

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2015

課題番号：15H06074

研究課題名(和文)パターン化アルギン酸カルシウム上での並列化筋管細胞包埋コラーゲンゲルシートの作成

研究課題名(英文) Making an Aligned Muscle Cell Embedded Collagen Gel Sheet on a Parallel Patterned Calcium Alginate Substrate

研究代表者

萩原 幸輝 (HAGIWARA, Koki)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：80761650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は骨格筋再生医療を目指した並列化筋細胞シートとその作成に必要な足場材料の作成である。結果、約400umの半円柱状並列溝構造を持つアルギン酸カルシウム足場の作成、及びその上で並列構造を持つ筋管細胞(未熟な筋線維細胞)を包埋したコラーゲンゲルシートの作成に成功した。また、移植時に扱い易い様にこの足場を包み込む並列筋管細胞包埋コラーゲンゲル2重膜の作成にも成功した。加えてシート移植を容易にする為に、シート保持、他組織への吸着防止用にアルギン酸カルシウムハニカムメッシュの作成にも成功した。また上下層に筋芽細胞包埋コラーゲンゲルを含むより強度の高いコラーゲンゲルシートの作成にも成功した。

研究成果の概要(英文)：This study's purpose was to make an aligned muscle cell sheet and its substrate to regenerate skeletal muscle through sheet transplantation. As a result, the creation of a calcium alginate substrate with aligned 400um diameter half column ditches and an aligned myotube embedded collagen gel sheet were a success. The ditches made aligned patterns in the gel; and the non adhesive feature of the substrate sheet let the proteins and cells contract smoothly on one axis. Also, double layer muscle cell sheets sandwiching the substrate were made to handle the sheet for easy transplantation. In addition, calcium alginate honeycomb meshes were made for the sheet transplantation. The dried mesh held sheets and transplanted to the target area easily. The mesh could then be removed or sutured in to interrupt other tissue attachment. Last, a tough collagen sheet sandwiched by cell embedded collagen gels was made for transplantation into areas needing high mechanical strength, such as the diaphragm.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 骨格筋再生 組織再生工学 小児外科 筋シート アルギン酸カルシウム

1. 研究開始当初の背景

生体内の骨格筋はある程度の修復・再生能力は持つが、大量の筋線維の喪失や先天的に筋組織が欠失しているときは、その部位での筋組織の再生構築は難しい。例として、交通事故などによる大規模な筋組織の後天的欠損、横隔膜ヘルニアや鎖肛などの新生児の先天的な筋組織欠損などが挙げられる。現在、これらの病状に対しては外科的に他部の筋組織を移植したり、人工物質を代わりに埋め込んだりして筋組織欠損部の補修を行っている。しかしこれらの方法には常に侵襲や剥離の危険性が伴う。例として、先天性横隔膜ヘルニア、特に **Bochdalek hernia** では左横隔膜筋部が先天的に欠損し、この穴が大きく縫合のみでは処置できない場合、**Gore Tex®** などの人工繊維を用いて塞ぐ手法が取られる。しかし新生児の成長に伴ってこの人工繊維は成長しないため人工繊維剥離による横隔膜ヘルニア再発の危険性が伴う。初期または再発の手術時に、培養された筋シートなどを移植し、その移植細胞が患者の組織と融合し共に成長することによってより低侵襲で再発の危険性の低い治療に結びつくのではないかとと思われる。このような再生医療は成人に対しても有効であると思われるが、特に術後も組織が成長によって大きくなる小児患者に対して非常に効果が高いと考えられる。

この骨格筋組織再生治療を目指し、まずは筋前駆細胞(筋芽細胞)細胞移植を試みた^{1,2}。実験では **Enhanced Green Fluorescent Protein(EGFP)**陽性筋芽細胞(以下、**EGFP 筋芽細胞**)をゼラチンを球状に架橋固定したゼラチンハイドロゲルマイクロスフィア³に **basic Fibroblast Growth Factor** (以下、**bFGF**)を吸着させたものと共に、ラット後肢の人工的骨格筋部に移植して移植細胞の再生能を観察した。その結果、術後4週間の移植細胞の生存率は実験群で有意に向上しこの細胞が横紋構造をもつ骨格筋に成長し、筋中心核も**bFGF**投与群では筋再生が観察され、筋芽細胞移植と**bFGF**投与の併用の筋再生能への有用性が確認された。また実験群では**CD31**も有意に高く血管新生に伴い供給される酸素や栄養量が上昇し生存率向上に寄与したと思われた。それでも患部に留まる移植細胞は少なく見受けられた。多くの移植細胞が流れるか死滅してしまったことが考えられる⁴。この移植細胞の流出や死滅の問題解決の一つとしては、より成熟した筋管細胞の状態での移植が考えられる。しかし培養皿上での筋管細胞への分化培養では無秩序な向きに伸長する。これは生体内の規則的に並列に並ぶ筋線維構造とは程遠く、一軸方向への機械的収縮強度や収縮効率が下がることが暗示された。

そこで細胞を並列に配列させるために細胞接着率の低い **Poly Vinyl Alcohol** によって異なる幅の溝構造を作成して細胞接着面を

制限し、これによって並列化された筋管細胞を作成する実験を行った⁵。その結果、平行に配列する筋管細胞の作成に成功した。また、溝幅によって筋管細胞の形態が変化することも確認し、特に **200µm** や **400µm** 幅などの太い溝内では多数の細い筋管細胞と少数の太い筋管細胞が作られることが確認された。

次の問題は培養皿上での細胞培養では筋管細胞が1層にしかならず、移植に耐えられる力学強度が得られないということである。これの解決には、細胞外マトリクス(以下、**ECM**)に細胞を包埋培養し三次元的な構造を作り出すことが考えられた。これに前実験で確認された溝構造による細胞生存領域の制限を併用し、並行かつ立体的に構築された筋管細胞を含むシートを製作する計画を建てた。

2. 研究の目的

(1) パターン化アルギン酸カルシウム足場上での並列化筋細胞包埋コラーゲンゲルシートの作成

本研究の目的は外科的な移植再生医療に用いることができる、自然界に存在するような並列・重層構造を持つ筋線維・筋細胞シートを作成することである。この足場材料に求められる条件として、細胞の生存領域や筋収縮の方向を制御することのできる並列な溝パターン、筋収縮を邪魔せず簡単に剥離可能な低接着性、溝底部の細胞にも酸素や栄養を届けることができるような透過性、筋前駆細胞や筋幹細胞の分化を硬骨に向けないための柔軟性、生体や細胞に対する低毒性などの特徴が挙げられる。これらの条件を満たす材料の一つとしてアルギン酸カルシウムが選定された。また溝幅は前実験で多数の細い筋管細胞と1~2本の太い筋管細胞が作られることが確認された **400 µm** 前後が妥当だと判断された⁵。また今回の実験で用いる筋芽細胞細胞は骨芽細胞や脂肪細胞にも分化することがある。繊維状に長い型の中で培養を行うとこれら目的外の細胞への分化が抑制されることも間葉系幹細胞を用いた実験で言及されている⁶。本研究の並列溝構造を持つ足場では筋由来細胞以外への分化が抑制される可能性がある。

(2) 並列化筋細胞包埋コラーゲンゲル2重シート

実験(1)の成功の折にはこの筋細胞シートを移植の為に取り扱い易くする必要があり、その解決法の一つとして(1)の筋細胞シートを足場を包むような形で2重膜にすることが考えられた。1層の筋細胞シートでは、成熟するにつれ培養皿から剥がした時点で収縮し、展開して移植することが困難であるからである。

(3) アルギン酸カルシウムハニカムメッシュ

実験(1)の移植への問題点を払拭する方法の一つとして、アルギン酸カルシウムハニカムメッシュの作成も考案された。アルギン

酸カルシウム自体にはタンパク質や細胞は付着しないが、乾燥させたアルギン酸カルシウムは触れた物から吸水しながら保持することができる。この性質により実験(1)で作成されたようなシート状の物質を保持・移植させ易くする為の実験である。また、目的の位置に移動後は、アルギン酸カルシウムに十分に吸水させると容易に剥がすことが可能である。また、目的のシートと共に患部に移植し、力学強度の向上や移植物への他組織の付着を防ぐことも可能である。剥がしやすさ、弾力や強度、患部への十分な栄養補給を考慮し、力学的に強く且つ柔軟性に優れるハニカム構造を持つメッシュの形を選定した。

(4) 強化コラーゲンシートを筋細胞包埋コラーゲングルシートで挟んだ3重シート

上記までの筋細胞包埋シートでは横隔膜ヘルニアなど陰圧の強い場所での耐久性に問題がある可能性を考慮し、コラーゲングルを風乾で密度を高めた上に架橋を行ったコラーゲン薄膜の上下層に筋細胞包埋コラーゲングルシートを付着させた3重シートを作成し、ラットの筋に移植することを行った。

3. 研究の方法

(1) パターン化アルギン酸カルシウム足場上での並列化筋細胞包埋コラーゲングルシートの作成

先ず直径 500 μ m のガラス棒 (Fujiston, Japan) を並べて接着した型を2つ作成し、両端に2 \times 4cm のパラフィンフィルム (American National Can, U.S.A.) 2枚をスペーサーとして重ねる。その上に3% (w/v) のアルギン酸ナトリウム (Kimika, Japan) 溶液を乗せ、2つめの型で挟み10% 塩化カルシウム溶液 (Wako, Japan) に5分間浸漬させアルギン酸カルシウムに変質させた。 $(\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6)_n + (\text{CaCl}_2)_n \rightarrow (\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{CaO}_{12})_n$ この後70%エタノールにより30分脱水・滅菌し、2 \times 2cm 角のシートに切り出し、滅菌10%塩化カルシウム溶液に4時間浸漬させて更に架橋を促進した。これを滅菌 miliQ 水で3回洗浄後、無血清培地 (DMEM F12 Ham, Wako, Japan) に15分浸漬、その後、筋分化培養液に30分浸漬して分化培養液に馴染ませた。この分化培養液は HEPES 添加・L-グルタミン無添加 DMEM F12 Ham 培地 (Wako, Japan) に2%馬血清 (Gibco, U.S.A.)、1% Penicillin Streptomycin (Wako, Japan)、1% L-Alanyl-L-Glutamine (Wako, Japan)、0.01% 25mM インスリン (Sigma-Aldrich, U.S.A.) を加えたものである。足場1片を100 \times 100mm 培養皿 (BD Falcon, U.S.A.) に設置し、両脇に滅菌した0.5 \times 4cm シリコンを液漏れ防止用に設置した (図1, 2)。

並行して細胞含有コラーゲン溶液を製作した。氷上で3% Type-I アテロコラーゲン溶液 (新田ゼラチン, Japan)、10倍濃縮 F12 培養液 (新田ゼラチン, Japan)、再緩衝液 (新田ゼラチン, Japan) を8:1:1の割合で順番に混

合し、更に2%馬血清 (Gibco, U.S.A.)、1% Penicillin Streptomycin (Wako, Japan)、0.01% 25mM インスリン (Sigma-Aldrich, U.S.A.) を混合し、これをゲル化用コラーゲン溶液とした。このゲル化用コラーゲン溶液に2 \times 10⁶ cells/ml になるように Passage 3 L6 筋芽細胞 (ATCC, U.S.A.) を混合し、この細胞浮遊コラーゲン溶液600 μ m を先に製作したアルギン酸カルシウム足場上に、100 μ m ずつをそれぞれ足場と培養皿の接触域に塗布しゲル化後のアンカーとした。これを5%CO₂ 濃度のインキュベーターに30分静置してゲル化させ、筋芽細胞包埋コラーゲングルシートを作成し、シリコン棒を除去後、30ml 筋分化培養液を注入し2週間分化培養を行った (図1, 2)。なお培養液は毎日交換した。

培養から1、3、5、7、10、14日目の細胞の写真をそれぞれランダムな10箇所において撮影し、細胞のコラーゲンの型線に対する角度を Image-J (National Institute of Health, USA) を用いて計測した。なお、7日目以降は筋芽細胞同士が融合して筋管細胞を形成するので、抗ミオシン重鎖 (MHC, 1:50; Calbiochem, Germany) -Alexa Fluor[®]555 (1:400, Invitrogen, U.S.A.) にて蛍光免疫染色した筋管細胞の勾配角度を計測した。

培養から14日目には作成したシート内の細胞が筋由来細胞であることを証明するために、ブロッキング溶液・抗体希釈液として5% albumin, from bovine serum Cohn Fraction V (BSA; Wako, Japan)、1次抗体として rabbit-anti-MHC monoclonal IgG (1:50; Calbiochem, Germany)、mouse-anti-desmin monoclonal IgG (1:50; Dako, Denmark)、mouse - anti- α -sarcomeric actinine polyclonal IgG (1:50; Sigma-Aldrich, USA)、2次抗体として goat-anti-rabbit-AlexaFluor[®]555 (1:400, Invitrogen, U.S.A.)、goat-anti-mouse-AlexaFluor[®]488 (1:400, Invitrogen, U.S.A.)、各染色液として Hoechst 33342 (1:100, AnaSpec Inc, USA) を用いた。各シートの培養液除去後、PBS(-) (Nissui, Japan) にて洗浄し、4% paraformaldehyde (Wako, Japan) にて20分常温で固定したのちPBS(-)を用いて5分3回の洗浄を行い、5分4 $^{\circ}$ Cの条件下で Triton X-100 (Wako, Japan) を用いて細胞膜浸透処理を行いPBS(-)洗浄後、上記5%BSAにてブロッキング処理を行い、1次抗体反応を常温で60分行ってからPBS(-)洗浄し、遮光下で2次抗体反応を常温で45分を行い、PBS(-)で洗浄後に核染色を常温10分の条件下で行いPBS(-)洗浄後に FluoreSave[®] とカバーガラスで封入後4 $^{\circ}$ C環境下で染色物を保存し、観察次は BZ-8100 蛍光顕微鏡 (Keyence, Japan) を用いて行った。

また、ゲル内の筋細胞が正常に分化・成長しているか確認するために4、7、10、14日目のシートからRNAを採取し、これをcDNA

に変換後、 β -actin に対する MHC、Actinin2、Myogenin、の発現率を TaqMan RT-qPCR 法を用いて測定後、 $\Delta \Delta CT$ 法を用いて計測した(テーブル 1)。RNA 採取には Isogen II (日本ジーン, Japan) を使用し、RNA からの DNA 除去及び cDNA への変換には ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Toyobo, Japan) を使用した。また RT-qPCR には ABI 7500fast 機 (Applied Biosystem, U. S. A.) を、probe 及び Master Mix には Universal ProbeLibrary (Roche, Schweizerische) を、プライマーは Roche Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche, Schweizerische) を用いて設計した配列を北海道システムサイエンス社から購入して用いた(テーブル 1)。RT-qPCR の設定は、初期変性に 95°C10 分、その後は変性に 95°C15 秒、伸張に 60°C60 秒を 55 サイクル行った。

また今回の結果の統計処理には Statcell の analyzed with a one-way analysis of variance (ANOVA) を用い、 $p < 0.05$ を有意差と見なした。

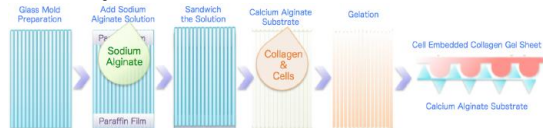


図 1: アルギン酸カルシウム足場と筋芽細胞包埋コラーゲンゲルシートの作成スキーム。

テーブル 1: RT-qPCR に用いた遺伝子、プライマー、Universal ProbeLibrary プローブ番号

Primer Name	Primer Sequence	Gene Number	UPL Number
β -Actin	5'-CCCGCGAGTACAACCTTCT-3'	NM_031144	17
	5'-CGTCATCCATGGCGAACT-3'		
Myosin Heavy Chain	5'-CAGACTAAAGTGAAAGCCTACAAGAG-3'	L24897	82
	5'-TGACGTTGGATTGTCTCTCA-3'		
Actinin2 (n-sarcomeric actinin)	5'-CCGGATTCTGGCTCTGATA-3'	NM_001170325	53
	5'-GGCAGCTCTGACGAAAGT-3'		
Myogenin	5'-CTACAGGCCTGTCTCAGCTC-3'	NM_017115	63

(2) 並列化筋細胞包埋コラーゲンゲル 2 重シート

筋細胞包埋コラーゲンゲル 2 重シートの作成工程は、ほぼ実験 (1) のものと同様である。異なる工程は、先ず 2×2cm 滅菌カバーガラス (Matsunami, Japan) を培養皿中心に Type-I コラーゲン (新田ゼラチン, Japan) で固定し、両端をシリコン棒で塞いだ後に 400 μ m の 2×10⁶ cells/ml を塗布し、その上にアルギン酸カルシウム足場を静置し、その後は実験 (1) と同様に 600 μ m の細胞含有コラーゲン溶液を足場上に、100 μ m ずつを足場両端に塗布し、インキュベーター内でゲル化させるだけである。このコラーゲンゲル及び細胞はガラスに接着せず、足場を包み込む形でゲル化されることによってゲルが培養皿に接

着している部位を剥がしてシートが収縮しても容易に持ち上げることができると予測された。培養も実験 (1) と同様の分化培養液を等量、毎日交換した。

また、ラットへの移植実験も行った。この時細胞には移植細胞の見分けが付くように、L6 筋芽細胞膜に CellVue[®] Claret Far Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich, U. S. A.) により Cy5 の蛍光標識を付着させた細胞をコラーゲンゲルシート作成時に用いた。移植には 5 週齢の SD ラット (日本 SLC, Japan) を用いた。イソフルラン (マイラン製薬株式会社, Japan) 吸入麻酔をしながら左後脚大腿筋に作成した人工的筋欠損部に 14 日培養し PBS (-) で洗浄した 2 重シートを足場ごと移植縫合した。また比較群には細胞を包埋しないコラーゲンゲル 2 重シートが使用された。なお、当動物実験は筑波大学の倫理規定に法り、証人番号 15-416 として行われた。

(3) アルギン酸カルシウムハニカムメッシュ

先ず Solidworks (Dassault Systemes, Japan) により 3D CAD を作成した。各ハニカム構造は 1 辺 2mm、幅 0.5mm、深さ 1mm であり、全体の大きさは幅 50mm、長さ 30mm、深さ 5mm の長方体である。この 3D 情報を元に 3D プリンタ AGILISTA-3000 (Keyence, Japan) を用いて透明樹脂 AR-M2 (Keyence, Japan) の型を作成した。この型は実体顕微鏡 VR-3000 (Keyence, Japan) を用いて観察・測定した。次にこの型内に 3% (w/v) アルギン酸ナトリウム溶液を流し込み、10% 塩化カルシウム溶液に 2 分浸漬架橋しアルギン酸カルシウムハニカムメッシュを形成した。これを 70% エタノールに 20 分浸漬して滅菌し、滅菌 10% 塩化カルシウム溶液に 4 時間浸漬してさらに架橋を行った。これを滅菌水に 10 分 3 回浸漬して洗浄し、実体顕微鏡 VHX-5000 (Keyence, Japan) を用いて観察・測定した。

(4) 強化コラーゲンシートを筋細胞包埋コラーゲンゲルシートで挟んだ 3 重シート

先ずシリコン板に設置された 2.5×2.5×0.3cm シリコン枠内に沿うように、乾燥中の収縮を防ぐ目的で虫ピンを刺し、この中にゲル化用コラーゲン溶液を注入し、インキュベーター内でゲル化を行った (37°C、30 分)。その後クリンベンチ内で風乾圧縮した薄膜を架橋用液 (80% Ethanol 50ml、50mM Water-soluble carbodimide hydrochloride 0.479g、20mM N-Hydroxysuccinimide 0.115g) に 12 時間浸漬架橋し、miliQ 水と超音波洗浄機を用いて洗浄した (常温、15 分を 6 回)。この後 70% Ethanol に 20 分浸漬して滅菌し、滅菌 miliQ 水で 5 分 3 回洗浄し、PNS (-) に 20 分 2 回浸漬して培養液に馴染ませた。その後 CellVue[®] Claret Far Red Fluorescent Cell Linker Kit で Cy5 標識された L6 筋芽細胞包埋コラーゲンゲルを 600 μ m 塗布し、インキ

ユベーター内でゲル化させた(37°C、30分)。この工程を下層部にも同様に行い3重膜を形成した。このシートを筋分化培養液で2日培養後にPBS(-)で洗浄し、SDラット横隔膜または左後肢大腿筋に作成した人工的筋欠損部に移植した。また免疫抑制剤FK506(Asterasu, Japan)を1週間毎日注した。患部組織は回収後にO.C.T. compoundを用いて凍結させ、蛍光免疫染色で移植細胞の生存確認(Cy5)、また抗TUJ-1-AlexaFluor®488を用いて神経が移植金に接着しているか確認予定である。

4. 研究成果

(1) パターン化アルギン酸カルシウム足場上での並列化筋細胞包埋コラーゲンゲルシートの作成

足場製作においては、溝幅約403.32 μ m(SD=40.01 μ m)、深さ約123.60 μ m(SD=20.74 μ m)のアルギン酸カルシウムゲル足場の作成に成功した(図1a)。また、その足場上では筋細胞包埋コラーゲンゲルシートの作成及び培養に成功した(図2b, c, d, e)。ゲル内の細胞配角度は培養期間に反比例して有意に減少し、並列に揃った筋管細胞を包埋するコラーゲンゲルシートの作成に成功した(図3)。これらの細胞においては培養期間に正比例して筋細胞の成熟に必要なMyosin、Actinin2、Myogeninが有意に発現し、正常に筋分化誘導がかかっていることが判明した(図4)。また培養から14日目のDesmin、Actinin2、Myosin蛍光免疫染色でもこれら筋由来フィラメントの存在を証明し、筋管細胞が並列化していることも視認された(図2c, d, e)。

本実験の成功は、将来的な筋再生に非常に有用なものであると推測される。現状、*in vitro*では無秩序に配列し、また単層である筋細胞が整列・積層した状態で移植できる可能性があるからである。また、培地やコラーゲンゲル自体にもMyogeninの発現抑制を引き起こすMyostatinを抑制する働きのあるForestatinや筋成長因子などを混合して徐放してより力学強度の高い成熟し移植に耐えうる筋線維シートを移植したり、筋成熟に必要な血管や神経伸展を促進させるbFGF、VEGF、HGFなどの成長因子もコラーゲンに混合・徐放させ、移植幹部の総合的な再生を促進させることも期待できる。また*in vitro*での骨格筋作成のブラックボックスを解明するモデルや、各個人由来筋細胞から筋シートを作成し、それに対する各個人の薬剤耐性を計るモデルにもなりうる可能性にもなり得る。

なお、本研究成果は2016年12月に開催予定の学TERMIS-AMにおいて発表予定であり、英語論文も投稿予定である。

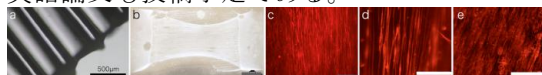


図2：並列溝構造を持つアルギン酸カルシウム足場の明視野顕微鏡写真。半円柱状の並列溝を持つアルギン酸カ

ルシウム足場明視野顕微鏡写真(a)。14日目の筋細胞包埋コラーゲンシート(b)。14日目のDesminフィラメント(c)。14日目のMHCフィラメント(d)。14日目のActinin2フィラメント(e)。スケールバーa, bは500 μ m、c, d, eは

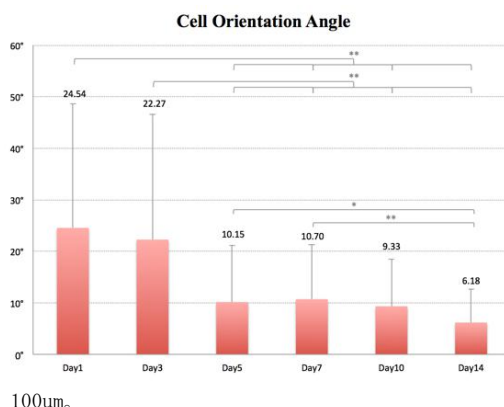


図3：細胞の配勾角度。培養期間に反比例して有意に減少している。特に筋管細胞が出来始める5日目からは顕著に細胞の配列が揃いだす。

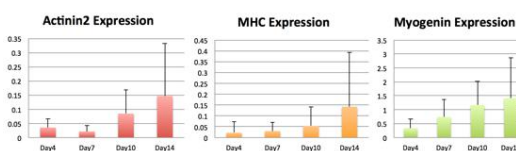


図4： β -Actin発現量に対するActinin、MHC、Myogenin発現量のグラフ。培養期間に正比例して各筋由来遺伝子が増加した。

(2) 並列化筋細胞包埋コラーゲンゲル2重シート

筋細胞包埋コラーゲンゲル2重シートの作成には成功した(図5a, b, c)。このシートは培養皿から剥がした後も、仮説通りに足場を包み込み、ピンセットでも容易に持ち上げることが可能であった。ラットへの移植実験は実験群8匹、比較群2匹に成功した、移植3週間後も元気に動き回っている。

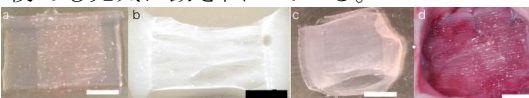


図5：筋細胞包埋コラーゲンゲル2重シート。ゲル化直後の2重シート(a)。14日目の筋細胞包埋コラーゲンゲル2重シート(b)。移植前の容易に扱える、足場を挟んだ2重シート(c)。ラット大腿筋に移植した2重シート(d)。スケールバーは5mm。

(3) アルギン酸カルシウムハニカムメッシュ

3D CADデータ及び型、アルギン酸カルシウムハニカムメッシュ全ての作成に成功した(図6, 7)。型の溝幅は約0.49mm、深さは約0.99mmと3D CADデータと相似した(図6d)。メッシュは深さ約0.98mm、幅約0.51mmとCADデータと相似したが、1辺約1.5mmと架橋や脱水の過程で少々小さくなった。滅菌後培養皿に貼り付けて風乾させたメッシュはピンセットでも容易に取り扱えるほど強度があるフィルム状となり、目的の取り扱いの難し

い薄いコラーゲンシートを容易且つ強く保持し、移動させることができ、給水後は剥がすことも可能であった。水分を含んだゲル自体は弾力と強度に富み、薄いシートだけでは難しい筋肉への縫合も容易に行えた。また、アルギン酸カルシウムの性質上、給水後のメッシュには他組織が接着しにくい為、例えば横隔膜に *in vitro* で作成した筋シートやコラーゲン膜の移植時に同時に使用すれば、横隔膜に肺や肝臓などの他組織が附着しない為、収縮・拡大運動を阻害せず且つ附着による移植シートの剥離を防止することが可能になるとと思われる。

なお本研究も TERMIS-AM 学会でポスター発表し、論文投稿もする予定である。

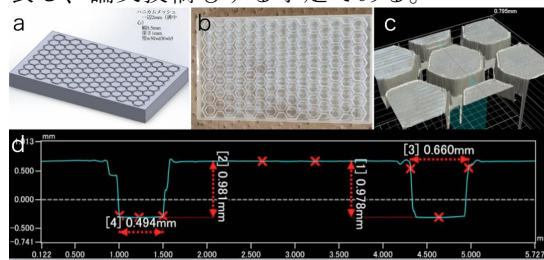


図 6：アルギン酸カルシウムハニカムメッシュ用型の参考画像。3D CAD 図 (a)。3D プリンターで形成された型 (b)。実体顕微鏡写真 (c)。型の溝の計測図 (d)。

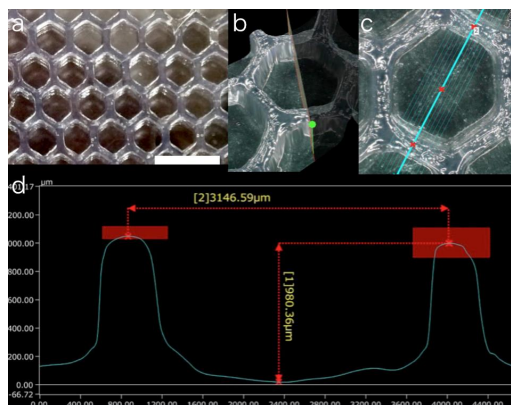


図 7：アルギン酸カルシウムハニカムメッシュの参考画像。ハニカムメッシュ構造を持つシートであることがわかる (a)。実体顕微鏡による観測用写真 (b, c)。深さなどの観測図 (d)。

(4) 強化コラーゲンシートを筋細胞包埋コラーゲンゲルシートで挟んだ 3 重シート

圧縮高強度コラーゲンの作成及び、強化コラーゲンシートを筋細胞包埋コラーゲンゲルシートで挟んだ 3 重シートの作成にも成功した。薄状なので実験 (3) で作成したハニカム構造シートを用いて、まずは SD ラット横隔膜への移植に腹腔側から挑戦した。この膜の力学強度は高く、横隔膜の穴を塞ぐことには成功したが、肝臓が非常に邪魔且つ横隔膜は常に運動しているため縫合が困難であり、安楽死まで横隔膜ヘルニア部を保持していた。その後、移植部位をラット右後脚大腿筋に作成した人工的筋欠損部にハニカムメッシュと共に移植した。比較群は筋芽細胞が包埋されていない 3 重シートを用いた。実験群は 5 匹、比較群は 2 匹に移植を行った。

横 隔膜ヘルニア部への移植は元座の自分の技術では難しかったが、横隔膜の陰圧に耐えるほど力学強度が高く、且つ縫合による穴も強化コラーゲン膜や筋細胞包埋コラーゲンゲルにより即座に塞がり、さらに 3 層別々に成長因子や分化誘導因子などを徐放させることが出来る為、非常に有用だと思われる。また、移植用の筋組織から採取。増幅させたものを用いれば、ある程度の緊急次にも利用出来る可能背がある。

なお、当動物実験は筑波大学の倫理規定に法り、証人番号 15-416 として行われた。

<参考文献>

1. Koki Hagiwara, Guoping Chen, Naoki Kawazoe, Yasuhiko Tabata, Hiroaki Komuro. : Promotion of muscle regeneration by myoblast transplantation combined with the controlled and sustained release of bFGFcp. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. Published online in Wiley Online Library DOI: 10.1002/term.1753, 2013.
2. 萩原幸輝: Skeletal Muscle Regeneration Therapy Research for Congenital Diaphragmatic Hernia (横隔膜ヘルニア治療を目的とした骨格筋再生医療研究). 1-137 項, 2015. (博士学位論文)
3. Tabata Y, Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Aoyama I, Tamura M, & Ikada Y. Bone regeneration by basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogels. Biomaterials 19, 807-15, 1998.
4. Fan Y, Maley M, Beilharz M, & Grounds M. Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. Muscle & nerve 19, 853-60, 1996.
5. Koki Hagiwara, Naoki Kawazoe, Koji Masumoto, Guoping Chen: Myotube orientation control by polyvinyl alcohol micro pattern, 第 6 回ナノバイオメディカル学会大会要旨集、産業技術総合研究所、P-15、2012
6. Rong Peng, Xiang Yao, Jiandong Ding., Effect of cell anisotropy on differentiation of stem cells on micropatterned surfaces through the controlled single cell adhesion., Biomaterials 32, 8048-8057., 2011.

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 予定 件)

[学会発表] (計 予定 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 予定 件)

名称：発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 萩原 幸輝 (HAGIWARA, Koki)

筑波大学 医学医療系 非常勤研究員

研究者番号：80761650

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし