

骨格筋ティッシュエンジニアリングにおける筋機能強化および収縮活性評価に関する研究

池田, 一史

<https://doi.org/10.15017/1931746>

出版情報 : 九州大学, 2017, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

骨格筋ティッシュエンジニアリングにおける
筋機能強化および収縮活性評価に関する研究

平成 30 年 2 月

池田 一史

第1章 序論

1.1 本研究の目的

1.1.1 ティッシュエンジニアリング

近年、怪我や病気で失われた臓器や組織の機能や欠損を生体外で培養した細胞などを移植して、機能を補うことを目的とした再生医療が注目されている。日本を含めた世界中で自家細胞を培養して作製された人工表皮、人工軟骨、心筋シートや網膜シートなどの再生医療製品が上市され、実際に治療に利用されるようになるなど、世界各国で再生医療製品の研究開発が進められている^{1,2}。

Langer と Vacanti は、生分解性合成高分子の足場に細胞を播種して治療患部へ移植する方法を提唱した (Fig. 1-1)³。この生命科学と工学技術を組み合わせた手法は組織工学 (ティッシュエンジニアリング) と呼ばれ、細胞、足場、成長因子という3つの要素に着目した様々な研究が行われており、再生医療を実現する技術の一つとして期待されている。2006年に Yamanaka らによって樹立された induced pluripotent stem cell (iPS細胞) を細胞源として用いる次世代の再生医療は、自家由来の細胞を使用するため移植の際の免疫系による拒絶反応の可能性が極めて低く、ES細胞と異なり iPS細胞は体細胞から作製されるため、倫理的な問題は回避できることから、精力的に研究が進められている⁴。

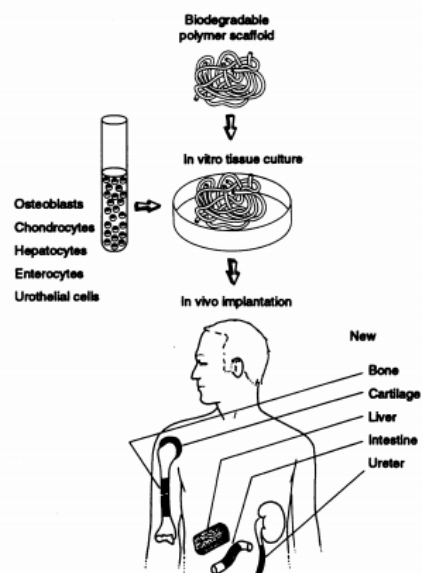


Fig. 1-1 Schematic image of tissue engineering³

1.1.2 人工筋組織の機能強化および収縮活性評価の意義

iPS細胞を用いた再生医療研究は、我が国においてヒト iPS細胞等研究拠点整備事業として京都大学、慶應義塾大学、東京大学、理化学研究所を主な拠点に置き、重点的に推進されており、網膜色素変性症では平成27年より臨床研究が開始され、心不全、血小板減少症、脊髄損傷、およびパーキンソン病は平成29年頃、筋萎縮性側索硬化症などを対象にした臨床研究が計画されている。

筋ジストロフィーに代表される筋疾患は重篤な運動障害を引き起こすことが知られており、このような筋疾患の原因のほとんどは遺伝子の欠損や変異によるものであるため、有用な治療法が無く、再生医療の応用が期待されている。これまでに、*MYOD1* 遺伝子を iPS細胞へ遺伝子導入することで筋繊維の元となる筋芽細胞に分化誘導する手法が確立されている⁵。このような成果から、患者由来の細胞から iPS細胞を樹立し、筋芽細胞へ誘導したものを細胞源として活用し、ティッシュエンジニアリングによって作製した人工筋組織を用いて移植治療を行うというアプローチの実現が期待されている (Fig. 1-2)。

一方で、人工筋組織の作製においては、マウス、ラット、ヒトの株化細胞や初代細胞を用いた例がいくつか報告されているが、生体が発生する力に比べて非常に弱く、骨格筋のモデルとして最も一般的に使われるマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いた人工筋組織の収縮力は、生体が発生する力のわずか数%程度であった⁶。人工筋組織は、再生医療への応用の他に、バイオアクチュエータの動力源や薬剤スクリーニングの評価手法としての活用も期待されているが、これらへの応用を目指すにあたり、その機能の強化が不可欠となっている。

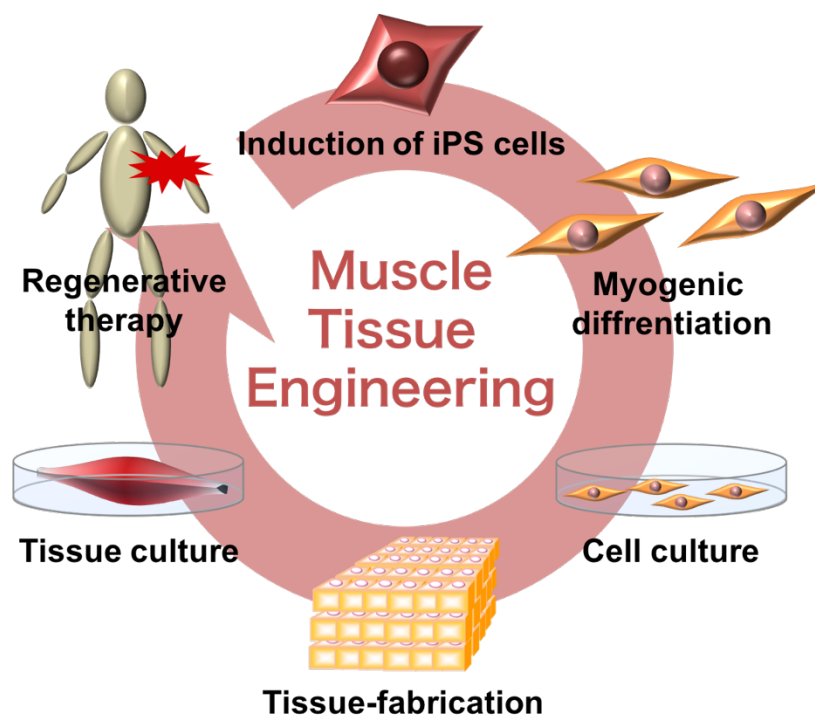


Fig. 1-2 Schematic image of muscle tissue engineering using iPS cells for Regenerative therapy.

このような背景から、本研究で人工筋組織の機能強化と筋芽細胞の収縮活性評価に焦点を当てて研究を遂行する意義を以下に簡単に述べる。

1. 細胞源の株化細胞、初代細胞を問わず、人工的に作製された筋組織の機能は低く、iPS 細胞を使って作製された人工筋組織も同様の傾向となることが予測されるため、その機能強化手法の検討が必要である。
2. 人工筋組織の収縮力測定では、細胞の機能を評価することが可能であるが、組織作製という特殊な技術を用いているため、誰でも容易に筋細胞の機能が評価できるように、人工筋組織の収縮力と高い相関性が得られる評価方法の開発が必要である。

1.2 本研究の方針

まず本研究では、培養環境や培養液中の添加物、細胞への遺伝子導入による人工筋組織の機能強化を試み、人工筋組織誘導に有用な手法の検討を行った。一方で、5つのモデル薬剤を用いて人工筋組織の収縮力による評価と高い相関性を有する評価方法の探索を行った。

1.3 本論文の構成

第1章では、本研究を行うにあたっての解決すべき課題を示した上で、本研究の意義を示した。さらに、本研究を遂行するための方針について述べた。

第2章では、本研究に関連する分野の既往の研究について示した。2.1節では、筋肉について詳細に説明した。2.2節では、筋芽細胞や人工筋組織の応用について説明し、その応用例を示した。2.3節では、異なるアプローチのティッシュエンジニアリング技術を説明し、本研究で人工筋肉を作製するための手法を選定した。2.4節では、問題点を解決するための骨格筋細胞培養に関する最新の動向について紹介した。

第3章では、熱ストレスとアスコルビン酸添加による人工筋組織の機能強化を行った。熱ストレスを与えることで人工筋組織中の筋管が肥大化し、アスコルビン酸を添加することで、細胞の分化能が向上した。さらにこの培養方法で分化誘導を行った人工筋組織の収縮力が大きく向上することを示した。

第4章では、人工筋組織作製に用いる細胞源に、筋機能の向上が期待できる遺伝子を導入することにより人工筋組織の機能強化を行った。さらに過去の研

究で有用な分化誘導法であると報告されている電気刺激培養と組み合わせることで、人工筋組織の収縮力を著しく向上させることに成功した。

第5章では、筋芽細胞の収縮活性を利用した薬剤スクリーニング系の構築を行った。5つの低分子薬剤を用いて、形態学的な評価と人工筋組織の収縮力、および平面培養での筋管の収縮活性を比較することで、人工筋組織の収縮力と筋管の収縮活性評価を行うことにより、従来の遺伝子発現や形態による評価より優れていることがわかった。

第6章では、本論文の総括を行った。さらに、本論文での成果をもとに、今後の展望について記述した。

第2章 既往の研究

2.1 筋肉について

2.1.1 筋肉の発生と役割

我々ヒトを含む哺乳類動物の成り立ちは、一つの核を持つ受精卵の発生から卵割を繰り返し、胚葉と呼ばれる動物初期の胚を構成する2層ないし3層の細胞層を形成する。その胚葉の細胞層の外側の層は外胚葉、内側の層は内胚葉、それぞれの細胞層の一部が外胚葉と内胚葉の間に入り込み、細胞集団を形成したものが中胚葉となる。その後、外胚葉は表皮や神経、内胚葉は消化器官などの臓器となり、中胚葉が筋や骨を形成する。中胚葉の細胞の一部は、分裂と増殖を繰り返し、筋の始まりとなる筋芽細胞へと分化する。筋芽細胞は融合して配向性を持った筋管へと成熟し、ミオシンやアクチンなどのタンパク質を生成しながら成長することで筋繊維となる。一方で、融合しなかった筋芽細胞は、筋の断裂の修復などの役割を担うサテライト細胞となり、筋繊維の周囲に存在する⁷。

このような筋肉は生命活動で重要な4つの役割を担っている。1つ目は、収縮することにより力を発生し、生体の運動機能の根幹となることである。2つ目は、筋がエネルギーを消費し、熱を発生して生体の温度を維持するための熱源となることである。3つ目は、筋が強い力を発生することで、筋内部の圧力が高まり、血流が絞り出されることや、弛緩することによって筋の中に血流が急激に流れ込むというポンプのように働き、循環の補助をすることである。4つ目は、力学的ストレスから体を保護するショックアブソーバーとなることである。特に1つ目の役割を担う筋肉は一般的に「骨格筋」と呼ばれている。骨格筋は先述のように多数の核を有する筋繊維から構成されており骨格筋繊維のタイプは大きく分けて遅筋繊維と速筋繊維の2種類に分類することができる。遅筋繊維は収縮力

が遅いが持久力に優れている、速筋繊維は収縮速度が速いが持久力に欠けているという特徴がある⁷。

2.1.2 筋肉の構造と機能

筋肉は平行に並んだ筋束から構成され、さらにこの筋束は細い筋細胞と呼ばれている多核の細胞の束が寄り集まっている(Fig. 2-1)。細胞はその細長い形状から先述のように筋繊維と呼ばれている。人体において筋細胞は最大の細胞であり、直径 $20\sim 100\ \mu\text{m}$ 、長さ数 mm から数 cm、筋肉によっては $30\ \text{cm}$ を超えるものもある。それぞれの筋細胞は筋周膜に覆われており、神経および筋接合部には神経末端が到達している。これによって、神経インパルスを伝え筋肉を収縮させる。筋周膜の内部には筋原繊維が縦に並び、その間を波形質が満たしている。筋原繊維は規則正しい横紋の移送を揃えるように配列されており、細胞全体としても横紋を呈することとなる⁸。一般的にこの横紋を呈する構造はサルコメアと呼ばれ、筋収縮の最小単位と考えられており、メカニズムを分子生物学的に理解するのに重要な構造である。筋肉は収縮する際、ブドウ糖を酸化し、高エネルギー化合物であるアデノシン三リン酸 (ATP) を合成することで、筋収縮のエネルギー源としている。

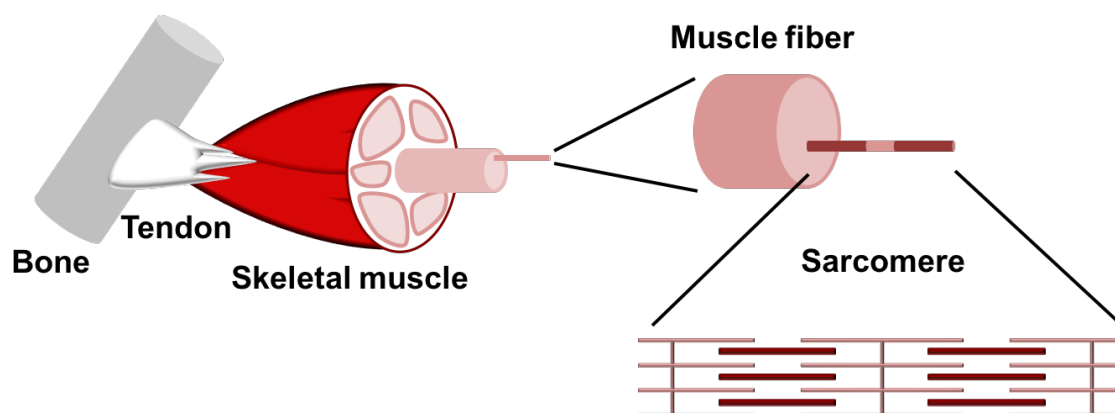


Fig. 2-1 A top-down view of skeletal muscle structure.

筋収縮のメカニズムとしてこれまでに「滑り説」が提唱されている^{9,10}。サルコメアに存在する太いフィラメント（ミオシン分子）と細いフィラメント（アクチン分子）は規則的に配置されており、長軸方向から見ると互い違いに帯状に並んでいるため、これらが結合して相互作用することで滑り力が発生し、筋収縮が起こるとされている（Fig. 2-2）。

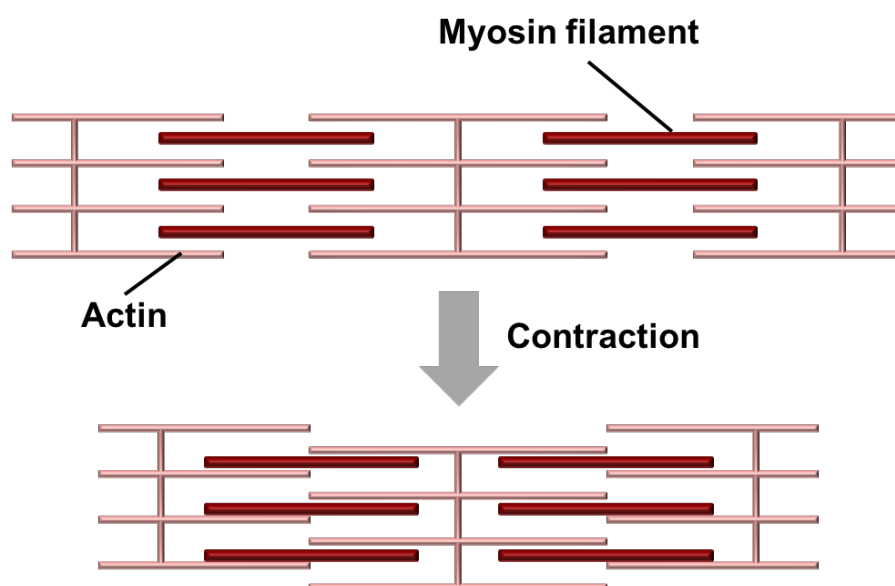


Fig. 2-2 Interaction of actin with myosin filament.

アクチン分子上にはミオシン結合部位を覆うようにトロポミオシンが存在しており、ミオシン分子がアクチン分子に結合できないため、筋肉は弛緩している状態となる。ここで、筋小胞体の表面上にあるカルシウムイオンチャンネルが開き、カルシウムイオンが細胞質内に流入すると、カルシウムイオンはトロポミオシンの成分の一つであるトロポニンCと結合し、トロポニンの構造が変化することでトロポミオシンの位置がずれ、7個のアクチン分子上のミオシン結合部位が現れる。その結果、ミオシン分子とアクチン分子が結合できるようになり、収縮が起こる（Fig. 2-3）。

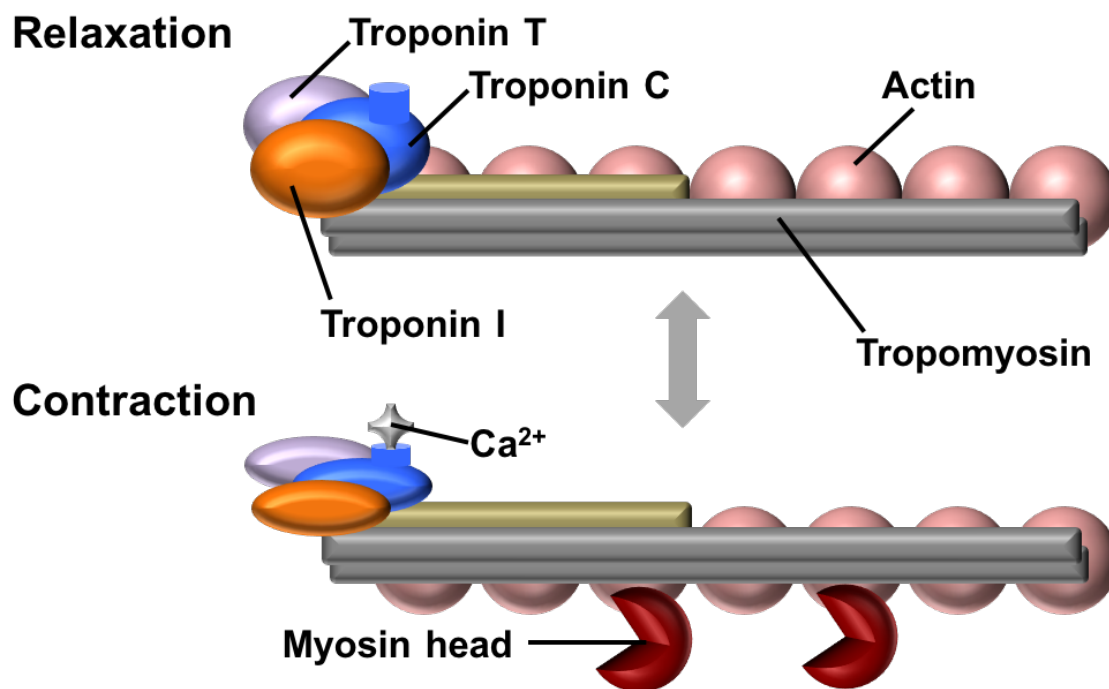


Fig. 2-3 Molecular mechanism of muscle contraction.

2.2 筋芽細胞や人工筋組織の応用

2.2.1 アクチュエータの動力源としての応用

前節で述べたような生体筋肉の動きや機構を人工的に模倣しようとする研究は、世界中で行われている。物理、化学的なエネルギーを動力に変換して、ロボットの関節を動かしたり、制御したりする機構はアクチュエータと呼ばれる。特に、人工筋肉の素材自体が伸縮性をもつものはソフトアクチュエータとも呼ばれ、現在では、産業用ロボットへの応用のみならず、リハビリテーションや介護用のウェアラブルアシストスーツなどへの応用も期待されている¹¹。本節では、本研究の主軸であるバイオテクノロジーを利用した人工筋肉の先駆けとなった非生物材料（ゴム、電導性ポリマー、形状記憶合金、カーボン・ナノチューブなど）を使った人工筋肉の研究をいくつか紹介する。

2.2.1.1 非生体材料を使った人工筋肉

ゴムをはじめとした弾性材料に空気などの流体を注入して伸縮率によって動力を得るアクチュエータは空気圧ゴム人工筋と呼ばれる。中でも、McKibben型人工筋肉は、1961年に Joseph McKibben によって開発され、最も一般的な空気圧ゴム人工筋である (Fig. 2-4、中央大学理工学研究所ホームページより引用)¹¹。しかしながら、この人工筋肉の収縮率は、20%程と生体の筋肉の収縮率と比べて低く、ゴムと他材料の摩擦が起き、ゴム自体が摩耗することで装置の寿命が短くなることにある。



Fig. 2-4 Contraction of rubber artificial muscle with air pressure¹¹.

また、高い柔軟性が必要とされるロボットの人工筋肉には、形状記憶合金 (Shape Memory Alloy、SMA) が、大きな発生力と発生変位を有し、柔軟性にも優れることから広く研究が行われている (Fig. 2-5)。しかし、この人工筋肉では、SMA ワイヤの細さと熱容量の問題から、強制的に冷却させる必要が生じるが、その冷却方法が課題となっている¹²。

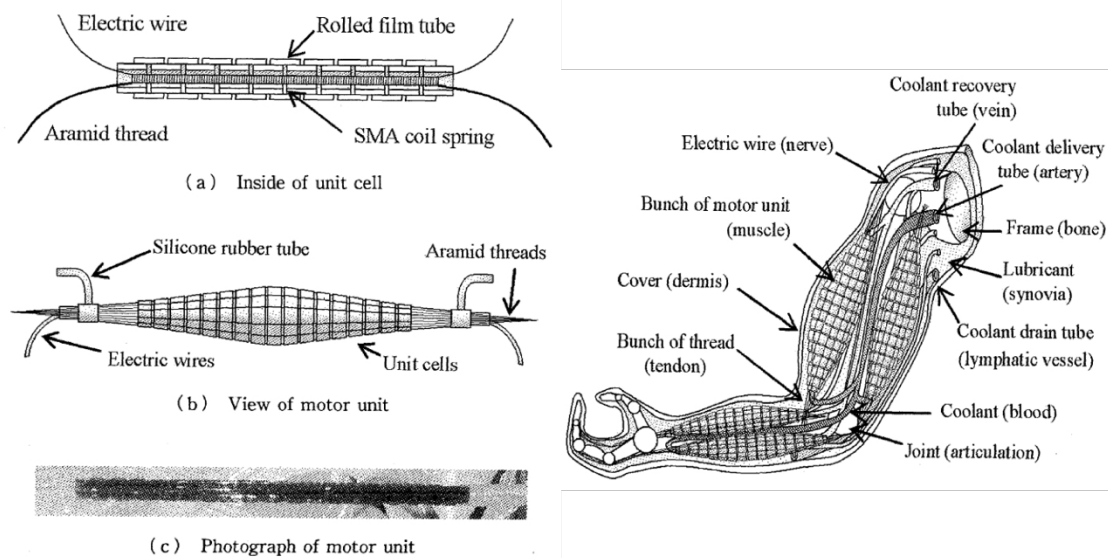


Fig. 2-5 View of motor unit (left) and artificial muscle arm (right)¹².

2.2.1.2 生体材料を使った人工筋肉

近年では、生体内の筋組織や心筋細胞などの初代細胞を用いたバイオアクチュエータも報告されている。Herr と Dennis らは、アクチュエータの動力源にカエルの半腱様筋を用いて泳ぐロボットを作製した¹³。また Feinberg らは、新生児期ラットの心筋細胞を poly-dimethylsiloxane (PDMS) の薄膜上にパターンニングすることで、多様な動作を行うデバイスを作製している¹⁴。さらに、Morishima らはラットの胎仔から取得した心筋細胞を用いて、ハイドロゲルから作られたマイクロキャピラリーを動かすことに成功している¹⁵。

このように、筋細胞の機能を高分子等の人工的な材料で再現しようとした研究例はあるが、生物の最小単位である細胞そのものを用いたデバイスやシステムの研究は未開拓の分野である。アクチュエータへの応用として、動力源に筋

芽細胞から作製した人工筋組織を用いることで、筋組織周囲に存在する筋芽細胞は組織内で損傷が起きた場合には増殖し、自らを構成するタンパク質を絶えず製造して自己修復するような、新しい原理のアクチュエータを実現できる可能性がある (Fig. 2-6)。

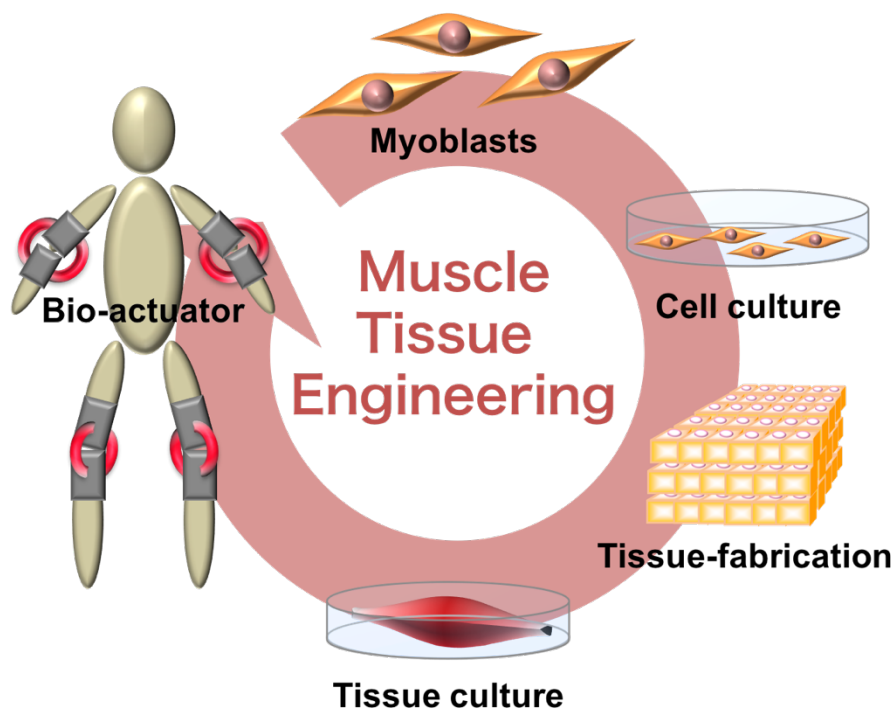


Fig. 2-6 Schematic diagram of application for bio-actuator.

2.2.2 薬剤スクリーニングへの応用

人工筋組織は、筋疾患や加齢による筋力低下などに有効な薬剤を探索するための薬剤スクリーニングへの応用も期待されている。これまで、薬剤スクリーニングや有効性評価では動物実験が行われ、マウスやラットなどの哺乳類動物が主に用いられてきた。しかしながら、国内では1980年代後半に大手化粧品メーカーが化粧品そのものを動物に使用して行う実験を廃止し、2011年に自社研究所での動物実験を廃止した。さらに大手飲料メーカーでは2010年に新製品の開発における動物実験を廃止し、製品に含まれる成分の有効性の検証をヒ

トの培養細胞を用いて行っている。国外においても、米国で2007年に大手メーカー2社が動物愛護への関心の高まりを受け、動物実験の廃止を行った。さらにEUでは1990年代以降、動物実験が段階的に取り締まられ、2013年に動物実験を行った製品と原料を含む製品の販売を禁止した。

このような傾向から、細胞培養による *in vitro* での実験は、動物実験代替法として有用な手法であると考えられる。骨格筋の元となる筋芽細胞を筋疾患マウスから分離培養し、健常マウス由来の筋芽細胞と比較する筋疾患モデルはすでに報告されている (Fig. 2-7)¹⁶。衛星細胞由来の C2C12 細胞に代表されるマウス筋芽細胞株は、増殖段階ではほぼ無限に増殖し、細胞が高密度になった状態で血清飢餓の分化誘導培地に切り替えることで、多核化した筋管へと分化することができる。

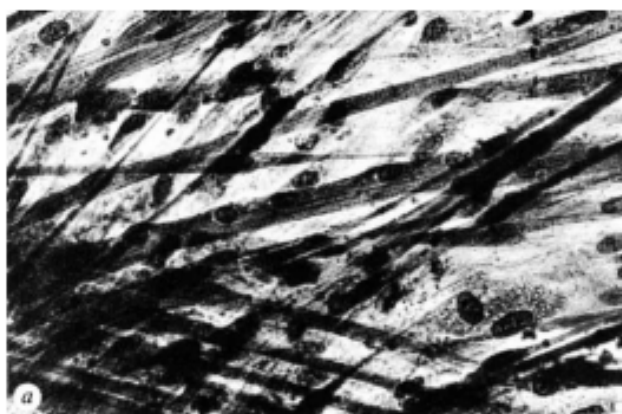


Fig. 2-7 Primary myoblasts derived from muscle disease patient¹⁶.

この特性を有する C2C12 細胞株を細胞源として人工筋組織を作製し、様々な薬剤を添加して培養を行い、筋組織が発生する力を測定することで、これまでの細胞の増殖や分化という形態学的な評価だけでなく、筋肉の機能を評価するシステムを構築できる。そして、このように培養細胞から人工筋組織を作製し、薬剤スクリーニングを行うというシステムを利用することで、動物実験を行うことなく薬剤を試験することが可能となる。そのため、人工筋組織の薬剤

スクリーニングへの応用は、筋疾患や加齢に伴う筋機能低下に有効な薬剤などの探索に大きく貢献できるものであると考えられる (Fig. 2-8)。

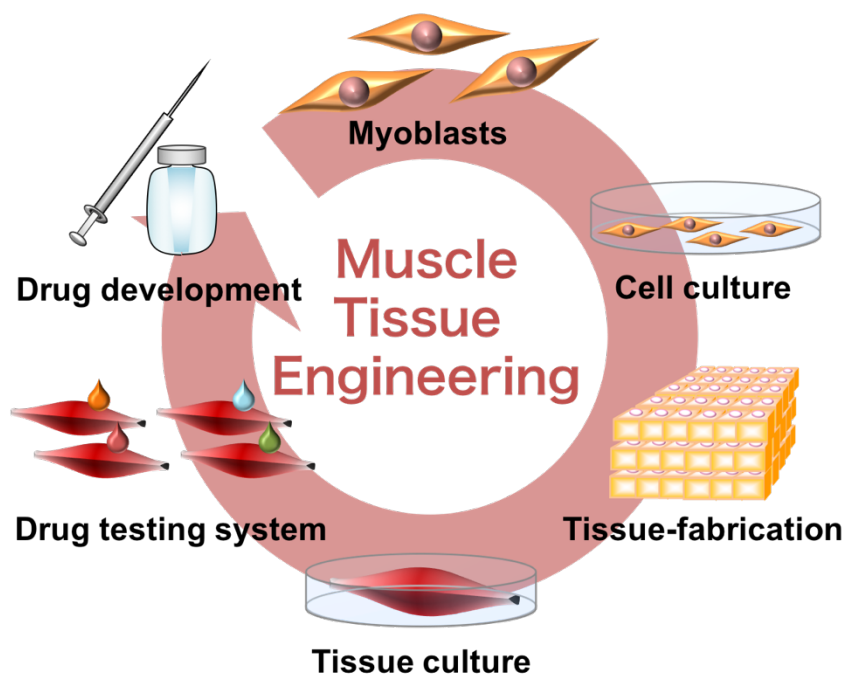


Fig. 2-8 Schematic diagram of application for drug testing system.

2.2.3 筋芽細胞の臨床応用

本来、生体の筋肉には、筋繊維を構成する筋細胞の他に、筋再生に関与する筋衛星細胞が存在している。この細胞は普段は休眠状態で、筋損傷した際に活性化されて増殖し、損傷した細胞を補う役目を担っている。軽度の筋損傷であれば、生体内で筋衛星細胞の増殖と分化によって治癒することが可能であるが、腫瘍切除や重度の筋損傷によって大部分の筋肉組織を損失した場合、筋衛星細胞による修復が不可能となる場合がある。

これまでに、筋芽細胞を疾患の治療に用いられた例として、心臓のバイパス手術後、心機能低下を示した患者に対して自家由来の骨格筋芽細胞を移植するという大規模な臨床研究がヨーロッパで行われた。しかしながら、その結果

は、心筋の運動機能の改善度という一次エンドポイントにおいて、改善が見られなかったことが報告されている (Table 2-1)^{17,18}。このような筋芽細胞の臨床応用では、重篤な患者が対象とされており、移植細胞の準備期間の短縮など、いくつかの課題が残されている。

Table 2-1 Efficacy data from the MAGIC study¹⁸.

	Placebo	Low dose myoblasts	High dose myoblasts	<i>p</i> value (high dose vs. placebo)
No of patients: randomised	41	39	40	
No of patients: injected	34	33	30	
Change in LVEF (echo)	+4.4%	+3.4%	+5.2%	NS
Change in LVEDD (ml)*	+9 (-21 to 28)	-9 (-33 to 25)	-23 (-42 to 0)	0.006
Change in LVEF (nuclear)	0% (<i>n</i> =30)	2% (<i>n</i> =20)	3% (<i>n</i> =25)	<0.04

* Mean and 95% CI.

2.3 再生医療実現に向けた工学的アプローチ

2.3.1 細胞シート工学

前節で述べたように、細胞そのものを移植しても治療効果が得られない場合がある。そこで細胞シート工学では、細胞を大量に培養し、試験管内でシート状の組織体を構築して、それを移植に用いる戦略を取っている。温度感受性ポリマーであるポリ N イソプロピルアクリルアミド (PNIPAm) を培養皿などの基質材料にナノメートルレベルで固定化することによってバイオナノインターフェイスを作製し、その基質上で培養した細胞から温度変化を利用し簡便に細

胞シートを作製する組織構築法は Okano らによって確立された¹⁹。PNIPAm は 32°C 以下で親水性、32°C 以上で疎水性を示す。この性質を利用し、PNIPAm をグラフトした培養皿で細胞を培養した時、通常の培養温度である 37°C では、疎水性を示し PNIPAm 鎖が、収縮したままであるため、細胞は培養皿に接着可能となる。一方で、32°C では親水性を示して PNIPAm 鎖が水分子と結合しながら伸長するため、細胞は培養皿に接着できず細胞間接着を保持したシート状で剥離する (Fig. 2-9)。この手法を用いて、心筋細胞シートの作製や口腔内上皮細胞シートを用いた移植用人工角膜の作製に成功している。

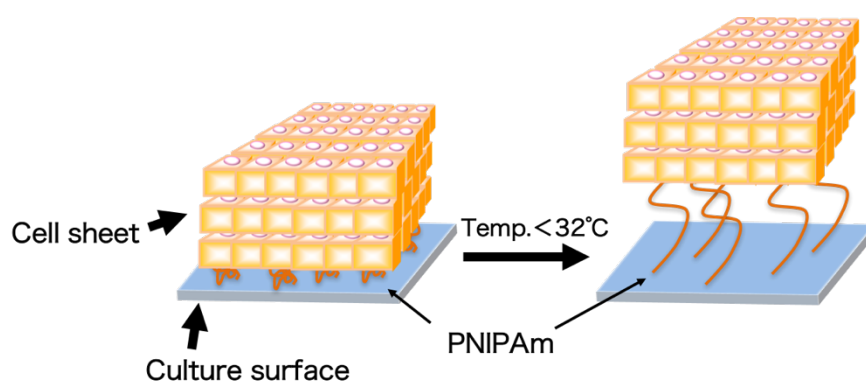


Fig. 2-9 Schematic diagram of adhesion and detachment of a cell sheet to poly (N-isopropylacrylamide) grafted surface.

現在、この技術を利用した再生医療の研究が精力的に進められており、独立行政法人理化学研究所と公益財団法人先端医療振興財団が共同で行っている

「滲出型加齢黄斑変性に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植に関する臨床研究」という計画が最も進んでいる。視力で重要な役割を担う網膜は、視細胞を含む感覚網膜と網膜色素上皮 (RPE) から構成されている。加齢黄斑変性は、網膜の中心に存在する黄斑部と呼ばれる部分に異常な血管が新生し、RPE に障害が生じ黄斑部の機能が低下している状態である。

この計画では、滲出型加齢黄斑変性の患者から iPS 細胞を樹立した後、RPE 細胞に分化誘導し、移植用の RPE シートを作製する (Fig. 2-10, 理化学研究所

ホームページより引用)。その後、患者の障害のある RPE を除去して、患者 iPS 細胞由来 RPE 細胞シートを移植し、定期検査により安全性の確認や視機能に対する有効性を評価するものである²⁰。この臨床研究は、現段階での iPS 細胞を用いた再生医療の最先端であり、今後の再生医療研究の進展において重要な研究であると考えられる。

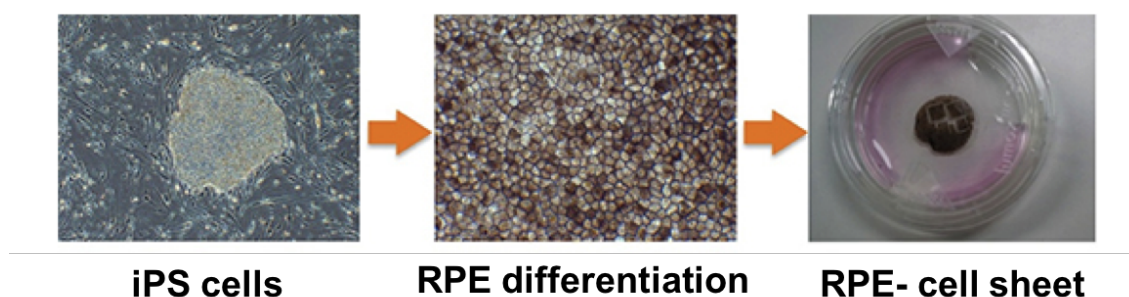


Fig. 2-10 Fabrication of RPE-cell sheet from iPS cells.

理化学研究所ホームページより引用 (http://www.riken.jp/pr/topics/2013/20130228_1/)

2.3.2 バイオプリンター

近年、プリンターの印刷技術の発展により、インクを細胞混合液に置き換えたバイオプリンターの研究が盛んに行われている。さらに 2D プリントだけでなく、細胞を立体的にプリントする 3D プリンターによって、3次元細胞組織の作製が試みられている。これらのバイオプリンターは、細胞や組織体の足場材料を任意の細胞数や濃度で正確に制御し、組織体を作製できるところにある²¹。このような 3D プリンティング技術は、バイオテクノロジーや医療分野での応用が期待されている (Fig. 2-11)。

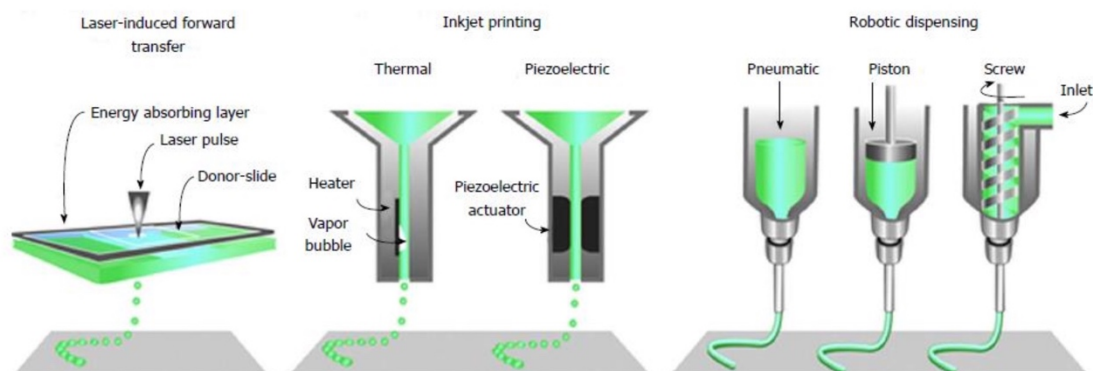


Fig. 2-11 The common approaches currently used to bio-print tissue, are laser-assisted, inkjet-based and extrusion-based robotic dispensing techniques²¹.

また、その他に特徴的な 3D バイオプリンティング技術としては、ハイドロゲルなどの足場材料の代わりに、細胞凝集塊（スフェロイド）を剣山に刺す様に管状構造を構築する方法が報告されている²²。この手法は、スフェロイドが基本材料となっているため、一般的な 3D プリンティングで用いられる足場材料にアレルギー物質が含まれていた場合、それらを回避できることが利点として挙げられる。現在この研究では、人工透析用の太い血管を、患者自身の細胞から作製し、移植することを目標として進められている (Fig. 2-12)。

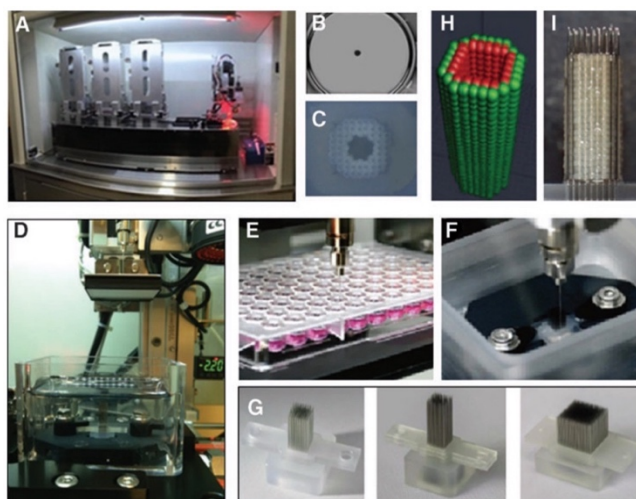


Fig. 2-12 Main components of the 3D bioprinting platform. (A) Aseptic hood containing the assembling line: a plate storage magazine (far left), followed by two feeding magazines and a

plate transportation line toward the mobile arm (far right) and an imaging system (red light). (B) Cell spheroid imaged within its feeding plate's well. (C) Top view of a completed cell construct and the tips of supporting microneedles. (D) Fluid-immersed Kenzan holder. (E) Nozzle aspirating a spheroid. (F) Nozzle depositing a spheroid onto a needle. (G) Three types of kenzans (with 9×9 regular and hollow, and with 26×26 needles); note the needle-perforated plastic bases. (H) A virtual double-layered tube created with the "Bio 3D Designer" program. (I) An actual spheroid construct awaiting postprinting maturation²².

2.3.3 磁性ナノテクノロジー

機能性磁性ナノ粒子 (Magnetite cationic liposome; MCL) を用いた組織構築法が Ito らによって提案された²³。MCL は 10 nm の磁性粒子であるマグネタイト (Fe_3O_4) を正電荷脂質膜で包埋したものである。MCL を培地中に添加して培養することで、MCL の正電荷と細胞膜の負電荷が静電的に吸着し、エンドサイトーシスによってマグネタイトが細胞内に取り込まれる。この MCL で磁気標識した細胞と磁力を用いて組織を作製する方法は Mag-TE (Magnetic force based-tissue engineering) と呼ばれている。これまでに、Mag-TE 法により、心筋細胞シート²⁴、ヒト角化細胞シート²⁵の作製が報告されており、近年、Yamamoto らによって筋芽細胞株 C2C12 細胞から環状の人工筋組織の作製も報告された (Fig. 2-13)⁶。

磁力を用いる利点として、細胞を培養底面に直接堆積するため、細胞を高密度な筋組織が誘導されることが期待できる。筋組織内の細胞密度を高くすることができれば、筋分化誘導時に細胞融合が起りやすくなり、筋分化が促進されると考えられる。そこで本研究では、Mag-TE 法を用いた組織構築法によって人工筋組織を作製することにした。

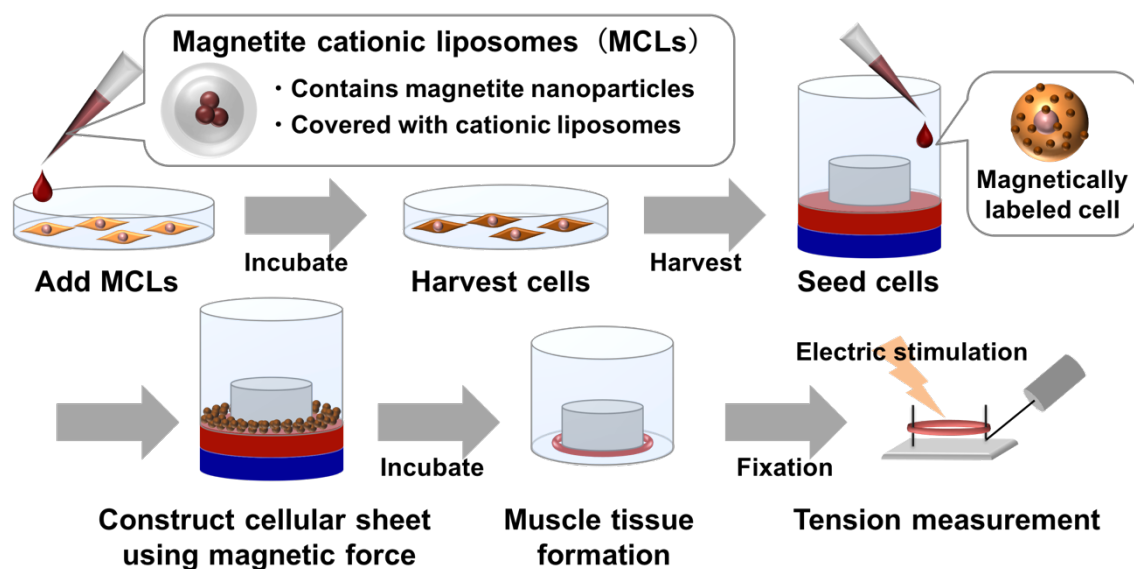


Fig. 2-13 Schematic image of Mag-TE technique.

2.4 骨格筋細胞培養に関する最新の動向

2.4.1 筋芽細胞の遺伝子改変

これまでに、筋芽細胞へ様々な遺伝子を導入し、その高機能化の成功例が報告されている。Uchinaka らは *elastin* 遺伝子を筋芽細胞へ導入し、*elastin* を過剰発現させ、その細胞から作製した細胞シートを心筋梗塞モデルマウスに移植するという実験を行った。その結果、遺伝子導入を行っていない細胞シートを移植した場合と比較して、長期的に治療効果を維持することに成功している²⁶。

また、Goudenege らは筋特異的転写因子である *MyoD* 遺伝子を ES 細胞と iPS 細胞に導入し、筋芽細胞へ分化誘導した後、筋ジストロフィーモデルマウス (mdx マウス) に移植する実験を行った。その結果、遺伝子導入を行わずに分化誘導した ES 細胞と iPS 細胞は mdx マウスにほとんど生着しなかったが、*MyoD* 遺伝子を導入したものは、mdx マウスの筋肉に生着していることを明らかにした²⁷。

Sato らは、薬剤誘導型の遺伝子発現システムを利用し、骨格筋の成長や分化に重要な役割を果たしている *Insulin-like growth factor-1* (*IGF-1*) 遺伝子を筋芽細胞で発現させた人工筋組織を作製し、電気刺激に応じて生じる収縮力を測定することで人工筋組織の機能向上の評価を行った。その結果、遺伝子発現を誘導していない筋組織と比較して *IGF-1* 遺伝子発現を誘導したものは、収縮力が約 1.7 倍向上した²⁸。また同氏らは、細胞のアポトーシスの重要な制御因子として知られる *B-cell lymphoma 2* (*Bcl-2*) 遺伝子についても、同様の手法で人工筋組織を作製し収縮力を測定しており、約 2 倍収縮力を向上させることに成功している (Fig. 2-14)²⁹。

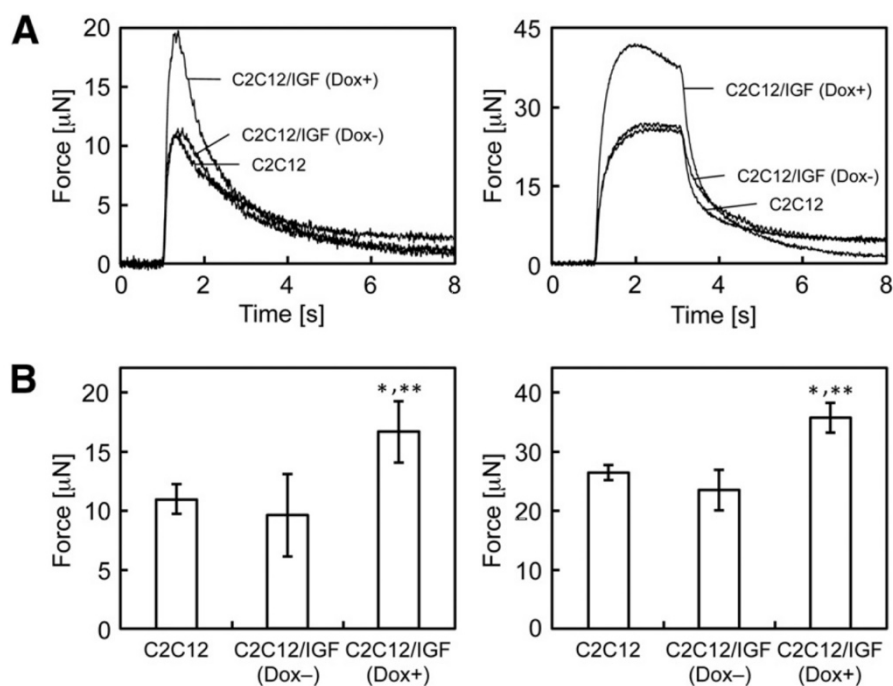


Fig. 2-14 Contractile properties of the artificial skeletal muscle tissue constructs. (A) A representative peak of the twitch force generated by the muscle bundles (left) and the fusion of tetanus of the muscle bundles (right) after 7 days of culture in the differentiation medium. (B) Maximum twitch (left) and tetanus (right) forces of the muscle bundles. The data are expressed as the means \pm SD of three bundles. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.05$ versus normal C2C12 bundles and C2C12/IGF (Dox-) bundles, respectively²⁹.

2.4.2 人工筋組織の電気刺激培養

一般的には、筋肉に物理的な負荷を与えることで、トレーニングを行い、筋肉量を増大させることが知られている。しかしながら、*in vivo* では中枢神経系から運動神経細胞を介して、筋肉に電気的信号が伝えられるが、*in vitro* での人工筋組織の培養では、神経細胞は存在しないため、筋管の発達は限界があるとされている³⁰⁻³³。そこで近年、平面培養の筋管や筋組織に電気刺激を与えることで、高機能化が試みられている。Fujitaらは、平面で培養している筋管に対し、電気刺激を与えることで、サルコメア構造の発達を確認している³⁴。またDonnellyらは、筋組織の電気刺激培養を行うことで、2倍の収縮力を生み出すことに成功した³⁵。また我々の研究室では、磁力を用いた三次元組織構築法によって作製した人工筋組織に与えるための電気刺激条件（印加電圧、パルス幅、周波数）の検討を行い、0.3 V/mm、4 ms、1 Hzの電気刺激を人工筋組織に与えて培養することで、電気刺激を与えていない場合と比較して、約5倍の収縮力強化に成功している（Fig. 2-15）³⁶。

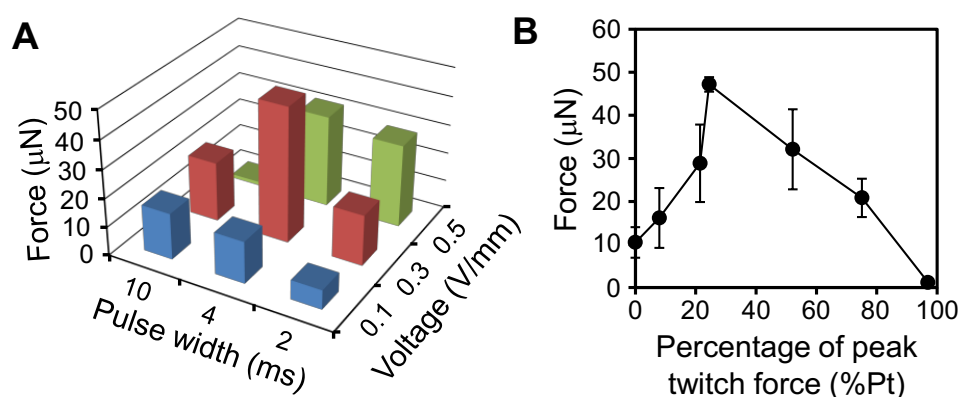


Fig. 2-15 Contractile properties of artificial skeletal muscle tissue constructs using a culture system with EPS. (A) Contractile twitch force of EPS-treated artificial tissue constructs (day 7), using a single electric pulse (voltage, 0.83 V/mm; width, 10 ms). The maximum twitch force generation was observed for tissue constructs applied the EPS culture of 0.3 V/mm, 4 ms and 1 Hz. (B) Relationship between %Pt and the contractile force³⁶.

2.4.3 ヒト iPS 細胞から筋芽細胞への分化誘導

1.1.2 でも簡単に述べたが、筋分化における *MyoD* 遺伝子発現の重要性は、Davis らによるマウス由来繊維芽細胞株のダイレクトリプログラミングによって明らかにされた。彼らは、*MyoD* 遺伝子を繊維芽細胞株へ導入することで、筋特異的タンパク質であるミオシン重鎖 (MHC) を発現する筋芽細胞を誘導することに成功している (Fig. 2-16)³⁷。

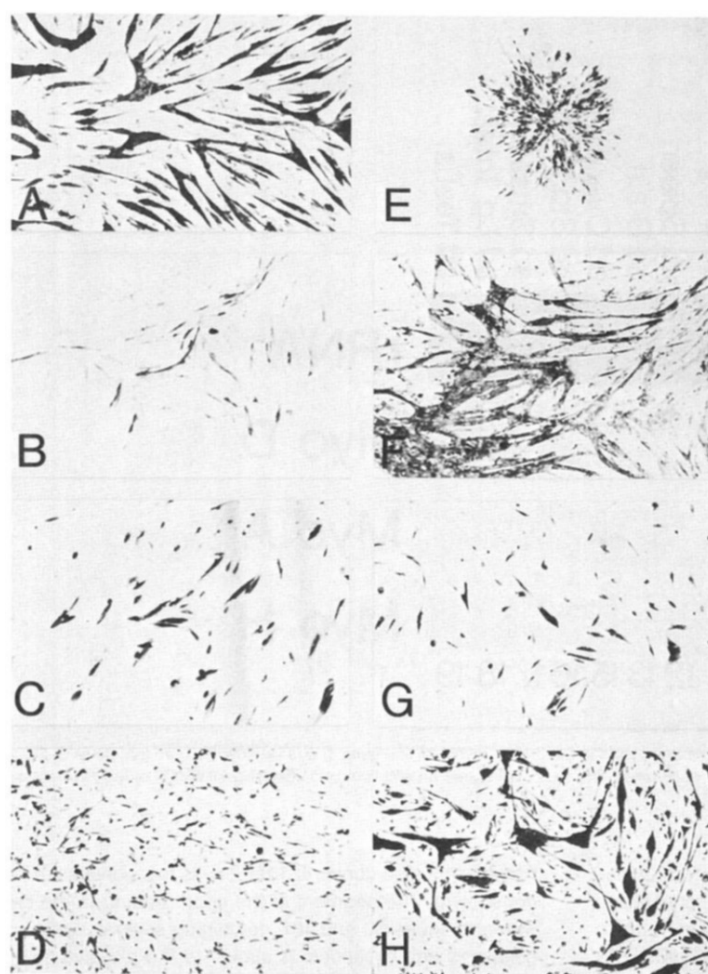


Fig. 2-16 Myosin Staining of Different Cell Lines Transfected with the MyoD Expression
Vehicle Immunostained myosin heavy chain-positive colonies: C3H10T1/2 (A), NIH 3T3 (B),
Swiss 3T3 (C), Swiss 3T3-clone 2 (D), L cells (E), 3T3-L1 adipocytes (F), 3T3-F442A
adipocytes (G), and TAI adipocytes (H)³⁷.

また近年 Tanaka らは、*MyoD* 遺伝子を薬剤誘導型遺伝子発現ベクターに組み込み、ヒト iPS 細胞へ導入することで、およそ 90%の効率で筋芽細胞へ誘導する手法が報告されている⁵。さらに、この筋芽細胞誘導法を用いることで、細胞の膜タンパク質の一種であるジスフェリンの異常症として知られる三好型筋ジストロフィー疾患患者由来の iPS 細胞から筋芽細胞を作製し、*in vitro* で細胞膜再生が弱くなるという病態を再現することに成功している (Fig. 2-17)⁵。これまで、iPS 細胞や ES 細胞などから胚葉体 (EB) 形成を経て筋芽細胞を誘導する手法は報告されていたが、筋芽細胞まで誘導する期間が長く、Tanaka らの開発した手法によって約 2 週間に短縮することが可能となった³⁸。iPS 細胞へ遺伝子を導入し、目的の細胞を誘導する技術は重要である一方で、誘導の再現性が課題となっている。

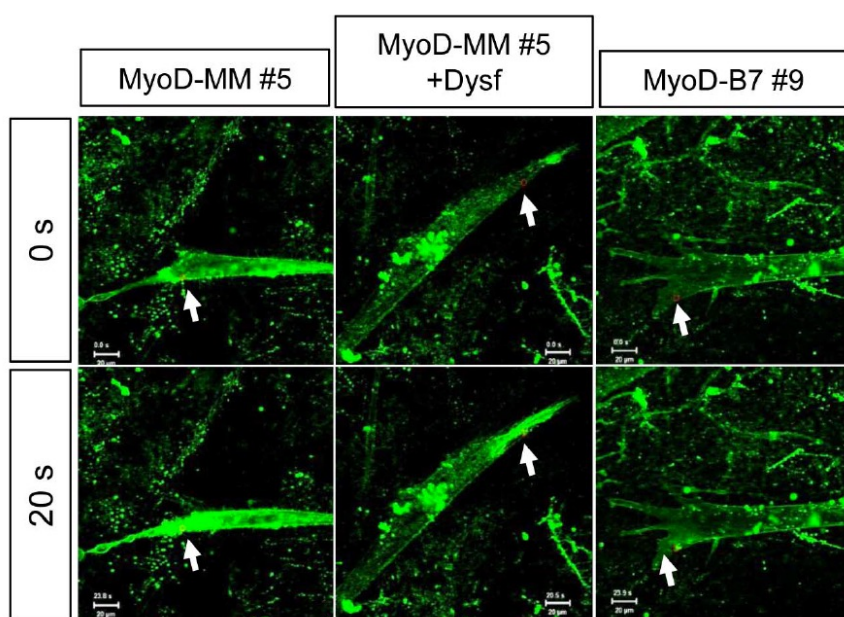


Fig. 2-17 Modeling Miyoshi Myopathy (MM) by patient derived-hiPSCs. Entry of FM1-43 green fluorescent dye into differentiated myofibers from MyoD-MM #5 (left), rescued MyoD-MM #5 with DYSF expression (middle), or control MyoD-hiPSC clone B7 #9 (right), before (0 s) and 20 s after (20 s) two photon laser-induced damage of the sarcolemmal membrane (arrow). Scale bars = 20 μm .

この課題を解決するために、Uchimura らは従来までの筋分化誘導法を改良し、分化誘導の途中で細胞を回収し、再度播種するリプレーティング法を開発した³⁹。この手法では、分化誘導 day3 まで従来通りの 6 ウェルプレートや 10 cm ディッシュで細胞を培養した後、酵素処理にて細胞を剥離し、96 ウェルプレートや 384 ウェルプレートに再度播種する (Fig. 2-18A)。この手法により、直接 96 ウェルプレートに播種した場合と比較して、細胞をそれぞれのウェルで均一に分化させることに成功している (Fig. 2-18B)。これは、創薬スクリーニングに求められるレベルの分化効率と安定性が得られており、筋疾患の治療薬開発への応用が期待されている。

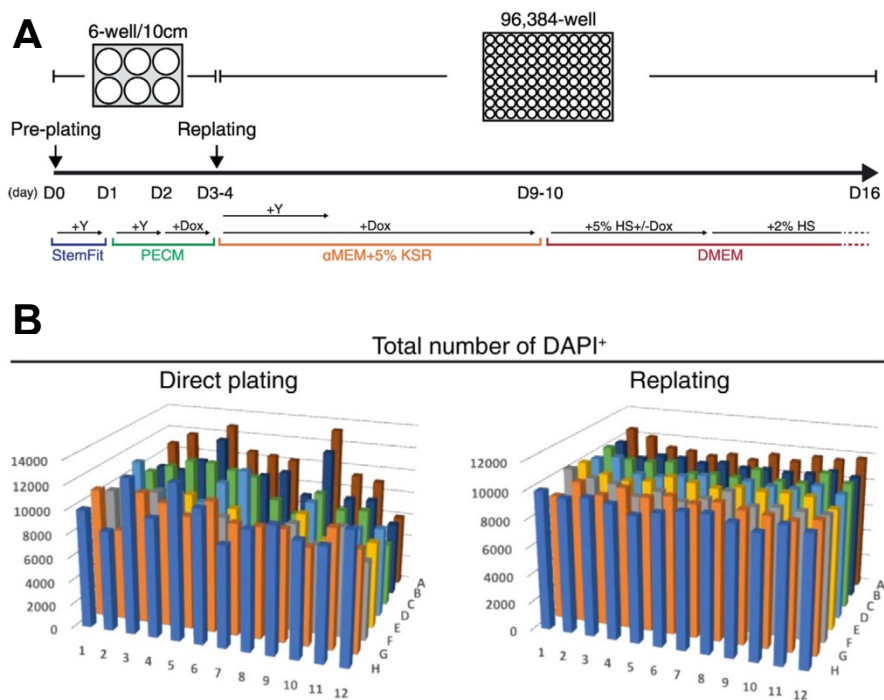


Fig. 2-18 Skeletal muscle differentiation of hiPSC^{tet-MyoDmC} in 96 multi-well plate by replating method. (A) A schematic diagram of the replating for skeletal myogenic differentiation of hiPSC^{tet-MyoDmC}. (B) A total number of cells are compared between direct plating and replating methods at day 9³⁹.

2.5 本章のまとめ

2.1 節では、筋肉がどのような細胞から分化し成り立っているのか、また、筋肉の主な機能として知られる収縮以外にどのような役割を持っているのかを述べた。2.2 節では、筋芽細胞や人工的に作製された筋肉の応用例を示した。2.3 節では、再生医療の実現に向けたアプローチについて研究例を示しながら説明した。2.4 節では、筋細胞の機能向上に寄与した既往の研究を示し、人工筋組織の機能強化および収縮活性評価において、本研究で試みるべきアプローチを明確にした。

第3章 熱ストレスとアスコルビン酸添加による 人工筋組織の機能強化

3.1 緒言

本章では、細胞の培養温度を変化させることによる熱ストレスと、一般的にビタミン C として知られているアスコルビン酸を培養液中の添加物として加えることによる、細胞の形態、分化や機能への影響を調べた。

熱は、エネルギーの移動形態の一つであり、高温物体から低温物体に移動する自発的なエネルギーである。また、熱機関を介して発電や交通機関に広く用いられている。生物学的には、細胞が熱等のストレス条件下にさらされた時に熱ショックタンパク質 (HSP) が分子シャペロンとして細胞を保護するために発現するように、熱は、生理学的な影響をも及ぼす⁴⁰。さらに、熱ストレスは、温熱療法で知られているように、様々な疾患に対する理学療法に広く用いられている。また、熱は物理的に容易に使用可能であり、例えば、恒温槽に培養皿を設置することで、ストレスを持続的に加えることができる。実際に、熱ストレスを加えることで、ヒト骨格筋芽細胞やマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞が肥大したことが報告されている⁴¹。

一方で、筋肉の成長および修復には、筋肉組織を構成する細胞外マトリックスであるコラーゲンの合成が不可欠である^{42, 43}。コラーゲンは、プロリンがヒドロキシル化と糖付加を受けて 3 本鎖のプロコラーゲンとして細胞外へ分泌され、その後、細胞外でプロコラーゲンペプチダーゼによって末端の数個のアミノ酸が切断されてトロポコラーゲンとなり、凝集して繊維を作り、さらにコラーゲン分子内および分子外で架橋が行われることで合成される。この反応プロセスで、プロリンがヒドロキシル化される際に、還元剤としてアスコルビン酸が関与することから、コラーゲンの生合成にはアスコルビン酸が必須である。さらに、アスコルビン酸は、消化器官中の鉄の吸収促進や胆汁酸の合成、ア

ドレナリンの生成といった生体内の様々な反応に加え、筋肉中の疲労物質である乳酸の分解の促進にも関与している⁴⁴。本研究では、人工筋組織の機能強化を目指して、熱ストレスを与えると共に、安定的なアスコルビン酸の誘導体であるL-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 *n* 水和物(AscP)を添加することにより、マウス筋芽細胞株 C2C12 における増殖と分化および、作製した筋組織の発生力に対する影響を調べた。

3.2 実験材料および方法

3.2.1 マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞の培養

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞は豊田中央研究所から供与されたものを使用した。増殖培地は DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco) にウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) を 10% 添加したもの、分化誘導培地は仔牛血清 (CS) を 2% 添加したものを使用した。また、AscP (Wako) は 0, 50, 100, 200, 400 μM の濃度で加えた^{43, 44}。どちらの培地も 100 unit/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン、3.7 mg/ml 炭酸水素ナトリウムを添加した。増殖培養は 37°C, 5%CO₂ インキュベータ内で行い、50~80%コンフルエントになったらリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、0.25%トリプシン-EDTA を用いて細胞をはがして 1/8 から 1/16 に希釈された細胞密度で継代した。また、分化誘導培養は 6 well プレート (Greiner) に細胞を 5.0×10^5 cells /well で播種し、2 日間増殖培地で、37°C, 5%CO₂ インキュベータ内で培養を行った後、分化誘導培地に変え、7 日間培養を行った。熱ストレス印加は 37, 39 あるいは 41°C に設定した 5%CO₂ インキュベータ内で培養することで行った。

3.2.2 免疫蛍光染色

細胞を PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)含有 PBS で 15 分間固定した。さらに 0.2% Triton-X 100 を含む PBS で 15 分間浸した後、PBS で 3 回洗浄し、1% ウシ血清アルブミン(BSA)を含む PBS で 30 分間ブロッキングした。次に 1 次抗体である抗 α アクチニン抗体(Sigma)を 1%BSA 含有 PBS で 800 倍希釈した溶液で 45 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄し、2 次抗体である Alexa Flour 488 (Invitrogen)とファロイジン(Alexa Flour 546 phalloidin, Invitrogen)および DAPI(Roche)を 1%BSA 含有 PBS で 1000 倍希釈した溶液で 45 分間反応させた。反応後、PBS で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡(BZ-9000, キーエンス)で観察した。

3.2.3 熱ショックタンパク質およびコラーゲンの遺伝子発現解析

熱ストレス条件下における、熱ショックタンパク質およびコラーゲンの遺伝子発現を半定量的に解析するために RT-PCR を行った。まず、C2C12 細胞を増殖培地で 2 日間培養し、分化誘導培地で 7 日間培養を行った。次に、RNA 抽出キット (RNAiso plus, Takara) を用いて、Total RNA を抽出した。なお、操作手順は製品プロトコールに従った。抽出した Total RNA を oligo-dT プライマーと ReverTra Ace (Toyobo) 逆転写酵素を用いて逆転写し、cDNA を合成した。 *α B-Crystallin*、*HSP47*、*HSP72*、*HSP90* および、*Type I collagen* 遺伝子の発現解析のために、G-taq DNA ポリメラーゼ (Cosmo Genetech) を用いて PCR を行った。PCR 反応は、95°C 2 分間の初期解離後、95°C 20 秒間、60°C 10 秒間の増幅反応を 30 サイクル行い、最後に 72°C 5 分間の伸長反応を行った。コントロールとしてハウスキーピング遺伝子である GAPDH を選択し、各遺伝子の増幅には、各遺伝子に対する特異的なプライマーを用いた (Table 3-1)。

Table 3-1 Primer sequences for RT-PCR

<i>Gene</i>		<i>Primer sequences</i>	<i>Product size</i>
<i>αB-Crystallin</i>	FW	5' - TCAGAGGCGAAGGCAACAGTC -3'	151 bp
	RV	5' - AACCTTGACTTTGAGTTCCTCCG -3'	
<i>HSP 47</i>	FW	5'- GATGGGGCACTGCTTGTGAA -3'	168 bp
	RV	5'- TCTCCTTCTCGTCGTCATAGTAGTTG -3'	
<i>HSP 72</i>	FW	5'- TGGAGGAGTTCAAGAGGAAGCA -3'	170 bp
	RV	5'- GCGTGATGGATGTGTAGAAGTCG -3'	
<i>HSP 90</i>	FW	5'- TGGACGAGAAATCCTGATGACAT -3'	145 bp
	RV	5'- CTTGGGACAAAAAGAAGGGC -3'	
<i>Type I collagen</i>	FW	5'- TCAGAGGCGAAGGCAACAGTC -3'	119 bp
	RV	5'- GCAGGCGGGAGGTCTTGG -3'	
<i>GAPDH</i>	FW	5'- CTACCCCAATGTGTCCGTC -3'	150 bp
	RV	5'- GCTGTTGAAGTCGCAGGAGAC -3'	

3.2.4 ウェスタンブロット (SDS-PAGE)

7日間分化誘導培養をした細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄し、0.25%トリプシン-EDTAを用いて細胞を剥離した。凍結融解処理終了後に、15000 rpm、4°Cで5分間遠心を行い、上清を回収した。次にBCA法により各サンプルの総タンパク質濃度を測定した。Bicinchoninic Acid Solution(BCA, Sigma)とcopper(II) sulfate(Sigma)を50:1の割合で混合してBCA試薬を作製した。段階希釈した各タンパク質

サンプル 50 μl に対して BCA 試薬を 500 μl ずつ加えて 37°C で 1 時間インキュベートした後、氷上で急冷した。次に、Smart Spec 3000 (Bio-Rad) で波長 562 nm での吸光度を測定し、サンプル濃度を算出した。なお、検量線には濃度既知のタンパク質である BSA (Bovine Serum Albumin) 溶液 (Sigma) を用いた。そしてサンプルのタンパク質濃度が 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように PBS を用いて調製した。最後に 3×Buffer (195 mM Tris-HCl (pH6.8)、9% SDS、30%グリセロール、15% 2-メルカプトエタノール、0.075% BPB) を加えて 100°C で 5 分間加温した後、氷上で冷やし、これを泳動用サンプルとした。Myosin heavy chain (MHC) および Myosin heavy chain fast (MHC fast) については Lower gel を 7.5%、Myosin heavy chain slow (MHC slow), Akt, pAkt, Myogenin および GAPDH については Lower gel を 10% で調整した。泳動時間は、MHC および MHC fast は 2 時間 15 分、Akt, pAkt, MHC slow, Myogenin、および GAPDH については 1 時間 45 分とし、それぞれ定電圧 100 V で泳動した。

3.2.5 ウェスタンブロット (抗原抗体反応)

SDS-PAGE 終了後のゲルを 15 分程度トランスファーバッファー (25 mM Tris、192 mM グリシン、0.1% SDS、20% メタノール) に浸しておいた。フィルターパッド、ろ紙 (Bio-rad)、ニトロセルロースメンブレン (Amersham) も同様にトランスファーバッファーに浸した。ゲルとメンブレンを 2 枚のろ紙ではさみ、その上からさらにフィルターパッドではさみ、トランスファー用装置にセットした。350 mA、1 時間でゲルからメンブレンへタンパク質を転写した。転写終了後、メンブレンを TBS-T (25×TBS (pH7.4) 20 ml、Tween20 250 μl に蒸留水を加えて 500 ml とする) で洗い、3~5%のスキムミルクを使用して、一晩 4°C でブロッキングを行った。一次抗体にはマウス抗 Myogenin 抗体 (Abcam)、ウサギ抗 MHC 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、マウス抗 MHC-fast 抗体

(Santa Cruz Biotechnology)、マウス抗 MHC-slow 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、ウサギ抗 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology)、ウサギ抗 pAkt 抗体 (Cell Signaling Technology)、ウサギ抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology) を使用し、Myogenin は希釈倍率を 1:200 で 1 時間反応させ、MHC、GAPDH は希釈倍率を 1:1000 で 1 時間反応させ、Akt、pAkt は希釈倍率を 1:1000 で 1 晩反応させた。また 2 次抗体はそれぞれ、Myogenin と MHC-fast と MHC-slow がヤギ抗マウス抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、MHC と Akt と pAkt と GAPDH はヤギ抗ウサギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を使用し、希釈倍率は全て 1:5000 で 1 時間反応させた。抗体を希釈する際に、検出感度を上げるために Cangetsignal (Toyobo) を使用した。2 次抗体反応終了後、ECL Plus Western Blotting Detection Reagent Solution A と B (GE Healthcare) を混合したものを PVDF 膜に満遍なくかけて 5 分間静置した。その後、メンブレンを mini camera (Amersham) にセットして撮影を行った。

3.2.6 Magnetite Cationic Liposome (MCL) の作製

粒子径 10 nm のマグネタイト (Fe_3O_4 ; 戸田工業) を超純水で洗浄し、余分なイオン成分を十分に除いた後、1 時間超音波処理により分散マグネタイト液を得た。次に、クロロホルムに溶解させた脂質 (TMAG; 相互薬工、DLPC; Sigma、DOPE; Sigma) をそれぞれ物質質量比 1:2:2 の組成で混合させ、ナス型フラスコに入れてロータリーエバポレーターで回転させながら吸気し、フラスコ内壁に脂質膜を作製した。10 mg/ml に調製した分散マグネタイト液をそのフラスコに加え、ボルテックス攪拌することによりマグネタイトを脂質で包埋した。

3.2.7 MCL による C2C12 細胞の磁気標識

C2C12 細胞を磁気標識し、磁力によって細胞を高密度に培養底面に集積させて三次元組織を構築するために、MCL を用いて磁気標識した。80%コンフルエントのディッシュの細胞を回収し、計数を行った後に 100 pg/cell の濃度になるように調製した MCL 入り培地と培地交換し、8 時間培養することで C2C12 細胞に磁気標識した。

3.2.8 環状筋組織の作製と筋分化誘導

8 時間磁気標識した C2C12 細胞を回収し、 1.0×10^6 cells/ 50 μ l で DMEM (Gibco) に FBS を 10% 添加した培地に懸濁した。0.3 % Type I コラーゲン (新田ゼラチン)、 $10 \times$ DMEM、再構成用緩衝液 (0.05N 水酸化ナトリウム溶液 100 ml に対し、炭酸水素ナトリウム 2.2 g、HEPES 4.77 g を溶かしたもの)、マトリゲル (BD Biosciences)、FBS、細胞懸濁液をそれぞれ 56:7:7:15:15:50 の割合で混合した混合溶液を調製した。混合溶液は、コラーゲン及びマトリゲルがそれぞれ最終濃度 0.5 mg/ml 及び 0.8~1.2 mg/ml となるように調製した。操作は氷上で行った。

次に、低接着性 24 ウェルプレートを中心にグリースを用いて直径 12 mm のシリコン栓を設置し、これを 4000 G の磁石の上に設置した。ウェルとシリコン栓の間にできた隙間に、作製した混合溶液を 1 well 当たり 150 μ l ずつ播種した。

環状筋組織を 12 時間増殖培地で培養した後に、環状筋組織を取り外し、虫ピンを用いて環状筋組織をシリコンラバー上に固定した。シリコンラバーについては、35 mm dish もしくは 6 well plate のウェル内に設置した。また、虫ピンと虫ピンの間隔については 6 mm とした。その後、分化誘導培地として、DMEM に血清の代替物として知られる Ultrosor G (Pall) を 0.4% 含む培地を加え、5% CO₂ インキュベータ内で 7 日間分化誘導培養を行った。この際、CO₂ インキュベータの設定温度を変えることで、熱ストレスを印加した。また、AscP は 200 μ M の濃度で加えた。

3.2.9 環状筋組織の収縮力測定

4 lane 培養プレート(Nalgen Nunc International)の側面に 18 mm の間隔で炭素電極を設置し、分化誘導時に使用していた DMEM に 0.4 %の Ultrosor G を含む培地を入れた後に、炭素電極間に誘導した人工筋組織を設置した。次に、筋組織を固定していたピンから取り外し、張力変換器の先に設置した虫ピンに固定した。その後、印加電圧 15 V、パルス幅 10 ms の電気パルスを与え、LabView ソフトウェア (National Instruments)を用いて収縮応答の解析を行った。

3.2.10 統計解析

マンホイットニー順位和検定を用いて統計解析を行い、 $P < 0.05$ の時、有意に差があると判断した。

3.3 実験結果および考察

3.3.1 培養温度が筋芽細胞に与える影響

次に、分化誘導時に培養温度を変えることで、熱ストレスを加えることによる筋肥大と分化能への効果を検証した。培養温度は、37, 39, 41°C の 3 条件とし、37°C をコントロール、39°C を穏やかな熱ストレスを加えた場合、41°C を強い熱ストレスを加えた場合とした。また、分化誘導 7 日目に免疫染色を行った (Fig. 3-1A)。 α アクチニン蛍光染色画像と DAPI 染色画像から分化率(分化した細胞の核数/総細胞核数)と筋管の太さを測定した (Fig. 3-1B)。なお、 α アクチニンと DAPI によって、分化した筋管と核が染色

される。結果、各培養温度で分化率は変わらなかったが、コントロール(37°C)と比較して39°Cにおける培養では筋管が肥大し、41°Cにおける培養では筋肥大は起こらなかった。これにより、穏やかな熱ストレスが筋肥大を誘導することが分かった。

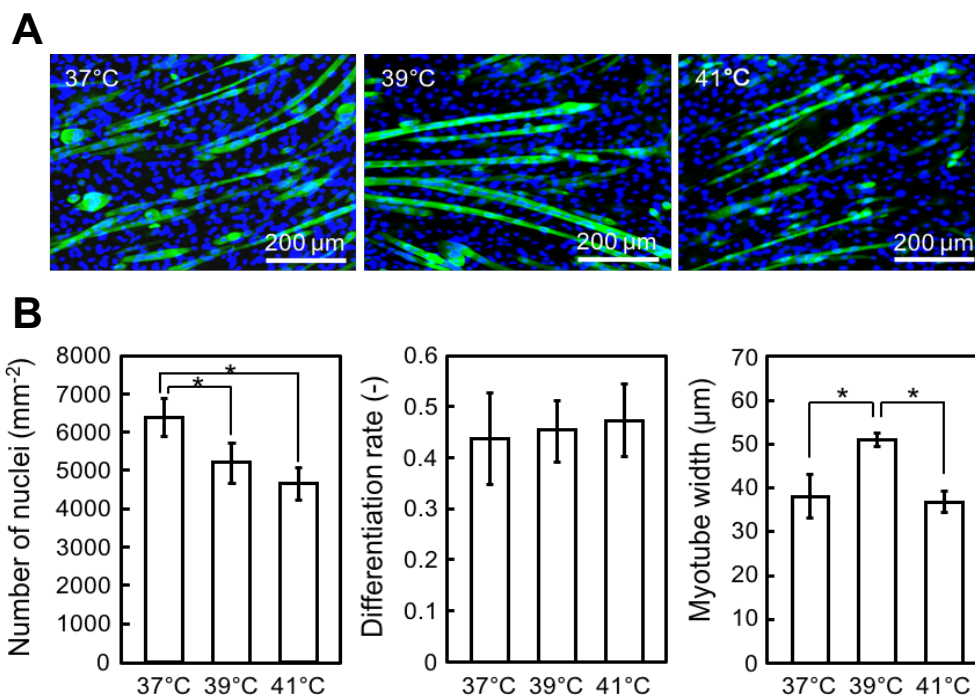


Fig. 3-1 Effects of heat stimulation on myogenic differentiation. (A) Fluorescence microscopic images of myotubes on day 7. C2C12 cells were cultured at 37, 39, or 41°C for 7 days in differentiation medium. Green, α -actinin-positive myotubes; blue, DAPI-stained nuclei. (B) Quantitative image analysis of the number of nuclei (left), differentiation rate (center), and myotube width (right) on day 7. The data are expressed as mean \pm SD (n=3). * $P < 0.05$.

3.3.2 培養温度が筋芽細胞の熱ショックタンパク質遺伝子発現に与える影響

熱ストレス条件下における筋分化誘導中の熱ショックタンパク質の発現を調べるために、 α -B-クリスタリン、HSP47、HSP72、HSP90 の遺伝子発現レベルを RT-PCR にて半

定量的に解析を行った。その結果、熱ショックタンパク質の発現は、39°C もしくは 41°C の熱ストレスによって誘導されることがわかった (Fig. 3-2)。

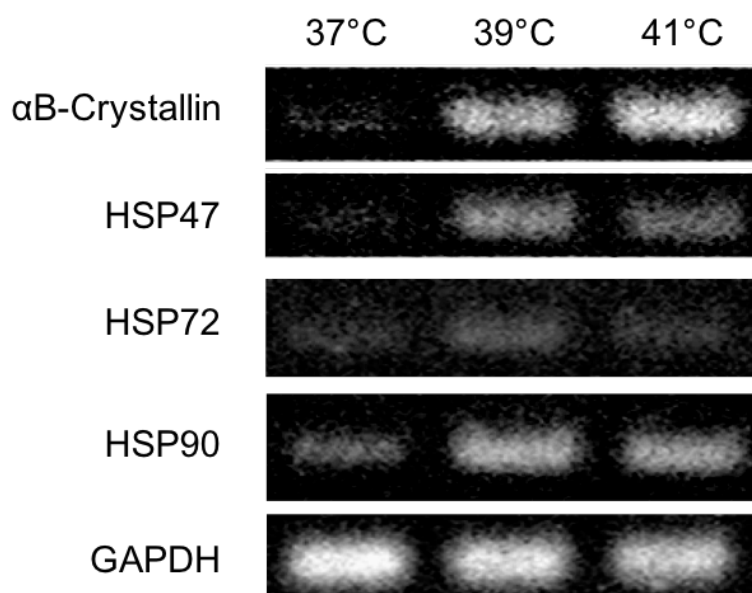


Fig. 3-2 Effects of heat stimulation on heat shock protein gene expression. Semiquantitative RT-PCR analysis of HSP gene expression at 37, 39, or 41°C on day 1.

3.3.3 緩やかな熱ストレスの印加時間の検討

次に、熱ストレスを印加する期間の影響についても調べた。37 および 39°C で 7 日間分化誘導培養した場合 (Fig. 3-3; 条件 i, ii) と 39°C で 1 日間分化誘導培養し、その後、37°C で 6 日間分化誘導培養した場合 (Fig. 3-3; 条件 iii) の 3 条件とし、(i) をコントロール、(iii) を穏やかな熱ストレスを短期間印加した場合、(ii) を穏やかな熱ストレスを長期間印加した場合とした。分化誘導 7 日目に免疫染色を行い、 α アクチニン蛍光染色画像から筋管の太さを測定した。コントロール (i) と比較して、39°C で 1 日間培養し、その後、37°C 6 日間培養した場合 (iii) は有意に筋管が肥大した。また、39°C で 7 日間培養した場合 (ii) と比較して、39°C で 1 日間培養し、その後、37°C、6 日間培養

した場合 (iii) は同等に肥大し、核数の減少は見られなかった。

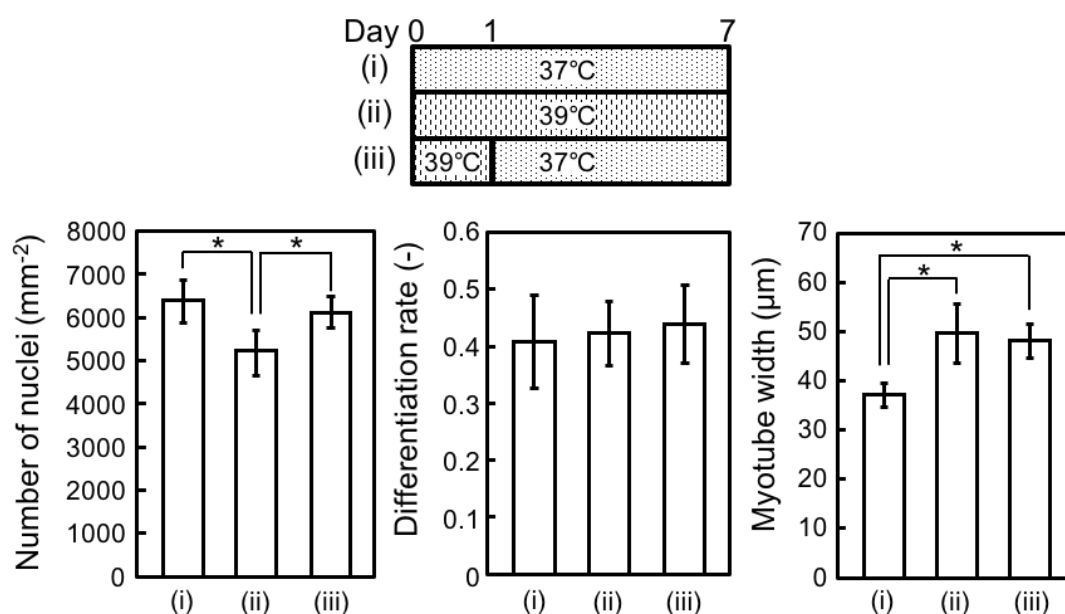


Fig. 3-3 Effects of heat stimulation on myogenic differentiation. Effects of heating period on myogenic differentiation. Time schedule (top) indicates heating periods: (i) incubation at 37°C for 7 days; (ii) incubation at 39°C for 7 days; and (iii) incubation at 39°C for 24 h and subsequent incubation at 37°C for 6 days. Quantitative image analysis of the number of nuclei (left), differentiation rate (center), and myotube width (right) on day 7. The data are expressed as mean \pm SD (n=3). * $P < 0.05$.

3.3.4 アスコルビン酸添加が筋芽細胞に与える影響

これまでの結果から、熱ストレスによって筋肥大が起こるものの、分化率の上昇は見られないことがわかった。一方、ビタミン C 誘導体であり、長期間活性が維持される AscP を分化誘導培地に添加することにより高い分化促進効果が得られると報告がある⁴³。そこで、熱ストレスを加えるとともに、AscP を添加することにより、筋肥大し、さらに分化率が上昇するのではないかと考えた。まず、C2C12 細胞の分化に適した AscP の

添加濃度を検討するために、50, 100, 200, 400 μM の AscP を分化誘導培地に添加し、分化能への効果を検証した。また、コントロールとして、AscP を添加していない分化誘導培地でも同様に分化誘導培養を行った。分化誘導 7 日目に免疫染色を行い、 α アクチニン染色画像と DAPI 染色画像から分化率と筋管の太さを測定した (Fig. 3-4)。結果、添加濃度 50 μM から 200 μM までは、添加濃度が上昇するにつれ、分化率が上昇する傾向がみられ、コントロール (AscP 添加なし) と比較して、200 および 400 μM で有意に分化率が上昇した。一方で、筋管の太さについては、AscP の添加で有意な差は見られなかった。これらのことから、以降の実験では AscP の添加濃度を 200 μM とした。

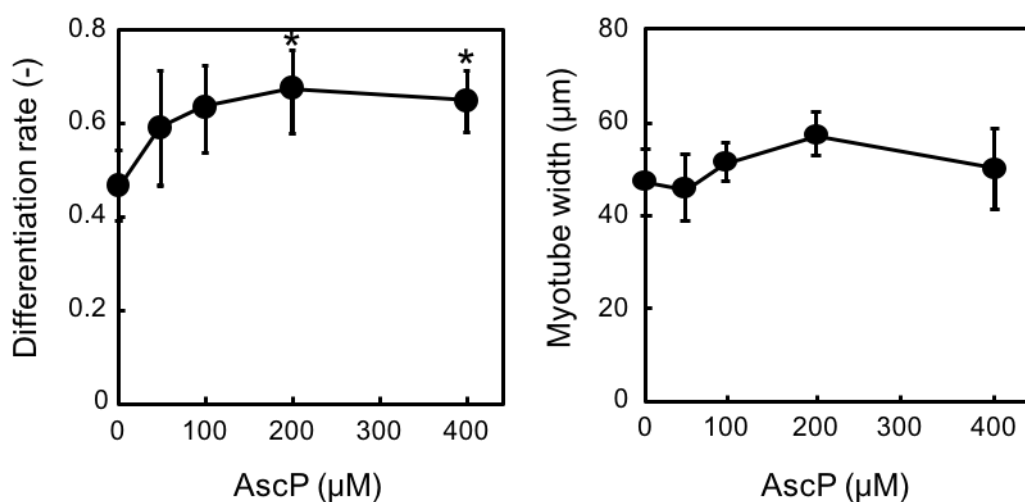


Fig. 3-4 Effects of AscP concentration on myogenic differentiation. Quantitative image analysis of the differentiation rate (left) and myotube width (right) on day 7. The data are expressed as mean \pm SD (n=3). *P < 0.05 vs. 0 μM .

3.3.5 熱ストレスとアスコルビン酸添加による

C2C12 細胞のコラーゲン遺伝子発現への影響

次に、筋分化におけるアスコルビン酸の役割について調べるために、熱ストレスとアスコルビン酸を加えて培養した C2C12 細胞のタイプ I コラーゲンの遺伝子発現を半定量的に解析した。その結果、熱ストレスによってコラーゲンの発現は誘導されなかったが、アスコルビン酸添加の条件下ではどの培養温度でも、コラーゲンの発現を誘導していることがわかった (Fig. 3-5)。

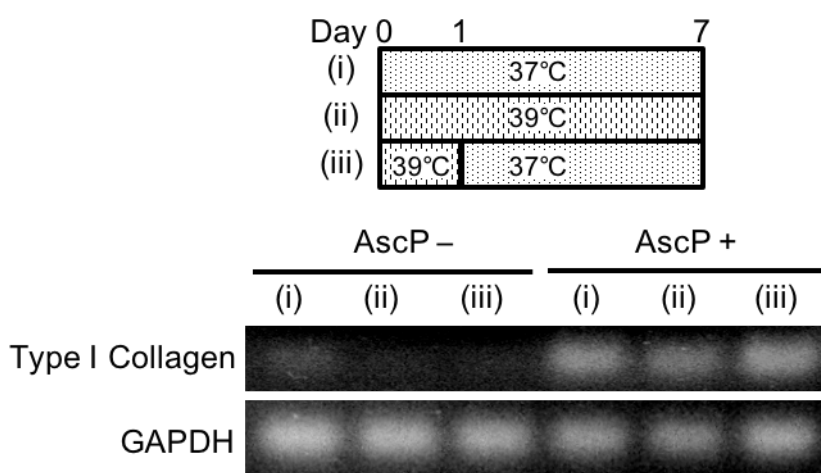


Fig. 3-5 Semiquantitative RT-PCR analysis of type I collagen expression in myogenic differentiation with (+) or without (-) AscP supplementation. Time schedule indicates heating periods: (i) incubation at 37°C for 7 days; (ii) incubation at 39°C for 7 days; and (iii) incubation at 39°C for 24 h and subsequent incubation at 37°C for 6 days.

3.3.6 熱ストレスとアスコルビン酸添加による C2C12 細胞の筋分化への影響

次に、培養温度を変化させると共に、AscP を分化誘導培地に添加することによる、筋肥大と分化能への効果を検証した。培養温度は、コントロールである 37°C と、AscP を添加していない分化誘導培地で筋肥大が確認された 39°C の 2 条件とした。また、分化誘導 7 日目に免疫染色を行った (Fig. 3-6A)。その後、 α アクチニン染色画像と DAPI 染色画像から分化率と筋管の太さを測定した (Fig. 3-6B)。結果として、コントロールと比べて 39°C における培養では、AscP を添加した分化誘導培地と、添加してい

ない分化誘導培地の両条件で有意に筋肥大がみられた。また、AscP を添加していない分化誘導培地と比べて、AscP を添加した分化誘導培地では、分化率が上昇した。このことから、AscP を添加することにより分化能が上昇することが分かった。これらの結果から、39°C の熱ストレスと AscP の添加を組み合わせることで、筋肥大と分化率の両方を向上させることに成功した。

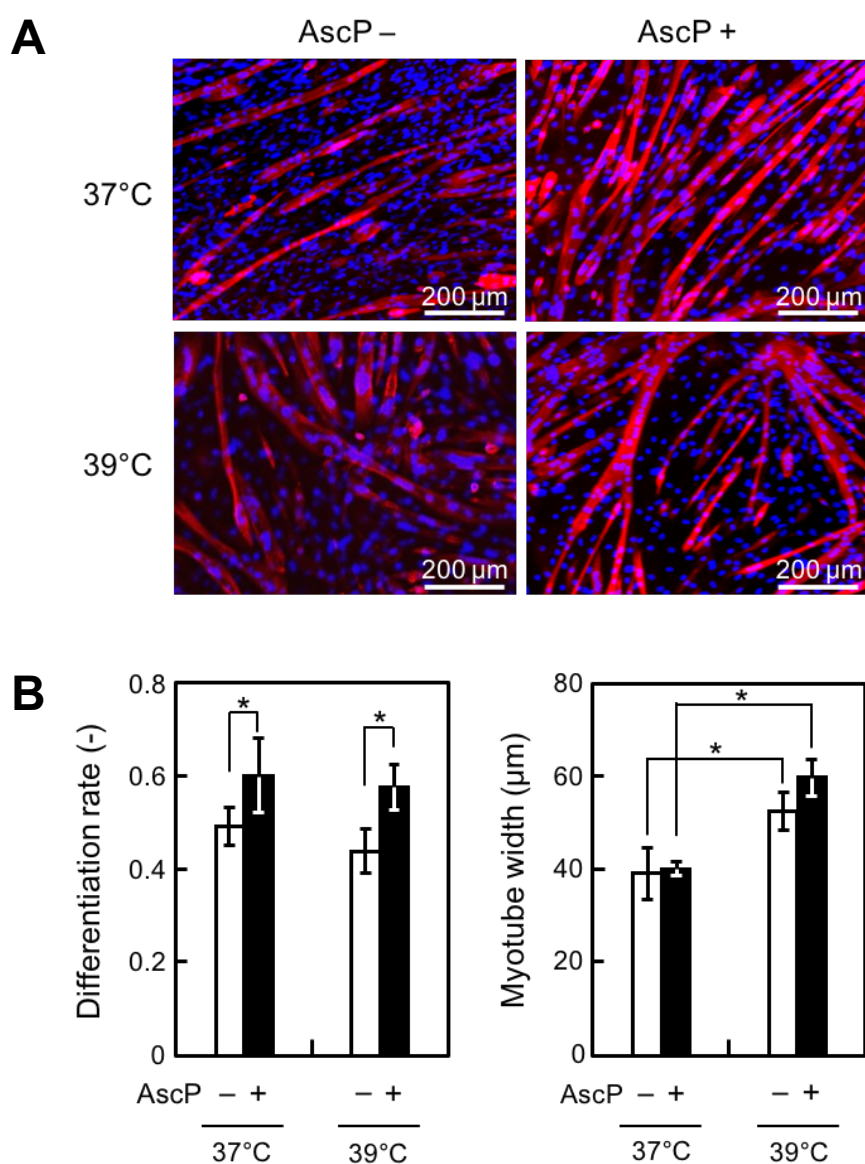


Fig. 3-6 Combined effects of mild heat stimulation and AscP supplementation on myogenic differentiation. (A) Fluorescence microscopic images of myotubes on day 7. C2C12 cells were cultured at 37 or 39°C for 7 days, with (+) or without (-) AscP supplementation in differentiation

medium. Green, α -actinin-positive myotubes; blue, DAPI-stained nuclei. (B) Quantitative image analysis of the differentiation rate (left) and myotube width (right) on day 7. The data are expressed as mean \pm SD (n=3). * P < 0.05.

3.3.7 熱ストレスとアスコルビン酸添加における C2C12 細胞のタンパク質発現の変化

さらに、39°C における培養と AscP 添加の組み合わせの筋タンパク質の発現の変化をウェスタンブロット法により解析した (Fig. 3-7)。さらに、得られたバンドを ImageJ (NIH) ソフトウェアで数値化し、発現量を比較した。筋肥大は、シグナル伝達物質である Akt がリン酸化されることにより起こることが知られている。そこで、Akt とリン酸化 Akt (pAkt) の発現を調べたところ、コントロール (37°C, AscP 添加なし) と比べ、39°C で AscP の非存在下で、pAkt の発現が 3.2 倍上昇した。また、39°C で APS を添加した培養では、pAkt の発現がコントロールと比較して、6.8 倍増加していることから、Akt のリン酸化が促進され、筋肥大が起こったと考えられる。分化率の上昇について、筋分化マーカーである myogenin と MHC の発現を調べたところ、39°C で AscP を添加した場合、コントロールと比較して、myogenin は 2.7 倍、MHC は 2.2 倍発現量が増加した。また、一般的に筋肉は遅筋と速筋に分類される。筋型について調べたところ、遅筋繊維において発現量が多い MHC slow の発現量は、コントロールと比べて 39°C での培養において、AscP 非存在下で 2.7 倍、AscP 添加条件で 3.5 倍上昇した。このことから、39°C で分化誘導培養をした際に、持続的で穏やかな熱ストレスにより適度な長期的トレーニングで誘導される遅筋にシフトしている可能性が示唆された。

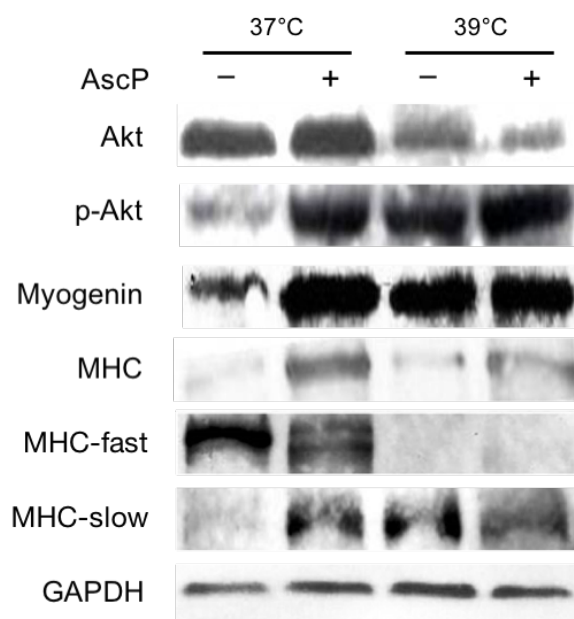


Fig. 3-7 Western blot analysis of myogenic differentiation proteins in C2C12 cells cultured at 37 or 39°C, with (+) or without (-) AscP supplementation for 7 days.

3.3.8 熱ストレスとアスコルビン酸添加による人工筋組織への影響

熱ストレスの印加とアスコルビン酸添加の組み合わせによる筋組織の収縮力への効果を検証するために、環状筋組織を作製した(Fig. 3-8A)。Fig. 3-8B 上の培養スキームの分化誘導条件で培養を行い、分化誘導 7 日目に収縮力の測定を行った(Fig. 3-8B)。アスコルビン酸を添加していない培養(AscP-)と比較して、アスコルビン酸を添加した培養(AscP+)では、同じ温度条件において(条件 i の AscP±、条件 ii の AscP±、条件 iii の AscP±の比較)、有意な差は見られなかったが、収縮力が増加する傾向にあった。

また、39°C で 7 日間培養した場合、37°C で 7 日間培養した場合と比較して(条件 i の AscP-と条件 ii の AscP-、条件 i の AscP+と条件 ii の AscP+の比較)、収縮力は減少した。人工筋組織の作製において、39°C で 7 日間培養した筋組織は、37°C で培養

した組織に比べて、分化誘導培養途中で切れてしまうものが多かった。平面培養の細胞核数の結果において、39 °C、7 日間の熱ストレスで細胞核数が減少したように、環状筋組織においても細胞へのダメージがあったものと推測される。

一方、39°Cの熱ストレスを分化誘導開始から 1 日間付加した筋組織(条件 iii)は 37°Cで7日間培養した筋組織と比較して(条件 i の AscP-と条件 iii の AscP-、条件 i の AscP+と条件 iii の AscP+の比較)収縮力が有意に向上した。これにより、短期間の熱ストレスの印加と APS 添加により、人工筋組織の収縮力が向上することが分かった。

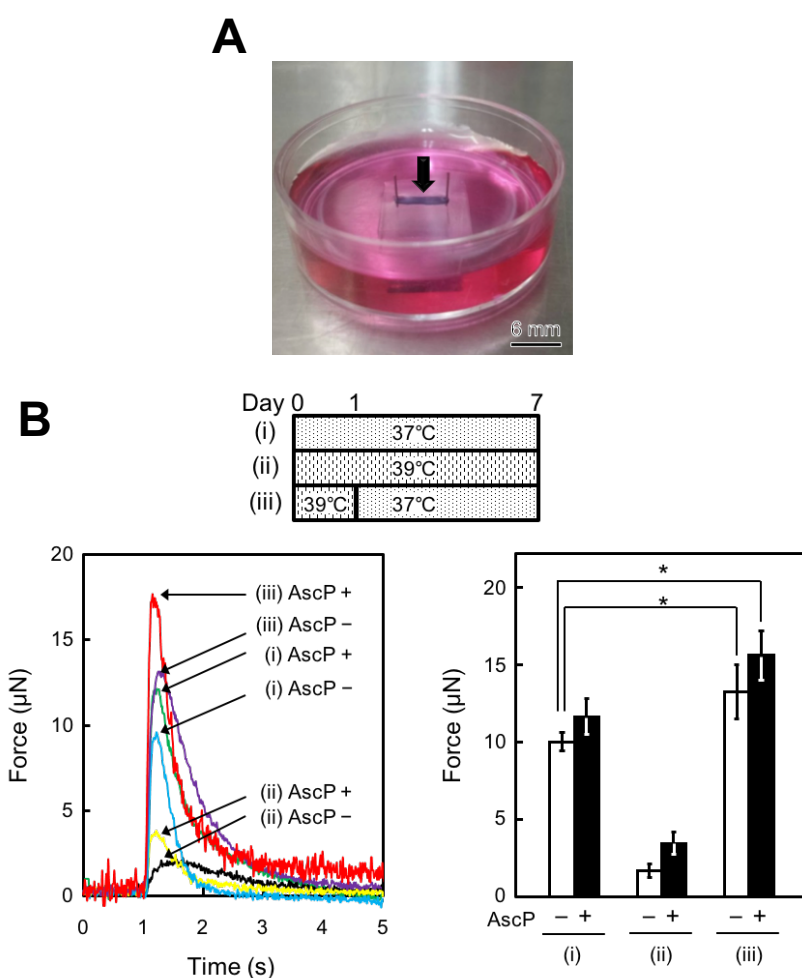


Fig. 3-8 Combined effects of mild heat stimulation and AscP supplementation on bioengineered skeletal muscle tissue constructs. **(A)** Macroscopic observation of a tissue construct fabricated by the Mag-TE technique. The tissue construct is indicated by the arrow. **(B)** Contractile properties of skeletal

muscle tissue constructs. Time schedule (top) indicates heating periods: (i) incubation at 37°C for 7 days; (ii) incubation at 39°C for 7 days; and (iii) incubation at 39°C for 24 h and subsequent incubation at 37°C for 6 days. (left) Representative peaks of the twitch force generated by skeletal muscle tissue constructs on day 7. (right) Maximum twitch forces of the skeletal muscle tissue constructs. The data are expressed as mean \pm SD (n=3). * $P < 0.05$.

3.4 本章のまとめ

本章では、熱ストレスとビタミン C 誘導体であるアスコルビン酸添加による人工筋組織の機能強化を試みた。穏やかな熱ストレスを加えること(39°C における培養)で筋肥大することがわかった。この際、熱ショックタンパク質である α B-クリスタリン、HSP47、HSP72、HSP90 の遺伝子発現レベルの上昇が確認された。アポトーシスに抑制的に働くと考えられる HSP72 の発現量は、37°C の培養条件と比べて 39°C で 1.8 倍上昇した。熱ストレスにおいて HSP72 は、タンパク質の恒常性維持に重要な役割を担っており、筋ジストロフィーモデルマウスを用いた研究では、筋肉内で HSP72 の発現を増強させることで、筋ジストロフィーの病態が軽減されることが報告されている^{45,46}。しかしながら、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に HSP72 を強制発現させただけでは、筋管の太さも分化率も促進されないという報告があることから、筋細胞の肥大化が起こるためには、熱ショックタンパク質の発現だけでは十分ではないことが考えられる⁴⁷。一方、他の筋肥大のメカニズムとして、C2C12 細胞において、カルシウムイオン依存的なカルシニューリンシグナル伝達経路の活性化が筋肥大と筋繊維型のシフトを引き起こすことが報告されている⁴⁸。本研究においても、穏やかな熱ストレスによる MHC-slow のタンパク質発現の増強が確認された。これは、熱によって細胞内のカルシウムイオンが増加したことで、カルシウムイオン依存的なシグナルが活性化されたため、筋肥大が誘導されたと考えられる^{49,50}。

また、筋細胞はコラーゲンの合成に必須となるビタミン C を生産することができないことから、ビタミン C 誘導体であるアスコルビン酸(AscP)を骨格筋細胞の分化誘導中に添加することは有用であると考えられる⁵¹。実際に、C2C12 細胞の分化誘導中にアスコルビン酸を添加することで分化能が上昇し、筋特異的転写因子である myogenin の発現量が増加した。このメカニズムは未だに明らかになっていないが、筋細胞の成熟や筋分化調節遺伝子にとって、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの合成活性化が必要であるということに関連していると考えられる⁵²。

そして、平面培養において分化誘導培地にアスコルビン酸を添加し、穏やかな熱ストレスを加えることで筋肥大と分化能を上昇させることに成功した。また、この培養法で作製した筋組織が、熱ストレスとアスコルビン酸のいずれも加えていないコントロールと比べて、より強い力を発生することが分かった。これらの結果から、培養温度を変更するという簡便な手法で人工筋組織の機能を強化することができ、さらにアスコルビン酸添加を組み合わせることで、収縮力を促進できることが示された。

第4章 遺伝子工学的手法を用いた 人工筋組織の機能強化

4.1 緒言

これまでの人工筋組織の機能強化に関する研究では、様々な遺伝子を導入することで、筋芽細胞の機能向上が試みられてきた^{28,29}。しかしながら、その効果は再生医療や薬剤スクリーニング、アクチュエータへの応用へ大きく期待が持てるような機能強化となっているとは言い難い。人工筋組織を実際に応用するためには、さらなる機能強化に有用な遺伝子を筋芽細胞へと導入し、より高い機能を有する人工筋組織の作製が求められる。

ヨーロッパでは筋肉量が増加した牛や羊などの家畜が知られていたが、このような家畜の遺伝子を調べると、*Myostatin* 遺伝子に様々な変異が発見されており、2005年には*Myostatin* 遺伝子変異を持つ男児も報告されている。この男児の筋肉は、新生児の頃から良く発達しており、5歳で3 kgのダンベルを持ち上げることができた⁵³。こうして、*Myostatin* は骨格筋量増加を抑制することが明らかとなった。

Myostatin は骨格筋特異的に発現する TGF- β ファミリー分子であり、1997年に McPherron らによってクローニングされた⁵⁴。筋ジストロフィーの治療として、この *Myostatin* を抗 *Myostatin* 抗体で阻害することで、骨格筋量を上方調節する戦略が試みられたが、エンドポイントである徒手筋力検査や筋 MRI 検査において有意な改善はみられなかった⁵⁵。その他にも *Myostatin* を阻害する戦略として、上記以外にもいろいろな手段が考えられており、創薬研究が進展している。その中の一つである *Follistatin* は *Myostatin* に直接結合し、細胞膜上に存在している膜貫通型 TGF- β I 型受容体と TGF- β II 型受容体への結合を阻害する⁵⁶。これらのことから、人工筋組織の機能強化において、*Follistatin* 遺伝子導入筋芽細胞を用いることは有効な手段であると考えられる。

また、既往の研究で述べたように、Ito らは人工筋組織に電気刺激与えて培養することで、約5倍の収縮力強化に成功している³⁶。そこで本研究では、*Follistatin* 遺伝子導入に加えて、電気刺激培養を組み合わせることで、人工筋組織の更なる機能強化を試みた。

4.2 実験材料および方法

4.2.1 マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞の培養

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞は豊田中央研究所から供与されたものを使用した。C2C12 細胞の増殖培地として、低グルコース DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium ; Gibco) 合成培地に 10%ウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum , FBS)、抗生物質 (100 unit/ml ベンジルペニシリンカリウム (Wako)、100 µg/ml ストレプトマイシン硫酸塩 (Wako))、25 mM HEPES (同仁化学)、3.7 mg/ml 炭酸水素ナトリウム (Wako) を添加して使用した。また、分化誘導培地は、10%FBS を添加する代わりに 2%仔牛血清 (CS) を添加したものをを用いた。増殖培養は 37°C、5%CO₂ インキュベータ内で行い、50~80%コンフルエントになり次第、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、0.25%トリプシン-EDTA を用いて細胞を剥離し、2000 cells/cm² の細胞密度で継代した。また、分化誘導培養は 5000 cells/cm² で播種し、2 日間増殖培地で、37°C、5%CO₂ インキュベータ内で培養し、コンフルエントになった後、分化誘導培地に変え、7 日間培養を行った。

4.2.2 ヒト胎児腎細胞由来細胞株 293FT 細胞の培養

ウイルス生産細胞として 293FT 細胞を用いた。293FT 細胞の培地として、10% FBS、0.1 mM 非必須アミノ酸 (NEAA, Invitrogen)、25 mM HEPES (同仁化学)、抗生物質 (100 unit/mL ベンジルペニシリンカリウム、0.1 mg/mL ストレプトマ

イシン硫酸塩) および 3.7 g/L 炭酸水素ナトリウムを添加した高グルコース DMEM を用いた。また、培養基材としてコラーゲンコートディッシュ (Iwaki) を使用し、37°C、5% CO₂ インキュベータ内で培養した。

4.2.3 プラスミドベクター取得のための操作

4.2.3.1 大腸菌コンピテントセルの調製

本研究では、Inoue らの手法をもとに、コンピテントセルの作製を行った⁵⁷。LB 寒天培地 (1%ポリペプトン、1%NaCl、0.5%酵母エキス、2%アガー) 上に菌体を塗布し、増殖したコロニーを 3 ml の LB 培地に植継ぎ、37°C で一晩振盪培養した。翌日、1 ml の前培養液を 30 ml の新たな LB 培地に添加し、培養液の濁度が OD₆₀₀=0.5 になるまで 37°C で振盪培養した。その後、3,000 × g、10 分間、4°C で遠心分離し、上清を除去した。沈澱した菌体ペレットを 10 ml のトランスフォーメーションバッファー (10 mM PIPES、15 mM CaCl₂ · 2H₂O、250 mM KCl、MnCl₂ · 4H₂O、pH6.8) で再懸濁し、氷上で 10 分間静置した。さらに、3,000 × g、10 分間、4°C で遠心分離を行い、上清を除去し、7%DMSO を含む 2.4 ml のトランスフォーメーションバッファーで懸濁し、100 μl ずつ分注した。その後、液体窒素を用いて週間凍結させ、-80°C で保存した。

4.2.3.2 形質転換

微量遠心チューブに 10 μl のプラスミド DNA 溶液と大腸菌コンピテントセル 100 μl を混ぜ、穏やかにピペットで攪拌した後、氷上で 30 分インキュベートした。42°C のヒートブロックで 45 秒間加熱処理を行い、再び氷上で 5 分間インキュベートした。次に、1 ml の LB 培地 (1% ポリペプトン、1%NaCl、0.5%酵母エキス) の入った試験管に全量を移し、37°C で 1 時間振盪培養した。その後、

培養液 100 μ l を LB 寒天プレート (LB 培地、2% アガロース) にとり、コンラージ棒を用いて均等に塗り広げ、37°C のインキュベータ内で一晚培養し、コロニーを形成させた。

4.2.3.3 小スケールプラスミド DNA 抽出 (アルカリ法)

微量遠心チューブに大腸菌の培養液 1 ml をとり、6,000 \times g、1 分間の遠心分離後、上清を除去し、菌体を回収した。100 μ l のリゾチーム含有グルコース溶液 (50 mM グルコース、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA、2 mg/ml リゾチーム) を加え、よく懸濁した。次に、200 μ l のアルカリ-SDS 溶液 (0.2 N NaOH、1% SDS) を加え、微量遠心チューブを穏やかに数回反転し、150 μ l の 3 M 酢酸カリウム (pH 4.5) を加え、微量遠心チューブを穏やかに反転した。これに 450 μ l のフェノール-クロロホルム混液を加え、よく混和した後、12,000 \times g、5 分間、4°C で遠心することにより、DNA を含む水層と油層を分離した。

DNA を含む上層を新たな微量遠心チューブに移し、300 μ l のイソプロパノールを加え、よく混和させ、12,000 \times g、10 分間、4°C で遠心分離し、DNA ペレットを沈殿させた。次に、上清を除去し、200 μ l の冷 70% エタノールを加えて、20,000 \times g、5 分間、4°C で遠心分離することにより DNA ペレットを洗浄した後、上清を捨て、減圧乾燥し、20 μ l の超純水に溶出した。

4.2.3.4 制限酵素を用いた DNA の切断

プラスミドの制限酵素による切断は、プラスミド (50~200 ng) と制限酵素、及び制限酵素に適するバッファーを微量遠心チューブにとり、溶液を混ぜ、軽く遠心して (数秒間) 微量遠心チューブの底に集め、37°C で、1 時間反応させた。

4.2.3.5 アガロースゲル電気泳動による DNA 断片の確認および精製

制限酵素で切断した DNA 溶液サンプルをアガロースゲルにアプライし、すでにバンドサイズが分かっているマーカー (λ -*Hind*III-digested または ϕ X174-*Hinc*II-digested marker) と同時に泳動することでサンプルのバンドの長さを確認した。

アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイドを用いてアガロースゲル中の DNA 断片を染色した。UV 照射下で目的バンド部分のアガロースゲルを切り出し、細かくスライスし、1.5 ml マイクロチューブに移した。その後、DNA 精製キット (MagExtractor-PCR & Gel Clean Up-, Toyobo) を用いて、DNA 断片を精製した。なお操作はキットに付随するプロトコールに従った。

4.2.3.6 プラスミド DNA の大量抽出

目的のプラスミド DNA を有する大腸菌を LB 培地 3 ml で 8 時間前培養し、その培養液 80 μ l を新たな LB 培地 40 ml に加え、12 時間培養した。その後、6,000 \times g、15 分間、4°C で遠心分離し、上澄みを完全に除去した。次に、プラスミド抽出キット (QIAfilter Plasmid Midi Kits, Qiagen) によりプラスミドの大量抽出を行った。

4.2.4 *Follistatin* 遺伝子を導入した C2C12 細胞の作製

4.2.4.1 レトロウイルスベクター生産用プラスミドの構築

C2C12 細胞への遺伝子導入のために、MSCV ベースのレトロウイルスベクターを用いた。また、レトロウイルスベクターに Tet-On システム (Clontech) を組み込むことで、*Follistatin* 遺伝子の発現誘導を行った。レトロウイルスベクター生産のために、リバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (reverse tetracycline-dependent transactivator; rtTA) の発現ユニットをコードする

レトロウイルスベクター生産用プラスミドを使用した。pQMSCV/EGFP-CMV-rtTA-WPRE は、ドキシサイクリン (Dox) によって活性化させる rtTA の構造的発現ユニットをコードする。

pQMSCV/EGFP-TREtight-Follistatin-WPRE は、テトラサイクリン応答配列 (tetracycline-responsive element; TRE) と *Follistatin* 遺伝子から構成される発現ユニットをコードする。*Follistatin* 遺伝子の発現は、活性化された rtTA によって誘導される。これらのプラスミドは、ウイルス力価の測定のためのレポーター遺伝子として、ウイルス LTR プロモーターの制御下に Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子を有する。pQMSCV/EGFP-CMV-rtTA-WPRE は山元秀晃氏から譲渡して頂いた⁵⁸。また、*Follistatin* の cDNA は *Follistatin* 遺伝子を含むプラスミド pCMV-SPORT6 (Clone ID: LIFESEQ95153976, Open Biosystems) を鋳型にして表 2-1 に示すプライマーを用いて PCR 法により増幅し、制限酵素 *Bam*HI で消化した *Follistatin* 遺伝子の DNA 断片を、*Bam*HI で切断した pQMSCV/EGFP-TREtight-WPRE と結合させ、pQMSCV/EGFP-TREtight-Follistatin -WPRE を作製した。

Table 4-1 Primer sequences for cloning of follistatin gene.

<i>Gene</i>	<i>Primer sequences</i>	<i>Enzyme</i>
<i>Follistatin</i>	FW 5'- AAGGATCCACCATGGTCCGCGAG-3'	<i>Bam</i> HI
	RV 5'-GCGGATCCTTACCACTCTAGAATAGAAGATATAGGAAAG -3'	<i>Bam</i> HI

4.2.4.2 レトロウイルスベクターの生産および細胞への感染

ウイルスベクターは、Hotta らの方法に基づいて生産させた⁵⁹。遺伝子導入の前日に、293FT 細胞をコラーゲンコートディッシュに 6.5×10^4 cells/dish で播種し、翌日、細胞密度が 90~95%になった時点で pQMSCV/EGFP-CMV-rtTA-WPRE ま

たは pQMSCV / EGFP- TREtight- Follistatin- WPRE および pcDNA4/gag-pol、pLP/VSV-G をリポフェクション試薬 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて一過性でコトランスフェクションした。トランスフェクションから 48 時間後に 293FT 細胞の培養上清を回収した。回収した培養上清は、上清中の細胞を除去するために孔径 0.45 μm のセルロースアセテートフィルター (Advantec) を用いて濾過して回収し、液体窒素を使用して凍結後、 -80°C で保存した。ウイルス力価の測定は C2C12 細胞を前日に 24 well plate (Thermo Fisher Scientific) に 1×10^4 cells/well で播種し、DMEM (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ポリブレン (Sigma-Aldrich)) で段階希釈したウイルス溶液を加え、48 時間後にフローサイトメトリーによる測定を行った。ウイルス感染のために、C2C12 細胞を 100 mm 細胞培養ディッシュ (Thermo Fisher Scientific) に 2.5×10^5 cells/dish の細胞数で播種した。翌日、培養上清を取り除き、MOI (Multiplicity of infection) が 5 になるようにウイルス力価を調整 (2.5×10^6 IU/mL) し、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ポリブレンを含む新たな培地を加えた。細胞を 37°C で 6 時間培養し、培地を再度交換した。

4.2.5 *Follistatin* 遺伝子の発現解析

Follistatin 遺伝子の発現量を半定量的に解析するために RT-PCR を行った。まず、*Follistatin* 遺伝子導入 C2C12 細胞 (以下 C2C12/FST 細胞) を増殖培地で 2 日間培養し、分化誘導培地で 7 日間培養を行った。次に、RNA 抽出キット (RNAiso plus, Takara) を用いて、Total RNA を抽出した。なお、操作手順は製品プロトコールに従った。抽出した Total RNA を oligo-dT プライマーと ReverTra Ace (Toyobo) 逆転写酵素を用いて逆転写し、cDNA を合成した。*Follistatin* 遺伝子の発現解析のために、G-taq DNA ポリメラーゼ (Cosmo Genetech) を用いて PCR を行った。PCR 反応は、 95°C 2 分間の初期解離後、 95°C 20 秒間、 72°C 10 秒間の増幅反応を 30 サイクル行い、最後に 72°C 5 分間の伸長反応を行った。コントロールとし

てハウスキーピング遺伝子である GAPDH を選択し、各遺伝子の増幅には、各遺伝子に対する特異的なプライマーを用いた (Table 4-2)。

Table 4-2 Primer sequences for RT-PCR

<i>Gene</i>	<i>Primer sequences</i>		<i>Product size</i>
Follistatin	FW	5' - TGGACCGAGGAGGATGTGAAC -3'	155 bp
	RV	5' - GCAGCGGGGTTTATTCTTCTTGT -3'	
GAPDH	FW	5'-CTACCCCAATGTGTCCGTC-3'	150 bp
	RV	5'-GCTGTTGAAGTCGCAGGAGAC-3'	

4.2.6 免疫蛍光染色

分化誘導後の筋管を観察し、形態学的に評価（筋管の太さ、面積、分化率の定量）するために免疫蛍光染色を行った。C2C12 細胞および C2C12/FST 細胞を 6 well 細胞培養プレート (Thermo Fisher Scientific) に 5.0×10^4 cells/well の細胞数で播種し、増殖培地で 80~90%コンフルエントになるまで培養した後、分化誘導培地に切り替えた時点をも分化誘導 0 日目として、7 日間毎日培地交換を行った。分化誘導 7 日目に、サンプルをリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) を含む PBS で 15 分間固定した。その後、サンプルは 0.2% Triton-X 100 (Wako) を含む PBS で 15 分間浸した。PBS で 3 回洗浄した後、1%ウシ血清アルブミン (BSA, Wako) を含む PBS で 30 分間ブロッキングした。次に一次抗体である抗 α アクチニン抗体 (Sigma) : 1% BSA 含有 PBS = 1:1000 の割合で混合した溶液をサンプルに 45 分間浸した。PBS で 3 回洗浄し、二次抗体 Alexa Flour 488 (Invitrogen) : Alexa Flour 546 phalloidin (Invitrogen) : DAPI (Roche) : 1% BSA 含有 PBS = 1 : 1 : 1 : 1000 の割合で混合

した溶液をサンプルに45分間浸した。PBSで3回洗浄し、蛍光顕微鏡(BZ-9000, キーエンス)で観察した。1wellにつき5枚の写真を撮り、各条件で3wellずつ、計15枚の写真からImage Jソフトウェア(NIH)を使用して α アクチニン陽性の筋管の太さと面積を計測し、全核数と筋管中に存在する核数の割合から分化率を算出した。

4.2.7 電気刺激応答性筋管の収縮幅計測

C2C12細胞およびC2C12/FST細胞を 5×10^4 cells/dishの細胞数で35mm細胞培養ディッシュ(Corning)に播種後、増殖培地で2日間培養し、分化誘導培地に交換して7日間培養を行った。その際、C2C12/FST細胞にはDoxを分化誘導培地中に1 μ g/mlで添加した細胞と、比較対象として非添加のものを用意した。その後、ディッシュを電気刺激培養チャンバー内(C-Dish)に設置し、直流電源を用いてC-dishから細胞に電気刺激を加えた。印加電圧(0.3V/mm)、パルス幅(4ms)、周波数(1Hz)の条件で電気刺激を与えたときの筋管の収縮運動を顕微鏡(BZ-9000, キーエンス)で24秒間撮影し、その動画を動体解析ソフトウェアで解析し、筋管の収縮幅を測定した。

4.2.8 Magnetite Cationic Liposome(MCL)の作製

3.2.6に記述した手法と同様にしてMCLを調製した。

4.2.9 人工筋組織の作製

磁力によって細胞を高密度に培養底面に集積させ、三次元組織を構築するために、MCLを用いて細胞を磁気標識した。80%コンフルエントのディッシュの細胞を回収し、細胞数を計測した後に100pg/cellの濃度になるように調製した

MCL 含有培地で培地交換を行い、4 時間培養することで C2C12 細胞を磁気標識した。

その後、磁気標識した C2C12 細胞を回収し、 1.0×10^6 cells/ 50 μ l の細胞密度で 10%FBS 含有 DMEM 培地に懸濁した。0.3 %Type I コラーゲン (新田ゼラチン)、10 \times DMEM、再構成用緩衝液 (0.05N 水酸化ナトリウム溶液 100 ml に対し、炭酸水素ナトリウム 2.2 g、HEPES 4.77 g を溶かしたもの)、マトリゲル (BD Biosciences)、FBS、細胞懸濁液をそれぞれ 56 : 7 : 7 : 15 : 15 : 50 の割合で混合した混合溶液を調製した。そして、超低接着性 24 well 培養プレートの well の中心に高真空用グリース (Corning) を用いて直径 12 mm のポリカーボネート栓を接着し、これを 4000 G の磁石の上に設置した。well とポリカーボネート栓の間にできた隙間に、作製した混合溶液を 1 well 当たり 150 μ l ずつ播種した。

4.2.10 人工筋組織の分化誘導と電気刺激培養(EPS)

人工筋組織を 12 時間増殖培地で培養した後に、シリコンラバーを 35 mm dish もしくは 6 well プレートの well 内に高真空用グリースを用いて接着した。人工筋組織を取り外し、虫ピンを用いて人工筋組織をシリコンラバー上に固定した。また、虫ピンと虫ピンの間隔については 7 mm とした。その後、分化誘導培地として、血清の代替物として知られる Ultrosor G を 0.4%含む DMEM 培地を用いて、5%CO₂ インキュベータ内で 7 日間分化誘導培養を行った。また、電気刺激培養を行った条件については、4 日間分化誘導を行った後、人工筋組織を電気刺激培養チャンバー内 (C-Dish) に設置した。直流電源を用いて、C-dish から人工筋組織に電気刺激を加えた。印加電圧 (0.3 V/mm)、パルス幅 (4 ms)、周波数 (1 Hz) をパラメーターとした条件下で分化誘導 7 日目まで電気刺激培養を行った。また、*Follistatin* 遺伝子発現を誘導する条件については、平面培養と同様に、分化誘導 0 日目から 1 μ g/mL の濃度で Dox を培養液中に添加した。

4.2.11 人工筋組織の収縮力測定

3.2.9 に記述した手法と同様にして人工筋組織の収縮力測定を行った。

4.2.12 *Follistatin* 遺伝子導入筋組織の免疫蛍光染色による観察

人工筋組織の筋管を観察し、電気刺激培養と *Follistatin* 発現による機能向上メカニズムの理解を深めるために免疫蛍光染色を行った。C2C12/FST 細胞を用いて人工筋組織を作製した後、分化誘導培地に切り替えた時点を分化誘導 0 日目として、7 日間毎日培地交換を行った。この際、電気刺激培養を行った条件は、分化誘導 4 日目から 7 日目までの 4 日間行い、*Follistatin* 発現を誘導した条件は、薬剤を分化誘導中の 7 日間添加した。その後、人工筋組織を PBS で洗浄し、4%PFA を含む PBS で 15 分間固定した。続いて、0.2% Triton-X 100 を含む PBS で 15 分間浸し、PBS で 3 回洗浄した後、1 %BSA を含む PBS で 30 分間ブロッキングした。次に一次抗体である抗 α アクチニン抗体 : 1% BSA 含有 PBS = 1 : 1000 の割合で混合した溶液をサンプルに 45 分間浸した。PBS で 3 回洗浄し、二次抗体 Alexa Flour 546 : DAPI : 1% BSA 含有 PBS = 1 : 1 : 1000 の割合で混合した溶液をサンプルに 45 分間浸した。PBS で 3 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡 (Flouview FVi10, OLUMPUS) で観察を行った。

4.2.13 統計解析

マンホイットニー順位和検定を用いて統計解析を行い、 $P < 0.05$ の時、有意に差があると判断した。

4.3 実験結果および考察

4.3.1 *Follistatin* 遺伝子を導入した C2C12 細胞の作製

Follistatin 遺伝子を薬剤（ドキシサイクリン, Dox）で誘導発現させるために、Tet-on システムを組み込んだレトロウイルスベクターを C2C12 細胞に感染させ、C2C12/FST 細胞を作製した。*Follistatin* 遺伝子の発現を確認するため、C2C12/FST 細胞を増殖培地で 2 日間培養し、分化誘導培地で 7 日間培養した後、RT-PCR 解析により、半定量的に *Follistatin* 遺伝子の発現量の確認を行った (Fig. 4-1)。その結果、Dox 添加 (Dox+) の条件で *Follistatin* 遺伝子の発現が確認された。

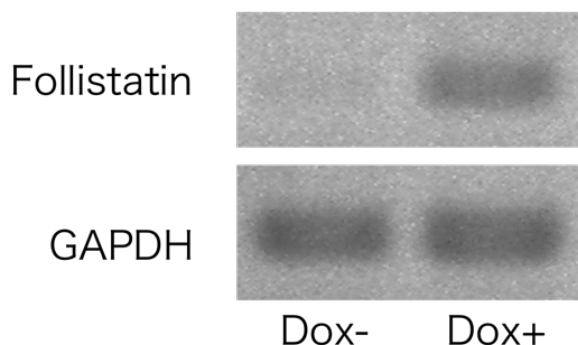


Fig. 4-1 *Follistatin* expression of C2C12/FST cells at day7 in the presence (Dox+) or absence (Dox-) of doxycycline (Dox) for 7 days.

4.3.2 *Follistatin* 発現における C2C12 筋管の形態学的評価

C2C12 筋管の形態学的な評価を行うために、C2C12 細胞および C2C12/FST 細胞を増殖培地で 2 日間培養後、分化誘導培地に交換して 7 日間培養し、C2C12 細胞を筋管へと分化させた。その後、免疫蛍光染色により筋管と細胞核を α アクチニン（赤色）および DAPI（青色）で蛍光標識し、顕微鏡で観察を行った (Fig.

4-2)。その結果、Dox 添加で Follistatin を発現した C2C12/FST (Dox+) 細胞は、Dox 非添加の C2C12/FST (Dox-) 細胞と比較して、筋管が太くなっており、筋管密度も高くなっていることが確認された。次に、ImageJ ソフトウェアを用いて、定量的画像解析を行い、 α アクチニン蛍光染色画像と DAPI 染色画像から、分化率（筋管中の核数/総核数）および筋管の太さを測定したところ、C2C12 細胞および Dox 非添加の C2C12/FST (Dox-) 細胞と比較して、Dox を添加した C2C12/FST (Dox+) 細胞は、分化率および筋管の太さが有意に上昇していた (Fig. 4-2)。これらのことから、C2C12 細胞において Follistatin の発現が、筋管への分化の際に筋管肥大化を促し、分化率を上昇させることがわかった。

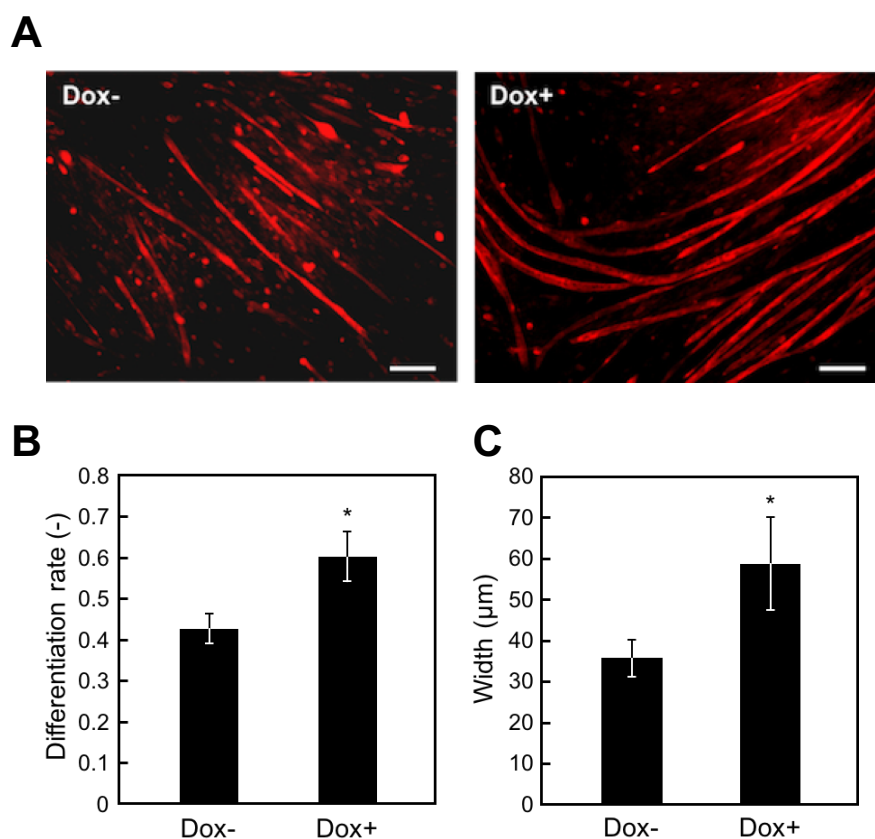


Fig. 4-2 (A) Fluorescence microscopy images of α -actinin-positive myotubes (red) of C2C12/FST cells at day 7 in two-dimensional (2D) culture. Nuclei were stained using DAPI (blue). C2C12/FST cells were cultured in the presence (Dox+) or absence (Dox-) of doxycycline (Dox)

for 7 days. Scale bars, 200 μm . (B) Quantitative image analysis of myotube differentiation rate at day 7 in 2D culture. The data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. $*P < 0.05$ vs. Dox-. (C) Quantitative image analysis of myotube width at day 7 in 2D culture. The data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. $*P < 0.05$ vs. Dox-.

4.3.3 Follistatin 発現が C2C12 細胞の収縮活性に与える影響

C2C12 細胞および C2C12/FST 細胞を増殖培地で 2 日間培養し、分化誘導培地で 7 日間培養した後、電気刺激に応じて収縮する筋管の動画を撮影し、動体解析ソフトウェアにて筋管の収縮幅を測定した (Fig. 4-3)。

その結果、*Follistatin* 遺伝子を発現した筋管細胞 (Dox+) の収縮幅は、*Follistatin* を発現していない筋管細胞 (Dox-) と比較して、有意に収縮幅が増加した。これにより、細胞の形態学的な評価による機能改善だけでなく、運動機能として収縮幅が増大していることから、*Follistatin* 発現 C2C12 細胞を用いることで、高機能な人工筋組織の作製が期待できる。

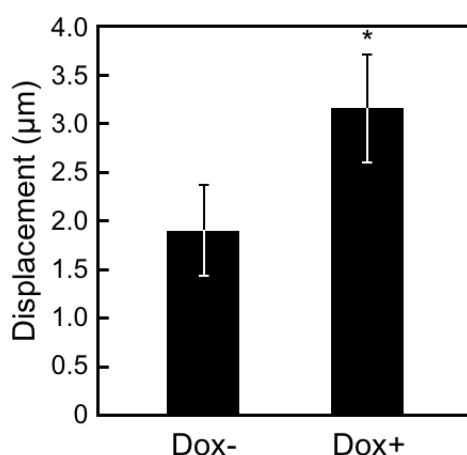


Fig. 4-3 Contractile movement of myotubes in 2D culture. Electrical pulse stimulation (EPS; voltage, 0.3 V/mm; width, 10 ms) was applied at 1 Hz, and the displacement of a single point was

analyzed within the myotubes on day 7. Quantitative analysis of displacement was performed. The data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$ vs. Dox-.

4.3.4 Follistatin 発現と電気刺激培養が人工筋組織の収縮力に与える影響

Follistatin 発現における人工筋組織の機能特性への影響を調べるために、人工筋組織の作製を行い、その人工筋組織を電気パルスで刺激し、その際に発生した収縮力を測定した。まず、C2C12/FST 細胞に機能性磁性ナノ粒子である MCL を取り込ませることで磁気標識した。さらに、磁力を用いて細胞をポリカーボネート栓と 24 well プレートの隙間に高密度に集積させることで、細胞密度が高く、配向性のある人工筋組織の作製に成功した。次に、この人工筋組織を分化誘導培地で7日間培養を行った後、1 V/mm、パルス幅 10 ms の電気パルスを与えることで収縮運動させ、そのときの収縮力を測定した (Fig. 4-4)。その結果、Follistatin 発現なしで電気刺激培養を行っていない人工筋組織 (Dox-, EPS-) と比較して、Follistatin 発現細胞で作製した人工筋組織 (FST+, EPS-) は、収縮力が約 9 倍向上した。また、電気刺激培養のみによる人工筋組織 (Dox-, EPS+) の収縮力向上は約 4.8 倍となった。さらに、Follistatin 発現と電気刺激培養を組み合わせ強化した人工筋組織 (Dox+, EPS+) の収縮力は、約 17 倍向上した。これらの結果から、C2C12 細胞に *Follistatin* 遺伝子の導入と、電気刺激培養の組み合わせは、ティッシュエンジニアリングで作製した人工筋組織の機能向上に非常に有効であることがわかった。

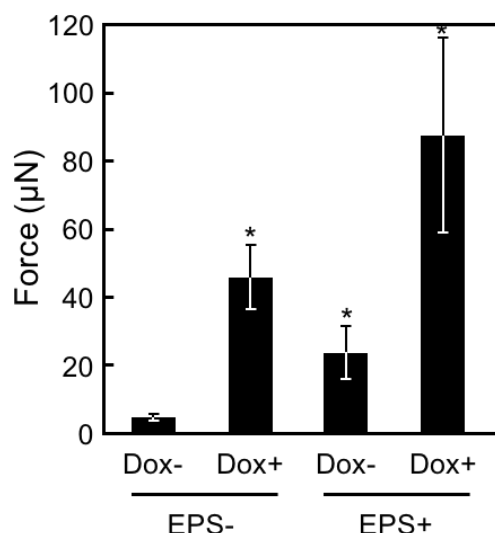


Fig. 4-4 The force generated by tissue-engineered skeletal muscle tissue constructs on day 7. Constructs were cultured with (EPS+) or without (EPS-) continuous EPS at an amplitude of 0.3 V/mm, width of 4 ms, and frequency of 1 Hz during tissue culture. The data are expressed as mean \pm SD of three constructs. * $P < 0.05$ vs. EPS- Dox-.

4.3.5 *Follistatin* 遺伝子導入人工筋組織の形態観察

C2C12/FST 細胞を用いて人工筋組織を作製した後、薬剤により *Follistatin* 遺伝子の発現を誘導し、さらに電気刺激培養と組み合わせることで、人工筋組織の収縮力を増強することに成功した。そこで、人工筋組織の機能向上メカニズムの解明ために形態観察を行った。まず、C2C12/FST 細胞を用いて人工筋組織を作製し、分化誘導培養中と同時に薬剤により *Follistatin* 遺伝子発現を誘導した。さらに分化誘導 4 日目から 7 日目まで電気刺激培養を行った後、人工筋組織を免疫蛍光染色により蛍光標識した。筋管は α アクチニン (赤色)、細胞核は DAPI (青色) の蛍光波長を共焦点レーザー顕微鏡により観察することで、組織内の細胞形態の観察を行った (Fig. 4-5)。その結果、*Follistatin* を発現した人工筋組織 (Fig. 4-5 右上、筋管径 $29.2 \pm 2.8 \mu\text{m}$) は、遺伝子発現なし、電気刺激培養なしのコントロール (Fig. 4-5 左上、筋管径 $14.1 \pm 1.4 \mu\text{m}$) と比較して筋管の太さが増加す

ることがわかった。これは、平面培養における C2C12/FST 細胞の免疫染色の結果と相関性があるといえる。また、電気刺激培養を行った人工筋組織 (Fig. 4-5 左下、筋管径 $27.9 \pm 2.7 \mu\text{m}$) の筋管は、発達したサルコメア構造を有していることがわかった。このような発達したサルコメア構造は、電気刺激培養を行っていない条件 (Fig. 4-5 左上) では確認出来なかったことから、電気刺激培養による人工筋組織の収縮力増強は、サルコメア構造の発達に関係していることが示唆された。一方で、Dox の添加による Follistatin 発現のみの条件 (Fig. 4-5 右上) においても、電気刺激条件ほどではないが、サルコメア構造の形成が確認された。平面培養において、Follistatin の発現は筋肥大と分化どちらも促進されていることから、人工筋組織においても、筋分化に伴ってサルコメア構造が形成されたと考えられる。また、電気刺激培養と Follistatin 発現を組み合わせた条件 (Fig. 4-5 右下、筋管径 $40.8 \pm 9.4 \mu\text{m}$) では、Follistatin 発現によって筋管が肥大化し、その筋管中に存在するサルコメアが電気刺激培養によって発達することが人工筋組織の著しい機能向上に寄与していると考えられる。

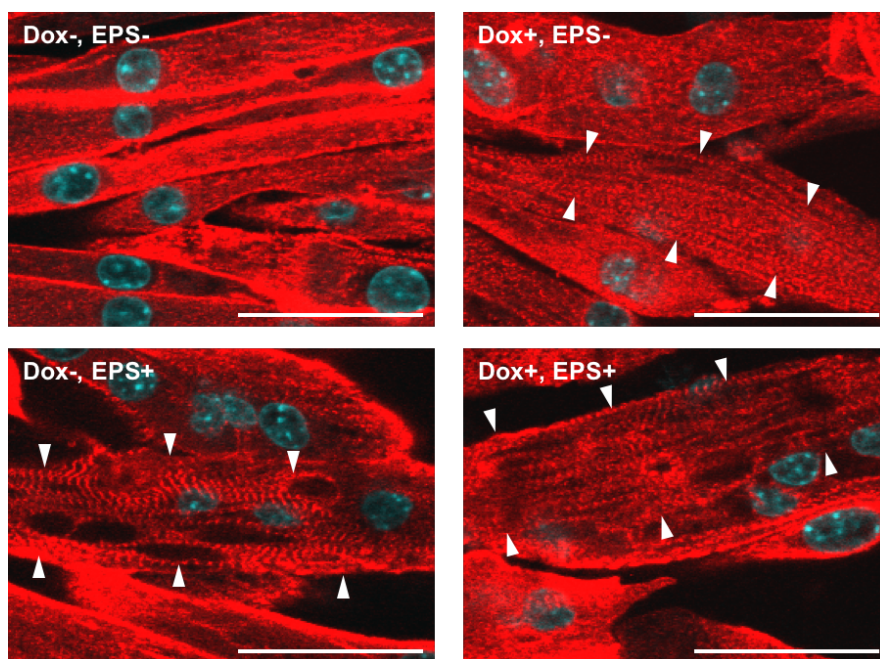


Fig. 4-5 Fluorescence microscopy images of α -actinin-positive myotubes (red) in the C2C12/FST tissue constructs at day 7. Nuclei were stained by DAPI (blue). Muscle tissue constructs were

cultured in the presence (Dox+) or absence (Dox-) of doxycycline, and cultured with (EPS+) or without (EPS-) continuous EPS at amplitude of 0.3 V/mm, width of 4 ms, and frequency of 1Hz. Sarcomere structures were indicated by white arrows. Scale bars, 50 μ m.

4.4 本章のまとめ

近年、怪我の欠損部位や組織の機能不全に対する治療方法として再生医療が注目されており、この治療方法を実現するためにティッシュエンジニアリングが提唱された。中でも人工筋組織の作製は、骨格筋再生医療のための組織移植や筋疾患に対する薬剤スクリーニング、またアクチュエータの動力源などへの応用が期待されている。一方で、収縮運動に代表される人工筋組織の機能は生体組織と比較して著しく低く、その改善は人工筋組織の応用を目指すにあたり必要不可欠であると言える。

そこで本章では、人工筋組織の高機能化を目的として、遺伝子工学的なアプローチと力学的なアプローチによる機能強化を試みた。まず、C2C12 細胞株へ Tet-on システムを組み込んだレトロウイルスベクターを用いて *Follistatin* 遺伝子導入を行い、培養液中の Dox 添加で遺伝子を発現する C2C12/FST 細胞を取得した。次に、*Follistatin* 遺伝子の発現を確認するために、RT-PCR 解析により *Follistatin* 遺伝子を半定量的に解析し、Dox 添加により *Follistatin* 遺伝子を発現することを確認した。続いて、*Follistatin* 発現が分化誘導後の筋管の形態に与える影響を調べるために、免疫蛍光染色を用いて α アクチニンと DAPI の蛍光を観察し、筋管の太さ、分化率を計測した。その結果、*Follistatin* の発現によって、筋管の太さおよび、分化率が上昇した。さらに、*Follistatin* の発現が筋管の収縮運動に与える影響を調べるために、電気刺激を与えることで収縮する筋管の動画を撮影し、動体解析ソフトウェアを用いて、筋管の収縮幅を測定した。これにより *Follistatin* の発現は筋管の収縮幅を有意に上昇させることが確認された。次に、*Follistatin* を発現する細胞を用いて人工筋組織を作製した後、*Follistatin* 発現で細胞機能を強

化し、電気刺激培養を併用することで、人工筋組織の収縮力を著しく向上させることに成功した。これにより、*Follistatin* の発現が電気刺激による人工筋組織のトレーニング効果を促進する可能性が示唆された。以上のことから、*Follistatin* 遺伝子導入と電気刺激培養の組み合わせは人工筋組織の機能強化に有用であると考えられる。また、*Follistatin* 遺伝子導入と電気刺激培養による人工筋組織の機能強化メカニズムの解明のために人工筋組織を免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で筋組織の観察を行った。その結果、電気刺激培養によって筋管のサルコメア構造が発達し、*Follistatin* の発現で筋肥大していることが確認され、電気刺激培養と *Follistatin* 発現の組み合わせによる人工筋組織の収縮力向上は、筋肥大とサルコメア構造の発達に起因すると考えられる。

第5章 筋芽細胞の収縮活性を利用した 薬剤スクリーニング系の構築

5.1 緒言

我々の研究室では、生体筋肉が持つ特徴を模倣するために、Mag-TE法を利用して人工筋組織の作製を行ってきた^{6,28,29,36}。作製した三次元人工筋組織は、細胞が高密度に存在し、一方向に配向した筋管を誘導することができた。作製した三次元人工筋組織が発生した力は生体組織が発生する力のわずか0.5%程度ではあったものの、電気刺激に応答した収縮を示したことから、生体筋肉と同様の「収縮して力を発揮する」といった機能性をもっていることが明らかになった。生体筋肉と同様の機能性を持った三次元人工筋組織には多くの応用が考えられるが、中でも *in vitro* で筋機能を増強する薬剤を探索するのに有効なツールとなるのではないかと考えた。

一方で、エピジェネティックな変化をもたらす低分子薬剤の添加により筋芽細胞株の筋分化が促進されたとの報告がある⁶⁰⁻⁷⁰。エピジェネティクスとはDNA配列の変化を伴わず、後天的な修飾により遺伝子発現が制御され維持される仕組みのことである。中でも、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は単なる脱アセチル化酵素としてだけでなく、細胞内で転写調節に関わるタンパク質と複合体を形成することにより、真核生物の遺伝子発現調節に深く関わることで、明らかになってきた⁷¹。HDACは転写調節をはじめ、多様な細胞機能に関与する。したがって、HDACを阻害することにより、遺伝子発現や細胞機能を変化させることができる。HDACとしてこれまでに11種類のタンパク質が同定されており、これらのタンパク質はクラス毎に分類することができる⁷¹。全身にユビキタスに存在するHDACクラスI、主に心臓や骨格筋に存在するHDACクラスIIの他にクラスIII、クラスIVが存在する。HDAC阻害剤はその構造の違いによって4タイプに分類できるが、ヒドロキサム酸タイプのトリ

コスタチン A (TSA)、短鎖脂肪酸タイプのバルプロ酸ナトリウム (VPA) と酪酸ナトリウム (SB)、環状テトラペプチドタイプのアピシジン (API) などがある。これらの HDAC 阻害剤は主に HDACI 及び HDACII を阻害する。

HDAC 阻害剤の他に、エピジェネティックな変化をもたらす薬剤として DNA 脱メチル化剤の 5 アザシチジン (5AC) がある。DNA がメチル化あるいは脱メチル化されることにより、塩基配列情報自体には変化なく遺伝子発現のオン/オフが切り替わるが、これは、細胞核内における遺伝子のプロモーター領域にメチル基が付加されるとプロモーターは不活性となり遺伝子の転写が抑制されることによるものである。すなわち、細胞はメチル基の着脱というエピジェネティックな機序により種々な遺伝子の特異的な発現とその抑制を可能にしており、筋芽細胞の分化能が上がったという報告もある^{10,66}。

そこで本章では、エピジェネティックな変化をもたらす 5 種類の低分子薬剤をモデル薬剤として C2C12 細胞の分化能と筋肥大に与える影響を調べた。そして、Mag-TE 法で作製した人工筋組織が生じる収縮力や平面培養での収縮幅などの収縮活性を指標として薬剤の筋機能向上効果を調べることで薬剤探索ツールとしての有用性を検証した。

5.2 実験材料および方法

5.2.1 マウス筋芽細胞由来細胞株 C2C12 細胞の培養

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞は豊田中央研究所から供与されたものを使用した。増殖培地は DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium ; Gibco) にウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS) を 10% 添加したもの、分化誘導培地は仔牛血清 (Calf serum: CS) を 2% 添加したものをを使用した。培地交換の際に、薬剤を含む培地を使用することで薬剤添加を行った。低分子薬剤は TSA、VPA、SB、API および 5AC の 5 種類とし、薬剤毎に 3 つの濃度条件で検証した。この際、

薬剤を添加しない C2C12 細胞をコントロールとした。既存の報告では、分化誘導 1 日前に薬剤を添加しているプロトコールが多かったが、本研究では分化誘導 4 日目に薬剤を添加して day7 まで分化誘導を行った⁶⁰⁻⁶⁵。また、文献値を参考に、TSA (Wako) は 0.1 μM 、VPA (Wako) は 1 mM、SB (Wako) は 5 mM、API (Enzo) は 0.1 mM、5AC (Wako) は 10 μM の濃度を基準として、10 分の 1 濃度および 10 倍濃度で添加した⁶⁰⁻⁷⁰。

どちらの培地も 100 unit/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン、3.7 mg/ml 炭酸水素ナトリウムを添加した。増殖培養は 37°C、5%CO₂ インキュベータ内で行い、50~80%コンフルエントになったらリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、0.25%トリプシン-EDTA を用いてにより細胞をはがして 1/8 から 1/16 の細胞密度で継代した。また、分化誘導培養は 24 well plate (Corning) に細胞を 5.0×10^4 cells/well で播種し、2 日間増殖培地で、37°C、5%CO₂ インキュベータ内で培養を行った後、分化誘導培地に変え、7 日間、5%CO₂ インキュベータ内で行った。

5.2.2 免疫蛍光染色

分化誘導後の筋管を観察し、形態学的に評価 (筋管の太さ、分化率の定量) するために 4.2.7 に記述した手法と同様にして免疫蛍光染色を行った。

5.2.3 MCL の作製

3.2.6 に記述した手法と同様にして MCL を調製した。

5.2.4 筋芽細胞の磁気標識

磁力によって細胞を高密度に培養底面に集積させて三次元組織を構築するために、MCLを用いて細胞を磁気標識した。細胞数を計測した後、80%コンフルエントのディッシュの細胞に100 pg/cellの濃度になるように調製したMCL含有培地で培地交換を行い、4時間培養することでC2C12細胞を磁気標識した。

5.2.5 磁気標識細胞とコラーゲンゲル混合溶液の調製

磁気標識したC2C12細胞を回収し、 1.0×10^6 cells/ 50 μ lの細胞密度で10%FBS含有DMEM培地に懸濁した。0.3% Type I コラーゲン（新田ゼラチン）、10 \times DMEM、再構成用緩衝液（0.05N 水酸化ナトリウム溶液100 mlに対し、炭酸水素ナトリウム2.2 g、HEPES 4.77 gを溶かしたもの）、マトリゲル（BD Biosciences）、FBS、細胞懸濁液をそれぞれ56 : 7 : 7 : 15 : 15 : 50の割合で混合した混合溶液を調製した。

5.2.6 人工筋組織の作製および分化誘導

人工筋組織を12時間増殖培地で培養した後に、シリコンラバーを35 mm dishもしくは6 wellプレートのwell内に高真空用グリースを用いて接着した。人工筋組織を取り外し、虫ピンを用いて人工筋組織をシリコンラバー上に固定した。また、虫ピンと虫ピンの間隔については7 mmとした。その後、分化誘導培地として、血清の代替物として知られるUltroser Gを0.4%含むDMEM培地を用いて、5%CO₂インキュベータ内で7日間分化誘導培養を行った。また、電気刺激培養を行った条件については、4日間分化誘導を行った後、人工筋組織を電気刺激培養チャンバー内（C-Dish）に設置した。直流電源を用いて、C-dishから人工筋組織に電気刺激を加えた。印加電圧（0.3 V/mm）、パルス幅（4 ms）、周波数（1 Hz）をパラメーターとした条件下で分化誘導7日目まで電気刺激培養を行った。

5.2.7 人工筋組織の収縮力測定

3.2.9 に記述した手法と同様にして人工筋組織の収縮力測定を行った。

5.2.8 電気刺激応答性筋管の収縮幅計測

C2C12 細胞を 5×10^4 cells/dish の細胞数で 35 mm 細胞培養ディッシュ (Corning) に播種後、増殖培地で 2 日間培養し、分化誘導培地に交換して 7 日間培養を行った。その際、分化誘導 4 日目に低分子薬剤を添加した。その後、ディッシュを電気刺激培養チャンバー内 (C-Dish) に設置し、直流電源を用いて C-dish から細胞に電気刺激を加えた。印加電圧 (0.3 V/mm)、パルス幅 (4 ms)、周波数 (1 Hz) の条件で電気刺激を与えたときの筋管の収縮運動を顕微鏡 (BZ-9000, キーエンス) で 24 秒間撮影し、その動画を動体解析ソフトウェアで解析し、筋管の収縮幅を測定した。

5.2.9 リアルタイム PCR による *Follistatin* 遺伝子の発現解析

基準濃度の 5 種類の低分子薬剤を培養液中に添加し分化誘導後、細胞を回収した。その後、RNA 抽出キット (RNAiso plus, Takara) を用いて Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA を oligo-dT プライマーと ReverTra Ace (Toyobo) 逆転写酵素を用いて逆転写し、cDNA を合成した。合成した cDNA をテンプレートとして用い、THUNDERBIRD SYBR qPCR RT Set (Toyobo) を使用してリアルタイム PCR を行った。プライマーは、GAPDH については、Table 4-2 に記述したものを使用し、Follistatin については、QuantiTect Primer Assays (Cat# QT00105483, Qiagen) を使用した。また、PCR 反応については、LightCycler1.5 (Roche) を用いて 95°C 5 秒、56°C 20 秒、72°C 30 秒を 1 サイク

ルとして、40 サイクル行った。反応終了後、GAPDH のクロッシングポイントを基準として、 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法により各薬剤添加における Follistatin 発現量を算出した。

5.2.10 統計解析

マンホイットニー順位和検定を用いて統計解析を行い、 $P < 0.05$ の時、有意に差があると判断した。

5.3 実験結果および考察

5.3.1 低分子薬剤が C2C12 細胞の分化能に与える影響

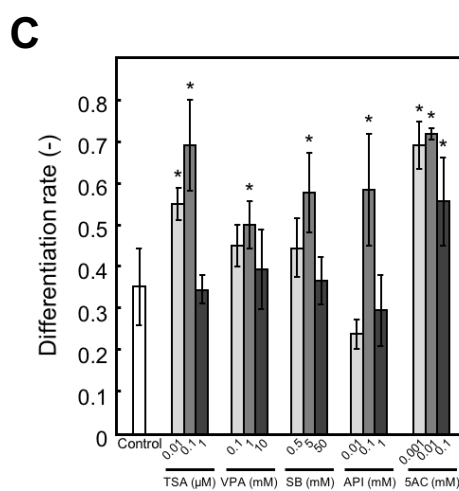
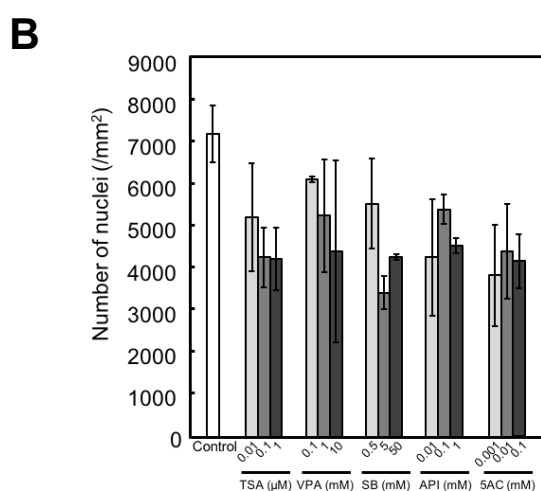
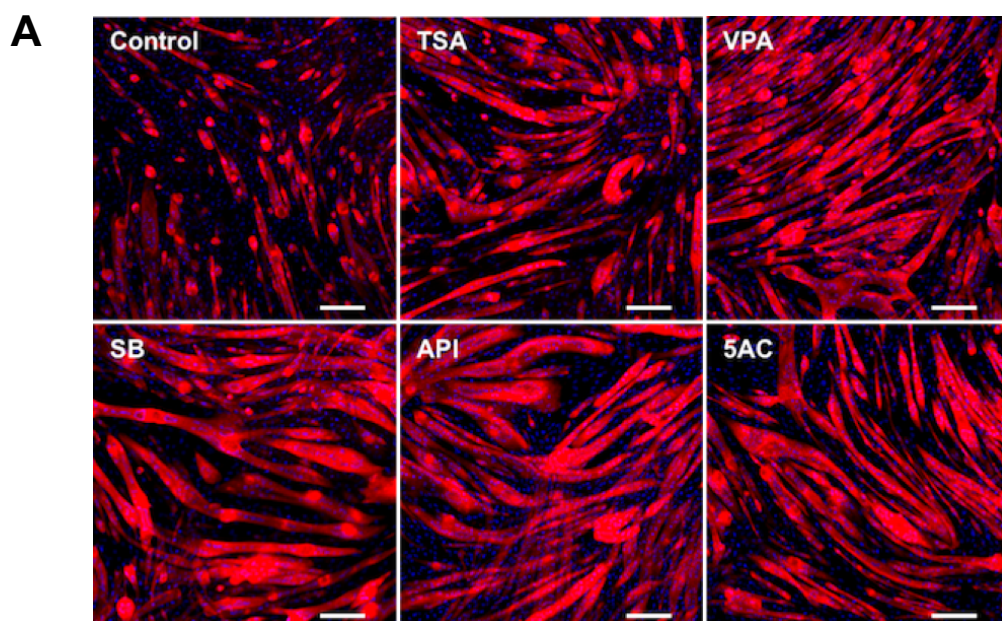
C2C12 細胞の分化誘導時に 5 種類の低分子薬剤をそれぞれ添加することにより、低分子薬剤が C2C12 細胞の分化能と筋肥大に与える影響を検証した。筋管ができ始めるのは分化誘導 3 日目から 4 日目であり、分化誘導 4 日目に低分子薬剤を添加すると、分化誘導 1 日前に薬剤を添加するのと同様に分化が確認できた。分化誘導 7 日目には、細胞を固定して免疫染色を行い、アクチニン蛍光染色画像と DAPI 蛍光染色画像から細胞核数分化率と筋管の太さを測定した (Fig. 5-1A)。

結果として、低分子薬剤を加えないコントロールに比べて、低分子薬剤を加えた場合には総核数が減少したことから、低分子薬剤には細胞毒性があると考えられる (Fig. 5-1B)。総核数は、1/10 濃度、基準濃度、10 倍濃度のうち、10 倍濃度になるにつれて減少する傾向にあった。低分子薬剤を添加した中で、VPA (0.1 mM) の総核数が一番多かったことから、細胞毒性が低かったことが考えられる。細胞死、特にアポトーシスが筋分化を促進するといった報告があることから、細胞死が必ずしも問題になるとは限らないと考えられる⁶³。

また、分化率を算出したところ、TSA (0.01 μ M および 0.1 μ M)、VPA (1 mM)、SB (5 mM)、API (0.1 mM)、5AC (10 μ M、100 μ M および 1000 μ M) において有意な分化率の向上がみられた (Fig. 5-1C)。本研究では、文献で使用されている薬剤濃度を中心に、その濃度の 1/10 および 10 倍濃度で検討を行ったが、薬剤濃度が最も高い条件では分化率が低下する傾向があった。これまでに API を C2C12 細胞に添加して分化効率および筋肥大への影響を調べた報告はなかったが、API が分化率向上と筋肥大を引き起こすことがわかった (Fig. 5-1C および D)。API は細胞周期インヒビターである P21 遺伝子やゲルゾリンの転写活性を誘導するという報告があることから、分化誘導を引き起こしたと考えられる⁶⁵。API は、がんの治療薬としても注目を集めているため、臨床応用が期待される薬剤である。他の HDAC 阻害剤である TSA、VPA、SB を添加した C2C12 細胞も同様に、分化率が向上した。これらの結果は、ヒストンからアセチル基を取り除く酵素の活性を妨げることによる遺伝子発現コントロールが行われることで、C2C12 細胞の分化率が上昇したと考えられることから、これらの低分子薬剤が、筋芽細胞の分化誘導に有用であることが示唆された。

コントロールに比べ、特に高い分化率が示されたのは、TSA (0.1 μ M) であり分化率は 2 倍に上昇した。TSA の添加を分化誘導前に行っている文献と比べても同等の分化率だったことから、分化誘導 4 日目であっても筋芽細胞の分化を促進したと考えられる^{60,61}。5AC を添加した C2C12 細胞は、基準濃度、1/10 倍濃度、10 倍濃度のすべてにおいて分化率が有意に上昇した。基準濃度に比べて 10 倍濃度では、やや分化率が低下しているものの、コントロールと比べて 1.7 倍に上がっているため、5AC は DNA 脱メチル化剤としてエピジェネティックな変化を引き起こすように機能して、分化を促進したと考えられる。具体的には、細胞核内における筋分化関連遺伝子のプロモーター領域のメチル基が脱離し、プロモーターが活性化することで、遺伝子の転写が活性化され、筋分化が促進されたと考えられる。

また、コントロールと比べて、低分子薬剤を基準濃度と基準濃度の 1/10 で添加した際には筋管が太くなっていることが分かった (Fig. 5-1C)。最も筋管が太くなったのは API (0.01 mM) であり、太さが 1.8 倍になった。5AC (10 μ M) でも有意差があり、太さが 1.6 倍になった。このことから低分子薬剤には筋肥大を促進する効果があると考えられる。本研究では、低分子薬剤の添加を分化開始 4 日目で行ったが、HDAC 阻害剤及び脱メチル化剤である 5AC は筋芽細胞の各分化段階特異的に効果を発揮することから、平面培養において低分子薬剤を添加するタイミングを詳細に検討することで、更なる効果を望める可能性がある。



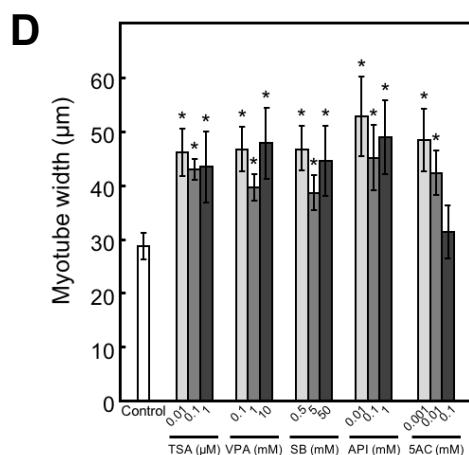


Fig. 5-1 Effects of epigenetic drugs on the myogenic differentiation of C2C12 cells in two-dimensional culture. (A) Fluorescence microscopy images of myotubes at day 7. C2C12 cells were treated with trichostatin A (TSA, 0.1 μ M), valproic acid (VPA, 1 mM), sodium butyrate (SB, 5 mM), apicidin (API, 0.1 mM) or 5-azacytidine (5AC, 0.01 mM) at day 4. Red, α -actinin-positive myotubes; blue, DAPI-positive nuclei. Scale bar, 200 μ m. (B) Quantitative image analysis of number of nuclei. (C) Quantitative image analysis of myotube differentiation rate. The data are expressed as mean \pm SD. * P < 0.05 vs. control. (D) Quantitative image analysis of myotube width. The data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. * P < 0.05 vs. control.

5.3.2 低分子薬剤を添加した人工筋組織の作製と筋肥大に与える影響

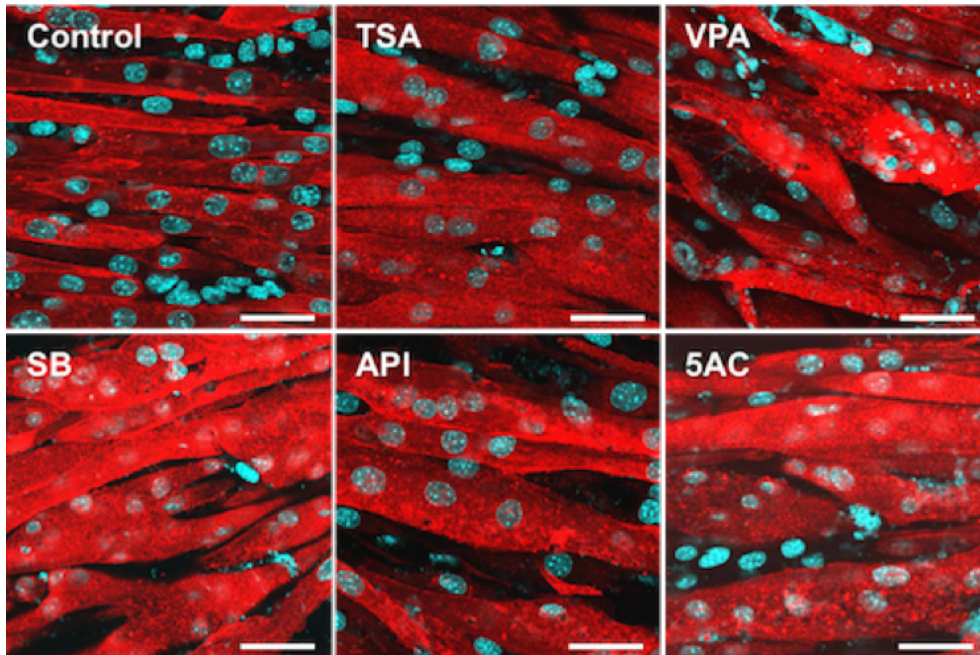
これまでに、低分子薬剤を添加した人工筋組織による収縮力の測定を行った報告はない。Mag-TE 法により作製した人工筋組織に低分子薬剤を添加し、収縮力と筋肥大の程度を測定することで、①低分子薬剤の筋機能向上効果を調べ、②人工筋組織の薬剤探索ツールとしての有用性、そして③平面培養で C2C12 細胞に低分子薬剤を用いた場合との相関性を調べた。

低分子薬剤が三次元筋組織の収縮力へ与える効果を検証するために、実験検討段階では低分子薬剤を環状組織作製時（分化誘導 1 日前）に添加したが、細胞

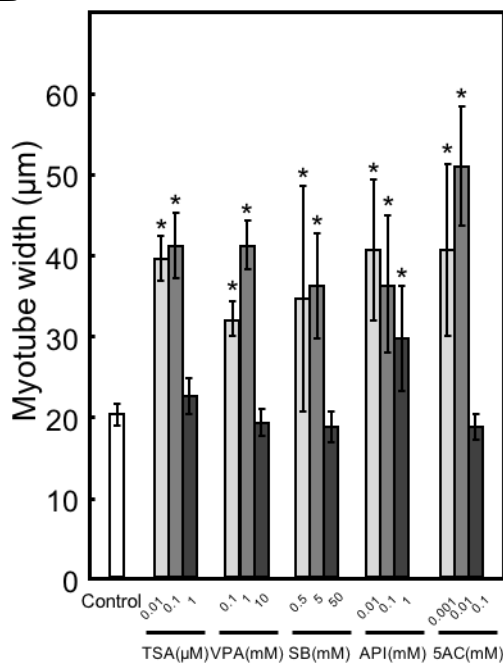
毒性があるためか、環状組織が切れてしまい、組織作製ができなかった。そのため、組織が完全に形成した分化誘導 4 日目に環状筋組織にそれぞれの低分子薬剤を添加し、分化誘導 7 日目に収縮力の測定を行った。その後、4%PFA を用いて細胞を固定して免疫蛍光染色を行い、アクチニン蛍光染色画像と DAPI 蛍光染色画像を共焦点レーザー顕微鏡により観察することで、組織内部の細胞形態の観察を行った (Fig. 5-2A)。この際、アクチニンは分化した筋管は染色されるが未分化筋芽細胞は染色されない。また、DAPI は全ての細胞の核が染色される。その結果、コントロールと比べて、薬剤を 1/10 倍濃度および基準濃度で添加した際には筋管が太くなっていることが分かった (Fig. 5-2B)。また API では 10 倍濃度でも筋管が太くなっていた。最も筋管が太くなったのは 5AC (10 μ M) であり、太さが約 2.5 倍になった。このことから、低分子薬剤には筋組織の筋肥大効果があると考えられる。しかし、基準濃度の 10 倍濃度では必ずしも筋管が太くなるとは限らなかった。これは、基準濃度の 10 倍濃度では、低分子薬剤が細胞毒性を示したためであると考えられる。一方、作製した人工筋組織が発生する収縮力は、低分子薬剤を添加していないコントロールに比べ、TSA (0.01 μ M および 0.1 μ M) において有意な向上がみられた (Fig. 5-2C)。TSA (0.1 μ M) 添加により、約 1.8 倍の収縮力の向上がみられた。しかしながら、他の低分子薬剤 (VPA、SB、API、5AC) については、コントロールに比べ収縮力は同等あるいは減少した。また、低分子薬剤を添加した平面培養の実験 (Fig. 5-1) においては分化率や筋肥大が見られた薬剤の種類や濃度であっても、三次元筋組織の収縮力は減少した。これは、環状筋組織内においては平面培養ではみられない細胞へのダメージがあった可能性、あるいは低分子薬剤で誘導される筋分化率の向上が収縮力に結びついていない可能性が考えられる。

収縮力は筋肉の総合的な指標であり、筋組織が収縮力を発生するためには、様々なタンパク質が関連している。そのため、筋組織内部の筋管が太くなるからといって、収縮力に結びつくとは限らないことがわかった。

A



B



C

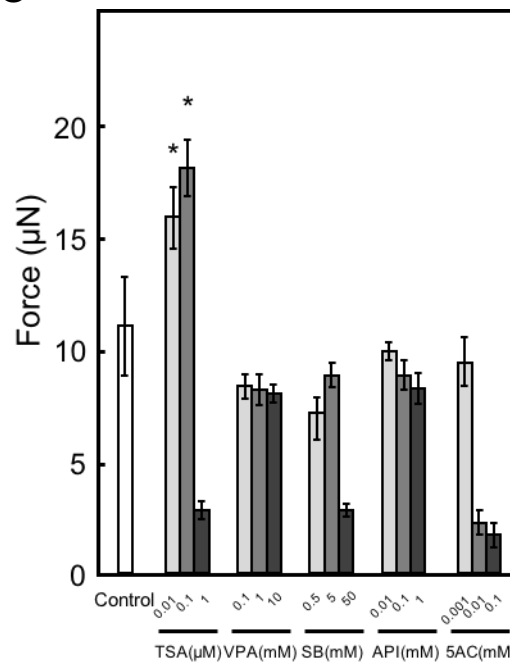


Fig. 5-2 Effects of epigenetic drugs on force generation of tissue-engineered skeletal muscle constructs. (A) Fluorescence microscopy images of α -actinin-positive myotubes (red) in the tissue-engineered skeletal muscle tissue constructs at day 7. Nuclei were stained using DAPI (blue). Tissue-engineered skeletal muscle tissue constructs were treated with trichostatin A (TSA; 0.1 μ M), valproic acid (VPA; 1 mM), sodium butyrate (SB; 5 mM), API (0.1 mM) or 5-azacytidine (5AC; 0.01 mM) at day 4. Scale bars, 50 μ m. (B) Quantitative image analysis of myotube width in tissue-engineered skeletal muscle tissue constructs. The data are expressed as mean \pm SD of three constructs. * P < 0.05 vs. control. (C) The force generated by tissue-engineered skeletal muscle tissue constructs on day 7. The data are expressed as mean \pm SD of three constructs. * P < 0.05 vs. control.

5.3.3 低分子薬剤添加における C2C12 筋管の収縮活性評価

次に、平面培養と三次元培養との相関があるかどうか調べた。筋肉の本来の機能は収縮であるが、その力の発生の最小単位は、筋細胞のサルコメア構造のアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの相互作用である。しかしながら、分子レベルでのサルコメアの収縮を経時的に観察することは困難である。そこで、サルコメア構造を持つ筋管の収縮を観察することで、低分子薬剤が C2C12 の筋管へ与える影響を筋肉の機能により近い評価方法として調べた。まず、C2C12 細胞を増殖培地で 2 日間培養し、分化誘導 4 日目には低分子薬剤を添加し、分化誘導培地で 7 日目まで培養した。その後、電気刺激を与えながらパルスに応じて収縮する筋管の動画を撮影し、動体解析ソフトウェアにて筋管の収縮幅を測定した (Fig. 5-3A)。

その結果、TSA (0.01 μ M および 0.1 μ M) を添加した筋管細胞の収縮幅は、低分子薬剤を添加していない筋管細胞と比較して、有意に収縮幅が増加した (Fig. 5-3B)。これにより、TSA (0.01 μ M および 0.1 μ M) を添加した際には細胞の形

態学的な評価による機能向上だけでなく、収縮機能として収縮幅が増大することが示された。

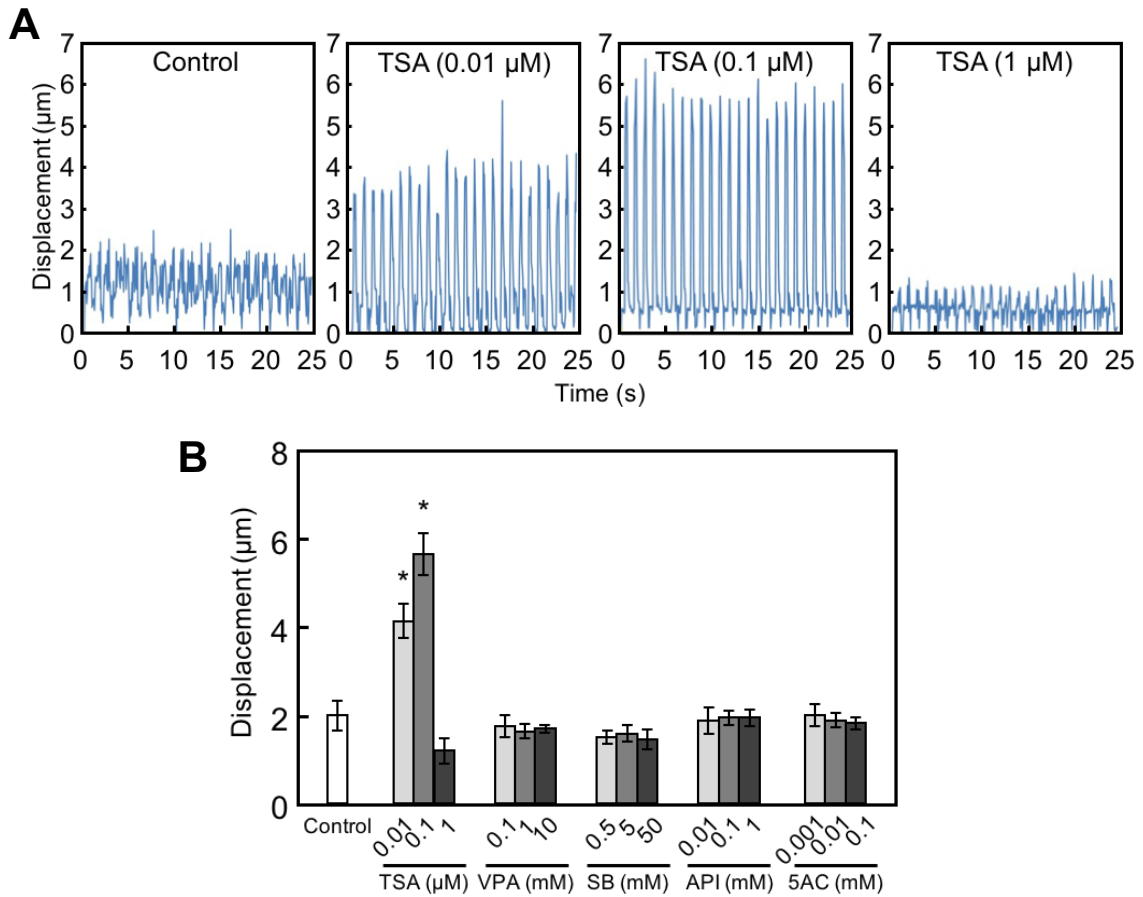
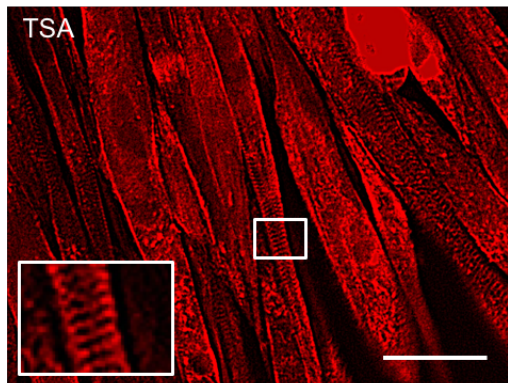


Fig. 5-3 Effects of epigenetic drugs on the contractile activity of C2C12 myotubes in two-dimensional culture. (A) Contractile movement of myotubes. C2C12 cells were treated with trichostatin A (TSA; 0.01, 0.1 or 1 μg/ml) on day 4. Electrical pulse stimulation (voltage, 0.3 V/mm; width, 10 ms; frequency, 1Hz) was applied, and the displacement of a single cell within the myotubes was analyzed. (B) Quantitative analysis of the range of displacement. The data are expressed as mean ± SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

5.3.4 低分子薬剤添加による筋管内サルコメア発達への影響

筋管の収縮機能が向上した理由として、筋肉の最小単位である筋細胞のサルコメア構造が発達しているからであると考えた。そこで筋管内のサルコメア構造を観察するための実験を行った。まず、C2C12細胞を増殖培地で2日間培養し、分化誘導4日目には低分子薬剤を添加し、分化誘導培地で7日目まで培養した。その後、電気刺激装置を用いて筋管に電気刺激を30分間与えた。電気刺激を与えると、筋肉の収縮装置であるサルコメアの特徴である一様に伸びる縞模様を顕微鏡で観察しやすくなると考えた。その後、細胞をPBSで3回洗浄し、4%PFAを用いて細胞を固定して免疫蛍光染色を行った (Fig. 5-4A)。筋管内部の観察を行った結果、TSA (0.01 μM および 0.1 μM) を添加すると、低分子薬剤を添加していない場合と比較してサルコメアを有する筋管が多くみられた。つまり、TSA (0.01 μM および 0.1 μM) を添加すると、平面培養では収縮幅が大きくなり、サルコメア構造を有する筋管の数も多くなった。そして、三次元筋組織では収縮力も向上していることから、三次元筋組織の収縮力と平面培養での筋管の収縮活性の評価およびサルコメア構造の発達は、相関が得られる結果となった。

A



B

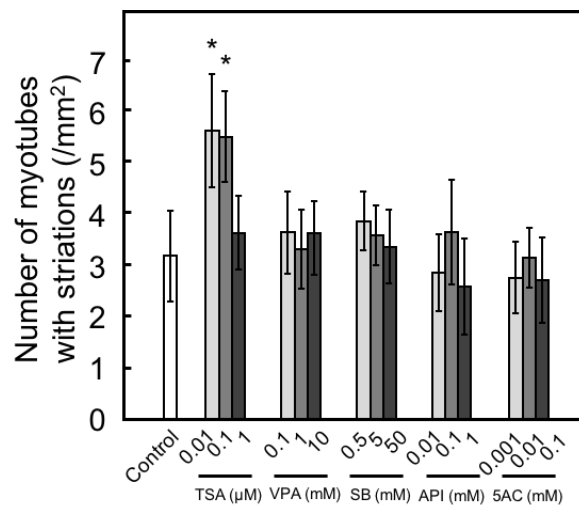


Fig. 5-4 Effects of epigenetic drugs on the contractile activity of C2C12 myotubes in two-dimensional culture. (A) Fluorescence microscopy images of myotubes at day 7. C2C12 cells were treated with small molecular drugs on day 4. (B) Quantitative image analysis of the number of myotubes with striations. The number of myotubes displaying striations of sarcomeric α -actinin was quantified by counting myotubes. The data are the means \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

5.3.5 低分子薬剤が *Follistatin* 遺伝子発現に与える影響

筋芽細胞株 C2C12 細胞において、*Follistatin* 遺伝子の強制発現によって、筋細胞の分化や筋管の肥大化を促進し、筋細胞の機能である収縮活性が増強されることを4章で示したが、5種類の低分子薬剤が *Follistatin* 遺伝子のような筋細胞の分化や機能にとって重要な役割を担う遺伝子の発現レベルに影響するのかわどか調べた。C2C12 細胞の分化誘導中に基準濃度となる各薬剤を添加し、分化誘導後、細胞を回収しリアルタイム PCR を行った。その結果、TSA、API および 5AC を添加した条件で *Follistatin* 遺伝子の発現レベルが向上した (Fig. 5-5)。API や 5AC の添加における *Follistatin* 遺伝子の発現量の増加は、人工筋組織の収縮力測定や平面培養での収縮活性の結果とは、相関性がなかった。このことから、低分子薬剤の添加による筋細胞の収縮力や収縮活性の向上は、*Follistatin* 遺伝子発現の関与が示されたが、それだけでは十分ではなく、他の要因も関わっている可能性が示唆された。

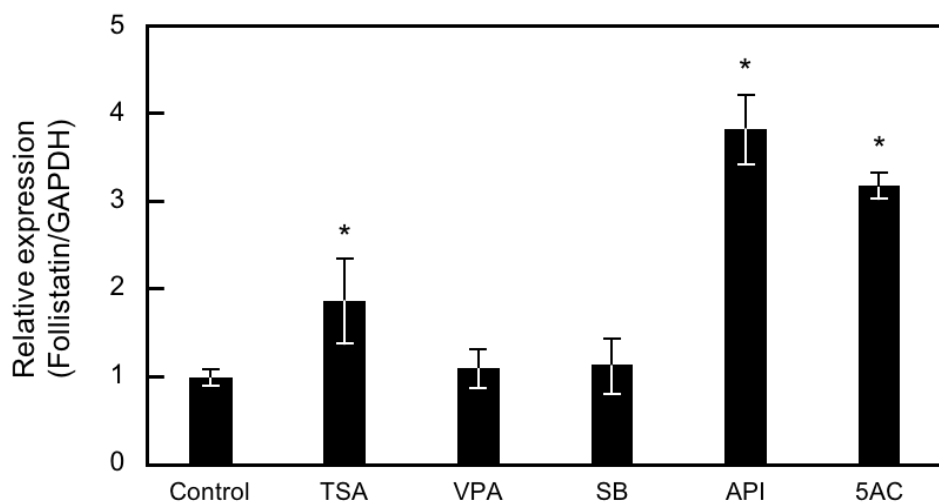


Fig. 5-5 Effects of epigenetic drugs on follistatin gene expression. Relative expression level of follistatin mRNA. C2C12 cells were treated with TSA (0.1 μ M), VPA (1 mM), SB (5 mM), API (0.1 mM) or 5AC (0.01 mM) at day 4. Total RNA was isolated on day 7 and real time-PCR was performed with primers for follistatin and GAPDH. The data are expressed as mean \pm SD of triplicate experiments. * $P < 0.05$ vs. control.

5.4 本章のまとめ

本章では、筋芽細胞の収縮活性を利用した薬剤スクリーニング系の構築を目的とした研究を行った。そのために、モデル薬剤として5種類の低分子薬剤が人工筋組織の筋機能増強および、筋管の収縮活性に与える影響を調べることで、筋細胞の機能を指標とした評価系の有用性を検証した。

その結果として、低分子薬剤を添加した平面培養の実験においては分化率や筋肥大が見られた薬剤の種類や濃度であっても、必ずしも三次元筋組織の収縮力は増強しなかった。この際、平面培養で筋肥大が見られた薬剤では三次元筋組織においても筋肥大が見られた。これは、①環状筋組織内においては、平面培養ではみられない細胞へのダメージがあった可能性、あるいは、②低分子薬

剤で誘導される筋分化率の向上が収縮力に結びついていない可能性が考えられる。今回調べた低分子薬剤の中で、TSA (0.01 μM および 0.1 μM) を添加した際には、三次元筋組織の収縮力が向上した。そこで、平面培養で筋管の収縮幅を調べることで、TSA (0.01 μM および 0.1 μM) を添加した際に、収縮幅が大きくなることがわかった。その現象は、筋肉の収縮装置であるサルコメア構造にあると考え、筋管の免疫蛍光染色を行ってサルコメア数を調べたところ、TSA (0.01 μM および 0.1 μM) を添加した場合には、サルコメア構造が多く見られた。また、5種類の低分子薬剤の *Follistatin* 遺伝子発現への影響については、TSA、API および 5AC が *Follistatin* 遺伝子発現を促進しており、収縮力測定や収縮活性評価と相関性はなかった。しかし、*Follistatin* 遺伝子の発現が筋機能に深く関わっていることは、4章の結果より明らかである。

骨格筋に対する *in vitro* の評価系として、平面培養での筋管の太さや分化率の測定が一般的に用いられている。しかしながら、これら形態学的な観察だけでは、筋芽細胞の本来の機能である収縮や筋成熟について十分に評価できていない可能性がある。本章では、平面培養において従来までの評価方法である形態学的評価と、より機能的な評価が可能な筋芽細胞の収縮活性を比較することで、収縮活性による評価が従来法よりも高度な評価ができることを明らかにし、人工筋組織の収縮力評価と高い相関性を有する評価法であることが確認できた。

第6章 総括

6.1 本論文のまとめ

骨格筋ティッシュエンジニアリングにおいて、人工筋組織の機能強化や収縮活性の評価は、骨格筋再生医療や薬剤スクリーニング、バイオアクチュエータへの応用を目指すにあたり必要となることが予想される。本研究では、培養環境や培養液中の添加物、細胞への遺伝子導入による人工筋組織の機能強化を試み、人工筋組織誘導に有用な手法を検討した。また、5つのモデル薬剤を用いて人工筋組織の収縮力による評価と高い相関性を有する評価方法を探索した。

第1章では、本研究の背景を説明し、その後本研究の目的と意義およびその遂行方針を示した。

第2章では、生体の筋肉がどのような細胞から構成されているのか、また、その主な機能として知られている収縮以外にどのような役割を担っているのかを述べた。そして、筋肉を模倣して作られた人工筋肉の例や人工筋組織の応用例を示し、ティッシュエンジニアリングと再生医療の関わりについても述べた。さらに、筋細胞の機能強化に寄与した研究を示して、本研究で試みるべき方針を明らかにした。

第3章では、熱ストレスとアスコルビン酸添加による人工筋組織の機能強化を試みた。まず、培養温度が筋芽細胞株 C2C12 細胞の核数、筋管太さ、分化率へ与える影響について調べたところ、39°C の穏やかな熱ストレスを加えた場合、筋肥大を誘導したが、総核数が減少しており、細胞死も誘導したことが示唆された。そこで、39°C の熱ストレスを与える時間を分化誘導 1 日目の 24 時間だけにしたところ、39°C の熱ストレスを 7 日間与えた場合と同等の筋肥大を誘導することができ、細胞死

は誘導されないことがわかった。

次に、培養液中の添加物として、アスコルビン酸の添加濃度検討を行った。分化誘導培養液中のアスコルビン酸の終濃度 0、50、100、200、400 μM で検討したところ、200、400 μM の濃度条件で分化率が有意に上昇した。一方で、アスコルビン酸の添加は筋肥大に影響しないことがわかった。これら二つの培養条件を組み合わせたところ、平面培養において、分化率と筋管太さの両方を向上させることに成功した。さらに、熱ストレスとアスコルビン酸を組み合わせたときの人工筋組織の収縮力への影響を調べた結果、収縮力が顕著に上昇することがわかった。

第4章では、遺伝子工学的手法を用いた人工筋組織の機能強化を行った。第3章では、培養液中の添加物や培養環境を変化させることによって収縮力の強化を試みたが、本章では異なるアプローチとして、人工筋組織の細胞源となる C2C12 細胞へ遺伝子導入を行い単一細胞の機能を向上させ、その細胞で人工筋組織を作製することで、収縮力強化を行った。まず、*Follistatin* 遺伝子導入 C2C12 細胞を取得し、PCR によって *Follistatin* の発現を確認した。そして、平面培養において、*Follistatin* 発現の筋管への影響を調べたところ、分化率が上昇し、筋肥大が誘導されていることがわかった。さらに収縮活性も高くなっていることがわかった。最後に、人工筋組織の強化に有用である電気刺激培養条件下で *Follistatin* 発現 C2C12 細胞からなる人工筋組織を作製し、収縮力測定を行った結果、著しく機能を強化することに成功した。

第5章では、筋芽細胞の収縮活性を利用した薬剤スクリーニング系の構築を試みた。まず、筋肉に対して有用性が報告されている5つの低分子薬剤をモデル薬剤として、平面培養での分化率と筋管の太さによる評価と人工筋組織の収縮力と筋管太さによる評価を比較したところ、平面培養では5つすべての薬剤が分化率、筋肥大を促進したという結果となったが、人工筋組織における収縮力の評価では、TSA のみで機能が促進されることがわかった。さらに、平面培

養での収縮活性についても同様の薬剤で調べたところ、TSA のみが収縮活性を向上させたことから、平面培養での収縮活性は人工筋組織の収縮力測定と高い相関性のある評価法であることが示唆された。

以上の結果より、本研究で遂行した人工筋組織の機能強化と筋芽細胞の収縮活性評価が、再生医療や薬剤スクリーニング、アクチュエータへの応用を目指す際に、骨格筋ティッシュエンジニアリングが抱える課題を解決する手法として有効であると示すことができた。

6.2 今後の展望

本研究により培養液中の添加物や培養環境、および細胞の遺伝子導入を行うことで、人工筋組織の高機能化に成功した。また、筋芽細胞の収縮活性を利用した評価方法の有用性を示すことができた。そこで、今後の展望について以下のようにまとめる。

第3章と第4章で示したように、本研究での人工筋組織の機能強化は、アスコルビン酸添加と熱ストレスによって1.5倍、遺伝子導入および電気刺激培養を与えたことで9倍の収縮力増強に成功した。しかしながら、生体の発生する力と比較しても、未だ5%未満という数値に留まっているため、更なる強化方法の開発は行われるべきであると考えている⁶。Itoらは、分化誘導4日目から0.3 V/mm、4 ms、1 Hzの電気刺激培養条件で電気刺激培養を開始し、7日目には40 μ Nの収縮力を得ており、14日目まで電気刺激培養を行うことで100 μ Nを上回る収縮力が得られたことを報告している³⁶。本研究では、Follistatin発現と電気刺激培養の組み合わせることで、分化誘導7日目で測定し平均では80 μ Nを超える収縮力が得られ、その中の一部の筋組織では、100 μ Nを超えるものもあった。

このような結果から、更なる機能強化のためにより長期的な組織培養を行う必要があると考えられる。Ito らが用いた手法では、環状筋組織にコラーゲン混合溶液をコートする組織作製方法であったが、本研究では、より強い収縮力にも耐える筋組織を作製するために、コラーゲン混合溶液で細胞を包埋して環状の筋組織を作る手法を用いた⁷²。これにより、収縮力の強い組織体の作製に成功したが、組織中心部の細胞まで栄養や増殖因子が行き渡らず、死細胞や未分化の細胞が組織内部に存在する傾向にあった²⁸。生体の筋肉では、筋繊維がまとまった束と束の間に血管が張り巡らされており、このような構造を模して、組織体中心部でも栄養や酸素、老廃物の代謝が可能な血管構造を構築することが重要になると考えている。骨格筋細胞シートの作製において筋芽細胞と血管内皮細胞の共培養によって、機能的な血管構造の構築が報告されている⁷³。本研究においても、このような異種細胞の共培養による人工筋組織の作製が望ましい。

第5章では、筋芽細胞の収縮活性を利用した薬剤スクリーニング系の構築のために、5つの低分子薬剤を用いて、形態学的な評価、人工筋組織の収縮力、平面培養の筋管の収縮活性評価を比較した。筋芽細胞の収縮活性を用いた評価では、従来までの形態学的な評価よりも、評価される薬剤が筋細胞の機能面に与える影響について、直接的に評価できることがわかった。しかしながら、これまで行ってきた評価は電気刺激装置の問題上、6 well プレートが最も小さい培養スケールであった。本研究の収縮活性評価における今後の課題は、小スケール化であると考えている。96 well プレートや384 well プレートへの小スケール化においてまず問題となるのは、筋細胞への収縮を促す刺激をどのようにして与えるかである。その手法として、光でタンパク質の発現を制御する光遺伝学的手法（オプトジェネティクス）は興味深い技術である。実際に、細胞への毒性が低い青色LEDの光刺激を用いて、光活性化イオンチャネルであるチャンネルロドプシン2を発現するC2C12細胞の収縮を誘導できることが報告されている⁷⁴。

このような技術を用いることで、小スケールの培養プレートに対応した電気刺激装置を用いることなく筋細胞の収縮活性を測定することができると考えられる。

さらに今後は、先述のスクリーニング系にヒト iPS 細胞から誘導した筋細胞を用いることが考えられる。第1章および第2章で述べたように遺伝子工学的に筋芽細胞を誘導する手法は、Tanaka らによって報告されており、さらにその誘導法を改良し、薬剤スクリーニング系に適応可能なレベルの均一性で、ヒト iPS 細胞から筋細胞へ分化させることに成功している³⁹。このような細胞源を本研究での収縮活性を用いた評価系に活用することで、骨格筋ティッシュエンジニアリングの応用の一つである薬剤スクリーニング系への応用に近づいていくと考えている。

参考文献

- 1 O'Connor, N.E., Mulliken, J.B., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O., and Green, H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *The lancet.*, **317**(8211), 75-78, 1981.
- 2 Ochi, M., Uchio, Y., Tobita, M., and Kuriwaka, M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artificial organs.*, **25**(3), 172-179, 2001.
- 3 Langer, R., and Vacanti, J.P., Tissue engineering. *Science*. **260**(5110), 920-926, 1993
- 4 Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.*, **131**(5), 861-872, 2007.
- 5 Tanaka, A., Woltjen, K., Miyake, K., Hotta, A., Ikeya, M., Yamamoto, T., Nishino, T., Shoji, E., Sehara-Fujisawa, A., Manabe, Y., Fujii, N., Era, Y., and Yamanaka, S. Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. *Plos one.*, **8**(4):e61540, 2013.
- 6 Yamamoto, Y., Ito, A., Fujita, H., Nagamori, E., Kawabe, Y., and Kamihira, M. Functional evaluation of artificial skeletal muscle tissue constructs fabricated by a magnetic force-based tissue engineering technique. *Tissue. Eng. Part A.*, **17**(1-2), 107-114, 2010.
- 7 石井直方, 筋肉学入門, 講談社, p43-44., 2009
- 8 Schiaffino, S., and Reggiani, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.*, **91**(4), 1447-1531, 2011
- 9 Huxley, H.E., and Hanson, J., Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, **173**(4412), 973-976, 1954
- 10 Huxley, A.F., and Niedergerke, R., Structural changes in muscle during contraction: Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*, **173**(4412), 971-973, 1954
- 11 中村太郎, 軸方向繊維強化型空気ゴム人工筋肉の開発, 日本機械学会誌, **110**(1062), 73, 2007.
- 12 石川敏也, 中田毅, 人工筋肉を目指した形状記憶合金アクチュエータ, 日本機械学会論文集 (C編), **74**(738), 359-364, 2008
- 13 Herr, H., and Dennis, R.G., A swimming robot actuated by living muscle tissue. *J. Neuroeng. Rehabil.*, **1**, 6, 2004.
- 14 Feinberg, A.W., Feigel, A., Shevkoplyas, S.S., Sheehy, S., Whitesides, G.M., and

- Parker, K.K. Muscular thin films for building actuators and powering devices. *Science*, **317**(5843), 1366-1370, 2007.
- 15 Tanaka, Y., Morishima, K., Shimizu, T., Kikuchi, A., Yamato, M., Okano, T., Kitamori, T., Demonstration of a PDMS-based bio-microactuator using cultured cardiomyocytes to drive polymer micropillars. *Lab Chip*, **6**(2), 230-235, 2006.
 - 16 Yaffe, D., and Saxel, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, **270**(5639), 725-727, 1977.
 - 17 Menasche, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J.T., Marolleau, J.P., Seymour, B., Larghero, J., Lake, S., Chatellier, G., Solomon, S., Desnos, M., and Hagege, A.A. The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial. *Circulation*, **117**(9), 1189-1200, 2008.
 - 18 Cleland, J.G.F., Coletta, A.P., Abdellah, A.T., Nasir, M., Hobson, N., Freemantle, N., and Clark, A.L. Clinical trials update from the American Heart Association 2006: OAT, SALT 1 and 2, MAGIC, ABCD, PABA-CHF, IMPROVE-CHF, and percutaneous mitral annuloplasty. *Eur. J. Heart Failure*, **9**(1), 92-97, 2007.
 - 19 Yang, J., Yamato, M., Shimizu, T., Sekine, H., Ohashi, K., Kanzaki, M., Ohki, T., Nishida, K., and Okano, T., Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials*, **28**(34), 5033-5043, 2007
 - 20 Kanemura, H., Go, M.J., Shikamura, M., Nishishita, N., Sakai, N., Kamao, H., Mandai, M., Morinaga, C., Takahashi, M., and Kawamata, S. Tumorigenicity studies of induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration. *Plos one*, **9**(1):e85336, 2014.
 - 21 Charbe, N., McCarron, P.A., and Tambuwala, M.M. Three-dimensional bio-printing: A new frontier in oncology research. *World J. Clin. Oncol.*, **8**(1), 21-36, 2017.
 - 22 Moldovan, N.I., Hibino, N., and Nakayama, K. Principles of the *Kenzan* method for robotic cell spheroid-based three-dimensional bioprinting. *Tissue Eng. Part A*, **23**(3), 237-244, 2017.
 - 23 Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., and Kobayashi, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.*, **100**(1), 1-11, 2005.
 - 24 Shimizu, K., Ito, A., Lee, J. K., Yoshida, T., Miwa, K., Ishiguro, H., Numaguchi, Y., Murohara, T., Kodama, I., and Honda, H., Construction of multi-layered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnol. Bioeng.*, **96**(4), 803-809, 2007
 - 25 Ito, A., Ino, K., Hayashida, M., Kobayashi, T., Matsunuma, H., Kagami, H., Ueda, M., and Honda, H., Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue Eng.*,

- 11(5-6), 1553-1561, 2005.
- 26 Uchinaka, A., Kawaguchi, N., Hamada, Y., Miyagawa, S., Saito, A., Mori, S., Sawa, Y., and Matsuura, N. Transplantation of elastin-secreting myoblast sheets improves cardiac function in infarcted rat heart. *Mol. Cell Biochem.*, **368**(1-2), 203-214, 2012.
- 27 Goudenege, S., Lebel, C., Huot, N.B., Dufour, C., Fujii, I., Gekas, J., Rousseau, J., and Tremblay, J.P. Myoblasts derived from normal hESCs and dystrophic hiPSCs efficiently fuse with existing muscle fibers following transplantation. *Mol. Ther.*, **20**(11), 2153-2167, 2012.
- 28 Sato, M., Ito, A., Kawabe, Y., Nagamori, E., and Kamihira, M. Enhanced contractile force generation by artificial skeletal muscle tissue using IGF-I gene-engineered myoblast cells. *J. Biosci. Bioeng.*, **112**(3), 273-278, 2011.
- 29 Sato, M., Ito, A., Akiyama, H., Kawabe, Y., and Kamihira, M. Effects of B-cell lymphoma 2 gene transfer to myoblast cells on skeletal muscle tissue formation using magnetic force-based tissue engineering. *Tissue Eng. Part A*, **19**(1-2), 307-315, 2012.
- 30 Ross, J.J., Duxson, M.J., and Harris, A.J. Neural determination of muscle fibre numbers in embryonic rat lumbrical muscles. *Development.*, **100**, 395-409, 1987.
- 31 Fredette, B.J., and Landmesser, L.T., A reevaluation of the role of innervation in primary and secondary myogenesis in developing chick muscle. *Dev. Biol.*, **143**(1), 19-35, 1991.
- 32 Harris, A.J., Fitzsimons, R.B., and McEwan, J.C. Neural control of the sequence of expression of myosin heavy chain isoforms in foetal mammalian muscles. *Development.*, **107**, 751-769, 1989.
- 33 Wilson, S.J., and Harris, A.J. Formation of myotubes in aneural rat muscles. *Dev. Biol.*, **156**(2), 561-571, 2008.
- 34 Fujita, H., Nedachi, T., and Kanzaki, M. Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes. *Exp. Cell Res.*, **313**(9), 1853-1865, 2007.
- 35 Donnelly, K., Khodabukus, A., Philp, A., Deldicque, L., Dennis, R.G., and Baar, K. A novel bioreactor for stimulating skeletal muscle in vitro. *Tissue Eng. Part C: Methods.*, **16**(4), 711-718, 2010.
- 36 Ito, A., Yamamoto, Y., Sato, M., Ikeda, K., Yamamoto, M., Fujita, H., Nagamori, E., Kawabe, Y., and Kamihira, M. Induction of functional tissue-engineered skeletal muscle constructs by defined electrical stimulation. *Sci. Rep.*, **4**:4781, 10.1038/srep04781, 2014.
- 37 Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.*, **51**(6), 987-1000, 1987.

- 38 Gao, F., Kishida, T., Ejima, A., Gojo, S., and Mazda, O. Myostatin acts as an autocrine/paracrine negative regulator in myoblast differentiation from human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**(2), 309-314, 2013.
- 39 Uchimura, T., Otomo, J., Sato, M., and Sakurai, H. A human iPS cell myogenic differentiation system permitting high-throughput drug screening. *Stem Cell Res.*, **25**, 98-106, 2017.
- 40 Morrison, P.R., and Ryser, F.A. Weight and body temperature in mammals. *Science.*, **116**(3009), 231-232, 1952.
- 41 Yamaguchi, T., Suzuki, T., Arai, H., Tanabe, S., and Atomi, Y. Continuous mild heat stress induces differentiation of mammalian myoblasts, shifting fiber type from fast to slow. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **298**, 140-148, 2010.
- 42 Mitumoto, Y., Liu, Z., and Klip, A. A long-lasting vitamin C derivative, ascorbic acid 2-phosphate, increases myogenic gene expression and promotes differentiation in L6 muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**(1), 394-402. 1994.
- 43 Shima, A., Pham, J., Blanco, E., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Matsuda, R. IGF-I and vitamin C promote myogenic differentiation of mouse and human skeletal muscle cells at low temperatures. *Exp. Cell Res.*, **317**(3), 356-366, 2011.
- 44 Savini, I., Rossi, A., Catani, M.V., Ceci, R., and Avigliano, L. Redox regulation of vitamin C transporter SVCT2 in C2C12 myotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **361**(2), 385-390, 2007.
- 45 Yamaguchi, T., Arai, H., Katayama, N., Ishikawa, T., Kikumoto, K., and Atomi, Y. Age-related increase of insoluble, phosphorylated small heat shock proteins in human skeletal muscle. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **62**(5), 481-489, 2007.
- 46 Gehrig, S.M., van der Poel, C., Sayer, T.A., Schertzer, J.D., Henstridge, D.C., Church, J.E., Lamon, S., Russell, A.P., Davies, K.E., Febbraio, M.A., and Lynch, G.S. Hsp72 preserves muscle function and slows progression of muscular dystrophy. *Nature.*, **484**(7394), 394-398, 2012.
- 47 菅野翔太, 修士論文, pp. 25, 2013.
- 48 Semsarian, C., Wu, M.J., Ju, Y.K., Marciniak, T., Yeoh, T., Allen, D.G., Harvey, R.P., and Graham, R.M. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature.*, **400**(6744), 576-581, 1999.
- 49 Mikkelsen, R.B., Reinlib, L., Donowitz, M., and Zahniser, D. Hyperthermia effects on cytosolic [Ca²⁺]: analysis at the single cell level by digitized imaging microscopy and cell survival. *Cancer Res.*, **51**(1), 359-364, 1991.
- 50 Thelen, M.H., Simonides, W.S., Muller, A., and van Hardeveld, C. Cross-talk between transcriptional regulation by thyroid hormone and myogenin: new

- aspects of the Ca^{2+} -dependent expression of the fast-type sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Biochem. J.*, **329**(1), 131-136, 1998.
- 51 Peake, J.M. Vitamin C: effects of exercise and requirements with training. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, **13**(2), 125-151, 2003
- 52 Saitoh, O., Periasamy, M., Kan, M., and Matsuda, R. cis-4-Hydroxy-L-proline and ethyl-3,4-dihydroxybenzoate prevent myogenesis of C2C12 muscle cells and block MyoD1 and myogenin expression. *Exp. Cell Res.*, **200**(1), 70-76, 1992.
- 53 Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hubner, C., Riebel, T., Komen, W., Braun, T., Tbin, J.F., and Lee, S.J. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.*, **350**, 2682-2688, 2004.
- 54 McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.*, **387**, 83-90, 1997.
- 55 Wagner, K.R., Fleckenstein, J.L., Amato, A.A., Barohn, R.J., Bushby, K., Escolar, D.M., Flanigan, K.M., Pestronk, A., Tawil, R., Wolfe, G.I., Eagle, M., Florence, J.M., King, W.M., Pandya, S., Straub, V., Juneau, P., Meyers, K., Csimma, C., Araujo, T., Allen, R., Parsons, S.A., Wozney, J.M., Lavallie, E.R., and Mendell, J.R. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*, **63**(5), 561-571, 2008.
- 56 Patel, K. Follistatin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **30**(10), 1087-1093, 1998.
- 57 Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.*, **96**(1), 23-28, 1990.
- 58 Yamamoto, H., Kawabe, Y., Ito, A., and Kamihira, M. Enhanced liver functions in mouse hepatoma cells by induced overexpression of liver-enriched transcription factors. *Biochem. Eng. J.*, **60**, 67-73, 2012.
- 59 Hotta, A., Saito, Y., Kyogoku, K., Kawabe, Y., Nishijima, K., Kamihira, M., and Iijima, S. Characterization of transient expression system for retroviral vector production. *J. Biosci. Bioeng.*, **101**(4), 361-368, 2006.
- 60 Colussi, C., Mozzetta, C., Gurtner, A., Illi, B., Rosati, J., Straino, S., Ragone, G., et al. HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**(49), 19183-7, 2008.
- 61 Iezzi, S., Padova, M.D., Serra, C., Caretti, G., Simone, C., Maklan, E., Minetti, G., Zhao, P., Hoffman, E.P., Puri, P.L., Sartorelli, V. Deacetylase inhibitor increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Dev. Cell.*, **6**(5), 673-684, 2004.
- 62 Hagiwara, H., Saito, F., Masaki, T., Ikeda, M., Nakamura-Ohkuma, A., Shimizu, T., and Matsumura, K. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances myogenesis by coordinating muscle regulatory factors and myogenic repressors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **414**(4), 826-831, 2011.

- 63 Ahn, S., Olive, M., Aggarwal, S., Krylov, D., Ginty, D.D., and Vinson, C. A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of *c-fos*. *Mol. Cell Biol.*, **18**(2), 967-977, 1998.
- 64 Iezzi, S., Cossu, G., Nervi, C., Sartorelli, V., and Puri, P.L. Stage-specific modulation of skeletal myogenesis by inhibitors of nuclear deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**(11), 7757-7762, 2002.
- 65 Abaza, M.S., Bahman, A.M., and Al-Attayah, R. Superior antimitogenic and chemosensitization activities of the combination treatment of the histone deacetylase inhibitor apicidin and proteasome inhibitors on human colorectal cancer cells. *Int. J. Oncol.*, **44**(1), 105-128, 2013.
- 66 Hupkes, M., Jonsson, M.K., Scheenen, M.J., van Rotterdam, W., Sotoca, A.M., van Someren, E.P., van der Heyden, M.A., van Veen, T.A., van Ravestein-van Os, R.I., Bauerschmidt, S., Piek, E., Ypey, D.L., van Zoelen, E.J., and Dechering, K.J., Epigenetics: DNA demethylation promotes skeletal myotube maturation. *FASEB J.*, **25**(11), 3861-3872, 2011.
- 67 Guasconi, V., and Puri, P.L. Chromatin: the interface between extrinsic cues and the epigenetic regulation of muscle regeneration. *Trends Cell Biol.*, **19**(6), 286-294, 2009.
- 68 McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr. Opin. Genet.*, **11**(5), 497-504, 2001.
- 69 Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., and Schubeler, D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.*, **39**, 457-466, 2007.
- 70 Palacios, D., Summerbell, D., Rigby, P.W., and Boyes, J. Interplay between DNA methylation and transcription factor availability: implications for developmental activation of the mouse myogenin gene. *Mol. Cell Biol.*, **30**(15), 3805-3815, 2010.
- 71 秋山徹, 河府和義, 阻害剤活用ハンドブック, 2006
- 72 Ikeda, K., Ito, A., Sato, M., Kanno, S., Kawabe, Y., and Kamihira, M. Effects of heat stimulation and L-ascorbic acid 2-phosphate supplementation on myogenic differentiation of artificial skeletal muscle tissue constructs. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **11**(5), 1322-1331, 2015.
- 73 Levenberg, S., Rouwkema, J., Macdonald, M., Garfein, E.S., Kohane, D.S., Darland, D.C., Marini, R., Blitterswijk, C.A., Mulligan, R.C., D'Amore, P.A., and Langer, R. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat. Biotechnol.*, **23**(7), 879-884, 2005.
- 74 Asano, T., Ishizua, T., and Yawo, H. Optically controlled contraction of photosensitive skeletal muscle cells. *Biotechnol. Bioeng.* **109**(1), 199-204, 2012.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜り、さらに、先生のご経験から来る的確な指示、広い視野に立ったものの考え方についてご教示くださいました九州大学大学院工学研究院化学工学部門 上平 正道 教授に深く感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益かつ細部まで渡るご助言を賜りました九州大学大学院工学研究院化学工学 部門 井嶋 博之 教授、機械工学部門 工藤 奨 教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、終始有益かつ的確なご指導、ご助言をいただきました九州大学工学研究院化学工学部門 井藤 彰 准教授 に心より感謝申し上げます。

実験を円滑に行えるように常に配慮して頂いたばかりでなく、困難な場面でもフォローしていただいた九州大学工学研究院化学工学部門 河邊 佳典 助教には心より感謝いたします。

研究室の皆様の協力によって私の研究が成り立っていることを実感しており、研究室全員の方々には心より感謝いたします。特に、本研究のメンバーとして多大な御協力を頂いた、佐藤 暢哲氏、山本 昌弘氏、今田 隆介氏には深く感謝いたします。

最後に、5年間という長い大学院生活を真心から支えて頂いた両親及び兄弟を始め、祖父母、友人の方々には感謝の意が絶えません。この支えがなければこうして私の研究が形になることはありませんでした。ここに深く感謝いたします。