

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24656150

研究課題名(和文) 3次元動的力学刺激場の能動応用による再生治療用3次元ニューロンネットワークの創生

研究課題名(英文) Three-dimensional neuronal networking for regenerative medicine by active utilization of three-dimensional dynamic stimulation field

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：再生治療に貢献するため、ポリ乳酸(PLA)多孔質体を足場材料として用い、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圧電駆動超小型3次元振動ステージを開発し、これまでとは全く異なる力学的原理に基づく3次元ニューロンネットワークの創生を可能とする革新的デバイスシステムの構築を目指した。

iPS細胞を用いた研究の結果、振動刺激を付加した場合、3次元ニューロンネットワークを伸展させる効果があることを確認した。また振動方向とニューロンネットワークの伸展方向には相関が存在し得る可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We have developed completely new small sized piezoelectric three-dimensional vibration stage. Together with scaffold of poly-lactic acid, the device enables us to enforce various micro dynamic stimulations upon the cultured living cells.

The system, not like a conventional approach but based on the principle of mechanics, has an ability to support development of the regenerative medicine by using iPS cells. The results suggest that utilization of appropriate dynamic stimulation may accelerate three-dimensional neuronal networking. It is also found that there may be certain correlation between the direction of the neuronal networking and the direction of the dynamic stimulation.

研究分野：機械力学・生体力学

キーワード：動的力学刺激 3次元振動ステージ iPS細胞 ポリ乳酸多孔質体 分化誘導 3次元ニューロンネットワーク 再生治療

## 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、iPS 細胞を再生医療に導入するためには、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次元構造を有する臓器組織への立体培養法の開発は最大かつ最後の課題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。

申請者は、これまでの細胞の力学刺激に関する研究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培養構築に応用できるのではないかと全く新たな着想を得た。

## 2. 研究の目的

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圧電駆動超小型3次元振動ステージを開発し、これまでとは全く異なる力学的原理に基づく3次元ニューロンネットワークの創生を可能とする、革新的デバイスシステムの構築をめざす。

本研究で挑戦する iPS 細胞の神経細胞への分化誘導・立体培養は、これまで医学的に不可能とされてきた脊髄損傷受傷者(国内推計10万人以上、毎年5千人以上受傷)の治療法開発へ大きな福音をもたらす点で、成功による意義は学問的にも社会的にもきわめて大きい。すなわち脊髄損傷の場合は、あらかじめ患者自身あるいは適合性の高い細胞株からつくられた培養 iPS 細胞を神経幹細胞あるいは神経細胞に分化させた上で

一定量準備し、受傷後できるだけ早期に移植する必要がある。そこで本研究では誘導因子に加え、3次元動的力学刺激環境を実現することにより、分化誘導から細胞組織のアクティブ立体培養を可能とする全く新たな手段の提言を行い、再生移植治療の早期実現への貢献をめざすものである。

## 3. 研究の方法

(1)超小型圧電3次元振動ステージシステムの構築:超小型3次元振動ステージは、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次元動的力学刺激付加が可能となる。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CO<sub>2</sub>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。なお、培養ヒト iPS 細胞のコロニー成長に及ぼす動的力学刺激の影響を調査した結果、特定の周波数による動的力学刺激が iPS 細胞を活性化させ、コロニーの増殖を大幅に促進することを確認している。

(2)ヒト iPS 細胞の神経細胞への分化誘導促進法構築:本研究ではヒト iPS 細胞(HPS0001およびHPS0002)を用い、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。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も合わせて行う。iPS 細胞から分化誘導された神経細胞と臨床的に採取された神経細胞とでは、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。

(3) 3 次元ニューロンネットワーク創生の試み：培養液中に設けた生分解性多孔質ポリ乳酸（空隙率 90%以上、連続孔）のマイクロ立体足場に分化誘導した神経細胞を播種し、この培養ディッシュに開発した超小型 3 次元振動ステージにより 3 次元力学刺激を組織的に作用させることにより、ニューロンの 3 次元化を段階的に誘導構築していく。ニューロンは付加された力学刺激を感知、反応しつつ、足場内の無数の連続孔を随時選択し、3 次元的に成長していくものと予想される。そこで、特にニューロンのネットワーク形成を司る部分である軸索および樹上突起の 3 次元発生・成長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評価を行う。すなわち、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、ネットワーク構築への増幅・誘導効果について組織的検証を行う。

以上の研究成果を統合し、ヒト iPS 細胞からのニューロンネットワークの 3 次元構築を促す最適な力学刺激環境場の能動利用法を開発する。また、これに基づく神経細胞のアクティブ立体培養法の指針を確立し、脳・神経系再生治療を格段に進展させる支援ツールシステム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 piezo 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  $\mu\text{m}$  の加振能力を有している。(2) 生分解性多孔質ポリ乳酸（空隙率 90%以上、連続孔）のマイクロ立体足場に分化誘導した神経細胞を播種し、この培養ディッシュに開発した超小型 3 次元振動ステージにより 3 次元力学刺激を組織的に作用させることにより、ニューロンの 3 次元化を段階的に誘導構築する手法を構築した。

(3) マウス神経細胞については、10Hz 程度の振動刺激を付加した場合、ニューロンネットワークを広く伸展させる効果があることを確認した。ヒト神経細胞については、長時間振動刺激を付加し続けることで、運動神経細胞への分化が促進されることが明らかになった。また 1, 5, 10Hz いずれの振動刺激も、静置培養時よりもニューロンネットワークの成長を促進させることが明らかになった。さらに、振動方向とニューロンネットワークの伸展方向には相関が存在し得る可能性を見出した。

#### 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 5 件)

T. Kosawada, R Harada, R Ajiki, H Endo, Z. Feng, Novel Method to Explore the Mechanical Inhomogeneity of Human Osteoblast Nucleus and Its Relationship to Cell Cycle, Proceedings of the JSME/ASME 2014 International Conference on Materials and Processing, Detroit, USA, 8pp. (2014.6.9), 査読有

Z. Feng, Y. Wagatsuma, S. Kobayashi, T. Kosawada, D. Sato, T. Nakamura, T. Kitajima, M. Umezu, 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

〔学会発表〕(計 10 件)

伊東 彬, 永田 哲平, 金子 暢生, 小沢田 正, 長谷川 麗, 宇山 浩, PLA 多孔質体および動的力学刺激を用いたマウスニューロンの 3 次元ネットワーク形成の試み, 日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2013, USB 論文集, No.170, 9pp.(2014.8.28), 上智大学四谷キャンパス(東京都千代田区)

早坂 紘旗, 真坂 洋平, 菊池 駿佑, 小沢田 正, 馮 忠剛, ヒト iPS 細胞から神経細胞への分化・成長過程に及ぼす動的力学刺激の影響, 日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2013, USB 論文集 No.169, 11pp.(2014.8.28), 上智大学四谷キャンパス(東京都千代田区)

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(宮城県, 仙台市)

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 次元的形成への影響, 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(山形県, 米沢市)

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(山形県, 米沢市)

小沢田 正, 「iPS 細胞の基礎と研究上のニーズ」, 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), TKP ガーデンシティ仙台(宮城県, 仙台市)

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(岩手県, 盛岡市)

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(福岡県, 福岡市)

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(青森県, 八戸市)

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(神奈川県, 横浜市)

〔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：  
出願年月日：  
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/](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