

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901  
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）  
研究期間：2017～2019  
課題番号：16KK0126  
研究課題名（和文）相互作用解析が可能な次世代型骨格筋組織チップの開発と応用（国際共同研究強化）  
  
研究課題名（英文）Development of skeletal muscle-on-a-chip for investigating cell-cell/cell-ECM interaction(Fostering Joint International Research)  
  
研究代表者  
清水 一憲 (Shimizu, Kazunori)  
  
名古屋大学・工学研究科・准教授  
  
研究者番号：70402500  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,600,000円  
渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究では、収縮力測定可能な組織チップを改良し、灌流可能な血管様構造をもつ培養筋組織の構築を行った。マウス筋芽細胞株C2C12とフィブリンゲルを用いて作製した筋組織内にヒト臍帯静脈内皮細胞HUVECを用いて血管様構造を構築した。構築した血管様構造をもつ培養筋組織は電気刺激に反応して収縮し、血管様構造は培地を灌流可能であった。また、スケールダウンしたチップ上で線維芽組織を構築し、線維芽細胞とフィブロネクチンの相互作用解明を並行して実施した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨格筋細胞や線維芽細胞で組織を構築し、他の細胞や組織あるいは細胞周囲の細胞外マトリックスとの相互作用を解析するための技術を開発した。従来技術では困難であった、灌流可能な血管様構造をもつ収縮能をもつ骨格筋組織をチップ上で構築できた。この技術と用いると、動く骨格筋組織と他の組織との相互作用をインビトロで再現することが可能になることから、細胞組織生物学の基礎研究、疾患発症メカニズム解明のための研究、創薬スクリーニング技術としての応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we improved the tissue chip capable of measuring contractile force and constructed muscle tissues with a vascular-like structure capable of perfusion. A vessel-like structure was constructed in muscle tissues using C2C12, HUVEC and fibrin gel. The cultured muscle tissue with vascular-like structure contracted in response to electrical stimulation and the culture medium was able to be perfused in the vascular-like structure of the tissues.

研究分野：生物工学

キーワード：バイオマイクロシステム マイクロ・ナノシステム 生体医用工学 生体機能利用

## 様式 F - 19 - 2

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は体重の約半分を占めるため、骨格筋関連疾患は全身性疾患であることが多く、発症すると生活の質が大きく低下する。特に超高齢化社会では加齢性や廃用性の筋萎縮が社会問題になっており、その予防・治療薬開発が急務である。現在、筋萎縮薬の開発における前臨床試験では、平面上で培養した骨格筋細胞や後肢懸垂マウスなどが頻用されるが、筋萎縮モデルとして不十分な部分も多く、新たな前臨床試験法の開発が求められている。

臓器/組織チップは、細胞周囲の環境をうまく制御して臓器/組織特異的な機能を再現した細胞培養デバイスであり、薬効評価試験における新技術として非常に期待が大きい(1, 2)。我々はこれまでに骨格筋チップの開発を進めてきた。本研究の基課題では、簡便性、再現性、スループット性などに課題を解決するべく、筋組織チップの開発を行うとともに、筋疾患モデルとして利用可能な筋組織チップの開発へと研究を展開している。さらに、デバイス上に構築した培養筋組織の環境を制御することで筋萎縮の病態を再現した筋萎縮モデル筋組織チップの開発を目指している。こうした基課題の研究を進める中、2つの課題が明確になった。

まず一つ目に、チップのスケールダウンの必要性である。基課題で開発した筋組織チップは96ウェルプレートでの評価が可能であるが、ひとつの筋組織あたり約100,000個の骨格筋細胞を使用する必要がある。今後、ヒトiPS細胞由来の希少な細胞を用いることが想定されるため、より少ない細胞数で多条件の評価を行う必要があると考えた。二つ目に、骨格筋と他の臓器/組織との相互作用解析の必要性である。近年、骨格筋研究が進み、骨格筋は動力源としてだけでなく、様々な生理活性物質（総称をマイオカインという）を分泌し、他の臓器/組織と双方向に影響しあっていることが明らかになってきた(3)。筋萎縮においてもIL-6やIrisinなどのマイオカインの関与が示唆されている(4)が、それらの生理学的な意味の大部分が明らかになっていない。

海外共同研究者のProf. Christopher Chen, M.D., Ph.D. (Boston Univ./Harvard Univ.)はMEMS技術を利用した組織の力計測マイクロデバイスの開発や肝と心筋を搭載し組織/臓器チップ研究で多くの実績を挙げている(5)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、上述した2つの課題を解決するため、収縮力測定可能な筋組織チップのスケールダウンあるいは改良を行い、スケールダウンあるいは改良したチップを用いて筋細胞や線維芽細胞で組織を構築し、他の細胞や組織あるいは細胞周囲の細胞外マトリックスとの相互作用を解析する技術を開発することである。海外共同研究者との議論を行い、具体的には改良したデバイス上での灌流可能な血管構造をもつ培養筋組織の構築と、スケールダウンしたデバイス上で構築した線維芽組織における細胞とフィブロネクチンの相互作用解明を並行して実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞の培養 マウス筋芽細胞 C2C12 の増殖培地として、10% FBS および 1% Penicillin-Streptomycin を含む DMEM を用いた。培地交換は毎日行った。分化培地として 2% HS 入り DMEM を用いた。ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC は EGM-2 を用いて培養し、2日に1回の培地交換を行った。HUVEC-GFP も同様の方法で培養した。すべての細胞は 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Air の条件で培養した。

(2) 共培養用培地の検討 HUVEC を 6 well plate に  $4 \times 10^4$  cells/well で播種した。培地は血管内皮細胞用培地、骨格筋増殖用培地および分化用培地の3種類で培養した。培地交換は毎日行い、5日間培養した。C2C12 筋芽細胞を 6 well plate に  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> で播種した。培地は血管内皮細胞用培地、骨格筋増殖用培地の2種類で培養した。培地交換は毎日行い、7日間培養した。C2C12 筋芽細胞の培地検討では、筋芽細胞をサブコンフルエントまで増殖培養した後に、分化培地で培養した。分化培地は2日に1回交換した。分化培養5日目に筋管細胞の形成を確認したのちに、血管内皮細胞用培地に交換し、培地交換を毎日行い、9日間培養した。培地混合の検討は次のように行った。血管内皮細胞用培地と骨格筋細胞用増殖培地を比を変えて混合した6種類の培地で4日間培養し、その後、血管内皮細胞用培地と骨格筋細胞用分化培地を比を変えて混合した6種類の培地で8日間培養した。3次元筋組織を用いた共培養培地の検討は次のように行った。筋組織を既報を参考に作製した(6)。デバイスに細胞を播種してから2日間増殖培地で培養した後、10日間分化培地で培養し、その後2日間、血管内皮細胞用の培地で培養した。

(3) 共培養用デバイスの作製 デバイスは2段構造である。1段目、2段目ともに、SILPOT 184 を触媒と 10 : 1 で混合したポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いて作製した。作製した鋳型に PDMS を流し込み、70 °C で 1 時間加熱させ PDMS を固化した。ガラス、1 段目、2 段目をプラズマ処理で接着させた。プラズマ処理を行った後、1 段目とガラスの接着面を重ね、上から 500 g のおもりを乗せた状態で 85 °C, 30 分ホットプレート上で加熱することで、強固に接合した。最後に、硬化前の PDMS を用いて 2 段目と 1 段目を接着させた。

(4) 共培養デバイスを用いた共培養 筋芽細胞入りゲルをデバイスに播種する前に、まずデバイスの準備を行った。はじめに静脈留置針を1段目の両側から通し、その先端にシリコンゴム通した。静脈留置針の内針を抜き、片方のカテーテルをチャンバー上で切断した。カテーテルを切断した側から両側のカテーテルが通るように静脈留置針の針を刺しなおした。その後、上述した方法で筋組織を構築した。一定期間培養後、静脈留置針の内針によって作製された管腔内にシリンジポンプを用いてHUVECを注入した。液を流し入れるのと同時に静脈留置針の内針を管腔内に空気が入らないように抜き出した。もう一方のカテーテルをデバイス上で切断し、20分間インキュベータ内で静置した。その後、デバイスを裏返して、さらに20分間インキュベータ内で静置し、両側のチャンバー内に血管内皮細胞用培地を満たした。

(5) 血管構造形成の確認 FITC修飾デキストランを用いて血管構造が作製されているかを確認した。片方のチャンバーの液を半量抜き、もう一方のチャンバーは全量液を吸い取った。液が空のチャンバーに培地で溶解した100 $\mu$ g/mlのFITC修飾デキストランで満たし、蛍光顕微鏡で血管構造の液流れ、浸透性を観察した。

#### 4. 研究成果

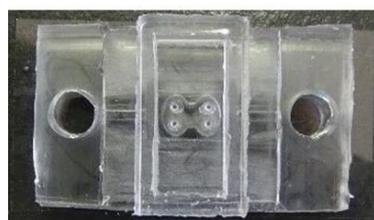
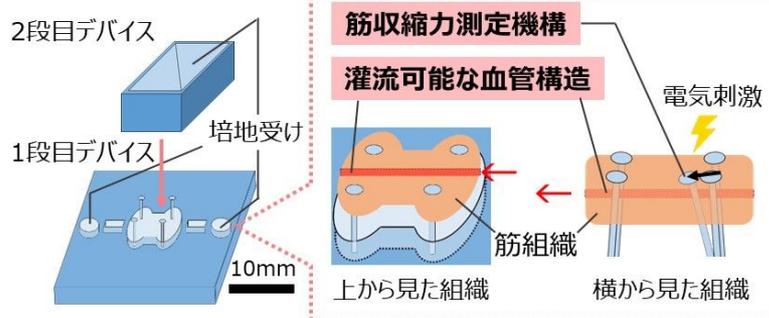
(1) 骨格筋細胞と血管内皮細胞のそれぞれの培地に対する影響の評価 骨格筋細胞、血管内皮細胞の2細胞の共培養を目指し、各培地による各細胞への影響を評価した。まず、骨格筋細胞用培地による血管内皮細胞HUVECの増殖への影響を調べた。5日間培養した結果、骨格筋細胞用増殖培地ではHUVECが増殖せず、死滅していく様子が観察された。次に血管内皮細胞用培地による骨格筋細胞C2C12の増殖や分化への影響を調べた。血管内皮細胞用培地では、骨格筋細胞が増殖する様子が観察できた。しかし、骨格筋細胞が筋管細胞へと分化する様子は見られなかった。

そこで、筋芽細胞を筋管細胞に分化誘導した後に、血管内皮細胞用培地で培養する実験を行った。その結果、血管内皮細胞用培地で培養することにより、筋管細胞の数が経時的に減少することがわかった。また同様の実験を、3次元骨格筋組織を用いて行った。分化誘導後に、血管内皮細胞用培地で培養した3次元骨格筋組織では収縮力の明らかな低下が観察された。免疫染色を行ったところ、血管内皮細胞用培地で培養した培養筋組織では、筋管細胞が細くなっていた。これらの結果から、C2C12とHUVECをどちらかの培地で共培養することは難しいと判断した。

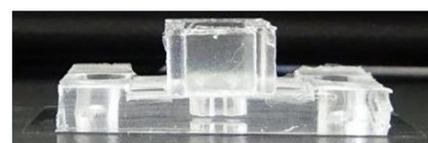
(2) 培地混合による骨格筋細胞と血管内皮細胞への影響 次に、血管内皮細胞および骨格筋細胞用分化培地を混合させることによって、骨格筋細胞が分化し、血管内皮細胞が維持または増殖する条件を見出せるのではないかと考えた。その結果、骨格筋細胞は、血管内皮細胞用培地が8割以上混合した培地で分化しなかった。また、血管内皮細胞は骨格筋細胞用培地が5割以上入っていると増殖能が低下することがわかった。以上、それぞれの培地を混合した条件でC2C12とHUVECをうまく共培養することは困難であったため、デバイスの設計を工夫し、それぞれの細胞をそれぞれの培地で培養する必要があると判断した。

(3) マイクロデバイス上での筋組織作製と収縮力測定 上記の結果より、マイクロデバイスの改良のため、設計と製作を行った(図1)。作製したマイクロデバイスを用いて筋組織を構築し、

筋収縮力を指標に培養条件を検討した。骨格筋組織用の培地受けに1mlまたは2mlの培地を入れ、増殖培養日数を2日または3日の4条件で筋組織の培養を行った。その結果、増殖培養3日間行ったものより、増殖培養2日間行った筋組織の方が大きな収縮力を有していた。培地量による影響は、ほとんど観察されなかった。これらの結果から、増殖培養2日で培地量1mlを培養条件とした。



上からの写真



横からの写真

図1 開発したデバイス

(4) 筋組織内への血管様構造の作製  
筋組織内に作製した管腔内表面への HUVEC の播種・接着条件を検討した。管腔内全面に HUVEC を接着させるために、HUVEC を播種してからデバイスを一定時間静置し、その後、デバイスを裏返し、管腔の上側にも HUVEC が接着させることを試みた。24 well plate にフィブリンゲルを播種し、そのフィブリンゲル上に HUVEC-GFP を  $9.5 \times 10^4$  cells ずつ播種し、静置した。その後 10, 20, 30 分後に培地交換を行い、HUVEC の様子を撮影した。その写真から 3 スポットランダムに選び、細胞数を数えた。その結果、1 日後では 10 分後に培地交換したサンプルでは  $67.3 \pm 11.2$  cells、20 分後では  $84 \pm 5.3$  cells、30 分後では  $83.3 \pm 2.5$  cells となり、20 分以上の静置時間で十分に細胞が接着することがわかった。2 日後に測定した場合も、1 日後と同様の結果が得られた。以上の結果から、HUVEC-GFP を播種してから裏表 20 分ずつ静置することにした。次に、見出した条件で、筋組織内に形成させた管腔内表面への HUVEC-GFP 播種を行った。播種後、3 日後においても管腔内に HUVEC-GFP が存在している様子が観察できた。

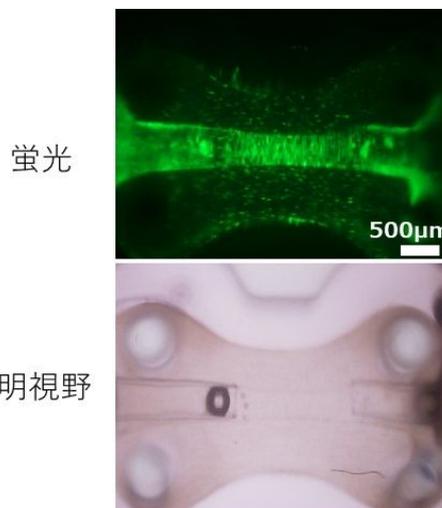


図2 筋組織内に構築した血管様構造

(5) 血管様構造をもつ筋組織の収縮力評価 3 次元骨格筋組織は HUVEC-GFP を播種してから血管内皮用培地で 2 日培養後、骨格筋細胞用分化培地でさらに 2 日間培養した。分化培養 2 日目に、筋収縮力測定を行った。両側にあるカテーテルを PDMS から切り離し、電気刺激を負荷した際の発生収縮力を測定した。その結果、血管様構造を構築した筋組織では  $4.93 \mu\text{N}$ 、血管様構造を構築していない筋組織では  $4.70 \mu\text{N}$  動いた。このように、血管様構造有と無では発生筋収縮力はほとんど変わらなかった。

(6) 血管様構造への灌流とバリア機能の評価 次に、筋組織内に構築した血管様構造が、灌流可能であり、バリア機能を保持するかどうかを評価した。評価には、ヒトの血漿アルブミン ( $66.5\text{-}70\text{kDa}$  以上) と同程度の分子量をもつ FITC 標識デキストリンを用いた。HUVEC-GFP を播種してから 2 日培養後に、FITC 標識デキストリンの灌流を試みた。その結果、管腔内を FITC-Dextran が流れる様子が観察された。以上のように、基課題のデバイスを改良し、灌流可能な血管構造をもつ培養筋組織の構築に成功した。

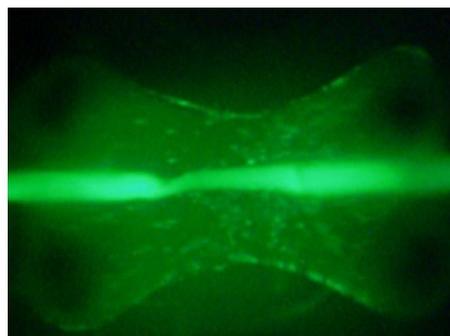


図3 血管様構造に蛍光標識デキストリン溶液を灌流した様子

1. **van der Meer, A. D. and van den Berg, A.:** Organs-on-chips: breaking the in vitro impasse, *Integr Biol-Uk*, **4**, 461-470 (2012).
2. **Abaci, H. E. and Shuler, M. L.:** Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling, *Integr Biol-Uk*, **7**, 383-391 (2015).
3. **Peake, J. M., Della Gatta, P., Suzuki, K., and Nieman, D. C.:** Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects, *Exerc Immunol Rev*, **21**, 8-25 (2015).
4. **Prelovsek, O., Mars, T., Jevsek, M., Podbregar, M., and Grubic, Z.:** High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF-alpha and LPS on IL-6 secretion from the precursors of human muscle regeneration, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **291**, R1651-1656 (2006).

5. **Legant, W. R., Pathak, A., Yang, M. T., Deshpande, V. S., McMeeking, R. M., and Chen, C. S.:** Microfabricated tissue gauges to measure and manipulate forces from 3D microtissues, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **106**, 10097-10102 (2009).
6. **Shimizu, K., Genma, R., Gotou, Y., Nagasaka, S., and Honda, H.:** Three-Dimensional Culture Model of Skeletal Muscle Tissue with Atrophy Induced by Dexamethasone, Bioengineering (Basel), **4** (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学工学研究科本多研究室ホームページ  
<https://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/life2/index.html>

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
主たる 渡航先の 主たる 海外共同 研究者	チェン クリストファー  (Chen Christopher)	ボストン大学・Department of Biomedical Engineering・ Professor	