

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：34406

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04520

研究課題名(和文) マイオカイン探索研究のための体外可動型培養骨格筋の開発

研究課題名(英文) Tissue-engineered skeletal muscle for myokine secretion

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) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋の運動に伴って分泌されるマイオカインが注目されている。数十以上のマイオカインがあるとされているが、多くは未知である。生体(動物)を用いたin vivo(生体内)でのマイオカイン探索では、骨格筋以外他組織からの分泌物やホルモンなどの影響もあり、明確な評価は容易でない。われわれは骨格筋芽細胞とコラーゲンから作製した培養骨格筋を用い、等尺性・等張性など種々の収縮運動モード下で分泌されるマイオカインを評価できるデバイスを新たに開発し、マイオカインの同定や分泌条件の最適化を目指した。その結果、1日あたり6時間の電気刺激を7日間加えた条件が、最も収縮力およびIL-6の分泌が高いことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養骨格筋に各種電気刺激を与え、収縮力およびマイオカインIL-6の分泌について検討した。無数にある電気刺激条件の中で、培養骨格筋の収縮力が低下せず、また培地のpH等への影響も少ない周波数0.5Hzに固定して検討したところ、1日あたり6時間の電気刺激を7日間加えた条件が、最も収縮力およびIL-6の分泌が高いことを確認した。また、培養骨格筋周囲をアルギン酸ゲル膜でコーティングすることで、培養骨格筋内に分泌されたIL-6を閉じ込めることを確認した。これによって、マイオカインを豊富に含む培養食肉への応用可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Myokines secreted during skeletal muscle movement have attracted much attention. Currently, there are more than several dozen myokines, many of which are unknown. In the in vivo search for myokines using living animals, it is not easy to clearly evaluate myokines due to the influence of other tissues than skeletal muscle. Using cultured skeletal myoblasts and collagen, we developed a new device to evaluate myokines secreted under various contraction modes, such as isometric and isotonic, in order to identify myokines and optimize the secretion conditions. As a result, we confirmed that the highest contractility and secretion of IL-6 were observed under the condition of 6 hours of electrical stimulation per day for 7 days.

研究分野：生体組織工学

キーワード：組織工学 培養骨格筋 マイオカイン IL-6 培養肉

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

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、単に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、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を柔軟に変化させる。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、骨格筋運動が身体の健康維持に与える作用機序が解明されつつある。

現在、数十以上のマイオカインがあるとされているが、多くは未知である。生体(動物)を用いたin vivo(生体内)でのマイオカイン探索では、運動後における骨格筋の遺伝子解析や、骨格筋から抽出された物質の解析を行う。しかし、骨格筋以外他組織からの分泌物質やホルモンなどの影響もあり、明確な評価は容易でない。また、通常の平面培養した骨格筋細胞を用いたin vitroでの探索でも、シリコンチャンバーを用いた伸展培養装置の利用などの例はあるものの、組織構造が生体筋とは全く異なるため生体と同一視することはできない。

## 2. 研究の目的

これまでin vitro(生体外)で骨格筋芽細胞とコラーゲンから培養骨格筋を作製し、繰り返し屈伸運動できるマイクロマシン駆動用デバイスを開発した。このデバイスを改良することで、等尺性・等張性など種々の収縮運動モード下で分泌されるマイオカインを評価できるデバイスを新たに開発し、マイオカインの同定や分泌条件の至適化を目指した。

培養骨格筋デバイスでマイオカインを大量分泌させ、正常あるいは疾患モデルマウス・ラットに投与し、その有効性を確認することが本研究の最終目標である。すなわち、今後はマイオカインを大量分泌させて各種疾患モデル動物へ投与し、効果を確認することを次の目標としたい。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 三次元培養骨格筋の作製

11.30±0.3mm離して設置した2本のキルシュナー鋼線に固定した人工腱の間にC2C12細胞を $1.0 \times 10^7$  cells/mL含むブタ由来コラーゲンを100 $\mu$ L播種し、30分間、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%、湿度100%の環境下で静置させ、ゲル化させた。作製後、2日間は増殖培地(GM)で培養し、その後、分化培地(DM)で培養した。

### 3-2. 電気刺激

電気刺激デバイスを用いて培養骨格筋に電気刺激を与えた。デバイスは3DCADソフトを用いて製図したものをAFINA 3Dプリンターにポリカーボネートフィラメントを用いて作製した。電極には白金を用いており、培養骨格筋の長軸方向に電気刺激デバイスを培地内に入れ、培地内を通じて培養骨格筋に電気刺激を与えた(Fig.1)。電気パルスはファンクションジェネレーターWF1974(エヌエフ回路設計ブロック)を用いて刺激波形を作成し、高速電力増幅器により増幅させた。電気刺激の波形は5V, 0.5Hz, 2msecの矩形波刺激となるようにオシロスコープで確認した。また、電気刺激時間はArduino Unoとリレーにより制御を行った(Fig.2)。

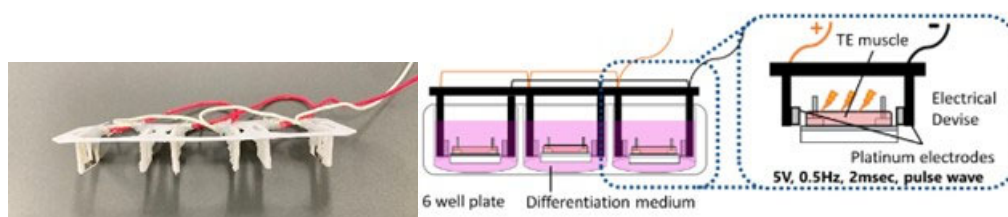


Fig.1 Culture device.

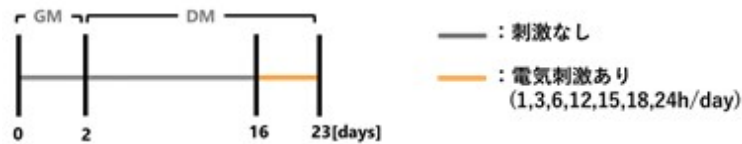


Fig.2 Culture protocol.

### 3-3. 等尺性収縮力測定

培養終了後、等尺性収縮力を測定した。荷重センサと微動ステージで作られた装置にpHの変化を抑えるためにHEPES含有GMを入れ、培養骨格筋を取り付けた。荷重の変化が安定するまで静置し、等尺性収縮力を測定した。電気パルスの信号源としてファンクションジェネレーターを使用し、高速電力増幅器により増幅した信号を培地に印加した。培養骨格筋の長軸方向を挟み込むように白金平板電極を設置し電気刺激を印加した。荷重センサによって得られた信号は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。印加条件はパルス幅2msec、電圧50V、周波数50Hzを3回印可し、サンプリング周波数500Hzで測定を行った。

### 3-4. マイオカインIL-6分泌量の定量

培養終了後に回収した培地、及び培養骨格筋をホモジナイザーで粉碎して遠心分離により回収した上清のIL-6濃度を、Mouse IL-6 Assay Kit(免疫生物学研究所)を用いて測定した。

### 3-5. LDHの定量

Cytotoxicity LDH Assay Kit-WSTを用いて培養骨格筋の損傷評価としてLDH測定を行った。

### 3-6. 培養骨格筋のゲルコーティング

分泌されたIL-6が培地中に拡散されないように培養骨格筋周囲を含水ゲル膜でコーティングした。2週間培養した培養骨格筋をアルギン酸ナトリウム水溶液、塩化カルシウム水溶液の順に添加していき、三次元培養骨格筋の周りにゲル膜をコーティングした。ゲル膜を構成する際に使用するアルギン酸ナトリウムは、粘度300~400cPと500~600cPを使用した。コーティング後、IL-6の保持量を測定した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 等尺性収縮力

1-9h/dayの電気刺激を1週間与え続けた結果、電気刺激を与えなかった培養骨格筋の収縮力と比較し、変化はなかった。しかし、12h/dayの収縮力は上昇傾向にあった。また、12h/day以降の電気刺激において、有意な収縮力の減少がみられた(Fig.3a)。電気刺激を与えなかった培養骨格筋と各条件で電気刺激を与えた培養骨格筋の組織に損傷は見られなかった(Fig.3b)。

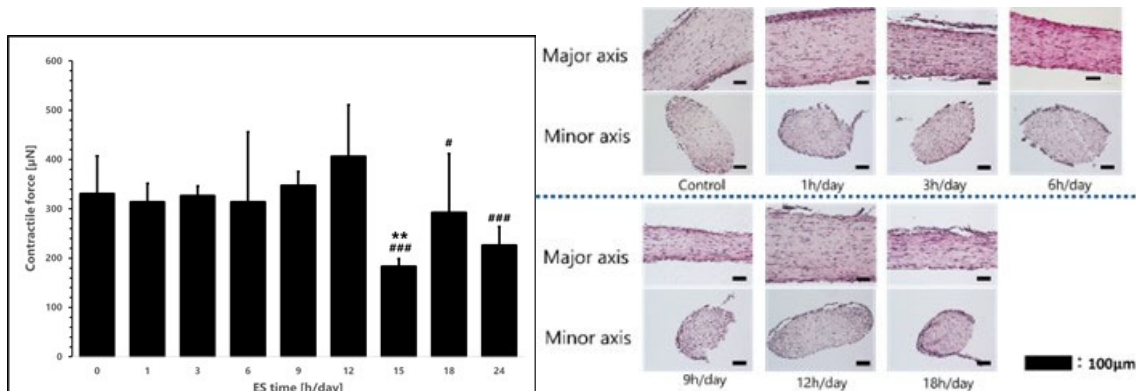


Fig.3 (a) Contractile force and (b) HE staining.

#### 4-3. IL-6分泌量

培地内では6h/dayにおいて有意な上昇が確認された。12h/dayにおいて分泌量の減少が確認されたが、15h/day以降で上昇が確認された(Fig.4a)。培養骨格筋内では同じ傾向であったが、培地内に比べて1/20程度であった(Fig.4b)。

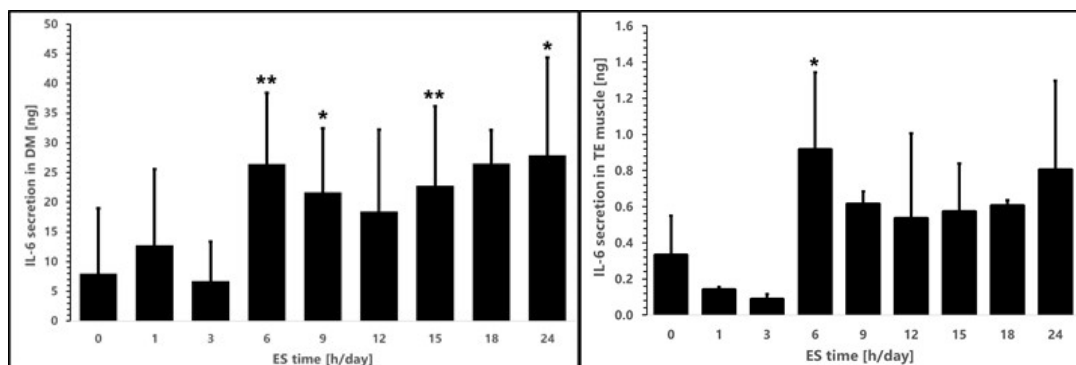


Fig.4 Amount of IL-6 in (a) culture medium and (b) engineered muscle.

#### 4-3. LDHの定量

電気刺激条件15h/dayの時に最もLDHが活性化しており、また収縮量の結果と見比べてみると、最も収縮力が低下した15h/dayの時にLDHが活性化した(Fig.5a)。

#### 4-4. ゲルコーティング

アルギン酸ナトリウムを濃度300~400cPよりも500~600cPでコーティングした方がIL-6濃度が高くなった。このことから、アルギン酸ナトリウムの粘度はIL-6の保持に影響することが示唆された。

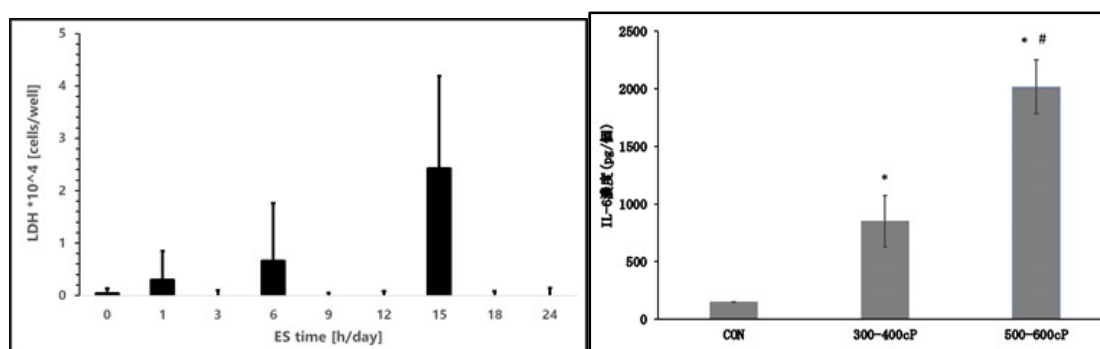


Fig.5 Amount of (a) LDH in culture medium and (b) IL-6 in coated engineered muscle.

#### 4-5. 考察

低周波による電気刺激によって、培養骨格筋の収縮力は1-9h/dayでは電気刺激を与えなかった培養骨格筋と比較し、有意な差は見られなかった、しかし、12h/dayでは有意な上昇、15h/day、18h/dayでは有意な減少がみられた。また、15h/day以降では12h/dayとの有意な収縮力の減少がみられた(15h/day, 24h/day<0.001, 18h/day<0.01)。15h/dayで急激に収縮力が低下した原因として、電気刺激により多くの細胞膜が破壊された可能性がある。

IL-6分泌においては、培養骨格筋内と培養骨格筋外とで各条件における増減は同じであることが分かった。さらに、培養筋内よりも培地内にIL-6量が多かったことから、培養筋が収縮運動して生成されたIL-6のほとんどは培養筋外に分泌されることが分かった。このことから、電気刺激による収縮運動を行うことによって、IL-6分泌を促すのに有効であることが分かった。

また、収縮力とIL-6分泌を比較したところ、そこに相関性は見られなかった。このことから、筋力増強とIL-6分泌には異なったメカニズムが働いているとみられる。

IL-6は免疫系のサイトカインとして知られ、炎症期にはマクロファージや好中球、T細胞、

線維芽細胞, グリア細胞など, さまざまな種類の細胞により産生される。また免疫系だけでなく, 細胞増殖の調整, 遺伝子活性化, 分化, 生存などの多くの生理的現象にも作用されることが知られている。本研究で用いている培養骨格筋はC2C12とコラーゲンゲルのみから構成される組織であり, 免疫系の細胞は含まれていない。LDHの活性化がみられるため, 電気刺激によって膜レベルの損傷が確認されるものの, IL-6は培養骨格筋の収縮運動によって放出されたマイオカインであると考えられる。

培養骨格筋の周りにアルギン酸ナトリウムと塩化カルシウムの濃度や時間を変えてアルギン酸カルシウム膜をコーティングし, IL-6の保持を試みたところ, アルギン酸カルシウム膜をコーティングすることができ, 膜を構成するアルギン酸ナトリウムの粘度を高くすることでIL-6の保持量が増加することがわかった。IL-6透過実験からは, アルギン酸カルシウム膜はIL-6を24時間程度は保持することが認められた。今後はよりIL-6が透過しにくく, 三次元培養骨格筋の自己収縮運動でも破れない膜を模索すると同時に, 他のマイオカインが収集できているかも検討したいと考える。

#### 4-6. 結論

培養骨格筋の収縮力において, 一日あたりに与える電気刺激の時間が12時間で最大となり, その後, 有意な減少が確認された。これは筋肉の細胞膜が電気刺激によって膜が破壊されたためではないかと考察する。また, IL-6分泌と収縮力との間に相関性は見られなかったことから, 筋力増強とマイオカイン産生には別のメカニズムが働いていると考えられる。また, IL-6の分泌とLDH産生には相関性がみられなかった。HE染色画像から組織損傷が起こっていないことから, IL-6は培養骨格筋の収縮運動によって放出されたマイオカインであると考えられる。また, 培養骨格筋周囲をアルギン酸ゲル膜でコーティングすることで, 培養骨格筋内に分泌されたIL-6を閉じ込めることを確認した。これによって, マイオカインを豊富に含む培養食肉への応用可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 3件）

1. 著者名 Kobayashi Mako, Ohara Masako, Hashimoto Yoshihide, Nakamura Naoko, Fujisato Toshiya, Kimura Tsuyoshi, Kishida Akio	4. 巻 16
2. 論文標題 Effect of luminal surface structure of decellularized aorta on thrombus formation and cell behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0246221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0246221	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 -
1. 著者名 Nakamura Tomohiro, Takagi Shunya, Okuzaki Daisuke, Matsui Seika, Fujisato Toshia	4. 巻 132
2. 論文標題 Hypoxia transactivates cholecystokinin gene expression in 3D-engineered muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 64～70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.03.006	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 -
1. 著者名 藤里俊哉	4. 巻 72
2. 論文標題 バイオ人工骨格筋 - 再生医療からマイクロロボット駆動源, 食料まで -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学工業	6. 最初と最後の頁 341～346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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, Okuzaki Daisuke, Matsui Seika, Fujisato Toshia	4. 巻 132
2. 論文標題 Hypoxia transactivates cholecystokinin gene expression in 3D-engineered muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 64～70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.03.006	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 Kobayashi Mako, Ohara Masako, Hashimoto Yoshihide, Nakamura Naoko, Fujisato Toshiya, Kimura Tsuyoshi, Kishida Akio	4. 巻 8
2. 論文標題 In vitro evaluation of surface biological properties of decellularized aorta for cardiovascular use	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 10977 ~ 10989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0TB01830A	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 Kobayashi Mako, Kadota Junpei, Hashimoto Yoshihide, Fujisato Toshiya, Nakamura Naoko, Kimura Tsuyoshi, Kishida Akio	4. 巻 21
2. 論文標題 Elastic Modulus of ECM Hydrogels Derived from Decellularized Tissue Affects Capillary Network Formation in Endothelial Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6304 ~ 6304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176304	査読の有無 無
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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Abe H, Sawada K, Fujisato T
2. 発表標題 Animal tissue processing utilizing supercritical carbon dioxide
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀野悟士, 澤田和也, 藤里俊哉
2. 発表標題 新規な足場材料を用いた人工筋組織の創生
3. 学会等名 第31回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2022年

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 機械刺激を与えた培養骨格筋からのマイオカイン産生
3. 学会等名 第31回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木海渡, 佐久田稜, 藤里俊哉
2. 発表標題 培養骨格筋に対する電気刺激における印加部の作成と評価
3. 学会等名 第31回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森茉奈美, 藤里俊哉, 澤田和也
2. 発表標題 三次元細胞培養を目指したスキャフォールドのナノファイバーによる被覆化
3. 学会等名 第31回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田汐里, 古賀野悟士, 藤里俊哉
2. 発表標題 培養骨格筋の足場材料としての魚鱗由来コラーゲンスポンジ
3. 学会等名 第31回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 中村友浩, 今井尚馬, 藤里俊哉
2. 発表標題 筋細胞株C2C12細胞におけるコレシストキニン遺伝子発現動態の解析
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇津奨麻, 佐久田稜, 藤里俊哉, 横山 奨
2. 発表標題 マイオカイン生成を目指した人工骨格筋伸縮装置の開発
3. 学会等名 2020年度日本機械学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井尚馬, 杉本岳史, 橋本健志, 藤里俊哉, 中村友浩
2. 発表標題 機械的除負荷が三次元培養骨格筋に与える影響
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白井佑布子, 藤里俊哉
2. 発表標題 培養骨格筋の機能向上を目指した培養方法に関する研究
3. 学会等名 第30回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤里俊哉、中村友浩、横山 奨、長森英二	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 322
3. 書名 代替プロテインによる食品素材開発	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生命支援バイオ技術のための研究開発・人材教育プラットフォーム構築  <a href="https://www.research.oit.ac.jp/portfolio-item/project_04/">https://www.research.oit.ac.jp/portfolio-item/project_04/</a></p>
--

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	中村 友浩  (NAKAMURA Tomohiro)  (30217872)	大阪工業大学・工学部・教授    (34406)	
研究分担者	横山 奨  (YOKOYAMA Sho)  (30760425)	大阪工業大学・工学部・講師    (34406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------