

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 :

氏 名 : 池田 一史

論 文 名 : 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

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

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。そして最後に、人工筋組織の収縮力評価と高い相関性を持つ評価方法を用いて、ヒト iPS 細胞の新たな筋分化誘導法の評価を行った。序論では、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。次に既往の研究の中で、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。

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において、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ると、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。

また、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。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が向上することを既に述べたが、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。

また、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。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。