は10、50、100、250、500、1000μm)

本研究では、生体模倣デバイスで最も重要かつ大きな課題である安定した定流量送液を可能にするための機構についても開発を行い、MNE2023 で発表した。我々は、数十 $\mu\text{L}/\text{min}$ の安定した低流量を実現するために、図 5 に示すような液滴の表面張力を利用したパッシブポンプの概念を取り入れた。パッシブポンプの送液流量は、流路の入口と出口の液滴の側面画像を取得して体積の差 ΔV を以下の (1) 式から見積もって算出した。その結果、 $100\mu\text{m} \times 500\mu\text{m} \times 30\text{mm}$ のマイクロ流路への送液流量を入口に滴下する液量によって $15\mu\text{L}/\text{min}$ から $55\mu\text{L}/\text{min}$ まで高精度で制御することができた(図 6)。

$$\Delta V = \frac{1}{6}\pi\{h_1(3R_{in}(t_2)^2 + h_1^2) - h_2(3R_{in}(t_1)^2 + h_2^2)\} \quad (1)$$

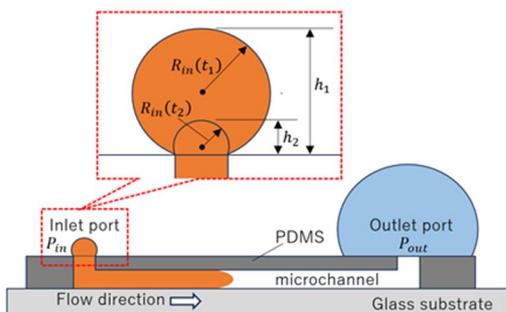


図 5 . 表面張力を利用したパッシブポンプ

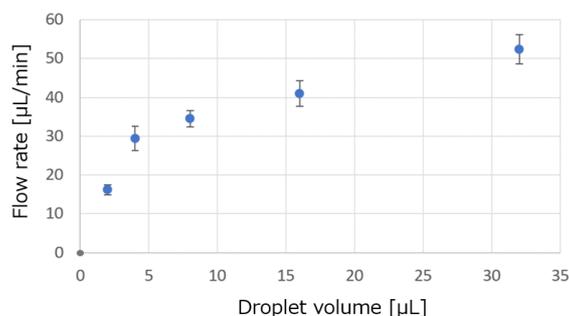


図 6 . 送液流量と入口に滴下する液量の関係

このパッシブポンプを長時間連続で駆動させるためには、ポンプへ培養液を恒常的に供給する必要がある。そのため、本研究では、培養液の連続滴下装置を開発し、その培養液供給の精度検証を行った。この装置は、図7に示すような電動マイクロピペット(VIAFLO, INTEGRA Biosciences AG)と2軸ロボットを組み合わせた遠隔制御装置である。必要最小限に削減された駆動部によって単純化された機構は、操作が簡略化できるだけでなく、故障や緊急停止などの際の対応も容易であり、医療や創薬の分野への導入も期待できる。また、小型で耐久性にも優れており、CO2 インキュベータ内に格納した状態で Bluetooth による無線での制御も行える。図8は、マイクロ流路に培養液を供給する際の滴下位置の精度を検証した結果である。図8-Aはマイクロピペットの先端の到達位置を直径2mmの流路の入口の写真に重ね合わせた図である。この実験では、マイクロピペットの先端にシリンジ針を固定して、流路の入口を覆った厚さ $40\mu\text{m}$ の OPP フィルムに針先で切り込みを入れて到達位置を計測した。図中の赤点線は各切り込みの幅を表し、その中心を青点で表している。図8-Bは、先端到達位置を2次元座標にプロットした結果である。液滴の滴下目標を原点座標 $(x,y)=(0,0)$ として、10回試行した平均値の座標 $(-277\mu\text{m}, -253\mu\text{m})$ を橙色の点で表した。なお、10回試行の標準偏差は $(x,y)=(221\mu\text{m}, 257\mu\text{m})$ となり、原点座標から最も遠い先端到達位置の座標 $(284\mu\text{m}, -782\mu\text{m})$ の原点からの距離は $781\mu\text{m}$ となった。この結果から、滴下位置が2mm径の流路入口内に十分に収まることを示せた。

以上の結果から、本研究課題の期間内に、サブミリスケールのマイクロ流路構造および、培養技術、送液機構を開発することができた。今後は、開発した要素技術を統合し、エクソソームの生体への影響を可視化するための生体模倣システムの開発を着実に進めていく。

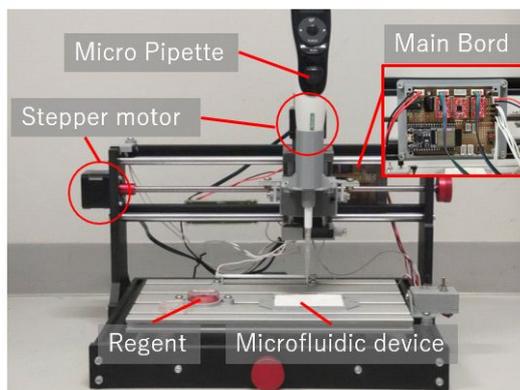


図 7 . 培養液の連続滴下のための遠隔制御装置概要

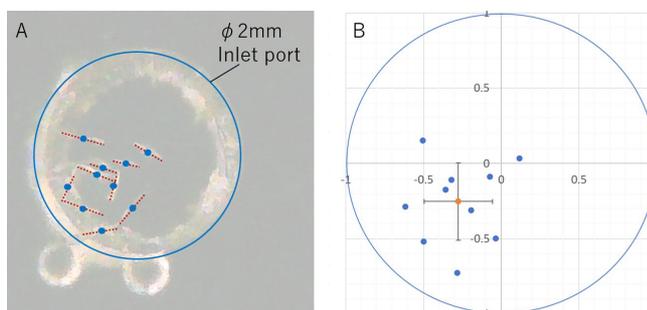


図 8 . 滴下位置の精度を検証した結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Takada Naoki, Mogi Katsuo, Takaki Tomohiro, Someya Satoshi, Baba Soumei, Saito Shimpei | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 MICROFLUIDIC SIMULATIONS OF DROPLET MOTION ON STRUCTURED SOLID SURFACE USING PHASE-FIELD LATTICE BOLTZMANN METHOD | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Multiphase Science and Technology | 6. 最初と最後の頁 17 ~ 33 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1615/MultScienTechn.2022043657 | 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 Mogi Katsuo, Kimura Hiroyuki, Kondo Yuto, Inoue Tomoya, Adachi Shungo, Natsume Tohru | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Automatic radioisotope manipulation for small amount of nuclear medicine using an EWOD device with a dimple structure | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Royal Society Open Science | 6. 最初と最後の頁 201809 ~ 201809 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsos.201809 | 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 Hirama Hirotada, Otahara Ryutaro, Mogi Katsuo, Hayase Masanori, Torii Toru, Mekar Harutaka | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Rapid Prototyping of a Nanoparticle Concentrator Using a Hydrogel Molding Method | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Polymers | 6. 最初と最後の頁 1069 ~ 1069 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym13071069 | 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 Hirama Hirotada, Otahara Ryutaro, Mogi Katsuo, Hayase Masanori, Torii Toru, Mekar Harutaka | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Rapid Prototyping of a Nanoparticle Concentrator Using a Hydrogel Molding Method | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Polymers | 6. 最初と最後の頁 1069 ~ 1069 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym13071069 | 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 Katsuo Mogi , Hiroyuki Kimura, Yuto Kondo, Tomoya Inoue, Shungo Adachi and Tohru Natsume | 4. 巻 採択済み |
| 2. 論文標題 Automatic radioisotope manipulation for small amount of nuclear medicine using an EWOD device with a dimple structure」 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Royal Society Open Science | 6. 最初と最後の頁 |
| 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤原 康宣、戸谷 一英、菊池 華央、上野 裕太郎、佐賀 駿鷹、八重樫 温人、木村 寛之、茂木 克雄、鎌田 智也、小此木 孝仁 |
| 2. 発表標題 ロボットによる分注自動化のための電動ピペット用チップ着脱デバイスの開発 |
| 3. 学会等名 第39回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム講演論文集 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高田 尚樹、茂木 克雄、高木 知弘、相原 慎太郎、染矢 聡、馬場 宗明、齋藤 慎平 |
| 2. 発表標題 数値流体力学シミュレーションによる微細加工表面濡れ性評価 |
| 3. 学会等名 日本機械学会関東支部第29期総会・講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 茂木 克雄、木村 寛之、高田 尚樹 |
| 2. 発表標題 EWODを用いた微量放射性医薬品の自動調製技術 |
| 3. 学会等名 第34回日本臨床微生物学会総会・学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高田 尚樹、高木 知弘、茂木 克雄、染矢 聡、馬場 宗明、齋藤 慎平、相原 慎太郎 |
| 2. 発表標題 微細加工表面上における液滴挙動のフェーズフィールドモデルシミュレーション |
| 3. 学会等名 第35回計算力学講演会 (CMD2022) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Katsuo Mogi, Hiroyuki Kimura, Naoki Takada |
| 2. 発表標題 Microfluidic technology for making string-like cell tissues |
| 3. 学会等名 11th IEEE CPMT Symposium Japan (ICSJ2022) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高田 尚樹、高木 知弘、茂木 克雄、染矢 聡、馬場 宗明、齋藤 慎平 |
| 2. 発表標題 微細構造固体表面上における液滴挙動のフェーズフィールドモデルシミュレーション |
| 3. 学会等名 日本混相流学会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Naoki Takada, Katsuo Mogi, Tomohiro Takaki, Shintaro Aihara, Satoshi Someya, Soumei Baba, Shimpei Saito |
| 2. 発表標題 Microfluidic Multiphase Flow Simulation Using an Advanced Diffuse-interface Model-based Method |
| 3. 学会等名 15th World Congress on Computational Mechanics (WCCM-XV) and 8th Asian Pacific Congress on Computational Mechanics (APCOM-VIII) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 茂木克維 |
| 2. 発表標題 次代の創薬モダリティを支えるマイクロ流体システムの開発 |
| 3. 学会等名 一般財団法人 総合研究奨励会 次世代医療技術研究会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 茂木克維 |
| 2. 発表標題 微量試薬調製の自動化技術の開発 |
| 3. 学会等名 令和2年度第四回名古屋産学官・医連携研究会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高田 尚樹, 高木 知弘, 茂木 克雄 |
| 2. 発表標題 マルチフェーズフィールドモデルと格子ボルツマンモデルに基づく混相流の数値計算手法 |
| 3. 学会等名 日本機械学会第34回計算力学講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高田 尚樹, 高木 知弘, 茂木 克雄 |
| 2. 発表標題 多相流シミュレーションへの保存形マルチフェーズフィールドモデル計算法の適用性について |
| 3. 学会等名 混相流シンポジウム2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Katsuo Mogi, Hiroyuki Kimura, Shungo Adachi, Tomoya Inoue, Tohru Natsume |
| 2. 発表標題 Automatic radioisotope manipulation for rapid synthesis of nuclear medicine using an EWOD device with a dimple structure |
| 3. 学会等名 Pacific Basin Societies 2021 (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 N aoki Takada, Katsuo Mogi Shintaro Aihara and Tomohiro Takagi |
| 2. 発表標題 CFD simulation of multiphase flows using phase-field and multi-phase-field models |
| 3. 学会等名 COMPSAFE2020 (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大田原 隆太郎、 茂木 克雄、 早瀬 仁則、 鳥居 徹、 平間 忠宏 |
| 2. 発表標題 ハイド ロゲル モールドイング手法を用いたナノ粒子濃縮 流路のラピッドプロト タイピング |
| 3. 学会等名 化学と マイクロ・ ナノシステム 学会第 4 2 回 研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

| | | |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 産業財産権の名称 放射性組成物の製造方法 | 発明者 茂木 克雄、足達 俊吾、井上 朋也、夏目 徹 | 権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所、京都薬 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特開2021-181932 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| 産業財産権の名称 放射性組成物の製造方法 | 発明者 茂木 克雄、足達 俊吾、井上 朋也、夏目 徹、木村 寛之 | 権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願 2020-087511 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| 産業財産権の名称 開放空間型の液体操作装置 | 発明者 茂木 克雄、足達 俊吾、井上 朋也、夏目 徹 | 権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/004702 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計2件

| | | |
|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 産業財産権の名称 放射性組成物の製造方法 | 発明者 茂木 克雄、足達 俊吾、井上 朋也、夏目 徹、木村 寛之 | 権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所、京都薬 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特許査定済 | 取得年 2023年 | 国内・外国の別 外国 |
| 産業財産権の名称 開放空間型の液体操作装置 | 発明者 茂木 克雄、足達 俊吾、井上 朋也、夏目 徹 | 権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特許第7253845号 | 取得年 2023年 | 国内・外国の別 国内 |

〔その他〕

-

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|