

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2009～2010

課題番号：21686079

研究課題名 (和文) 機能性磁性ナノ粒子を用いた筋組織再生技術によるバイオアクチュエータの開発

研究課題名 (英文) Development of bio-actuator constructed by magnetic force-based tissue engineering

研究代表者

井藤 彰 (ITO AKIRA)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：60345915

研究成果の概要 (和文)：筋肉はきわめて高いエネルギー効率を有する動力素子 (アクチュエータ) である。本研究では、磁力を用いた組織工学技術を応用して、高密度の筋芽細胞からなる三次元組織を構築し、電気刺激に応じて収縮運動する人工筋組織を構築することに成功した。さらに、人工筋組織の高機能化を目指して、筋芽細胞への遺伝子導入を行い、機能向上を評価した。

研究成果の概要 (英文)：If an artificial skeletal muscle can be applied as an actuator, it may exhibit high energy conversion efficiency. In this study, we successfully constructed three-dimensional tissue-like structures composed of myoblast cells by using a magnetic force-based tissue engineering technique. The tissue contracted rhythmically in response to electrical pulses. Moreover, we constructed genetically engineered myoblast cells to promote their performance as bio-actuator.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
年度			
年度			
年度			
総計	11,800,000	3,540,000	15,340,000

研究分野：生体医用工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：ティッシュエンジニアリング、磁性ナノ粒子、バイオアクチュエータ、骨格筋

1. 研究開始当初の背景

我々の身の回りにあるアクチュエータ (入力されたエネルギーを運動に変換する装置) と比較すると、筋肉はきわめて高いエネルギー効率を有している。培養筋芽細胞から分化誘導した筋組織を生体外で人工的に再生する研究は長らく行われているが、作製した筋組織を再生医療ではなく、アクチュエータに応用する研究はほとんど行われておらず、筋

芽細胞を用いた実用的なアクチュエータの開発には至っていない。

我々は今までに、標的分子デザインとして、細胞に特異的な抗体やリポソームで被覆した機能性磁性ナノ粒子を用いて、バイオターゲティングの研究を行ってきた。さらに、バイオターゲティング技術を、近年、夢の医療として期待される再生医療分野へと発展させている。具体的には、機能性磁性ナノ粒子

を細胞に添加することで細胞を磁気標識し、磁力で引きつけることにより、細胞を層状に積み重ねていき、一定時間磁力で保持することによる三次元培養で細胞外マトリクスを形成させ、三次元組織を構築する技術を開発した。この技術によって、心筋や皮膚といった、細胞を重層化させてシート構造にすることで機能がはるかに促進される組織が構築可能であることを示してきた。さらに我々は、磁性ナノ粒子を様々な生物活性をもつバイオ材料で修飾し、機能性磁性ナノ粒子を磁力で操作することで、細胞の形態・挙動・運命を制御する技術への発展を行ってきた。また、磁性ナノ粒子を含む血管内皮細胞を細胞シート上に磁気マイクロパターンングすることで、複雑な形状かつ複数種類の細胞を含む組織を作製する技術の開発を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発した再生医療のための「磁力を用いた三次元組織構築技術」を応用して、筋芽細胞からなる三次元組織を構築し、筋芽細胞の分化誘導を行うことによる「機能する」つまり刺激に応じて収縮運動する人工筋組織（バイオアクチュエータ）を構築することを目的として研究を行った。

医療目的ではなく、アクチュエータとして筋芽細胞を使用する場合には、制限なく人工的に細胞を改良することができる。研究データが蓄積されたマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を使用し、筋細胞アクチュエータとしての機能を強化する遺伝子を導入することで、バイオテクノロジーを駆使したバイオアクチュエータ専用筋芽細胞株の構築を目指した。機能強化遺伝子として、筋芽細胞の増殖と分化を促進するインスリン様増殖因子 (IGF) -I 遺伝子を導入した細胞を作製して、機能を調べた。

3. 研究の方法

(1) 磁力を用いた三次元筋組織の構築

図1に磁力を用いた筋組織の構築法を示す。まず、C2C12細胞に正電荷脂質で包埋した磁性ナノ粒子 (Magnetite cationic liposome, MCL) を添加することで、細胞を磁気標識した。次に、低接着性培養皿の中心にシリコン栓を設置し、シリコン栓と培養皿の間にできた隙間に磁気標識した細胞を播種し、磁石の上に設置して培養を行った。1時間後には培養皿の底面に重層化細胞シートが形成し、12時間後には細胞シートが収縮してシリコン栓に巻きついて環状筋組織を形成した。環状筋組織を2日間培養した後、マトリゲルとコラーゲンゲルの混合ゲルを環状筋組織に塗布し、その後環状筋組織を取り外して35 mm培養皿に移してシリコンラバー上に虫ピン

で固定して分化誘導培地で培養を行った。作製した筋組織の機能評価を行うために、筋組織の組織学的評価、生化学的評価、電気刺激によって発生する力学的評価を行った。

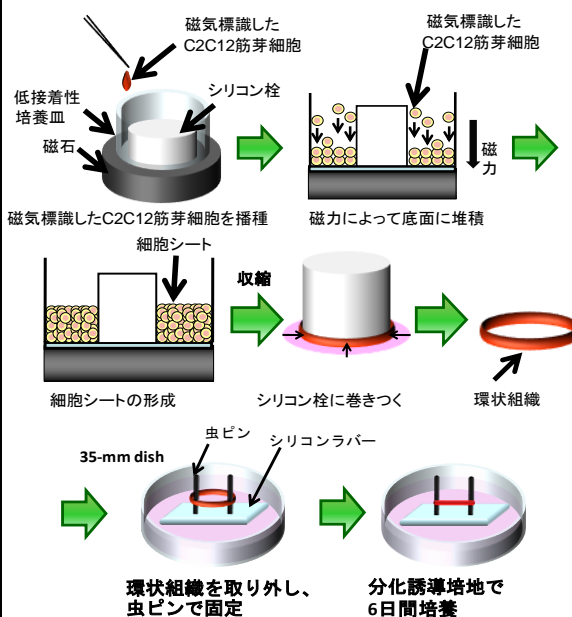


図1 三次元筋組織の作製方法

(2) 遺伝子導入筋芽細胞の作製

バイオアクチュエータ専用筋芽細胞株を構築するために IGF-I 遺伝子の導入を行った。遺伝子発現の細胞への影響を評価するため、Tet-On システムを利用して、ドキシサイクリン (Dox) 添加によって遺伝子発現が誘導されるベクターを構築した。IGF-I 遺伝子をレトロウイルスベクターで C2C12 細胞に導入した。目的遺伝子の発現を確認するために RT-PCR および ELISA を行った。

IGF-I は筋芽細胞の増殖および分化に効果があるという報告があることから、遺伝子導入細胞の増殖速度を継時的なセルカウントで、また分化誘導培養後の筋管形成頻度と筋管の太さを顕微鏡画像から測定した。

4. 研究成果

(1) 磁力を用いた三次元筋組織の構築

図2に作製した組織の組織学的検討の結果を示す。分化誘導7日目の筋組織についてヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行ったところ、細胞が高密度に存在し、かつ、配向して多核化した筋管細胞を観察することができた。さらに、分化誘導7日目の筋組織に対して免疫染色を行ったところ、作製した筋組織内に筋肉の収縮装置であるサルコメア構造を観察することができた。これらの結果から、筋芽細胞を磁力で集積させることで、筋組織を構築ことに成功した。

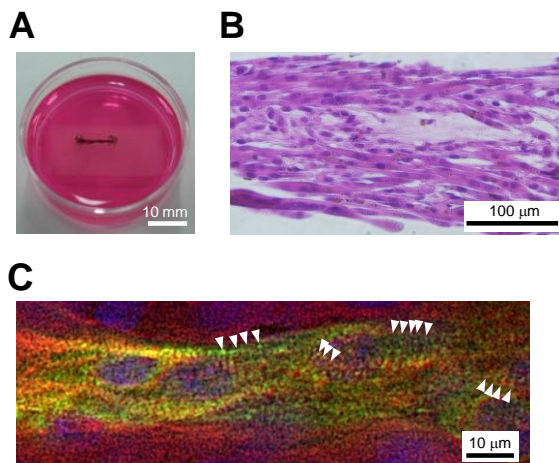


図2 分化誘導筋組織の組織学的評価。(A) 分化誘導 17 日目の筋組織。(B) HE 染色 (C) 分化誘導 7 日目の筋組織の免疫染色 (緑; α -アクチニン、赤; ファロイジン、青; DAPI)。矢印はサルコメアを示す。

図3に生化学的な検討結果を示す。ウエスタンブロット法から、分化が開始すると発現する Myogenin と、筋形成・収縮に関与している Myosin Heavy Chain (MHC) と Tropomyosin の発現を確認した。また、筋組織の成熟度のマーカーであるクレアチンキナーゼ活性を測定したところ、分化誘導日数が経つにつれてクレアチンキナーゼの活性が上昇した。これらの結果から、分化誘導日数が経過するにつれて、筋組織の分化が進んでいくことが示唆された。

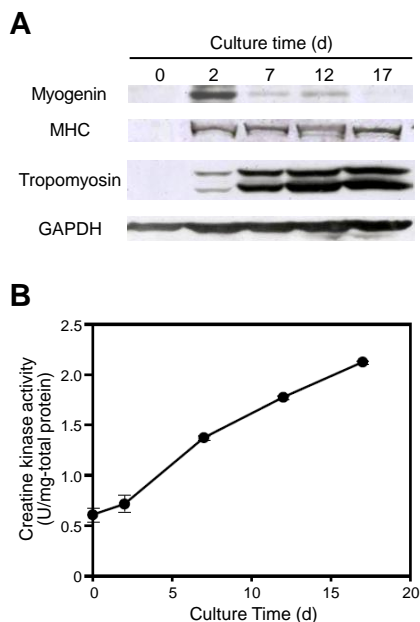


図3 筋特異的タンパク質発現の経時変化。(A) ウエスタンブロット。(B) クレアチンキナーゼ活性。

力学的評価の結果を図4に示す。作製した筋組織の収縮力を測定するために、筋組織に電気パルスを当てて筋組織の収縮応答を調べた。印加電圧 15 V、パルス幅 10 ms の電気パルスを与えたとき、筋組織の単収縮を確認することができた。また、印加電圧 15 V、パルス幅 10 ms、周波数 50 Hz で 2 秒間電気パルスを与えたとき、筋組織の強収縮を確認することができた。また、周波数を変化させて電気刺激を行った時、作製した筋組織はそれぞれの周波数に応じて収縮応答を示した。また、10 Hz 以降では収縮力が大きくなったが、これは強収縮と呼ばれる現象で、生体内の骨格筋と同様の生理現象が生じたと考えられる。

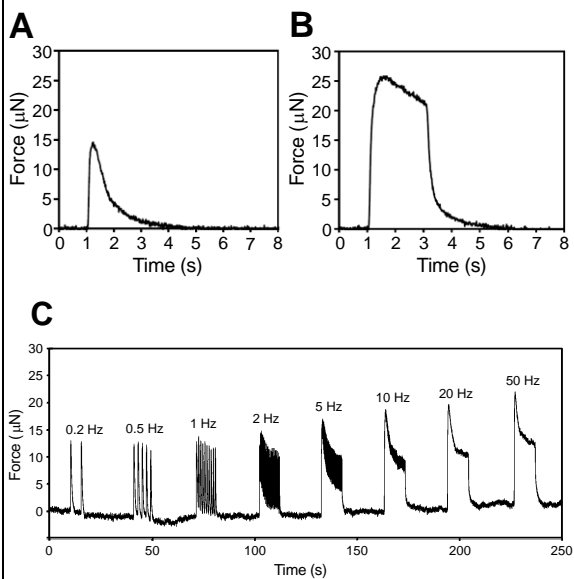


図4 作製した筋組織の収縮応答 (分化誘導 7 日目)。(A) 単収縮。(B) 強収縮。(C) 周波数を変化させたときの筋組織の収縮応答 (左から 0.2、0.5、1、2、5、10、20、50Hz)。

以上の結果から、筋特異的なタンパク質の発現を確認することができ、また、電気刺激に応答して力を発生したことから、本方法で作製した筋組織はバイオアクチュエータに応用可能であると考えられる。しかしながら、作製した筋組織をアクチュエータとして用いるためには、さらに強力な筋組織を誘導する必要がある。本方法で作製した筋組織の収縮力は断面積あたりにすると 1 mN/mm^2 であり、マウス生体内の骨格筋組織が発生する力の 0.5% 程度であった。そこで、次に、遺伝子導入による機能強化筋組織の構築を目指して、IGF-I 遺伝子導入筋芽細胞の作製を行い、機能が向上するかどうかを調べた。

(2) 遺伝子導入筋芽細胞の作製

レトロウイルスベクターを用いて、IGF-I 遺伝子を C2C12 細胞に導入することで、C2C12/IGF 細胞を作製した。C2C12/IGF 細胞

に Dox を添加した細胞 [C2C12/IGF (Dox+) 細胞] は、IGF-I を誘導発現した (図 5)。

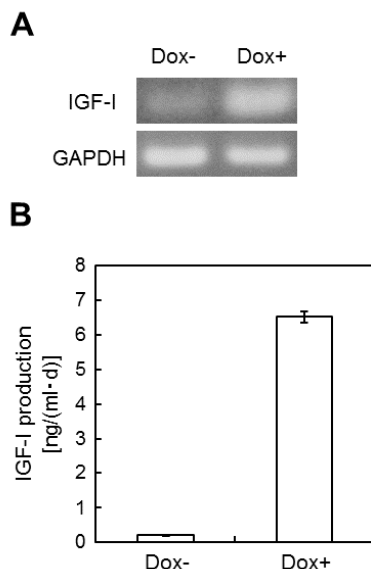


図 5 IGF-I 遺伝子の誘導発現。(A) RT-PCR 法による mRNA の検出。(B) ELISA 法によるタンパク質の定量。

IGF-I は筋芽細胞の増殖を促進するといった報告がある。そこで、C2C12/IGF (Dox+) 細胞の増殖能を調べたところ、親株 C2C12 細胞および C2C12/IGF (Dox-) 細胞と比較して、増殖速度の向上がみられた (図 6)。

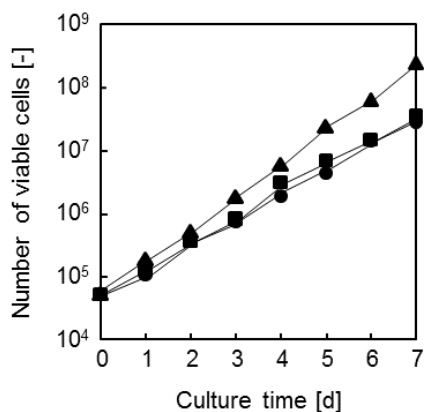


図 6 IGF-I 遺伝子発現による増殖促進効果。●, C2C12 細胞; ■, C2C12/IGF (Dox-) 細胞; ▲, C2C12/IGF (Dox+) 細胞

次に、IGF-I は筋芽細胞の分化および筋肥大を促進するといった報告があることから、分化誘導培養 7 日後の C2C12/IGF (Dox+) 細胞の筋管の面積および幅を調べたところ、親株 C2C12 細胞および C2C12/IGF (Dox-) 細胞と比較して、面積・幅ともに有意な向上がみられた (図 7)。

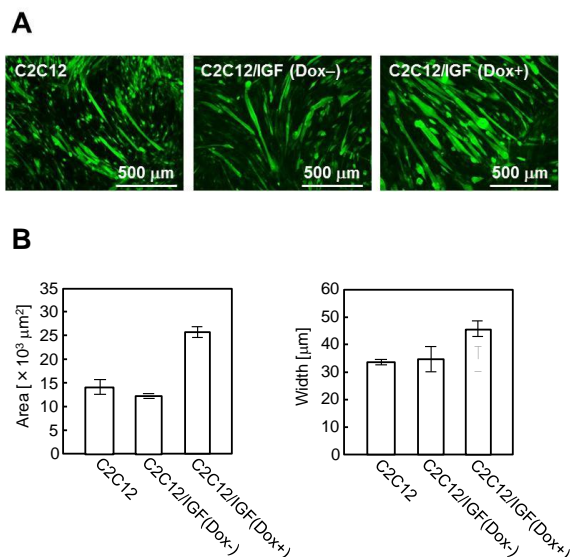


図 7 IGF-I 遺伝子発現による分化および筋肥大の効果。(A) 抗 α アクチニン抗体による筋管の蛍光染色。(B) 蛍光顕微鏡画像の定量的解析。左) 筋管の面積。右) 筋管の幅。

これらの結果から、IGF-I 遺伝子導入 C2C12 細胞は、増殖能と分化能の亢進により、ティッシュエンジニアリングで作製したバイオアクチュエータに有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yasunori Yamamoto, Akira Ito, Hideaki Fujita, Eiji Nagamori, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Functional Evaluation of Artificial Skeletal Muscle Tissue Constructs Fabricated by a Magnetic Force-Based Tissue Engineering Technique. *Tissue Engineering Part A*, (査読有) 17(1-2), pp. 107-114, (2011).
- ② Hirokazu Akiyama, Akira Ito, Masanori Sato, Yoshinori Kawabe and Masamichi Kamihira, Construction of Cardiac Tissue Rings Using a Magnetic Tissue Fabrication Technique. *International Journal of Molecular Sciences*, (査読有) 11(8), pp. 2910-2920, (2010).
- ③ Hirokazu Akiyama, Akira Ito, Yoshinori Kawabe, and Masamichi Kamihira, Genetically Engineered Angiogenic Cell Sheets Using Magnetic Force-Based Gene Delivery and Tissue Fabrication Techniques. *Biomaterials* (査読有) 31(6), pp. 1251-1259 (2010)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Yasunori Yamamoto, Akira Ito, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Fabrication of Artificial Skeletal Muscle Tissues by a Magnetic Force-Based Tissue Engineering Technique. The 16th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC 2010), 平成22年11月10日, 元智大学 (台湾)
- ② Hirokazu Akiyama Akira Ito, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Fabrication of Angiogenic Gene-Modified Myoblast Cell Sheets Using Magnetic Tissue Engineering Techniques. International Conference on Chemical Engineering 2010, 平成22年10月21日, サンフランシスコ (アメリカ)
- ③ Yasunori Yamamoto, Akira Ito, Hideaki Fujita, Eiji Nagamori, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Magnetic Force-Based Tissue Engineering of Skeletal Muscle. 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 平成22年9月14日, リミニ (イタリア)
- ④ 佐藤暢哲, 井藤 彰, 河邊佳典, 長森英二, 上平正道, IGF-I遺伝子導入による高機能筋芽細胞の作製. 化学工学会第42回秋季大会, 平成22年9月6日, 同志社大学 (京都市)
- ⑤ 井藤 彰, 河邊佳典, 長森英二, 上平正道, ティッシュエンジニアリングによる筋組織構築とバイオアクチュエータへの応用. 化学工学会 第42回秋季大会, 平成22年9月6日, 同志社大学 (京都市)
- ⑥ 佐藤暢哲, 井藤 彰, 河邊佳典, 藤田英明, 長森英二, 上平正道, バイオアクチュエータのためのIGF-I遺伝子導入筋芽細胞の作製. 第47回化学関連支部合同九州大会, 平成22年7月10日, 北九州国際会議所 (北九州市)
- ⑦ 山本泰徳, 井藤 彰, 河邊佳典, 藤田英明, 長森英二, 上平正道, 機能性磁性ナノ粒子を用いて作製した人工筋組織の機能評価. 化学工学会第75年会, 平成22.3月20日, 鹿児島大学 (鹿児島市)
- ⑧ Yasunori Yamamoto, Akira Ito, Hideaki Fujita, Eiji Nagamori, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Construction of Skeletal Muscular Tissue-Like Structures by a Magnetic Force-Based Tissue Engineering Technique. APBioChEC2009, 平成21年11月26日, 神戸市

- ⑨ Akira Ito, Hirokazu Akiyama, Yasunori Yamamoto, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Skeletal Muscle Tissue Engineering Using Functional Magnetite Nanoparticles. MHS2009, 平成21年11月10日, 名古屋市
- ⑩ 井藤 彰, 山本泰徳, 河邊佳典, 藤田英明, 清水一憲, 長森英二, 上平正道, 機能性磁性ナノ粒子を用いた筋組織再生技術によるバイオアクチュエータの開発. 第2回化学工学3支部合同北九州大会, 平成21年10月31日, 北九州市
- ⑪ 井藤 彰, 磁力を用いたティッシュエンジニアリング技術による筋組織の構築. 第61回日本生物工学会大会, 平成21年9月25日, 名古屋市
- ⑫ 秋山弘和, 井藤 彰, 河邊佳典, 上平正道, 血管新生因子を遺伝子導入した細胞シートの作製と評価. 第61回日本生物工学会大会, 平成21年9月23日, 名古屋市
- ⑬ 山本泰徳, 井藤 彰, 河邊佳典, 藤田英明, 長森英二, 上平正道, 磁力を用いた筋組織構築法の開発. 第46回化学関連支部合同九州大会, 平成21年7月11日, 北九州市

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002906/index.html>

<http://www.chem-eng.kyushu-u.ac.jp/lab3/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井藤 彰 (ITO AKIRA)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：60345915

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：