

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760650

研究課題名(和文)収縮運動能を有するヒト骨格筋細胞のインビトロ培養系の開発

研究課題名(英文)Development of culture method for evaluation of contractile capability of human skeletal muscle cells

研究代表者

長森 英二(NAGAMORI, Eiji)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70394898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：以前に開発したマウス筋管細胞張力評価技術を、筋疾患治療薬スクリーニングに展開するために、ヒト初代細胞の系へと適用を図った。ヒト筋管細胞の張力発生量は、マウス筋管細胞よりも極めて微弱であるため、ヒト骨格筋由来筋芽細胞と同由来繊維芽細胞の混在比率を変化させた共培養を行うことにより、この解決を図った。予想に反し、張力の増大は観察されなかったが、筋芽細胞組織内に低濃度に混入された繊維芽細胞(細胞同士が連結していない状態)は、直ちに組織の外部に遊走し組織から抜け出すという特徴的な挙動が明らかになり、今後の筋組織の設計に重要な知見を得た。半導体歪計からの信号検出の高感度化により当初の目標は達成した。

研究成果の概要(英文)：To enhance active tension capability of human skeletal muscle myotubes derived from human skeletal muscle myoblast population, addition of human skeletal muscle fibroblast cells to myoblast population was examined. Contrary to our expectation, significant improvement of contractile capability of human skeletal muscle myotubes was not achieved, which may be caused by spatial habitation of fibroblast cells in the myoblast tissue due to the differences in its behavior of migration and cell-cell connection. Fibroblast cells mixed in the myoblast tissue rapidly and linearly migrated in the vertical direction and distributed in upper position. Further studies investigating the habitation pattern of various cell types will shed light on controlling the spatial arrangement of the heterogeneous cell population and constructing complicated tissues.

研究分野：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：骨格筋 筋芽細胞 繊維芽細胞 張力測定 細胞シート 棲み分け 自己組織化 遊走

### 1. 研究開始当初の背景

マウス骨格筋筋芽細胞 C2C12 (株化細胞) は、筋管細胞 (骨格筋組織の細胞としての最小単位: 筋芽細胞同士が細胞融合・多核化をすることで形成される細長い形態の細胞) を *in vitro* 環境下でも効率よく形成するため、筋発生のモデル細胞として繁用されている。申請者は以前に、このマウス筋管細胞が発生する張力を簡便に定量評価可能な独自技術 (図 1) を開発した (*Biotechnology and Bioengineering*, 106(3), 482-489. (2010))。この張力値を新しい評価指標として用いて、培養条件 (培地組成や通気条件) の最適化を行い、古くから用いられてきた筋分化指標である筋特異的タンパク質の細胞内局在や発現量の解析では明らかに出来なかった最適培養条件が設定可能であることを示してきた (*Biotechnology and Bioengineering*, 107(5), 894-901 (2010) など)。この張力測定技術は、*in vitro* 培養でありながら、生体筋 (*in vivo*) に近い機能を評価可能と考えられるため、筋疾患治療薬スクリーニングに展開可能であると期待される。

微細な短冊型に加工したコラーゲン薄膜を支持体として筋管細胞を培養すると、薄膜上の筋管細胞の収縮力を歪計で定量可能。

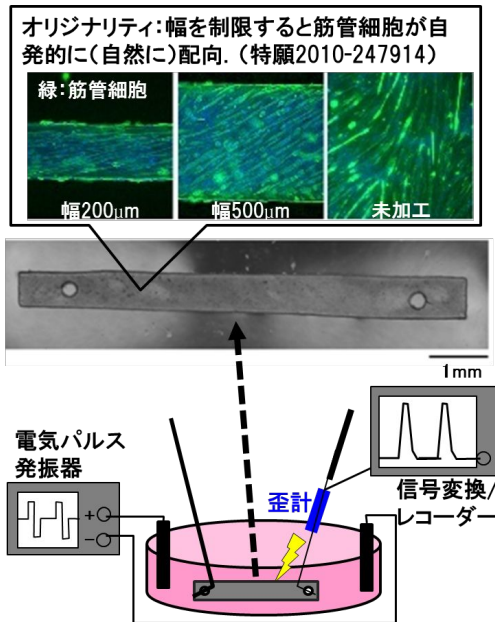


図 1 以前に開発した活性張力評価技術

### 2. 研究の目的

上記の筋管細胞張力計測技術はマウス筋管細胞を用いて開発されたが、これを実際の筋疾患治療薬スクリーニングに利用する場合には、ヒト初代筋管細胞を使った系が求められる。しかし予備検討では、市販のヒト骨格筋由来初代筋芽細胞を貧栄養下で分化培養して得られるヒト筋管細胞の張力発生量は、マウス筋管細胞よりも極めて微弱であるため、上述の評価法に適用困難であることが判明した。ヒト筋管細胞が旺盛に張力発生出来ない原因として、マウス由来細胞では線維芽質な細胞が適度に混在して鉛直方向に厚

みがある組織を形成し筋管細胞が多く含まれているのに対し、ヒト由来ではコラーゲン薄膜上に形成される組織の厚みが非常に薄いことが観察され、つまり、単位支持体培養面積あたりに含まれる筋管細胞数が少ないため張力発生に至らない可能性が考えられた。ヒト筋芽細胞では積層した組織様の構造を取れない原因として、筋芽細胞同士の細胞間接着力がマウス株化細胞に比べ十分ではないことや、ある種の細胞外マトリクスやサイトカイン類の分泌量が十分でないことが要因と考えられた。しかしながらこれらの要素を個々に変化させ影響を個別に検証するためには多額の研究材料費が必要となり、実際には難しい。そこでまず、市販のヒト初代骨格筋筋芽細胞は実際には骨格筋筋芽細胞と骨格筋線維芽細胞が混じった筋芽細胞群であること、また上記の市販の初代筋芽細胞群では線維芽細胞の比率が極めて低い状態で供給されていることに着目した。組織内間質細胞である線維芽細胞は、上述した細胞外マトリクスやサイトカインを多く分泌していることが予想され、本研究ではまず、ヒト骨格筋由来筋芽細胞と同由来線維芽細胞の混在比率を変化させた共培養を行うことにより、電気パルス刺激に反応して“動く”骨格筋細胞の *in vitro* 培養が可能であるかを検証し、ヒト筋管細胞の張力測定を可能とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

具体的には、以下の項目の順に検討を行なった。予想外の結果も含まれたものの、方針転換を行うことで、本研究課題の解決を試みた。

- (1) ヒト骨格筋筋芽細胞群に含まれるヒト骨格筋筋芽細胞とヒト骨格筋線維芽細胞をそれぞれの比率が高い状態で増殖培養する方法の開発。
- (2) ヒト骨格筋筋芽細胞群におけるヒト骨格筋線維芽細胞混入比率の変化が、筋管細胞が発する活性張力に与える影響の評価。
- (3) 上記共培養で形成された筋芽細胞群組織内における混入線維芽細胞の局在と遊走挙動の観察による現象の把握。
- (4) 筋管細胞が発する張力を検出可能とするための検出手法の改良 (他のアプローチによる本課題の問題解決)。

### 4. 研究成果

(1) ヒト骨格筋筋芽細胞とヒト骨格筋線維芽細胞をそれぞれの比率が高い状態で増殖培養する方法の開発。

まずヒト骨格筋筋芽細胞群に含まれる筋芽細胞および線維芽細胞のそれぞれを優先的に増殖培養する方法を検討した。既に、培養面にラミネンコートを実施することで筋芽細胞の優先的な増殖を得られることが明らかにされていた (*Journal of Bioscience and Bioengineering* 109 (3), 310-313 (2010)) ため、

繊維芽細胞の増殖を優先するための条件として、培養面へのラミニンコートを行わず、継代培養を繰り返すことで、ある種の株(Lonza, 6F4296株)では高い繊維芽細胞比率(80%以上)を有する細胞群の培養が可能であることを見出した。一方で、この株ではラミニンコート面上においても高い筋芽細胞比率(80%以上)を保った状態で維持培養することが難しいことが分かったため、ラミニンコート面で優先的な増殖が可能な筋芽細胞群(Lonza, 4F1618株)を使用することとした。以上の検討により、骨格筋由来筋芽細胞と同繊維芽細胞をそれぞれ高純度(80%以上)に入手することが可能となった。

**(2) 線維芽細胞混入比率の変化が、筋管細胞が発する活性張力に与える影響の評価。**

上記により得られた筋芽細胞と繊維芽細胞の比率を変えて混合し、コラーゲン薄膜状へ播種、筋管細胞への分化培養を行ったところ、予期しなかったことに、組織から活性張力が発生される条件を見出すことが出来なかった。ただし組織自体の厚みは繊維芽細胞混合比率が上昇するにつれ、厚くなっていることが観察された。

**(3) 上記共培養で形成された筋芽細胞群組織内における混入線維芽細胞の局在と遊走挙動の観察による現象の把握。**

前述の検討で筋芽細胞に混入させた線維芽細胞が組織内でどのように挙動しているか推定するために、筋芽細胞シートを積層した肉薄組織を、培養面上の細胞密度が異なる繊維芽細胞の上に配置して共培養を行った。積層細胞シートは厚みが数十 $\mu\text{m}$ と薄いことから共焦点レーザー顕微鏡で鉛直方向の局在を明らかに出来るため、組織内細胞挙動を解析するために優れた培養フォーマットである。筋芽細胞シートの積層、培養面上への転写には他プロジェクトで開発されたゼラチンスタンプシステム(Biotechnology Letters, 35, 1001-1008. (2013))を用いた。

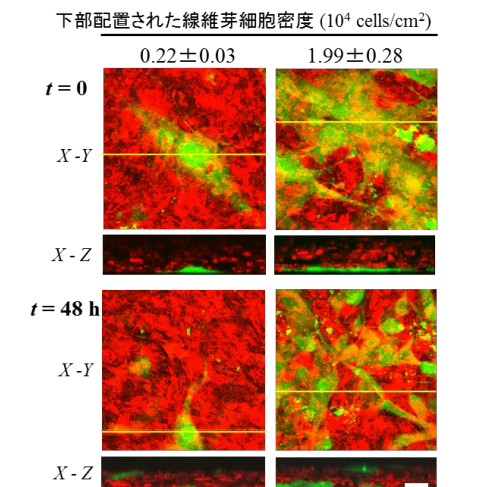


図2 異なる初期細胞密度で配置された線維芽細胞の形態と局在 (bar: 30  $\mu\text{m}$ )

共培養開始時( $t=0$ )の初期細胞密度は $X_0 = 0.22 \pm 0.03 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$  および  $1.99 \pm 0.28 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ であった。培養開始時( $t=0$ )と $t=48 \text{ h}$ における線維芽細胞の形態と鉛直方向位置の代表例を図2に示す。初期において、低密度では線維芽細胞同士は接することなく単細胞で存在した。一方、高密度では線維芽細胞同士が横方向に密着していた。いずれの条件の細胞も、培養面に接着しているため、水平方向に広がった形態であった。48時間では、低密度の繊維芽細胞はより長く手を伸ばし、組織の上部と下部に局在していた。高密度では、一部上部に抜け出た細胞を除き、ほとんどが近傍と連結した状態を保ちつつ組織底部に局在していた。

線維芽細胞の動的挙動を把握するためにタイムラプス観察を行った(図3)低密度では、線維芽細胞は培養面から脱接着すると同時に細胞シート上層に向けて直線的に素早く遊走する特徴的な挙動を示すことが観察により明らかにされた。高密度の線維芽細胞では、大半の線維芽細胞同士が細胞間接着を維持したままでシート底部付近に留まった。

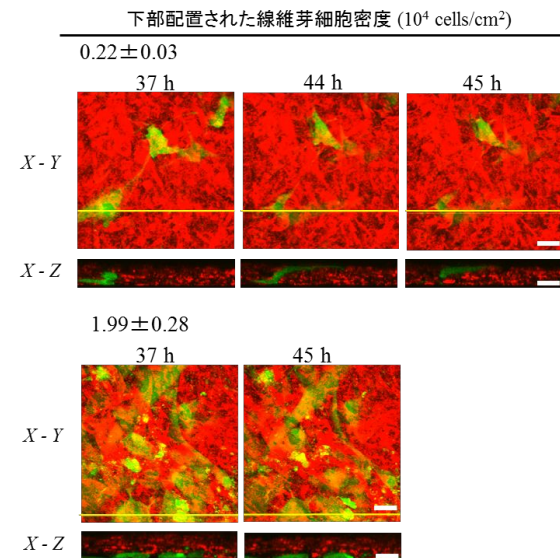


図3 異なる細胞密度の線維芽細胞の動的挙動の比較 (bar: 30  $\mu\text{m}$ )

以上のことから、筋芽細胞組織に低濃度にて混入された繊維芽細胞は筋芽細胞と均一に混じり合うことなく組織上部に抜け出て存在していることが推測された。また一定濃度以上で混入された線維芽細胞は組織内で集塊を形成し留まっていると考えられた。線維芽細胞の混入によって、本研究で仮説した張力増強が観察されなかった直接的な原因として本現象を結びつけることは難しいものの、線維芽細胞を筋芽細胞組織に低濃度で混入することは困難であることは明らかとなり、また線維芽細胞を均一に存在させるにはかなり高い濃度で混入させる必要があり、高い密度の線維芽細胞は筋組織を駆動させ



際に重要となる組織弾性を奪っている（硬化させている）可能性が考えられた。

本研究の本来の目的とは異なるものの、組織内に存在する異種細胞が、遊走と接着という特徴の違いによって、組織内において棲み分けを起こすことが示されたことは、興味深い。実際の生体内の組織では、サイトカインや栄養、酸素などの誘因因子の遊走への影響や分化による形態変化といった要素が複雑に折り重なって自己組織化が達成されていると考えられる。今後、積層細胞シートを解析性が優れる培養フォーマットとして活用し、様々な組織を構成する細胞種同士の接着や遊走のパターンを数多く把握することで、組織内における異種細胞の空間的配置制御が可能になることが期待される。

#### (4)筋管細胞が発する張力を検出可能とするための検出手法の改良（他のアプローチによる本課題の問題解決）。

コラーゲン薄膜 細胞複合体から発生される張力は、半導体ひずみ計（地震計や重力加速度センサーなどに使用されるトランスデューサ-）によって抵抗値の変量として定量される。この測定方法では、図4に示したように測定ノイズやベースのドリフトが大きく、微量な活性張力の判別・定量は極めて難しい。そこで、測定を行うプログラムの改良を行い、複数の測定データを積算することで、張力の検出を可能にした。具体的には、歪み計からの出力値をファイルに記録する際に、筋細胞に電気刺激が加えられた時間範囲が判別可能となるように改良を加えた。結果、電気刺激をかけた時間の部分を正確に積算することが可能となり、微細な張力を検出できるようになった。

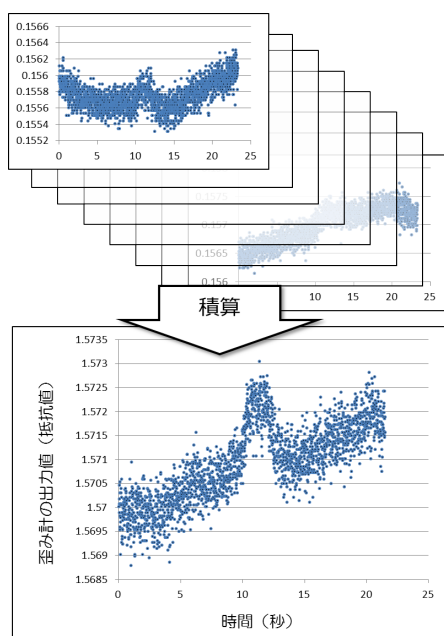


図4 測定データの積算による活性張力検出

#### 5. 主な発表論文等

#### 〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) Ngo, T.X., Nagamori, E., Shimizu, T., Okano, T., Taya, M., Kino-oka, M. In vitro models for angiogenesis research: a review, *International Journal of Tissue Regeneration*, in press
- 2) Nagamori, E., Oda, M., Nakamura, T., Shimizu, T., Okano, T., Kino-oka, M. Spatial habitation of heterologous cells in a multi-layered myoblast sheet due to the differences in their behaviors of migration and cell-cell connection *Current Nanoscience*, 10, 173-178 (2014)
- 3) Shimizu, K., Fujita, H., Nagamori, E. Evaluation systems of generated forces of skeletal muscle cell-based bio-actuators, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115, 115-121. (2013)

#### 〔学会発表〕(計2件)

- 1) 長森 英二, 骨格筋由来筋芽細胞を用いた細胞アッセイ技術の開発と応用展開, 2012年度日本動物細胞工学会奨励賞受賞講演会, 東京, 2014年2月10日
- 2) Nagamori, E., Oda, M., Kino-oka, M. Spatial habitation of umbilical vein endothelial or fibroblast cells in multi-layered myoblast cell sheet, The 25th Annual and international meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC2012), 名古屋, 2012年11月30日

#### 〔図書〕

無し

#### 〔産業財産権〕

無し

#### 〔その他〕

- 1) 長森 英二, 平成24年度日本動物細胞工学会・研究奨励賞, 論題: 骨格筋由来筋芽細胞を用いた細胞アッセイ技術の開発と応用展開. (2013年7月19日)
- 2) Best poster award in The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC2012) 論題: Spatial habitation of umbilical vein endothelial or fibroblast cells in multi-layered myoblast cell sheet. (2012年11月30日, 発表者: 長森 英二)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

長森 英二 (NAGAMORI Eiji)

大阪大学大学院工学研究科・専任講師

研究者番号: 70394898

##### (2)研究分担者

無し

##### (3)連携研究者

無し