

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19899

研究課題名（和文）メカニカルストレス制御による革新的オルガノイド形成プロセスの理解深化と応用展開

研究課題名（英文）Improved understanding and application development of innovative organoid formation process by mechanical stress control

研究代表者

清水 一憲（Shimizu, Kazunori）

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：70402500

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マイクロデバイスを用いたヒトiPS細胞由来神経筋オルガノイド形成を制御し、そのプロセスの理解を深めることで、革新的な非臨床試験技術の開発へと応用展開することを目指した。その結果、細胞密度を高める、ウェルサイズを小さくする、ROCK阻害剤添加することで筋組織の収縮力が大きくなることを見出した。また神経筋オルガノイド内に神経筋接合部が存在し、シュワン細胞等が含まれることが示唆された。堅牢な試験法への展開を目指し、さらなる神経筋接合部の形成効率の向上を試みたが顕著な増加は観察されなかった。今後は筋細胞の成熟をさらに高めることで神経筋接合部の形成を増加させることができる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、骨格筋細胞や運動神経細胞、神経筋接合部に関連する疾患の解析やその治療法の開発に有用であると期待される。今後さらにオルガノイド内の骨格筋細胞の成熟度を向上させることで、堅牢な非臨床試験法となると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to control human iPS cell-derived neuromuscular organoid formation using microdevices to better understand the process and apply it to the development of innovative nonclinical testing techniques. We found that increasing cell density, decreasing well size, and adding ROCK inhibitors increased the contractility of muscle tissue. We also suggested that a neuromuscular junction exists within the neuromuscular organoids and contains Schwann cells and other cells. We attempted to further improve the efficiency of neuromuscular junction formation in order to develop a robust test method, but no significant increase was observed. In the future, it may be possible to increase neuromuscular junction formation by further enhancing myocyte maturation.

研究分野：バイオマイクロシステム

キーワード：バイオマイクロシステム オルガノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

医薬品開発の成功率は非常に低い。これはヒト臨床試験を実施する候補化合物を選び出すための培養細胞や実験動物を用いた従来の非臨床試験の正確性が低いためと考えられており、新たな非臨床試験技術の開発が求められている。

近年、オルガノイドが非常に注目されている。オルガノイドは、幹細胞を用いて作製した生体器官に類似した培養立体組織であり、多様な細胞群から構成される、細胞極性などの局所構造がある、臓器/組織の機能を有するなどの特徴がある。従来の平面培養法で培養した細胞よりも生体模倣性が非常に高いため、非臨床試験での活用が大いに期待されている。

我々はマイクロデバイス技術を用いてヒト iPS 細胞由来神経筋オルガノイドの形成を制御できる可能性を見出した。2本のマイクロポストをもつダンベル型チャンバーにヒト iPS 細胞を含むハイドロゲル溶液を入れ、骨格筋・神経系細胞へと分化誘導した。この結果、2本のマイクロポストを橋渡しするように、骨格筋細胞と運動神経細胞を含む神経筋オルガノイドが形成された。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクロデバイスを用いたヒト iPS 細胞由来神経筋オルガノイド形成を制御し、そのプロセスの理解を深めることで、革新的な非臨床試験技術の開発へと応用展開することである。

### 3. 研究の方法

96 well フォーマットに対応した収縮力測定可能なマイクロデバイスを作製し、70% EtOH を用いて洗浄後、UV 光を2時間照射して滅菌した。iPS 細胞クローン 409B2tet-MyoD、414C2tet-MyoD を京都大学の櫻井英俊先生より提供いただいた。これらの細胞を増殖させたのち、Dox を添加した。24 時間後に細胞を回収し、マトリゲルとフィブリンゲルが混合した溶液を用いて細胞溶液を作製し、デバイスに播種した。Dox を添加した筋分化培地で6日間培養した後に、神経分化培地に交換し、培養を継続した(図1)。

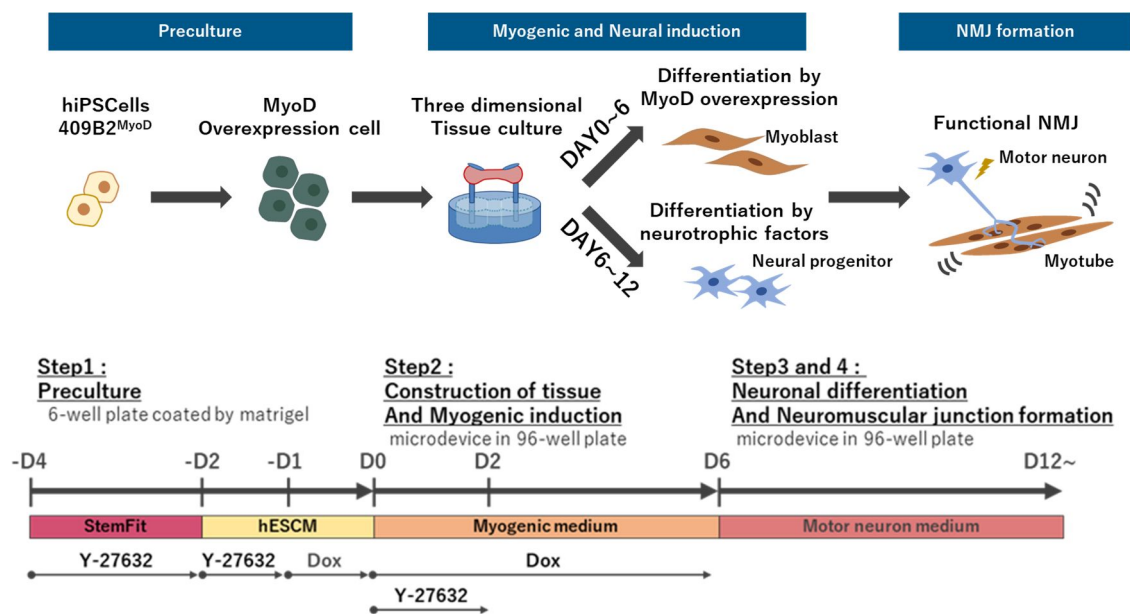


図1 培養手順

### 4. 研究成果

はじめに、iPS細胞由来筋組織培養条件の改良を行い、より大きな収縮力を発生する培養条件を検討した。その結果、組織化時細胞密度を高める、ウェルサイズを小さくする、ROCK阻害剤添加することで筋組織の収縮力が大きくなることが明らかになった(図2)。次に、上記で見出した条件で筋組織を構築し、組織化6日後から神経栄養因子を添加することで、運動神経細胞の誘導を行った。免疫染色を行い、筋管細胞周囲に神経細胞が存在することがわかった(図3)。

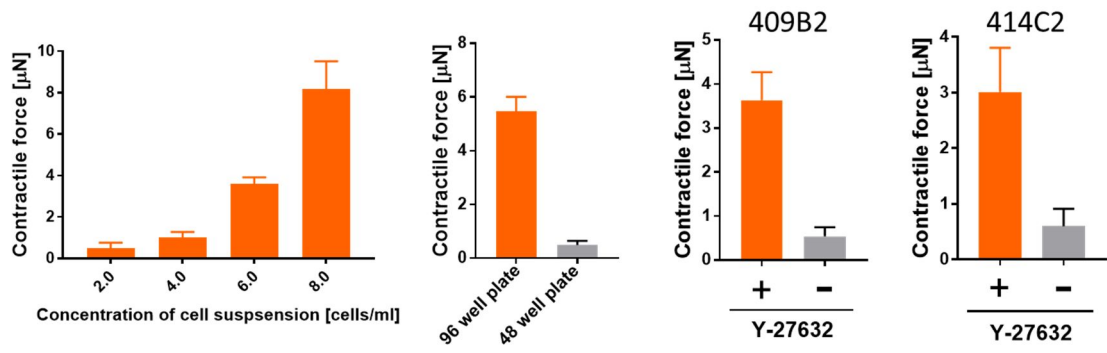


図2 筋組織培養条件の改良

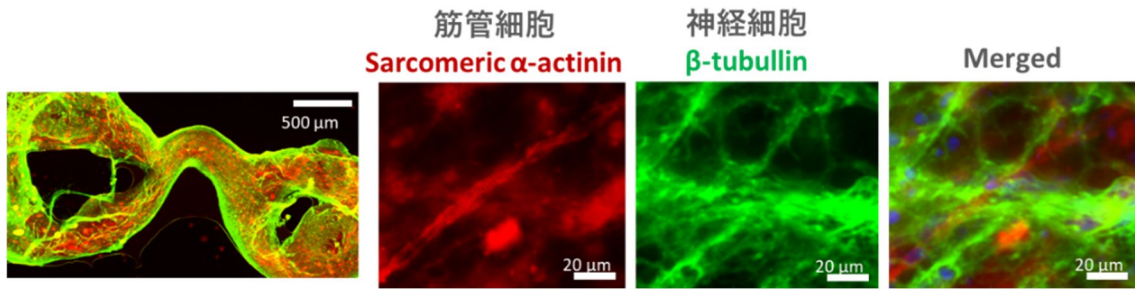


図3 免疫染色の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山本一貴、樋口昌也、秋山裕和、本多裕之、清水一憲
2. 発表標題 収縮力測定可能なマイクロデバイス上での神経筋オルガノイドの構築
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本一貴、樋口昌也、松島歩夢、秋山裕和、本多裕之、清水一憲
2. 発表標題 収縮力測定可能なマイクロデバイス上での神経筋共分化誘導法の開発
3. 学会等名 Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay (細胞アッセイ技術の現状と将来)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水一憲
2. 発表標題 マイクロデバイス技術を用いた培養骨格筋組織の構築と利用
3. 学会等名 2022年電気化学会第89回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水一憲
2. 発表標題 マイクロデバイスを用いたin vitro三次元筋組織モデルの開発と応用
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazunori Shimizu
2. 発表標題 Development of in vitro human skeletal muscle models using microfabricated devices
3. 学会等名 2021 KSBB Spring Meeting and International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀井雄平、山本一貴、秋山裕和、本多裕之、清水一憲
2. 発表標題 Developing compartmentalized three-dimensional co-culture microdevice for neuromuscular disease model
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のオンラインセミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀井雄平、山本一貴、秋山裕和、本多裕之、清水一憲
2. 発表標題 マイクロデバイス上での区画化ヒト神経筋組織モデルの構築
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本一貴、大隅早紀、長島拓則、秋山裕和、本多裕之、清水一憲
2. 発表標題 96ウェル型培養筋組織収縮力評価系を用いた抗筋萎縮ペプチドの探索
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水一憲、山本一貴、大隅早紀、長島拓則、秋山裕和、本多裕之
2. 発表標題 96穴型培養筋モデル収縮力評価系を用いた抗筋萎縮ペプチドの開発
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 亀井雄平、山本一貴、秋山裕和、本多裕之、清水一憲
2. 発表標題 神経筋疾患解析や創薬応用に向けた区画化三次元ヒト神経筋組織モデルの構築
3. 学会等名 Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay (細胞アッセイ技術の現状と将来)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有本加奈絵、秋山裕和、清水一憲、本多裕之
2. 発表標題 酸素濃度の違いが培養骨格筋細胞に与える影響
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水一憲、山本一貴、大隅早紀、長島拓則、秋山裕和、本多裕之
2. 発表標題 培養筋組織収縮力評価系の開発と抗筋萎縮ペプチド探索への応用
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 (2022)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimizu, K., Yamamoto, K., Kamei, Y., Akiyama, H., Honda, H.
2. 発表標題 Human Neuromuscular Tissue Models Fabricated on a 24-Well-Plate-Format Compartmentalized Microfluidic Device
3. 学会等名 Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC 2022)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shimizu, K., Yamamoto, K., Kamei, Y., Akiyama, H., Honda, H.
2. 発表標題 Innervated skeletal muscle-on-a-chip for modeling neuromuscular disorders
3. 学会等名 International Symposium on Chemistry for Multimolecular Crowding Biosystems (CMCB2022) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 オルガノイドの製造方法	発明者 清水一憲、本多裕之、山本一貴	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-166757	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

名古屋大学工学研究科本多研究室ホームページ <a href="https://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/life2/index.html">https://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/life2/index.html</a>
--

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	秋山 裕和  (Akiyama Hirokazu)  (60914140)	名古屋大学・工学研究科・助教     (13901)	

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