

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01779

研究課題名(和文) 加齢時運動機能低下を再現可能な脳-骨格筋モデルの創出

研究課題名(英文) Co-culture model with neurons and skeletal muscle tissue for reproduction of motor function declined by aging

研究代表者

森本 雄矢 (Morimoto, Yuya)

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号：60739233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動機能を評価可能な神経-骨格筋モデルの実現を目的とし、神経信号伝達を起因として筋収縮運動が発生するヒト神経-骨格筋組織の構築方法を確立するとともに、当該組織とデバイスとの組み合わせにより運動モデルが構築可能か検証した。その結果、神経刺激に収縮運動可能な神経-骨格筋組織を実現するとともに、ロボット骨格との融合による遊泳バイオハイブリッドロボット実現した。さらには、運動モデルとしてヒト神経-骨格筋組織を利用するための、培養用デバイス、電気刺激用電極、トレーニング用デバイスなどといった要素技術も創出し、神経-骨格筋組織の運動機能評価の基盤を確立することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で生みだされた技術は、ヒト運動神経からの信号伝達によるヒト骨格筋組織の収縮運動を体外で評価することを可能にする。そのため、生物学分野や医学分野における神経による骨格筋組織の収縮制御のメカニズム理解や疾患および加齢時の運動機能変容の動態理解に貢献可能である。さらに、神経-骨格筋組織を駆動源とするバイオハイブリッドロボットの実現により収縮運動を工学的に利用可能なことも示しており、運動学やロボティクス分野にも当該技術は大きく貢献可能である。以上のように、幅広い分野に応用可能な本研究の技術は大変意義深い研究成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, with the aim of realizing a neuro-skeletal muscle model to evaluate its motor function, we established a method to construct human neuro-skeletal muscle tissue that generates muscle contractions triggered by nerve signal transmission. Moreover, we also verified whether it is possible to construct the exercise model by combining the tissue and the device. As a result, we succeeded in the construction of a neuro-skeletal muscle tissue capable of contractions upon nerve stimulation and a swimming biohybrid robot by fusing it with a robotic skeleton. Furthermore, we produced elemental technologies such as culture devices, electrodes for electrical stimulation, and training devices to use human neuro-skeletal muscle tissue as an exercise model, indicating that we have succeeded in establishing a foundation for the evaluation of the motor function of neuro-skeletal muscle tissue.

研究分野：マイクロ工学、BioMEMS

キーワード：組織工学 生体模倣モデル 培養組織 MEMS

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、加齢に伴う運動障害であるロコモティブシンドロームが注目されており、健康寿命の増大に向けて治療・予防法の確立が望まれている。ヒトは加齢とともに筋力の低下が見られるが、この筋力低下が発生する機序は未だに分かっていない。これまでに、加齢による筋力低下では、中枢神経(脳)と末梢神経(脊髄)の間の信号伝達部位や末梢神経から筋線維への信号伝達部位(神経筋接合部)がまず変性することが知られている。そこで、中枢神経・末梢神経・筋線維のどれが起因となり伝達部位の変性が発生するのかの解明が望まれている。信号伝達部位における機能解析や変性メカニズムの解明には、複数の要素が複合的に影響する生体を用いるよりも、よりシンプルに神経・筋線維の細胞のみで体外にて構築した神経-筋モデルを用いる方が効果的である。しかし、運動可能な神経-骨格筋モデルは未だ確立されていない。運動神経と骨格筋のモデルは従来から存在しているが、基板上に固定されており、生体の骨格筋とは異なり収縮運動を行えず、従来モデルを拡張するだけでは運動機能を評価可能な神経-骨格筋モデル構築は困難であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、運動機能を評価可能な神経-骨格筋モデルの実現を大目標とし、具体的な目的として以下の3項目の実現を目指した。

- ① ヒト iPS 細胞由来運動神経とヒト骨格筋組織を融合することにより、神経信号伝達を起因として筋収縮運動が発生するヒト神経-骨格筋組織の構築方法の確立すること。
- ② ヒト神経-骨格筋組織とロボット骨格を組み合わせたバイオハイブリッドロボットを構築し、神経-骨格筋組織の収縮運動を駆動源とする当該バイオハイブリッドロボットの動作を実現すること。
- ③ 神経-骨格筋組織において、運動神経と骨格筋組織の培養領域の分離、培養液中で特定の領域のみへの電気刺激負荷、ウェイトトレーニングによる筋組織の成熟、などが可能なデバイスの実現により、神経-骨格筋運動モデルとして利用可能になること。

3. 研究の方法

ヒト骨格筋組織とヒト iPS 細胞由来神経細胞を組み合わせることで、神経刺激伝達で収縮運動可能なヒト神経-骨格筋組織が構築できるかを検討した。まず、既に研究代表者が確立したハイドロゲル中での筋芽細胞培養による骨格筋組織構築方法を応用し、ヒト骨格筋組織を構築した。このヒト骨格筋組織にヒト iPS 細胞由来運動神経スフェロイドを隣接させ、1時間ほど培養して骨格筋組織上にヒト運動神経スフェロイドを接着させた。その後、筋組織と運動神経を共培養して、神経-骨格筋組織を構築した。この時、スフェロイドの接着方法や共培養時の培養液の組成を変化させることで、運動神経と筋管の間で神経信号を伝達可能にする神経筋接合部を形成可能な培養法を検証した。加えて、作製した神経-骨格筋組織が運動神経からの神経信号の伝達によって収縮運動可能か確認した。

次に、神経-骨格筋組織を柔軟なロボット骨格上に設置することでバイオハイブリッドロボットを構築し、神経-骨格筋組織の収縮運動でロボット骨格が変形して、当該バイオハイブリッドロボットが動作できるかを検討した。3D プリンタを用いて形成した樹脂製のモールドを転写してゴム製のクラゲ状のロボット骨格を形成し、ロボット骨格にはブロック状の穴を設けてパーツを嵌め込めるようにした。このロボット骨格に紫外光およびオゾンガスを20分以上当てて滅菌することで、培養に利用できるようにした。一方で、3D プリンタで作製されたブロック状パーツの表面にパリレンをコーティングして組織培養への適合性を上げた後に、両端部にブロック状パーツを設けた状態で組織培養を行うことで、ブロック状パーツ付き神経-骨格筋組織を構築した。このブロック状パーツを保持して移動させることで、ブロック状パーツをロボット骨格に嵌め込み、柔軟なロボット骨格上に神経-骨格筋組織を設置した。この時、神経-骨格筋組織の移動方法やロボット骨格上での培養方法を検討することで、ロボット骨格上で収縮運動可能にする神経-骨格筋組織の取り扱い方法を見出した。さらに、神経-骨格筋組織の収縮運動でクラゲ状のロボット骨格を変形させることで、当該バイオハイブリッドロボットが動作し、培養液中を泳ぐことができるかを評価した。

最後に、神経-骨格筋組織を運動モデルとして利用するためのデバイスが機能するかを検証した。運動神経と骨格筋組織の培養領域分離に向けて、多孔質薄膜を介してヒト運動神経とヒト骨格筋組織の培養領域を分けた状態で培養可能な組織培養デバイスを構築した。この時、多孔質薄膜表面のコーティング方法やデバイスの形状を変化させ、神経細胞から軸索伸展した状態で神経-骨格筋組織を構築可能な培養条件を検証した。加えて、神経-骨格筋組織において場所特異的に電気刺激を与えるために、電極形状を変化させた刺激電極を用意し、電極の配置と個数で電気刺激パターンを制御できるかどうかを検討した。さらに、組織の端部に重りを設置することが可能なウェイトトレーニングデバイスを構築した。このウェイトトレーニングデバイス上にて収縮運動を行い、重りによる運動負荷によって筋組織の収縮力や太さなどが変化するかどうかを評価した。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞由来運動神経を細胞非接着性の U 底マイクロウェルで培養したところ、ヒト運動神経のスフェロイドを形成することに成功した。また、このスフェロイドの大きさはマイクロウェルに播種する細胞数にて制御されることを確認した。作製したスフェロイドをマイクロウェルから取り出し、ハイドロゲル中でヒト筋芽細胞を培養して作製したヒト骨格筋組織に接着させることで、ヒト神経-骨格筋組織を構築した。この時、V 字型の骨格筋組織保持部があるデバイスを用いると、スフェロイドが安定して筋組織に接着でき、効率よく神経-骨格筋組織が構築されることを見出した。この神経-骨格筋組織の培養には神経用培地と骨格筋組織用培地を等量混合した培養液が適していることを見出し、当該共培養培地で神経-骨格筋組織を培養したところ骨格筋組織上で運動神経から軸索伸展させることに成功した。さらに、神経-骨格筋組織は自発的に収縮運動を開始することが確認された。この組織に神経筋接合部の活動を阻害するクラレを添加したところ収縮運動が抑制されることが確認された。以上のことより、当該手法にてヒト運動神経とヒト骨格筋組織から成るヒト神経-骨格筋組織が構築でき、その収縮運動は神経筋接合部を介して神経刺激にて制御されていることが示唆された。

この神経-骨格筋組織をゴム製のグラゲ状ロボット骨格に設置して、バイオハイブリッドロボットを創出した (図 1)。このロボットに運動神経の発火を促すグルタミン酸を添加したところ、組織の収縮運動によってロボットのヒレの部分が変形してフィンのような屈曲動作が実現できることを確認した。このときのロボットの動作を確認したところ、屈曲動作の高速化・低速化を繰り返しながら遊泳することが明らかとなった。この遊泳速度は約 $50 - 150 \mu\text{m}/\text{min}$ であり、筋組織を取り付けて電気刺激したときの遊泳動作 (平均 $200 \mu\text{m}/\text{min}$) よりも小さく、電気刺激起因の収縮運動よりも神経刺激起因の収縮運動は小さくなっていることが示された。このように、提案の神経-骨格筋組織を駆動源として用いることで、遊泳可能なバイオハイブリッドロボットを構築することに成功した。

神経-骨格筋組織を運動モデルとして利用するためのデバイスとして、運動神経と骨格筋組織の培養領域を多孔質膜で分離した神経-骨格筋組織培養デバイスを構築した。この時、多孔質膜の表面に iMatrix をコーティングすると運動神経が多孔質膜に接着して軸索を進展することを見出した。さらに、この多孔質膜をデバイスに取り付け、骨格筋組織端部に設けられたパーツと組み合わせ可能にすることで、多孔質膜と骨格筋組織が接触した状態で共培養できることを見出した。この神経-骨格筋組織は共培養した状態で取り外しが可能であり、他の組織評価デバイスに移動できることが確認された。加えて、電気刺激負荷を行うための電極形状を検討した。電極の極数を多くし、筋組織の長軸方向に沿って正極・負極を交互に配置することで筋組織周辺に高密度に電気刺激を収束できることを見出した。これにより培養液中での電気刺激であっても対象組織のみへの刺激が可能となることが分かった。本技術は運動神経スフェロイドにのみ電気刺激を与え、筋組織には電気刺激を与えないといった電気刺激制御に応用可能であり、電気刺激を起因とした神経信号伝達による神経-骨格筋組織の収縮運動に繋げることができると考えている。さらに、組織の端部に重りをかけたウェイトトレーニングデバイスを構築し、運動負荷下での収縮運動によるトレーニングを実施した。その結果、無負荷または過大な負荷下での収縮運動よりも、適度な運動負荷でのトレーニングによって収縮力が増大しやすくなることを見出した。また、このトレーニングによって筋管の肥大や糖代謝の活性化を確認することにも成功した。これにより単に収縮運動するだけでなく、組織に合わせた運動負荷を与えることによって適切な筋組織の成長を促進可能であることが示された。上記の培養領域分離可能な培養デバイス、対象組織刺激電極、トレーニングデバイスは独立した要素のため組み合わせ可能なため、将来的にはこれらのデバイスを統合することで神経-骨格筋組織の運動能を評価可能な運動モデルとして使用可能になると考えられる。

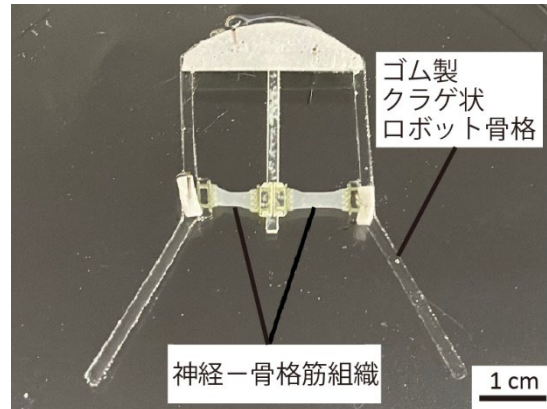


図 1. 神経-骨格筋組織を駆動源とするバイオハイブリッドロボット

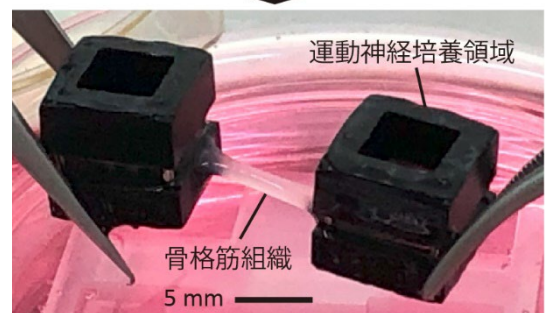
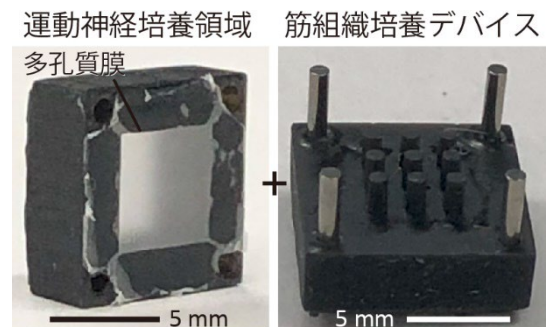


図 2. 培養領域を分離可能な神経-骨格筋組織培養デバイス

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto Miki, Morimoto Yuya, Sato Toshiro, Takeuchi Shoji	4. 巻 13
2. 論文標題 Microfluidic Device to Manipulate 3D Human Epithelial Cell-Derived Intestinal Organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 2082 ~ 2082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi13122082	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 Jo Byeongwook, Morimoto Yuya, Takeuchi Shoji	4. 巻 11
2. 論文標題 3D Printed Centrifugal Pump Driven by Magnetic Force in Applications for Microfluidics in Biological Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advanced Healthcare Materials	6. 最初と最後の頁 2200593 ~ 2200593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adhm.202200593	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 Morimoto Yuya, Nagata Shogo, Matsumoto Miki, Sugahara Keisuke, Miura Shigenori, Takeuchi Shoji	4. 巻 348
2. 論文標題 Microfluidic system for applying shear flow to endothelial cells on culture insert with collagen vitrigel membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 130675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2021.130675	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 Miura Shigenori, Morimoto Yuya, Furihata Tomomi, Takeuchi Shoji	4. 巻 6
2. 論文標題 Functional analysis of human brain endothelium using a microfluidic device integrating a cell culture insert	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 APL Bioengineering	6. 最初と最後の頁 16103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0085564	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14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Kentaro Motoi, Byeongwook Jo, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi
2. 発表標題 Weight training device to promote maturation in skeletal muscle tissues
3. 学会等名 The 36th MEMS conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tingyu Li, Minghao Nie, Yuya Morimoto and Shoji Takeuchi
2. 発表標題 Microelectrodes fabricated by vacuum filling with low melting-point alloy for muscle tissue stimulation
3. 学会等名 The 36th MEMS conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菱沼拓未, 森本雄矢, 根岸みどり, 竹内昌治
2. 発表標題 組織培養用デバイスを用いた筋組織への運動神経細胞塊の接着
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ウェイトトレーニングによる培養骨格筋組織の成熟度向上の実現
2. 発表標題 本井健太郎, 趙炳郁, 森本雄矢, 竹内昌治
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福島皓平, 轟銘昊, 三浦重徳, 森本雄矢, 竹内昌治
2. 発表標題 可分解アンカを用いた 3 次元骨芽細胞組織の二重構築
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 趙炳郁, 森本雄矢, 竹内昌治
2. 発表標題 同心円状に収縮するチューブ状骨格筋組織の作製
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第46回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Byeongwook Jo, 森本雄矢, 竹内昌治
2. 発表標題 3Dプリンタで作製した磁力駆動小型遠心ポンプ
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第45回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jo Byeongwook, Morimoto Yuya, Takeuchi Shoji
2. 発表標題 Fabrication of skeletal muscle through modular tissue assembly perfused with 3D-printed centrifugal pump
3. 学会等名 MBI 3M 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inagaki Satoshi, Emoto Kazuo, Morimoto Yuya, Takeuchi Shoji
2. 発表標題 A co-culture system of human skin equivalent and dorsal root ganglion neurons
3. 学会等名 MicroTAS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamamoto Mikiyoshi, Myasnikova Dina, Nie Minghao, Morimoto Yuya, Takeuchi Shoji
2. 発表標題 Directional control of neurite outgrowth by micro-pathways on a collagen gel sheet
3. 学会等名 MicroTAS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jo Byeongwook, Morimoto Yuya, Takeuchi Shoji
2. 発表標題 Culture dish mountable centrifugal pump driven by magnetic force in applications for tissue engineering
3. 学会等名 MicroTAS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakayama Tomohiro, Jo Byeongwook, Morimoto Yuya, Takeuchi Shoji
2. 発表標題 Formation of perfusable skeletal muscle tissue
3. 学会等名 MicroTAS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sun Jung-Chun, Jo Byeongwook, Morimoto Yuya, Takeuchi Shoji
2. 発表標題 Permeable bio-printed vessel for cultured tissue
3. 学会等名 MicroTAS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣智之、榎本和生、森本雄矢、竹内昌治
2. 発表標題 培養皮膚モデルとDRGニューロンの共培養システム
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第44回研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担者	吉田 昭太郎 (Yoshida Shotaro) (20785349)	中央大学・理工学部・助教 (32641)	
研究 分担者	根岸 みどり(加藤みどり) (Negishi Midori) (30300750)	武蔵野大学・薬学部・助教 (32680)	

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
---------	---------