

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01383

研究課題名（和文）組織工学技術を用いたバイオ筋肉モジュールの開発

研究課題名（英文）Tissue-engineered skeletal muscle and its application to actuator

研究代表者

藤里 俊哉 (FUJISATO, Toshiya)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：60270732

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：生体筋組織は、ATPをエネルギー源として駆動する柔軟、軽量、かつ高効率なアクチュエータである。本研究では、三次元培養骨格筋組織を電気刺激で駆動し、長時間駆動可能なバイオアクチュエータとして利用するための研究開発を行った。その結果、培養骨格筋は完全強縮を起こす電気刺激を与え続けた場合は等尺性収縮力が減少していくが、単収縮を起こす電気刺激を与え続けた場合は増加していくことが示された。また、レバー駆動ならびにピストン駆動型のモジュールを作製し得た。これらの結果から、培養骨格筋を長期間収縮運動させバイオアクチュエータの駆動源として用いるには、電気刺激の周波数が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋組織は単なる身体の物理運動を担う組織と思われがちである。しかし、最近では、運動に伴ってマイオカインと呼ばれる健康に資する様々な生理活性物質を分泌していることも明らかとなり、適度な運動が身体の健康維持に重要であることを示している。本研究では、培養骨格筋のアクチュエータへの応用について検討した結果、電気刺激を工夫することで、比較的長時間収縮運動できることを見いだした。この成果はマイオカインを生産するためのデバイスや機能性食品としての展開に期待できると考えている。すなわち、筋肉運動と疾病改善との関係を明確化でき、我が国の健康寿命の延長に資すると考えている。

研究成果の概要（英文）：The living muscles have excellent characteristics of lightweight, high flexibility, and remarkable efficiency for driving energy. In this work, a three-dimensionally cultured tissue-engineered skeletal muscle has been developed for actuator driven by electric stimulation. Effective electric stimulation for long-term drive of the tissue-engineered actuator has been studied. The isometric twitch force of the tissue-engineered muscle actuator was not affected by continuous twitch induced by single electric stimulation. However, it gradually decreased by continuous tetanus induced by electric stimulation of more than 15Hz frequency. The isometric twitch force recovered soon after the end of continuous tetanus when the frequency of electric stimulation was low, however it was not recovered enough when the frequency was high. These results suggest that the frequency of electric stimulation to the tissue-engineered muscle actuator is important for its long-term drive.

研究分野：組織工学

キーワード：筋組織工学 培養骨格筋 アクチュエータ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体筋組織は、ATP をエネルギー源として駆動する柔軟、軽量、かつ高効率なアクチュエータであり、人工のアクチュエータでは得ることのできない優れた特性を有している。生体筋組織を生体外で利用するバイオアクチュエータの開発は、筋構成タンパク質を利用したものから、筋細胞、そして筋組織を直接利用したものまで、幅広いレベルで行われている[1]。しかし、ソフトアクチュエータとして広く研究されている合成高分子や形状記憶合金などの人工物とは異なり、生物素材特有の取り扱いの難しさがあるため、広く研究されてきたとは言い難い。他方、心筋梗塞などの虚血性心疾患の治療のため、増殖しない心筋細胞の代用として、骨格筋組織を利用する研究も古くから行われてきた。かつて心臓周囲に巻き付けた骨格筋を電気刺激によって心臓と同期収縮させる Cardiomyoplasty などが盛んに研究されたが、これなどは体内で骨格筋組織をアクチュエータとして利用する試みであったと言える[2]。現在では、患者さんから採取した骨格筋芽細胞をシート状に培養し、心筋梗塞部位に貼り付ける治療方法が大阪大学などで臨床応用されている。このような組織工学・再生医療技術が近年注目されることで、細胞から生体組織を構築したり、バイオリアクターを用いて細胞や生体組織を生体外で長期間培養したりする研究が広く行われるようになり、それらの知見や技術が急速に蓄積されつつある。

心筋組織とは異なり、骨格筋組織では前駆となる骨格筋芽細胞(筋衛星細胞)を容易に単離することができ、その増殖・分化によって筋管細胞や骨格筋細胞を得ることができる。このため、本研究では培養骨格筋をバイオアクチュエータの駆動源として使用する。先駆的研究では、米国の Dennis らは筋芽細胞の自己組織化(自然に細胞塊が形成されて組織化すること)によって培養骨格筋を作製し、その電気刺激による収縮力は強縮状態で約 $440 \mu\text{N}$ であったと報告している[3]。研究代表者は、コラーゲンをういた伸張培養によって、 $1,000 \mu\text{N}$ 弱の収縮力を有する培養骨格筋を得ていた[4, 5]。この培養骨格筋を用いたバイオアクチュエータを、繰り返し使用できるようにするためには、培養骨格筋組織の強力化、モジュール化、そして3ヶ月を目標とする長期駆動など、幾つかの課題に取り組むことが必要となった。

2. 研究の目的

本培養筋は体外で組織を構築する点で組織工学の手法と一致するが、組織工学での問題に、細胞に酸素・栄養を与える毛細血管網を構築できないことがある。それ故、体外で長期間生存できる大組織を作製できない。2016年現在、研究代表者が得ている培養筋の直径は約 0.5mm であるが、それすら内部の筋管細胞は表層に比べて少なく、内部は低栄養状態にあることが推測される。しかし、体内で使用しないバイオアクチュエータは、生体と同じ構造である必要はない。生体構造にとらわれず、より強力に、より長く、より長期間駆動しえる培養骨格筋を得るべく、その構造や作製方法、そしてバイオリアクターの機構を用いた培養方法などを改良・開発することが本研究の主題となる。

アクチュエータとして機能するには、筋芽細胞の増殖・分化によって一配向性の成熟筋線維を得る必要がある。前述の自己組織化では長時間を要し、十分に成熟・配向しないなどの問題がある他、両端を機器へ取り付けることが難しい。研究代表者らの培養筋は、コラーゲンに張力を加えて培養することで筋芽細胞の成熟性および配向性を高め、さらに両端に生体組織を用いた人工腱組織を複合化することで機器への取り付けを容易にしている。これにより、アクチュエータとして応用しやすく、かつ収縮弛緩動態の定量的評価を可能とした培養筋を作製することが可能となる。これまでに、3Dプリンタで作製した構造体の駆動実験を行ったが、わずかに1回限りの単収縮運動しか行えなかった。そこで本研究では、伸縮運動を行い得るバイオ筋肉モジュールを作製し、3ヶ月の駆動を実現することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養骨格筋組織の作製

培養骨格筋はこれまで報告してきた方法にて作製した[5]。簡潔に示すと、マウス由来筋芽細胞株 C2C12 を $1.0 \times 10^7 \text{cells/mL}$ の濃度になるようにコラーゲン溶液と懸濁したあと、脱細胞化処理したブタ血管由来組織から作製した2つの人工腱の間に均一になるように $100 \mu\text{L}$ 播種し、インキュベーター内で静置することでゲル化させ、培養筋を作製した。

(2) 電気刺激

電気刺激は Function generator を使用し、高速電力増幅器により増幅した信号を、白金電極を介して培地中に印加した。幅 20msec 、電圧 1.1V/mm のパルス波を、単収縮では 2Hz 、強縮では 15Hz および 100Hz にて印加した。

(3) 等張培養

培養筋作製2日後あるいは2週間後に、新たに開発した等張培養装置に移設し、さらに1週間のあいだ張力を調整しつつ培養した。

(4) 伸縮機構

電気刺激によるレバー駆動タイプならびにピストン駆動タイプを開発した。いずれも3Dプリンタでデバイスを作製した。

(5) 等尺性収縮力

等尺性収縮力は収縮力測定用の電気刺激を印加し、荷重センサによって得られた信号を動ひずみアンプおよびデータロガーを介して数値化した。

4. 研究成果

(1) 電気刺激による強力化

培養骨格筋に電気刺激を10分間連続して印加し、その都度等尺性収縮力を測定したところ、2Hzでは収縮力が増加したが、15Hzおよび100Hzでは減少した(図1左)。この結果から、単収縮を引き起こす電気刺激は収縮力を増加させ、完全強縮を引き起こす電気刺激は収縮力を減少させていくことが示された。単収縮を連続して起こさせることで、培養筋内でこれまで反応していなかった細胞が徐々に反応するようになった可能性がある。一方、完全強縮では疲労などの要因で、電気刺激に対する反応が悪くなったと考えられる。また、2Hzの電気刺激を10分おきに止めるよりも、1時間与え続けた方が等尺性収縮力の増加が見られ、さらに1時間毎に測定すると、より増加する傾向を示した(図1右)。

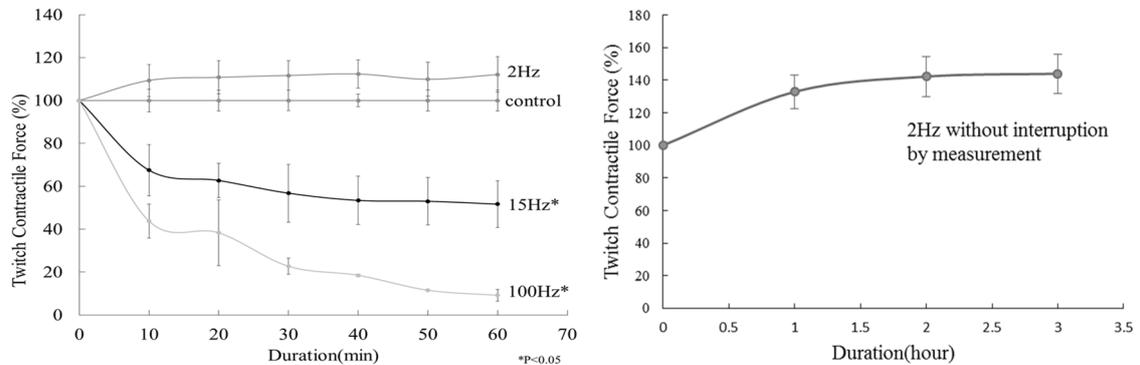


図1. 連続的な電気刺激による等尺性収縮力の変化
(左) 10分毎に測定した場合、(右) 1時間毎に測定した場合

(2) 電気刺激終了後の収縮力変化

電気刺激終了後、15Hzの電気刺激を与え続けた培養筋の収縮力は回復したが、100Hzの電気刺激を与え続けた培養筋の収縮力は回復しなかった(図2左)。このことから、強縮を引き起こす電気刺激でも周波数によって培養筋に与える刺激が異なると考えられた。また、PBS内で培養筋に15Hzの電気刺激を15分間与え続けることにより、等尺性収縮力をほぼ0にまで減少させることが出来た。その後、PBSから培地に戻すと等尺性収縮力の回復が開始され、10分程で90%まで回復したが、それ以降は変わらなかった(図2右)。培養液中の栄養成分が培養骨格筋内部にまで拡散した結果と考えられる。

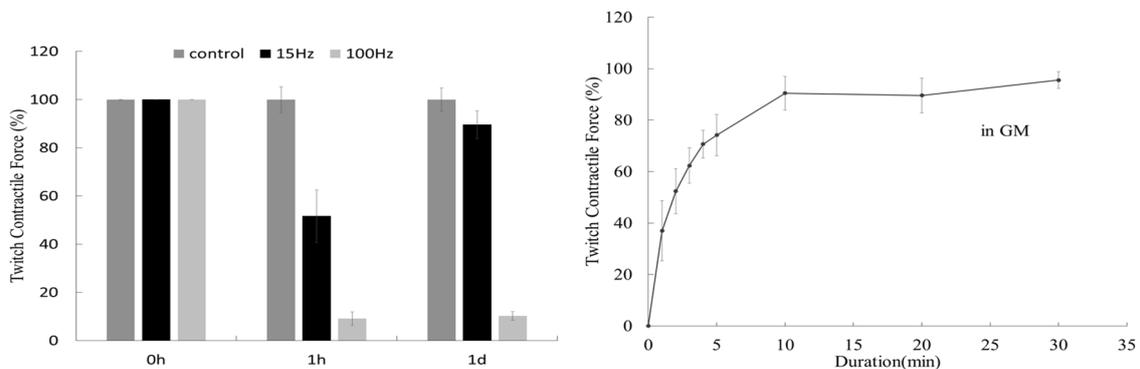


図2. 電気刺激後の等尺性収縮力の変化
(左) 培地中の場合、(右) PBS中で刺激後に培地に戻した場合

(3) 等張培養による強力化

培養骨格筋を等張培養したところ、作製2日後から培養したものでは、固定培養にくらべて優位に等尺性収縮力は増大した(図3左)。しかし、作製2週間後までは固定培養してその後等張培養したものは、固定培養と有意な差はなかった(図3右)。また、作製2日後から等張培養したものは、周囲の筋線維、ならびにサルコメア等の微細構造もよく発達していることがわかった(図4)。これらから、骨格筋芽細胞から筋線維へと分化する早期から等張培養することで、骨格筋組織の成熟が促進され、収縮力も増大すると考えられた。

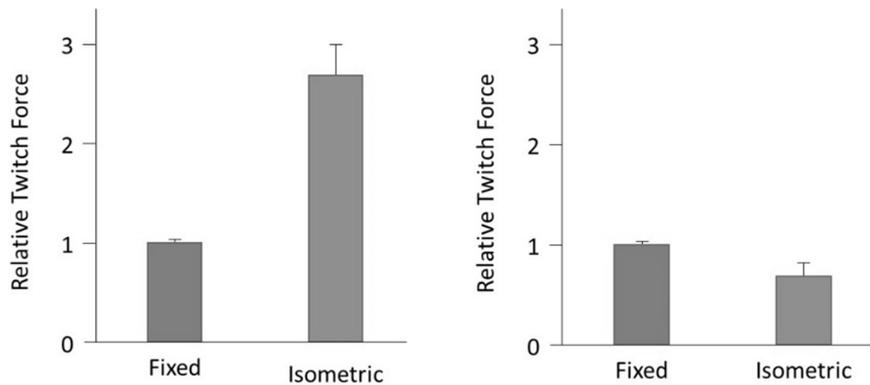


図3. 固定培養と等張培養での収縮力
 (左) 培養骨格筋作製2日後から、(右) 作製2週間後から等張培養

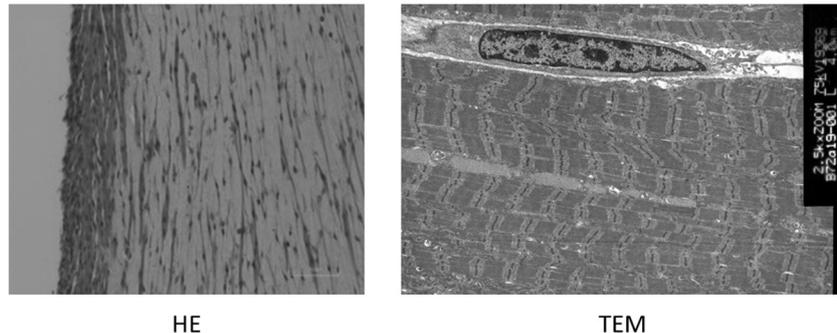


図4. 等張培養した培養骨格筋の組織像

(4) 伸縮機構

レバー駆動タイプならびにピストン駆動タイプとも、電気刺激によって繰り返し収縮運動させることが可能であった(図5)。ただし、電気刺激では電気分解による培地のpH変化などにより、特に強縮の連続駆動は容易でなかった。しかし、単収縮であれば条件を工夫することでより長期の連続駆動が可能であると思われ、引き続き検討中である。なお、連続刺激でなければ培養3ヶ月後でも収縮運動が可能であった。

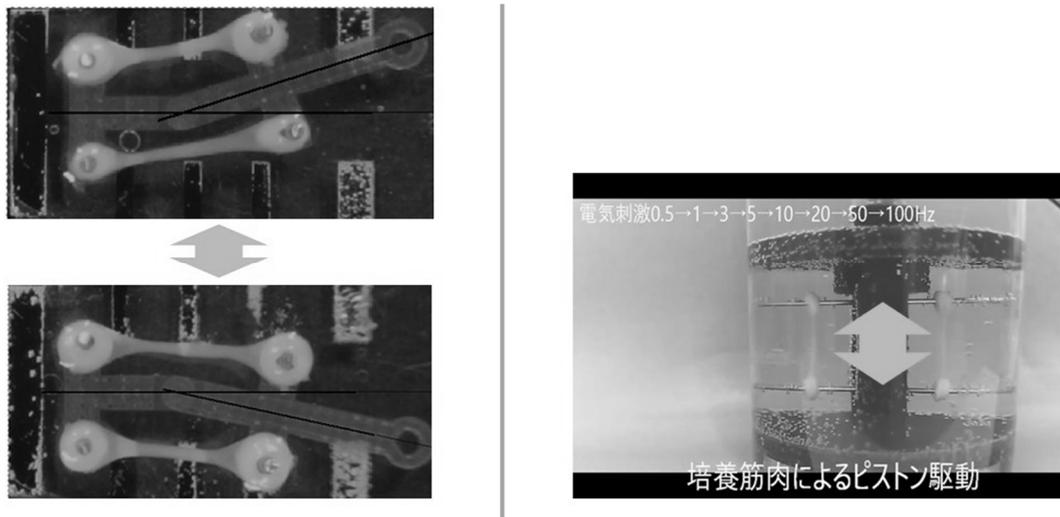


図5. 電気刺激による培養骨格筋の収縮運動
 (左) レバー駆動タイプ、(右) ピストン駆動タイプ

(5) まとめと今後の展開

培養骨格筋は完全強縮を起こす電気刺激を与え続けた場合は等尺性収縮力が減少していくが、単収縮を起こす電気刺激を与え続けた場合は増加していくことが示された。また、一度栄養をなくし、等尺性収縮力を減少させても栄養を与えることで回復していくことが示された。これらの結果より、培養骨格筋を長期間収縮運動させ、バイオアクチュエータの駆動源として用いることの可能性が示唆された。

骨格筋組織は多核細胞である骨格筋細胞(骨格筋線維)からなり、単なる身体の物理運動を担う組織と思われがちである。しかし、タンパク質の貯蔵やグルコースの代謝、体温の維持などの生理学的な面でも重要な働きを担っている。また、外的要因に対する高い感受性を持ち、状況に

応じて筋肉量や筋線維の型(速筋型や遅筋型)、代謝パラメータなどがある程度柔軟に変化させる。さらに最近では、運動に伴ってマイオカインと呼ばれる健康に資する様々な生理活性物質を分泌していることも明らかとなり、適度な運動が身体の健康維持に重要であることを示している。

引き続き、筋トレのように培養骨格筋を鍛えることで収縮力を高めたり、また、生理活性物質が産生されるかについても探求する予定である。最近注目されている、筋肉で作られ健康に重要な役割を果たすといわれているマイオカインを生産するためのデバイス、さらには機能性食品としての展開も期待できると考えている。マイオカインに関しては、さらに未知の作用をもつものがいくつも存在すると考えられている。本研究の成果はこれらの探索活動を加速するツールとなり、さらに、蓄積したデータ解析によってこれまで漠然としていた種々の筋肉運動と疾病改善との関係を明確化でき、我が国の健康寿命の延長に資する可能性もある。

参考文献

- [1] Akiyama Y, Iwabuchi K, Furukawa Y, Morishima K. Long-term and room temperature operable bioactuator powered by insect dorsal vessel tissue. *Lab Chip*. 2009; 9(1): 140-4.
- [2] Chiu RC, Kochamba G, et al. Biochemical and functional correlates of myocardium-like transformed skeletal muscle as a power source for cardiac assist devices. *J Card Surg*. 1989; 4(2): 171-9.
- [3] Dennis RG, Kosnik PE 2nd. Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2000; 36(5): 327-35.
- [4] Yamasaki K, Hayashi H, Nishiyama K, Kobayashi H, Uto S, Kondo H, Hashimoto S, Fujisato T. Control of myotube contraction by electrical pulse stimulation for bio-actuator. *J Artif Organs*. 2009; 12(2): 131-7.
- [5] Fujisato T, Takagi S, Nakamura T, Tsutsui H. Tissue Engineering Approach to Making Soft Actuators. Asaka K, Okuzaki H eds. *Soft Actuators -Materials, Modeling, applications, and Future Perspectives-*. pp463-73, Springer, Tokyo, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujisato Toshia, Takagi Shunya, Nakamura Tomohiro, Tsutsui Hiroshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Tissue-Engineering Approach to Making Soft Actuators	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Soft Actuators -Materials, Modeling, Applications, and Future Perspectives-	6. 最初と最後の頁 679 ~ 690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-6850-9_38	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Tomohiro, Takagi Shunya, Kamon Takafumi, Yamasaki Ken-ichi, Fujisato Toshia	4. 巻 123
2. 論文標題 Development and evaluation of a removable tissue-engineered muscle with artificial tendons	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 265 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2016.08.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Shunya, Nakamura Tomohiro, Fujisato Toshia	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of heat stress on contractility of tissue-engineered artificial skeletal muscle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-018-1020-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 1件／うち国際学会 11件）

1. 発表者名 佐久田 稜, 宇津奨麻, 横山 奨, 藤里俊哉
2. 発表標題 培養骨格筋に対する機械的刺激の影響
3. 学会等名 第29回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木優希, 藤里俊哉
2. 発表標題 熱ストレスとアスコルビン酸添加による人工筋組織の機能強化
3. 学会等名 第29回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakao F, Fujisato T
2. 発表標題 Cell allocation in 3D scaffolds.
3. 学会等名 The 29th Annual Meeting of European Society for Biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大音宇範, 藤里俊哉
2. 発表標題 三次元培養骨格筋に与えた損傷による収縮力への影響
3. 学会等名 第28回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井佑布子, 藤里俊哉
2. 発表標題 培養骨格筋の産生物質に関する研究
3. 学会等名 第28回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T.Fujisato, H.Terazawa, S.Takagi, T.Nakamura, H.Tsutsui
2. 発表標題 Tissue-engineered skeletal muscle and its application to actuator with longterm drivability
3. 学会等名 Eur Soc Artif Organs (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H.Terazawa, S.Takagi, T.Nakamura, H.Tsutsui, T.Fujisato
2. 発表標題 Tissue-engineered Skeletal Muscle Actuator Having Longterm Drivability
3. 学会等名 TERMIS Americas (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高木 空, 中村友浩, 藤里俊哉
2. 発表標題 培養骨格筋を用いた温熱ストレス評価法の開発
3. 学会等名 ライフサポート学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takagi S, Nakamura T, Fujisato T
2. 発表標題 3D Tissue-Engineered Skeletal Muscle Having Native-like Contractile Properties
3. 学会等名 World Biomaterials Congress (WBC)2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤里俊哉
2. 発表標題 組織工学技術を用いた培養骨格筋
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高塚謙太，高木 空，中村友浩，藤里俊哉
2. 発表標題 培養骨格筋におけるビタミンCの効果
3. 学会等名 第26回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中尾文明，藤里俊哉
2. 発表標題 スキャフォールド内への細胞配置に関する研究
3. 学会等名 第26回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤里俊哉、高木 空、中村友浩、筒井博司	4. 発行年 2016年
2. 出版社 S & T出版	5. 総ページ数 375（362-368）
3. 書名 ソフトアクチュエータの材料・構成・応用技術	

〔産業財産権〕

〔その他〕

OIT研究室ナビ バイオマテリアル研究室
<https://www.oit.ac.jp/laboratory/room/152>

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
研究協力者	中村 友浩 (NAKAMURA Tomohiro) (30217872)	大阪工業大学・工学部・教授 (34406)	