

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：34406

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20187

研究課題名（和文）薬効評価機能を有する生体外ヒト由来神経筋接合組織モデルデバイスの開発

研究課題名（英文）Development of an Advanced In Vitro Model Device for Human-Derived Neuromuscular Junction Tissue with Drug Efficacy Evaluation Function

研究代表者

横山 奨（Yokoyama, Sho）

大阪工業大学・工学部・講師

研究者番号：30760425

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新薬開発コストの低減を目指し、神経・筋疾患モデルデバイスの開発に取り組んだ。神経細胞と筋細胞の共培養手法の開発と、筋オルガノイド収縮力評価技術の薬効評価への応用を実施した。共培養手法では、神経筋接合を目指しデバイスを試作した。複数の手法を検討した結果、神経細胞シートを作製し筋オルガノイドを被覆する方法を評価中である。収縮力評価技術では、栄養物質の投与や、低栄養状態、微小重力環境に応じて筋オルガノイドの収縮力が増減することを確認した。以上の成果より、神経筋接合モデルの初期検討、筋オルガノイド収縮力評価技術の薬効評価への応用を完了した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有望な薬物分子が細胞に与える変化を迅速かつ正確に評価する技術は、新薬開発プロセスにおいて極めて重要である。これまでは、動物試験が薬物動態を予測する上で重要な役割を果たしており、人体に対する副作用や薬効毒性の評価を担っていた。しかし、動物試験は倫理的問題や個体差による精度的問題が指摘されている。そのため、倫理問題を回避し、より高精度に薬効評価が行えるツールが求められている。そこで本研究では、マウスの細胞から作製した人工筋肉が発揮する収縮力を用いて、薬効を評価する手法を開発した。また、人工筋肉に対して神経細胞を接合することで、神経疾患などの薬物評価への発展に取り組んだ。

研究成果の概要（英文）：In this study, our aim was to develop model devices for neuromuscular diseases and reduce the costs of new drug development through technological innovation. We successfully created a co-culturing method for nerve and muscle cells, using it to evaluate muscle organoid contractility for drug efficacy assessment. To establish a nerve-muscle junction in our co-culture method, we designed a prototype device. Currently, we're investigating a method involving nerve cell sheets that cover muscle organoids, aiming for a stable nerve-muscle connection. Our evaluation of contractile force revealed significant impacts from nutritional substances, low-nutrition conditions, and microgravity. These findings mark the completion of our initial investigation into the neuromuscular junction model and the application of muscle organoid contractility evaluation for drug efficacy assessment.

研究分野：生体医工学

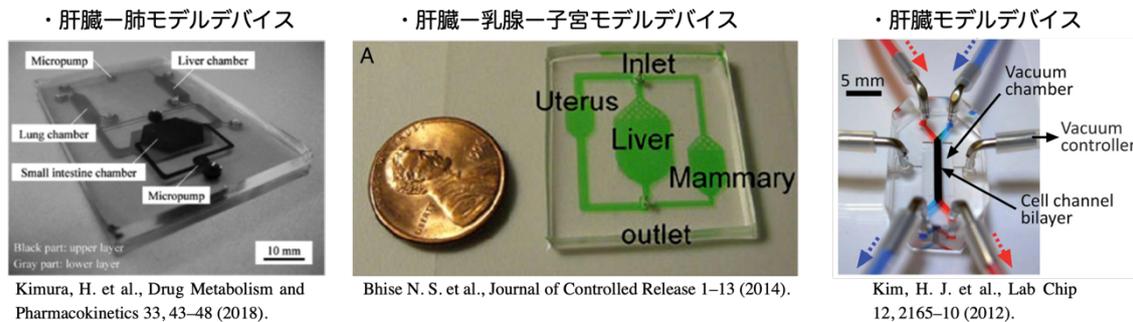
キーワード：筋オルガノイド 神経オルガノイド 薬効評価 収縮力 Neuromuscular junction

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新薬開発には、研究開始から承認取得まで10年以上を要し、その成功確率はわずか3万分の1と極めて低い[医薬品産業強化総合戦略 ~グローバル展開を見据えた創薬~ 厚生労働省]。近年はバイオ医薬品の開発や、高度な安全性の要求により新薬開発コストが増加し、早急な技術革新による新薬開発コストの低減が求められている[Paul, S.M. et al., 2010. Nature Reviews Drug Discovery.]。新薬開発プロセスでは、基礎研究段階において膨大な数の化合物を合成し、薬効評価を行うことで、有効な化合物を絞り込む。効率的に新薬開発を進展するためには、迅速かつ再現性の高い薬効評価技術が必要不可欠である。従来の動物実験の種差問題を解決するために、細胞とマイクロ流体デバイスを組み合わせた新たな細胞アッセイツールが Organ-on-a-chip として提唱され、各種臓器の機能を再現したモデルデバイスが開発されている(図1)。特に薬効評価を目的としたデバイスでは、抗がん剤などを想定した、肝臓-他臓器を1チップに集積化することで肝臓による薬物代謝を再現し、抗がん剤の薬効を評価することに成功している。しかしながら、Organ-on-a-chip においても、薬効評価は、細胞の死亡率や蛍光プローブを用いた評価、qPCRなどのタンパク質の評価が基本的な手法となっており、薬効評価用モデルデバイスとしての Organ-on-a-chip の利点を最大限に活かしているとは言えない。また、薬物代謝の性質上、主に肝臓細胞に重点的に研究が進められており、神経・筋疾患などを対象としたモデルデバイスの研究は十分に進んでいないのが実状である。

そこで、我々の研究グループは、神経オルガノイドと筋オルガノイドを接続した神経筋接合組織モデルデバイス (Neuromuscular Junction Model-on-a-Chip) に力学的薬効評価機構を集積化した薬効評価用生体外神経筋接合組織モデルデバイスを新たに提案した。



ヒト由来細胞を用いたモデルデバイスにより、低コストかつ高精度な薬効評価を実現 + 動物実験の削減

図1 Organ-on-a-chip の先行研究事例

2. 研究の目的

筋オルガノイドの作製および生体と類似した神経筋接合部を有する神経筋オルガノイドを1チップ上で接合し、神経筋接合組織モデルデバイスを作製すること、さらに筋オルガノイド収縮力評価機構と組み合わせることで、神経・筋疾患に対して“力”を利用した定量的薬効評価技術を実用化することを目的としている。神経・筋疾患においては各種モデルデバイスを用いた膨大な研究が実施されているが、その多くは、神経細胞、神経筋接合部、筋細胞などの各種細胞の動態を個々に観察・評価するのみに留まっており、研究代表者が調べた限りでは細胞を利用し神経細胞から筋細胞に至る運動ニューロンを総合的にモデル化したデバイスは、未だ実用化されておらず、実用化すれば唯一無二の存在と言える。また、本デバイスでは図2に示すような、神経筋接合組織の動態をポリジメチルシロキサン (PDMS) プラークを用いて筋オルガノイド収縮力を測定することにより評価する機構を集積化している。評価系に“力”を利用した例も少なく、本デバイスの特色である。従来の蛍光プローブや筋電測定、qPCRなどの評価系に比べて、単純な光学観察のみで“力”を定量的に測定することで、特別な装置を必要とせず、低コスト・リアルタイム・連続な定量的薬効評価を実現可能である。

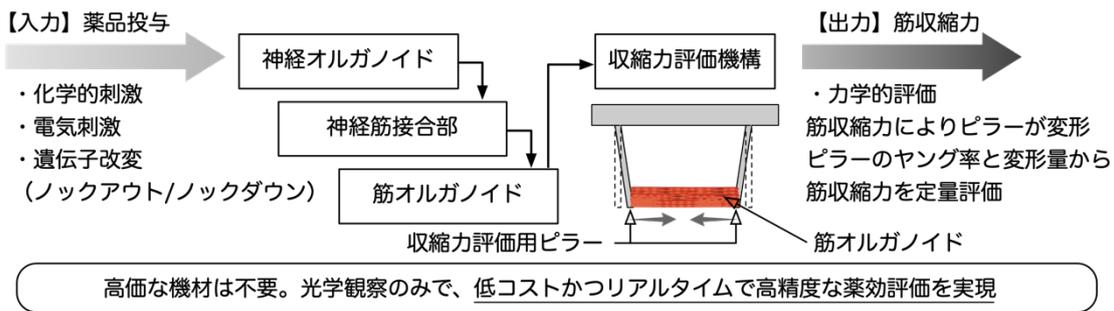


図2 Neuromuscular Junction Model-on-a-Chip を用いた薬効評価原理

3. 研究の方法

本研究では、Neuromuscular Junction Model-on-a-Chipを開発し、薬効評価用生体外ヒト由来神経筋接合組織モデルデバイスとして確立を目指している。これを実現するために、以下の3段階に分けて研究開発を進めた。(1) 筋オルガノイド収縮力定量化デバイスの確立、(2) 筋オルガノイド収縮力を利用した薬効評価技術の確立、(3) 神経—筋接合モデルの確立。初年度となる2020年度は主に、神経筋オルガノイドの接合と生化学的評価および神経筋接合部の機能評価機構としての役割を果たす筋オルガノイドの収縮力定量化デバイスの開発に取り組んだ。2021年度には、神経細胞と筋オルガノイドの接合、神経筋接合部の作製と薬効評価技術としての確立に取り組んだ。2022年度には、引き続き神経細胞と筋オルガノイドの接合を試みつつ、先行している筋オルガノイド収縮力を利用した薬効評価技術の応用を実施した。

4. 研究成果

本研究では、これまで動物実験と細胞実験に二極化していた薬効評価において、オルガノイドを用いた薬効評価技術の実用化に取り組んだ。筋オルガノイド収縮力を利用した薬効評価技術に関しては、既に複数の対象化合物での薬効評価を実現しており、投与タイミングや解析手法を含め薬効評価技術としては実用化が視野に入る段階にまで到達している。神経—筋接合モデルの確立に関しては、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) では神経軸索の伸張が十分ではなく、ヒトiPS細胞由来神経細胞への変更したことなど、複数の想定外の事態が発生し研究期間内に完遂することはできなかった。しかしながら、複数のデバイスにより神経—筋接合には成功しており、一定の成果は得られたと考えている。

(1) 筋オルガノイド収縮力定量化デバイスの確立

従来のロードセルに替えて、図3に示すようなPDMSピラーの変移を用いた筋オルガノイド収縮力定量化デバイスを開発した。キルシュナー鋼線とPDMSピラーの間に筋オルガノイドが架橋され、その収縮力によるPDMSピラーの変移量を顕微鏡観察で測定することで、収縮力を簡易評価する。筋汎用のウェルプレートに合わせて設計されており、一般的な倒立顕微鏡で観察可能な様に測定時は上下反転させることが可能である。PDMSピラーの本数等は、ガラスニードルを用いて測定し、変移量から収縮力への換算を可能とした。本デバイスは、従来のロードセルなどを用いた収縮力定量化より精度は劣るが、非侵襲的であり経時的な評価が可能である利点が存在する。この利点を最大限活用し、次項の薬効評価技術への応用を図った。

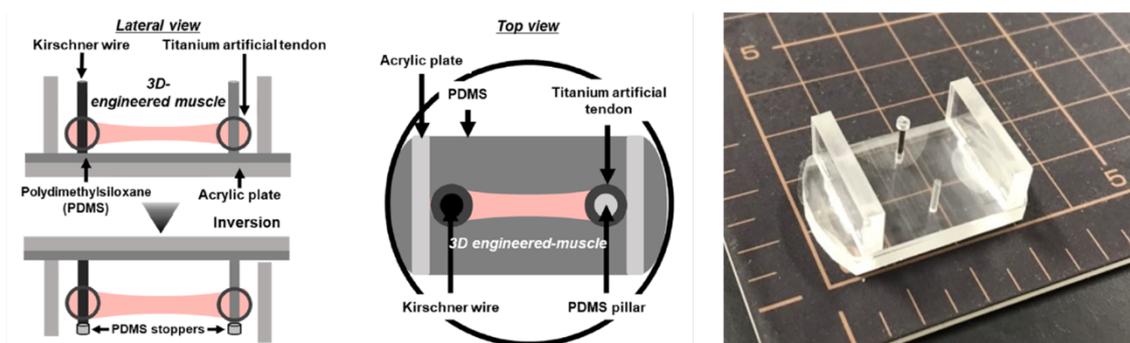


図3 筋オルガノイド収縮力定量化デバイス

(2) 筋オルガノイド収縮力を利用した薬効評価技術の確立

筋肥大効果のあるフラボノイドを培地に100 μMの濃度で培地に混合し、筋オルガノイドの収縮力が增大するかを確認した。筋オルガノイドの培養開始1週間後に投与を開始し、1週間ごとに5週目まで収縮力を評価した。筋オルガノイドの収縮力には個体差が存在し、適正な薬効評価を阻害する。そこで、1週目の収縮力評価後に有意差検定を行い、投与群と非投与群の間に収縮力の有意差が生じないように群分けを実施した。

実験結果の一例を図4に示す。筋オルガノイドの収縮力は一般的に、培養1~5週目までは増大傾向を示し、その後徐々に減少する。培養初期の1~2週目では、フラボノイド投与による効果は発現しないが、3~5週目からは投与群の収縮力が非投与群に比べて有意に増大することを確認し、筋オルガノイド収縮力定量化デバイスを利用した薬効評価技術を確立した。

その後、筋肥大や筋萎縮を生じる複数の薬効成分に対しても同様の実験を行い、筋肉に対する薬効評価モデルとして活用するとともに、qPCRによる結果と比較することで生化学的な裏付けを得た。

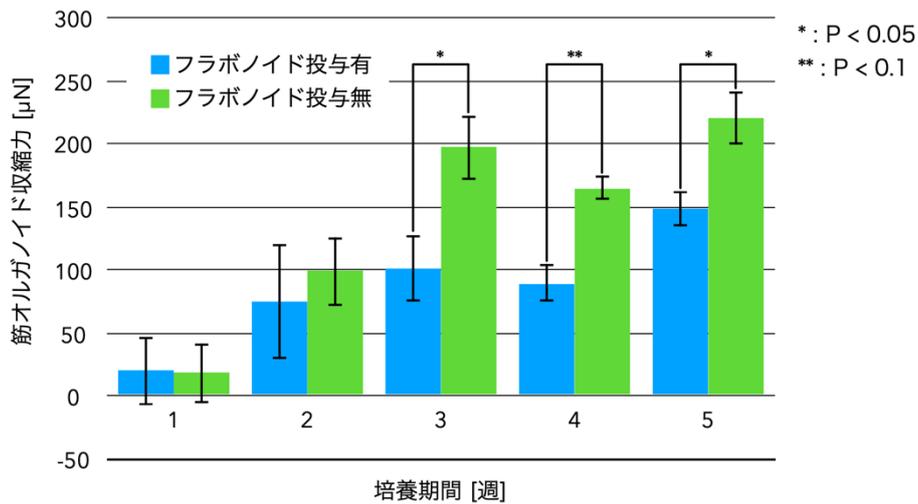


図4 フラボノイド投与の有無と筋オルガノイド収縮力増大による薬効評価

(3) 神経—筋接合モデルの確立

新たに筋オルガノイドに対して、神経細胞および神経細胞スフィアを接合する培養デバイスを開発した。PDMSで作製した微小溝にiPS神経細胞を播種、2週間培養し神経スフィアを形成する。その後、収縮力定量化デバイス上で培養した筋オルガノイドに対して微小溝を押し当てることで、神経—筋接合モデルの確立を試みた。また、研究協力者の支援により、神経細胞シートを作製し、そのシートを筋オルガノイドに巻きつける形で神経—筋接合モデルの作製する手法など、複数の手法を実施した。

観察結果の一部を図5に示す。蛍光観察により、神経細胞と筋オルガノイドの接合部が形成されていることを確認した。一方で、神経—筋接合が不十分な部分も確認され、Neuromuscular Junction Modelとしては不十分である。より生体再現度の高い神経—筋接合を目指し、今後も検討を進める予定である。

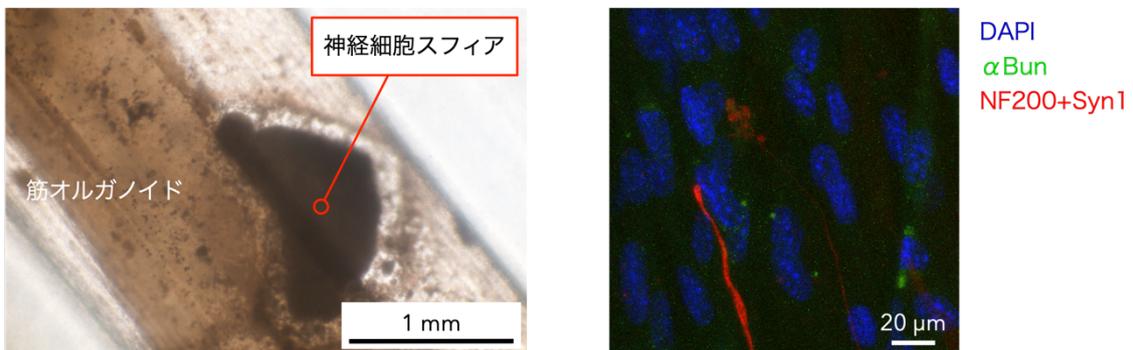


図5 神経細胞スフィアと筋オルガノイドの接合によるNeuromuscular Junction Modelの創生

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岸下滉太, 中村友浩, 横山奨
2. 発表標題 電気刺激環境下の人工骨格筋収縮力評価技術の薬効評価への展開
3. 学会等名 2022年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 原田真樹, 中村友浩, 横山奨
2. 発表標題 人工骨格筋収縮力測定デバイスの定量化に向けた取り組み
3. 学会等名 2021年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Harada M, Nakamura T and Yokoyama S.
2. 発表標題 Quantitative Evaluation of Contractility with PDMS Micro-Pillars During Artificial Skeletal Muscle Development
3. 学会等名 The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021 Conference) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 宇津奨麻, 佐久田稜, 藤里俊哉, 横山奨
2. 発表標題 マイオカイン生成を目指した人工筋肉伸縮装置による長期培養の実現
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第44回研究会 (CHEMINAS44)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Harada M, Nakamura T and Yokoyama S.
2. 発表標題 Design and Construction of a Continuous Quantitative Force Measurement Microdevice for Artificial Skeletal Muscle
3. 学会等名 The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2020 Conference) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田真樹, 中村友浩, 横山奨
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスの量産化に向けた固相拡散接合装置の開発と評価
3. 学会等名 2020年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇津奨麻, 佐久田稜, 藤里俊哉, 横山奨
2. 発表標題 マイオカイン生成を目指した人工骨格筋伸縮装置の開発
3. 学会等名 2020年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>骨格筋オルガノイドを活用した簡便な筋萎縮モデル https://www.research.oit.ac.jp/oitid/seeds/seeds/seeds-4788/ 培養筋肉を用いた健康科学研究 ~ マイオカイン探索への応用 ~ https://www.research.oit.ac.jp/oitid/seeds/seeds/seeds-6801/ 大阪工業大学工学部機械工学科 マイクロ流体力学研究室 http://www.oit.ac.jp/med/~yokoyama/mflab/pages/publications.html</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
研究協力者	中村 友浩 (Nakamura Tomohiro)	大阪工業大学・工学部・教授 (34406)	
研究協力者	大友 麻子 (Asako Otomo)	東海大学・医学部・講師 (32644)	

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