

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630429

研究課題名(和文) オンチップ神経支配筋組織の創製

研究課題名(英文) Development of innervated skeletal muscle on chip

研究代表者

清水 一憲 (Shimizu, Kazunori)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70402500

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)：オンチップ神経支配筋組織の創成を目指して、必要な要素技術の開発を行った。神経細胞と筋管細胞を任意の位置に配置する技術を検討し、磁性ナノ粒子と磁力を使った方法とマイクロ流体デバイスを用いた方法でこれを達成した。また筋管細胞の収縮力を非接触で非破壊的に測定する技術を検討し、それが可能なマイクロデバイスの開発を行った。今後は各要素技術の統合を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to develop innervated skeletal muscle on chip. We developed several elemental technologies. We succeeded to pattern the attachment of neurons and skeletal muscle myotubes by a cell patterning method using magnetite nanoparticles and magnetic force, or micro fluidic devices. Also, we succeeded to measure the contraction force of cultured myotubes noninvasively by using the developed microdevice. Hereafter, we plan to integrate these elemental technologies.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バイオマイクロデバイス 磁性ナノ粒子 骨格筋細胞 神経細胞 細胞アッセイ

### 1. 研究開始当初の背景

オンチップ臓器/組織は細胞周囲の微小環境をうまく制御し、臓器/組織特異的な機能を再現した細胞培養マイクロデバイスであり、薬効評価試験における新技術として非常に期待が大きい[1]。

筋組織の最も特徴的な機能は収縮して力を発揮することであるため、オンチップ筋組織では収縮力測定機能が不可欠であると考えられる[2]。我々はこれまでに様々なオンチップ骨格筋組織の開発を行ってきた[3-5]。その中で、収縮力測定が可能なオンチップ筋組織を開発し、人工的な電気刺激にตอบสนองして単一の培養筋細胞が収縮する力を測定することに成功している[3]。

しかし、生体内において骨格筋組織の収縮は神経細胞に支配されていることから、より正確な薬効評価試験を行うためには、in vitroで神経細胞に支配された筋組織を構築する必要があると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、オンチップ神経支配筋組織を開発することである。

最終的には、神経細胞 - 神経筋接合部 - 筋組織で構成される神経支配筋組織をマイクロデバイス上で構築し、「それぞれの構成要素への選択的な薬剤刺激が可能」かつ「神経細胞のシグナルで動く筋組織の収縮力変化を非接触・非破壊的に定量可能」という特徴をもつ新しい細胞アッセイシステムの創製を目指す。

研究期間を2年間とし、上述した最終目標を達成するための要素技術の開発を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス神経幹細胞の培養

妊娠 14 日目のマウスから胎生期マウスを取り出し、実体顕微鏡下で線条体を取り出した。その線条体を細かく切り、トリプシン処理を行った後に細胞数を計測し、培養皿にまいた。使用した培地は、DMEM/F12 に抗生剤、B27 サプリメント、EGF、FGF-2 を加えたものである。

#### (2) 骨格筋細胞の培養

マウス骨格筋筋芽細胞 C2C12 とヒト初代筋芽細胞 HSMM を使用した。C2C12 は 10% 牛胎児血清入りの DMEM で増殖培養し、2% 馬血清入りの DMEM で分化誘導培養した。HSMM は SkGM で増殖培養し、2% 馬血清入りの DMEM で分化誘導培養した。

#### (3) MCL の調製と細胞の磁気ラベル化

MCL (magnetite cationic liposome) の調製は既報[6]に従った。調製した MCL を神経幹細胞を懸濁した培養液に加え、2 時間 37、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置した。

#### (4) マイクロデバイス製作

一般的なフォトリソグラフィ技術を利用

した。SU-8 フォトレジストを Si 基板上にスピンコートし、フォトマスクを介して露光し、SU-8 現像液で現像することで任意のマイクロパターンを得た。それを鋳型に PDMS を成型し、目的のデバイスを製作した。

### 4. 研究成果

目標達成を目指し、神経細胞と骨格筋細胞を任意の位置に配置するための要素技術開発を行った。本研究では2つの方法を検討した。一つは磁性ナノ粒子と磁力を用いた細胞パターンニング、もう一つはマイクロ流体デバイスを用いたパターンニングである。

まず前者の結果を示す。

#### (1) 神経幹細胞の増殖への MCL の影響

まず、増殖への影響を評価した。初代培養した神経幹細胞をシングルセルの状態に懸濁した培地に、MCL を 0、100、300 pg/cell の濃度で 2 時間添加し、それを 6 ウェルプレートに播種し、3、6、9 日後の細胞数を調べた。その結果、MCL の添加で神経幹細胞の増殖が抑制されることがわかった (図 1)。100 pg/cell の条件では、増殖開始が遅れるが 6 日目以降には増殖が観察され、その時の倍化時間は 0 pg/cell の条件と同様であった。

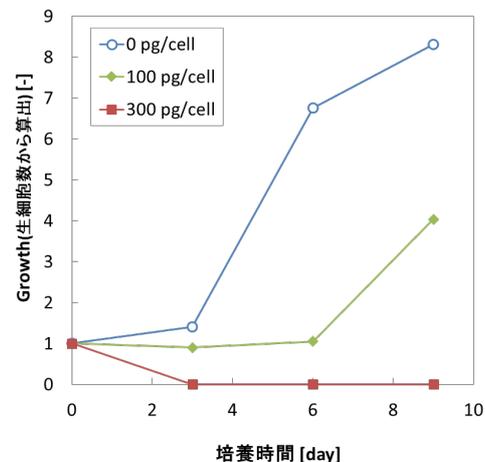


図1 神経幹細胞の増殖に対する MCL の影響 (シングルセル状態)

次に、スフェア状態の神経幹細胞への影響を調べた。神経幹細胞を 3 日間浮遊培養し、スフェアを形成させ、3、6 日後の細胞数を調べた。その結果、100 pg/cell の条件においても、神経幹細胞の増殖には影響がないことがわかった (図 2)。

このことからシングルセル状態で磁気ラベル化した直後に強制的にスフェアを形成せると増殖阻害が観察されなくなるのではないかと考えた。これまでに開発した剣山状鉄製デバイス[7]を用いて、100 pg/cell の条件で磁気ラベル化した神経幹細胞をアレイ化し、磁気ラベルなしでの増殖と比較した。その結果、予想通り、MCL による神経幹細胞の増殖阻害が見られなくなった (図 3)。

100 pg/cell の濃度で、シングルセル状態では阻害が観察されたが、同じ細胞をスフェアにすることで阻害が観察されなくなったことから、MCL が何らかの機構で、神経幹細胞の細胞間接着を阻害したことで、シングルセル状態においてのみ、増殖が阻害されたと考えられる。

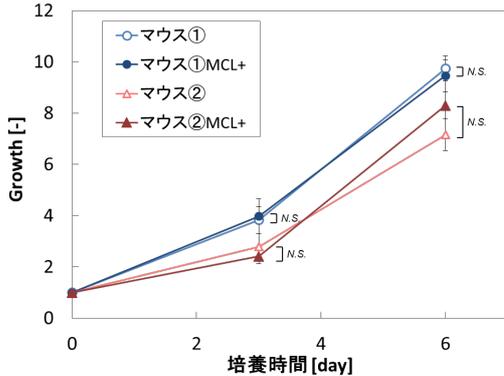


図2 神経幹細胞の増殖に対するMCLの影響 (スフェア状態)

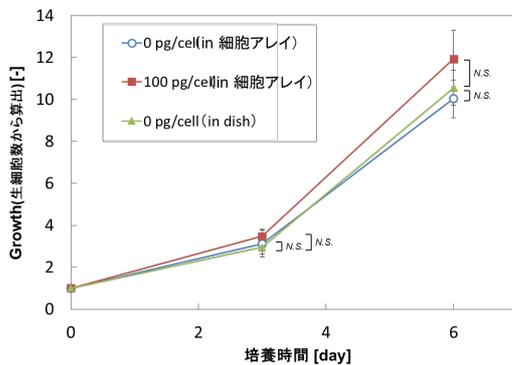


図3 神経幹細胞の増殖に対するMCLの影響 (磁力でスフェアを形成)

(2) 神経幹細胞の分化へのMCLの影響  
次に、分化への影響を調べた。3日間培養した神経幹細胞スフェアに対して、0、100 pg/cell の濃度でMCLを添加し、それをpoly-L-ornithineコートガラス状に播種し、7日間、分化誘導培養を行った。ニューロンのマーカーであるβIII tubulinとグリア細胞の一種であるアストロサイトのマーカーであるグリア線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) に対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、MCL添加ありの条件において、添加なしの条件と同様に分化することが分かった (図4)

そこでこれ以後は、3日間培養した神経幹細胞スフェアを100 pg/cellで磁気ラベル化して実験に用いることとした。

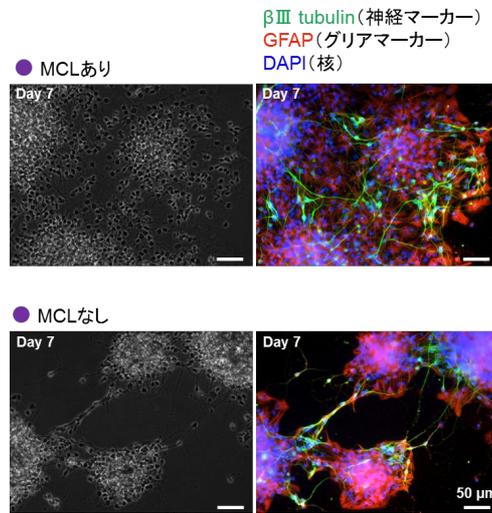


図4 神経幹細胞の分化に対するMCLの影響

(3) 磁性ナノ粒子を用いた神経幹細胞と筋管細胞のパターニング共培養

神経幹細胞を磁力で位置制御可能であることが分かったので、筋管細胞の位置制御と組み合わせ、パターニング共培養を行った。筋管細胞は、PDMS製ステンシルを用いた細胞パターニング法で位置制御した[8]。ステンシルを用いてヒト初代筋芽細胞から誘導した筋管細胞をパターニングして8日間培養した。その後、ステンシルを除去し、その上から神経幹細胞スフェアをアレイ化することで、それぞれの細胞を任意の位置に配置することに成功した。

次に、後者を示す。

(4) マイクロ流体デバイスを用いた神経幹細胞の位置制御

フォトリソグラフィ技術で製作したマイクロ流体デバイスを用いて神経細胞の細胞体と軸索を分けて培養することを試みた。デバイスには2つの細胞培養チャンバーがあり、そのチャンバー間が、長さ450 μm、高さと幅が5 μmの約100本のマイクロ流路でつながれている。神経幹細胞を片側のチャンバーに入れ、6日間培養したところ、軸索のみが反対側のチャンバーに到達した (図5)

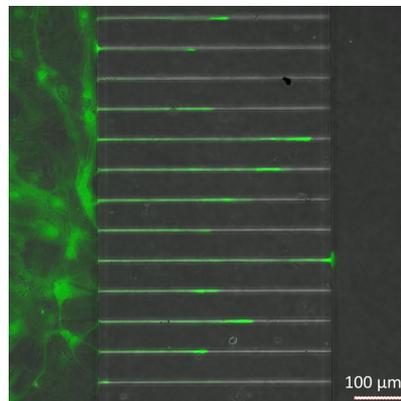


図5 細胞体と軸索のパターニング培養

また、骨格筋組織の収縮力変化を非接触・非破壊的に測定するための要素技術開発を行った。

(6) 骨格筋細胞の組織化と収縮力測定  
PDMS製のマイクロデバイスを作製した。マイクロデバイスには、収縮力を測定するためのピラー構造と三次元骨格筋組織を形成させるチャンバーがある。ピラー構造は、高さ4mm、直径300、400、500 $\mu$ mの円柱とした。デバイスを6ウェルプレート内に置き、そのチャンバー内に、マウス筋芽細胞を混合したフィブリンとマトリゲルからなるゲルを入れて、デバイス全体が培養液中に沈むように培地を添加した。翌日には、培養三次元筋組織がピラー構造を巻き込むように形成された。6日間分化誘導培地で培養した後に、電圧20V、パルス幅2ms、1Hzの電気刺激を負荷した。その結果、デバイス上の筋組織は電気刺激に応答して収縮し、それに付随してピラー構造が動いた。変位量を計測することで、収縮力を非接触に非破壊的に計測することに成功した。

以上、本研究ではオンチップ神経支配筋組織の開発を目指し、そのために必要な要素技術開発を行った。今後は開発した要素技術の統合を進めていく。

#### <引用文献>

- [1] Dongeun Huh, Geraldine A. Hamilton, Donald E. Ingber: From 3D cell culture to organs-on-chips, Trends Cell Biol, 21, 745-754, 2011 など
- [2] Shimizu K, Fujita H, Nagamori E: Evaluation systems of generated forces of skeletal muscle cell-based bio-actuators, J Biosci Bioeng, 115, 115-121, 2013
- [3] Shimizu, K., Sasaki, H., Hida, H., Fujita, H., Obinata, K., Shikida, M., Nagamori, E.: Assembly of skeletal muscle cells on a Si-MEMS device and their generative force measurement, 12, 247-252, 2010
- [4] Fujita, H., Shimizu, K., Nagamori, E.: Novel method for measuring active tension generation by C2C12 myotube using UV-crosslinked collagen film, Biotech Bioeng, 106, 482-489, 2010
- [5] Shimizu, K., Araki, H., Sakata, K., Tonomura, W., Hashida, M., Konishi, S.: Microfluidic devices for construction of contractile skeletal muscle microtissues J Biosci Bioeng, 119, 212-216, 2015
- [6] Yamamoto, S., Fei, J., Okochi, M., Shimizu, K., Yusa, A., Kondo, N., Iwata, H., Nakanishi, H., Honda, H.: Efficient capturing of circulating tumor cells using a magnetic capture column and a size-selective filter, Bioprocess and

Biosystems Engineering, 38, 1693-1704, 2015

[7] Arai, S., Okochi, M., Shimizu, K., Hanai, T., Honda, H.: A Single Cell Culture System Using Lectin-Conjugated Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force to Screen Mutant Cyanobacteria, Biotech Bioeng, 113, 112-119, 2016

[8] Shimizu, K., Fujita, H., Nagamori, E.: Micropatterning of single myotubes on a thermoresponsive culture surface using elastic stencil membranes for single-cell analysis, J Biosci Bioeng, 109, 174-178, 2010

#### 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0件)

〔学会発表〕(計9件)

山本修平、大河内美奈、清水一憲、本多裕之、磁気細胞パターンニングを用いた細胞の配置制御による異種細胞間相互作用解析モデルの構築、Symposium for New Technology for Cell-based Assay、2015年1月13日

森英樹、中亮介、原正之、Development of Textile Materials for Culture of Neural Stem/Progenitor Cells、日本化学会第95春季大会

Shimizu, K., Yamamoto, S., Okochi, M., Honda, H., Analysis of Cell-Cell Interactions Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force, 7th International Symposium on Microchemistry and Microsystems, 8-10 Jun (2015)

Shimizu, K., Yamamoto, S., Okochi, M., Honda, H., Magnetic Micropatterning of Different Types of Cells for Analysing Their Interactions, Annual Meeting of Biomedical Engineering Society (BMES2015), 7-10 Oct (2015)

Yamamoto, S., Shimizu, K., Okochi, M., Honda, H., Magnetic Force-based Cellular Micropatterning for Analysis of Cell-cell Interactions, Asian Congress on Biotechnology 2015 (ACB2015), 15-19 Nov (2015)

山本 修平、清水 一憲、森 英樹、原 正之、本多 裕之、磁気細胞パターンニング法を用いた神経幹細胞と筋管細胞の相互作用解析モデルの構築、第67回日本生物工学会大会、2015年10月26日(月)

清水 一憲、骨格筋組織オンチップの開発、  
名古屋大学 予防早期医療創成センター  
第5回ワークショップ、2015年8月5日

清水 一憲、本多 裕之、動く微小骨格筋組  
織を搭載したマイクロ流体チップの開発、名  
古屋大学 予防早期医療創成センター 第5  
回ワークショップ、2015年8月5日

清水 一憲、物理刺激と機能評価のための  
バイオマイクロデバイス、第2回豊田理研特  
定課題研究 講演会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/proc/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 一憲 (SHIMIZU, Kazunori)  
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：70402500

### (2) 研究分担者

森 英樹 (MORI, Hideki)  
大阪府立大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：30450894

### (3) 連携研究者

なし