

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K13894

研究課題名(和文) 3次元動的力学刺激環境と包埋ゲル空間によるニューロンネットワークの立体誘導制御

研究課題名(英文) Three-dimensional manipulation and control of neuronal networking by using environment of three-dimensional dynamic stimulations upon gel-embedded space

研究代表者

小沢田 正 (Kosawada, Tadashi)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：10143083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：再生治療に貢献するため、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ゲル包埋培養法と合わせ、これまでとは全く異なる力学の原理に基づく3次元ニューロンネットワークの創生・誘導制御を可能とする革新的システムの実現をめざした。

コラーゲンゲル濃度の最適化により、「ゆるやか」かつ構造安定的な足場によるiPS細胞から分化誘導される神経細胞の3次元包埋培養法を確立した。包埋培養ディッシュを開発した超小型3次元振動ステージ上に設置し3次元動的力学刺激を組織的に作用させることにより、ニューロンネットワークの3次元誘導制御手法としての原理的有用性を確認した。

研究成果の概要(英文)：Not like a conventional approach but based on the principle of mechanics, a novel small sized piezoelectric 3-D vibration stage is developed to impose dynamic stimulations on cultured living cells in order to support regenerative medicine. Together with scaffold utilizing gel-embedded 3-D culture, the device enables us to enforce 3-D micro dynamic stimulations upon the cultured neuronal networks.

Appropriately soft but structurally stable scaffold is realized by optimization of collagen-gel concentration, which provides an effective method for the gel-embedded 3-D culture of neurons differentiated from iPS cells. Enforcing systematic 3-D dynamic stimulations upon gel-embedded neuronal networks by the developed 3-D vibration stage, principle usefulness of the present study as a 3-D manipulation and control method of neuronal networking has been confirmed.

研究分野：機械力学・生体力学

キーワード：超小型3次元振動ステージ 3次元動的力学刺激 iPS細胞 分化・成長誘導制御 神経細胞 3次元ゲル包埋培養 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。

代表者は、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であり、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構築誘導制御に応用できるのではないかと全く新たな着想を得た。この手法の開発、実現にむけて、関連する基盤技術の修得を行って来たところである。

## 2. 研究の目的

iPS 細胞を用いた再生治療に貢献するため、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、ゲル包埋培養法と合わせ、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・誘導制御を可能とする革新的デバイスシステムの実現をめざす。

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11万人以上、毎年6千人

以上受傷)、パーキンソン病(同15万人)、ALS(同1万人)など重篤な神経系難病に対する細胞移植再生治療法開発へ新たな糸口をもたらす点で、成功によるインパクトは学術的にも社会的にもきわめて大きい。脊髄損傷の場合は、患者自身または適合性の高い細胞株からつくられた iPS 細胞を神経細胞に分化させ一定量準備し、ニューロンネットワークの立体的構築の足掛かりを与え、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、生化学的誘導因子に加え、3次元振動ステージとゲル包埋培養法による3次元動的力学刺激環境を実現することにより、iPS 細胞の分化誘導から神経細胞のアクティブ立体培養誘導制御をも可能とする全く新たな手段の開発に挑戦し、神経細胞移植再生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構築:

本研究で提案する超小型3次元振動ステージの機構は、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35mm標準培養ディッシュ用3点支持ステージ部から成るシンプルな構造を有している。1枚のステンレス板に曲げ加工とねじり加工を施し、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所望の信号を入力することによりステージ部変位(各軸約30 $\mu$ m)を制御でき、3次元動的力学刺激付加が可能となる。また、振動ステージの最小固有振動数(現時点では30Hz)以下であれば、任意の周波数で加振が可能となる。さらに、本振動ステージを複数個インキュベータ内に組み込むことにより、個別ディッシュの細胞群に対し独立して種々の3次元動的力学刺激環境を設定し、組織的培養

コントロールを行うことが可能となる。

現時点ではまだ開発段階にある超小型3次元振動ステージについて、有限要素解析を駆使した振動特性の最適化により、培養細胞への付加加速度および周波数帯域を大幅に拡張し、かつ制御機能を付与することで、動的力学刺激付加機能の広帯域、高精度化を図る。

#### (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(HPS0002)を用い、特に神経細胞移植を念頭におき、ヒト iPS 細胞から神経幹細胞へ分化誘導し、次いで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系と臨床的に直接採取された神経細胞系とでは、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) ゲル包埋培養によるニューロンネットワークの立体誘導制御：

冷却したコラーゲン・ゲル(Cellmatrix Type A, 新田ゼラチン(株))混合溶液に分化誘導した神経細胞を素早く混合した後、この培養ディッシュをインキュベータ内(37℃, CO2:5%, O2:3%)に設置することでゲル化し細胞の「ゆるやかな足場」が形成される。この包埋培養ディッシュを右上概念図のように、27年度で開発した超小型3次元振動ステージ上に設置し3次元動的力学刺激を組織的に作用させることにより、ニューロンネットワークの3次元化

を段階的に誘導制御していく。ニューロンは3次元ゲル空間において、付加された力学刺激を感知、反応しつつ、随時伸展方向や速度、突起密度などを選択し、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状突起の3次元的形成率、伸展成長率、指向性、分岐密度など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組織的評価を行う。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、ネットワーク構築の誘導制御、促進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次元的構築を誘導制御する最適な力学刺激環境場の探索を行う。さらに、これに基づく神経細胞アクティブ立体培養法の確立をめざし、脳・神経系疾患に対する神経細胞移植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可能性を探求する。

#### 4. 研究成果

(1) iPS 細胞を用いた再生治療に貢献するため、生きている培養細胞に対し誘導因子に加え、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、ゲル包埋培養法と合わせ、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・誘導制御を可能とする革新的デバイスおよびシステムの開発に挑戦した。

(2) 開発した圧電駆動超小型3次元振動ステージに対し、付加加速度および周波数帯域を大幅に拡張して利用できるような最適化・改良法を提示した。新たに、1枚のステンレスはりを軸線方向に1/2ねじり加工を行い立体ねじれカンチレバー状に加工した振動子に、直交2軸方向それぞれの変位が制御できるように2箇所複数の圧電

素子を接着し製作する手法を新たに考案した。この着想により、培養ディッシュを面内に 1/2 回転させることで培養細胞に実質的に 3 次元動的力学刺激を付加可能なデバイスの開発に成功した。

(3) コラーゲン・ゲルの濃度の最適化を図ることにより「ゆるやか」かつ構造安定的な足場による神経細胞の 3 次元包埋培養法実現の可能性を確認した。この包埋培養ディッシュを開発した超小型 3 次元振動ステージ上に設置し 3 次元動的力学刺激を組織的に作用させることにより、ニューロンネットワークの 3 次元化を段階的に誘導する手法を開発した。

(4) 開発したシステムを用い、マウスおよびヒト iPS 細胞からそれぞれ神経細胞への分化誘導効率、分化細胞の挙動および健全性について検証を行った。さらにニューロンの 3 次元ネットワーク形成に関する基本的な挙動、すなわち神経突起の 3 次元形成率、伸展成長率、指向性、分岐密度などの把握、計測を実施した結果、本手法の原理的有用性を確認した。なお動的力学刺激に関連する多数のパラメータ、すなわち方向、形態、変位量、周波数、インターバル、時間数などの影響のさらなる組織的計測・評価、最適化が今後の課題である。

#### 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 4 件)

Tadashi Kosawada, Keita Ohnishi, Hiroaki Satoh, Zhonggang Feng, Kaoru Goto : Novel Methods to Apply Micro Dynamic Stimulations on Cultured Adhesive Cells and Its Application in Constructing Gel-embedded Three-dimensional Neuronal Structures Differentiated From Human iPS Cells, *Microsystem Technologies* (Springer-Verlag), DOI: 10.1007/s00542-017-3399-4, Vol.24-1, pp.625-638, (2018.1), 査読有.

Kyohei Fujita, Zhonggang Feng, Daisuke Sato, Tadashi Kosawada, Takao Nakamura,

Yasuyuki Shiraiishi, Misuo Umezu. Modulation of the mechanical properties of ventricular extracellular matrix hydrogels with a carbodiimide crosslinker and investigation of their cellular compatibility. *AIMS Materials Science*, 2018, 5(1): 54-74. DOI: 10.3934/matricsci.2018.1.54,(2018.1.19), 査読有.

Tadashi Kosawada, Active three-dimensional dynamic stimulations on cultured iPS cells to develop three-dimensional neuronal structures to be provided for regenerative medicine, *Research papers of the Suzuken memorial foundation*, Vol.34, pp.85-96, (2017.2), 査読無.

Tadashi Kosawada, Tomoyuki Koizumi, Kazuya Ugajin, Zhonggang Feng, Kaoru Goto : Novel Three-dimensional Micro Vibration Actuator for Imposing Dynamic Stimulations to Promote Differentiation of iPS Cells, *Microsystem Technologies* (Springer-Verlag), Vol.22, pp.45-56, (2016), 査読有.

〔学会発表〕(計 13 件)

佐藤 拓亮, 登坂 勇紀, 小沢田 正, 馮 忠剛: マウスニューロンネットワーク間の融合に対する動的力学刺激の影響について, D&D Conf.2017, 愛知大学豊橋キャンパス, (2017.8.31).

赤間 広輔, 大西 敬太, 小沢田 正, 馮 忠剛: ゲル包埋培養によるヒトニューロンの 3 次元構造形成に及ぼす動的力学刺激の影響評価, D&D Conf.2017, 愛知大学豊橋キャンパス, (2017.8.31).

小沢田 正, 「iPS 細胞の基礎と細胞培養技術及び実用化のためのニーズと課題」, R&D SUPPORT CENTER 主催セミナー, 招待講演, 東京・江東区文化センター (2017.3.23).

登坂 勇紀, 金子 暢生, 小沢田 正, 馮 忠剛, 動的力学刺激環境及び包埋ゲル空間によるマウスニューロンネットワークの 3 次元形成, LIFE 2016, 東北大学 (2016.9.5).

大西 敬太, 菊池 駿佑, 小沢田 正, 馮 忠剛, ヒト神経細胞コロニー間のニューロンネットワーク形成に及ぼす動的力学刺激の影響評価, LIFE 2016, 東北大学 (2016.9.5).

Z. Feng, Y. K. Fujita, T. Kosawada, D. Sato, T. Nakamura, Y. Shiraishi, T. Kitajima, M. Umezu : Biomechanics of Collagen-Based Hydrogels as Tissue Engineering Scaffolds, Proceedings of 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society(EMBC), ThCT7-18: p1., (2016.8.16-20), Orlando, FL, USA.

小沢田 正, 「iPS細胞の効率的な培養のための支援デバイスの開発」, 技術情報協会主催セミナー, 招待講演, 東京・五反田, 技術情報協会, (2016.6.20).

Z Feng, K Fujita, T Kosawada, D Sato, T Nakamura, T Kitajima, M Umezu. The mechanical properties of biohydrogels and the applications for tissue engineering. (Invited Lecture), Proc of EMN Meeting on Hydrogel Materials 2016;B16:p1., May 9-13,2016, Singapore.

小沢田 正, 「iPS細胞培養技術・機器・装置開発へのニーズとiPS細胞の基礎」, 技術情報協会主催セミナー, 招待講演, 東京・五反田, 技術情報協会, (2015.9.24).

Ken-ichi Konno, Tadashi Kosawada,: Development of Sensing System for Three-dimensional Shape and Local Mechanical Properties on Living Tissues, Proceedings of the 8-th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (Sapporo, Japan), p.259, (2015.9.16-19).

金子 暢生, 大西 敬太, 登坂 勇紀, 小沢田 正, 馮 忠剛, ゲル包埋培養を用いたマウス神経細胞の3次元ネットワーク形成に及ぼす動的力学刺激の影響, D&D Conf.2015, 弘前大(2015.8.28).

菊池 駿佑, 早坂 紘旗, 佐野 聖人, 小沢田 正, 馮 忠剛, ヒト iPS細胞の神経細胞への分化及び成長に及ぼす動的力学刺激の影響評価, D&D Conf.2015, 弘前大(2015.8.28).

Kyohei Fujita, Yuuki Tuchida, Hiroki Seki, Tadashi Kosawada, Zhonggang Feng, Daisuke Sato, Takao Nakamura, Yasuyuki Shiraishi, Mitsuo Umezu, Characterizing and modulating the mechanical properties of hydrogels from ventricular extracellular matrix, Proceedings of the 10<sup>th</sup> Asian

Control Conference 2015(ASCC 2015), pp.718-722, (2015.5.31-6.3), Kota Kinabalu, Malaysia.

〔図書〕(計 1 件)

小沢田 正, 「細胞培養技術・機器・装置開発へのニーズと細胞の基礎」, 動物細胞培養・自動化におけるトラブル発生原因と対策: 7-2, 技術情報協会, pp.275-284, (2017.11.30), ISBN 978-4-86104-684-1 C3045

〔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

(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