

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18358

研究課題名（和文）筋細胞と腱細胞の3次元共培養法を用いた腱を有する骨格筋組織の構築

研究課題名（英文）Three-dimensional co-culture of myocytes and tenocyte

研究代表者

島 亜衣 (Shima, Ai)

東京大学・大学院情報理工学系研究科・特任助教

研究者番号：50757309

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：筋肉や腱を含む運動器の健康維持は、超高齢化社会の到来した我が国においてますます重要になっている。そこで、本研究では腱細胞を有する3次元骨格筋組織モデルの構築を目的とした。ヒト腱細胞とヒト筋細胞の共培養条件を検討した結果、両端に腱細胞を配置したひも状3次元筋組織において、筋細胞の自発的な筋収縮を達成した。また、共培養時の細胞の相互作用を明らかにした。本研究は、将来的に筋肉と腱の相互作用を調べるモデルの構築につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤の開発や疾患の治療法確立のためには、生体を模倣したヒト組織モデルが必要である。特に、運動器の健康増進に貢献するモデルは、超高齢化社会を迎えた我が国において価値が高いと考える。近年、3次元組織培養技術の発達により、生体に近い組織を体外で構築することが可能になっているが、機能的なヒト腱-筋モデルは未だ存在していない。本研究では、腱-筋モデル構築の端緒となる腱細胞と筋細胞の3次元共培養に着手している点に学術・社会的意義が認められる。

研究成果の概要（英文）：It is becoming more and more important in Japan, where the super-aging society has arrived, to maintain the health of the locomotorium including muscles and tendons. Therefore, the purpose of this study was to construct a three-dimensional skeletal muscle tissue model with tendon cells. As a result of examining the co-culture conditions of human tenocytes and human myocytes, spontaneous muscle contraction was achieved in the fiber-shaped three-dimensional muscle tissue in which tendon cells are arranged at both ends. Moreover, the interaction of each type of cells during the co-culture was studied. This model is expected to become a tool for investigating the interaction between tendon and muscle in the future.

研究分野：細胞生物学

キーワード：再生医学 細胞・組織 発生・分化 組織工学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋肉や腱、靭帯、関節、骨、神経からなる運動器の健康を維持することは、超高齢化社会の到来した我が国においてますます重要になっている。なかでも腱は、整形外科的に重要な組織である。腱の断裂はスポーツに伴う怪我や加齢によってしばしば起こるが、腱細胞の分化・再生メカニズムが十分に明らかになっていないことから、有効な早期治療法は未だ確立されていない。これは、細胞／遺伝子レベルで再生機構が明らかになっている骨格筋とは大きく異なる点である。また、神経筋骨格系組織のうち、「神経筋接合部」については多くの生物学的知見が得られているが、腱と骨格筋をつなぐ「筋腱接合部」については詳細な研究がなされておらず、今後発展が期待される分野である。腱細胞の分化制御機構や骨格筋との相互作用が明らかとなり、腱の再生医療による治療が実現すれば、多くの高齢者やスポーツ選手の怪我からの早期回復が望める。

薬剤の開発や疾患の治療法確立のためには、ヒト細胞からなる *in vitro* モデルが重要である。近年、3次元組織培養技術の発達により、これまでの培養皿での細胞培養と比べて、より生体に近い組織を体外で構築することが可能になっている。骨格筋組織についても、ハイドロゲル中に筋細胞を包埋する3次元培養法が考案されて、この方法では2次元培養と比べて筋分化が顕著に促進され、サルコメアを具えた成熟筋線維の形成や自発的な筋収縮が認められることが報告されている。さらに、このような3次元培養法を用いて筋細胞と神経細胞の共培養を行ない、「神経筋接合部」の再現も報告されている。しかし、これまでに、3次元的に筋細胞と腱細胞を共培養して、「筋腱接合部」を再現したとの報告はない。

以上のことから、将来的に腱の分化・再生機構を調べるツールとなり、腱の損傷を改善する効果的な治療法確立に寄与する、腱を有する3次元骨格筋組織モデルの構築が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋細胞と腱細胞からなる3次元腱付き骨格筋組織を構築し、筋腱接合部の構造を観察するとともに、腱の有無が筋の収縮に与える影響を解析することである。また、骨格筋細胞と腱細胞の共培養による、両細胞の相互作用を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 実験に使用する細胞の選定

腱細胞を有する3次元骨格筋組織の構築には、私たちの先行研究 (Shima et al., *Exp. Cell Res.* 370: 168-173, 2018) にて3次元培養すると自発的な筋収縮を起こすことが明らかになっているヒト不死化筋細胞と、市販のヒト初代腱細胞 (Zen-Bio 社) を用いた (図1)。ヒト筋細胞は20% 胎児ウシ血清を含むF10培養液、ヒト腱細胞は10% 胎児ウシ血清を含むDMEM-F12培養液 (Tenocyte Medium; 以下TMと略す) にて増殖させ、3次元組織構築に使用した。腱細胞については、免疫蛍光染色にて標識可能なマーカーを探索した。また、このヒト不死化筋細胞の分化誘導には、インスリン、アポトランスフェリン、アスコルビン酸、インスリン様成長因子 (IGF) を含むDMEM培養液 (Differentiation Medium; 以下DMと略す) が適していることから、共培養条件導出のために、DMおよびTMとDMの1:1混合培養液にて腱細胞を培養して、細胞の様子を観察した。

(2) 腱細胞を有する3次元骨格筋組織の構築

筋細胞、腱細胞ともに $1-2 \times 10^7$ cells/ml の細胞密度でゲルに懸濁し、シリコンゴム (ポリジメチルシロキサン; PDMS) 製の型を用いて3次元組織を構築した。具体的には、筋細胞はコラーゲンタイプ I とマトリゲルの混合ゲル、腱細胞はコラーゲンタイプ I ゲルに懸濁し、筋細胞を含むゲルの両端に腱細胞を含むゲルを配置して、幅 $500 \mu\text{m}$ となるように型どりしてひも状に成型した。ひもは長さ 5mm で

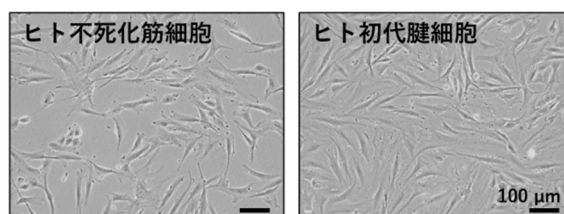


図1. 実験に用いたヒト不死化筋細胞(左)とヒト初代腱細胞(右)の明視野顕微鏡像。

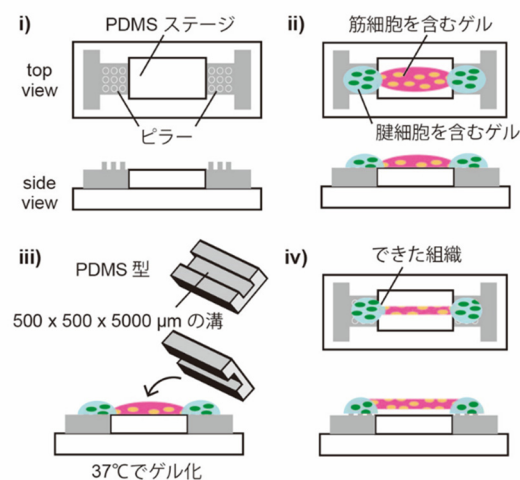


図2. 腱細胞を有する3次元骨格筋組織の構築法の模式図。筋細胞を含むゲルの両端に腱細胞を含むゲルを配置し、 $500 \mu\text{m}$ 幅に成型してひも状組織を構築した。

あり、両端をアンカで固定して培養した(図2)。この組織を構築1日後から、DMまたはTMとDMの1:1混合培養液を用いて合計9-11日間培養し、組織幅の変化を観察するとともに、筋細胞の分化の度合いと腱細胞の局在を免疫蛍光染色によって調べた。

(3) 筋細胞と線維芽細胞の共培養による相互作用を調べる実験系の構築

腱細胞を有する3次元筋組織においては、3次元培養した腱細胞と筋細胞が互いに作用して、それぞれの細胞の増殖や分化に影響を与えると予想される。特に、細胞の分泌因子を介した相互作用を明らかにするために、一方の細胞をハイドロゲルに内包して3次元的に培養し、細胞はハイドロゲルの外に漏出しないが、細胞が分泌した因子のみが滲出する状態として、共培養した細胞がどのような影響を受けるかを調べる実験系を検討した(図3a)。3次元培養する細胞には、腱細胞を広義に含む線維芽細胞の代表的な株細胞であるマウス3T3細胞、共培養する細胞にはマウスC2C12筋芽細胞を用いた(図3b)。3T3細胞の3次元組織化には「細胞ファイバ」技術(Onoe et al., Nature Mater. 12: 584-590, 2013)を利用し、細胞外タンパク質(ECM)ゲルに懸濁した3T3細胞をアルギン酸ゲルで内包してコアシェル型のみも状構造に成型した。なお、1本の細胞ファイバあたり 10^7 オーダーの細胞を含むように作製した。このとき、ファイバの両端はアルギン酸ゲルで閉じ、細胞の漏出を防いだ。通常、C2C12細胞の増殖が大幅に抑制される無血清DMEM培養液を用いた場合に、線維芽細胞ファイバと2日間共培養すると、その分泌因子によってC2C12細胞の生存と増殖が改善されるかどうかを、細胞数の計測によって判定した。陽性対照には5%胎児ウシ血清を含むDMEM培養液、陰性対照には細胞を含まないECMゲルファイバと無血清培養液を用いた。また3T3細胞の分泌因子をELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法によって推定した。

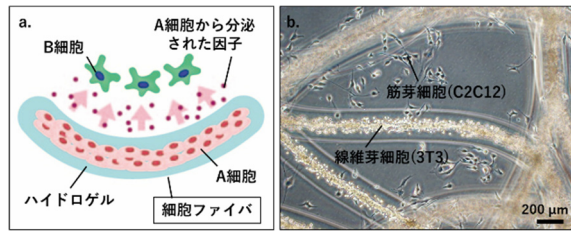


図3. 3次元組織化された細胞が、共培養した別種の細胞に与える影響を調べる実験系. a) 細胞ファイバ内で3次元的に培養されたA細胞の分泌因子がB細胞に作用する場合の模式図. b) 線維芽細胞ファイバと筋芽細胞の共培養.

4. 研究成果

(1) 筋細胞用分化培養液(DM)が腱細胞に与える影響

① 腱細胞マーカーの探索

筋細胞との共培養時に腱細胞を標識可能なマーカーの探索を行った。腱細胞特異的に細胞膜に発現するtenomodulinと、同じく腱細胞特異的に核に発現する転写因子scleraxisについて免疫蛍光染色を行ったが、高い特異性とシグナル強度を有する抗体が見つからなかった。そこで、腱細胞特異的なマーカーではないが、腱細胞で多量に発現しており、免疫蛍光抗体法で明るく染めることが可能なコラーゲンタイプIをマーカーとして用いることとした。コラーゲンタイプIは腱細胞の細胞質全体に存在した(図4)。

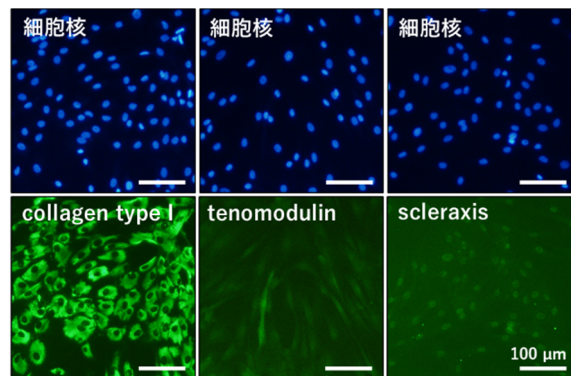


図4. 腱細胞の免疫蛍光染色像. 抗コラーゲンタイプI抗体で細胞質全体が明るく染まった.

② 筋分化用培養液(DM)での腱細胞培養

筋収縮等の機能を有する3次元組織構築を行うためには、筋細胞と腱細胞の共培養と筋細胞の分化誘導を同時に行う必要がある。そこで、筋分化用培養液(DM; インスリン、アポトランスフェリン、アスコルビン酸、インスリン様成長因子を含むDMEM培養液)が腱細胞の生存や増殖に与える影響を調べた。DMを含む腱細胞用培養液(TM) (TM:DM=1:1) と、TMだけでそれぞれ5日間培養したところ、両培養液で細胞の増殖に差は見られなかった。一方、DMだけで培養すると、細胞数が著しく減少した(図5a)。これは、DMには血清が含まれていないためと考えられる。ただし、TMとDMの混合培養液、DMのみの両方の場合において、コラーゲンタイプIは腱細胞内で発現を維持さ

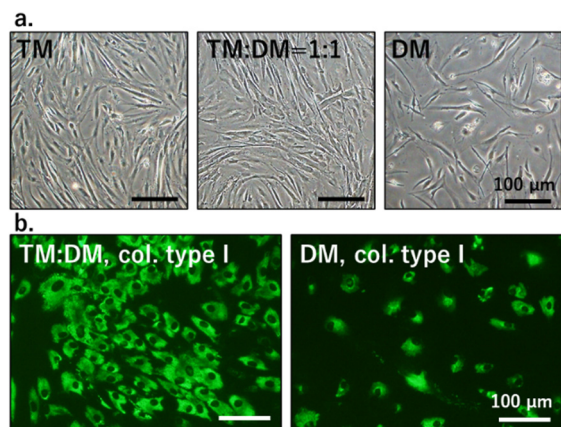


図5. 培養液の検討. (a) 各培養液で腱細胞を5日間培養した際の明視野顕微鏡像. (b) 各培養液で腱細胞を2日間培養した際のコラーゲンタイプIに対する免疫蛍光染色像. TM: 腱細胞用培養液, DM: 筋分化用培養液

れていることが、免疫蛍光染色によって確認された (図 5b)。

(2) 腱細胞を有する 3次元骨格筋組織の構築

① 筋細胞用分化培養液 (DM) を用いた場合

腱細胞と筋細胞を含む 3次元組織を構築し、まずは筋分化を優先させるために DM にて 11 日間培養した。2種類の細胞を用いてひも状組織を構築することは可能であり、10 日以上培養も達成できた (図 6)。組織幅は培養日数と共に減少し、特に腱細胞を有する両端部では、筋細胞のみの場合よりも組織の縮み方が大きかった。培養 11 日目に免疫蛍光染色を行ったところ、多数の多核の筋管細胞の形成と、抗 α アクチニン抗体で染色されるサルコメア構造が観察された。また、自発的な筋収縮も認められた。このことから、DM で培養した場合は筋組織の十分な分化が起こることが分かった。抗コラーゲンタイプ I 抗体で染まる単核の腱細胞も筋細胞の近傍に観察されたが、生体でみられるような特徴的な筋管との位置関係は認められなかった。

② 腱細胞用培養液 (TM) と筋細胞用分化培養液 (DM) の混合培養液を用いた場合

次に、TM と DM の 1:1 混合培養液で 3次元組織を培養した。この場合も組織の損傷なく 9 日間培養可能であった (図 7)。ただし、組織幅の収縮は DM 単独で培養した場合よりも小さかった (図 8)。また、多核の筋管細胞の形成や自発的な筋収縮は認められず、筋細胞が十分に分化していないことが推測された。一方、腱細胞のようすは DM で培養した場合と大きな違いはなかった。

③ 明らかになった課題

本研究において、腱細胞と筋細胞の 2種類を混在させた状態で 3次元組織を作製した場合に、DM を使用すれば、腱細胞の生存を阻害することなく、筋細胞の分化と自発的な筋収縮を実現可能なことが明らかとなった。これは、機能的な *in vitro* 腱-筋モデルを構築するうえで重要な知見である。一方、腱細胞はコラーゲンタイプ I を発現する単核の細胞として観察されたが、コラーゲンタイプ I は腱細胞特異的に発現するわけではなく、筋細胞でも発現することから、融合していない単核の筋芽細胞との区別がつかないとの課題が残る。よって、免疫蛍光染色で検出可能な腱細胞特異的なマーカーの探索は今後必須といえる。また、今回利用した腱細胞と筋細胞を同時にゲル化する方法では、腱細胞の配置を完全に制御することができないため、生体内の筋腱接合部で見られるような筋線維と腱束の指状陥入構造の再現には至らなかった。さらに、腱細胞の密度が高い点も生体との大きな相違点である。

本研究において、筋組織の機能を維持したままで、ヒト腱細胞とヒト筋細胞の 3次元共培養が可能であることが明らかとなった。本条件を基本にした培養条件の最適化を行うことで、より生体に近い *in vitro* モデルの実現を目指す。

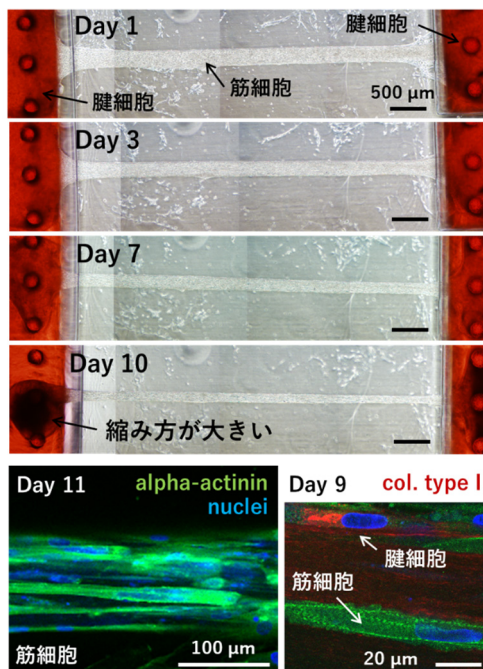


図 6. 筋分化用培養液で培養した腱細胞を含む 3次元骨格筋組織。

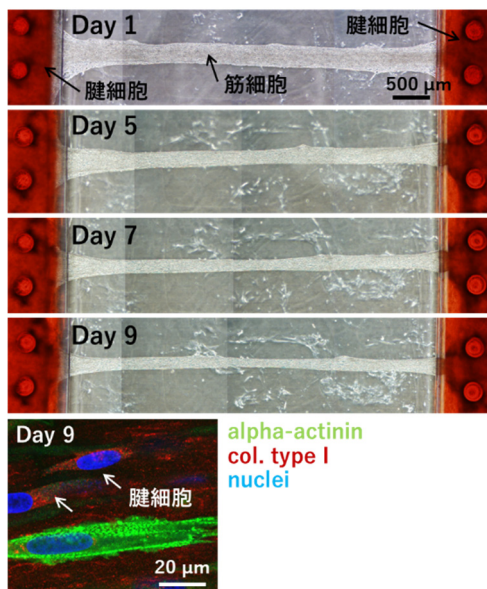


図 7. 筋分化用培養液と腱細胞用培養液を混同して培養したときの腱細胞を含む 3次元骨格筋組織。

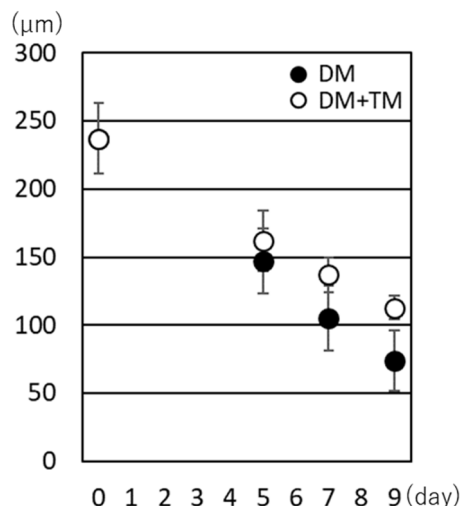


図 8. 培養日数に伴う 3次元組織幅の変化. 筋分化用培養液 (DM) 単独で培養した場合の方が組織の収縮率が大きかった。

(3) 3次元培養した線維芽細胞との共培養が筋細胞の増殖に与える影響

3次元ひも状組織に成型したマウス 3T3 線維芽細胞と2日間共培養すると、無血清培養液で培養した場合でも、マウス C2C12 筋細胞の増殖が促進された

(図 9)。5% 胎児ウシ血清を含む培養液では培養日数に伴って、筋細胞数が増加するが、無血清培養液では細胞はほとんど増殖しなかった。3T3 線維芽細胞ファイバと共培養すると、細胞を含まない ECM ゲルファイバと共に培養した場合と比べて有意に細胞数が増加したことから、3T3 細胞ファイバの分泌因子には筋細胞の増殖を促進する作用があることが示された。このことは、腱細胞と筋細胞を3次元的に共培養した場合にも、腱細胞の分泌因子が筋細胞の増殖を促し、分化を抑制する可能性があることを示唆している。従って、共培養を行う際の培養液の選定には、細胞同士の相互作用についても十分に考慮する必要がある。なお、ELISA 法により、3T3 線維芽細胞ファイバの分泌する因子のひとつが線維芽細胞増殖因子 (FGF) -2 であることがわかった。

本培養系は、3次元培養した細胞による相互作用を調べるために利用できるほか、人工的に合成できない細胞由来の因子を他の細胞の培養に利用することが可能な共培養系として価値があることから、Scientific Reports 誌にて報告した (Shima et al., Sci. Rep 10:288, 2020)。

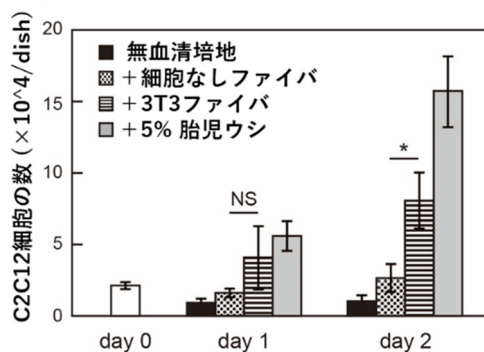


図 9. 3次元培養した線維芽細胞との共培養が筋細胞の増殖に与える影響. 3T3 線維芽細胞ファイバからの分泌因子は C2C12 筋細胞の増殖を促進した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Shima Ai、Itou Akane、Takeuchi Shoji | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Cell fibers promote proliferation of co-cultured cells on a dish | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 288 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-57213-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 島亜衣, 森本雄矢, H. Lee Sweeney, 竹内昌治 |
| 2. 発表標題 収縮能を持つ三次元ヒト骨格筋組織の構築 |
| 3. 学会等名 第4回日本筋学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ai Shima and Shoji Takeuchi |
| 2. 発表標題 CELL-LADEN MICROFIBER AS GROWTH FACTOR SUPPLIER |
| 3. 学会等名 MEMS 2019（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 島亜衣, 竹内昌治 |
| 2. 発表標題 「細胞ファイバ」を用いた筋細胞と線維芽細胞の共培養 |
| 3. 学会等名 第5回日本筋学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|