

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22360093

研究課題名(和文) 3次元動的マイクロ力学刺激を用いるiPS細胞のアクティブ力学操作・再生治療支援法

研究課題名(英文) Supporting system for regenerative medicine by utilizing three-dimensional micro dynamic stimulations and active manipulations on the iPS cells

研究代表者

小沢田 正 (Kosawada, Tadashi)

山形大学・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) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：生きている培養細胞群に対し任意の3次元方向に動的力学刺激を自在に付加可能なマイクロ3次元振動ステージおよび個別細胞に対し選択的に3次元アクチュエーションおよび動的力学刺激を付加可能とするマイクロ3次元アクチュエータを開発し、これまでとは全く異なる力学的原理に基づく培養iPS細胞のアクティブ力学操作・コントロールシステムを構築し、再生移植治療の早期実現を支援するツール開発を行った。その結果、動的力学刺激によるiPS細胞群の増殖促進を確認した。またiPS細胞から神経細胞への分化誘導において、動的力学刺激の付加により分化及びニューロンネットワーク形成の促進が可能であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We have developed completely new small sized piezoelectric three-dimensional vibration stage and a micro vibration actuator, which enable us to enforce various micro dynamic stimulations upon the cultured living iPS cells colony as well as upon a single cell. The system, not like a conventional approach but based on the principle of mechanics, has an ability to support development of the regenerative medicine. The results suggest that utilization of appropriate dynamic stimulation may be a promising approach not only to accelerate iPS cells proliferation but also to improve differentiation efficiency of iPS cells into neurons as well as neuronal networking.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・機械力学・制御

キーワード：動的刺激 3次元刺激 iPS細胞 アクティブ力学操作 分化誘導 細胞増殖 振動ステージ 振動アクチュエータ

1. 研究開始当初の背景

(1)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、その具体的手法の開発と早期実用化は、医学的重要性から焦眉の急である。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、iPS細胞を必要な細胞へと分化誘導し再生医療に導入するためには、分化誘導因子や誘導条件の特定、誘導効率の大幅な改善、ガン化防止の安全性確保、さらには3次元構造を有する臓器組織への誘導法の開発などまだ多くの課題が山積しており、これらの克服のために我国を含め世界的な開発競争が行われている。

(2)申請者は、これまで動的力学刺激による細胞・組織の損傷治療法に関する開発研究を行ってきた。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にあるという事実に着目し、この環境を培養時に実現することによりiPS細胞の増殖や分化を誘導促進できる可能性があるのではないかとこの着想を得た。すなわち、もし3次元振動台をピエゾ振動子等を駆使し超小型化できれば、細胞培養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できるのではないかとこの全く新たなアイデアを得た。さらに、申請者が細胞の損傷治療法に用いたマイクロプローブによる動的アクチュエーションを個々の細胞に選択的に行うことによりiPS細胞の分化誘導をよりアクティブにコントロールし得る可能性が高まるのではないかとこの発想を得た。

2. 研究の目的

(1)iPS細胞を用いた再生治療に貢献するため、本研究では、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マイクロ3次元振動ステージおよび細胞への個別的・選択的力学操作を可能とするマイクロアクチュエータシステムを開発し、これまでとは全く異なる力学的原理に基づく細胞培養のアクティブコントロールを可能とする、革新的デバイスシステムの創成をめざす。

(2)このシステムを用いたiPS細胞のアクティブ分化誘導・機能発現の促進および計画的増殖を試み、再生移植治療の早期実現を強力に支援する新次元のツール開発をめざす。

3. 研究の方法

(1)ピエゾマイクロ3次元振動ステージシステムの構築:マイクロ3次元振動ステージは、ピエゾ素子を利用した微小一体型振動子とこれに付随する培養用ステージから成るシンプルな構造を有している。1枚のステンレス板から立体ダブル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箇所複数のピエゾ素子を接着し製作する。これらのピエゾ素子に任意の信号を入力することにより先端ステージの変位を高精度に制御でき、3次元的なアクチュエーションが可能となる。また、任意の振動数で加振させることが可能となる。複数の本デバイスをCO₂インキュベータ内に組込み制御することにより、種々の3次元動的力学刺激環境下で組織的に培養コントロールを行うことができるシステムの構築を行う。

(2)ピエゾマイクロ3次元アクチュエータシステムの構築:アクチュエータは、立体ダブルL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ピエゾ素子を装着し構築する。ピエゾ素子に信号を入

力することにより先端の多段触覚プローブで3次元的に自由なアクチュエーションおよび励振が可能となる。また、プローブを被測定体に接触させた場合の振動子のインパルス応答を高精度に測定することにより、被測定体の力学的コンプライアンス（やわらかさ）を定量的に評価可能となる。

(3)マウス iPS 細胞の神経細胞への分化誘導促進：第一段階として、マウス iPS 細胞から神経幹細胞へ分化誘導し、ついで神経幹細胞から神経細胞（ニューロン）およびグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）への分化誘導を試みる。それぞれの分化の段階において、核内転写因子など生化学的分化誘導因子のみの場合と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、さらにマイクロアクチュエータによる個別細胞への選択的力学刺激を付加した場合について比較実験を行う。その後、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。この際、細胞内部構造の変遷把握を、遺伝子導入トランスフェクション法を用いたアクチンフィラメント細胞骨格の GFP 蛍光観察・分子イメージングにより行う。さらに、細胞のコンプライアンス特性の計測も併せて行い、これらの結果を統合し、細胞の各分化プロセスに最適な3次元動的力学刺激環境の探索を行う。

(4)ヒト iPS 細胞の神経細胞への分化誘導促進：本研究ではヒト iPS 細胞(HPS0001および HPS0002)を用い、特にヒト iPS 細胞から神経幹細胞へ分化誘導し、次に神経幹細胞から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、さらにマイクロアクチュエータによる個別細胞への選択的力学刺激を付加した場合についてについて、比較実験を行う。その後、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。また力学刺激と細胞内部構造および力学特性の変遷の検証を、22年度のシステムを応用して行う。マウス iPS 細胞の場合と大きく異なることが予想されるため、その差異を精査・検証すると同時に、ヒト iPS 細胞特有の各分化プロセスに最適な3次元動的力学刺激環境の探索を行う。

(5)ヒト iPS 細胞の特定細胞への分化誘導促進と指針確立：神経細胞の研究結果に基づき、ヒト iPS 細胞の特定細胞への分化誘導促進を試みる。特に力学刺激に敏感な骨芽細胞、軟骨細胞への分化誘導について集中的に実験を行う。以上の研究成果を統合し、ヒト iPS 細胞の分化誘導を促す最適な力学刺激環境、すなわち刺激の形態、方向、変位量、周波数、インターバル、総時間数に基づくアクティブ分化誘導促進法の指針を確立し、再生治療支援法としての完成をめざす。

4. 研究成果

(1)生きている培養細胞群に対し任意の3次元方向に動的力学刺激を自在に付加可能なマイクロ3次元振動ステージを開発した。1枚のステンレス板からねじれ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箇所複数のピエゾ素子を接着し、先端に培養ディッシュ用ステージ部を設け製作した。

35mm 標準培養ディッシュに対し、各軸方向に周波数 30Hz、全振幅 30 μm の加振能力を有している。

(2)生きている培養個別細胞に対し選択的に3次元アクチュエーションおよび動的力学刺激を付加可能とするマイクロ3次元アクチュエータを開発した。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ピエゾ素子を装着し構築する。先端の触覚プローブで個別細胞に対し選択的に3次元アクチュエーションおよび励振を

可能とした。各軸方向に周波数 30Hz , 全振幅 30 μm の加振能力を有している。

(3)以上のマイクロデバイス開発により ,これまでとは全く異なる力学的原理に基づく培養 iPS 細胞のアクティブ力学操作・コントロールシステムを構築し ,再生移植治療の早期実現を支援するツール開発を行った。以下に ,本システムにより得られた主な結果を記す。

(4)未分化ヒト iPS 細胞は動的力学刺激に反応する細胞力覚機構を有し ,培養時に付加される動的力学刺激の方向や周波数によって増殖が大きく促進される場合あるいは抑制される場合など異なる応答を示すことが見出された。

(5)マウスおよびヒト iPS 細胞から神経細胞への分化誘導において ,付加される動的力学刺激の方向や周波数によって分化及びニューロンネットワーク形成の促進および抑制が可能であることを確認した。また ,分化過程において ,力学的スティフネスが変遷していく現象を確認した。

(6)上記動的力学刺激のパラメータは方向 ,周波数 ,変位 ,インターバル ,刺激位置など多岐に渡る。本研究ではその第一段階を確認したが ,最適な物理的 ,力学的環境条件を特定するため ,今後さらなる組織的研究が必要である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

Z. Feng, Y. Wagatsuma, S. Kobayashi, T. Kosawada, D. Sato, T. Nakamura, T. Kitajima, M. Umezumi, Analysis of the Contraction of Fibroblast-Collagen Gels and the Traction Force of Individual Cells by a Novel Elementary Structural Model, Proceedings of 35th Annual International Conference of the IEEE EMBS, Osaka, pp.6232-6235,(2013.7)査読有

Ken-ichi Konno, Tadashi Kosawada, Yasushi Kaneyama, Hiroya Endo,

Zhonggang Feng, Non-invasive Stiffness Detection Method for Living Cell Nucleus by Using Piezoelectric Micro Sensor, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, IFMBE Proceedings 39, Beijing · China, pp. 290 -293,(2012) , 査読有

Ken-ichi Konno, Tadashi Kosawada, Toru Ichita, Zhonggang Feng, Yasukazu Hozumi, Kaoru Goto, Novel Three-dimensional Micro Vibration Stage and Its Ability to Influence in Cellular Senescence, World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, IFMBE Proceedings 39, Beijing · China, pp.274- 277,(2012) , 査読有

小沢田 正 , 他 6 名 , D&D2011 におけるダイナミクスと制御の研究動向 , 「 7 . 細胞 , 組織 , 臓器のダイナミクスとその応用 」 , 日本機械学会論文集 (C 編) , 78-789,pp.1306-1314,(2012) , 査読無

Tadashi Kosawada, Ken-ichi Konno, Yasushi Kaneyama, Zhonggang Feng, Yasukazu Hozumi and Kaoru Goto, “Non-invasive Stiffness Evaluation Method for Living Cellular Nucleus by Using Micro Piezoelectric Vibration Device”, International Symposium Physicochemical Field for Genetic Activities January 24-26,2011 , Awaji , Japan, p.38,(2011) , 査読無

Ken-ichi Konno, Tadashi Kosawada, Masato Suzuki, Takeshi Nakamura, Zhonggang Feng, Yasukazu Hozumi, Kaoru Goto: Dynamic actuation and sensing micro-device for mechanical response of cultured adhesive cells, Microsystem Technologies, Vol.16,pp. 993-1000,(2010) , 査読有

Ken-ichi KONNO, Tadashi KOSAWADA, Ryota SATO, Zhonggang Feng, Yasukazu HOZUMI and Kaoru GOTO, Three- dimensional Micro Vibration Stage and Its Application to Cell Culture, World Congress of Biomechanics 2010, Singapore, IFMBE Proceedings 31(2010), pp.1409- 1412 , 査読有

Ken-ichi KONNO, Tadashi KOSAWADA, Takeshi NAKAMURA, Zhonggang Feng, Piezoelectric Micro Probe Device for Mechanical

Stimulation and Its Detection for Living Cells, World Congress of Biomechanics 2010, Singapore, IFMBE Proceedings 31(2010), pp.1413-1416, 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

真坂 洋平,早坂 紘旗,小沢田 正,馮 忠剛,ヒト iPS 細胞の神経細胞への分化過程における動的力学刺激の影響評価,日本機械学会東北支部第 49 期総会・講演会, No.2014-1, pp.127-128,(2014.3.14,東北大学工学部)

金子 暢生,永田 哲平,伊東 彬,小沢田 正,長谷川 麗,宇山 浩,動的力学刺激によるマウスニューロンネットワークの 3 次元形成への影響,日本機械学会東北支部第 44 回卒業研究発表講演会, pp.247-248,(2014.3.11,山形大学工学部)

菊池 駿佑,真坂 洋平,早坂 紘旗,小沢田 正,ヒト iPS 細胞の神経細胞への分化に及ぼす動的力学刺激の影響評価,日本機械学会東北支部第 44 回卒業研究発表講演会, pp.251-252,(2014.3.11,山形大学工学部)

小沢田 正,「iPS 細胞の基礎と研究上の二ーズ」,iPS 関連機器開発 参入促進オープンセミナー招待講演,(2014.1.17,仙台市:TKP ガーデンシティ仙台)

小泉 智幸,宇賀神 一也,小沢田 正,馮 忠剛,マウス iPS 細胞の分化に及ぼす動的力学刺激の影響に関する研究,日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2013, USB 論文集, No.454, 9pp.(2013.8.30,九州産業大学)

永田 哲平,小沢田 正,長谷川 麗,宇山 浩,マウス神経細胞の 3 次元ネットワーク形成に及ぼす動的力学刺激の影響,日本機械学会東北支部第 49 期秋季講演会講演論文集, No.2013-2, pp.101-102,(2013.9.20,岩手大学工学部)

小泉 智幸,会田 和広,今野 健一,馮 忠剛,小沢田 正,マウス iPS 細胞の分化過程における力学刺激の影響評価,日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2012, USB 論文集, No.431, 9pp.(2012.9.19,慶応義塾大学日吉キャンパス)

後藤 敬成,今野 健一,小沢田 正,馮 忠剛,八月朔日 泰和,後藤 薫,超小型 3 次元振動ステージの細胞培養への応用,日本機械学会東北支部第 48 期秋季講演会講演論文集, No.2012-2, pp.56-57.(2012.9.22,八戸高専)

阿部 淳司,今野 健一,市田 徹,工藤 佳明,小沢田 正,馮 忠剛,動的力学刺激を用いた iPS 細胞の培養コントロール, Dynamics and Design Conference 2011, CD-ROM 論文集 204, 6pp.(2011.9.5,高知工科大学)

小泉 智幸,会田 和広,今野 健一,小沢田 正,馮 忠剛,マウス iPS 細胞の分化過程における力学特性の評価,日本機械学会東北支部第 47 期秋季講演会講演論文集 No. 2011-2, No.202, pp.54-55,(2011.9.22,山形大学工学部)

市田 徹,今野 健一,小沢田 正,馮 忠剛,八月朔日 泰和,後藤 薫,超小型 3 次元振動ステージの開発と細胞培養コントロールへの応用,日本機械学会東北支部第 47 期秋季講演会講演論文集 No. 2011-2, No.202, pp.56-57,(2011.9.22,山形大学工学部)

工藤 佳明,今野 健一,小沢田 正,馮 忠剛,長時間細胞操作用培養環境維持装置の開発,日本機械学会東北支部第 47 期秋季講演会講演論文集 No. 2011-2, No.202, pp.50-51,(2011.9.22,山形大学工学部)

会田 和広,今野 健一,阿部 淳司,中村 健,小沢田 正,iPS 細胞の分化過程における力学特性の評価, Dynamics and Design Conference 2011, CD-ROM 論文集 430, 7pp.(2010.9.15,同志社大学京田辺キャンパス)

市田 徹,今野 健一,金山 寧,佐藤 亮太,小沢田 正,馮 忠剛,八月朔日 泰和,後藤 薫,超小型 3 次元振動ステージの開発と細胞培養への応用, Dynamics and Design Conference 2011, CD-ROM 論文集 433, 6pp.(2010.9.15,同志社大学京田辺キャンパス)

〔図書〕(計 1 件)

小沢田 正,技術情報協会,最新動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術,「2-5-1:動的力学刺激によるヒト iPS 細胞の培養・分化制御法」, 2014.4.30, pp.270-275

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

URL:http://kosawada_lab.yz.yamagata-u.ac.jp/

6. 研究組織

(1)研究代表者

小沢田 正 (KOSAWADA, Tadashi)
山形大学・理工学研究科・教授
研究者番号：10143083

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者

馮 忠剛 (FENG, Zhonggang)
山形大学・理工学研究科・准教授
研究者番号：10332545

後藤 薫 (GOTO, Kaoru)
山形大学・医学部・教授
研究者番号：30234975