

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月1日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791879

研究課題名（和文）舌・咀嚼筋組織の早期再生を可能にする骨格筋移植体作製技術の開発

研究課題名（英文）Development of cell-based skeletal muscle graft materials for the tongue and masticatory muscle tissue engineering

研究代表者

小林 宗正（KOBAYASHI MUNEMASA）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70467588

研究成果の概要（和文）：骨髄由来間葉系間細胞から骨格筋細胞を誘導する技術は骨格筋の再生医療に寄与する。本研究により、周期的伸展刺激を与えることで骨髄由来間葉系幹細胞から配向構造を有する骨格筋細胞を効果的に誘導可能であることが明らかとなった。また、配向後に伸展刺激の振幅を増加することにより、配向した細胞をシート状に回収可能であることを見出した。この周期的伸展刺激を用いた簡易な方法は、生体組織の構造を模倣した細胞移植材料の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The skeletal myogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) offers great therapeutic promise. This research project proposes a simple method for accelerating the skeletal myogenesis of BMSCs with an aligned structure by applying cyclic strain. In addition, increasing the amplitude of the stretching device after cell alignment allowed us to obtain aligned cells as a cell sheet. This simple method based on cyclic strain may facilitate the development of a cell-based implant material that displays an in vivo-like pattern of organization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯科補綴学一般・幹細胞・組織工学・骨格筋

## 1. 研究開始当初の背景

舌、咀嚼筋組織は補綴歯科治療において非常に重要な役割を有しており、欠損により患者のQOLに大きな影響をおよぼす。生体内および、生体外において組織や臓器を形成する工学的な技術であるTissue Engineeringは、舌、咀嚼筋組織の再生において、低侵襲による再建およびquality of life (QOL)の回復

を可能にする技術として期待されている(Langer R, Vacanti JP, Science, 1993)。

細胞移植を用いた舌組織の再生に向けたアプローチはすでに始まっているが、これまでの方法では移植された細胞の分化誘導には、主に生体内移植部周囲の“場(ニッチェ)”における組織の潜在的な再生力に頼っているため、広範囲欠損の場合には細胞が成熟し

た筋線維にまで分化しない可能性が考えられる。また、移植細胞として筋組織から分離培養した筋芽細胞を使用しており、臨床応用の場合、患者の筋組織の採取が必要なため、外科的侵襲が生じてしまう。

そこで本研究代表者は、患者の侵襲が少なく、採取が比較的容易、安全である骨髄由来間葉系幹細胞に着目し、この細胞に生体内の環境を模倣した伸展刺激を与えることで、早期に効率的に一方に配向した筋管細胞に分化誘導させる技術を確認したいと考えた。

また、生体内の骨格筋組織は一方に配向していることから、生体外 (in vitro) で予め配向した骨格筋組織をシート状に播種して積層させれば、生体内骨格筋に類似した骨格筋組織移植体が作製できる可能性に着目した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内の骨格筋を模倣した骨格筋組織移植体を効率的に作製し、早期かつ広範囲の骨格筋再建を図ることである。

そのために、以下の項目を明らかにすることを試みた。

(1) 間葉系幹細胞の骨格筋細胞への分化誘導における反復伸展刺激の有効性を明らかにする。

(2) 骨格筋配向細胞をシート状にして回収し、これを積層する技術を確認する。

(3) 骨格筋組織欠損部への骨格筋細胞移植体の有効性を明らかにする

## 3. 研究の方法

(1) 間葉系幹細胞の筋系細胞への分化誘導における反復伸展刺激の有効性の検討

C57BL/6 マウスの大腿骨内腔より取り出した骨髄細胞から間葉系幹細胞を分離培養した。さらに、単一細胞株を樹立する目的で、初代間葉系間細胞を長期継代培養することで自然不死化を誘発した。この不死化細胞群からシリンドー法および限界希釈法を用いた細胞クローニングによって単一細胞株を作製した。これらの細胞株の中で、著明な骨および脂肪分化が確認された多分化能細胞株を実験に使用した。

間葉系間細胞の骨格筋分化誘導には、Muguruma らの報告(Muguruma Y, Exp Hematol, 2003)にある培地を用いた。

細胞に反復伸展刺激を与えるための細胞伸展装置をカスタムメイドで作製した(図1)。この細胞伸展装置では、細胞培地中に設置されたシリコンシートの両端がクランプで挟まれている。この片方のクランプは固定され、もう一方のクランプが付属のモーターによ

って一軸方向に牽引を繰り返すことにより、シリコンシート上に播種した細胞に対して周期的伸展刺激が加えられる構造になっている。



図1 細胞伸展装置

シリコンシート上に間葉系間細胞を播種し、骨格筋分化誘導培地中にて 10%, 0.17 Hz (10 回/1 分) の周期的伸展刺激を与え、骨格筋分化を骨格筋細胞分化に特異的な遺伝子発現 (RT-PCR 法) および蛋白質発現 (免疫染色法) について検討した。

(2) 骨格筋配向細胞シートの作製およびその積層化

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に増殖培地中で 10%, 0.17 Hz の周期的伸展刺激を与えて細胞を配向させ、振幅を 15% に上げることで、配向した細胞をシリコンシートから剥離させ、シート状の細胞を CellShifter® (セルシード社、東京) を用いてコラーゲンスポンジ上に 6 枚積層した (図2)。この試料から組織切片を作製し、HE 染色にてその構造を観察した。

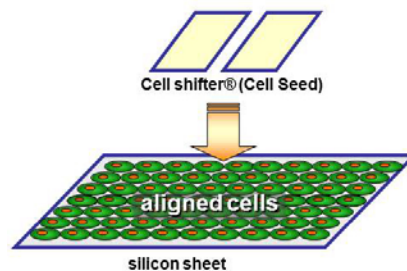


図2 骨格筋配向細胞シートの作製

(3) 骨格筋組織欠損部への骨格筋細胞移植体の有効性の検討

10 週齢マウスの背筋にバイオプシーパンチを用いて直径約 5mm の欠損を形成し、積層した細胞シートを移植した。今後、移植数週間後の欠損部組織を摘出し、組織学的な観察を行う予定である。

## 4. 研究成果

(1) 間葉系幹細胞の骨格筋細胞への分化誘導における反復伸展刺激の有効性

### ①細胞配向

周期的伸展環境下でマウス間葉系間細胞を48時間培養した結果、細胞および細胞骨格であるアクチン線維は伸展方向に対して並行に一様に配向した(図3)。一方、静的培養細胞では、細胞およびアクチン線維の配向は観察されなかった。

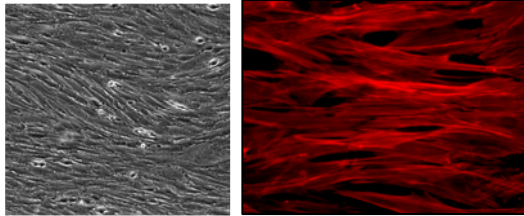


図3 水平方向の伸展刺激による間葉系間細胞の配向。左図：位相差顕微鏡像。右図：アクチン線維のファロイジン染色像。

### ②骨格筋分化

RT-PCR解析の結果、周期的伸展刺激はMyf5, myogenin, MRF4の遺伝子発現を促進した。静的および周期的伸展培養におけるマウス間葉系間細胞のMyoD遺伝子および平滑筋特異的遺伝子myocardinの発現は認めなかった。周期的伸展培養条件下における平滑筋特異的遺伝子 $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)遺伝子の発現は、静的培養の場合よりも低かった。また、周期的伸展刺激はTension-induced / inhibited proteins-1 (TIP1) 遺伝子発現を促進し、TIP3 遺伝子の発現を抑制した。また、周期的伸展刺激はGlucose-regulated protein 78 (BIP/GRP78)の遺伝子発現を経時的に促進した(図4)。

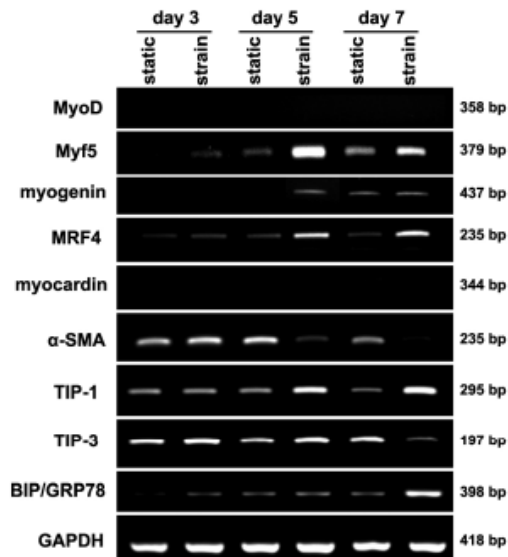


図4 伸展刺激による間葉系間細胞の骨格筋関連遺伝子発現。static：静的培養。strain：伸展刺激培養。

また、リアルタイム RT-PCRの結果、周期的伸展培養5, 7日後におけるMyf5およびMRF4の遺伝子発現は、静的培養の場合と比較して有意に増加した(図5)。

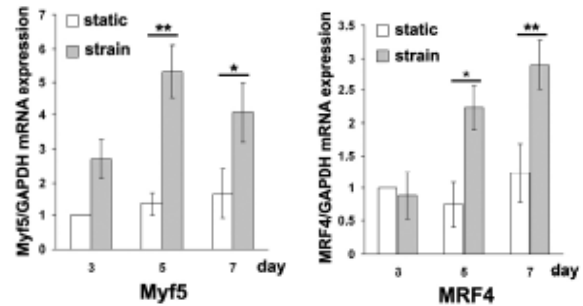


図5 周期的伸展刺激がマウス間葉系幹細胞のMyf5およびMRF4の遺伝子発現に及ぼす影響(リアルタイム RT-PCR解析)。

静的および周期的伸展培養5日後の細胞を、骨格筋関連タンパク質myogeninおよびmyosinで免疫蛍光染色した結果、周期的伸展培養細胞は静的培養細胞と比較して、これらのタンパク質を強く発現している像が観察された。

以上の結果から、10%、0.17 Hzの周期的伸展刺激は、マウス間葉系間細胞を伸展方向に配向し、骨格筋特異的遺伝子およびタンパク質の発現を促すことにより骨格筋分化を促進することが明らかとなった。

### (2) 骨格筋配向細胞シートの作製およびその積層化

C2C12細胞に増殖培地中で10%、0.17 Hzの周期的伸展刺激を与えて細胞を配向させ、振幅を15%に上げることでシリコンシートからシート状で剥離することが可能であることを見出した。さらに、これをCellShifter<sup>®</sup>を用いてコラーゲンスポンジ上に6枚積層することに成功した(図6)。



図6 骨格筋配向細胞シートの剥離。左図：細胞シートをCellShifter<sup>®</sup>を用いてコラーゲンスポンジ上に移している。右図：コラーゲンスポンジにC2C12細胞シートを6枚積層した写真。

この試料から組織切片を作製し、HE染色

にてその構造を観察したところ、コラーゲンスポンジ上に細胞が積層している像が確認された（図7）。

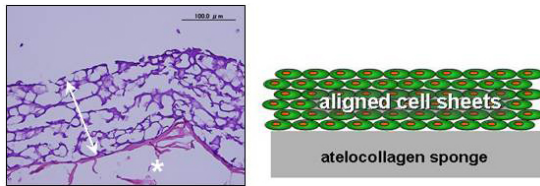


図7 積層した骨格筋配向細胞シート。左図：H E染色像（矢印：細胞層，\*コラーゲンスポンジ）。右図：模式図。

（3）骨格筋組織欠損部への骨格筋細胞移植体の有効性の検討

10週齢マウスの背筋にバイオプシーパンチを用いて欠損を形成し、積層した細胞シートを移植するモデルを作製した（図8）。

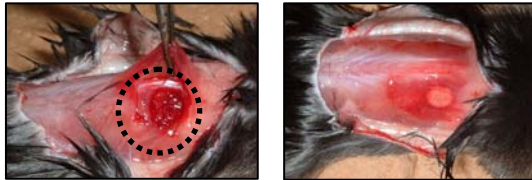


図8 積層細胞シート骨格筋移植モデル。左図：マウス背筋にバイオプシーパンチにて直径約5 mmの欠損を作製。右図：作製した欠損部位に、同直径の細胞積層シートを移植。

今後はこのモデルを用いて、移植した積層細胞シートによる骨格筋の再生を評価していく予定である。

## 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0件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 宗正 (KOBAYASHI MUNEMASA)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：70467588