

平成 29 年 4 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13904

研究課題名(和文)皮膚組織の保護による拮抗筋アクチュエータの空気中での駆動

研究課題名(英文)Skeletal muscle actuator covered by skin tissues for driving in air

研究代表者

森本 雄矢(Morimoto, Yuya)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：60739233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに骨格筋を用いたバイオアクチュエータが多数提案されているが、骨格筋は培養液中でのみ収縮運動が可能であり、空気中では乾燥によって細胞死が引き起こされるため活動することができなかった。そこで本研究では、細胞組織によって骨格筋周囲を覆うことによって、空気中でも駆動可能な骨格筋アクチュエータの構築を目指した。結果として、固定部材にて皮膚組織の端部を固定することで、曲面構造を有する血管構造付き皮膚組織を構築可能なことを明らかにした。さらに、曲面構造を有する細胞組織にて骨格筋周囲を覆うことによって乾燥からの保護が実現され、空気中にて骨格筋アクチュエータが駆動可能になることを示した。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle have gathered attentions as a linear actuator because its contractions are synchronized with electrical stimulations, and the power of the contraction depends on the amount of electricity. Due to high energy-conversion efficiency of skeletal muscles, many researchers have proposed bioactuators using in vitro constructed skeletal muscle tissues; conventional bioactuators achieved to walk on a Petri dish. However, the conventional bioactuators were driven only in culture medium and cannot work in air. In contrast, in vivo actuators with skeletal muscles such as arms and legs can be driven in air. Here, to mimic the in vivo properties, we proposed skeletal muscle actuators covered with cellular tissues. As a result, we succeeded in construction of curved skin tissues with vessel structures by fixation of their edges with anchors. Furthermore, we achieved driving skeletal muscle actuators in air by covering them with curved cellular tissues.

研究分野：組織工学

キーワード：骨格筋 皮膚 組織工学 マイクロ工学

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は生体内に存在するリニアアクチュエータである。電気刺激により開閉するカルシウムイオンチャンネルを筋小胞体に有しているため、骨格筋の収縮は電気刺激によって制御でき、収縮力は電気刺激の強さと負荷時間に応じて変化可能である。この骨格筋の特性に注目し、生体外で構築された骨格筋組織を駆動素子として用いたバイオアクチュエータが提案されており、培養皿上でのアクチュエータの歩行などが実現されている。しかし、従来のバイオアクチュエータは培養液中でのみ駆動可能であり、空気中では乾燥によって骨格筋組織がダメージを受けるため、駆動することができなかった。空気中での駆動が実現されると、培養液中以外でも物体操作や運動が可能になると考えられ、アクチュエータとしての応用可能性が広がることが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋組織の周囲の乾燥から保護するための細胞組織を設けることで、空気中で駆動可能な骨格筋アクチュエータの構築を目指した。皮膚は撥水性を有しているため、皮膚組織で骨格筋が覆われたバイオアクチュエータを構築することで乾燥を防ぐことが可能となると考えられる。この皮膚による湿潤環境の維持により、骨格筋の空気中での長期的な駆動が実現可能になる。

3. 研究の方法

提案の細胞組織で覆われた骨格筋アクチュエータ達成のため、本研究では(1)曲面形状持つ皮膚組織の構築方法の確立と(2)細胞組織を用いた骨格筋アクチュエータ周囲の湿潤環境維持の実現方法の確立を目指した。(1)曲面形状を持つ皮膚組織の構築方法確立のために、曲面構造上での皮膚細胞の培養特性を明らかにする。皮膚細胞は培養時の牽引力が強く、培養の経過につれて変形を起こし、骨格筋アクチュエータを保護できなくなる。そこで、皮膚細胞の培養条件と変形の間関係を明らかにすることで、構築される皮膚組織の形状制御を実現した。さらに、(2)骨格筋組織の周囲に乾燥から保護する細胞組織を設置する方法を確立し、空気中での骨格筋アクチュエータの駆動の実現に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 曲面形状を有する皮膚組織の構築

曲面構造を有する皮膚組織の構築にあたり、樹脂で作製したアンカ構造にて皮膚組織の端部を固定する方法を考案した。このアンカ構造は円筒状の形状をしており、皮膚組織内の血管構造と繋がっている。そのため、ポンプと接続されたチューブをこのアンカ構造に繋げ、アンカ構造を介して培養液を供給することで、生体と同様に表皮を空気に曝した状態で培養することが可能となっている。

皮膚組織の端部固定を実現するために、まず培養容器を作製した。3Dプリンタにてアンカ構造を有するデバイスを作製し、このデバイス表面にパリレンを成膜して、デバイスの生体適合性を向上させた。次に、アンカ構造を介してナイロンワイヤを挿入して、アンカ構造間を繋ぐ架線を張った後に、酸素プラズマにて表面処理を行い、細胞がデバイスに接着できるようにした。

次に、作製した培養容器内で皮膚組織の構築を行った。真皮線維芽細胞(NHDF)を懸濁したコラーゲン溶液をデバイス内に注入した。このコラーゲンを37℃環境のインキュベータ内でゲル化することにより、真皮層を構築した。培養の経過とともに真皮層は細胞の牽引力によって縮むが、アンカ構造にて保持されているため、鉛直方向にのみ収縮が発生する。その後、ワイヤを抜去することで、中空の流路を真皮層内に作製した。この時、真皮層の表面への表皮角化細胞(NHEK)を播種して表皮を形成すると同時に、中空流路内に血管内皮細胞(HUVEC)を播種して血管構造を形成した。最後に、アンカ構造を介して培養液を灌流させることで、表皮を空気に曝した状態、つまり気液界面で表皮を培養し、表皮の角化を促した。提案の方法で作成した皮膚組織に、ポンプによって培養液を送液することで、培養液を漏らすことなく皮膚組織内での灌流培養可能なことを確認した。本結果は提案のアンカ構造が皮膚組織の端部固定において十分な機能を有していることを示している。

作製した皮膚組織の形態を評価するために、皮膚組織の凍結切片を作製し、組織断面の観察を行った。HE染色の結果、真皮の上に表皮が形成されており、組織中に血管構造が形成されていることが確認された。また、この凍結切片の表皮周辺の拡大像から、およそ50 μ mの表皮が形成されていることが確認された(図6b)。加えて、切片の免疫染色の結果、表皮の下層のマーカーであるサイトケラチン15、および上層のマーカーであるサイトケラチン10が所定の位置に発現されており、表皮の分化が確認された。これらの結果から、表皮に相当する形態を有していることが明らかになった。

さらに、作製した皮膚組織の表皮バリア機能の評価を実施するために、表皮の撥水性を確認した。表皮の表面に生理食塩水を滴下したところ、表皮によって弾かれて半球状の液滴が形成された。真皮のみの場合は即座に液体は広がるため、本結果はバリア機能の指標の一つである撥水性を作製した皮膚組織が有していることを示している。また、バリア機能と相関があることが知られているキャパシタンスを測定した。この結果、真皮に比べて表皮のキャパシタンスが有意に低いことが確認された。キャパシタンスが低いほどバリア機能が形成されているという先行研究の結果から、作製した皮膚組織がバリア機

能を持つこと、つまり表皮に相当する機能を有していることが明らかになった。上記のように、アンカ構造にて端部を固定することで、表皮相当の機能および形態を有した皮膚組織を形状維持したまま構築可能なことが明らかになった。

このアンカ構造を曲面形状のデバイスの端に設置し、筐体の中で皮膚組織を構築することで、筐体の曲面構造に沿うように皮膚組織を構築することが可能となった。例えば、アンカ構造を設けた培養容器と指型を統合し、灌流を行うことで、これまで曲面形状で困難だった気液界面での培養を実現した。具体的には、作製した培養容器に、真皮層を形成するための NHDF を含んだコラーゲンゲルを注入することで、指型の周囲にゲルを成形し、指型にそった形で真皮の形成を達成した。その後、先述のように表皮層の構築を行うことで、指型上に曲面構造を有する皮膚組織を構築することに成功した。断面像から、表皮及び真皮の二層が形成されており、提案のアンカ構造を用いることで曲面形状を有する皮膚組織の構築が可能になることを明らかにした。

(2) 細胞組織を用いた骨格筋アクチュエータ周囲の湿潤環境を維持する方法の確立

曲面形状を有する細胞組織にて覆われた骨格筋アクチュエータの構築に向けて、まず、長細い溝(幅・高さ: 500 μm , 長さ: 4 mm)が複数本並行して刻まれたゴムスタンプにて筋芽細胞含有マトリゲル溶液を型取り、37 環境下でゲル化を引き起こした。ゲル化後、2 日間成長用培地(ダルベッコ改変イーグル培地に 10%ウシ胎児血清と 100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを混合)にて培養を行い、筋芽細胞同士を接着させた。この筋芽細胞同士の接着はゲル構造を硬化させ、ゲルシートを培養液中にて取り扱い可能とした。このゲルシートからゴム板およびゴムスタンプを取り外し、リンク機構を有するデバイスの表裏両面にある固定部材上に積層することで、デバイス上の対称な位置にて筋芽細胞を含有した長細いゲル構造を 3 次元的に整列させた。その後、分化用培地(ダルベッコ改変イーグル培地に 2%ウマ血清と 100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを混合)で培養し、固定部材間で筋芽細胞の融合を促して筋線維を構築することで、拮抗筋構造を有する骨格筋アクチュエータが構築される。

リンク機構を有するデバイスには微小電極が配置されているため、デバイスの両面に配置された骨格筋組織に対して、選択的に電気刺激を負荷することが可能になっている。そこで、交互に骨格筋組織に電気刺激を負荷したところ、選択的な骨格筋組織の収縮を発生させることに成功した。この骨格筋組織の収縮を起因として、リンク機構を回転させることにも成功し、結果として約 80 度の回転

運動を実現することに成功した。

加えて、微小柔軟電極上の固定部材に作製された骨格筋組織を細胞組織で覆い、空気中に骨格筋アクチュエータを持ち出せるようにした。まず、アルギン酸溶液を骨格筋組織の周囲に添加した後、霧状の塩化カルシウム溶液を混合させ、アルギン酸溶液の形状を保ったままゲル化を引き起こした。その後、ゴム型内にアルギン酸ゲル付き骨格筋アクチュエータを設置し、そこにコラーゲン溶液を注入することで、骨格筋アクチュエータをコラーゲン構造内に包埋した。コラーゲン構造内のアルギン酸ゲルをアルギナーゼ(40 $\mu\text{l}/\text{ml}$)で溶解することで、中空部をコラーゲン構造内に確立し、空気中で駆動可能な骨格筋アクチュエータが実現した。最後に、線維芽細胞(NIH3T3 細胞)をコラーゲン構造上に播種して培養し、骨格筋アクチュエータを覆うように細胞を配置させ、骨格筋組織を覆う細胞組織を構築した。この時、生死判定試験を行った結果、ほとんどの細胞が生きた状態で細胞組織にて骨格筋アクチュエータを覆うことが可能であることが分かった。以上より、細胞の生存に影響を与えることなく、骨格筋アクチュエータの表面に曲面形状を有する保護組織を構築でき、骨格筋組織全体を被覆可能であることが分かった。

さらに、細胞組織によって被覆された骨格筋アクチュエータを吊り下げた状態で空気中にて固定した。この時、電気刺激を負荷することで、骨格筋組織の収縮運動にて細胞組織ごとアクチュエータが変形することが分かった。本結果より、細胞組織にて被覆することで、電気刺激を介した骨格筋組織の運動を空気中にて実現できることが示された。

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 2 件)

Nobuhito Mori, Yuya Morimoto and Shoji Takeuchi, Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip, *Biomaterials*, Vol. 116, 2017, pp. 48-56
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.031>

Nobuhito Mori, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi, Vessel-like channels supported by poly-L-lysine tubes, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 査読有, Vol. 122, No. 6, 2016, pp. 753-757
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.05.011>

[学会発表](計 12 件)

Keigo Nishimura, Nobuhito Mori, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi, Formation of vessel-like channel using alginate fiber

as a sacrificial structure, The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017), Las Vegas, USA, Jan. 2017

森本雄矢、竹内昌治、培養骨格筋を用いたバイオアクチュエータ、化学工学会 第 48 回秋季大会、徳島、2016 年 9 月

森本雄矢、竹内昌治、細胞を使った「ものづくり」、BioOpto Japan 2016、横浜、2016 年 9 月

森本雄矢、竹内昌治、工学技術を利用した生体現象の再現、第 2 回 CSAHi 定例ウェビナー、ウェブ、2016 年 8 月

森宣仁、森本雄矢、竹内昌治、Cyclic stretching culture system of perfusable skin-equivalent for promoting epidermis differentiation、第 16 回東京大学生命科学シンポジウム、東京、2016 年 4 月

森宣仁、森本雄矢、竹内昌治、灌流可能な三次元皮膚モデルの表皮分化促進に向けた周期伸展培養システム、バイオ・マイクロシステム研究会、東京、2016 年 4 月

森本雄矢、in vitro construction of 3D muscle tissues、第 93 回日本生理学会大会、札幌、2016 年 3 月

Nobuhito Mori, Yuya Morimoto and Shoji Takeuchi, Stretchable Culture Device of Skin-equivalent with Improved Epidermis Thickness, The 29th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2016), pp. 259-262, Shanghai, China, Jan. 2016

森本雄矢、竹内昌治、細胞ブロックを利用した 3 次元組織構築、平成 27 年度「メディショナルナノテク研究会」第 3 回例会、東京、2015 年 12 月

森本雄矢、竹内昌治、マイクロ加工技術を利用した 3 次元組織構築、第 11 回「ヘルスケアデバイス・システム技術分科会」、東京、2015 年 11 月

Nobuhito Mori, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi, Skin-Equivalent Integrated with Perfusable Vascular Channels, The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2015), pp. 138-140, Gyeongju, Korea, Oct. 2015

Yuya Morimoto, Fabrication of muscle actuator by in vitro reconstruction of

skeletal muscle, IROS Workshop “Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Innovation”, Hamburg, Germany, Sep. 2015

〔図書〕(計 1 件)

Daniela Serien, Yuya Morimoto, and Shoji Takeuchi, Springer, Advanced Mechatronics and MEMS Devices II “Chapter 21 Photo-induced Fabrication Technology for 3D microdevices”, 2016, 24

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称 : Stretchable culture device of skin-equivalent
発明者 : 森本雄矢、森宣仁、竹内昌治
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : PCT/JP2017/001499
出願年月日 : 2017 年 1 月 18 日
国内外の別 : 外国

名称 : 人工三次元組織とその製造方法、実行三次元組織灌流デバイス
発明者 : 森本雄矢、森宣仁、竹内昌治
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : 特願 2015-159551
出願年月日 : 2015 年 6 月 30 日
国内外の別 : 国内

〔その他〕

サイエンティスト・クエスト - あなたと考えるあたらしい科学と暮らし - (日本科学未来館), “機械の概念が変わる!? 細胞も「ものづくり」の材料になる時代”, 講師, 2016 年 12 月 4 日

サイエンスアゴラ 2016 (科学技術振興機構), JST ブース “未来社会をそうぞうする ~ 仮想研究所 2016 ~”, 実行委員, 2016 年 11 月 3 日 - 11 月 6 日開催

Research Portrait 02, “ELEGANT CELL 細胞とバイオマテリアルの小さな実験室” 企画チーム メンバー, 2016 年 2 月 17 日 - 2 月 23 日

サイエンスアゴラ 2015, “そうぞう! 2020 年の未来社会 ~ みんなの仮想研究所 2015” 実行委員, 2015 年 11 月 13 日 - 11 月 15 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 雄矢 (MORIMOTO, Yuya)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号 : 60739233