

令和元年5月31日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05909

研究課題名(和文)筋成長におけるメカノバイオロジー機構に基づいた革新的骨格筋組織作製技術の開発

研究課題名(英文) Engineering of a matured muscle tissue construct by electrical stimulation-induced exercise and co-culturing iPS cell-derived neurons

研究代表者

高橋 宏信 (Takahashi, Hironobu)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：00710039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療の実現や創薬開発に向けた研究において、動物実験とヒト臨床を繋ぐツールが求められており、それには生体外で人工的に構築したヒト組織の利用が有効と考えられている。本研究では、筋疾患研究に有用なヒト骨格筋組織を構築するために、メカノストレスを利用した筋組織の成熟化手法の開発、運動神経細胞と生理的に連結した筋組織の構築を目指した。筋組織を電気で刺激することで運動負荷を与えたところ、筋線維が肥大するなどの成熟化促進効果があることがわかった。また、ヒトiPS細胞から分化させた神経細胞を筋組織と共培養することにより、神経細胞を刺激することによって収縮する筋組織を構築できた可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は骨格筋組織の成熟化を目指すことを通じて、筋の成長メカニズムを知り、それを制御することに繋げることができると期待される。この成果によって構築される組織は創薬研究における組織モデルとして有用である。生体に近い組織を構築できることは、その一部が欠損することで起こる様々な筋疾患に対する治療法の開発にも繋がる。本研究はその対象となる疾患を筋肉が原因の疾患のみならず、神経が関与する筋疾患にも拡大できることも示すことができた。さらに、老化に伴う筋萎縮のような問題は高齢者にとって幅広く関わりがあるため、筋萎縮を解決できる可能性を持つ本研究が高齢社会に与えるインパクトは特に大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle physiology and the mechanisms of muscle diseases can be effectively studied by an in-vitro tissue model produced by tissue engineering. In this study, a human skeletal muscle tissue was produced by our newly developed method. To mimic native muscles, we focused on mechanical stresses. This study demonstrated that periodic exercise induced by continuous electrical stimulation enhanced the contractile ability of the engineered tissue. On the other hand, muscle contraction is controlled by nerve system in the body. From this viewpoint, we also attempted to produce a neuron-muscle tissue construct. Human iPS cells-derived motor neurons were seeded onto the tissue construct, and then the resultant tissue showed potential that human neurons physiologically connected to the engineered muscles. This new tissue engineering method could lead to truly biomimetic muscle tissue generation, and development of in-vitro physiological tissue models.

研究分野：組織工学・再生医療

キーワード：組織工学 再生医療 メカノバイオロジー 筋組織 神経組織

1. 研究開始当初の背景

医学研究において動物実験により見出された結果がヒトにそのまま適応できるか否かは常に大きな課題であり、再生医療の実現や創薬開発に向けて動物実験とヒト臨床を繋ぐツールが求められている。組織工学技術により人工的に生体組織を再現したヒト組織がそのツールとなり得ることから、組織モデルとして利用できる生体に近い組織を構築する技術に注目が集まっている。骨格筋組織の場合はヒトから採取した筋芽細胞を筋線維になるまで生体外で成熟させることで構築できると考えられているが、細胞ソースとして比較的採取しやすい一方、機能的に十分なレベルまで成熟化させることが非常に困難である。したがって、多くの研究はマウス筋組織を構築するに留まっているが、組織モデルとしての有用性を考慮した場合、ヒト細胞によって形成された組織であることは非常に重要である。このような観点から、いくつかの研究グループでは独自の培養手法を駆使して収縮機能を有するまで成熟したヒト筋組織を構築することに成功しており、筋疾患研究に応用できる筋組織モデルとして期待されている。我々もこれまでに特殊な培養基材を利用することで骨格筋組織を構築する手法を提案している。生体組織において骨格筋が持つ特異な配向構造は力学的な機能に直結する重要な要素であるため、これを再現するために微細加工を施した特殊な培養基材を開発している(H. Takahashi et al., *Biomaterials*, 34, 7372-7380, 2013)。骨格筋由来の筋芽細胞をこの基材上で配向させることが可能となり、さらにこれらの筋芽細胞をコラーゲンゲル上で培養することで骨格筋組織として成熟化させることにも成功している。しかしながら、現段階で構築できる骨格筋組織は生体模倣性を追究するうえで不十分であり、組織をさらに生体に近づける工夫が求められる。

すべての生体組織は生命活動において必ず物理的な刺激を受けていることから、生体に近似したレベルで組織を再現するためにはメカノバイオロジーの視点が重要である。筋組織は骨・軟骨組織と並んでメカノストレスが成長・機能維持に重要な要素となっている。通常の生活において骨格筋が感じるメカノストレスは筋としての機能を維持するために必須であり、その効果は寝たきり状態の老人や微小重力空間で生活した宇宙飛行士の筋が急激に委縮することからも明らかである。したがって、筋組織の成長・機能メカニズムを解明し、より高機能な筋組織を構築する技術に発展させるためには、メカノバイオロジーの要素を取り入れることが重要と考えられる。

これまでの組織再生は単一の細胞種で形成されたものが多かったが、複雑な組織の生体メカニズムを再現するためには、複数の異なる細胞種が組織内で連携しあう構造・環境を再現する必要がある。これまでに構築されてきた骨格筋組織は、筋線維のみで構成されたものが多かったが、生体に見られる骨格筋は神経組織と生理的に結合しており、神経組織からのシグナルを受け取ることで収縮挙動が制御されている。神経と筋肉は非常に密接な関係性にあることから、神経細胞の欠陥に伴う筋疾患も多く存在する。このような神経筋疾患に対しても有用な組織モデルの構築を目指す場合、これまでの筋線維のみからなる組織では不十分であり、神経組織を導入した共培養筋組織が求められる。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでに確立した骨格筋組織の構築技術を基盤として、この筋組織をより優れた組織モデルとして利用するための高機能化を目指す。これまでに配向構造を持つ筋管組織を形成させ、これに神経細胞を物理的に共培養することには成功している。本研究では、より生体に類似した筋組織の構築するうえで重要な項目として、メカノストレスを利用した筋組織の成熟化手法の開発、運動神経細胞と生理的に連結した筋組織の構築を目指した研究を行う。各種メカノストレスにより作製した筋組織を刺激し、筋肥大・筋機能向上を含む筋組織の成長を中心にメカノストレスに対する応答性を観察する。これを実現するメカノストレスとして継続的な電気刺激による運動負荷を与えながら組織を培養し、筋組織の収縮能の変化から運動負荷と組織の成長について検証を行う。この研究を通じて、最適な運動負荷条件を見出すことができれば、メカノストレスを利用した筋組織の高機能化(収縮力の向上)手法を実現できる。また、この手法が確立されることにより、筋の成長と物理的負荷の関係性を深く追求するための組織モデルとしての応用も期待される。

筋管組織に神経細胞を単純に共培養することはすでに試みているが、これまでの成果はあくまで物理的に接触する形で共培養された状態であったため、生理的に連動する神経筋接合部の形成ができていなかった。これまでは運動神経細胞が入手困難であったことから、予備実験として中枢神経細胞によって共培養が可能であることを確認したのみであった。本研究では、機能的な神経筋組織の構築を目指して、ヒト iPS 細胞から運動神経細胞に分化誘導し、これを用いて骨格筋と生理的に結合した神経筋組織を構築する。この研究を通じて異種細胞間のコミュニケーションを含む総合的な筋のメカノバイオロジーを解明できる組織モデルを構築できれば、難治性筋疾患のメカニズム解明や組織工学的治療法の確立への足がかりとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋組織構築技術の改良

これまでに開発した技術をさらに改良することにより、より安定的および効率的に筋組織の機能化を図った。まず、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、配向制御した筋芽細胞シートを作製する。次に、フィブリンゲルとマトリゲルを混合した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。筋管分化を誘導するための培地（たとえば、2%ウマ血清含有培地）をゲル上に添加し、1週間この状態で培養した後に低温培養(20℃)によって基材から筋管組織をゲルごと回収する。ゲルに張り付いた状態の筋管組織をさらに数週間培養した後、収縮能および構造について評価した。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 α -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、細胞ペーシングシステム（C-PaceEP：ION Optix 社）を用いて筋組織を電気刺激することで、筋組織の収縮能を検証した。

(2) 運動負荷による筋組織の成熟化促進手法の検討

電気刺激によって収縮する筋組織を構築できるようになったことで、筋組織に対して継続的に収縮運動負荷を与えることができる。上述の手法により作製した筋組織を3週間培養したものをコントロール群として、分化誘導1週間後から2週間にわたって継続的に電気刺激を与え続けることで、運動によるメカノストレスが筋組織の成長に与える影響を検証した。筋線維の構造的な評価としては筋線維の太さ変化を観察し、機能面での変化については筋収縮を経時的に観察することによって評価した。

(3) 筋組織への運動神経の導入による神経筋組織の構築

筋組織と生理的に結合するタイプの神経細胞を導入する必要があるため、はじめにヒト iPS 細胞から運動神経細胞に分化誘導した。既報の論文を参考にして、iPS 細胞から胚様体を形成させる手法により運動神経細胞を得た。運動神経への分化に関しては、特異的なタンパク質を蛍光染色することで確認した。具体的には、ニューロフィラメントおよび HB9 や islet を染色することで、運動神経細胞に分化したことを確認した。

筋組織は上述の手順によって作製し、運動神経細胞を播種することで共培養状態にした。共培養した神経細胞の様子については樹状突起を蛍光染色によって確認した。また、神経筋接合部の形成に関してもアセチルコリンレセプターを染色することで確認した。一方、神経細胞と筋線維が機能的に結合していることを明らかにするため、神経伝達物質であるグルタミン酸を培地に添加することで神経細胞を刺激する実験を行った。グルタミン酸によって神経細胞が刺激されたことを通じて最終的に筋収縮が惹起されるか否かについて観察することで、神経細胞と筋線維の機能的な結合について検証した。

4. 研究成果

(1) 骨格筋組織構築技術の改良

作製したパターン化温度応答性培養基材に播種した筋芽細胞はストライプパターンに沿って同一方向に配向し、低温培養(20℃)することにより細胞シートとして回収することができた。その際、ゲルに接着した状態で基材から剥離させることにより、配向構造を維持した状態でゲルに転写することに成功した。さらに、分化誘導培地で培養することで筋芽細胞はゲル上で配向したまま筋管を形成した。分化誘導3週間後に α -actinin を蛍光染色したところ、筋収縮に必須のサルコメア構造を形成していることが確認できた。さらに、ラミニンや IV 型コラーゲンを蛍光染色したところ、これらのタンパク質が筋線維の周辺に膜構造を形成するように局在していることが分かった。生体の筋線維は基底膜に覆われており、ラミニンおよび IV 型コラーゲンはいずれも基底膜の主成分であることから、これらの筋線維は生体に似た基底膜様構造を形成している可能性があると考えられる。また、この膜構造はフィブリンゲルにマトリゲルを混合させることではじめて形成されることから、本研究で用いた混合ゲルの成分が重要であることがわかった。以上の結果から、本手法により

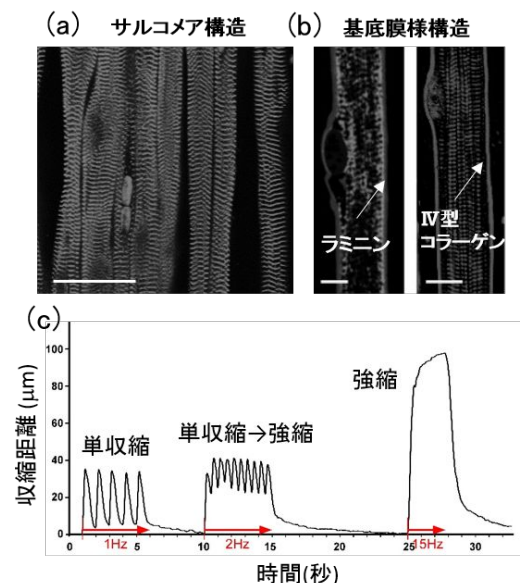


図1(a)サルコメア構造を有する筋線維により形成された骨格筋組織（スケールバー：50 μm）(b)ラミニンおよび IV 型コラーゲンが筋線維周辺を覆うように局在している膜構造（スケールバー：10 μm）(c)電気刺激の頻度に応じて単収縮または強収縮する機能的な骨格筋組織の収縮能

構造的な生体模倣性を有するヒト筋組織を構築できることが示唆された。

次に、機能的な成熟度を評価するため、作製した筋組織に電気刺激を行ったところ、電気刺激に反応して筋収縮する様子が観察された。電気刺激条件が 1 Hz の場合には収縮・弛緩を繰り返す完全な単収縮であったが、2 Hz では部分的に収縮が重なる状態が見られた。さらに 15 Hz に刺激の頻度を上げることで、持続的に収縮する強縮状態の収縮も見られた。このように電気刺激の頻度に応じて単収縮または強縮する様子は、生理学的に骨格筋組織を構築できた証拠と言える。また、配向構造を持つことで特定の方向にのみ筋収縮するという点も生体模倣の観点から重要である。

(2) 運動負荷による筋組織の成熟化促進手法の検討

分化誘導 1 週間後から 2 週間に渡って様々な電気刺激条件によって運動負荷を組織に与え続け、最適な電気刺激条件を探索した。最終的に、電圧：10 V、頻度：1 Hz、パルス幅：3m 秒または 10m 秒の電気刺激を 1 時間継続して行った後に 3 時間休止するプロセスを繰り返し行ったところ、筋組織の成熟化を効果的に促進させることがわかった。この刺激によって筋線維の一部が肥大する様子が確認されており（図 2）運動負荷による筋肥大を in-vitro で再現することに成功した。さらに、組織全体の筋収縮も顕著に強くなったことから、本研究における電気刺激条件が筋の成長を促す運動負荷として有効に作用することが示唆された。生体の筋組織は筋力トレーニング等によって肥大することから、生体における筋の成長に類似の機構によるものと推察している。一方、電気刺激のパルス幅を変更することで負荷の強さを変えることができるため、3m 秒と 10m 秒の 2 種類で刺激を行い、組織への影響を比較した。負荷条件が異なることで成熟化に及ぼす影響をより詳細に確認したところ、筋収縮の変化量に有意な差は見られなかった（図 3）。したがって、運動負荷は作製した筋組織の成長に効果的なメカノストレスとして働くことは明らかであるが、その効果は負荷の強度を上げることで際限なく大きくできるわけではないこともわかった。生体における筋の肥大・成長には新しい筋芽細胞が供給されるシステムが含まれていることから、本手法により機能向上に限界があるのはこの機構が不足しているためではないかと推測している。

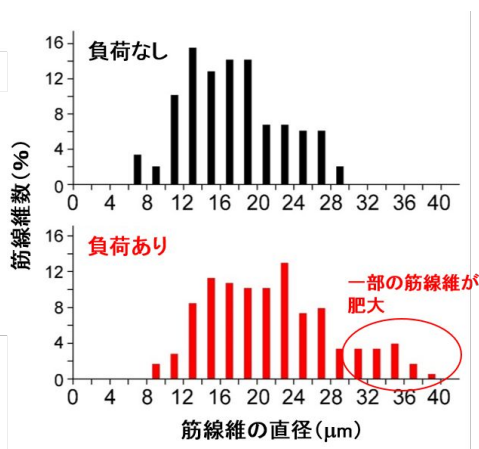


図 2 運動負荷による筋組織内の筋線維の太さ変化
(刺激条件 10 V, 1 Hz, 3m 秒で 2 週間)

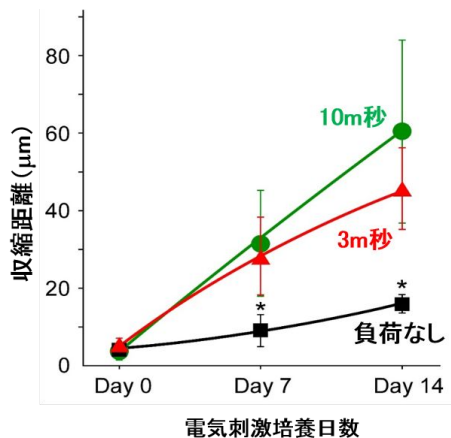


図 3 2 種類の運動負荷（3m 秒および 10m 秒）が筋収縮に与える影響

(3) 筋組織への運動神経の導入による神経筋組織の構築

ヒト iPS 細胞から分化した細胞は運動神経細胞に特異的なタンパク質を発現しており、運動神経細胞に分化できていることが確認できた。分化誘導効率は現在のところ明確にできていないが、十分な細胞数は得られたと判断し、本研究では特別にセクションしない状態で筋組織と共培養した。共培養することで神経細胞は筋線維の配向方向に沿って樹状突起を伸長させており、この培養状態で神経細胞は筋組織の構造を認識することがわかった（図 4(a)）。また、筋線維にアセチルコリン受容体が局在している部分が点在している様子も観察できた。アセチルコリン受容体は神経細胞の有無に関わらず確認することはできるが、神経細胞と共培養することによってより多く発現することを見出した。アセチルコリン受容体の発現量は筋線維の成熟度を推測するひとつの指標となることから、この点において神経細胞との共培養が筋組織の成熟化を促進する効果があることが示唆された。さらに、アセチルコリン受容体が存在する部分に神経細胞の樹状突起の末端が重なっているように見える箇所があり、神経筋接合部の形成を期待させる結果が得られた（図 4(b)）。しかしながら、同じ場所で物理的に接触しているだけでは神経筋接合部として機能しないため、この画像から確定的な結論は出せない。そこで次に、この組織を培養している培地中にグルタミン酸を添加し、筋収縮の挙動を観察した。グルタミン酸添加直後に数秒間にわたって筋収縮が続く様子が確認されたことか

ら、グルタミン酸により刺激された運動神経細胞から筋線維にシグナル伝達が起こったと推察される。一方、その際に見られた収縮は組織の一部分のみに限定的に確認されたものであり、組織全体では見られていない。したがって、神経筋接合部が形成されているが非常に限定的なものである可能性が高い。神経筋組織として十分に機能する組織に成長させるためには、神経組織と筋組織が連結する部分をより強固で安定的に構築する必要があると考えている。

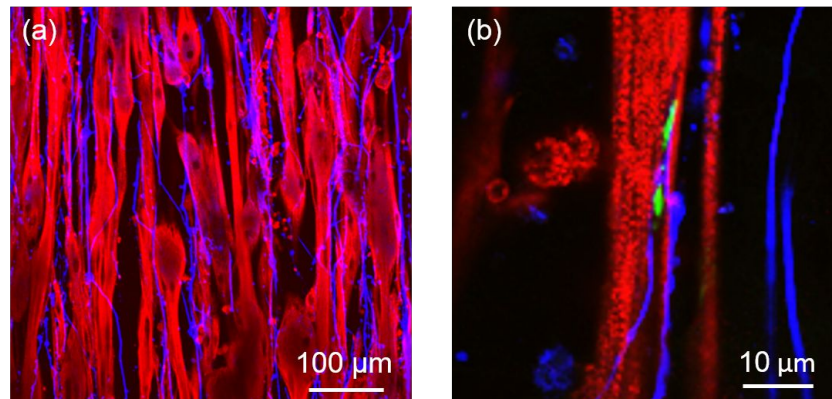


図 4(a)筋線維の配向方向を認識しながら伸長する運動神経の樹状突起（赤：筋線維、青：樹状突起）、(b)筋線維表面に局在しているアセチルコリンレセプターと樹状突起の末端が重なっている部分（赤：筋線維、青：樹状突起、緑：アセチルコリンレセプター）

これまでの組織は多くがシンプルな構造のものに留まっており、組織の配向構造や複数の細胞種による共培養環境を含めた生体模倣性を追求する研究、さらにメカノバイオロジー研究の要素を組み込んだアプローチは先駆的であると言える。この組織構築手法を利用することで、高度な成長機構を持つ筋組織におけるメカノストレスの役割・神経細胞や ECM の役割を解明することができるかと期待している。生体を模倣した複雑組織を in-vitro で再現することで、シンプルな in-vitro 組織では見られない細胞間の連携、in-vivo 実験では困難である詳細な生化学的・組織学的解析を実現し、最終的には再生医療をはじめとする新規治療開発に必要な知見を得るうえで有効なツールになると期待している。特に筋組織と切り離せないメカノバイオロジーの要素に着目して筋組織と神経組織の関係性をより深く追求できれば、神経原性の筋萎縮症や筋原性ミオパチー等の病態解明や治療薬開発にも繋がると考えられる。また、本研究を通じて得た知見を応用して高機能な筋組織を安定的に作製できる筋成熟化技術を確立することが可能となれば、再生医療への貢献のみでなく、脊椎損傷や老化に伴う筋力低下に対するリハビリテーションにおいても役立つ研究になると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hironobu Takahashi, Teruo Okano, Thermally-triggered fabrication of cell sheets for tissue engineering and regenerative medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 査読有、Vol. 138, 2019, pp.276-292

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.004>

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Engineered human contractile myofiber sheets as a platform for studies of skeletal muscle physiology, *Scientific Reports*, 査読有、Vol. 8, 2018, 13932

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32163-1>

〔学会発表〕(計 18 件)

高橋宏信、清水達也、岡野光夫、組織モデルとしての応用を目指した収縮能を有するヒト骨格筋組織の構築、第 18 回日本再生医療学会総会、2019 年

高橋宏信、清水達也、大和雅之、岡野光夫、組織モデルとしての応用を目指した組織工学手法によるヒト骨格筋組織の構築、日本動物実験代替法学会第 31 回大会、2018 年

高橋宏信、清水達也、大和雅之、岡野光夫、フィブリンゲルを用いたヒト骨格筋組織の機能化と継続的な収縮運動による成熟化、第 40 回日本バイオマテリアル学会大会、2018 年

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Engineering a functional muscle tissue using a fibrin-based gel for tissue modeling, 29th Annual Conference of the European Society for Biomaterials 2018, 2018 年

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Functionalization of a human skeletal muscle tissue construct using a fibrin-based gel for tissue modeling, 5th TERMIS World Congress 2018, 2018 年

高橋宏信、清水達也、大和雅之、岡野光夫、機能的な骨格筋組織の構築および継続的な収縮運動が収縮能に及ぼす影響、第 17 回日本再生医療学会総会、2018 年

高橋宏信、清水達也、大和雅之、岡野光夫、組織構築における配向構造制御のためのバイオインターフェースの設計、第 27 回日本 MRS 年次大会、2017 年

高橋宏信、清水達也、大和雅之、岡野光夫、フィブリンゲルを用いた骨格筋組織の構築と組織モデルとしての応用、第 39 回日本バイオマテリアル学会大会、2017 年

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Cell sheet-based tissue engineering for producing a contractile muscle tissue construct, 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials 2017, 2017 年

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Micro-fabricated thermoresponsive polymer-grafted surface for producing contractile muscle tissue construct, 2017 MRS Spring Meeting & Exhibit, 2017 年

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Production of contractile muscle tissue constructs based on cell sheet tissue engineering, The Society For Biomaterials 2017, 2017 年

高橋宏信、細胞シート技術を利用した三次元組織の構造制御手法による生体模倣組織の構築、第 36 回日本動物細胞工学会シンポジウム『次世代が創り上げる三次元組織構築・測定・品質管理を考える』、2017 年

高橋宏信、清水達也、大和雅之、岡野光夫、筋芽細胞の自己配向制御能を利用した骨格筋組織の構築と収縮機能の評価、第 16 回日本再生医療学会総会、2017 年

高橋宏信、3 次元組織の配向構造制御を目的とした培養基材の表面設計、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、2016 年

高橋宏信、3 次元組織の配向制御技術の開発と生体模倣組織構築への応用、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、2016 年

高橋宏信、清水達也、中山正道、大和雅之、岡野光夫、高分子パターンニング技術および細胞シート操作技術による 3 次元組織の構造制御、第 65 回高分子討論会、2016 年

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Production of a contractile muscle tissue construct based on cell sheet technology, TERMIS-AP 2016, 2016 年

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Masamichi Nakayama, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Cell sheet-based tissue engineering for organizing anisotropic muscle tissue constructs produced using microfabricated thermoresponsive materials, 10th World Biomaterials Congress, 2016 年

〔図書〕(計 2 件)

高橋宏信、坂口勝久、コロナ社、筋、組織工学ライブラリ マイクロロボティクスとバイオの融合 第 3 巻 細胞社会学、2016、pp.92-109

Hironobu Takahashi, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Elsevier, Intelligent surfaces for cell sheet engineering, Chapter 28 in Principles in Regenerative Medicine 3rd Edition, 2019, pp.469-484

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。