

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289315

研究課題名(和文) 磁性ナノテクノロジーによる骨格筋再生医療の技術基盤の創製

研究課題名(英文) Skeletal muscle tissue engineering by magnetic force-based nanotechnology

研究代表者

井藤 彰 (Ito, Akira)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60345915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋再生医療における「再生治療」と「再生研究」に有用な新規技術基盤の開発を行った。特に、我々がこれまで開発してきた先進医工学技術「磁性ナノテクノロジー」を効果的に利用し、独創的な方法論で研究展開をはかった。骨格筋は組織を形成して初めて本来の機能を発揮する。磁力を用いた組織工学技術により、電気刺激によって「動く」筋組織を作製することで、移植組織の「質」を評価する「再生治療」の評価基盤の確立を行った。また、再生治療研究として、ヒトiPS細胞の筋分化法の検討を行った。さらに、微細加工技術を組み合わせることで筋組織アレイを開発し、新規薬剤の探索を行う「再生研究」の基盤技術の確立を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a novel technology of skeletal muscle tissue engineering, designated "magnetic force-based tissue engineering (Mag-TE)", for regenerative medicine and drug discovery. The most important characteristic of skeletal muscle is force generation. We constructed three dimensional skeletal muscle tissues by Mag-TE technique and showed that the tissue-engineered skeletal muscles contracted and generated force upon electrical pulse stimulation. In the present study, 1) we explored a method of myogenic differentiation of human iPS cells; 2) we demonstrated that the contractility data is indispensable for evaluation of in vitro tissue-engineered skeletal muscle grafts; 3) we developed micro devices for high throughput screening of muscular disease drugs.

研究分野：生物化学工学

キーワード：ティッシュエンジニアリング 骨格筋 再生医療 iPS細胞 磁性ナノ粒子 薬剤スクリーニング マイクロデバイス 筋ジストロフィ

1. 研究開始当初の背景

我々はいままでに、標的分子デザインとして、細胞に特異的な抗体やリポソームで被覆した機能性磁性ナノ粒子 (図 1) を用いて、バイオターゲティングの研究を行ってきた。

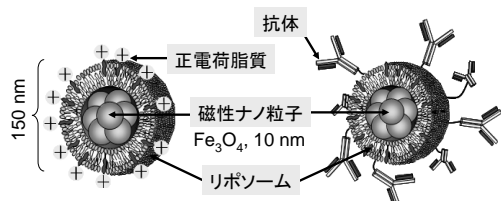


図 1 機能性磁性ナノ粒子。左) 正電荷脂質包埋型マグネタイトは、正電荷脂質の作用で静電的相互作用によって標的細胞と結合する。右) 抗体結合型マグネトリポソームは、細胞特異的な抗体の作用によって標的細胞と結合する。

我々はバイオターゲティング技術を組織工学分野へと発展させ、機能性磁性ナノ粒子で細胞を磁気標識し、磁力で細胞を積み重ねていき、磁力で保持することによる三次元培養で細胞の自己組織化を促し、三次元組織を構築する技術を開発した (図 2)。

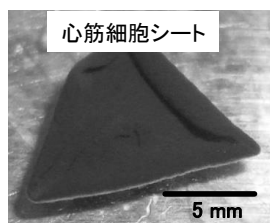
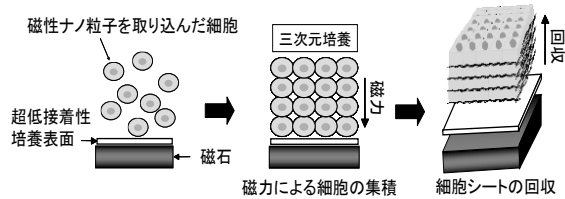


図 2 磁力による三次元組織構築法の概略。機能性磁性ナノ粒子で標識した細胞を、磁石を設置した超低接着性培養表面に播種する。細胞は、磁力により重層化された状態で保持されることで三次元細胞培養が可能となり、細胞外マトリクスの生産を誘導し、三次元組織が構築できる。作製した組織は、細胞が高密度に存在していることから、細胞間接着が重要な筋組織の構築に威力を発揮する。

培養筋芽細胞を分化誘導して、さらに「高密度」で「配向」した筋組織を作製するのは非常に困難である。我々は、磁力を用いた組織工学技術 (Magnetic force-based tissue engineering, Mag-TE) の開発により、電気刺激によって収縮運動する筋組織の作製に成功した (図 3)。

さらに申請者は、筋組織の機能を高める遺

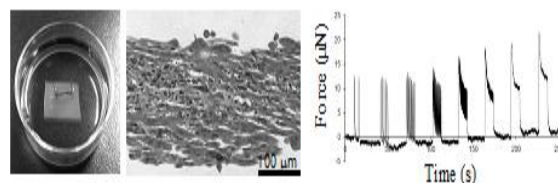


図 3 Mag-TE 法で作製した筋組織。左) 虫ピンで留めた筋組織。中央) 組織断面の顕微鏡写真。細胞が融合して配向した筋細胞が形成された。右) 周波数応答。周波数に応答して収縮し、力を発生した。

伝子を導入して分化度を高め、さらに電気刺激を繰り返して収縮運動させることで、文字通り筋肉を「鍛える」プロセスを開発して、試験管内で成熟した筋組織を構築することに成功した。

京都大学の山中伸弥教授の iPS 細胞の開発により、我が国における再生医療実用化への期待が高まっている。iPS 細胞は患者自身の細胞から誘導可能であるため、再生治療や、病気の仕組みの解明や薬の開発における再生研究に非常に有用である。今までに、患者の iPS 細胞を筋芽細胞に分化誘導する手法は検討されているが、iPS 細胞から筋芽細胞に分化誘導し、さらに筋組織を構築して、その移植組織の「質」としての収縮力を測定する一連のプロセスは確立されておらず、産業化を目指した再生医療プロセスの開発は工学者の責務である。本研究では、今までに我々が若手研究 A で 7 年間研究してきた Mag-TE 法による筋組織工学を基盤とした骨格筋再生医療プロセスの開発を行う。骨格筋組織の最も重要な機能は収縮して力を発生することである。しかしながら、今までの研究では、筋分化マーカー遺伝子を調べる生化学的検討や、免疫組織化学的検討は多く行われてきたが、それら筋機能関連の遺伝子発現および構造的特徴の集約である収縮力を指標として機能評価を行った研究は少ない。筋組織が発生する力を測定する装置の開発は、若手研究 A (平成 23-25 年度) における大きな成果であり、これを使用することで、今まで研究例のほとんどない人工筋組織の力学的評価が可能となった。この技術によって、作製した筋組織の収縮力を非破壊的に測定できることから、再生治療における移植組織の機能評価に最適であると考えられる。さらに、MEMS の専門家である名古屋大学の清水准教授による微細加工技術を組み合わせることで筋アレイを新たに開発し、ハイスループットの新規薬剤の探索を行う再生研究の基盤技術の確立を目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋再生医療における「再生治療」と「再生研究」に有用な新規技術基盤の開発を行った。特に、我々がこれまで開発してきた先進医工学技術「磁性ナノテクノロジー」を効果的に利用し、独創的な方法論で

研究展開をはかった。骨格筋は組織を形成して初めて本来の機能を発揮する。磁力を用いた組織工学技術により、電気刺激によって「動く」筋組織を作製することで、移植組織の「質」を評価する「再生治療」の評価基盤の確立を行った。さらに、微細加工技術を組み合わせることで筋組織アレイを開発し、新規薬剤の探索を行う「再生研究」の基盤技術の確立を行った。本研究では、骨格筋再生医療に貢献するだけでなく、組織工学的アプローチによる再生医療用移植筋組織の「質」を見極めるための重要な概念を創出することを目指して研究を行った。

3. 研究の方法

骨格筋の (1) 再生治療および (2) 再生研究のための各プロセスを、以下のプロセスに分けて検討を行った。

(1) 再生治療へのアプローチ

① iPS 細胞の筋芽細胞分化誘導工程

ヒト iPS 細胞[健常者由来(WT)、筋ジストロフィ患者由来(DMD)、および CRISPR/cas9 でゲノム編集してジストロフィン遺伝子が修復された筋ジストロフィ患者由来(CRISPR)]を使用して、筋芽細胞への分化誘導の検討を行った。iPS 細胞の筋芽細胞への分化は、Tanaka らの方法(Tanaka A. *et al.* *PLoS One* 2013)を基に、筋分化のマスター遺伝子である MyoD 遺伝子を iPS 細胞に誘導発現させることで行った。

② iPS 細胞の筋組織構築工程

すでに成功しているマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いた場合を基に、iPS 細胞をコラーゲンゲルとマトリゲルで包埋することで三次元組織を構築し、組織学的検証(筋細胞の染色)を行った。

(2) 再生研究へのアプローチ

① Mag-TE 法による薬剤スクリーニング系の構築

筋分化を促進すると報告のある低分子薬剤である HDAC 阻害剤[トリコスタチン A(TSA), バルプロ酸ナトリウム(VPA), 酪酸ブチル(SB), アピシジン(AP)]および脱メチル化酵素阻害剤[5-アザシチジン(5AC)]をモデル薬剤として、C2C12 細胞を使用して Mag-TE 法で作製した骨格筋組織を用いた薬剤スクリーニング法の開発を行った。

② MEMS を用いた薬剤のハイスループットスクリーニング用筋収縮力測定デバイスの開発

ハイスループットスクリーニングシステムに適合しやすく 96 ウェルプレート仕様をベースに、マイクロピラーをウェル内に設置するタイプのデバイスを作製した。96 ウェルに設置可能なマイクロピラーを PDMS で作製し、ウェル内に磁性ナノ粒子を取り込ま

せた「磁気標識細胞」(C2C12 細胞を使用)を播種した。アレイ磁石を設置することで細胞を磁気集積させて細胞シートを形成させた。細胞シートは収縮していき、設置したマイクロピラーに巻きつかせ、巻きついた組織は収縮をマイクロピラーに留められることによる張力で一定方向に配向するようにデザインした。筋分化誘導培養後、電気刺激によって筋組織を収縮させ、ピラーの変位とバネ定数から筋組織が発生した力を測定した。ここで、ピラーの径に関しては、モデル細胞であるマウス筋芽細胞株 C2C12 で作製した筋組織を用いて、100 μm を基準にいくつかの径を変えたものを作製して、最適なピラーを設計した。

4. 研究成果

(1) 再生治療へのアプローチ

① iPS 細胞の筋芽細胞分化誘導工程

ヒト iPS 細胞 (WT, DMD および CRISPR) を既存の方法で分化誘導させたところ、いずれの細胞株においても筋分化率が低く、分化して形成した筋細胞(筋管)も細かった。そこで、分化誘導培養の工程で持続的に電気刺激(electric pulse stimulation, EPS)を行いながら培養を行ったところ、筋分化率および筋管の太さを向上させることに成功した(図 4)。

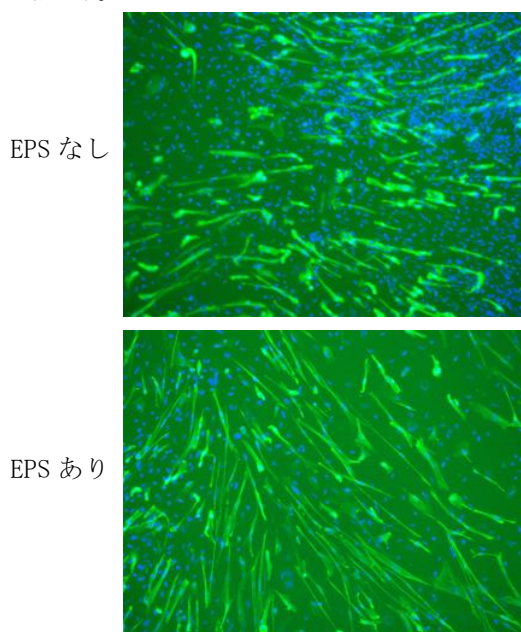


図 4 ヒト iPS 細胞の筋分化誘導における EPS の影響。分化誘導培養 day16

さらに分化率を向上させるために、低分子薬剤であるレチノイン酸 (retinoic acid, RA) を筋分化誘導中に添加することで、分化率が向上し、さらに死細胞数が減少することを見いだした(図 5)。これらの結果から、電気刺激培養およびレチノイン酸の添加は、ヒト iPS 細胞の分化誘導に有効でありことが示唆された。

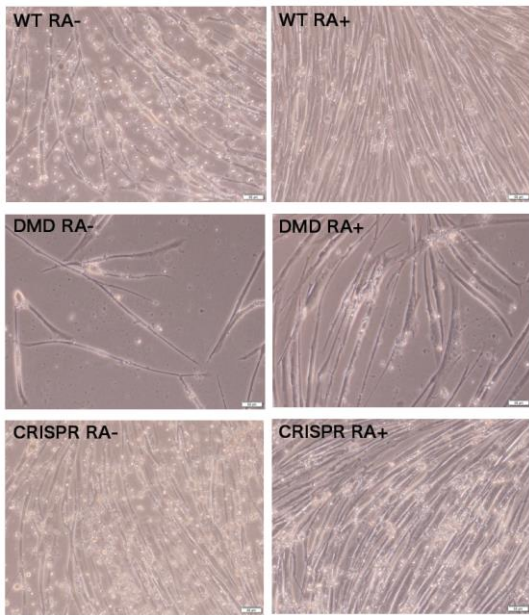


図 5 ヒト iPS 細胞の筋分化誘導における RA 添加の影響。分化誘導培養 day11

一方で、図 5 より、筋ジストロフィ患者由来 iPS 細胞の筋分化度は、健常者由来 iPS 細胞からの分化度より低く、さらにゲノム編集された iPS 細胞の筋分化度は健常者の iPS 細胞と同等であったことから、ゲノム編集技術は筋ジストロフィ治療に有用であることが示唆された。

② iPS 細胞の筋組織構築工程

iPS 細胞をコラーゲンゲルとマトリゲルで包埋することで三次元組織を構築し、筋細胞の染色 (α アクチニン染色, 緑色蛍光) を行ったところ、三次元組織内に α アクチニン陽性の筋管が観察され (図 6 上)、さらにその中の筋管に筋収縮装置であるサルコメア構造が観察された (図 6 下)。

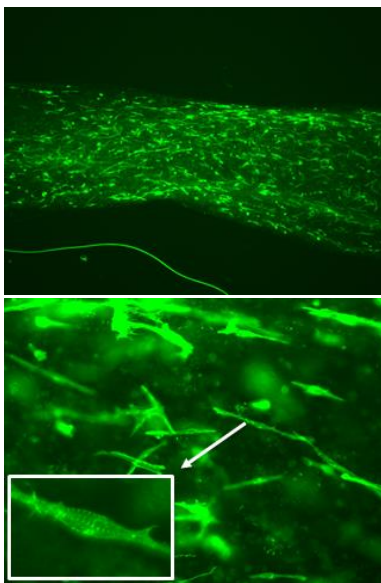


図 6 三次元組織内の筋管。上) 弱拡大画像。下) 強拡大画像。分化誘導培養 day13

(2) 再生研究へのアプローチ

① Mag-TE 法による薬剤スクリーニング系の構築

筋分化を促進すると報告のある TSA, VPA, SB, AP および 5AC をそれぞれ、C2C12 細胞を用いて Mag-TE 法で作製した骨格筋組織に添加したところ、すべての薬剤で筋分化度が向上した (図 7)。一方で、三次元筋組織が発生する収縮力を測定したところ、TSA を添加した筋組織のみで収縮力の向上がみられた (図 8)。このことは、骨格筋組織の「質」としての収縮力を測定することが重要であり、収縮力を指標とした薬剤スクリーニングの重要性が示唆された。さらに、TSA 添加による収縮力向上のメカニズム解明のため、フォリスタチン遺伝子発現に着目して調べた。TSA を添加すると C2C12 細胞はフォリスタチンを発現した。フォリスタチン遺伝子発現を siRNA でブロックすると、筋分化が抑制された。さらに、フォリスタチンを遺伝子導入して高発現させた C2C12 細胞で構成される筋組織は、収縮力の著しい向上がみられ、さらに EPS 培養によって成熟度が高まり、約 $90 \mu\text{N}$ の収縮力を発生する人工筋組織の構築に成功した。

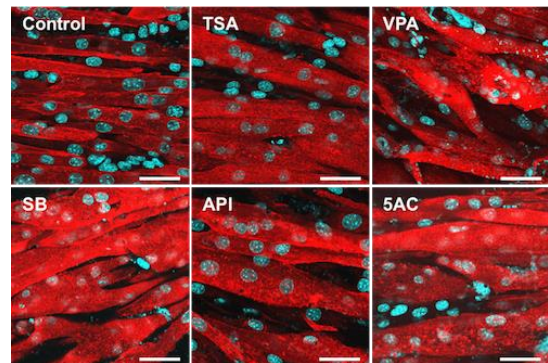


図 7 三次元筋組織の筋分化誘導における薬剤添加の影響。Control: 添加なし

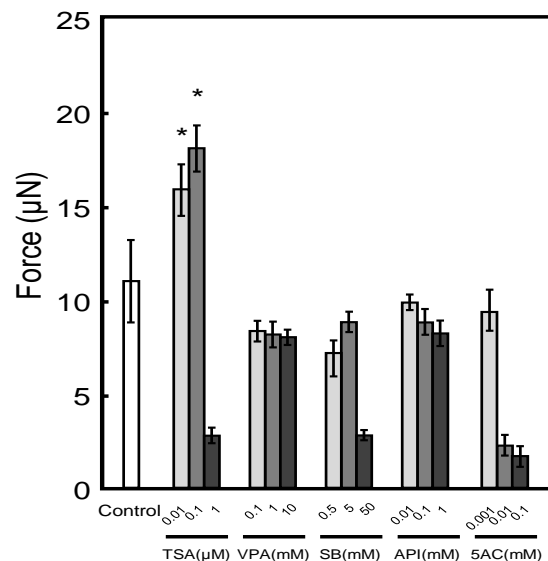
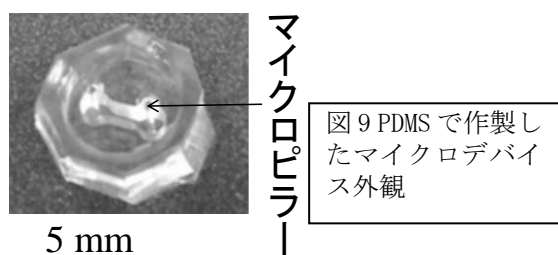


図 8 三次元筋組織の収縮力における薬剤添加の影響。Control: 添加なし

②MEMS を用いた薬剤のハイスループットスクリーニング用筋収縮力測定デバイスの開発

マイクロピラーをウェル内に設置するタイプのデバイスを作製した(図9)。デバイス内に磁性ナノ粒子を取り込ませたC2C12細胞を播種し、アレイ磁石を設置すると、細胞が集積して収縮していき、設置したマイクロピラーに巻きついた。細胞数と添加するECMの量を調節して最適化したところ、作製効率100%(8個中8個形成)で三次元筋組織を作製することに成功した。筋分化誘導培養後、電気刺激によって筋組織を収縮させ、ピラーの変位とバネ定数から筋組織が発生した力を測定したところ、28.3 μN の収縮力を発生した。



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7件)

1. Kazushi Ikeda, Akira Ito, Masanori Sato, Shota Kanno, Yoshinori Kawabe and Masamichi Kamihira, Effects of heat stimulation and L-ascorbic acid 2-phosphate supplementation on myogenic differentiation of artificial skeletal muscle tissue constructs. *J Tissue Eng Regen Med.* 査読有 in press (2017) doi: 10.1002/term.2030.
2. Kazushi Ikeda, Akira Ito, Ryusuke Imada, Masanori Sato, Yoshinori Kawabe and Masamichi Kamihira, *In vitro* drug testing based on contractile activity of C2C12 cells in an epigenetic drug model. *Sci Rep.* 査読有 7:44570 (2017). doi: 10.1038/srep44570.
3. Kazushi Ikeda, Akira Ito, Masanori Sato, Yoshinori Kawabe and Masamichi Kamihira, Improved contractile force generation of tissue-engineered skeletal muscle constructs by IGF-I and Bcl-2 gene transfer with electrical pulse stimulation. *Regen Ther.* 査読有 3, 38-44 (2016). doi.org/10.1016/j.reth.2015.12.004

- doi:10.1016/j.reth.2015.12.004
4. Masanobu Horie, Akira Ito, Takeshi Maki, Yoshinori Kawabe, and Masamichi Kamihira. Magnetic-labeled feeder system for mouse pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng.* 査読有 119(5), 614-616 (2015). doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.020.
 5. Akira Ito, Masahiro Yamamoto, Kazushi Ikeda, Masanori Sato, Yoshinori Kawabe, and Masamichi Kamihira. Effects of type IV collagen on myogenic characteristics of IGF-I gene-engineered myoblast cells. *J Biosci Bioeng.* 査読有 119(5), 596-603 (2015). doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.008.
 6. Masanori Sato, Kazushi Ikeda, Shota Kanno, Akira Ito, Yoshinori Kawabe, and Masamichi Kamihira, Enhancement of Contractile Force Generation of Artificial Skeletal Muscle Tissues by Mild and Transient Heat Treatment. *Curr Pharm Biotechnol.* 査読有 14(13), 1083-1087 (2014). DOI: 10.2174/1389201015666140408125231
 7. Akira Ito, Yasunori Yamamoto, Masanori Sato, Kazushi Ikeda, Masahiro Yamamoto, Hideaki Fujita, Eiji Nagamori, Yoshinori Kawabe and Masamichi Kamihira, Induction of functional tissue-engineered skeletal muscle constructs by defined electrical stimulation. *Sci Rep.* 査読有 4, 4781; DOI:10.1038/srep04781(2014).

[学会発表] (計15件)

1. 吉岡貫太郎、井藤彰、河邊佳典、上平正道、カドヘリン遺伝子導入フィーダー細胞を用いたiPS細胞の運動神経分化誘導、化学工学会、2017年3月7日東京都
2. Kazushi Ikeda, Akira Ito, Ryusuke Imada, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Development of a drug testing system based on contractile force generation of tissue-engineered skeletal muscle constructs, JAACT2016, 2016年11月12日神戸市
3. Paerwen Paerhati, Kantato Yoshioka, Kaori Iwamoto, Hitomi Yamabe, Akira Ito, Masamichi Kamihira, Yoshinori Kawabe, Cadherin gene-engineered feeder systems for neural differentiation of mouse iPS cells, JAACT2016, 2016年11月12日神戸市
4. Akira Ito, Kazushi Ikeda, Ryusuke Imada, Masanori Sato, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Magnetic

- force-based skeletal muscle tissue engineering for in vitro drug testing, ICONAN2016, 2016年9月29日仏国パリ
5. 池田一史、井藤彰、今田隆介、河邊佳典、上平正道、人工骨格筋組織の収縮力測定による薬剤評価系の構築、日本生物工学会、2016年9月29日富山県富山市
 6. 井藤彰、池田一史、今田隆介、佐藤暢哲、河邊佳典、上平正道、ティッシュエンジニアリングで作製した骨格筋の収縮力を指標とした in vitro 薬剤試験、化学工学会、2016年9月8日徳島県徳島市
 7. 吉岡貫太郎、Paerwen Paerhati、井藤彰、山部ひとみ、岩本佳央梨、河邊佳典、上平正道、カドヘリン遺伝子導入フィーダー細胞を用いた iPS 細胞の神経分化誘導、化学工学会、2016年9月8日徳島県徳島市
 8. 井藤 彰、磁性ナノ粒子を用いたティッシュエンジニアリング技術の開発、日本機械学会バイオエンジニアリング講演会、2016年1月9日東京都
 9. 井藤 彰、磁気細胞操作によるティッシュエンジニアリング技術の開発、化学とマイクロ・ナノシステム学会、2015年11月27日北九州市
 10. Kazushi Ikeda, Akira Ito, Ryusuke Imada, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Construction of a drug screening system using artificial skeletal muscle tissues, YABEC2015, 2015年10月15日韓国春川市
 11. 池田一史、井藤彰、今田隆介、河邊佳典、上平正道、磁力を用いた骨格筋組織工学技術による薬剤探索系の開発、化学工学会、2015年9月10日札幌市
 12. 今田隆介、井藤彰、池田一史、河邊佳典、上平正道、ティッシュエンジニアリングで作製した筋組織を用いた薬剤スクリーニング法の開発、化学工学会、2015年3月20日東京都
 13. Kazushi Ikeda, Akira Ito, Masanori Sato, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Artificial skeletal muscle tissues using follistatin gene-engineered myoblasts, BMEiCON2014, 2014年11月26日福岡市
 14. Kazushi Ikeda, Akira Ito, Masanori Sato, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Fabrication of artificial skeletal muscle tissues using follistatin gene-engineered myoblasts, JAACT2014, 2014年11月12日北九州市
 15. 池田一史、井藤彰、佐藤暢哲、河邊佳典、上平正道、IGF-I および Bcl-2 の遺伝子共導入による人工骨格筋組織の機能強化、日本生物工学会、2014年9月10日札幌市

〔その他〕
ホームページ等
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002906/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井藤 彰 (ITO, Akira)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：60345915

(2) 研究分担者

清水 一憲 (SHIMIZU, Kazunori)
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：70402500