

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23686121

研究課題名(和文) バイオテクノロジーを駆使した人工筋組織による新原理アクチュエータの創製

研究課題名(英文) Development of bio-actuator using tissue-engineered skeletal muscle

研究代表者

井藤 彰 (Ito, Akira)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60345915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)：生体の筋肉に近い性質および性能をもつ動力素子(アクチュエータ)はロボット工学などの分野に新しい展開を生み出すと考えられる。我々は、磁力を用いた三次元組織構築技術(Mag-TE法)を利用して、高密度で配向した筋芽細胞からなる三次元組織を構築し、さらに遺伝子導入および電気刺激培養により機能を高めて、電気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)を構築することに成功した。

研究成果の概要(英文)：The development of new actuators which can mimic living muscle performances would open new horizons in robotics field. We applied a magnetic force-based tissue engineering (Mag-TE) technique to skeletal muscle tissue engineering, and succeeded to construct highly cell-dense, aligned and contractile skeletal muscle-like tissues by using a genetic engineering approach and electrical pulse stimulation in culture.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス・化学工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：骨格筋 再生医療 ティッシュエンジニアリング アクチュエータ 人工筋組織 遺伝子導入 組織培養 三次元組織

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変換効率を有している。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バイオ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、我々は、バイオターゲティング技術を、ティッシュエンジニアリング分野(Langer R, Vacanti JP. *Science* 1993)へと発展させてきた。具体的には、機能性磁性ナノ粒子で細胞を磁気標識し、磁力で細胞を積み重ねていき、磁力で保持することによる三次元培養で細胞の自己組織化を促し、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、細胞を積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マテリアルで修飾し、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ニングすることで、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

生体内で動力装置として働いているのは筋組織であり、ATPを動力源として行う収縮運動のエネルギー変換効率は、一般的な内燃機関と比べて格段に高いことが知られている。さらに、筋芽細胞は組織内で損傷が起きた場合には増殖し(自己増殖)、自らを構成するタンパク質を絶えず製造する(自己修復)ことから、筋組織を試験管内で構築して動力素子として使用することができれば「自己再生」する新しい原理のアクチュエータの創製となる。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(Levenberg et al. *Nat Biotechnol* 2005)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いない。我々は体内の動力装置である筋肉を試験管内で作製することができれば、新しい原理のアクチュエータの開発につながるという発想から、磁力を用いたティッシュエンジニアリング技術(Magnetic force-based tissue engineering, Mag-TE)を用いた筋組織の構築により、電気刺激によって収縮運動する筋組織の作製を

行った。しかしながら、作製した組織が発生する力は、マウス骨格筋組織が発生する力のわずか0.5%程度であった。また、従来型の「人工筋肉」である高分子材料を用いたソフトアクチュエータと比較して、「真の人工筋肉」ともいべきバイオアクチュエータの利点や有用性を証明することは、今までに例が無いゆえに、我々に課せられた使命である。これらの観点から、本研究は、無限増殖可能な筋芽細胞株を構成部品として、遺伝子工学技術による機能強化を行い、我々が開発した磁力を用いたティッシュエンジニアリング技術で三次元組織を構築することで、新原理バイオアクチュエータを開発し、その新しい学術領域を開拓することを目指した。

3. 研究の方法

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加工して改良することができる。無限増殖可能なマウス筋芽細胞株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細胞を構築することを目指した。機能強化のために導入する遺伝子として、筋芽細胞の「増殖と分化および筋肥大」を増強するIGF(インスリン様成長因子)-1遺伝子、「アポトーシス耐性」を付加するBcl2遺伝子を、レトロウイルスベクターを用いて導入した。これらの機能強化した筋芽細胞を用いて、磁力を用いたティッシュエンジニアリング技術によって人工筋組織を構築した。当時までに、磁力を用いたティッシュエンジニアリング技術を用いることで、筋細胞が高密度で配向した電気刺激で収縮運動する筋組織の作製に成功していた。ここで、「動く」筋組織の作製に成功したことは画期的な成果である一方、「筋肉トレーニング」を行うことで、さらにその発生する力を高めるチャンスを獲得したことを意味する。ここで筋力トレーニングとは、人工筋肉を電気刺激を繰り返して収縮運動させるといった文字通り筋肉を「鍛える」アプローチである。本研究では、さまざまな電気刺激培養条件を検討し、最適な「筋力トレーニングプログラム」を探索した。さらに、これら遺伝子工学および物理的刺激による筋肉トレーニングといったアプローチの併用により、人工筋組織の収縮力のさらなる向上を図った。また、バイオアクチュエータのもつ特長の一つである「自己再生能」を証明するための検討を行った。生体内の骨格筋は外傷等で壊死に陥った場合には活発な再生を行うが、成熟筋細胞は多核細胞で細胞分裂能をもたないため、壊死した筋細胞が再生するには、筋組織の辺縁に存在する筋サテライト細胞が基底膜上をくまなく動きまわり、活性化・増殖・分化することが必要である。ここで、本研究で使用するC2C12細胞は筋サテライト細胞由来の株化細胞で

あるため、人工筋組織辺縁に存在する未分化 C2C12 細胞は筋組織の自己再生能を担うと考えられる。本研究では、基底膜成分や筋組織間質系の細胞外マトリクスを用い、その成分を変えたときの人工筋組織上の C2C12 細胞の動きをタイムラプス顕微鏡解析で追跡することで、C2C12 細胞の運動性を調べ、また筋管形成への関与を調べた。

4. 研究成果

(1) 遺伝子導入筋組織の機能評価

筋組織をアクチュエータとして使用する場合に、遺伝子導入によって筋芽細胞の能力を高めることが可能になると考えられる。

IGF-1 遺伝子を導入した C2C12 細胞 (C2C12/IGF 細胞) の機能を評価したところ、C2C12/IGF 細胞は、IGF-1 のパラクリン/オートクリン作用によって、増殖能・分化能ともに向上した。また、C2C12/IGF 細胞を使用して作製した人工筋組織は、収縮力が 1.5 倍に増加した。

Bcl2 はミトコンドリアにおける抗アポトーシス作用を発するタンパク質として知られている。Bcl2 遺伝子を導入した C2C12 筋芽細胞 (C2C12/Bcl 細胞) は、Bcl2 の抗アポトーシス作用によって、組織構築後の細胞の高密度化に伴う低酸素状態でも細胞の生存率が向上し、筋組織の発生する力が約 2 倍に増強された。

これらの結果から、これらの遺伝子導入筋芽細胞はバイオアクチュエータ構築に有用であることが分かった。

(2) 人工筋組織の電気刺激培養

以前までに、磁力を用いた三次元組織構築技術で、電気刺激によって収縮する筋組織を作製することに成功していた。電気刺激のプログラムを筋力トレーニング用に変更して電気刺激培養を行った。印可電圧・周波数・パルス幅を変えて条件検討を行ったところ、0.3 V/mm, 1 Hz, 4 ms の電気刺激条件で培養した場合に最も効果が高く、電気刺激培養なしの場合と比較して約 5 倍強い力を発生する人工筋組織を作製することに成功した。この電気刺激培養による収縮力向上効果は予想以上に高かったことから、本手法は骨格筋のティッシュエンジニアリングに非常に有効な手段であると考えられる。また、本研究結果は、電気刺激の電圧値とパルス時間といった二つのパラメータによらず、その電気刺激条件が筋組織を最大収縮力の何%の力を発揮させる負荷であるか、という新しい指標 (%Pt) を生み出した点で、世界的にインパクトが高いと考えられる。

(3) 培養筋芽細胞のタイムラプス解析

基底膜などの細胞外マトリクスの影響を調べるために、コラーゲンタイプ I、コラーゲン

タイプ IV、ラミニン、あるいはフィブロネクチンがコートされた培養皿を用いて、人工筋組織の収縮力増強に効果がみられた点でバイオアクチュエータにとって有用な細胞源と考えられる C2C12/IGF 細胞における細胞遊走速度、増殖速度および分化度への影響を調べたところ、コラーゲンタイプ IV 上で培養した際に、最も高い効果が得られた。また、分化誘導途中の筋芽細胞に、C2C12/IGF 細胞をコラーゲンタイプ IV と共に添加して培養を行ったところ、既存の筋芽細胞に C2C12/IGF 細胞が融合した筋管が多く観察された。さらに、C2C12/IGF 細胞とコラーゲンタイプ IV の添加によって、分化してできた筋管のサルコメア構造が多く観察され、筋管の収縮運動が著しく向上した。これらの結果から、バイオアクチュエータとして、人工筋組織を作製するには、C2C12/IGF 細胞の細胞源としての使用とコラーゲンタイプ IV の添加が有効であることが示唆された。

(4) 遺伝子導入と電気刺激培養の組み合わせによる収縮力の向上効果

最後に、本研究課題のまとめとして、遺伝子導入と電気刺激培養の組み合わせによって、さらなる高機能人工筋組織構築法の開発に関する研究を行った。(1) で検討した IGF-1 および Bcl2 遺伝子を共導入した筋芽細胞を用いて三次元筋組織を構築し、(2) で検討した最適な筋力トレーニング用電気刺激のプログラム (0.3 V/mm, 1 Hz, 4 ms) で電気刺激培養を行ったところ、コントロール (遺伝子発現なし、電気刺激培養なし) と比較して、約 8 倍もの強い力を発生する人工筋組織を作製することに成功した。これらの結果から、人工筋組織における収縮力の増強には、IGF-1 および Bcl2 遺伝子導入および電気刺激培養の組み合わせが非常に有用であることが分かった。

本研究では、遺伝子導入および電気刺激培養が、人工筋組織の機能向上に有用であることを示し、さらに、バイオアクチュエータの利点としての、細胞遊走、増殖および分化による自己再生機構に、IGF-1 とコラーゲンタイプ IV の利用が有効であることを示した。バイオアクチュエータは、近年発展の著しい μ -TAS の分野における送液ポンプ等の動力に応用でき、さらに将来のパワードスーツなどのバイオ人工筋肉の基礎になりえることから、本研究の意義は非常に大きいと考えられる。世界的に見て、コラーゲンで筋芽細胞を包埋する筋組織構築法が主流であるが、生体内と比較して筋組織内のコラーゲン量が過剰となるのが問題になっている。筋芽細胞を、磁力を用いて三次元組織として構築する技術は、細胞が高密度で高度に分化・配向した筋組織を構築することを可能にした我々独自の方法でオリジナリティは高い。ま

た、アウトプットをバイオアクチュエータに置くことで、遺伝子工学技術を駆使した本研究は、これまでに例がない。さらに、バイオアクチュエータの最大の特長である「自己再生能」の証明は、本研究分野を開拓するうえで重要であり、将来的に機械工学とバイオテクノロジー分野の新しい学際領域の創出につながると考えられる。

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2件)

Masanori Sato, Akira Ito, Hirokazu Akiyama, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Effects of B-Cell Lymphoma 2 Gene Transfer to Myoblast Cells on Skeletal Muscle Tissue Formation Using Magnetic Force-based Tissue Engineering, *Tissue Engineering Part A*, 査読有, Vol. 19, No. 1-2, 2013, pp. 307-315
doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0728.

Yasunori Yamamoto, Akira Ito, Hideaki Jitsunobu, Katsuya Yamaguchi, Yoshinori Kawabe, Hiroshi Mizumoto, Masamichi Kamihira, Hollow fiber bioreactor perfusion culture system for magnetic force-based skeletal muscle tissue engineering, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, Vol. 45, No. 5, 2012, pp. 348-354
doi: 10.1252/jcej.11we237.

[学会発表](計14件)

池田 一史、佐藤 暢哲、菅野 翔太、井藤 彰、河邊 佳典、上平 正道、熱ストレスとビタミンC添加による人工骨格筋組織の機能強化、化学工学会、2014年3月18日~2014年3月20日、岐阜県岐阜市

Akira Ito, Medical Application of Magnetite Nanoparticles, 化学工学会、2014年3月18日~2014年3月20日、岐阜県岐阜市

佐藤 暢哲、池田 一史、菅野 翔太、井藤 彰、河邊 佳典、上平 正道、人工筋組織における熱ストレスとビタミンC添加の筋機能への影響、日本生物工学会、2013年9月18日~2013年9月20日、広島市

Masanori Sato, Akira Ito, Shota Kanno, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Magnetic Force-Based Tissue Engineering for Construction of Functional Skeletal Muscle Tissues, World Biotechnology Congress 2013, 2013年6月3日~2013年6月6日、Boston, USA

井藤 彰、山本 泰徳、藤田 英明、長森 英二、河邊 佳典、上平 正道、組織工学的手法で作製した骨格筋の電気刺激培養による機能強化、化学工学会、2013年3月17日~2013年3月19日、大阪市

Masanori Sato, Akira Ito, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Construction of Skeletal Muscle Tissues Using Genetically Engineered Myoblast Cells, JAACT 2012, 2012年11月27日~2014年11月30日、名古屋市

山本 泰徳、井藤 彰、河邊 佳典、藤田 英明、長森 英二、上平 正道、電気刺激による高機能人工筋組織の作製、日本生物工学会、2012年10月23日~2012年10月26日、神戸市

Akira Ito, Medical Application of Functional Magnetite Nanoparticles, International Conference of the Asia Union of Magnetics Societies 2012, 2012年10月2日~2012年10月5日、奈良市

山本 昌弘、佐藤 暢哲、山本 泰徳、井藤 彰、河邊 佳典、上平 正道、バイオアクチュエータ開発を目指したIGF-I遺伝子導入筋芽細胞の挙動解析、化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日、北九州市

佐藤 暢哲、井藤 彰、秋山 裕和、河邊 佳典、上平 正道、Bcl-2遺伝子導入によるアポトーシス耐性筋組織の作製、化学工学会、2012年3月15日~2012年3月17日、東京都

佐藤 暢哲、井藤 彰、河邊 佳典、上平 正道、IGF-I遺伝子導入による人工筋組織の収縮力の増強、日本生物工学会、2011年9月26日~2011年9月28日、東京都

山本 泰徳、井藤 彰、山口 勝矢、実延 秀昭、河邊 佳典、水本 博、上平 正道、磁力を用いた細胞積層技術による三次元筋組織の作製、化学工学会、2011年9月14日~2011年9月16日、名古屋市

Akira Ito, Yasunori Yamamoto, Yoshinori Kawabe, Masamichi Kamihira, Functional Evaluation of Artificial Skeletal Muscle Tissue Constructs Fabricated by a Magnetic Force-Based Tissue Engineering Technique, Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) 2011 Asia Pacific Meeting, 2011年8月3日~2011年8月5日、Singapore

菅野 翔太、井藤 彰、佐藤 暢哲、河

邊 佳典、上平 正道、熱ストレスによる培養筋組織の機能強化、化学関連支部合同九州大会、2011年7月9日、北九州市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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/researches.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：