

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04805

研究課題名（和文）運動機能評価が可能なヒト神経-筋アクチュエータの創出

研究課題名（英文）Construction of human neuron-muscle actuator to evaluate contractility

研究代表者

森本 雄矢（Morimoto, Yuya）

東京大学・大学院情報理工学系研究科・准教授

研究者番号：60739233

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではヒト運動神経をヒト骨格筋組織上で培養することで、運動神経と筋線維が接続し、運動神経から信号により筋組織の収縮運動を実現できることを明らかにした。加えて、一对の骨格筋組織を関節を介して取り付けることにより、収縮量を伴う骨格筋組織の収縮運動可能な骨格筋組織アクチュエータを実現できることを明らかにした。この骨格筋組織アクチュエータは各骨格筋組織の収縮運動を制御することで関節の回転量制御が可能であり、筋収縮に伴い関節に付いたアームを動かすことで物体操作できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で生み出した技術は、骨格筋組織の収縮運動の体外での再現に有用であり、生物学分野や医学分野での骨格筋組織の理解に貢献可能である。さらに、生体を模擬した運動を体外で実現できるため、運動学やロボティクスの分野でも大きく貢献可能であり、培養組織の新たな応用先を開拓可能な技術であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we showed that motor neurons and skeletal muscle fibers were connected by culturing the motor neurons on a human skeletal muscle tissue, and the muscle tissue was contractible according to transmitted signals from the motor neurons. In addition, we succeeded in formation of a skeletal muscle tissue actuator capable of muscle contractions with large contraction amount by arranging a pair of skeletal muscle tissues via a joint. This actuator with skeletal muscle tissues can control rotation of the joint according to contractions of each skeletal muscle tissue, and can manipulate objects by moving an arm attached to the joint with the muscle contraction.

研究分野：マイクロ工学

キーワード：バイオロボティクス マイクロ加工 BioMEMS 組織工学 バイオエンジニアリング

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

運動神経と骨格筋線維の間にある神経筋接合部は、骨格筋への神経刺激の伝達を可能にするだけでなく、発生機序や治療法が未だに不明な疾患(筋無力症や ALS など)の発生原因の一つと見なされている。この神経筋接合部における機能解析や疾患発症メカニズムの解明には、様々な要因が影響し合う生体を用いるより、骨格筋線維と運動神経のみから体外で再構築した神経筋接合部を用いる方が効果的である。神経筋接合部の再構築は、体外で構築した骨格筋管に運動神経を共培養させることで、国内外問わず近年実現されてきた。しかし、従来の神経-骨格筋共培養系では、筋管が基板などに固定されており、生体の骨格筋とは異なり収縮運動を行えていなかった。そのため、骨格筋組織の収縮運動を評価軸とした、神経筋接合部の機能評価が困難であった。収縮運動を評価するためには、自由端に骨格筋組織を設置することによる、組織の収縮運動を再現可能な筋アクチュエータの創出が必要である。

### 2. 研究の目的

ヒト筋芽細胞から構築した骨格筋組織上にてヒト神経幹細胞を運動神経に分化させることで、世界に先駆けて神経筋接合部を有するヒト神経-筋アクチュエータを実現することを目的とした。本目的の達成に向けて、ヒト神経-筋組織の構築方法を確立することを目指す。また、興奮した運動神経から信号が神経筋接合部を介して骨格筋組織に伝達されることで、神経の活性程度から骨格筋組織の収縮運動を制御可能であることを明らかにする。さらに、リンク機構を有するデバイスの表・裏面での骨格筋組織の構築により、拮抗筋付き筋アクチュエータを実現し、生体に近い収縮率を持った骨格筋組織の収縮運動を実現する。

### 3. 研究の方法

まず、ヒト筋管とヒト神経幹細胞から分化させたヒト運動神経との間に神経筋接合部が構築できるかを確認する。培養シャーレ上にてヒト筋芽細胞を培養し、分化培地で培養をすることで筋管を形成した。その後、ヒト神経幹細胞スフェロイドをシャーレ上に播種した状態で培養を続けることで、ヒト運動神経とヒト筋管の接続を促した。この時、神経細胞興奮薬であるグルタミン酸を添加して神経細胞を興奮させ、その神経細胞の信号が筋管に伝達されるかを確認した。

次に、これまでに研究代表者が開発したマイクロ加工したハイドロゲル中での筋芽細胞培養法を基に、ヒト骨格筋組織を構築方法を確立する。この時、使用するハイドロゲルや培養液の組成を変化させることで、収縮可能な骨格筋組織構築法を明らかにする。さらに、収縮可能な骨格筋組織にヒト神経幹細胞を播種し、運動神経と筋管が共培養されたヒト神経-筋組織を構築する(図1)。このヒト神経細胞の播種においては、マイクロ流路を用いて形成した紐状の細胞組織であるヒト神経幹細胞ファイバを用いた。この神経幹細胞ファイバは作製工程の関係で周囲をアルギン酸ゲルに覆われているため、そのアルギン酸ゲルをアルギナーゼで溶解し、神経幹細胞組織を露出した状態で骨格筋組織に接着させた。この状態で培養することで、筋組織と神経幹細胞ファイバを融合させ、神経-筋組織を構築した。電気刺激を負荷して筋管収縮特性が維持されているか確認するとともに、グルタミン酸を添加し神経から筋管への信号伝達が可能か確認する。

最後に、筋アクチュエータの構築に向けて、まず、3Dプリンタを用いて形成した樹脂製の部品を組み立ててロボット骨格を構築した。このロボット骨格の両面に生体適合性のある接着剤で柔軟金電極を接着した。紫外光を20分以上照射してロボット骨格を滅菌した後、PDMSスタンプ内でハイドロゲル溶液をゲル化し形成した筋芽細胞含有ハイドロゲルシートをロボット骨格の両面に積層した。この筋芽細胞含有ハイドロゲルシートは複数のストライプ構造(幅・高さ500 $\mu$ m、長さ4mm)を有しており、構造中で細胞が一方向に整列することを促すようになっている。ハイドロゲルシートを積層した状態で培養を行うことにより、ロボット骨格上にて筋芽細胞が融合した筋管の形成を誘導し、ロボット骨格の両面に骨格筋組織を構築した(図2)。この骨格筋組織の張力はお互いに釣り合っているため、筋組織の収縮運動を体外で再現可能になっている。

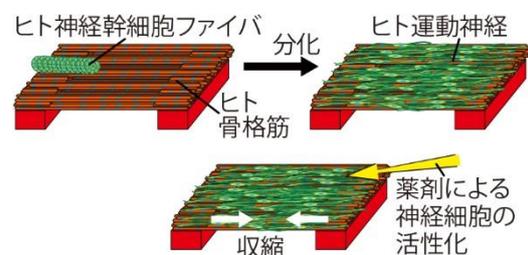


図1. 神経-筋組織の構築方法ならびに駆動法の概要

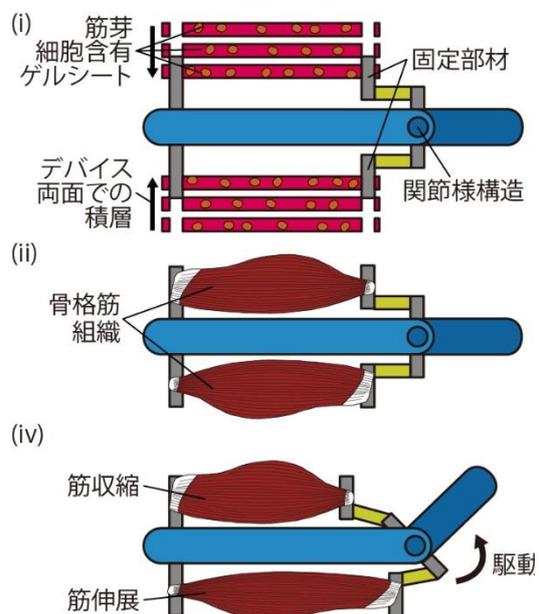


図2. 収縮運動を評価可能な筋アクチュエータの構築法

#### 4. 研究成果

ヒト筋芽細胞を培養シャーレ上でコンフルまで増殖させた後、分化培地で培養することでヒト筋管を形成した。この上にヒト神経幹細胞塊を播種し、運動神経への分化を促したところ、神経幹細胞から神経軸索が伸びていき、筋管と接続する様子が確認された。この状態で神経興奮薬であるグルタミン酸を添加したところ、筋管が収縮運動する様子が確認された。本結果より、ヒト筋芽細胞から分化した筋管とヒト神経幹細胞から分化した運動神経の間で神経筋接合部が形成可能なことが確認された。

収縮可能な骨格筋組織構築法を見出すために、マイクロ加工したハイドロゲル中でヒト筋芽細胞を培養して、骨格筋組織を構築した。この時、ハイドロゲルとしてマトリゲルとフィブリンとマトリゲルの混合ゲルの2種類を使用して、構築される骨格筋組織の収縮性能を比較した(図3a, b)。電気刺激を負荷したところ、マトリゲルで構築した骨格筋組織では一部の筋管しか収縮しなかったが、混合ゲルを使用した場合は組織全体にて筋管が収縮することが確認された。さらに、成長因子阻害剤を添加した培養液で培養したところ(図3c)、混合ゲルで構築した骨格筋組織は大きな収縮を生み出すことが明らかになった。本結果より、フィブリンとマトリゲルの混合ゲルの使用と成長因子阻害剤入り培養液の使用が、収縮可能な骨格筋組織構築に重要であることが明らかとなった。さらに、この収縮可能な骨格筋組織にアルギン酸を溶解してあるヒト神経幹細胞ファイバを接触させた状態で1時間静置することにより、ヒト神経幹細胞ファイバと骨格筋組織が接着することが明らかになった。神経幹細胞ファイバの使用が有用であることが確認された。その後、15日間培養すると、神経細胞と骨格筋組織が一体化した神経-筋組織が構築されることが分かった。この神経-筋組織に電気刺激を負荷すると、組織内の筋管が収縮運動しており、筋管の収縮特性が失われていないことが確認された。さらに、グルタミン酸を添加した際も、筋管の収縮が観察され、神経筋接合部の形成が確認することができた。これらの結果は、ヒト骨格筋組織とヒト運動神経から成る神経-筋組織中で神経筋接合部の形成に成功していることを示しており、開発した方法は神経起因の骨格筋組織の収縮実現に適していると考えられる。

骨格筋組織の収縮運動の実現に向けて、2つの拮抗する骨格筋組織から成る筋アクチュエータを構築した。両骨格筋組織の端部は腱様構造を介してロボット骨格の関節に繋がることで張力のバランスが取られているため、収縮していない状態では関節が回転せずに定常状態を維持できることが確認された。この筋アクチュエータの各々の骨格筋組織に電気刺激を選択的に負荷したところ、関節が回転するとともに、片方の骨格筋組織が収縮運動し、もう一方の骨格筋組織が伸展することに成功した。この時の骨格筋組織の収縮率は20%以上を達成しており、この結果はヒトの指における関節駆動と同等の収縮運動(筋組織収縮率20~40%)を実現していることを示している。これらの結果は、当該筋アクチュエータを用いることで、体外においても筋組織の収縮運動を再現できることを示しており、筋収縮評価のための運動モデルとして利用可能であると考えられる。

本研究で生み出した技術は、神経細胞からの信号伝達による骨格筋組織の収縮を体外で再現することに有用であり、生物学分野や医学分野における骨格筋組織の収縮動態の理解に貢献可能である。さらに、筋アクチュエータの構築により、生体と同等の収縮運動を体外で実現しており、運動学やロボティクス分野に当該技術は大きく貢献可能なため、培養組織の新たな応用先を開拓可能な技術であると考えられる。

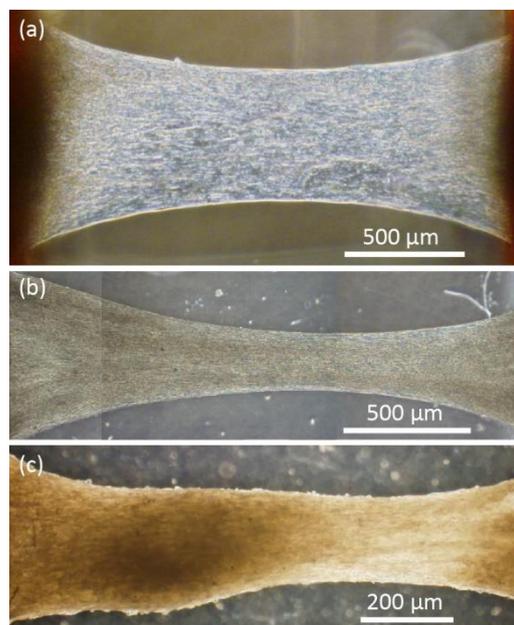


図3. (a)マトリゲルで構築した筋組織, (b)混合ゲルで構築した筋組織, (c)成長因子阻害剤入り培養液と混合ゲルで構築した筋組織

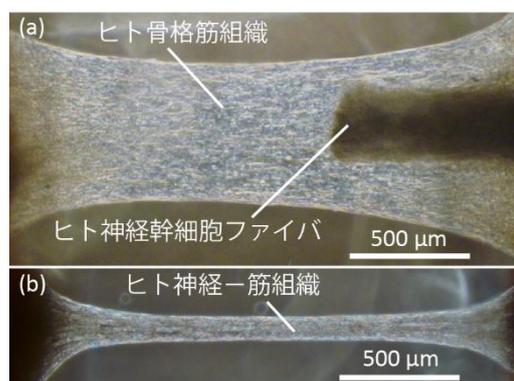


図4. (a)骨格筋組織に神経幹細胞ファイバが接着した様子, (b)構築された神経-筋組織

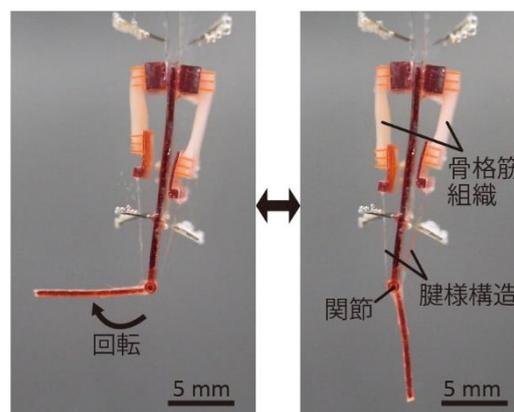


図5. 筋アクチュエータにおける骨格筋組織の収縮運動の様子

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuya Morimoto, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi	4. 巻 4
2. 論文標題 Biohybrid robot with skeletal muscle tissue covered with a collagen structure for moving in air	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 APL Bioengineering	6. 最初と最後の頁 26101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5127204	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 Yuya Morimoto, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi	4. 巻 3
2. 論文標題 Biohybrid robot powered by an antagonistic pair of skeletal muscle tissues	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Robotics	6. 最初と最後の頁 eaat4440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scirobotics.aat4440	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 Ai Shima, Yuya Morimoto, Sweeney H. Lee, Shoji Takeuchi	4. 巻 370
2. 論文標題 Three-dimensional contractile muscle tissue consisting of human skeletal myocyte cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 168 ~ 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2018.06.015	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 該当する
1. 著者名 Yuya Morimoto, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi	4. 巻 33
2. 論文標題 Biohybrid device with antagonistic skeletal muscle tissue for measurement of contractile force	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Robotics	6. 最初と最後の頁 208 ~ 218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/01691864.2019.1567382	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 Mori Nobuhito, Morimoto Yuya, Takeuchi Shoji	4. 巻 11
2. 論文標題 Perfusable and stretchable 3D culture system for skin-equivalent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biofabrication	6. 最初と最後の頁 011001 ~ 011001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1758-5090/aaed12	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 森本 雄矢, 竹内 昌治	4. 巻 137
2. 論文標題 点・線・面形状の細胞ブロックを利用した3次元組織構築とその応用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 電気学会論文誌 E (センサ・マイクロマシン部門誌)	6. 最初と最後の頁 322 ~ 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1541/ieejsmas.137.322">https://doi.org/10.1541/ieejsmas.137.322</a>	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 森本雄矢, 三浦重徳, 竹内昌治
2. 発表標題 3次元骨格筋 - 腱組織の構築
3. 学会等名 日本筋学会 第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本雄矢, 竹内昌治
2. 発表標題 3次元筋組織とデバイスの融合による筋組織の工学分野への応用
3. 学会等名 第2回 筋スマート社会実現コンソーシアム 講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本雄矢
2. 発表標題 培養筋組織とデバイスの融合によるバイオマシンの構築
3. 学会等名 令和2年電気学会全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuya Morimoto
2. 発表標題 Biohybrid device composed of cultured tissue and artificial device
3. 学会等名 24th iCeMS international symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuya Morimoto, Jun Sawayama, Shoji Takeuchi
2. 発表標題 In situ glucose monitoring in 3D-cultured skeletal muscle tissue
3. 学会等名 the 32nd MEMS conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本雄矢, 尾上弘晃, 竹内昌治
2. 発表標題 拮抗筋構造を有するバイオハイブリッドロボットの構築
3. 学会等名 第9回 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森直人, 森本雄矢, 竹内昌治
2. 発表標題 伸展及び灌流可能な3次元皮膚モデル用培養システム
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第37回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本雄矢
2. 発表標題 マイクロ流体デバイス技術を応用した機能的な3次元組織構築技術の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第37回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuhito Mori, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi
2. 発表標題 COLLAGEN SPONGE-LIKE SCAFFOLD FOR A 3D PERFUSABLE VASCULARIZED TISSUE
3. 学会等名 The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ai Shima, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi
2. 発表標題 IN VITRO 3D MICROVESSEL CONSTRUCTION BY GROOVED COLLAGEN-GEL SANDWICH
3. 学会等名 The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 島亜衣, 森本雄矢, 竹内昌治
2. 発表標題 三次元的に培養したヒト骨格筋細胞は自発的な収縮を示す
3. 学会等名 第3回 日本筋学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森本雄矢, 尾上弘晃, 竹内昌治
2. 発表標題 関節駆動可能な骨格筋バイオロボットの構築
3. 学会等名 バイオマイクロシステム研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nobuhito Mori, Yuya Morimoto, Shoji Takeuchi
2. 発表標題 Transendothelial Electrical Resistance (TEER) Measurement System of 3D Tubular Vascular Channel
3. 学会等名 The 31st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Yuya Morimoto, Shoji Takeuchi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 22 (本総ページ: 440)
3. 書名 Chapter 16, Biohybrid Robot Powered by Muscle Tissues (書名: Mechanically Responsive Materials for Soft Robotics)	

1. 著者名 森本雄矢、竹内昌治	4. 発行年 2019年
2. 出版社 CMCリサーチ	5. 総ページ数 8 (本総ページ: 362)
3. 書名 第5章7 身体運動を再現するバイオハイブリッドロボット (書名: 骨格筋研究を核とした筋スマート社会)	

1. 著者名 Yuya Morimoto, Nobuhito Mori, Shoji Takeuchi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 28 (本総ページ: 382)
3. 書名 In vitro tissue construction for organ-on-a-chip application (書名: Applications of Microfluidic Systems in Biology and Medicine)	

〔産業財産権〕

〔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