

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11369

研究課題名(和文)筋老化の分子機構解明の為に3D培養骨格筋組織の開発

研究課題名(英文) Development of 3D cultured skeletal muscle tissue for elucidation of molecular mechanisms of muscle aging

研究代表者

岸田 綱郎 (KISHIDA, TSUNAO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00370205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：サルコペニアの分子メカニズムの解明に応用する基盤を確立することを研究の目標としてスタートした。フィブリンを主成分とするゲルに筋芽細胞を播種し、数日間分化誘導培地で分化培養することで、三次元筋組織が形成された。免疫染色を行ったところ、筋組織内に多数のサルコメア構造を有する筋管細胞が存在することがわかった。電気刺激を加えたところ、構築された3D筋組織の収縮が見られた。電気刺激に反応して発生した筋組織の張力を、収縮力測定マイクロデバイスを用いて定量したところ、培養に伴い経時的に収縮力が増強する傾向が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の方法よりも優れた骨格筋組織の培養方法を確立することに成功し、得られた骨格筋組織が高い機能を有することを確認できた。(Shimizu K, Kishida T, et al. J Biosci Bioeng. 2020)。本研究で作成した骨格筋組織は、筋老化や筋肉の機能についての基礎研究のためのツールとしてのみならず、移植用の骨格筋組織を供給することも期待できるので、外傷や様々な骨格筋組織欠損に対する新しい有効な再生医療法に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to establish a fundamental technology that contribute to the elucidation of the molecular mechanisms of sarcopenia. Myoblasts were seeded in a fibrin-based gel, and three-dimensional muscle tissue was formed by several days of differentiation culture using differentiation induction medium. Immunostaining revealed numerous myotubular cells that possess sarcomere structures. An electrical stimulation resulted in contraction of the 3D muscle tissue. The tension generated by the electro-stimulated muscle tissue was measured using a contraction force measurement microdevice, showing that the contraction force tended to increase during the culture period.

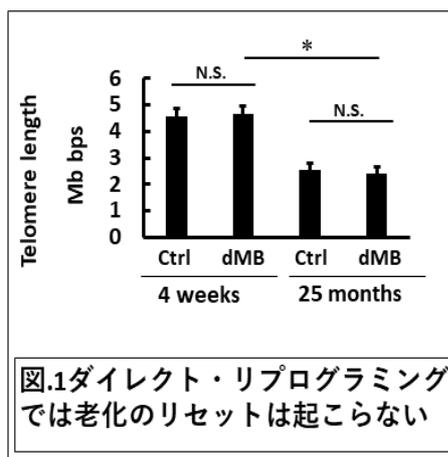
研究分野：再生医療

キーワード：骨格筋細胞 ダイレクトコンバージョン サルコペニア 3次元培養 再生医学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はヒト真皮線維芽細胞(Human dermal fibroblast:HDF)に、MyoD1 と L-Myc 遺伝子を導入することで、従来技術と比較して高い効率で筋芽細胞を直接誘導する技術を確立した。さらに、この方法で得られた直接誘導筋芽細胞 (Directly reprogrammed Myoblast : dMB) は、骨格筋細胞関連遺伝子群(Myogenin, CK-M, Myomarker など)を強発現するのみならず、融合して多核の筋管にまで成熟することが分かった (Biochem Biophys Res Commun. 2017)。本技術を用いて、若い、あるいは老化した線維芽細胞から筋芽細胞を作成し、老化マーカーとして Telomere length を解析したところ、筋芽細胞に変わっても元の線維芽細胞の老化の程度は維持されており、老化のリセットは起こっていないという結果を得ている(図.1)。サルコペニアの原因には、骨格筋タンパクの合成と分解のバランスの異常、筋組織の修復能の低下などがあると考えられているが、それらの分子メカニズムの多くは未解明である。



2. 研究の目的

サルコペニアの病態を分子レベルで解析するためのツールとして、生理的な老化を反映する培養3

Dヒト筋組織の開発が必要であるが、これには3つの要素技術が必要である。すなわち、老化筋芽細胞、3Dスキャフォールド、機能評価系。上述のように我々は、ヒト筋芽細胞を線維芽細胞から誘導する独創的な技術を開発した。高齢者から得た線維芽細胞から誘導した筋芽細胞は老化しており、上記の に有用な理想的な細胞である。さらに我々は、研究開始時点で に適したスキャフォールドも開発済みであり、 も研究分担者が独自技術を開発していた。そこで本研究では、 ~ を有機的に結び付け、老化筋組織の解析に最適な培養3Dヒト筋組織を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養。

正常ヒト線維芽細胞 (HDF) は、すべて東洋紡 (Japan) および DS Pharma Biomedical (Ireland) から購入した。PLAT-GP パッケージング細胞株は Cell Biolabs (USA) から購入した。これらの細胞は、10%ウシ胎仔血清 (FBS)、100 mM 非必須アミノ酸 (NEAA)、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地で培養した。

Real time RT-PCR 解析。

RNAeasy Kit (Qiagen, Germany) を用いて、細胞から総 RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo Japan) を用いて cDNA を合成。定量的リアルタイム RT-PCR は、TaqMan Advanced Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) と TaqMan probe (Applied Biosystems) を用いて StepOnePlus real-time PCR System (Applied Biosystems) で測定・解析した。

筋芽細胞へのダイレクトリプログラミング

pMXsMyoD1 puro および pMXs L-Myc puro をパッケージング細胞 plat GP に X-treme Gene

9 regent (Roche Applied Science, Germany) を用いて導入し作成したレトロウイルスベクターをヒト線維芽細胞に感染させた。感染翌日から、5% horse serum (HS), non-essential amino acids (NEAA), 10 ng/mL IGF-1, 100 U/mL penicillin, and 100 μg/mL streptomycin を添加した DMEM 培地に交換し培養した。

dMB の 3D 培養

ダンベル型ポケットと 2 本のマイクロポストをもつデバイスを骨格筋組織の構築に使用した。2D 培養した dMB を回収し、ハイドロゲルと混合しデバイス上のダンベル型ポケットに流し込み、37 °C でインキュベートして固化させた。培地は 1 日おきに交換した。

4 . 研究成果

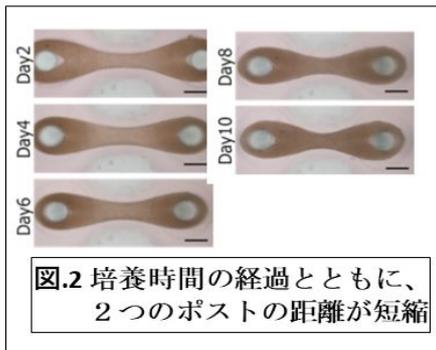


図.2 培養時間の経過とともに、2つのポストの距離が短縮

dMB の収縮能力を調べるために、dMB を 3 次元的に培養し、分化させた。組織のアンカーとしてデバイス上に 3 次元骨格筋組織を作製した。ハイドロゲル溶液と混合した dMBs を 2 本のマイクロポストを持つマイクロデバイス上に播種し、10 日間培養を行った。図 1A に示すように、マイクロポスト間には自己組織化により ribbon-shaped の組織が形成された。培養が進むにつれて、2 つのポスト間の距離は短縮した。

た。

図.2 は、2 本の支柱の間の距離を示したものである。図.3 はポスト間の距離を数値化したものである。2 日目から 4 日目にかけて距離が短縮し (2 日目 $3849.9 \pm 135.1 \mu\text{m}$ 、4 日目 $3118.0 \pm 262.2 \mu\text{m}$) 4 日目以降も 10 日目までゆっくりと減少するという結果を得た (10 日目 $2390.9 \pm 384.7 \mu\text{m}$)

dMBs とマイクロデバイスを組み合わせることで、3D 培養骨格筋組織を構築することができたので、組織形成中の骨格筋関連遺伝子 (MYOG、CKM、MYH3、MYH6 遺伝子) の発現量を 2D で培養した細胞

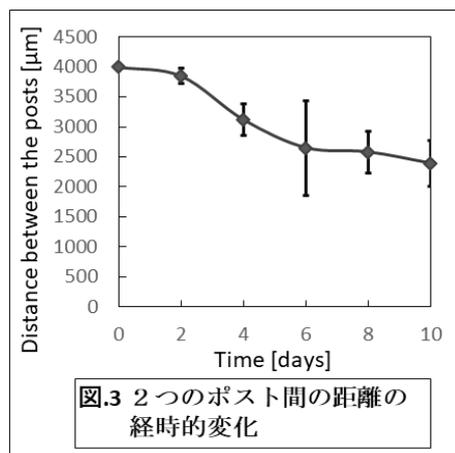


図.3 2つのポスト間の距離の経時的变化

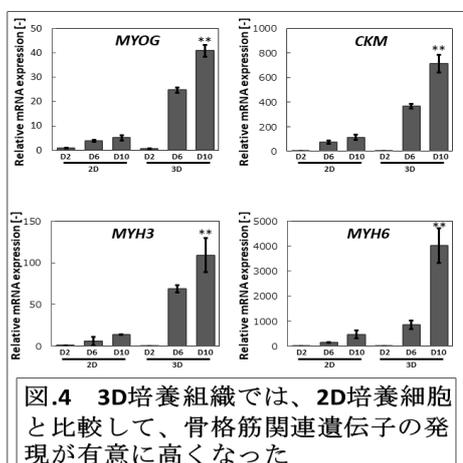


図.4 3D培養組織では、2D培養細胞と比較して、骨格筋関連遺伝子の発現が有意に高くなった

と、3D で培養した組織において定量的 RT-PCR を用いて測定し比較検討した。

図.4 のように 4 つの遺伝子の発現量は、3D、2D とともに培養日数に伴って増加した。培養 2 日目にはすべての遺伝子の発現が、2D 培養細胞と 3D 培養組織の間に有意差はなかったが、10 日目にはすべての遺伝子について、3D 組織の発現量が 2D 細胞の発現量より有意に高くなった。

次に、構築した三次元組織が電気刺激にตอบสนองして収縮する機能を有するかどうかを検討した。0、4、6、8、10日目に、30Hzの電気刺激を組織に与え、マイクロポストの変位を測定し、収縮力を算出した。図.5に示すように、作製した3次元組織は収縮能を有し、発生する力は培養日数に応じて増強した。4日目に $1.6 \pm 1.8 \mu\text{N}$ 、6日目に $4.7 \pm 3.4 \mu\text{N}$ 、8日目に $9.7 \pm 4.6 \mu\text{N}$ 、10日目に $12.2 \pm 5.3 \mu\text{N}$ が発生した。

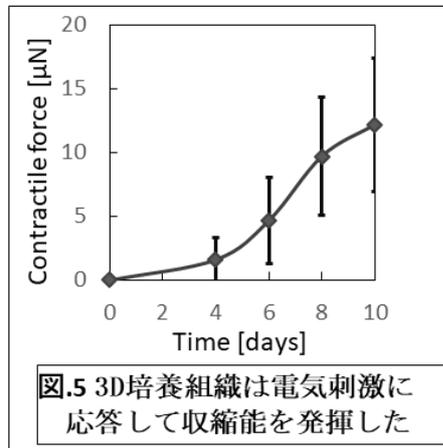


図.5 3D培養組織は電気刺激にตอบสนองして収縮能を発揮した

また、10日目の組織の収縮特性を、1 Hzと30 Hz

で5秒間電気刺激を加えることにより評価した。図.6に示すように、1 Hzでは瞬発的な収縮反応 (twitch)、30 Hzではより持続的な収縮 (tetanus) が観察された。

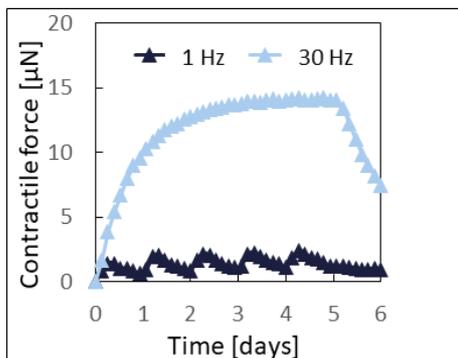


図.6 3D培養筋組織は30 Hzの連続電気刺激に対してtetanusを呈する

10日目の組織を用いた α -アクチニンの免疫蛍光染色により、筋組織には、図.7のようにサルコメア構造を持つ筋管が含まれていることがわかった。

このように、本研究では当初の目的を達成し、従来よりも優れた骨格筋組織の培養方法を確立すること

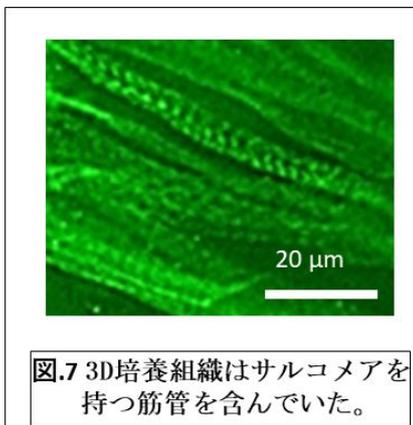


図.7 3D培養組織はサルコメアを持つ筋管を含んでいた。

に成功し、得られた骨格筋組織が高い機能を有することを確認できた。(Shimizu K, Kishida T, et al. J Biosci Bioeng. 2020)

本法で作成した骨格筋組織は、筋老化や筋肉の再生に関する基礎研究のツールとしてのみならず、移植用の骨格筋組織を供給することも期待できるので、外傷や様々な骨格筋組織欠損に対して、新しい有効な再生医療法に繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Maniwa J, Fumino S, Kimura K, Tanaka T, Higashi M, Kishida T, Mazda O, Tajiri T.	4. 巻 54(12)
2. 論文標題 Novel mesenchymal stem cell delivery system as targeted therapy against neuroblastoma using the TH-MYCN mouse model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pediatr Surg.	6. 最初と最後の頁 2600-2605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpedsurg.	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 Inoue Y, Kishida T, Kotani SI, Akiyoshi M, Taga H, Seki M, Ukimura O, Mazda O.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Direct conversion of fibroblasts into urothelial cells that may be recruited to regenerating mucosa of injured urinary bladder.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13850
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50388-6.	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 Shimizu K, Ohsumi S, Kishida T, Mazda O, Honda H.	4. 巻 129(5)
2. 論文標題 Fabrication of contractile skeletal muscle tissues using directly converted myoblasts from human fibroblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biosci Bioeng.	6. 最初と最後の頁 632-637.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.	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 Sowa Y, Kishida T, Louis F, Sawai S, Seki M, Numajiri T, Takahashi K, Mazda O.	4. 巻 10(3)
2. 論文標題 Direct Conversion of Human Fibroblasts into Adipocytes Using a Novel Small Molecular Compound: Implications for Regenerative Therapy for Adipose Tissue Defects.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10030605.	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 Sowa Y, Kishida T, Tomita K, Adachi T, Numajiri T, Mazda O.	4. 巻 146(6)
2. 論文標題 Reply: Involvement of PDGF-BB and IGF-1 in Activation of Human Schwann Cells by Platelet-Rich Plasma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plast Reconstr Surg	6. 最初と最後の頁 826e-827e
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PRS.00000000000007407.	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 Shimomura S, Inoue H, Arai Y, Nakagawa S, Fujii Y, Kishida T, Shin-Ya M, Ichimaru S, Tsuchida S, Mazda O, Takahashi K	4. 巻 101574
2. 論文標題 Mechanical stimulation of chondrocytes regulates HIF-1 under hypoxic conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Cell.	6. 最初と最後の頁 1016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2021.101574.	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 Mori D, Tsujikawa T, Sugiyama Y, Kotani SI, Fuse S, Ohmura G, Arai A, Kawaguchi T, Hirano S, Mazda O, Kishida T	4. 巻 149(12)
2. 論文標題 Extracellular acidity in tumor tissue upregulates programmed cell death protein 1 expression on tumor cells via proton-sensing G protein-coupled receptors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Cancer.	6. 最初と最後の頁 2116-2124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33786.	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 Kaihara K, Nakagawa S, Arai Y, Inoue H, Tsuchida S, Fujii Y, Kamada Y, Kishida T, Mazda O, Takahashi K.	4. 巻 22(8)
2. 論文標題 Sustained Hypoxia Suppresses Joint Destruction in a Rat Model of Rheumatoid Arthritis via Negative Feedback of Hypoxia Inducible Factor-1 .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 3898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22083898.	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 Sawai S, Kishida T, Kotani SI, Tsuchida S, Oda R, Fujiwara H, Takahashi K, Mazda O, Sowa Y.	4. 巻 Oct 15
2. 論文標題 ALK5 i II Accelerates Induction of Adipose-Derived Stem Cells toward Schwann Cells through a Non-Smad Signaling Pathway.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells Int.	6. 最初と最後の頁 8307797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/8307797.	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 Kamada Y, Toyama S, Arai Y, Inoue H, Nakagawa S, Fujii Y, Kaihara K, Kishida T, Mazda O, Takahashi K.	4. 巻 42(3-4)
2. 論文標題 Treadmill running prevents atrophy. differently in fast- versus slow-twitch muscles in a rat model of rheumatoid arthritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Muscle Res Cell Motil.	6. 最初と最後の頁 429-441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10974-021-09610-0.	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 Nakai K, Yamamoto K, Kishida T, Kotani SI, Sato Y, Horiguchi S, Yamanobe H, Adachi T, Boschetto F, Marin E, Zhu W, Akiyoshi K, Yamamoto T, Kanamura N, Pezzotti G, Mazda O.	4. 巻 3;9
2. 論文標題 Osteogenic Response to Polysaccharide Nanogel Sheets of Human Fibroblasts After Conversion Into Functional Osteoblasts by Direct Phenotypic Cell Reprogramming.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Bioeng Biotechnol .	6. 最初と最後の頁 713932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2021.713932.	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2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大隅早紀、清水一憲、岸田綱郎、松田修、本多裕之
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングで誘導した筋芽細胞を用いた三次元組織の構築と機能評価
3. 学会等名 再生医療学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸田綱郎、松田修
2. 発表標題 ダイレクトコンヴァージョン誘導筋芽細胞を用いた3D組織の構築と機能評価
3. 学会等名 OME研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 褐色脂肪細胞及びその調整方法	発明者 岸田綱郎、松田修	権利者 京都府立大学 法人
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2013/069226	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 細胞の調整方法	発明者 山本健太、岸田綱郎、素輪善弘、山本俊郎、松田修	権利者 京都府立大学 法人
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2016/081187	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 尿路上皮細胞への誘導剤及び尿路上皮細胞の誘導方法	発明者 井上裕太、浮村理、岸田綱郎、松田修	権利者 京都府立大学 法人
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/032644	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	新井 祐志 (Arai Yuji) (50347449)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	清水 一憲 (Shimizu Kazunari) (70402500)	名古屋大学・工学研究科・准教授 (13901)	

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