

令和 2 年 4 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03469

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた骨格筋ティッシュエンジニアリング技術の開発

研究課題名(英文) Skeletal muscle tissue engineering using human iPS cells

研究代表者

井藤 彰 (Ito, Akira)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：60345915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の最も重要な機能は収縮して力を発生することである。しかし、ヒトiPS細胞を分化誘導して、収縮力を発揮する成熟した三次元筋組織を作製する方法は確立されていない。本研究では、我々が開発した先進医学技術「磁性ナノテクノロジー」を基盤として、「動く」三次元筋組織を、ヒトiPS細胞から構築するプロセスを開発した。本研究で開発される三次元筋組織は、骨格筋の再生医療や筋疾患メカニズムの解明、および筋ジストロフィや加齢性筋萎縮(サルコペニア)に対する薬剤スクリーニングに有用であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在iPS細胞における研究開発の目まぐるしい発展により、再生医療の実用化が推進されている。iPS細胞は患者の細胞から誘導可能であるため、移植による再生治療や病気の仕組みの解明や薬の開発における再生研究に有用である。今までに、iPS細胞を筋細胞に分化誘導する手法は報告されているが、三次元筋組織まで構築する一連の技術は確立されていなかった。本研究では、iPS細胞から「動く」三次元筋組織を誘導する一連の技術を開発した。このことにより、筋肉に対する薬の効果を試験管内で「筋収縮力」を指標に調べることが可能となることから、筋ジストロフィやサルコペニアなどに対する薬の開発に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The most important function of skeletal muscle is to generate force by contracting. However, by inducing differentiation of human iPS cells, a method of producing mature three-dimensional muscle tissue exhibiting contraction force has not been established. In this study, we developed a process for constructing "contracting" three-dimensional muscle tissue from human iPS cells based on the advanced medical engineering technology "Magnetic Nanotechnology". The three-dimensional muscle tissues developed in this study are considered to be useful for regenerative medicine of skeletal muscle, elucidation of muscle disease mechanisms, and drug screening for muscle dystrophy and age-related muscle dystrophy (sarcopenia).

研究分野：医用生体工学

キーワード：ティッシュエンジニアリング 骨格筋 iPS細胞 磁性ナノ粒子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋組織の最も重要な機能は収縮して力を発生することである。しかしながら、今までに細胞の形態変化や筋関連遺伝子の発現を調べる検討は多く行われてきたが、それら遺伝子発現と構造的特徴の集約である収縮力を指標として機能評価を行った研究は少なかった。我々はティッシュエンジニアリングで作製した筋組織が発生する収縮力を測定する装置を開発し、今まで研究例のほとんどなかった力学的評価が可能となった。さらに、我々は磁力で三次元組織を構築する手法「Mag-TE法」を開発し、Mag-TEで作製した筋組織が、筋力を増強する薬剤のスクリーニングに有用であることを示した。その中で、興味深いことに、平面培養で太い筋管形成を誘導する薬剤であっても、三次元筋組織の収縮力を必ずしも増強しないことが分かった。これらの結果は、今後、三次元筋組織の収縮力測定が薬剤スクリーニングにおける世界的なスタンダードになることを示唆する。現在、iPS細胞における研究開発の目まぐるしい発展により、再生医療の実用化が推進されている。iPS細胞は患者の細胞から誘導可能であるため、移植による再生治療や病気の仕組みの解明や薬の開発における再生研究に有用である。今までに、iPS細胞を筋細胞に分化誘導する手法は報告されているが、三次元筋組織まで構築する一連の技術は確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発した先進医工学技術「磁性ナノテクノロジー」を基盤として、「動く」三次元筋組織を、ヒトiPS細胞から構築するプロセスを開発することを目的とした。さらに、正常iPS細胞に加えて筋ジストロフィ患者由来iPS細胞を用いた検討を行うことで、骨格筋における疾患特異的iPS細胞を活用した難病研究のための基盤技術を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

iPS細胞を用いた骨格筋ティッシュエンジニアリング技術の開発のために、以下の3つのプロセスの検討を行った。

1. iPS細胞から分化誘導された筋芽細胞を作製する工程（分化誘導工程）

iPS細胞は、共同研究者であるCiRAの櫻井講師が作製したMyoD遺伝子をDox添加で誘導発現可能な細胞を使用した。筋細胞への分化は、同研究グループの方法(*PlosOne*.2013)を基に行った。また、分化誘導に最適な細胞播種密度およびレチノイン酸添加濃度を検討した。

2. 磁力で積み上げて細胞密度の高い三次元筋組織を作製する工程（組織構築工程）

ヒトiPS細胞から分化誘導した筋芽細胞を用いて、すでに確立しているマウス筋芽細胞株C2C12細胞を用いた方法を基に、磁気操作するための磁性ナノ粒子の取り込み量の決定、Mag-TE法によって作製した三次元組織の組織学的解析（サルコメアの染色）を行った。

3. 電気刺激培養で筋組織を成熟化する工程（筋成熟培養工程）

作製したiPS細胞由来筋芽細胞からなる組織を成熟させ、「動く」筋組織を作製するために、以下の三次元培養法の検討を行った。

電気刺激培養

ヒトiPS細胞から分化誘導した筋管に対して、電圧を変えて電気刺激しながら培養を行い、培養後の筋管の収縮を測定して評価することで、最適な電気刺激培養条件を検討した。

運動神経細胞との共培養

SDIA(stromal cell-derived inducing activity)法(Kawasaki et al. *Neuron*. 2000)で分化誘導したiPS細胞

胎由来運動神経細胞と、作製した筋組織を共培養することで、運動神経を搭載した筋組織を作製し、筋組織としての成熟度の向上を図った。組織の収縮力測定その他、アセチルコリン受容体の局在による神経-筋接合を調べることで機能評価を行った。

4. 研究成果

1. 分化誘導工程

正常および筋ジストロフィ患者由来 iPS 細胞の筋分化誘導過程における播種密度を検討したところ、細胞株によって最適な播種密度が異なることが分かった。この結果は正常と筋ジストロフィ患者由来の差というよりも、細胞株間の差が要因として大きいと考えられ、そのメカニズムの解明にはさらなる検討が必要である。また、併せてレチノイン酸添加の影響を調べたところ、正常および筋ジストロフィ患者由来 iPS 細胞の両方で 1.0 μ M のレチノイン酸添加で、形成する筋管の面積が最大になった。

2. 組織構築工程

ヒト iPS 細胞から分化誘導した筋芽細胞を用いて、磁気操作するための磁性ナノ粒子の取り込み量を調べたところ、40 pg/cell で磁性ナノ粒子を添加すると約 20 pg/cell で細胞に取り込まれ、組織作製に十分な鉄濃度が得られた。さらに、PMDS マイクロデバイスに磁力を用いて細胞を集積させ、三次元培養を行ったところ、細胞組織は収縮してマイクロデバイスのピラーに巻き付くことで三次元組織が形成された(図1左)。形成された組織を免疫蛍光染色したところ、筋管が赤く染色され、組織内部で筋管が配向している様子が観察された(図1右)。

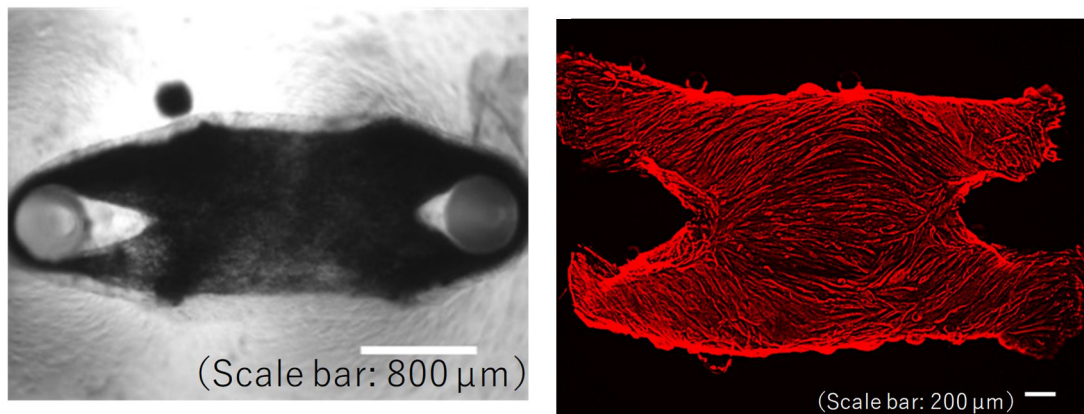


図1 Mag-TE法で作製した三次元筋組織

3. 筋成熟培養工程

電気刺激培養

ヒトiPS細胞から誘導した筋組織に対して、電気刺激条件を変えて培養を行い、培養後の組織の筋収縮を測定して評価したところ、0.17-0.30 Vが最適な電気刺激培養条件であることが分かった。

運動神経細胞との共培養

SDIA法で分化誘導したiPS細胞由来運動神経細胞と、Mag-TE法で作製した筋組織を共培養することで、運動神経を搭載した筋組織を作製した。作製した筋組織にはアセチルコリン受容体の局在による神経-筋接合が観察された。運動神経を搭載した筋組織は収縮力が約3倍増強され、神経伝達物質であるグルタミン酸に反応して収縮した。さらに、アセチルコリン受容体の阻害剤であるクラレを添加すると筋収縮が停止したことから、運動神経との接合をもつ骨格筋組織の構築に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arifuzzaman Md, Ito Akira, Ikeda Kazushi, Kawabe Yoshinori, Kamihira Masamichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Fabricating Muscle?Neuron Constructs with Improved Contractile Force Generation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 563 ~ 574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0165	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 Paerhati Paerwen, Ito Akira, Yoshioka Kantaro, Iwamoto Kaori, Fujiwara Sho, Horie Masanobu, Kawabe Yoshinori, Kamihira Masamichi	4. 巻 127
2. 論文標題 Neural differentiation of mouse induced pluripotent stem cells using cadherin gene-engineered PA6 feeder cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 633 ~ 640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.10.009	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 Yoshioka Kantaro, Ito Akira, Kawabe Yoshinori, Kamihira Masamichi	4. 巻 129
2. 論文標題 Novel neuromuscular junction model in 2D and 3D myotubes co-cultured with induced pluripotent stem cell-derived motor neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 486 ~ 493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.10.004	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13件（うち招待講演 3件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 井藤 彰
2. 発表標題 Magnetic force-based tissue engineering of skeletal muscle
3. 学会等名 12th International Conference on the Scientific and clinical Applications of Magnetic Carriers (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉開 太一,井藤 彰,池田 一史,吉岡 貴太郎,堀江 正信,櫻井 英俊,堀田 秋津,河邊 佳典,上平 正道
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の筋分化誘導条件の検討
3. 学会等名 化学工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井藤 彰
2. 発表標題 機能性磁性ナノ粒子の開発と医療技術への応用に関する生物工学的研究
3. 学会等名 生物工学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Md. Arifuzzaman,Akira Ito,Kazushi Ikeda,Yoshinori Kawabe,Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Tissue engineering of neuron-muscle constructs by C2C12/PC12 coculture system
3. 学会等名 JAACT2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Ito,Kantaro Yoshioka,Yoshinori Kawabe,Masamichi Kamihira
2. 発表標題 Magnetic Force-Based Skeletal Muscle Tissue Engineering
3. 学会等名 JAACT2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akira Ito
2. 発表標題 Functional magnetic nanoparticles and its application to medical technology
3. 学会等名 MRS 28th
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Arifuzzaman Md, Ito Akira, Ikeda Kazushi, Kawabe Yoshinori, Kamihira Masamichi
2. 発表標題 Enhancement of contractile activity of C2C12 myotubes co-cultured with PC12 neural cells
3. 学会等名 化学工学会 第49回秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉岡 貴太郎, 井藤 彰, Paerwen Paerhati, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 遺伝子改変フィーダー細胞を用いたiPS細胞の運動神経分化誘導
3. 学会等名 第69回日本生物工学会 大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉岡 貴太郎, 井藤 彰, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 iPS細胞由来運動神経細胞を含む三次元筋組織の構築
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会 総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 克成, 井藤 彰, 吉開 太一, 池田 一史, 河邊 佳典, 上平 正道
2. 発表標題 筋芽細胞と繊維芽細胞の共培養による人工骨格筋組織の作製
3. 学会等名 化学工学会 第83年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井藤 彰
2. 発表標題 機能性磁性ナノ粒子の開発と医療分野への応用
3. 学会等名 日本生物工学会 中部支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井藤 彰, 堀江正信, 堀田秋津, 櫻井英俊
2. 発表標題 磁力を用いた三次元筋組織構築とin vitro 評価系の開発
3. 学会等名 骨格筋スマート社会実現コンソーシアム講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Ito
2. 発表標題 Medical Application of Functional Magnetic Nanoparticles
3. 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筋ジストロフィ 患者由来iPS細胞を用いた人工筋組織の作製と機能評価
<http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab3/download/rinsho.pdf>
筋ジストロフィ 患者由来iPS細胞を用いた人工筋組織の作製と機能評価
<http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab3/download/rinsho.pdf>

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 分 担 者	堀江 正信 (Horie Masanobu) (60727014)	京都大学・環境安全保健機構・助教 (14301)	