

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26702018

研究課題名(和文) 構造的および機能的な生体模倣性を有する三次元筋組織の構築と疾患モデルとしての応用

研究課題名(英文) Production of a structurally and functionally biomimetic 3D muscle tissue construct using cell sheet-based tissue engineering

研究代表者

高橋 宏信 (Takahashi, Hironobu)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：00710039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体の構造を模倣した筋組織モデルの構築を目指して研究を行った。パターン化温度応答性基材を用いて筋芽細胞を同一方向に配向させ、3次元ゲルに貼りつけた状態で分化誘導することにより、サルコメア構造を有する筋管組織を得ることに成功した。この筋組織は電気刺激により収縮する機能的な筋組織であり、薬剤にตอบสนองして筋収縮が抑制される様子も確認された。さらに、神経細胞および血管内皮細胞を筋組織内に導入し、より複雑な構造を持つ筋組織を得ることも成功した。これらの細胞が神経や血管として機能するまで成熟した組織を構築することができれば、薬剤スクリーニング等に有用な筋組織モデルとして応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In mature skeletal muscle, the muscle fibers are highly oriented to produce its mechanical functions, and vasculature and neurons also have well-organized structures. Using a patterned thermoresponsive culture substrate, we produced a cell sheet composed of aligned skeletal muscle myoblasts. This cell sheet was attached on a 3D gel and then incubated in differentiation medium. As a result, contractile muscle tissue construct was successfully produced. The muscle contraction was observed by electrical stimulation, and it was suppressed by the addition of some kinds of ion channel blockers. In addition, human neurons and human endothelial cells were incorporated within the multilayer cell sheets for creating a complex tissue construct. Both type of cells formed oriented networks guided by the myoblast orientation. The structural design and sequential functionalization in future work could lead to truly biomimetic tissue generation, and development of in-vitro physiological tissue models.

研究分野：組織工学・バイオマテリアル

キーワード：組織工学 再生医療 細胞シート 骨格筋

## 1. 研究開始当初の背景

欧米に比べ圧倒的に移植ドナーが不足している日本の特殊性を考慮した場合、諸外国以上に組織工学・再生医学を基盤技術とする再生医療への期待が高くなっている。組織工学の発展により組織の再生が実現されている一方、組織の三次元化(スケールアップ)は大きな課題のひとつである。現在では細胞の三次元足場となるスキャホールドを利用した技術が主流となっているが、細胞を高密度に三次元組織内に配置するうえでスキャホールド自体が障害となっているのも事実である。したがって、細胞を高密度に内包した3次元組織を作製する技術は今後の組織工学・再生医療の分野において重要である。我々は培養細胞をシート状に組織化した「細胞シート」を作製する技術を確立しており、すでに角膜、食道、心筋を対象とした再生医療のヒト臨床応用に成功している。さらに、複数の細胞シートを積層することで組織の三次元化も可能であることから、細胞および細胞外マトリックス(ECM)のみで形成された三次元組織を構築できる有効な手法として期待されている。

生体組織には、骨格筋組織や腱組織等、細胞やECMが規則的に整列している組織があり、その特異な構造は機能を最大限に発揮するために重要である。この観点から、より生体に近い組織構造をデザインするうえで三次元組織の配向制御はひとつの重要な要素である。さらに、複雑な組織・臓器の再生医療を実現するには、異なる機能を持つ複数種の細胞を組織特異的なパターンにしたがって配列させるなどの工夫が必要である。これまでに臨床応用に用いてきた細胞シートは単一の細胞種からなり、ミクロ構造に至るまで制御したものではない。しかしながら、次世代の組織工学分野において有用な生体模倣組織モデルを構築するためには、より複雑な構造まで制御できる技術が必要である。

## 2. 研究の目的

骨格筋組織は筋線維が配向した構造で形成されており、運動神経によってその機能は制御されている。さらに、筋組織へ酸素・栄養を効率よく運搬するよう制御された血管網が張り巡らされている。本研究では、これら複数種の細胞から成る複雑に制御された三次元筋組織の構築を細胞シート技術により実現する。具体的には、配向制御された血管網および神経組織を持つ骨格筋組織を細胞シート技術により構築し、神経筋疾患を対象とした生体模倣組織モデルを構築するための基盤技術としての可能性を追求する。

本研究では、表面パターンニング技術によって温度応答性培養表面をパターン化し、配向した細胞を細胞シートとして回収する手法を用いる。ヒト骨格筋由来の筋芽細胞をこの基材表面上で同一方向に整列させ、これらの細胞シートを複数枚積層することにより、生

体を模倣したバンドル構造を持つ筋管組織を構築することに成功している。本研究では、この配向構造を持つ筋組織を機能的な組織にするための成熟化を図る。特に、ヒト筋細胞の成熟化は比較的困難とされていることから、ヒト筋組織であっても安定的に成熟化することができる培養技術の開発を目的とした。さらに、組織の機能評価を通じて、筋疾患組織モデルとしての可能性についても検討した。

三次元構造のスケールアップを実現するためには、組織内部の壊死を防ぐことが必須である。そこで、配向制御した筋組織に血管網を導入することで、より厚い組織を構築するための技術について検討した。血管網を積極的に導入するアプローチはこれまでも多く行われており、一定の成果をあげているが、血管網を導入することのみに着目したものが多く、再生組織内における血管網に特定の方向性はない。より生体模倣性の高い組織を構築するためには、効率よく酸素や栄養を運搬するよう設計された生体に近い構造の血管網を組織に導入する必要がある。さらに、構造のみでなく機能的にも生体を模倣することに焦点を当て、生化学的に筋と接合した神経組織の導入を目指す。血管網と同様に配向制御された神経組織を導入し、生体内の骨格筋組織と同様に神経組織を介して機能が制御される筋組織を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 配向制御型筋組織の機能化

配向方向を制御するために設計したパターン化温度応答性培養基材を用いてヒト骨格筋由来の筋芽細胞を同一方向に整列させ、コンフルエント状態になるまで培養することにより、配向制御型の筋芽細胞シートを作製する。次に、コラーゲン溶液をこの培養皿に流し込んでゲル化させ、細胞シートがゲルに接着した状態で培養を行う。一晩培養した後低温培養(20℃)によって基材から細胞シートをゲルごと回収する。または、別の手法としてヒト線維芽細胞をパターン化基材に播種して、配向制御型細胞シートを作製し、これをゲルに貼りつけた状態で回収する。この場合は、線維芽細胞シート上にさらに筋芽細胞をコンフルエントになるように播種する。いずれかの条件で筋芽細胞が配向した状態のゲル組織を作製し、分化誘導培地(たとえば、2%ウマ血清含有培地)で数週間培養しながら経過観察した。

筋管形成による形状変化については位相差顕微鏡により観察し、筋管に特異的に発現するタンパク質(ミオシン重鎖やアクチニンなど)については免疫染色後に蛍光顕微鏡によって観察した。また、作製した筋組織の収縮能を確認するため、培養細胞ペーシングシステム(C-PaceEP: ION Optix社)を用いて電気刺激を行った。

## (2) 配向した筋組織への血管網導入

筋組織内に血管網を導入するための手法として、細胞シート積層技術を用いた。配向制御型筋芽細胞シートを作製し、ゼラチンゲルスタンプにより配向性を維持した状態で回収した。さらに、この細胞シートを別の配向制御型筋芽細胞シート上に積層することで、筋組織の3次元化を行った。その際に血管内皮細胞シートを別の培養皿で作製しておき、積層した筋芽細胞シートの間に挟む形で積層した。もしくは、血管内皮細胞を1枚の筋芽細胞シート上に播種しておき、内皮細胞が十分に接着した後に別の筋芽細胞シートを積層する(図1)。本研究においてはヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞(HUVEC)を使用した。作製した血管内皮細胞を含む筋芽細胞組織を数日間培養した後、血管内皮細胞特異的なマーカーを免疫染色して蛍光顕微鏡によって観察した。

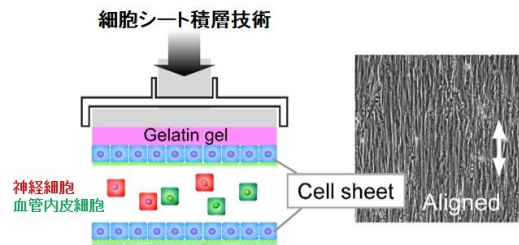


図1 ゼラチンゲルを用いて配向制御型筋芽細胞シートを積層し、血管内皮細胞または神経細胞を組織内に導入する

## (3) 配向制御型の神経組織形成

生体組織において、神経細胞は筋組織に効率よくシグナル伝達するために必要な方向に軸索を伸ばしている。この三次元構造の再現を目的として、筋芽細胞シートを用いた神経細胞の配向方向制御を試みた。神経細胞の導入手順は血管内皮細胞の導入と同様の手法を用いた(図1)。ヒトiPS細胞から誘導した神経細胞を2枚の筋芽細胞シート間に挟み込むことにより、神経細胞を含む筋組織を作製した。神経細胞は単独では細胞シートを形成しないため、神経細胞の場合は筋芽細胞シート上に神経細胞を播種した後に別の筋芽細胞シートを積層する形で導入を行った。神経細胞の伸長については、ニューロフィラメント等の神経細胞特異的なマーカーを染色することによって評価した。

## (4) 神経/血管/筋組織の作製および機能評価

生体を模倣した筋組織を構築するため、上述の手法により血管様組織および神経組織を持つ筋組織の作製を試みた。2種類の細胞を共培養した状態で積層した筋芽細胞シートで挟むことで、両者のネットワーク形成を観察した。また、生体を模した神経細胞を介

する筋組織の機能制御を確認するため、組織内に組み込んだ神経細胞を化学的または電気的に刺激した場合の筋収縮挙動を確認した。グルタミン酸等の神経伝達物質を培養組織に与えることにより、神経組織内のシグナル伝達を介する筋収縮挙動を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 収縮能を有する機能的筋組織の作製

収縮能を有する配向した筋組織を作製し、薬剤応答性を観察することで組織モデルとしての有用性を評価した。配向制御された筋芽細胞シートをコラーゲンゲルに張り付けた状態で3週間程度分化誘導することにより、サルコミア構造を有する筋組織を得ることに成功した。この筋組織を電気刺激(10 V, 10 msec)したところ、筋管が収縮する様子が観察された。ゲルに張り付けた状態で培養することにより、より長期間筋管を培養でき、さらに電気刺激によりゲルごと収縮できるよう設計することができた。一方で筋組織は培養皿には接着していないため、ゲルの柔軟性により収縮挙動を顕微鏡観察で捉えやすい状態に設計できたと考えている。ただし、コラーゲン成分が筋管の成熟化を促進する等に効果的であったかについては現時点で明らかではない。

電気刺激により十分に収縮する筋組織が得られたことから、筋収縮挙動を画像解析することにより、収縮距離を評価するシステムを構築した。これにより、異なるドナーより作製した筋組織がそれぞれ異なる収縮距離を示す様子を捉えることに成功した。筋芽細胞のドナーは購入時に指定できることから、異なるドナーから得られた筋芽細胞を用いて同様の方法で筋組織を作製し、これらの筋収縮を評価した。その結果、収縮機能はドナーごとに差があることがわかった。また、培養期間が2週間もしくは3週間と異なることでも収縮距離に違いが見られたことから、このシステムは筋組織の機能評価に有用であると言える。

さらに、薬剤に対する反応性を評価するため、カルシウムイオンチャンネルに作用するリアノジンやニフェジピンを培地に添加した。その結果、電気刺激により収縮していた筋組織が薬剤添加後には徐々に抑制されていく様子が見られた。さらに、薬剤による抑制効果が濃度依存的事であることも明らかにした。筋収縮が完全に停止するまでの時間を計測したところ、高濃度条件でより早く収縮が停止することがわかった。以上の結果から、薬剤の効果を筋収縮挙動から評価することができる筋組織を構築することに成功した。現段階ではシンプルな計測のみが評価基準であるが、この筋組織作製技術を基盤として薬剤スクリーニング等に有用な組織モデルに応用できると期待される。

## (2) 神経細胞・血管様組織の導入

優れた組織モデルを構築するためには、複雑な組織構造を設計する必要がある。配向した筋組織をより生体に近い構造にするため、神経細胞および血管内皮細胞を筋芽細胞シートと共培養した。血管内皮細胞を筋芽細胞シート間に挟む形で共培養を行った結果、共培養5日後には筋芽細胞シート組織内で血管様のネットワークが確認された。これまでの研究において、血管内皮細胞が3次元組織内で血管様の構造を形成することは報告されている。本研究でも同様のネットワーク構造が見られたが、その構造は明らかな異方的であった(図2)。このネットワーク構造は筋芽細胞シートの配向方向に沿った特異な方向性を持っており、細胞シートによって血管様構造を制御できることを示唆している。血管内皮細胞は周辺の3次元環境を認識し、自己組織的に自身の構造を決定していると考えられる。これを実現するためには本手法のようにスキャホールドフリーな組織構築技術が重要であると考えられる。

また、神経細胞も同様に細胞シート積層組織内でネットワークを形成することがわかった。神経細胞は樹状突起を十分に伸長させており、組織全体にネットワークを形成していた。さらに、血管内皮細胞と同様に異方性を持つ構造になっており、神経細胞が筋芽細胞の配向構造を認識することが示唆された。生体における骨格筋組織は配向方向の揃った神経/血管/筋組織によって構成されている。この観点から、生体模倣性を追求する場合に本研究で達成されたような組織構造は重要である。

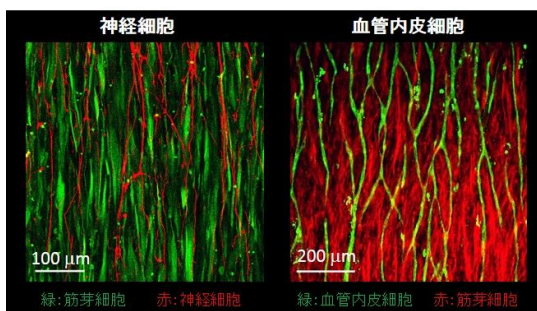


図2 筋芽細胞の配向構造に依存して異方的に形成される神経細胞および血管内皮細胞のネットワーク

## (3) 神経/血管/筋組織の作製および機能評価

神経/血管を有する筋組織を機能的な組織とするため、上述の手法により筋組織を収縮する状態になるまで培養した。電気刺激に応じてこの筋組織が収縮することを確認した後、組織内に組み込んだ神経細胞を化学的に刺激するためグルタミン酸を添加したが、筋収縮は確認されなかった。この結果から、神経筋接合部が形成していない、または神経細胞間ネットワークが生理的に不十分である

と考えられる。より機能的な生体模倣組織を構築するためには、これらの問題点を解決する必要がある。

## (4) 異種細胞共培養組織における神経細胞・血管内皮細胞の特異な挙動

細胞シート積層技術は単層シートを基本単位として積み上げる手法であるが、細胞シート間が生理的に相互作用できる状態になるため、最終的に一体化した3次元組織として機能することができる。別の見方をすれば、3次元組織を層状に切り分けて観察できる手法でもある。神経細胞と血管内皮細胞のネットワーク形成が確認されたことから、いずれの細胞も筋芽細胞が形成する3次元環境を認識していると言える。一方、本研究を通じて、神経細胞と内皮細胞が互いを認識している様子を捉えることができた。細胞シート組織内では両者ともにネットワークを形成することは上述のとおりである。一方、1枚の細胞シート上に内皮細胞が接着しただけではネットワーク構造は形成されない。これは以前から明らかであったが、神経細胞がこれに影響されることがわかった。まず、神経細胞と内皮細胞を細胞シート上で共培養したところ、互いに共存しない様子が見られた(図3)。神経細胞は内皮細胞が接着していない領域でのみネットワークを形成しており、血管内皮細胞がコンフルエント状態であれば樹状突起を伸長させない。この現象の詳細な機構は明らかではないが、重要なことはこれらの細胞を細胞シートで挟むと2種類の細胞ネットワークが混在した状態を作り出すことができる点である(図4)。つまり、3次元環境が内皮細胞に変化を与え、さらには神経細胞との共存状態にも影響することがわかる。以上のように、本手法により細胞にとって2次元および3次元環境を与えることができるため、3次元環境の重要性・異種細胞同士の連動した挙動を浮き彫りにすることもできる。したがって、細胞生物学的観点からも重要なツールであると考えている。

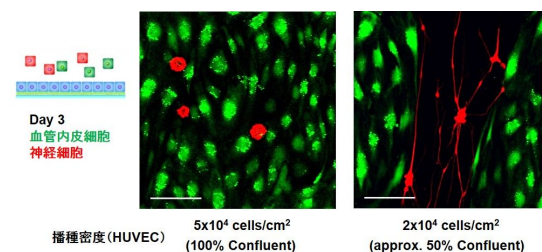


図3 細胞シート上で共存しない神経細胞と血管内皮細胞(スケールバー: 50μm)

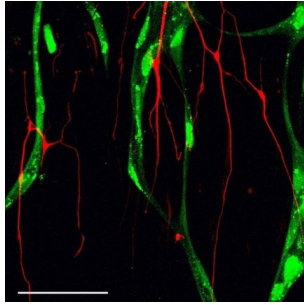


図4 筋芽細胞シートを積層した3次元環境において共存する神経細胞および内皮細胞ネットワーク(スケールバー:50 $\mu$ m)

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

Hironobu Takahashi, Teruo Okano, Cell sheet-based tissue engineering for organizing anisotropic tissue constructs produced using microfabricated thermoresponsive substrates, *Advanced Healthcare Materials*, Vol. 4, pp. 2388-2407, 2015 査読有、DOI: 10.1002/adhm.201500194  
 Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masamichi Nakayama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Anisotropic cellular network formation in engineered muscle tissue through the self-organization of neurons and endothelial cells, *Advanced Healthcare Materials*, Vol. 4, pp. 356-360, 2015, 査読有、DOI: 10.1002/adhm.201400297

### 〔学会発表〕(計8件)

高橋宏信、清水達也、中山正道、大和雅之、岡野光夫、細胞シート技術により作製した配向構造を有する骨格筋組織の機能評価、第15回日本再生医療学会総会、2016年3月17日~3月19日、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)  
 Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Micropatterned thermoresponsive materials for designing 3D microstructures in engineered tissue constructs, 2015 MRS Fall Meeting & Exhibit(国際学会) 2015年11月29日~12月4日、ボストン(アメリカ)  
 高橋宏信、細胞シートとパターン化技術を用いた3D組織構築技術の現状と展望、第37回日本バイオマテリアル学会大会(招待講演) 2015年11月9日~11月10日、京都テルサ(京都府・京都市)  
 高橋宏信、清水達也、中山正道、大和雅之、岡野光夫、表面パターン化技術による細胞シートの配向制御と3次元組織への応用、第64回高分子討論会、2015

年9月15日~9月17日、東北大学(宮城県・仙台市)

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masamichi Nakayama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Anisotropic network formation of neurons and endothelial cells in engineered muscle tissue construct, The Society For Biomaterials 2015 Annual Meeting, 2015年4月15日~4月18日、ノースカロライナ(アメリカ)

高橋宏信、清水達也、中山正道、大和雅之、岡野光夫、筋芽細胞の自己配向挙動を利用した異方性を有する三次元組織の構築、第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19日~3月21日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

高橋宏信、清水達也、中山正道、大和雅之、岡野光夫、配向制御型細胞シートを用いた異方性を有する筋組織の構造制御、第36回日本バイオマテリアル学会大会、2014年11月17日~11月18日、タワーホール船堀(東京都)

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masamichi Nakayama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, The use of anisotropic cell sheets for controlling cellular networks in engineered tissue constructs, 第63回高分子討論会、2014年9月24日~9月26日、長崎大学(長崎県・長崎市)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高橋 宏信(TAKAHASHI, Hironobu)  
 東京女子医科大学・医学部・助教  
 研究者番号: 00710039