

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02089

研究課題名(和文) 3D動的力学刺激環境制御によるニューロンのアクティブ再生移植制御・シミュレータ

研究課題名(英文) Active control and simulator of neurons in regenerative transplantation treatment with the aid of environment control utilizing three-dimensional dynamic stimulations

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：再生治療に貢献するため、培養細胞に対し3次元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。コラーゲンゲルを用いた「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。この包埋培養ディッシュを超小型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、再生移植に貢献し得るニューロンのアクティブ誘導制御・シミュレーション手法としての原理的有用性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、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従来の化学的誘導因子に加え、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た。ゲル包埋3次元培養法と合わせ、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・誘導制御および再生移植シミュレーションを可能とする革新的システムを開発した。今後の更なる研究により、脊髄損傷やパーキンソン病等神経系難病に対する再生移植治療の実現を支援・推進するデバイス、スキルに展開し得る可能性を提示した。

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 table 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 table, principle usefulness of the present study as a 3-D manipulation and active control method of neuronal networking as well as simulation system for regenerative transplantation medicine has been confirmed.

研究分野：医用生体工学，機械力学

キーワード：iPS細胞 ニューロン分化・成長誘導制御 3次元ゲル包埋培養 3次元ニューロンネットワーク in vitro移植シミュレータ 超小型3次元振動ステージ 3次元動的力学刺激環境 移植性促進法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 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、その実用化には、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次元構造を有する組織、臓器への立体的培養法の開発は最大かつ最後の障壁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。

2014年9月に我国で実施された iPS 細胞による加齢黄斑変性への網膜再生移植の臨床研究に続き、2018年度中にはパーキンソン病、次いで脊髄損傷への神経細胞移植の臨床研究が予定されていた。神経系再生移植治療では、移植神経細胞群の移植先での生着性および周辺被移植神経回路網とのニューロンネットワーク構築、神経機能回復が最大の課題とされているが、これらに対する具体的な支援策の開発は未だ極めて不十分な状況である。再生移植治療は心臓、肝臓や膵臓などに対しても予定されており、今後の医療の行方のみならず人類の生き方も左右する重要な技術に展開していく可能性が極めて高く、iPS 細胞発祥の我国の総力を挙げてその早期実用化が追及されているところである。

申請者は、これまで動的力学刺激による細胞、組織の損傷治療法および細胞生理と力学特性の計測評価に関する研究を行ってきた。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、これをニューロンの立体誘導制御と再生移植のアクティブな制御および *in vitro* シミュレータに活用できれば、施術に必要な事前情報あるいは事後追加処置用情報の取得・提供が可能となり、移植性を格段に向上させる手段になり得るのではという発想に辿り着いた。

一方で、もし3次元振動台を圧電振動子等を駆使し超小型化できれば、培養容器内細胞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しつつ、細胞を所望の方向へ成長誘導・制御できるのではないかと全く新たなアイデアを得た。さらに、3次元ゲル空間の中に「ゆるやかに」包埋培養した神経細胞をこの振動台に設置することで、細胞にとって理想的な力学刺激環境を実現できるのではないかと新たな発想も得た。これらに基づき、機械力学の原理を応用し、動的力学刺激環境による iPS 細胞の神経細胞への分化誘導、立体神経回路網構築、3次元アクティブ再生移植制御・*in vitro* シミュレータ開発などの可能性を探ってきた。

## 2. 研究の目的

再生移植治療の早期実用化には、広範な専門分野の総力結集が必要不可欠である。本研究は、機械力学の原理に基づく iPS 細胞、神経回路網のアクティブ力学操作・コントロール・計測評価を通し、細胞移植再生治療を機械工学の分野から支援するというこれまでにない全く新たなアプローチ・手段の提言をめざすものである。以下、具体的な研究目的は

- 1) iPS 細胞を用いた再生移植治療に貢献するため、生きている培養細胞に対し3次元の動的マイクロ力学刺激を自在に付加し得る高機能超小型3次元振動ステージを開発し、ゲル包埋3次元培養法と融合させることで、ニューロンネットワーク構造体のアクティブ3次元誘導制御・構築を可能とする革新的デバイスシステムの完成をめざす。
- 2) 誘導される3次元神経回路網を用いて、脊髄損傷およびパーキンソン病に対する再生移植治療を模擬する移植モデルを新たに構築する。上記3次元振動ステージを用い、移植施術後のニューロンの生着性、連結融合性を制御・促進する最適なアクティブ3次元動的マイクロ力学刺激環境の創出、および施術の事前および事後追加処置情報提供用 *in vitro* シミュレータの開発をめざす。

## 3. 研究の方法

### 1) 高機能超小型3次元振動ステージの開発:

本研究で提案する超小型3次元振動ステージの機構概略は、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箇所に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。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、個々の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改善し、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化、高精度化を図る。

### 2) 3次元アクチュエータ、マイクロ力学・電気刺激用プローブの開発:

開発する個別細胞力学刺激用3次元アクチュエータは、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圧電素子を装着し構築する。このアクチュエータをマイクロマニピレータに接続し、さらに先端のマイクロプローブに薄膜マイクロ電極処理を施すことで個別細胞の任意の点に対しアクティブかつ選択的に3次元動的力学刺激、電気刺激を付加可能とする。

すなわち、神経突起へのマイクロ力学、電気刺激による神経細胞の可塑的变化を、GFP またはCaイオン感受性蛍光色素Fluo4-AMのタイムラプス計測法を用いて計測可能となる。これにより、神経細胞の情報伝達・電気活動をリアルタイムで計測、評価できる。以上の手法は、パッチクランプ法に力学的刺激計測機能を融合させたハイブリッド電気・力学神経生理機能計測評価デバイスとして機能する画期的なシステムである。

### 3) 動的力学刺激による3D神経回路網の構築:

冷却した温度依存性コラーゲン・ゲル(Cellmatrix Type P, 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 $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub>:5%, O<sub>2</sub>: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、構築していく。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、神経突起密度などを選択し3次元的に成長し、ネットワークを形成していくものと予想される。この挙動の蛍光染色・分子イメージングによる詳細な観測により、ニューロンのネットワーク機能を司る軸索および樹状突起の3次元形成率、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計測・評価が可能となる。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、機能的ニューロンネットワークの誘導制御、構築促進を試みる。

### 4) in vitro 再生移植シミュレータ構築と動的力学刺激による生着・融合制御:

そこで、3)で開発した手法によりゲル足場内に誘導した3次元神経回路網構造体を用いて、脊髄損傷移植治療を想定し移植シミュレータを構築する。即ち個別培養した生体由来の神経回路網構造体に対し脊髄損傷を想定した切断損傷模擬施術を行い、次いで本手法で別途iPS細胞から分化誘導された神経回路網構造体を移植し、共培養を行う。一方、パーキンソン病を想定

したモデルでは、iPS 細胞から分化誘導された神経前駆細胞群をカテーテルにより被移植神経細胞群の最適な箇所へインジェクション移植する手法となる。これ以後の操作は両モデルで共通である。次に 1)で開発した振動ステージによる3次元動的力学刺激環境を付加し、移植系の生着・ネットワークの融合・連結の促進・制御を試みる。促進に関与する動的力学刺激の方向、形態、変位量、周波数、インターバル、時間数などの最適条件を探索する。

5)マイクロ力学、電気刺激による神経機能計測と移植適合性情報の取得・評価:

2)で開発した3次元アクチュエータを用いて、生体由来被移植側と分化誘導移植側の神経突起間で相互に発現させたマイクロ力学、電気刺激による Ca イオン応答の伝播挙動を蛍光染色・タイムラプス計測を行う。さらに、両者間の活動電位の計測を行い、神経ネットワークの自己組織化・機能的適合性を検証する。

損傷部断面の形状、面積、長さ、損傷後経過時間等が異なる場合や追加処置を施術した場合など種々の脊髄損傷、パーキンソン病治療モデル・再生移植シミュレータに対して実験の積み重ねおよび比較精査を行う。以上より、神経機能の結合性、反応特性、電気活動性に基づく再生移植適合性事前情報および移植後追加処置治療支援情報の取得・評価用シミュレータとしての完成をめざす。

#### 4. 研究成果

本研究では、iPS 細胞を用いた再生移植治療に貢献するため、生きている培養細胞に対し、3次元動的マイクロ力学刺激環境を自在に付加可能な超小型3次元振動ステージ・アクチュエータシステムを開発し、これにゲル包埋3次元培養法を組合せ、これまでとは全く異なる機械力学的原理に基づく iPS 細胞から神経細胞への分化誘導、3次元ニューロンネットワーク構築、さらにこれらを統合した3次元ニューロンのアクティブ再生移植制御・in vitro(培養ディッシュ内)シミュレータの開発に挑戦した。これらにより、最近開始されつつある重篤な神経系疾患への神経細胞再生移植治療を強力に支援する画期的システムへの展開を目指した。

立体 1/2 ねじれバイモルフカンチレバーを用いた超小型3次元振動ステージシステムを開発・改良し、これまでより大変位化、広帯域化の可能性を見出した。また、コラーゲンゲルを用いた「ゆるやかな足場」による神経細胞3次元包埋培養法をほぼ確立した。ただし、蛍光観察の鮮明性には依然として難点が存在するため、ゲル濃度の調整・最適化には最善の注意を払う必要を確認した。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次元動的力学刺激環境を組織的に制御・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。また得られた3次元ニューロンネットワーク組織を汎用ソフトウェア「NeuroLucida 360」を用い、3次元的かつ多角的に解析・評価する手法を確立した。

誘導された3次元神経回路網を用いて、脊髄損傷、パーキンソン病等に対する再生移植治療を模擬する in-vitro 移植モデル系を新たに開発した。さらに、超小型3次元振動ステージを用いた移植施術後のニューロンの生着性、連結融合性を促進する最適な3次元動的力学刺激環境の有用性、可能性について確認し、神経細胞再生移植治療支援法の基盤技術を創出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 小沢田 正	4. 巻 123-1218
2. 論文標題 培養iPS細胞に対する動的力学刺激の影響と利用技術	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本機械学会誌	6. 最初と最後の頁 18-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Shin, H, Haga, J.H., Kosawada, T., Kimura, K., Li, Y.S., Chien, S., Schmid-Schonbein, G.W.	4. 巻 18
2. 論文標題 Fine control of endothelial VEGFR-2 activation: caveolae as fluid shear stress shelters for membrane receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomechanics and Modeling in Mechanobiology	6. 最初と最後の頁 5-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10237-018-1063-2	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 該当する
1. 著者名 MIZUNA YANO, YUTA UMEHARA, TOMOKAZU KUDO, TAKAO NAKAMURA, TADASHI KOSAWADA, ATSUYOSHI NISHINA, MASAKI SAZUKA, DAISUKE SATO, ZHONGGANG FENG	4. 巻 45(5)
2. 論文標題 Effects of docosahexaenoic acid or arachidonic acid supplementation on gene expression and contractile force of rat cardiomyocytes in primary culture.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIOCELL	6. 最初と最後の頁 1213-1229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32604/biocell.2021.016281	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 Tadashi Kosawada, Taku Kitsunai, Zhonggang Feng, Kaoru Goto	4. 巻 9(4), 83
2. 論文標題 A Novel In Vitro Simulator to Investigate Promotion of Reconstruction of Damaged Neuronal Cell Colony Differentiated from iPS Cells with the Aid of Micro Dynamic Stimulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Technologies	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/technologies9040083	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 Zhonggang Feng, Kyohei Fujita, Mizuna Yano, Tadashi Kosawada, Daisuke Sato, Takao Nakamura, Mitsuo Umezu	4. 巻 126
2. 論文標題 Physically-based structural modeling of a typical regenerative tissue analog bridges material macroscale continuum and cellular microscale discreteness and elucidates the hierarchical characteristics of cell-matrix interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmbbm.2021.104956	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 -

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 小沢田 正
2. 発表標題 動的力学刺激によるiPS細胞のアクティブ操作・再生医療支援法開発 可能性と課題
3. 学会等名 日本機械学会Dynamics and Design Conference 2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小沢田正, 沼尻晃一, 馮 忠剛
2. 発表標題 ヒト神経細胞コラーゲン間ネットワークの損傷と再構築に及ぼす動的力学刺激の影響
3. 学会等名 日本機械学会Dynamics and Design Conference 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川 遼, 小沢田正, 馮忠剛, 片岡駿
2. 発表標題 ヒト神経細胞の In vitro 3次元移植システムの動的力学刺激付加による影響評価
3. 学会等名 日本機械学会Dynamics and Design Conference 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沼尻晃一, 小沢田正, 馮忠剛, 大島友一
2. 発表標題 損傷ヒト神経細胞コロニーの再構築に及ぼす動的力学刺激の影響
3. 学会等名 日本機械学会Dynamics and Design Conference 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Feng Zhonggang, Kuramochi Shunya, Kosawada Tadashi, Sato Daisuke, Nakamura Takao, Umezu Mitsuo
2. 発表標題 Investigation on the Poisson's ratio of fibroblast-compacted collagen gels
3. 学会等名 生体医工学
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富澤圭悟, 石原修平, 小沢田正, 馮忠剛
2. 発表標題 ヒト神経細胞のIn vitro 2次元移植システム構築及びそれに対する動的力学刺激の影響
3. 学会等名 日本機械学会Dynamics and Design Conference 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡駿, 金子哲也, 小沢田正, 馮忠剛
2. 発表標題 3次元ゲル包埋神経細胞コロニー間におけるネットワーク形成に及ぼす動的力学刺激の影響
3. 学会等名 日本機械学会Dynamics and Design Conference 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大島友一, 橋内琢, 小沢田正, 馮忠剛
2. 発表標題 損傷神経細胞コロニーの再構築に及ぼす動的力学刺激の影響
3. 学会等名 日本機械学会Dynamics and Design Conference 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小金澤 光, 藤巻 匠, 小沢田 正, 馮 忠剛
2. 発表標題 3次元ゲル包埋培養ヒト神経細胞の分化・成長に及ぼす動的力学刺激の影響
3. 学会等名 LIFE2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原修平, 小沢田正, 富沢圭吾
2. 発表標題 ヒト神経細胞の二次元移植システム構築及びそれに対する動的力学刺激の影響
3. 学会等名 LIFE2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小沢田 正
2. 発表標題 動的力学刺激環境によるiPS細胞の増殖, 分化, 組織構築制御と再生医療支援技術開発の可能性
3. 学会等名 ベンチャー創設支援フォーラム(招待講演)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 S Yoshino, T Suenaga, Z Feng, T Kosawada, D Sato, T Nakamura, M Umezu
2. 発表標題 A bioreactor system for the cardiac differentiation of human iPS cells.
3. 学会等名 The 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 F Hamada, K Fujita, Z Feng, T Kosawada, D Sato, T Nakamura, Y Shiraishi, M Umezu.
2. 発表標題 Investigation on the cardiomyocyte subtypes derived from human iPS cells on ventricular ECM hydrogels
3. 学会等名 The 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Kosawada "Biomechanics" Lab. Website <a href="http://kosawada-lab.yz.yamagata-u.ac.jp/">http://kosawada-lab.yz.yamagata-u.ac.jp/</a> Kosawada "Biomechanics" Lab. Website <a href="http://kosawada-lab.yz.yamagata-u.ac.jp/">http://kosawada-lab.yz.yamagata-u.ac.jp/</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	馮 忠剛 (Feng Zhonggang) (10332545)	山形大学・大学院理工学研究科・准教授  (11501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	後藤 薫  (Goto Kaoru)	山形大学・医学部・教授	
研究協力者	峯田 貴  (Mineta Takashi)	山形大学・大学院理工学研究科・教授	

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