

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09766

研究課題名（和文）筋容積損失治療を指向したスキャホールドフリー・生体模倣立体筋組織体の創出

研究課題名（英文）Development of Scaffold-Free Biomimetic Three-Dimensional Muscle Tissue for Treatment of Volumetric Muscle Loss

研究代表者

北口 陽平（Kitaguchi, Yohei）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40897188

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）：今回の我々の研究では外傷や腫瘍の切除などで生じる筋肉の損失を回復させることを目的として筋肉のもととなる筋芽細胞を用いた培養筋肉を作成し筋肉の欠損したマウスに移植し評価を行った。培養筋肉は特殊な培養皿コーティング剤とシリコン製の制御材を用い細胞自身が凝集し一塊をなす性質を利用することで足場素材を用いずに作成した。これをマウスに移植すると筋肉欠損部の凹みを埋めるように生着したが筋力の回復には至らなかった。足場素材を用いない培養組織形成法は様々な分野で応用できる可能性があるが、効率的な筋力の回復には用いる細胞や移植の方法にさらなる工夫が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来三次元培養組織は足場素材を用いる場合が多く移植の際には足場素材に起因する異物反応などに配慮する必要があった。足場素材を用いない場合形状の制御が困難であり、単層の細胞シートや小球状のスフェアを形成するにとどまっていた。本研究で開発した培養組織の形成法は種々の細胞に対して応用可能であり、足場素材を用いないという特性から異物反応の心配なく組織再生を促す手法として発展が期待される。また本研究で作製した培養筋組織の移植は筋力の回復にまでは至らなかったが、これは筋芽細胞株単体での組織再生の限界を示唆している可能性があり、今後の筋再生医療発展の礎になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to restore muscle loss caused by trauma or tumor resection by generating cultured muscle tissue using myoblasts. These cultured muscles were transplanted into muscle-deficient mice for evaluation. The cultured muscle was created without the use of scaffold materials by employing a special culture dish coating and silicone control material, leveraging the cells' inherent property to aggregate and form clumps. Upon transplantation into mice, the cells successfully filled the muscle defects but did not restore muscle strength. Although the scaffold-free tissue formation method shows potential for various applications, further innovations in cell selection or transplantation techniques are necessary for efficient muscle strength recovery.

研究分野：再生医療、組織工学、乳房再建、マイクロサージャリー

キーワード：Volumetric Muscle loss 筋容積損失 筋肉再生医療 組織工学 再生医療 自己凝集 三次元培養

1. 研究開始当初の背景

筋容積損失 (volumetric muscle loss, VML) は骨格筋が高度に損傷を受けた際に起こる筋容積の減少、筋力低下であり、海外を中心に再生医療による治療が研究されている。本邦ではまだ認識の薄い疾患であるが、交通外傷や悪性腫瘍切除により発症することがあり生活の質を著しく落とすこととなる。海外では主に足場材料に筋芽細胞などを付加した再生材料の移植が行われ一定の効果を得ているが、課題はまだ多い。

我々は足場材料を用いずに組織塊を作製する研究を行っており、この技術を用いて細胞密度の高い三次元筋組織を作製し、動物モデルに移植することでより効果的な筋組織の再生を目指すのが本研究の目的である。また本研究により得られる成果は筋組織の再生に関するメカニズムの解明につながるだけでなく、他の筋原性疾患の解析や治療にも応用できる可能性があると考えられる。また本研究で用いる三次元組織体の作製法は筋組織以外にも幅広い組織に適応することができると思われる。

2. 研究の目的

本研究の目的は足場材料を用いずに高細胞密度の三次元筋肉組織を作製し、VML の治療に有効かどうかを検証することである。このような足場材料を用いない再生筋組織を用いた VML の治療モデルはこれまでほとんど報告されていない。足場材料を用いないことで異物による瘢痕形成を避けることができ、また移植する組織内の細胞密度が高まることでより効果的な筋組織の再生につながると期待している。

三次元筋肉組織の作製では研究分担者の岩井が開発した自己凝集誘導技術 (Cell self-aggregation inducible Technology: CAT) を用いることで足場材料や他の動物由来の成分を用いずにシート状の細胞凝集塊を作製する。本技術は細胞の自己凝集を利用しており、単純な細胞シートに比べ厚みのある組織体の作製が可能であり、凝集塊の大きさや形状の制御が可能である点が他の細胞シートとの違いである。本研究により筋組織修復のメカニズムの解明を行うとともに CAT を用いて作製した三次元組織の特徴も明らかにすることができる。

また本実験で作製する三次元筋組織は VML の治療だけでなく、ほかの筋力低下を来す疾患の治療にも利用できる可能性がある。また本研究で用いる三次元組織の作製法は筋組織だけでなく、様々な細胞腫に適用することが可能である。本研究でのノウハウをもとに今後多種多様な三次元組織の作製が可能になると考える。

3. 研究の方法

筋芽細胞を用いたバンド状筋組織の作製と評価

培養部屋として培養皿の表面にシリコン板をくり抜いて作製した角丸長方形の型枠を貼付し、型枠内に細胞凝集制御材 (アンカー) を置く。シリコンのモールド内に CAT 用のコーティングを行ったのち、C2C12 細胞 (マウス筋芽細胞株) を播種することで凝集を誘導しバンド状の細胞凝集塊を作製した。CAT 濃度や細胞の播種密度を変更することで適切に凝集する条件を検討した。

バンド状筋組織の ex vivo 移植

ラット皮下にシリコンシートを挿入し 3 週間後に周囲に形成された被膜ごと採取することでこれを ex vivo 移植の足場とした。この被膜をエタノール処理したものに作成したバンド状筋組織を移植し、その後の経過を観察した。サンプルは組織切片を作成し HE 染色、抗アクチン染色抗体による免疫染色を行い評価した。

マウス VML モデルの作成とバンド状筋組織の移植

免疫不全マウスの前脛骨筋を種々の割合で切除しその後の筋組織の再生を観察することで VML モデルを作成するのに適切な切除量を決定した。次にこの VML モデルの前脛骨筋の欠損部ににて作製したバンド状筋組織を移植し無移植のコントロールとともに筋力測定を行い比較した。筋力測定では腓骨神経を神経刺激装置で刺激することで前脛骨筋の筋収縮を誘発し足関節の屈曲運動の強さをトルクセンサーにて検出した。

4. 研究成果

筋芽細胞を用いたバンド状筋組織の作製と評価

マウス筋芽細胞株 (C2C12) を用いバンド状の凝集塊を作成する方法論の開発を行った。具体

的にはまず角丸長方形のシリコン製の枠を培養皿に貼付し内部にシリコン製の小柱を 2 つ設置した。次いでこのシリコン枠内に CAT 用のポリマー液をコーティングし、同部に C2C12 をコンフルエントに播種し培養を行った。と細胞はいったんコーティング状に接着し細胞シートを形成した後に辺縁より剥離・凝集をはじめ、12 時間程度でシリコン製の小柱に引っかかる形でバンド状の凝集塊を形成した。ポリマーのコーティング濃度が $80\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、細胞播種密度が $1.0 \times 10^6 \text{ cells}/\text{cm}^2$ の条件で適切に凝集が生じることが確認された。特に細胞密度が低い場合には凝集時に細胞シートに穴が開き構造が破綻してしまうことが分かった。筋組織のバンドはこの後も培養を続けると組織の凝集力により支柱に引っかかっている部分が破綻してしまうためこの時点での移植が適切であろうと考えられた。

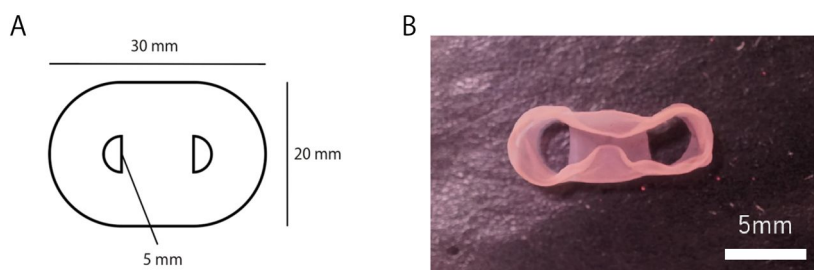


図 1 CAT を用いたバンド筋組織の作製
(A) 使用したシリコンモールドのデザイン。(B) 凝集後のバンド状筋組織

バンド状筋組織の ex vivo 移植

で作製したバンド状凝集塊の生体内での生着、成熟過程を模倣するために生体内で誘導したシリコン被膜へ移植する ex vivo 実験を行った。ラット背部皮下に 1mm 厚のシリコンシートを移植し 3 か月後に取り出すと周囲にコラーゲン性の被膜を生じていた。これをエタノール処理したものにバンド状凝集塊を移植すると 30 分程度で被膜に接着し、その後 2 週間ウマ血清を含有した分化培地で培養を行うと接着した凝集塊は結節状に再凝集した。組織切片を作成するとコラーゲン性の被膜上に凝集塊が接着しており抗 アクチニン抗体で免疫染色すると多核の筋管細胞形成を確認できた。このことから作成した筋芽細胞バンドは生体内に移植した際に移植部にとどまり、分化、成熟する能力を持つ可能性が示唆された。

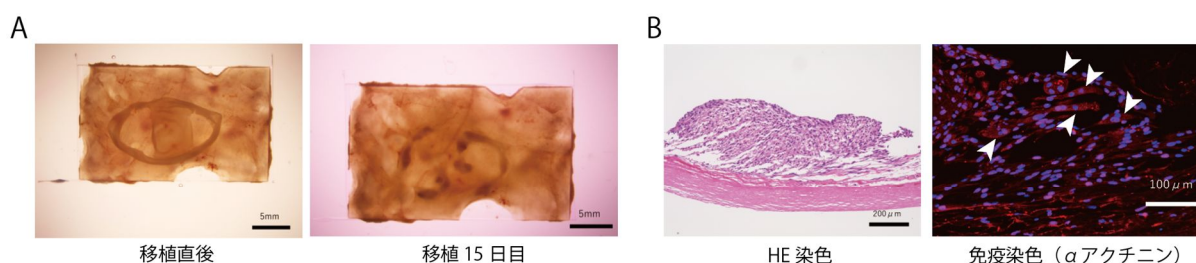


図 2 バンド状筋組織の ex vivo 移植
(A) 被膜上にバンド状筋組織を移植後 (左移植直後、右移植 15 日目)。
(B) 組織所見 (左 HE 染色、右 α アクチニン染色)

マウス VML モデルの作成とバンド状筋組織の移植

免疫不全マウスにおいて前脛骨筋の中央 1/3 において 0-80% の断面割合で筋切除を行い、1 か月後と 2 か月後に組織切片を作成し前脛骨筋の断面積の計測を行った。20%、50% 切除の条件では切除を行っていないものと大きな差は認めなかったのに対し 80% 切除の条件では 4 - 5 割程度の断面積低下を認めていた。

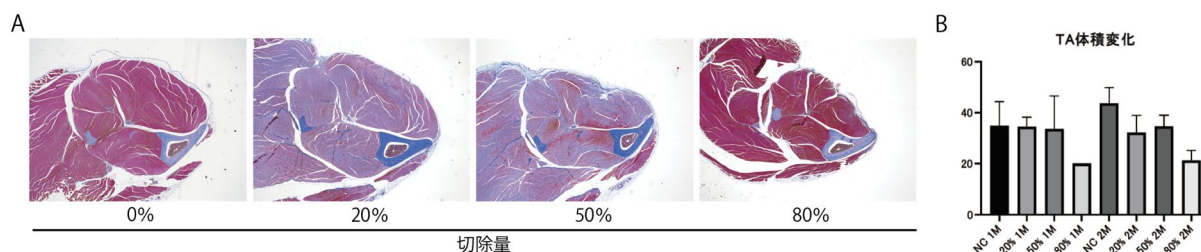


図 3 マウス前脛骨筋の切除量に応じた断面積変化
(A) 切除後 2 か月におけるマッソントリクローム染色 (B) 切除量と時間経過による前脛骨筋断面積の変化

続いて作成した VML モデルへのバンド状筋組織移植を行った。前脛骨筋の切除を行っていないコントロール群と切除のみ群、切除後にバンド状筋組織を移植した移植群を作成し、術直後、1 か月、2 か月時点での足関節背屈の筋力を測定した。結果はコントロールが最も筋力が高く、移植群は筋力の改善を認めなかった。移植部は切除のみ群では筋萎縮を認めていたが、移植群ではむしろ過形成であった。この結果から今回作成したバンド状筋組織は筋容積の損失自体は補える可能性があるが、現状効率的な筋力向上には寄与していないことが示唆された。

今回用いた C2C12 は筋芽細胞株であり、生体に移植するには増殖性が高すぎた可能性がある。株化細胞は細胞数の調整がしやすいため基礎実験においてよく用いられており今回の研究でも採用したが、自家筋組織から単離した筋芽細胞を用いた検討は今回の研究では行っていない。今後は細胞源や移植組織量などを調整することでより効率的に筋再生に寄与できる条件を検討したいと考える。

A



B

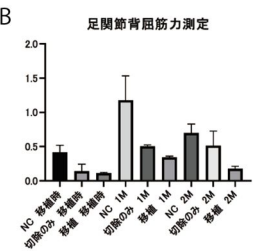


図4 VMLモデルマウスへのバンド状筋組織移植

(A) 左：前脛骨筋切除時、中：移植したバンド状筋組織、右：移植後の様子 (B) 移植後の各条件での足関節背屈筋力

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ota Tomoyuki, Iwai Ryosuke, Kitaguchi Yohei, Takarada Takeshi, Kimata Yoshihiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Fabrication of scaffold-free mesenchyme tissue bands by cell self-aggregation technique for potential use in tissue regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1748-605X/ac9c7f	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 Ota, T. Takao, T. Iwai, R. Moriwaki, T. Kitaguchi, Y. Fujisawa, Y. Yamada, D. Kimata, Y. Takarada, T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Fabrication of shape-designable cartilage from human induced pluripotent stem cell-derived chondroprogenitors using a cell self-aggregation technique	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1748-605X/ad02d1	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 太田智之、高尾知佳、岩井良輔、山田大祐、北口陽平、木股敬裕、宝田剛志
2. 発表標題 形成外科領域への応用を目指したスキャフォールドフリー三次元培養軟骨の開発
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田智之、高尾知佳、岩井良輔、山田大祐、北口陽平、森脇健司、中村正裕、大首根達則、木股敬裕、宝田剛志
2. 発表標題 自己凝集化技術を応用した形状型スキャフォールドフリー三次元培養軟骨の開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoyuki Ota, Tomoka Takao, Daisuke Yamada, Ryosuke Iwai, Takeshi Moriwaki, Yohei Kitaguchi, Yoshihiro Kimata, Takeshi Takarada
2. 発表標題 Preparation of scaffold-free tissue-engineered 3D cartilage construct for application in facial plastic surgery
3. 学会等名 Plastic Surgery the Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北口陽平、太田智之、高尾知佳、岩井良輔、山田大祐、藤原祐樹、大曾根達則、森脇健司、中村正裕、木股敬裕、宝田剛志
2. 発表標題 形成外科領域における細胞自己凝集化技術を用いたスキャフォールドフリー三次元軟骨培養法の開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北口陽平、太田智之、高尾知佳、岩井良輔、山田大祐、大曾根達則、木股敬裕、宝田剛志
2. 発表標題 無糖培地による培養軟骨移植時の内軟骨性骨化抑制法の開発
3. 学会等名 第66回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北口陽平、太田智之、高尾知佳、岩井良輔、藤澤祐樹、山田大祐、大曾根達則、木股敬裕、宝田剛志
2. 発表標題 無糖培地を利用した内軟骨性骨化抑制法の開発
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田智之、高尾知佳、岩井良輔、山田大祐、北口陽平、木股敬裕、宝田剛志
2. 発表標題 形成外科領域への応用を目指したスキャフォールドフリー三次元培養軟骨の開発
3. 学会等名 第34回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2022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	森脇 健司 (Moriwaki Takeshi) (50707213)	弘前大学・理工学研究科・准教授 (11101)	
研究分担者	岩井 良輔 (Iwai Ryosuke) (60611481)	岡山理科大学・フロンティア理工学研究所・講師 (35302)	
研究分担者	太田 智之 (Ota Tomoyuki) (90869140)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	

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