

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34406  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2012～2015  
課題番号：24500521  
研究課題名(和文) 生体組織構築技術を用いたバイオ人工筋肉の開発

研究課題名(英文) Tissue-engineered skeletal muscle

## 研究代表者

藤里 俊哉 (FUJISATO, TOSHIYA)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：60270732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに得られた長さ15mm、直径0.5mmの培養骨格筋をソフトアクチュエータとして利用するため、3つの課題で研究開発を行った。1．培養骨格筋の長大化、2．屈筋-伸筋構造による屈伸運動機構の導入、3．1ヶ月間の駆動期間を目標とした体外培養機構の開発、である。その結果、1では、血管様構造を有する多孔質コラーゲンスポンジを作製し、バイオリアクターにて培養することによって大型化でき、肉眼で確認できる収縮運動を確認した。2では、培養筋と並行に電極を組み込み、電界分布を適切に制御することで、同一媒体中での培養筋駆動の可能性を示した。3では、培養液循環機構を導入することで、1ヶ月の連続培養を可能にした。

研究成果の概要(英文)：Tissue-engineered skeletal muscle for a soft actuator was investigated in three points of thickening and elongation, bend and stretch structure, and longtime application. For thickening and elongation, a collagen sponge scaffold having angiostructure was newly developed and seeded myoblasts inside were cultured by circulation bioreactor. For bend and stretch structure, controlled electric field stimulation could be applied to tissue-engineered muscle by parallel electrodes. For longtime application, circulation bioreactor could maintain the tissue-engineered muscle for more than one month.

研究分野：組織工学

キーワード：組織工学 培養骨格筋 電気刺激 スキャフォールド コラーゲン スポンジ アクチュエータ

## 1. 研究開始当初の背景

生体筋組織は、ATPをエネルギー源として駆動する柔軟、軽量、かつ高効率なアクチュエータであり、人工のアクチュエータでは得ることのできない優れた特性を有している。生体筋組織を生体外で利用する試み、すなわちバイオアクチュエータの開発は、筋構成タンパク質を利用したものから、筋細胞、そして筋組織を直接利用したものまで、幅広いレベルで行われている。しかし、ソフトアクチュエータとして広く研究されている合成高分子や形状記憶合金などの人工物とは異なり、生物素材特有の取り扱いの難しさがあるため、広く研究されてきたとは言い難い。他方、心筋梗塞などの虚血性心疾患の治療のため、増殖しない心筋細胞の代用として、骨格筋組織を利用する研究も古くから行われてきた。かつて心臓周囲に巻き付けた骨格筋を電気刺激によって心臓と同期収縮させるCardiomyoplastyなどが盛んに研究されたが、これなどは体内で骨格筋組織をアクチュエータとして利用する試みであった。現在では、患者さんから採取した骨格筋芽細胞をシート状に培養し、心筋梗塞部位に貼り付ける治療方法が臨床応用されている。このような組織工学技術、いわゆる再生医療技術が近年注目されることで、細胞から生体組織を構築したり、バイオリアクターを用いて細胞や生体組織を生体外で長期間培養したりする研究が広く行われるようになり、それらの知見や技術が急速に蓄積されつつある。

心筋組織とは異なり、骨格筋組織では前駆となる骨格筋芽細胞（筋衛星細胞）を容易に単離することができ、その増殖・分化によって筋管細胞や骨格筋細胞を得ることができる。研究代表者は、コラーゲンゲルを用いた伸張培養によって、研究開始時点で180 $\mu$ Nの収縮力を有する培養骨格筋を得ていた。本研究では、培養骨格筋を用いたバイオアクチュエータの開発を行う。このため、培養骨格筋組織の長大・強力化、モジュールへの組み込み、そして長期に渡る駆動などに取り組んだ。

## 2. 研究の目的

本培養筋作製は、体外で組織を構築する点で組織工学の手法と一致するが、組織工学での問題に、細胞を栄養する毛細血管網を構築できないことがある。それ故、体外で長期間生存できる大組織を作製できない。研究代表者が得ていた培養筋の直径は約0.5mmであるが、それすら内部の筋管細胞は表層に比べて少なく、内部は低栄養状態にあることが推測された。しかし、体内で使用しないバイオアクチュエータは、生体と同じ構造である必要はなく、生体構造にとらわれず、より太く、より長く、より長期間駆動しえる力強い培養骨格筋を得るべく、構造や作製方法、そしてバイオリアクターを用いた培養方法などを改良することを本研究の主題とした。そして、

屈伸運動を行い得るバイオアクチュエータモジュールを作製し、1ヶ月の駆動を目標とした。

アクチュエータとして機能するには、筋芽細胞の増殖・分化によって一配向性の成熟筋繊維を得る必要がある。また、測定装置へ取り付けることが難しいことから、収縮力や収縮弛緩動態などの定量評価ができない問題もあった。研究代表者らの培養筋は、コラーゲンゲルに張力を加えて培養することで筋芽細胞の成熟性および配向性を高め、さらに両端に生体組織を用いた腱様組織を複合化することで収縮力測定装置への取り付けを容易にしている。これにより、アクチュエータとして応用しやすく、かつ収縮弛緩動態の定量的評価を可能とした培養筋を作製することが可能となった。

## 3. 研究の方法

筋芽細胞としては、マウス筋芽細胞由来樹立株であり、筋管細胞への分化能を有するC2C12筋芽細胞を用いた。

### (1) 培養骨格筋の長大・強力化

培養骨格筋の強力化のため、骨格筋芽細胞から骨格筋細胞への分化に際して、電気刺激の影響について検討した。中心に直径1mmの穴をもつ直径3mm、厚さ約1.5mmのドーナツ状人工腱を、ポリカーボネート製の板状基材上に設けた13mm間隔の2本の固定ピンにシリコンシートを介して挿入した。次に、C2C12細胞を $10^7$ cells/ml含む冷却コラーゲン溶液（コラーゲンゲル培養キット、新田ゼラチン（株））を、2つの人工腱周囲およびそれらの間に塗布した。最後に、培養インキュベータ内でコラーゲンをゲル化し、培養液を加えた。最初の2日間は増殖用培養液（10%ウシ胎児血清を添加した高グルコース培地）で培養し、続く期間は分化用培養液（7%ウマ血清を添加した高グルコース培地）で培養することにより、C2C12細胞を融合・分化させ、5日間ほどで長さ約15mm、直径約0.5mmの小さなダンベル状の培養骨格筋を得た（図1）。ロードセルによって等尺性収縮力が測定できる自作の測定装置に培養骨格筋を移設し、培養液を介して単極性電気パルス刺激を与えることで、収縮弛緩特性を評価した。また、各種遺伝子発現について検討した。

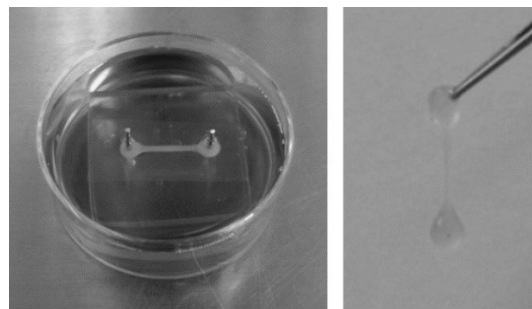


図1 培養骨格筋

また、長大化のため、血管様構造を有するコラーゲンスポンジを培養骨格筋の基材とした。可溶性コラーゲン溶液を発泡後架橋することで血管様構造を有する多孔質スポンジを作製した。作成したスポンジに筋芽細胞を注入播種し、細胞を配向させるため、細胞播種後のスポンジ両端を培養ディッシュ内のピンで固定し、長軸方向に張力を加えながら培養した。最初の2日程度は細胞増殖用培地にて培養し、続く2週間程度は細胞分化培地にて培養して筋管細胞へ分化させ、細胞生存率などを組織学的に検討した。

## (2) バイオアクチュエータの作製

生体骨格筋では自ら弛緩して伸びることはなく、収縮すると関節が曲がる屈筋と、収縮すると関節が伸びる伸筋とが拮抗的に働くことで、関節が曲げ伸ばしされる。したがって、培養筋2本を互い違いに駆動することで、効果的なアクチュエータ駆動を行うことができる。

まず、光造形装置 (ACCULAS SI-C1000、(株)ディーメック) にて作製したアクリル系光硬化性樹脂造形物の駆動実験を行った。シリコン樹脂上に、固定部と可動部となる2本のアーム (長さ13.5mm、幅2mm) を作製し、各アーム間に培養骨格筋およびシリコンゴムを取り付けた。培養筋に強縮を生じさせる電気パルス刺激を加え、その運動挙動を観察した。

次に、ゴム弾性体に代わり、培養骨格筋2本を組み込み、かつ各筋を個別に駆動し得る電気刺激システムを構築について検討した。

## (3) 体外培養機構の開発

培養骨格筋の両端を固定しつつ、培地を循環させるためのバイオリアクターを試作した。循環駆動には低流量型ペリスタポンプを使用し、流路は閉鎖系とした。培養1ヶ月後の収縮力発現について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 培養骨格筋の長大・強力化

作製した培養骨格筋の収縮弛緩特性を評価したところ、収縮力は印加電圧が高くなるにつれて、パルス幅が長くなるにつれて、そして周波数が高くなるにつれて大きくなった。骨格筋芽細胞が融合して形成された筋管細胞は、分化状態によって電気刺激に応答する閾値が異なっていると考えられる<sup>1)</sup>。印加電圧およびパルス幅が大きくなると、収縮運動に参加する筋管細胞数が増加し、収縮力が大きくなったと考えられる。生体の骨格筋では、収縮後、完全に弛緩する前に刺激が再度与えられると収縮力はより強くなり (単収縮の加重という)、さらに刺激の頻度が多くなると周期的な収縮は起こらなくなり、完全強縮と呼ばれる状態になる。培養骨格筋において電気刺激の周波数が高くなると収縮力が大きくなったのは、生体と同様に強縮が生じたため

であると考えている<sup>2)</sup>。

前述のCardiomyoplastyでは骨格筋を心臓補助に用いる前に、電気刺激を与えて筋を鍛えるトレーニングも行われていた。我々の培養骨格筋に5V、0.5Hz、パルス幅2msの電気刺激を1週間与えて培養したところ、その収縮力は刺激を加えない場合に比べて有意に増加していたことから (図2)、培養骨格筋の成熟に際して様々な刺激を加えることで、より収縮力を高めることも可能であると思われる。現在、最も強いもので、1,000  $\mu$ Nを超えるものも得ている。

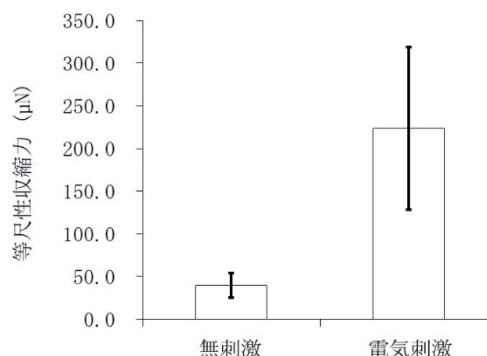


図2 電気刺激を加えて培養した培養骨格筋の収縮力 (培養9日目)

## (2) バイオアクチュエータの作製

培養筋に強縮を生じさせる電気パルス刺激を加えたところ、培養筋の収縮によって可動部アームが2°傾き、刺激を除くとシリコンゴムの張力によって元に戻った。電気パルス刺激の印加によって繰り返し駆動することが可能であった (図3)。なお、シリコンゴムがない場合は可動アームが10°傾き、刺激を除いても元には戻らなかった。シリコンゴムの弾性を変化させるなどにより、駆動角度を増減することが可能であると考えられた。生体でも骨格筋は自ら弛緩して伸びるのではなく、収縮すると関節が曲がる屈筋と、収縮すると関節が伸びる伸筋とが拮抗的に働くことで関節を曲げ伸ばししている。ここでは伸筋をシリコンゴムで代用したが、より大きな運動量を得るため、2本の培養筋を用いたバイオアクチュエータを作製中であり、培養筋と並行に電極を組み込み、電界分布を適切に制御することで、同一媒体中での培養筋駆動の可能性が示されつつある。

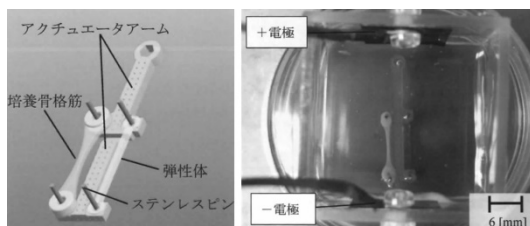


図3 培養骨格筋を組み込んだバイオアクチュエータ

### (3) 体外培養機構の開発

循環型バイオリアクターを導入することで、培養筋の長期培養が可能であった(図4)。また、培養1ヶ月後に収縮力を測定したところ、ほとんど収縮力の低下は認められなかった。

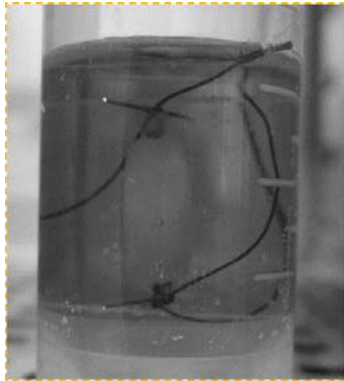


図4 バイオリアクター内の培養筋

以上、現在のところ培養骨格筋の断面積当たりの最大収縮力を計算すると、ラット生体筋の収縮力の約10分の1はあるものの、バイオアクチュエータとしての可能性を示すことができたと考える。さらに研究を進める所存である。

#### <引用文献>

- ①大西優貴、川北悠介、山崎健一、藤里俊哉、宇戸禎仁. 筋芽細胞の分化と細胞膜電位の変化. 生体医工学 2008; 46(1): 64-8.
- ②Yamasaki K, Hayashi H, Nishiyama K, Kobayashi H, Uto S, Kondo H, Hashimoto S, Fujisato T. Control of myotube contraction by electrical pulse stimulation for bio-actuator. J Artif Organs. 2009; 12(2): 131-7.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ①藤里俊哉、中村友浩、筒井博司. 培養骨格筋のバイオアクチュエータへの応用. 設計工学、査読無、2012; 48: 16-21

[学会発表] (計18件)

- ①及川裕輝、掃部貴文、藤里俊哉、筒井博司. 培養骨格筋のバイオアクチュエータへの応用. 第51回日本生体医工学会、2012年5月10~12日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)
- ②Fujisato T, Kamon T, Takagi S, Nakamura T, Tsutsui H. Tissue engineered skeletal muscle. 3rd TERMIS World Congress 2012. Sep 5-8, 2012, Vienna, Austria

- ③宮本政典、及川裕輝、高木 空、藤里俊哉、筒井博司. 骨格筋培養とバイオアクチュエータへの応用. 第27回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2013年5月23~24日、東北大学片平キャンパス(宮城県仙台市)

- ④Takagi S, Hatoma S, Kamon T, Nakamura T, Fujisato T. Effect of Electrical Stimulation of Tissue-Engineered Skeletal Muscle. TERMIS Americas Conference 2013. Nov 10-13, 2013, Atlanta, USA

- ⑤藤里俊哉. 生物由来繊維素材を用いた生体組織の再生. 平成26年度繊維学会年次大会(招待講演)、2014年6月11~13日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

- ⑥Hatoma S, Kamon T, Nakamura T, Fujisato T. Tissue-engineered skeletal muscle using collagen sponge. TERMIS-AP 2014, Sep 24-27, 2014, Daegu, South Korea

- ⑦高木 空、中村友浩、藤里俊哉. 温熱刺激が三次元培養筋の収縮機能に及ぼす影響. 第70回日本体力医学会総会、2015年9月18~20日、和歌山県民文化会館(和歌山県和歌山市)

[図書] (計1件)

- ①Fujisato T, Takagi S, Nakamura T, Tsutsui H, et al. Soft Actuators - Materials, Modeling, applications, and Future Perspectives-. Springer, 2014, 507(463-473)

[その他]

ホームページ等

大阪工業大学バイオマテリアル研究室

<http://www.oit.ac.jp/laboratory/room/152>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤里 俊哉 (FUJISATO, Toshiya)  
大阪工業大学・工学部・教授  
研究者番号: 60270732

##### (3) 連携研究者

筒井 博司 (TSUTSUI, Hiroshi)  
大阪工業大学・工学部・教授  
研究者番号: 00351453

中村 友浩 (NAKAMURA, Tomohiro)  
大阪工業大学・工学部・准教授  
研究者番号: 30217872

##### (4) 研究協力者

澤田 和也 (SAWADA, Kazuya)  
他