

組織工学的アプローチによる筋収縮モデルの構築

吉岡, 貫太郎

<https://hdl.handle.net/2324/4060141>

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

組織工学的アプローチによる筋収縮モデルの構築

吉岡 貫太郎

第 1 章 序論.....	1
1.1 本研究の目的.....	1
1.1.1 筋肉について.....	1
1.1.2 筋収縮に関わる細胞の役割.....	2
1.1.3 筋収縮に関する病気.....	4
1.1.4 筋収縮モデルの意義.....	6
1.1.5 組織工学.....	7
1.2 本研究の方針.....	8
1.3 本論文の構成.....	9
第 2 章 既往の研究.....	11
2.1 <i>In vitro</i> での筋収縮活性向上に関する研究.....	11
2.1.1 電気刺激培養による筋収縮活性の向上.....	11
2.1.2 遺伝子導入による筋収縮活性の向上.....	12
2.2 既存の筋収縮モデル.....	13
2.2.1 <i>In vitro</i> における筋収縮モデル.....	13
2.2.2 <i>In vivo</i> における筋収縮モデル.....	15
2.3 iPS 細胞の筋分化誘導.....	16
2.4 iPS 細胞由来筋芽細胞を利用した研究.....	18
2.4.1 iPS 細胞由来筋芽細胞を利用した薬剤スクリーニング.....	18
2.4.2 iPS 細胞由来筋芽細胞を利用した遺伝子修復.....	19
第 3 章 iPS 細胞由来運動神経細胞を用いた 筋収縮モデルの構築.....	21
3.1 緒言.....	21
3.2 平面における マウス iPS 細胞由来運動神経細胞と C2C12 細胞の共培養..	22

3.2.1	本節の目的	22
3.2.2	実験方法	22
3.2.3	実験結果と考察	26
3.2.4	本節のまとめ	32
3.3	i-MN と C2C12 細胞からなる複合三次元筋組織の構築	32
3.3.1	本節の目的	32
3.3.2	実験方法	32
3.3.3	実験結果と考察	35
3.3.4	本節のまとめ	38
3.4	本章のまとめ	38
第4章	患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築	40
4.1	緒言	40
4.2	RA 添加培養による iPS 細胞の筋分化効率の向上	41
4.2.1	本節の目的	41
4.2.2	実験方法	41
4.2.3	実験結果と考察	43
4.3	iPS 細胞由来筋管の電気刺激培養	45
4.3.1	本節の目的	45
4.3.2	実験方法	46
4.3.3	実験結果と考察	47
4.3.4	本節のまとめ	57
4.4	本章のまとめ	57
第5章	マイクロデバイスを用いた筋収縮モデルの構築	59
5.1	緒言	59
5.2	マイクロデバイスを用いた C2C12 細胞由来マイクロ筋組織の構築	59

5.2.1 本節の目的	59
5.2.2 実験方法	60
5.2.3 実験結果と考察	64
5.2.4 本節のまとめ	70
5.3 iPS 細胞を利用したマイクロ組織の作製と L-carnosine の添加培養	71
5.3.1 本節の目的	71
5.3.2 実験方法	71
5.3.3 実験結果と考察	74
5.3.4 本節のまとめ	82
5.4 本章のまとめ	82
第 6 章 総括	83
6.1 本論文のまとめ	83
6.2 今後の展望	85
参考文献	87

略語一覧

- AChR: Acetylcholine receptor (アセチルコリン受容体)
- ALS: Amyotrophic lateral sclerosis (筋萎縮性側索硬化症)
- BDNF: brain-derived neurotrophic factor
- BSA: Bovine serum albumin
- Cri-iPSc: Corrected DMD-iPSc by CRISPR-Cas 9 (DMD 遺伝子修復 iPSc 細胞)
- CRISPR-Cas9: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/
CRISPR associated protein 9
- DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DMD: Duchenne muscular dystrophy (デュシェンヌ型筋ジストロフィー)
- DMD-iPSc: DMD-patient derived iPSc cell (DMD 患者由来 iPSc 細胞)
- DMEM (h): Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose
- DMEM (l): Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose
- Dox: Doxycycline
- EPS: Electrical pulse stimulation (電気刺激)
- healthy-iPSc: healthy individual-derived iPSc cell (健常人由来 iPSc 細胞)
- i-MN: Motor neuron derived from mouse iPSc cell (iPSc 細胞由来運動神経細胞)
- iPSc cell: induced pluripotent stem cell
- KSR: Knock-out serum replacement
- Mag-TE: Magnetic force-based tissue engineering
- MCL: Magnetite cationic liposome (機能性磁性ナノ粒子)
- MEF: Mouse embryonic fibroblast
- α -MEM: α -Minimum essential medium eagle
- PDMS: Polydimethylsiloxane
- SDIA: Stromal cell-derived inducing activity
- TuJ: β III-tubulin
- RA: Retinoic acid

第 1 章 序論

1.1 本研究の目的

1.1.1 筋肉について

生体において筋肉は最大の臓器であり、生命活動を維持する上で多くの役割を担っている。1 つ目は骨格の基礎となり、生体を動かすことである。筋肉の中でも骨格筋は骨同士を繋ぐように骨と結合しており、関節等を安定させるだけでなく収縮運動により生体活動の主を担っている。2 つ目は衝撃からの緩衝作用である。筋肉によって骨や内臓が覆われていることにより、外部の衝撃から身体を守る。3 つ目は血流のポンプ作用である。心臓から押し出された血液は体中をめぐるが、心臓から離れた部位では血流が弱まる。その際に筋肉の収縮運動により静脈に圧力がかかり、筋ポンプ作用と呼ばれる血液の循環が促進される。4 つ目は熱代謝である。人間の体温は約 36°C で保たれているが、その熱生産の約 6 割を筋肉が占めている。5 つ目は免疫力の向上である。リンパ球をはじめとする免疫系の細胞はグルタミン等のアミノ酸によって活性化される。これらアミノ酸を筋肉が多く蓄えている。6 つ目がホルモンやマイオカインの産生である。筋肉から生産された物質は骨形成や抗炎症作用等を促進することで生命機能の維持に貢献している。最後の 7 つ目が水分の保持である。体内総水分量の約半数は筋肉が保持していると言われている。筋肉の構造は多数の筋束の間に動脈と静脈を張り巡らせた構造となっており、それぞれの血管は筋束の中に入り込み、収縮に必要な栄養や酸素のやり取りを行なっている¹。この筋束は多数の筋繊維で構成されており、さらに筋繊維は多数の筋原線維からなっている。この繊維は筋管細胞が成熟、その核が細胞表面へ移動し、近接（サルコメア）構造を有することで形成される（Fig. 1-1）。筋収縮の際にはサルコメア構造を構築しているミオシンフィラメントとアクチンフィラメントが、サルコメアの中央部に向かって互いに滑り合うことで収縮力が発生する²。骨格筋は損傷しても再生可能な組織であるが、その際に再生を促す細胞が筋衛

星細胞である。骨格筋損傷時に起きる炎症反応によって、損傷部位に集積している好中球やマクロファージから分泌される肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor）等によって活性化された筋衛星細胞が損傷部位に移動する³。そして筋芽細胞へと分化した後に、既存の骨格筋細胞に融合することで筋核数が増えることで筋再生が起こる。近年では筋衛星細胞特異的なマーカーとして Pax7 や Myf5 が同定されており、筋衛星細胞を幹細胞から分化誘導することで筋再生研究に向けた取り組みが行われている^{4,5}。

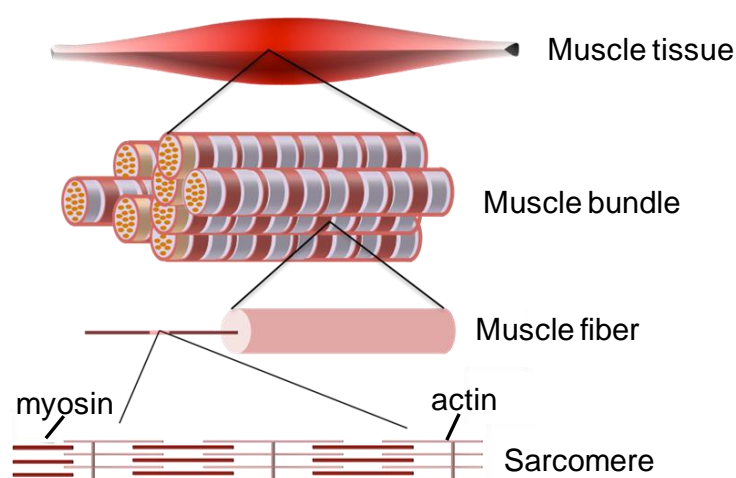


Figure 1-1. Schematic image of muscle structure.

1.1.2 筋収縮に関わる細胞の役割

筋肉は筋肉単体では収縮はできず、その他の細胞から栄養や足場を提供されるだけでなく、脳からの伝達により収縮が引き起こされる。ここでは筋収縮や筋機能に関わる細胞種についていくつか紹介する。

(1) 運動神経細胞

神経細胞には感覚受容器からの刺激を脳に伝達する感覚神経細胞、神経細胞同士

の情報伝達を行なう介在神経細胞などがある。中でも筋肉の収縮に関わっている運動神経細胞は、他の神経細胞から情報を受容する樹状突起が複数本細胞体から伸長しており、さらに情報を伝達する軸索が存在している。そして、軸索の末端部に複数本の終末側枝があり、下流の神経細胞や筋肉に対して情報伝達や刺激を与える。神経細胞が細胞間で情報伝達する際には、細胞内の電位が段階的に変化していく必要がある。通常、細胞外に Na^+ が細胞内よりも高い濃度で存在し、 K^+ は細胞内に高い濃度で存在している。初めに細胞外からのシグナルにより神経細胞のある部分の電位に変化が生じることで電位感受性 Na^+ チャンネルが開く。このことにより、細胞外から Na^+ が細胞内へ流入し、脱分極が起きる。すると細胞内と細胞外で電位差が生じることで、隣接部でも同様に膜透過性が変化し Na^+ の流入が起こる。この反応が連続的に起こることで、細胞内で電位が移動していくこととなる⁶。最終的にこの電位が軸索末端の終末側枝まで伝わることにより、終末側枝にある Ca^{2+} チャンネルが開き Ca^{2+} が細胞内に流入する。これによりシナプス小胞が終板まで移動し、シナプス小胞内に大量に含まれていた神経伝達物質が放出され、次の神経細胞や筋肉へとシグナルの伝達を行う。運動神経細胞が筋肉へとシグナル伝達を行う際には神経筋接合部 (Neuromuscular Junction) が形成される (Fig. 1-2)。神経筋接合部の形成過程において、運動神経細胞の終末から分泌された agrin が muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) を活性化することによって、アセチルコリン受容体 (AChR: Acetylcholine receptor) の集積が筋肉上で起きる^{7,8}。これにより運動神経細胞から放出されたアセチルコリンが筋肉上の AChR に結合することで、筋収縮が引き起こされる⁹。

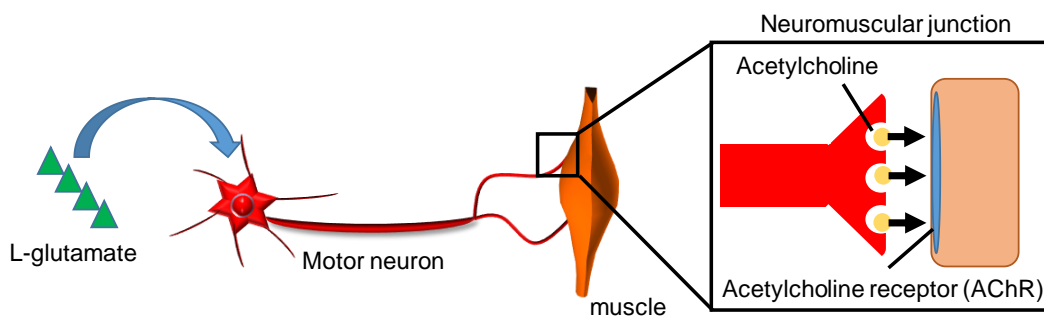


Figure 1-2. Mechanism of muscle contraction by motor neuron.

(2) 繊維芽細胞

繊維芽細胞は様々な生体組織に存在しており、細胞自身が組織構築における足場を提供するだけでなく、細胞外マトリックス (ECM : Extra Cellular Matrix) を分泌することでも足場を提供する。筋繊維は周囲の ECM を足場として形態を維持しているため、繊維芽細胞とも密接に接触している。また繊維芽細胞は筋再生とも密接に関与していることが知られている。筋再生時には前述した筋衛星細胞だけでなく、繊維芽細胞も損傷部へと移動し、コラーゲンをはじめとする ECM を分泌することで筋再生のための足場を提供する。また、筋衛星細胞の増殖を抑制する IL-6 等を分泌することで過剰な筋再生を抑える¹⁰。

(3) 脂肪細胞

筋組織中に局在する脂肪細胞はアディポカインと呼ばれる種々の分子を分泌し、筋細胞が分泌するマイオカインと共に組織間のコミュニケーションを媒介する働きを持つ¹¹。これらは生体において骨格筋と脂肪組織の適切な量比の維持に関与している。実際に筋細胞と脂肪細胞の共培養による研究では、IL-6 やミオスタチンを介して相互に成熟や筋管形成を抑制することが報告されている¹²。またアディポカインの一つである Leptin は、筋構成タンパク質の合成に関与するだけでなく、骨格筋のグルコース摂取を誘導する役割も有している¹³。

1.1.3 筋収縮に関する病気

筋肉の収縮に関する病気を大きく分類すると、筋肉の収縮を司る運動神経系に異常が生じる神経原性筋萎縮と、筋肉自体に異常が生じる筋原性筋萎縮、また神経筋接合部に異常が生じてしまう疾患の 3 つに分類される。そこでここでは、それぞれの分類ごとに代表的な疾患を一つずつ紹介する。

(1) 筋委縮性側索硬化症 (ALS: Amyotrophic lateral sclerosis)

ALS は神経原生筋委縮の一つで、上位もしくは下位運動ニューロンが系統的に変性し、罹患から約 3~5 年で罹患者の半数が呼吸筋麻痺により死亡する疾患である¹⁴。ALS 患者の 90%程度は遺伝性が見られない孤発性で、残りの約 10%が遺伝性の ALS である。これまでに ALS 発症の原因と考えられる遺伝子が 20 種類程度同定されているが、それら遺伝子と発症の関係は明確には明らかになっていない。近年では孤発性と遺伝性の両方で共通している遺伝子変異として TDP-43 が同定されており、ALS 患者の約 9 割が病巣部の神経細胞で TDP-43 の異常な蓄積がみられる¹⁵。TDP-43 に注目した研究が多く報告されるようになってきたが、未だ ALS 発症メカニズムとの詳細な関係は解明されていない。

(2) デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD: Duchenne muscular dystrophy)

DMD は筋原生筋委縮の先天性疾患であり、X 染色体劣性遺伝のため、男児のみに発症する。発症後は徐々に筋委縮が進行し、最終的に呼吸不全により患者のほとんどが 30 代までに死に至る¹⁶。発症の原因は X 染色体上にあるジストロフィン遺伝子の一部が欠失、重複あるいは多分点変異が生じることにより、細胞膜の裏打ちタンパクであるジストロフィンタンパク質が欠損することにある¹⁷。ジストロフィンタンパク質は筋肉の収縮運動を司るアクチン-ミオシン構造と細胞膜のグリコプロテインを架橋する形で存在しており、筋収縮の際の機械的エネルギーの衝撃を調節する役割や、細胞膜上に存在するイオンチャネルの働きを調節する役割を担っている¹⁸。そのため、ジストロフィンが欠損すると Ca^{2+} などが過剰に流入し、ミトコンドリアストレスやプロテアソームの発現により、細胞死が引き起こされると考えられている¹⁹。近年では DMD の治療法の一つとしてエキソンスキッピングが注目されている。エキソンスキッピングはジストロフィン遺伝子の変異点を読み飛ばすことで、一部が短縮しているものの機能を保ったジストロフィンタンパク質の発現を誘導する方法である^{20,21}。2019年にエキソンスキッピ

ングを利用した核酸医薬が承認申請されおり、DMD 治療の発展に期待されているものの、未だ根治療法の開発には至っていない。

(3) 重症筋無力症

重症筋無力症は神経筋接合部の自己免疫疾患で、筋肉の疲れやすさが主な症状だが重症になると呼吸筋に障害が起き、生命維持に問題が生じる。この疾患は神経筋接合部の筋肉上に存在するアセチルコリン受容体に対する自己抗体が、アセチルコリン受容体を介した神経筋伝達を阻害することにより発症する²²。現在でも根治できる有効な治療法はなく、免疫抑制剤等を利用した対症療法のみであるため、新たな治療の開発が求められている。

1.1.4 筋収縮モデルの意義

これまでに当研究室では筋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てきた。その中で DNA 配列の変化を伴わず筋分化筋肥大を促進できることが知られているエピジェネティックな低分子薬剤を添加した際に、筋管や筋組織の分化率や太さと筋収縮活性が相関しないことを報告している (Fig. 1-3)²³。この事実より、従来の形態学的な評価よりも、筋肉の最も重要な機能である収縮活性を直接評価できる方法の開発が重要であることが示唆されている。しかし、未だに薬剤スクリーニングなどへの応用が期待できるようなハイスループット性や生体を模倣した筋収縮モデルの報告が少なく、生命維持を脅かす筋疾患治療を発展させるためにも新しい筋収縮モデルの開発が必要である。

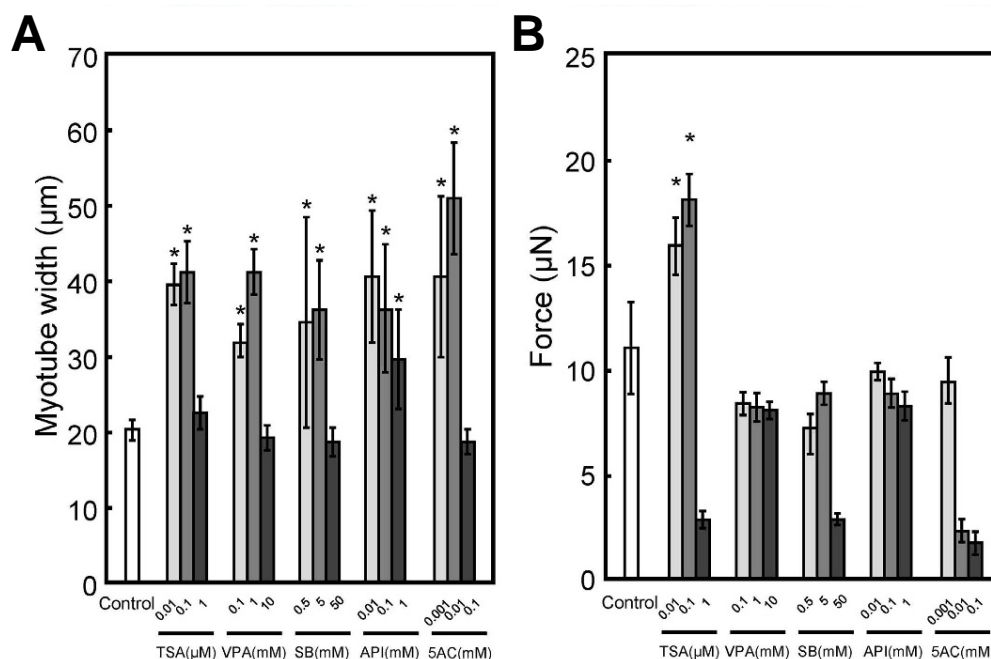


Figure 1-3. (A) Quantitative image analysis of myotube width in tissue-engineered skeletal muscle tissue constructs. The data are expressed as mean \pm SD of three constructs. $*P < 0.05$ vs. control. (B) The force generated by tissue-engineered skeletal muscle tissue constructs on day 7. The data are expressed as mean \pm SD of three constructs. $*P < 0.05$ vs. control²³.

1.1.5 組織工学

組織工学は再生医療における重要な技術の一つとして、1980年代から研究が進められている。Dr. Robert Langer と Dr. Joseph Vacanti らが 1993 年に機能的な組織を作製するには、細胞、足場、増殖因子の要素が必要不可欠であると提唱している²⁴。実際に Vacanti らのグループはヌードマウスの背に人の耳の形をした組織を移植することで世界中を驚かせ、組織工学と再生医療が広く認知されるきっかけとなった(Fig. 1-4)²⁵。前述の 3 要素の中で最も重要な要素は細胞であり、細胞を用いないアプローチは組織工学、再生医療の定義からは外れてしまう。近年では 2006 年に京都大学の山中 伸弥教授らによって induced pluripotent stem (iPS) 細胞が作製されて以来、再

生医療研究と組織工学的アプローチに基づいた再生医療製品の開発が進められてきた^{26, 27}。iPS 細胞をはじめとする幹細胞は様々な細胞種へと分化可能な多能性を有しており、生体外で患者由来の iPS 細胞を増殖し、患者自身に移植することが可能である。そのため、既存の他者からの臓器移植とは異なり、免疫拒絶やドナー不足の問題を回避できる点で非常に有用なツールである。また、2016 年にアメリカでは食品医薬品局 (FDA) が Regenerative Medicine Advanced Therapy (RMAT) を設け、組織工学的に作製された製品を含む再生医療製品において審査や承認期間を短縮することで、迅速な製品化とその普及が期待されている。

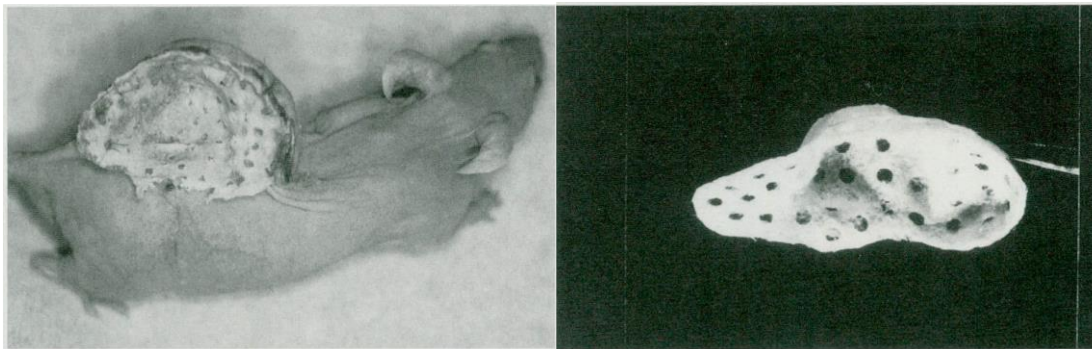


Figure 1-4. An external stent was fixed on the outside skin of the polymer ear implant to maintain polymer mold shape. The tissue consisted of polymer matrices seeded with chondrocyte, implanted subcutaneously, and then fixed by means of an external stent of the same size and shape²⁵.

1.2 本研究の方針

本研究では培養環境や使用する細胞が異なる筋収縮モデルを別々に構築することで、複数の状況に応じて薬剤スクリーニング等に適用可能な筋収縮モデルの構築を試みた。1 つ目に筋収縮を司る運動神経細胞の機能を評価するために、運動神経細胞と筋芽細胞の共培養系を 2 次元と 3 次元の両方で構築し、運動神経細胞からの刺激で収縮する筋収縮モデルを作製した。2 つ目にこれまで当研究室で頻繁に扱って

いたマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞ではなく、iPS 細胞由来筋芽細胞を新しい細胞源として、既存の筋収縮活性を向上させる手法を組み合わせることで、新たな筋収縮モデルを構築するとともに、そのモデルを患者由来の細胞に適用することにより病態細胞の機能評価を行った。また、3 つ目にハイスループット性を有する筋収縮モデルを構築し、モデル薬剤に対する収縮応答を観察することで作製した筋収縮モデルの有用性を評価した。

1.3 本論文の構成

第 1 章では本研究に取り組むにあたり、研究背景や意義と共に本研究の方針についても記した。

第 2 章では本研究に関連する分野の研究について記述し、研究背景と意義を明確にした。2.1 節では筋収縮活性を向上させる研究について述べた。2.2 節では既存の筋収縮モデルについて述べた。2.3、4 節では筋収縮モデル作製にあたり、細胞源として有用であると考えられている iPS 細胞由来筋芽細胞と iPS 細胞から分化誘導した筋肉の利用に関する研究について記述した。

第 3 章では運動神経細胞を含む筋収縮モデルの構築を行った。マウス iPS 細胞由来運動神経細胞 (i-MN) と C2C12 細胞由来筋芽細胞からなる共培養で、平面培養と 3 次元組織において神経筋接合を有する筋収縮モデルを構築することで、筋収縮を指標として運動神経細胞の機能が評価できることを示した。

第 4 章では DMD 患者由来 iPS 細胞と遺伝子修復した iPS 細胞から分化誘導した筋管に対して、筋収縮を指標とした機能評価を行った。電気刺激培養により iPS 細胞由来筋管の機能向上が可能であることを示した一方で、DMD 患者 iPS 細胞由来筋管においては電気刺激による細胞死が見られ、その原因が Ca^{2+} 依存のアポトーシス

によるものであることを明らかにし、アポトーシス阻害剤を添加培養することで、筋収縮活性を向上できることを示した。

第 5 章ではマイクロデバイスを用いて、ハイスループット性を有する三次元筋組織を構築した。マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞と iPS 細胞のそれぞれからマイクロ筋組織を作製し、複数の薬剤に応答した収縮活性の変化がみられた。

第 6 章では本論文の総括を行うと共に、本論文の成果をもとに今後の展望について記した。

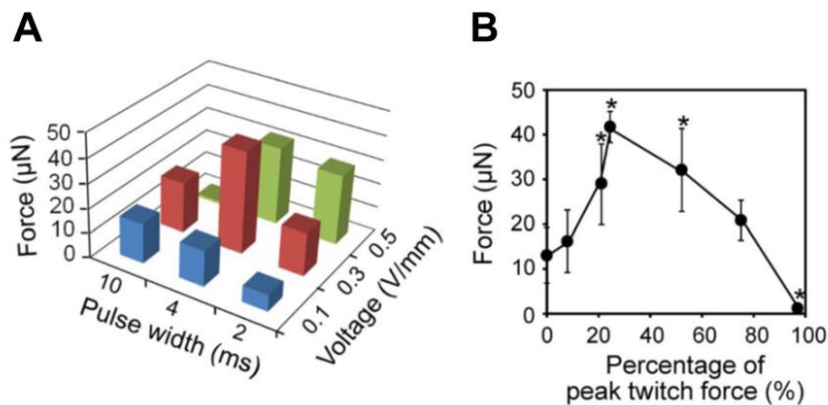
第 2 章 既往の研究

2.1 *In vitro* での筋収取活性向上に関する研究

2.1.1 電気刺激培養による筋収縮活性の向上

電気刺激 (EPS: Electrical pulse stimulation) は骨格筋の成熟を促す機械的刺激の一つであり、筋肥大や筋力増強等の変化を引き起こすことが広く知られている。Inoue らはラットの腓腹筋に対して電気刺激を与えた際の筋組織の変化を経時的に観察している²⁸。電気刺激を与える日数が長期に及ぶほど、筋量やタンパク質含有量の増加が見られた。加えて、筋繊維の断面積が増加した一方で、数が減少していた。これらの結果は電気刺激によって筋組織が肥大化し、成熟したことを示唆している²⁸。さらに電気刺激を与えた筋組織において筋肥大などを促進することが知られているテストステロンの代謝産物であるアンドロゲン受容体が増加することが報告されており、アンドロゲン受容体の増加がテストステロンに対する感受性を高め、筋肥大が誘発された可能性が示唆された^{28,29}。

また Ito らは C2C12 細胞から作製した筋組織に対して電気刺激培養する際に、印加電圧、パルス幅、周波数といった電気刺激の条件を変えて最適な条件を検討している³⁰(Fig. 2-1)。それにより、0.3 V/mm、4 ms、1Hz の条件で最も収縮力が増大したことが示されており、電気刺激培養が筋収縮活性の向上に有用な手段であることを示唆している。



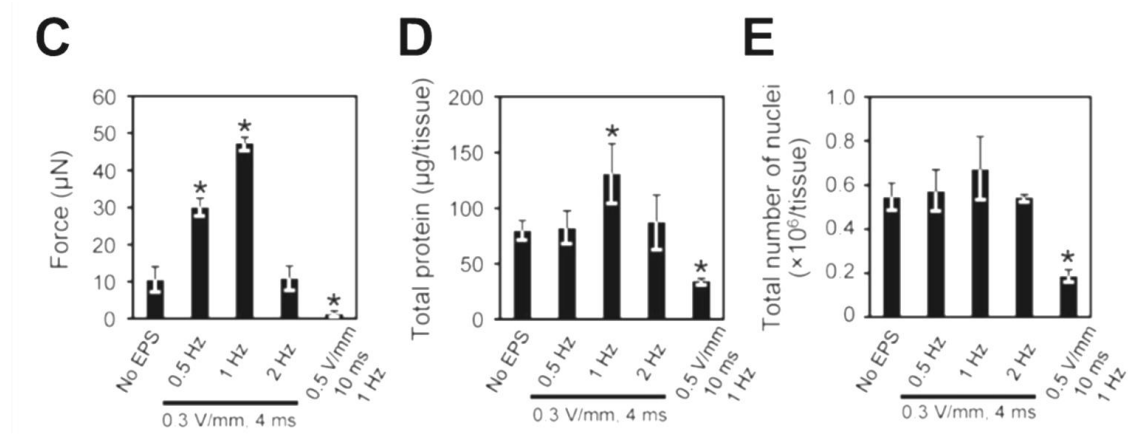


Figure 2-1. The effects of EPS on *in vitro* skeletal muscle tissues from days 4 to 7. (A) Peak twitch force generation of EPS-treated tissue constructs on day 7. (B) Relationship between %Pt at day 4 and force production at day 7. Data are shown as mean \pm 6 SD of three constructs. * $P > 0.05$ vs. 0%Pt. (C–E) The effects of EPS frequency during myogenic differentiation on the force production (C), the amount of protein (D), and the number of nuclei (E) in the tissue constructs at day 7. The data are expressed as mean \pm 6 SD of three constructs. * $P > 0.05$ vs. non-EPS constructs³⁰.

2.1.2 遺伝子導入による筋収縮活性の向上

筋組織の分化、成熟に関連する遺伝子は様々同定されており、それらを遺伝子導入することで筋組織の強化が図られている。IkedaらはFollistatinを導入した筋組織を作製している。Follistatinは骨格筋量増加を抑制するMyostatinに直接結合することで、その働きを阻害する。Follistatinを導入した筋組織では遺伝子導入を行っていない組織と比較して、約9倍収縮力が向上しており、形態学的にもサルコメアが観察されるなど、筋機能向上に有用な方法であることが示唆されている²³。

また従来の*in vitro*で作製された筋組織は一定以上の厚みがあると、組織内部が乏酸素状態になり、アポトーシスが起きてしまうことが問題であった。そこでSatoらはB-cell lymphoma 2 (Bcl-2)に注目した³¹。Bcl-2はアポトーシスに関与するシトクロムCのミトコンドリアからの放出を阻害することで、アポトーシスを抑制する³²。Bcl-2を遺伝子導入した筋組織では組織内部のアポトーシスが抑制されており、収縮力が約2倍

向上していた (Fig. 2-2)。これは筋成熟に直接関与しない因子であっても、組織構築を補助するような因子を用いることで筋収縮活性を向上できることを示唆している。

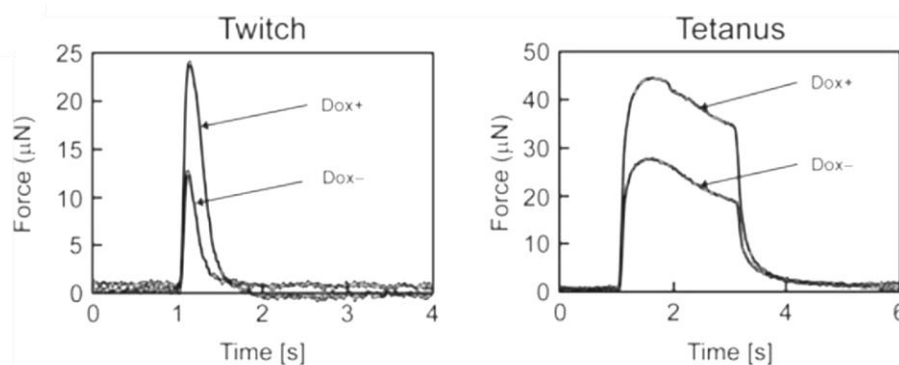


Figure 2-2. Representative peaks of the twitch force generated by the muscle bundles (left) and the fusion of tetanus of the muscle bundles (right) after 7 days of culture in the differentiation medium³¹.

2.2 既存の筋収縮モデル

2.2.1 *In vitro* における筋収縮モデル

In vitro での筋収縮モデルは薬剤スクリーニングだけでなく、バイオアクチュエータの開発や移植組織の構築に向けても開発が求められている。Dennis らはラットの初代細胞から三次元筋組織の構築を試みている³³。彼らの組織構築法では、初めにディッシュの中心にアンカーを設置しておき、ディッシュにラットの初代筋芽細胞を播種する。そして長期間培養することでディッシュから剥がれた細胞シートが中心のアンカーに対して巻き付くことで、筋組織が構築される。この手法で作製された筋組織は内部で筋管を形成しており、電気刺激に応答した収縮力を発揮することが報告されている³³。しかしこの方法ではディッシュから細胞シートが剥離するタイミングをコントロールできない点が問題であった。この問題に対し、Okano らは温度応答性ポリマーの開発に成功している³⁴。このディッシュは PIPAAm (poly(*N*-isopropylacrylamide)) がコートされて

おり、32°C以上ではディッシュ表面がわずかに疎水性となるため、細胞が接着可能だが、32°C以下では親水性となるために細胞がディッシュから剥離してしまう。実際に同氏らはこの温度応答性ポリマーを利用して細胞シートの作製に成功しており、他の研究者らもこのポリマーを利用して筋管細胞からなり、電気刺激に応答した収縮挙動を示す細胞シートを作製した例が報告されている^{35,36}。

その他の *in vitro* における筋収縮モデルの報告として、Ito らによって提案された機能性磁性ナノ粒子 (MCL: Magnetite Cationic Liposome) を用いた方法 (Mag-TE: Magnetic force based-tissue engineering) がある³⁷。MCL は磁性ナノ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ており、細胞に取り込まれやすい性質を持つ。この MCL により筋芽細胞を磁気標識し、磁力によって細胞を堆積させることで、細胞シートや環状筋組織の構築が可能となる (Fig. 2-3)³⁸。Mag-TE 法を筋組織構築に適用する利点は細胞を高密度で集積させることで、筋分化誘導時の細胞融合促進につながり、筋分化や筋成熟につながる点にある。

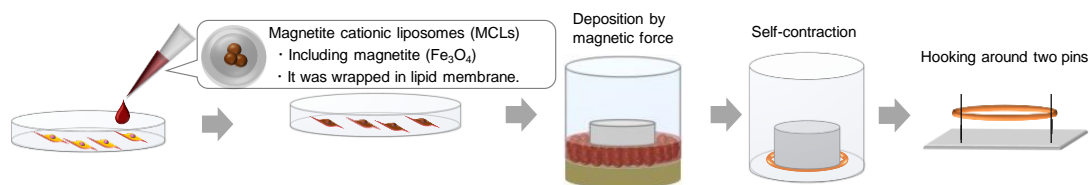


Figure 2-3. Mag-TE methods.

上述した筋組織は組織のサイズが大きいことから、96 well plate や 384 well plate 等に適用できないため、薬剤スクリーニングに利用する際にハイスループット性が乏しい点が問題として挙げられる。Simizu らはこの問題を解決するために 96 well サイズに収まるようなマイクロデバイスを利用することで、マイクロ筋組織の構築を試みている³⁹。彼らは Polydimethylsiloxane (PDMS) を用いて 2 本のポールを有する直径が 7 mm のマイクロデバイスを開発した (Fig. 2-4)。2 本のポールに対して巻き付くように細胞を播種することで、マイクロ筋組織を構築することが出来る。このマイクロ筋組織は電気刺激に応答した収縮力を発揮しており、dexamethazone を添加することで収縮力が減

少しした³⁹。

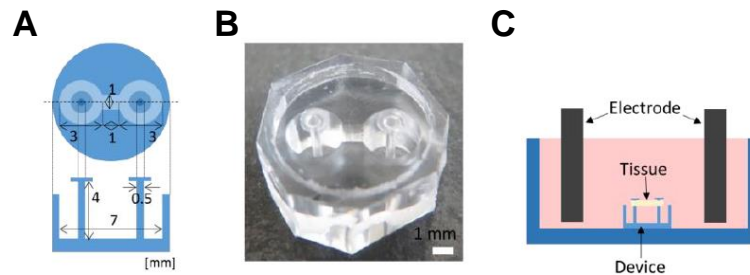


Figure 2-4. (A) Configuration of the microdevice, (B) Image of the fabricated device, (C) Schematic diagram of skeletal muscle tissue culture and electrical stimulation³⁹.

2.2.2 *In vivo* における筋収縮モデル

動物実験は薬剤スクリーニングや移植実験において、臨床試験を行なう前に安全性を確認するためには非常に有用な方法である。また、病態モデルの動物を使用することで、薬剤や遺伝子修復の効果を生検や動態によって評価できるため、現代でも欠かせない実験手段の一つである。代表的な例として DMD の病態モデルである mdx マウスは 1984 年に Bulfield らによって発見されて以来、DMD 研究に広く用いられている⁴⁰。mdx マウスは DMD と同様に点変異がジストロフィン遺伝子に生じていることで、ジストロフィンタンパク質が欠損している。しかし、骨格筋再生能が高いため、骨格筋の繊維化や脂肪化の程度が低く、筋力についてもほとんど低下しないため、DMD の病態進行を完全には反映できていない。一方で DMD 犬である CXMD 犬はエクソン 7 に点変異を有しており、mdx マウスや DMD と同様にジストロフィンが発現していない⁴²。CXMD 犬は mdx マウスとは異なり、骨格筋において繊維化や脂肪化が見られ、DMD の病態をよく反映している。Yokota らは前述したエクソンスキッピング法を CXMD 犬に対して適用した²⁰。その結果、ジストロフィンタンパク質の発現が回復しただけでなく、行動機能が改善していたことから、筋機能も回復していることが示唆された。この成果は臨床試験の推進に大きく寄与したものの、CXMD 犬の利用は維持や繁殖に多大な労力を要するという問題点を抱えている。

2.3 iPS 細胞の筋分化誘導

iPS 細胞は患者由来の細胞を利用できるため、薬剤スクリーニングへの応用にも期待されている。現在までに様々な細胞種への分化誘導法が確立されており、筋分化に関しても複数の報告がなされている。Darabi らは筋衛星細胞のマーカーとして知られる Pax7 に注目した⁴³。iPS 細胞から胚葉体を形成させ、その後、Pax7 陽性細胞を回収した。筋分化誘導された Pax7 陽性細胞は筋管様へと形態を変化させ、90%以上が筋特異的マーカーである myogenin や MHC によって染色された。また Pax7 陽性細胞を移植に用いることで筋力の上昇も見られた。しかしこの方法は胚葉体形成から 1 ヶ月程度かかるため、より短期間で分化誘導できる方法が求められた。そこで Tanaka らは 1993 年に発見され、myogenin をはじめとする筋分化に関わる転写因子の発現を制御することで知られる MyoD1 を iPS 細胞に遺伝子導入した^{44,45}。その結果、筋管様の細胞を 7 日間で得ることに成功し、分化誘導 14 日目には電気刺激に応答した筋収縮も観察された。また筋分化効率も 80%程度と非常に高いものであった (Fig. 2-5)。

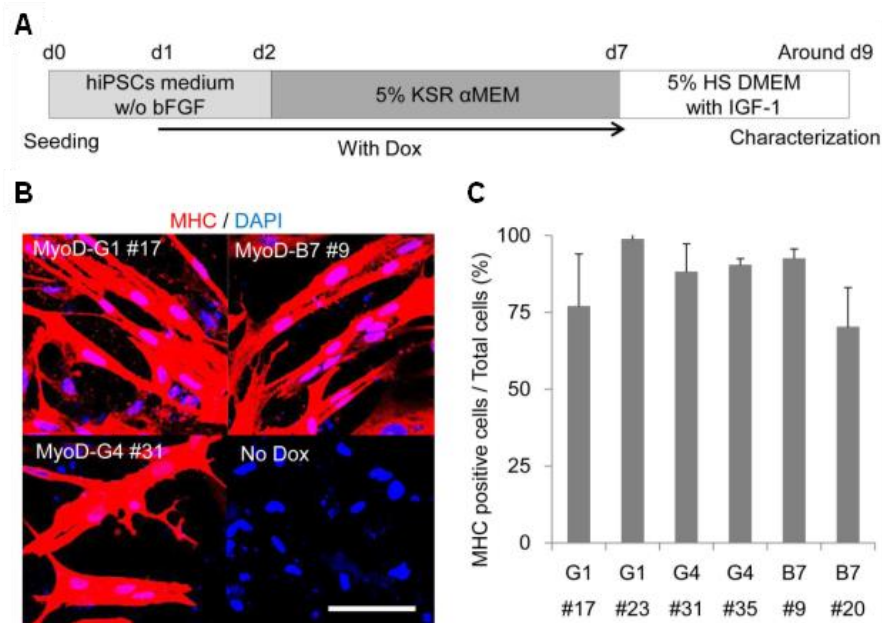


Figure 2-5. (A) A schematic of muscle differentiation protocol beginning with MyoD-hiPSc. (B) Immunohistochemistry of differentiated MyoD-hiPSc for MHC (red). Scale bar = 100 μ m. (C) Percentage of MHC positive cells per total cells following MyoD-induced differentiation of 6 MyoD-hiPSc clones. (n=3 for each clone). Data are listed as mean \pm S. D⁴⁵.

Uchimura らはこの手法を改良し、分化誘導 day 3 において細胞をディッシュから剥離して、別のディッシュに再播種する方法を開発した⁴⁶。この方法では従来法と比較してばらつきを示す変動係数が半分以下となっており、安定的な筋分化誘導に成功している (Fig. 2-6)。この方法は 96 well plate や 384 well plate で利用できることから、薬剤スクリーニングに適した筋分化誘導法であると考えられる。

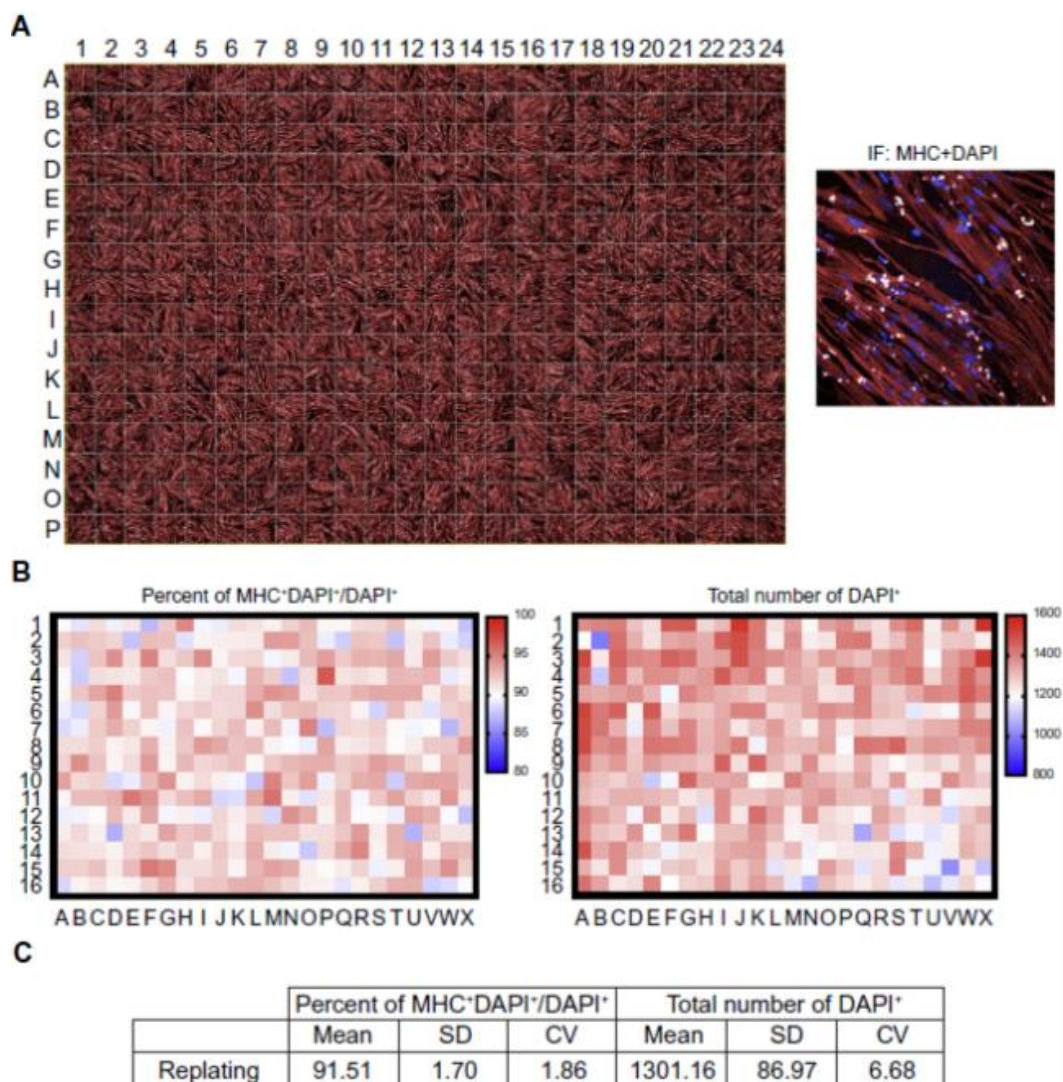


Figure 2-6. Skeletal muscle differentiation of hiPSC^{tet-MyoDmC} in 384multi-well plate by replating method. (A) Immunofluorescence images of MHC of myogenic differentiated hiPSC^{tet-MyoDmC} cultured in 384 multi-well plate at day 9. (B) A heat-map analysis of myogenic differentiation efficiencies and total number of nuclei at day 9. (C) A statistical analysis of skeletal muscle differentiation efficiencies and total number of nuclei between direct plating and replating methods in 384multi-well plate at day 9⁴⁶.

2.4 iPS 細胞由来筋芽細胞を利用した研究

2.4.1 iPS 細胞由来筋芽細胞を利用した薬剤スクリーニング

Kokuboらは筋ジストロフィーの一つであるジスフェルリン異常症患者から iPS 細胞を作製した⁴⁷。ジスフェルリン異常症は細胞膜が損傷した際に起きる膜修復機能がジスフェルリンの異常により弱まり、日常生活で骨格筋に対して蓄積したダメージにより四肢の筋肉が動かなくなるために、Quality of life(QOL)が低下する疾患である。彼らは前述の筋分化誘導法に則り、MyoD1 を遺伝子導入した iPS 細胞を 384 plate にて分化誘導した。その結果、既存薬ライブラリーから抗がん剤として使用されていたノコダゾールを見出し、ジスフェルリンの発現増加や膜修復機能が回復することが明らかになった (Fig. 2-7)。

このような既存薬ライブラリーと患者由来 iPS 細胞を組み合わせた薬剤スクリーニングはその他の細胞種でも広く進められており、ALS 患者由来 iPS 細胞を用いた薬剤スクリーニングによって見出されたボスチニブは既に臨床試験が始まっている⁴⁸。これらの事実から患者由来 iPS 細胞を利用した薬剤スクリーニングは有用であることが示唆されている。

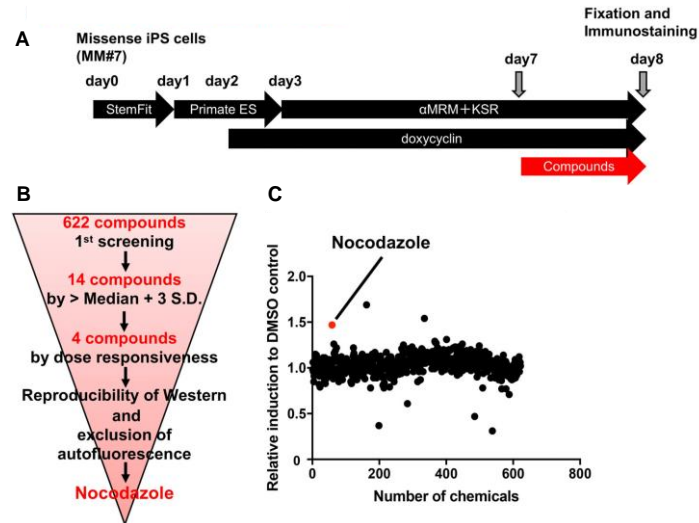


Figure 2-7. (A) Schematic representation of the protocol for myocyte differentiation and small molecule screening. (B) Schematic representation of the screening steps. Nocodazole was identified as the most effective molecule from the 622 compounds tested. (C) Result of the primary screen assay⁴⁷.

2. 4. 2 iPS 細胞由来筋芽細胞を利用した遺伝子修復

近年では遺伝子編集技術の発展が進み、実験動物だけでなく iPS 細胞を利用した遺伝子修復に関する研究も盛んに行われている。患者由来 iPS 細胞の筋分化誘導は前述したジスフェルリン異常症だけでなく、DMD 患者由来 iPS 細胞の筋分化誘導も行われている。Li らは DMD 患者由来 iPS 細胞に対して MyoD1 遺伝子を発現させることで、筋分化誘導に成功している⁴⁹。そしてその細胞は DMD に見られるジストロフィンタンパク質の欠損が見られた。また同氏らは遺伝子編集技術である CRISPR-Cas9 技術を利用して、ヒト iPS 細胞においてジストロフィン遺伝子の回復を試みている⁴⁹。CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9) 技術には、エンドヌクラーゼである Cas9 とターゲットとなる遺伝子配列に相補的な gRNA が使用される⁵⁰。Cas9 と gRNA が複合体を形成することで、gRNA が Cas9 をターゲットとなる遺伝子配列に誘導し、切断する。その後、相同組み換え修復の経路を利用することで任意の遺伝子を目的部位にノックインすることが出

来る遺伝子編集技術である。この技術を用いて、ジストロフィン遺伝子のエクソン 44 に欠損を持つ DMD 患者由来 iPS 細胞に対してエクソン 44 をノックインした。そしてその細胞を MyoD1 を遺伝子導入することで分化誘導した筋管がジストロフィンタンパク質の発現が回復したことを確認している (Fig. 2-8)。

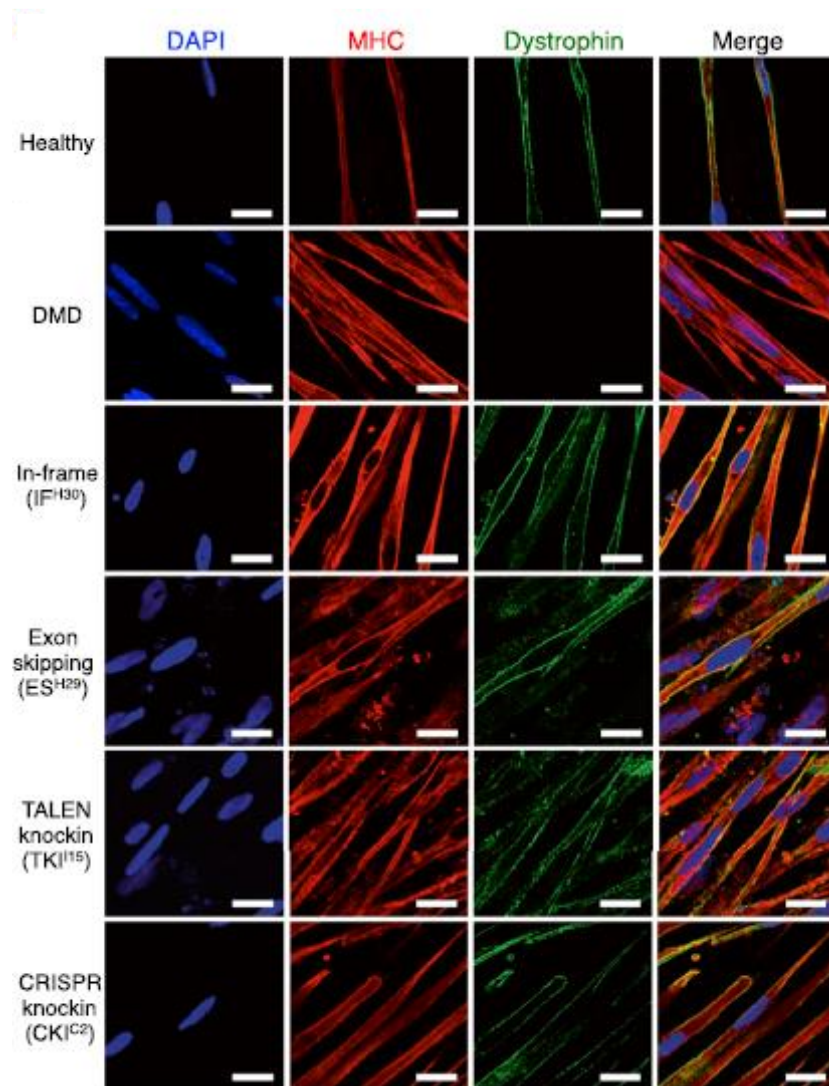


Figure 2-8. Immunofluorescence staining of skeletal muscle cells differentiated from the corrected clones. A z axis section of the confocal microscopy image shows submembrane localization of the dystrophin protein in the healthy control and all corrected clones, but not in the uncorrected original DMD iPSCs. The cells were stained by DAPI, a marker of skeletal differentiation (myosin heavy chain [MHC]), in red and an antibody that detects the rod domain of dystrophin (DYS1) in green. Scale bar, 50 μm ⁴⁹.

第3章 iPS 細胞由来運動神経細胞を用いた

筋収縮モデルの構築

3.1 緒言

近年、ALSをはじめとする神経疾患の *in vitro* での薬剤スクリーニングに対して iPS 細胞由来運動神経細胞の応用が注目されている^{48,51}。運動神経細胞の最も重要な機能は神経筋接合部を介して筋肉の収縮を引き起こすことだが、従来の薬剤スクリーニング法では運動神経細胞の生存率、形態、遺伝子発現挙動などに焦点があてられており、神経筋接合を介した筋収縮により運動神経細胞の機能を評価した研究は未だ少ない。以前当研究室では、ラット副腎褐色細胞株 PC12 細胞とマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いて神経筋接合モデルを開発したが、神経伝達物質であるグルタミン酸(L-glutamate)に対する応答した筋収縮はみられていない⁵²。そのため、筋収縮を指標として、運動神経細胞からのシグナル伝達に基づいた神経筋接合モデルの開発が必要である。

iPS 細胞から神経系の細胞への分化誘導法の一つに stromal cell-derived inducing activity (SDIA)法があり、この方法ではマウスストローマ細胞 (PA6 細胞)をフィーダー細胞として使用するだけで神経系への分化誘導が可能である^{53,54}。当研究室では PA6 細胞に対して N-カドヘリン遺伝子を高発現させてフィーダー細胞として用いることで、マウス iPS 細胞から運動神経細胞への分化誘導が促進できることを報告している⁵⁵。加えて、機能性磁性ナノ粒子で細胞を磁気標識し、磁力によって細胞を積層させることで組織体を作製する Mag-TE 法の研究も進めている^{37,38}。

そこで本章では *in vitro* において神経筋接合モデルを作製するために、マウス iPS 細胞と C2C12 細胞からそれぞれ分化誘導した運動神経細胞と筋芽細胞の共培養を行った。そして平面培養と Mag-TE 法を利用した複合三次元筋組織において、神経筋接合を介した筋収縮挙動を調べ、運動神経細胞の機能を評価可能な筋収縮モデルの構築を試みた。

3.2 平面における マウス iPS 細胞由来運動神経細胞と C2C12 細胞の共培養

3.2.1 本節の目的

前述したように、以前当研究室では PC12 細胞と C2C12 細胞からなる神経筋接合モデルを作製している⁵²。しかし、この神経筋接合モデル系は神経伝達物質であるグルタミン酸に対する応答は見られておらず、発展の余地がある。また株化細胞である PC12 細胞でなく iPS 細胞を用いることでモデル系としての有用性が高まると考えられる。そこで本節では、平面培養において i-MN と C2C12 細胞を共培養することで新たな神経筋接合モデルの作製を試みた。

3.2.2 実験方法

(1) 細胞培養

マウス iPS 細胞の未分化維持培養に用いる Mouse embryonic fibroblast (MEF) は MilliQ (450 ml) に 4.5 g/l Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM (h): Sigma-Aldrich)、3.7 mg/ml 炭酸水素ナトリウム (Fujifilm Wako Pure Chemical)、0.05 mM ペニシリン G カリウム (Fujifilm Wako Pure Chemical)、50 µg/ml ストレプトマイシン硫酸塩 (Fujifilm Wako Pure Chemical) を加え、1 M HCl (Fujifilm Wako Pure Chemical) で pH 7.0 に調製し、ウシ胎児血清 (FBS) 50 ml を加えて、よく混合した培地 (以下、MEF 用培地) により培養した。PA6/N 細胞は Paerwen Paerhati 氏から提供して頂いた⁵⁵。培養は α -MEM (Invitrogen) に 10% FBS、0.05 mM ペニシリン G カリウム、50 µg/ml ストレプトマイシン硫酸塩を混合した培地 (PA6/N 用培地) にて Collgen-Coated Dish Type I (AGC Techno Glass) 上で行った。マウス iPS 細胞は iPS-MEF-Ng-20S-17 株 (Riken) を使用した。培養培地は Knock-out Dulbecco's

第3章 iPS 細胞由来運動神経細胞を用いた筋収縮モデルの構築

Modified Eagle's Medium (Invitrogen) に、15 % Knock-out Serum Replacement (KSR: Invitrogen)、50 µg/ml ストレプトマイシン硫酸塩、0.05 mM ペニシリン G カリウム、4 mM L-グルタミン (Fujifilm Wako Pure Chemical)、0.1 mM 非必須アミノ酸 (Invitrogen)、100 µM 2-メルカプトエタノール (Thermo Fisher Scientific)、1000 unit/ml 白血病阻害因子 (LIF: Millipore) を添加した培地 (以下マウス iPS 細胞未分化維持培地) を用いた。またマウス iPS 細胞は未分化状態維持のため、マイトマイシン C (Nakalai Tesque) により処置した MEF 上で培養し、毎日培地交換を行った。C2C12 細胞 (ATCC: American) の培養には増殖培地として DMEM-low glucose (DMEM (1): Sigma-Aldrich) に 56 °C、30 分で非動化した FBS、5.96 mg/ml HEPES (Dojindo Laboratories)、3.7 mg/ml 炭酸水素ナトリウム、0.05 mM ペニシリン G カリウム、50 µg/ml ストレプトマイシン硫酸塩を加えたものを用いた。全ての細胞は 37 °C、5 % CO₂、95 % air の CO₂ インキュベーターで培養した。

(2) MEF の取得

妊娠 14 日目のマウス (Balb/c: 日本 SLC) を頸椎脱臼させ、ベンザルコニウム塩化物消毒液 (オスバン: Takeda) に浸し消毒した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 15 ml を入れた 10 cm 滅菌シャーレ (As One) を 3 枚用意し、胎児を子宮ごと取り出し、1 枚目のシャーレに入れて洗浄した。2 枚目のシャーレに移し、子宮から胎児を取り出して膜を取り除いた後、内臓と頭を取り除いた。これを 3 枚目のシャーレに移し、はさみでなるべく細かく切り刻んだ。次に、0.1 % トリプシン/0.2 % EDTA 溶液をプラスチックピペット (Greiner) で 20 ml 加えた組織懸濁液を C-Tube (Miltenyi Biotec) に移し、gentleMACS Dissociators (Miltenyi Biotec) により、細胞を分離した。MEF 用培地を加えてトリプシンの反応を停止させ、自然沈降により組織体が沈降した後で、上清を回収した。回収した上清を 4 °C、1000 rpm、5 min で遠心分離した。回収した細胞の数を、血球計算板及び 0.5 % トリパンブルー - PBS を用いたトリパンブルー色素排除染色法にて測定 (以下、セルカウント) し、100 mm ディッシュ (Thermo) に 1 枚当たり 1×10^6

第3章 iPS 細胞由来運動神経細胞を用いた筋収縮モデルの構築

cells で播種し、37 °C、5 % CO₂、95 % air の CO₂ インキュベーターで培養した。翌日 MEF 用培地で培地交換を行った。コンフルエントに達したところでトリプシン処理を行い、遠心分離にて細胞を回収した。これに MEF 用培地 900 μl、ジメチルスルホキシド (DMSO: Fujifilm Wako Pure Chemical) 100 μl 混ぜた溶液で懸濁し凍結した。なお、解剖に用いたはさみ、ピンセットは乾熱滅菌した。

(3) SDIA 法によるマウス iPS 細胞の運動神経分化誘導⁵³⁻⁵⁵

分化誘導 day 0 において PA6/N 細胞に終濃度 1 μg/ml で Dox を添加した。翌日、 2.0×10^5 cells/well で Collagen 6 well-plate (AGC techno Glass) 上に PA6/N 細胞を播種した。分化誘導 day 2 で、マウス iPS 細胞を 1.1×10^3 cells/well でコンフルエントに達した PA6/N 細胞上に播種し、マウス iPS 細胞未分化維持培地から LIF を除き、終濃度 1 μg/ml で Doxycycline (Dox: Sigma-Aldrich) を加えた培地 (マウス iPS 細胞分化誘導培地) にて培養した。分化誘導 day 6 神経系から運動神経細胞へと機能分化させるためにマウス iPS 細胞分化誘導培地に 0.2 μM All-trans retinoic acid (RA: Fujifilm Wako Pure Chemical) と 1 μM purmorphamine (Sigma-Aldrich) を加えた運動神経分化誘導培地にて分化誘導 day 10 まで培養を行った。分化誘導 day 2 以降は 2 日に 1 回培地交換を行った。

(4) i-MN と C2C12 細胞の共培養

i-MN と C2C12 細胞を共培養するため、初めに C2C12 細胞を 35 mm dish (Thermo Fisher Scientific) に 3.0×10^4 cells/well で播種し、C2C12 増殖培地にてコンフルエントになるまで培養した。3.2 節 2 項 (3) に示す方法で分化誘導した i-MN を papain dissociation method (Worthington Biochemical) を利用してディッシュから剥がし、回収した細胞を Collgen-Coated Dish Type I に播種し、30 分後に上清を回収することで i-MN と PA6/N 細胞をはじめとする i-MN 以外の細胞を分離した。回収した

第3章 iPS 細胞由来運動神経細胞を用いた筋収縮モデルの構築

i-MN をコンフルエントになっている C2C12 細胞上に 3.2×10^5 cells/well の細胞密度で播種した。培養は運動神経分化誘導培地から RA と purmorphamine を除いた培地と、C2C12 増殖培地の血清を 2% 仔牛血清に置き換えた培地を 1 : 1 で混合した培地にて 7 日間行った。培地交換は毎日行った。

(5) 免疫染色

Day 10 まで分化誘導を行った細胞を 4% PFA にて室温で 15 分間反応させて固定した。次に細胞を 1×PBS にて 3 回洗浄後、0.2% TritonX-100 溶液 (Fujifilm Wako Pure Chemical) に室温で 15 分間インキュベートし、膜透過処理を行った。再度 1×PBS で 3 回洗浄し、1×PBS に Bovine serum albumin (BSA: Fujifilm Wako Pure Chemical) を加えた 1% BSA 溶液を使用して、室温で 30 分間インキュベートしブロッキングした。次に運動神経分化誘導評価に関しては 1% BSA 溶液に抗 β III-tubulin 抗体 (R & D Systems) を 1.5 μ g/ml、抗 HB9 抗体 (Bioss) 5 μ g/ml の濃度で調製した溶液に交換し 24 時間 4°C でインキュベートした。共培養時の運動神経細胞は抗 β III-tubulin 抗体のみを用いて一次抗体と室温で 3 時間反応させた。また筋管の染色に関しては抗 α -actinin 抗体 (Sigma-Aldrich) を 1/1000 濃度で 1% BSA 溶液に加え、1 時間室温でインキュベートした。24 時間後、1×PBS で 3 回洗浄し、1% BSA 溶液で濃度を 1:1000 で調製した 2 次抗体 Alexa Fluor 488 (green)、Alexa Fluor 546 (red) 入り溶液、さらに 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI: Invitrogen) を加え 45 分間インキュベートした。3 回 1×PBS で洗浄後、1×PBS を加え、BZ-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence) にて観察した。

(6) 細胞の形態学的観察

β III-tubulin、HB9、 α -actinin の陽性面積は 1 well につき 5 枚ずつ 3 well 分写真を撮影し、BZ-Analyzer ソフトウェア (Keyence) にて算出した。また撮影した写真から

第3章 iPS 細胞由来運動神経細胞を用いた筋収縮モデルの構築

1well につき 25、10 細胞ずつ 3 well 分をそれぞれ神経突起の長さで筋管の太さ BZ-Analyzer ソフトウェア (Keyence)を用いて算出した。

(7) 筋管の収縮挙動の観察

共培養を 7 日間行った細胞に対して、BZ-9000 蛍光顕微鏡にて 5 視野分の動画を撮影した。次に 800 μM L-glutamate (Sigma-Aldrich)を添加して、1 分後に前述と同様の視野を動画で撮影した。さらに 50 μM curare (Tokyo Kasei Kogyo)添加して前述と同様の視野を動画で撮影した。その後、1 well 当たり 3 本の筋管の動きを 3 well 分、撮影した動画より motion analyzer ソフトウェア (Keyence)にて解析した。動画の撮影時、観察用培地として神経伝達物質を含まない DMEM (1)を用いた。

(8) 統計解析

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

3.2.3. 実験結果と考察

(1) マウス iPS 細胞の運動神経細胞への分化誘導

PA6/N 細胞を用いて SDIA 法によりマウス iPS 細胞から運動神経細胞へと分化誘導を行った。運動神経細胞へと分化しているかを確認するために、神経マーカーである β III-tubulin (TuJ)、運動神経マーカーである HB9 をそれぞれ赤と緑で染色し、観察した (Fig. 3-1)。TuJ と HB9 で染色された細胞集団 (コロニー)が観察されたことからマウス iPS 細胞から運動神経細胞への分化誘導に成功したと考えられる。また、HB9 陽性面積は TuJ 陽性面積の約 50%であり、この結果は以前の報告とほとんど一

致していることから同程度の細胞数の i-MN を得ることが出来たと考えられる⁵⁵。

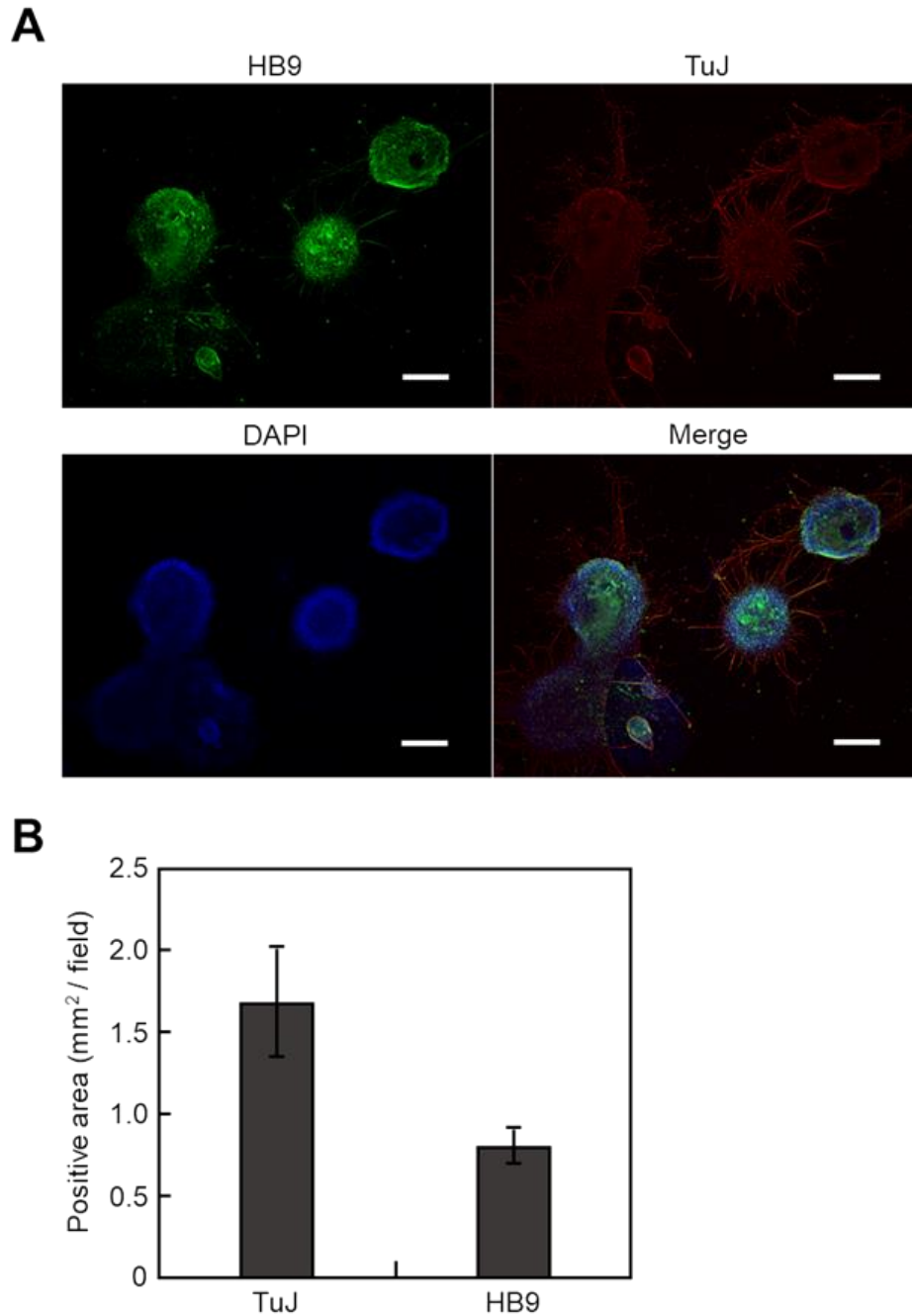
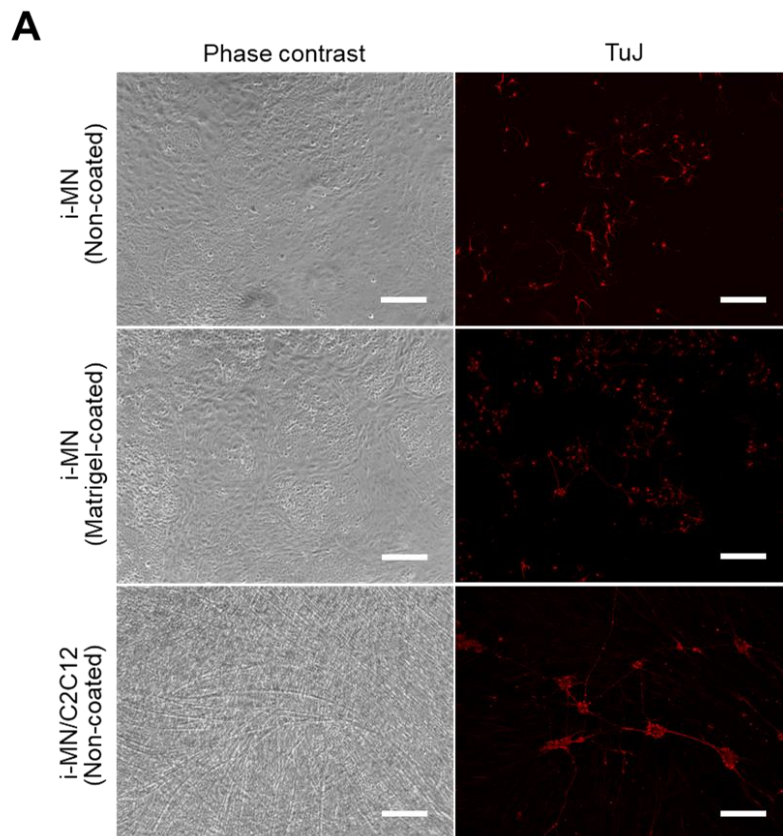


Figure 3-1. Motor neuronal differentiation of mouse iPS cells by SDIA method. iPS cells were cultured on PA6/N feeder for 8 days. (A) Fluorescence microscopy of i-MNs stained with anti-HB9 antibody (green, motor neuronal marker), anti-TuJ antibody (red, neuronal marker), and DAPI (blue, nucleus). Scale bars, 400 μ m. (B) Quantitative analysis of HB9- and TuJ-positive area. Data are expressed as means \pm SD (n=3).

(2) i-MNとC2C12細胞の共培養によるi-MNと筋管の形態に対する影響

次に、共培養がi-MNとC2C12細胞由来筋管それぞれどのような効果を示すかを細胞の形態を観察することで調べた。共培養から7日後、神経成熟の指標である神経突起の長さをTuJで染色された免疫染色画像から測定したところ、i-MNを単独で培養した条件と比較して、約1.8倍伸張していることが分かった(Fig. 3-2)。生体において筋肉はbrain-derived neurotrophic factor (BDNF)をはじめとする様々な神経栄養因子を放出しており、BDNFはTyrosine kinase B (TrkB)経路を介して下流の遺伝子を制御することで、神経系への分化や成熟そして神経突起の伸長を促進することが知られている⁵⁶。今回使用したC2C12細胞もBDNFなどを放出することが報告されていることから、C2C12細胞との共培養によりi-MNの神経突起が伸長したものと考えられる⁵⁶。またGreeneらの報告からもC2C12細胞とPC12細胞の共培養系においても、PC12細胞由来神経様細胞において突起の伸長が見られており、今回の結果と符合するものであった⁵⁷。



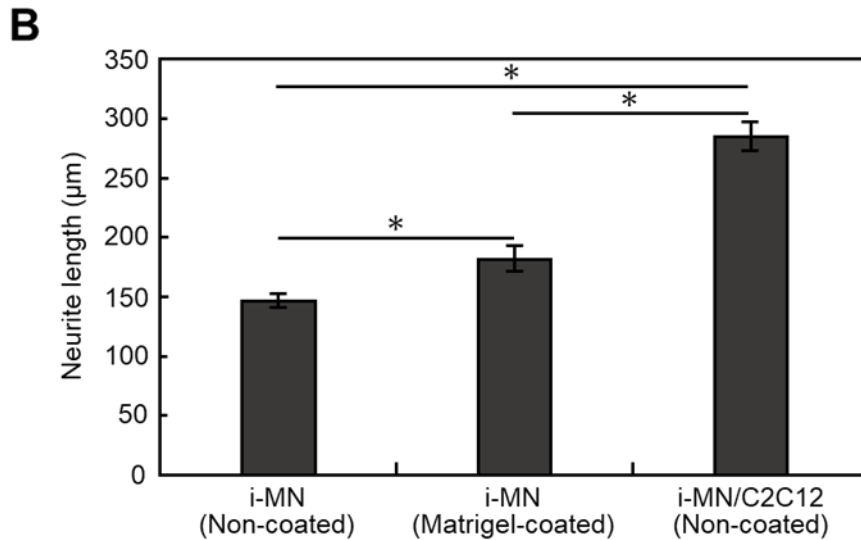
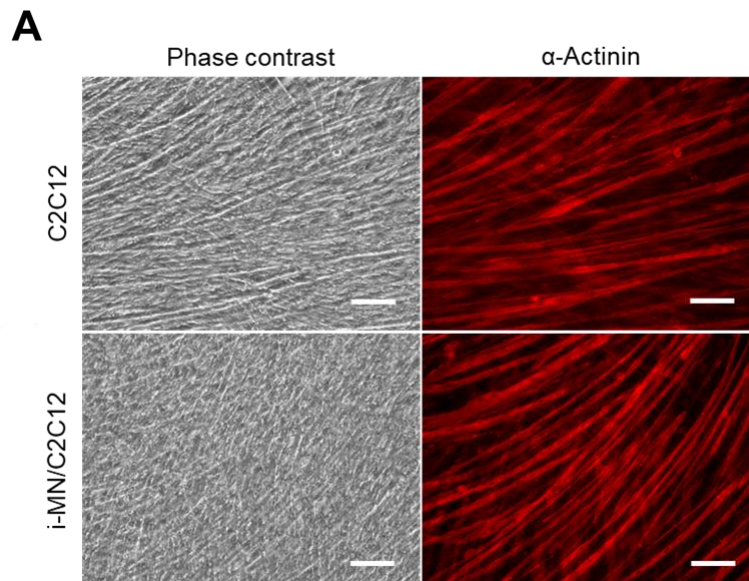


Figure 3-2. Morphological observation of i-MNs in co-culture with C2C12-derived myotubes. i-MNs were cultured with or without C2C12 cells for 7 days. (A) Fluorescence microscopy of cells immunostained with anti-TuJ antibody and DAPI. Scale bars, 200 μm. (B) Quantitative analysis of neurite lengths. Data are expressed as the mean ± SD (n=3). *P < 0.05.

一方で筋管も同様に共培養 7 日目に免疫染色後、筋管の形態を観察したが、筋管の太さ、筋管面積共に i-MN との共培養による有意差は見られなかった (Fig. 3-3)。この結果から、i-MN との共培養は筋成熟の指標である筋肥大に寄与しておらず、筋管の太さ、面積共に有意差が見られなかったため、筋分化に対しても寄与しないことが示唆された。



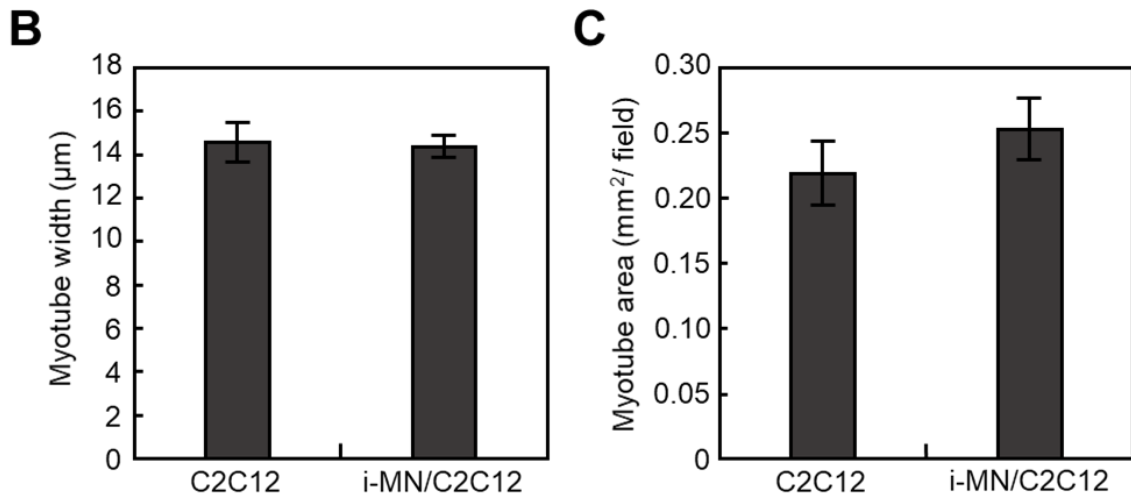


Figure 3-3. Morphological observation of C2C12-derived myotubes in co-culture with i-MNs. C2C12 cells were cultured with or without i-MNs for 7 days. (A) Fluorescence microscopy of cells immunostained with anti- α -actinin antibody and DAPI. Scale bar, 100 μ m. (B, C) Quantitative analysis of myotube widths (B) and α -actinin positive areas (C) with or without i-MNs. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3).

(3) 神経筋接合を介した C2C12 細胞由来筋管の収縮挙動解析

平面培養での共培養において、i-MN と C2C12 細胞由来筋管との間に神経筋接合が形成されているかを調べるため、神経伝達物質である L-glutamate に応答した筋収縮の有無を動画解析により調べた (Fig. 3-4)。動画解析の結果より、C2C12 細胞のみの培養条件では、L-glutamate の添加の有無に関わらず、筋収縮は見られなかった。一方で、i-MN と共培養した条件では L-glutamate の添加に応じて収縮する筋管が見られ、平均で $2.16 \pm 0.44 \mu\text{m}$ 動いていた。加えて、curare の添加に応じた収縮挙動の変化を調べた。Curare は筋管上のアセチルコリン受容体に結合して運動神経細胞から放出されたアセチルコリンの働きを阻害することで、筋収縮を停止させる働きがある。i-MN との共培養条件において L-glutamate の添加により収縮していた筋管が curare を添加することで収縮が停止した。これらの結果は i-MN と C2C12 細胞由来筋管との間に神経筋接合が形成されたことを示唆しており、平面培養において新たな神経筋接合モデルの構築に成功したと考えられる。

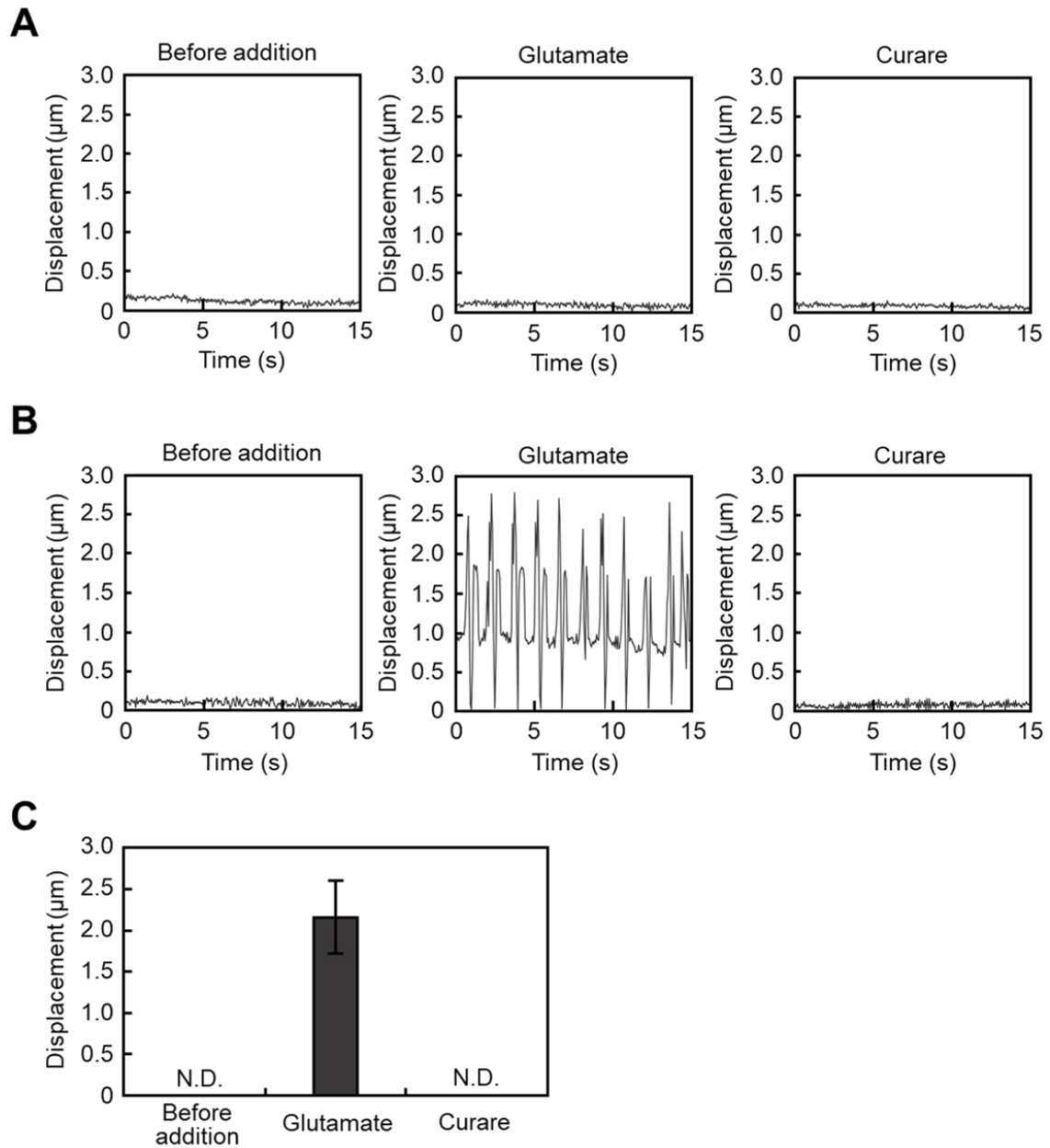


Figure 3-4. Evaluation of contractile activity for 2D myotubes. Contractile activity of C2C12-derived myotubes in mono-culture (A), or co-culture with i-MNs (B). (C) Quantitative analysis of the displacement of C2C12-derived myotubes co-cultured with i-MNs. N.D., not detected. For each condition, three myotubes were analyzed for measurement of myotubes displacement. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3).

3.2.4 本節のまとめ

i-MN と C2C12 細胞を共培養することで、i-MN の成熟が促されていた一方で、C2C12 細胞の筋分化と筋成熟は促進されなかった。また L-glutamate 添加による筋収縮および curare 添加による筋収縮の停止が見られたことから、平面での共培養において、i-MN と C2C12 細胞由来筋管との間に神経筋接合が形成されたと考えられる。これにより筋収縮を指標とした新たな平面培養における薬剤スクリーニング系が構築できたと考えられる。

3.3 i-MN と C2C12 細胞からなる複合三次元筋組織の構築

3.3.1 本節の目的

3.2 節では平面での i-MN と C2C12 細胞との間に神経筋接合が形成されたことが分かった。そこで本節では Mag-TE 法を利用して i-MN と C2C12 細胞からなる複合三次元筋組織を構築し、三次元組織においても神経筋接合が形成されるかについて検討した。

3.3.2 実験方法

(1) MCL の作製³⁷

粒子系 10 nm のマグネタイト (Fe_3O_4 ; Dai-ichi High Frequency) を 1 時間超音波処理することで分散マグネタイト溶液を得た。次にそれぞれクロロホルムに溶解した正電荷脂質である N-(α -trimethylammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride (TMAG) (NOF Corporation)、リン脂質である dilauroylphosphatidylcholine (DLPC) (NOF Corporation)、と dioleoylphosphatidyl-ethanolamine (DOPE) (NOF Corporation) を 1 : 2 : 2 で混合し、疎水性処理を施したナス型フラスコに加えた。フラスコ内壁に均

第3章 iPS 細胞由来運動神経細胞を用いた筋収縮モデルの構築

等に脂質膜が形成されるようにロータリーエバポレーターで吸気しながら、37°Cで1時間湯浴攪拌した。脂質膜形成後、10 mg/mL に調製した分散マグネタイト溶液を脂質膜が形成されたナス型フラスコに加え、15 分間ボルテックス攪拌することで、マグネタイトを脂質膜で包埋した MCL を作製した。最後に分散・滅菌処理のため、1 時間超音波により処理した。

(2) Mag-TE 法を利用した人工筋組織の作製^{23, 30-32, 38, 52}

Mag-TE 法により組織を作製するため、80%コンフルエントまで培養した C2C12 細胞を 100 pg/cells の濃度で MCL を加えた培地により 4 時間培養することで磁気標識した。組織 1 つにつき、0.3 % Type I collagen solution (Nitta Gelatin) 56 μ L、10 \times DMEM (1) 7 μ L、再構成溶液 (0.05 N NaOH 溶液 100 mL に対して、NaHCO₃ 2.2 g、HEPES 4.77 g を溶解した溶液) 7 μ L、Matrigel (Corning) 15 μ L、細胞溶液 (C2C12 細胞増殖用培地に C2C12 細胞 1.0×10^6 cells/tissue と i-MN $0.2\text{--}2.0 \times 10^6$ cells/tissue を混合) 50 μ L の割合で混合した混合溶液を調製した。調製は全て氷上で行った。事前に低接着 24 well plate (Corning) の well の中心に直径 11 mm のポリカーボネート製円柱をグリースにより固定しておき、1 well あたり混合溶液 150 μ L をポリカーボネート製円柱と well 壁面の隙間に播種した。播種した細胞を 0.4 T の磁石の上に置き、5 分間 37°C でインキュベート後、C2C12 細胞増殖用培地を 1 mL 加え、再度 37°C でインキュベートした。12 時間後、ポリカーボネートに巻き付いた環状筋組織を取り外し、虫ピン (Siga) を用いて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 に設置した。また虫ピン同士の感覚は 1 cm とした。その後、培養は運動神経分化誘導培地から RA と purmorphamine を除いた培地と、C2C12 増殖培地の血清を 0.4% Ultrosor G (Pall) に置き換えた培地を 1:1 で混合した培地にて 5% CO₂ インキュベーター内で 7 日間行った。

(3) 三次元筋組織の染色

筋管上の AChR を染色するため、組織作製 7 日目に 2 $\mu\text{g/ml}$ Alexa Fluor 647-conjugated bungarotoxin (Termo Fisher Scientific) を培地に加え、1 時間、37°C でインキュベートした。その後、4% PFA にて室温で 15 分間反応させて固定した。次に組織を 1×PBS にて 3 回洗浄後、0.2% TritonX-100 溶液に室温で 15 分間インキュベートし、膜透過処理を行った。再度 1×PBS で 3 回洗浄し、1×PBS に BSA を加えた 1% BSA 溶液を使用して、室温で 30 分間インキュベートしブロッキングした。次に 1% BSA 溶液に抗 HB9 抗体 5 $\mu\text{g/ml}$ 、抗 α -actinin 抗体を 1/1000 の濃度で調製した溶液に交換し 24 時間 4°C でインキュベートした。24 時間後、1×PBS で 3 回洗浄し、1% BSA 溶液で濃度を 1:1000 で調製した 2 次抗体 Alexa Fluor 488 (green)、Alexa Fluor 546 (red) 入り溶液、を加え 45 分間インキュベートした。3 回 1×PBS で洗浄後、1×PBS を加え、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) にて観察した。

(4) 三次元筋組織の収縮力測定^{23, 30-32, 28, 52}

4 lane 培養プレート (Nalgen Nunc International) に DMEM (1) を観察用培地として加えた後、人工筋組織を設置した。次に筋組織を固定していた虫ピンを一つ取り外し、張力変換機の先に設置した虫ピンに固定した。その後、LabView ソフトウェア (National Instruments) を用いて収縮力応答の解析を行った。次に 800 μM L-glutamate を添加して、1 分後に前述と同様に収縮力応答の解析を行った。L-glutamate 添加後に収縮力を測定した組織に対して、1.2 mM curare 添加し、5 分後に再度収縮力応答を解析した。

(5) 統計解析

統計解析はマンホイットニー順位和検定を用いて行い、 $P < 0.05$ の時、有意差がある

と判断した。

3.3.3 実験結果と考察

(1) i-MN と C2C12 細胞の最適な細胞混合比の検討

初めに、Mag-TE 法を利用した三次元筋組織作製における i-MN と C2C12 細胞の最適な細胞混合比を決定するため、組織 1 つあたりに含まれる C2C12 細胞の数を 1×10^6 cells/tissue で固定しながら、i-MN を $1.0, 1.5, 2.0 \times 10^6$ cells/tissue で混合した複合三次元筋組織を作製し、各条件の自発収縮力を評価した (Fig.3-5)。C2C12 細胞からなる筋組織と比較して、i-MN を加えることで自発収縮力が有意に向上しており、 1.5×10^6 cells/tissue 以上 i-MN が含まれている条件で収縮力が一定となった。これは i-MN の混合数が増加することで神経支配を受ける筋管が増え、それに伴い自発収縮力が増大したものと考えられる。そこでこれ以降の実験では C2C12 細胞と i-MN の細胞数をそれぞれ $1.0, 1.5 \times 10^6$ cells/tissue で組織を作製した。

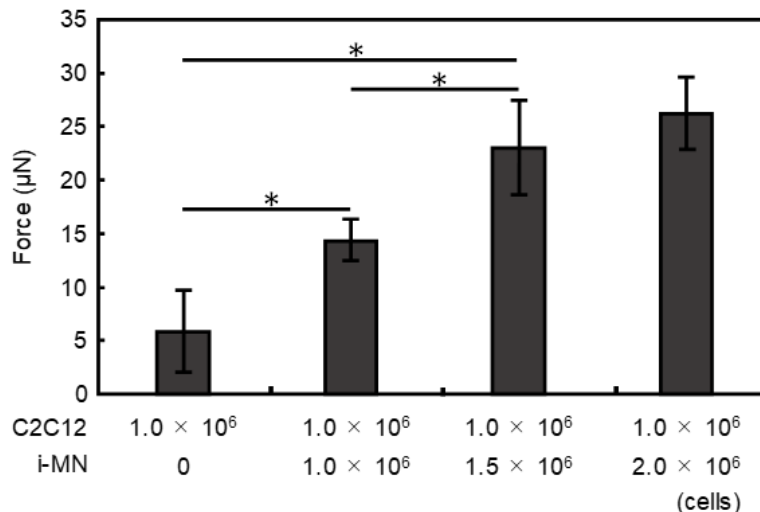


Figure 3-5. Effects of co-culturing with i-MNs on contractile force spontaneously generated by 3D muscle tissues. Co-cultured tissues were constructed by using various number of C2C12 cells and i-MNs, and the contractile force spontaneously generated by 3D muscle tissues were measured by using a force transducer. Data are expressed as means \pm SD (n=3).

*P < 0.05.

(2) 三次元筋組織の形態学的観察

神経筋接合部の特徴として、運動神経細胞のシナプスから放出された agrin により筋管上で AChR が集積することが知られている^{7,8}。i-MN を含む複合三次元筋組織において、神経筋接合部における筋管上の AChR が集積しているかを調べるために、AChR、i-MN、筋管の三重染色を行った (Fig. 3-6)。AChR の染色にはへび毒の一種である α -bungarotoxin (α -BTx) を使用した。C2C12 細胞のみからなる三次元筋組織では AChR の集積は見られなかった。一方で、i-MN を含む複合三次元筋組織では、i-MN と筋管が接している部分において AChR が集積している様子が観察された。この結果より、Mag-TE 法により作製された複合三次元筋組織において、形態学的観点から神経筋接合が形成されたことが示唆された。

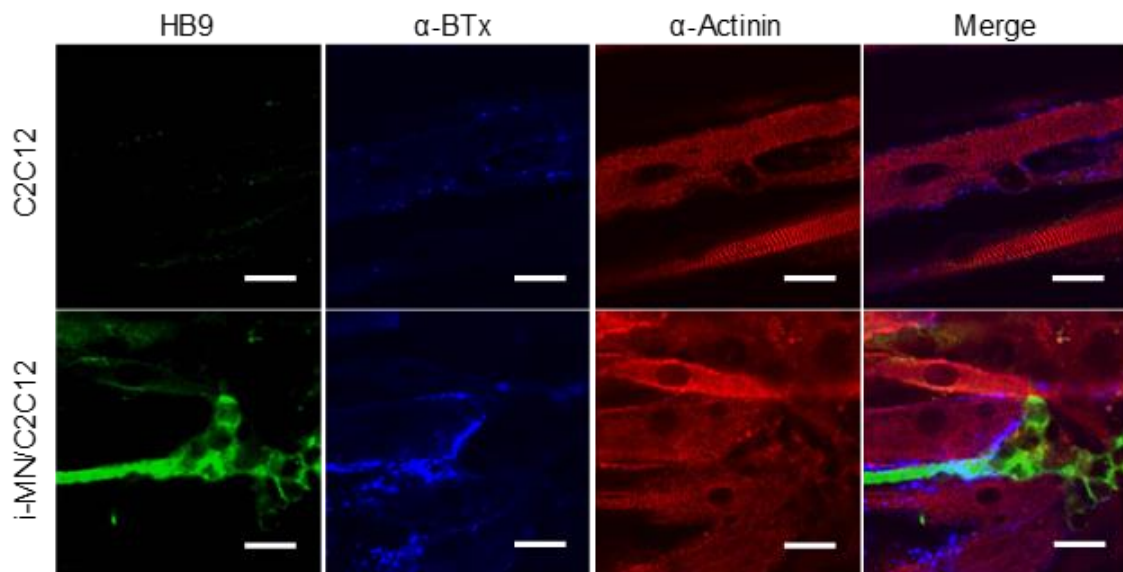
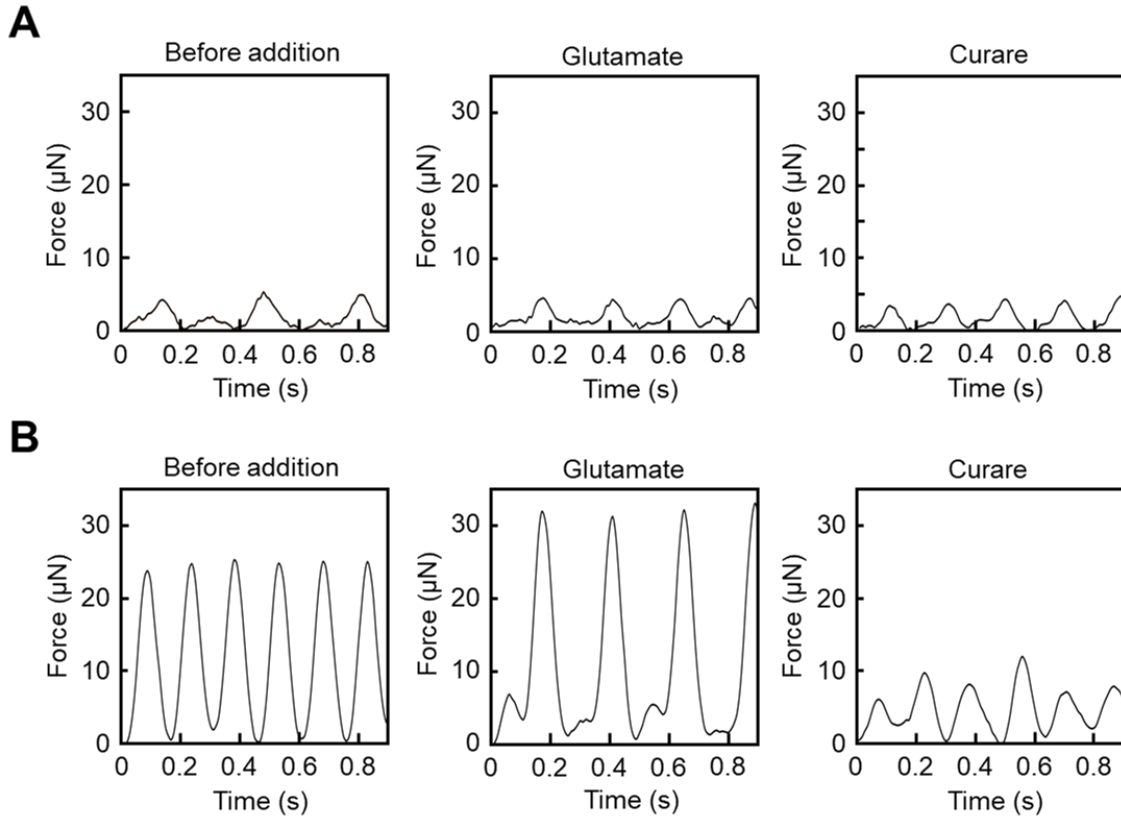


Figure 3-6. Immunohistological observation of 3D myotubes. Confocal laser microscopy of 3D muscle tissue constructs stained with anti-HB9 antibody (green, motor neuronal marker), α -BTx (blue, α -bungarotoxin, acetylcholine receptor marker), and anti- α -actinin antibody (red, myotube marker). Scale bars, 10 μ m.

(3) 三次元筋組織の収縮力評価

最後に複合三次元筋組織が神経筋接合を介した収縮応答を示すかを調べた (Fig. 3-7)。その結果、C2C12 細胞のみからなる三次元筋組織では L-gultamate や curare を添加に応じた収縮力の変化は見られなかった。また、i-MN を含む複合三次元筋組織では L-glutamate の添加に応じた収縮力が向上する傾向にあったものの、有意差は見られなかった。一方で、curare を添加することにより、C2C12 細胞のみからなる三次元筋組織と同程度のレベルまで自発収縮力が有意に低下した。これらの結果は i-MN を含む複合三次元筋組織において神経筋接合が形成されているものの、L-glutamate の添加に関わらず i-MN がアセチルコリンを放出している可能性を示唆している。この原因として培養培地として用いた構成成分が非公開となっている KSR 中に神経伝達物質が含まれており、三次元筋組織がゲルに包埋されているために神経伝達物質が組織内に残留し、自発収縮の向上に寄与したものと考えられる。



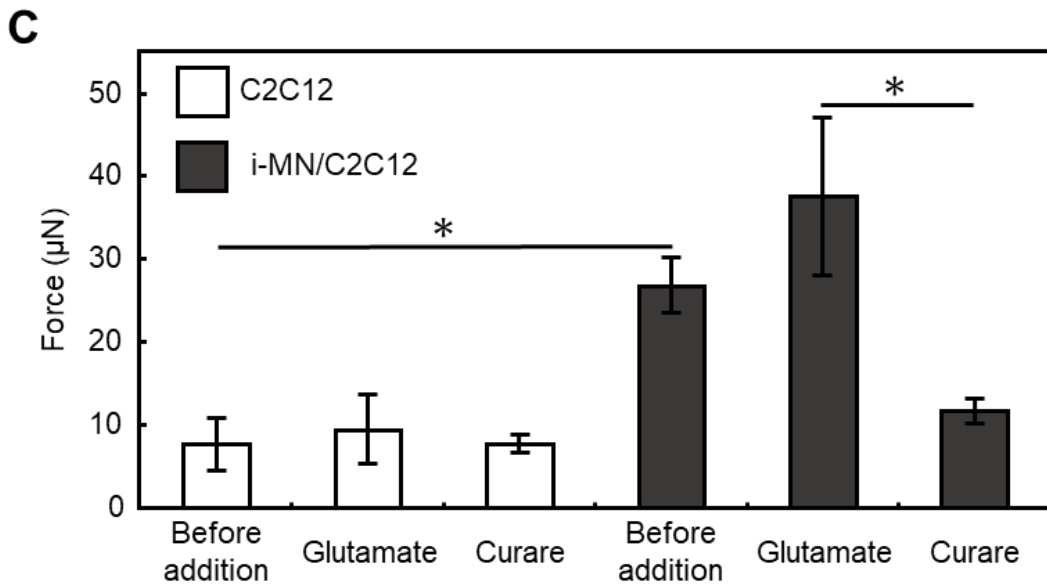


Figure 3-7. Evaluation of contractile force generation for 3D muscle tissue constructs. The contractile force levels generated by 3D muscle tissue constructs were measured using a force transducer. (A, B) Profiles of contractile forces generated by 3D myotubes in mono-culture (A) or co-culture with i-MNs (B). (C) Quantitative analysis of the contractile force levels generated by 3D myotubes. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). *P < 0.05.

3.3.4. 本節のまとめ

本節では i-MN と C2C12 細胞からなる複合三次元筋組織において神経筋接合が形成されるかを調べた。I-MN と C2C12 細胞由来筋管が接している部分において筋管上の AChR の集積が見られたことから、形態学的に神経筋接合が形成されたことが示唆された。また、L-gultamate や curare の添加に応じて収縮力の挙動が変化したことからも、複合三次元筋組織において神経筋接合が形成されているものと考えられる。

3.4 本章のまとめ

本章では初めに i-MN と C2C12 細胞を共培養した際に i-MN の形態に関しては神経成熟を示唆する様子が観察された一方で、筋管に対する影響は見られなかった。

第3章 iPS 細胞由来運動神経細胞を用いた筋収縮モデルの構築

神経成熟に関しては過去の報告と一致しており、BDNF 等の神経成長因子によるものと考えられる。

また、i-MN と C2C12 細胞を共培養することで、平面培養だけでなく三次元組織においても収縮挙動解析の結果から L-glutamate や curare に応答したため、神経筋接合が形成されたことが示唆された。これらの結果より、i-MN の機能を筋収縮活性によって評価可能な新しい筋収縮モデルの構築に成功した。

本章で作製した筋収縮モデルでは神経筋接合が形成されているため、ALS をはじめとする神経原性筋萎縮だけでなく、神経筋接合に異常が生じる疾患に対しての適応も可能であると考えられる。

第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

4.1 緒言

DMD は筋疾患の一つで、筋力が低下することで多くの患者が 30 代で死に至ってしまう病である¹⁶。DMD に対する効果的な治療法は未だに存在しない。DMD では 79 ものエキソンからなる巨大なタンパク質であるジストロフィン遺伝子のエキソンの一部に欠損や重複が生じ、正常なジストロフィンタンパク質が複製されない¹⁷。ジストロフィンが存在しないことにより、細胞死が誘導されるために DMD の筋萎縮という症状が引き起こされる。DMD の治療法確立のためのモデル動物として、mdx マウスが一般に用いられている。mdx マウスは DMD と同様にジストロフィン遺伝子が欠損しており、ジストロフィンタンパク質が複製されないという点で似ている⁴⁴。しかし、DMD と異なり、筋力の低下や寿命の減少などは見られないことから、DMD の病態を完全に模倣しているとはいえない。

近年では DMD 治療薬を探索するため、健常人由来 iPS 細胞から MyoD1 を遺伝子導入して筋芽細胞を作製した報告があり、この手法は DMD 患者由来 iPS 細胞だけでなく、DMD を CRISPR-Cas9 技術により治療した iPS 細胞にも応用されている^{46, 49}。しかし、これら iPS 細胞から分化誘導した筋管における電気刺激を印加した際の収縮挙動については未だ詳細には調べられていない。

これまでに当研究室では C2C12 細胞から分化誘導した筋管を電気刺激培養することで、収縮活性が向上することを報告している^{30, 58}。そこで本章では、健常人由来 iPS 細胞 (healthy-iPSc)、DMD 患者由来 iPS 細胞 (DMD-iPSc)、DMD を CRISPR-Cas9 技術により遺伝子修復した iPS 細胞 (Cri-iPSc) のそれぞれから筋管へと分化誘導し、電気刺激培養による収縮活性への影響を調べた。

4.2 RA 添加培養による iPS 細胞の筋分化効率の向上

4.2.1 本節の目的

筋管の機能を評価するためには、より多くの筋管を得る必要がある。そこで、本節では筋分化効率を促進する報告のあった RA を 3 種類の細胞株において添加培養することで、分化効率向上を試みた⁵⁹⁻⁶¹。

4.2.2 実験方法

(1)細胞培養

全ての細胞は京都大学の櫻井英俊 准教授と堀田秋津 博士より提供して頂いた。Healthy-iPSc は 409B2 株に対して puromycin 耐性遺伝子を有するテトラサイクリン誘導性 MyoD1 発現ベクターを導入することで作製された⁴⁶。DMD-iPSc はジストロフィン遺伝子のエクソン 44 が欠損している DMD 患者由来 iPS 細胞 (CiRA00111) に対して neomycin 耐性遺伝子を有するテトラサイクリン誘導性 MyoD1 発現ベクターを導入することで作製された⁴⁹。Cri-iPSc は CiRA00111 に対して CRISPR-Cas9 技術によりジストロフィン遺伝子のエクソン 44 を knock in した細胞 (CiRA00111-CKI-C2) に、neomycin 耐性遺伝子を有するテトラサイクリン誘導性 MyoD1 発現ベクターを導入することで作製された⁴⁹。

iPS 細胞を培養するために 6-well plate (Thermo Fisher Scientific) を $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ laminin 511-E8 (Nippi) で 37°C で 1 時間以上コートした。その後、iPS 細胞を 6.5×10^4 cells/well で laminin コートに対して播種し、Healthy-iPSc は Stem Fit AK02N (Ajinomoto Healthy Supply) に $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (MedChem Express)、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin (Thermo Fisher Scientific) を添加した培地により培養した。また、DMD-iPSc と Cri-iPSc は Stem Fit AK02N に $10 \mu\text{M}$ Y-27632 と $1 \text{ mg}/\text{ml}$ neomycin

第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

(Sigma-Aldrich)を添加した培地により培養した。それ以降は Stem Fit AK02N から Y-27632 を除いた培地により培養した。継代は iPS 細胞を accutase (Innovative Cell Technologies) で 10 分、37°C で処理することによりプレートから剥がし、 6.5×10^4 cells/well で laminin コートしたプレートに再播種した。全ての細胞は 37 °C、5 % CO₂、95 % air の CO₂ インキュベーターで培養した。

(2) 筋分化誘導⁴⁶

6 well-plate もしくは 35 mm dish (Greiner) を 50 倍希釈した matrigel growth factor reduced (Greiner) で 2 時間以上コート処理を施した。分化誘導 day 0 で healthy-iPSc、DMD-iPSc、Cri-iPSc をそれぞれ 3.0×10^5 , 5.0×10^4 , 1.0×10^5 cells/well でマトリゲルコートしたプレートに播種し、Stem Fit AK02N に 10 μ M Y-27632、0.1-10.0 μ M RA、と 0.5 μ g/ml puromycin もしくは 0.1 mg/ml neomycin を加えた培地により培養した。Day 1 で培地を Repro Stem (ReproCELL) に 0.1-10.0 μ M RA (Fujifilm Wako Pure Chemical)、と 0.5 μ g/ml puromycin もしくは 0.1 mg/ml neomycin を加えた培地に交換した。翌日、培地を Repro Stem に 0.1-10.0 μ M RA と 1.0 μ g/ml Dox (Sigma-Aldrich) を加えた培地により培養した。分化誘導 day 3 以降は α -Minimum Essential Medium Eagle (α -MEM: Invitrogen) に 5% KSR (Invitrogen)、0.1-10.0 μ M RA、1.0 μ g/ml Dox を添加した培地により、day 14 まで培養した。培地は毎日交換し、37 °C、5 % CO₂、95 % air の CO₂ インキュベーターで培養した。

(3) 免疫染色

Day 14 まで分化誘導を行った細胞を 4% PFA にて室温で 15 分間反応させて固定した。次に細胞を 1×PBS にて 3 回洗浄後、0.2% TritonX-100 溶液に室温で 15 分間インキュベートし、膜透過処理を行った。再度 1×PBS で 3 回洗浄し、1×PBS に BSA を加えた 1% BSA 溶液を使用して、室温で 30 分間インキュベートしブロッキング

第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

グした。また筋管の染色に関しては抗 α -actinin 抗体 (Sigma Aldrich) を 1/1000 濃度で 1% BSA 溶液に加え、1 時間室温でインキュベートした。その後、1×PBS で 3 回洗浄し、1% BSA 溶液で濃度を 1/1000 で調製した 2 次抗体 Alexa Fluor 488 (green) 入り溶液に DAPI を加え、45 分間インキュベートした。3 回 1×PBS で洗浄後、1×PBS を加え、BZ-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence) にて観察した。 α -actinin の陽性面積は 1 well につき 5 枚ずつ 3 well 分写真を撮影し、BZ-Analyzer ソフトウェア (Keyence) にて算出した。筋管の太さはそれぞれ撮影した写真から 1well につき 10 細胞ずつ 3 well 分を BZ-Analyzer ソフトウェアを用いて算出した。

(4) 統計解析

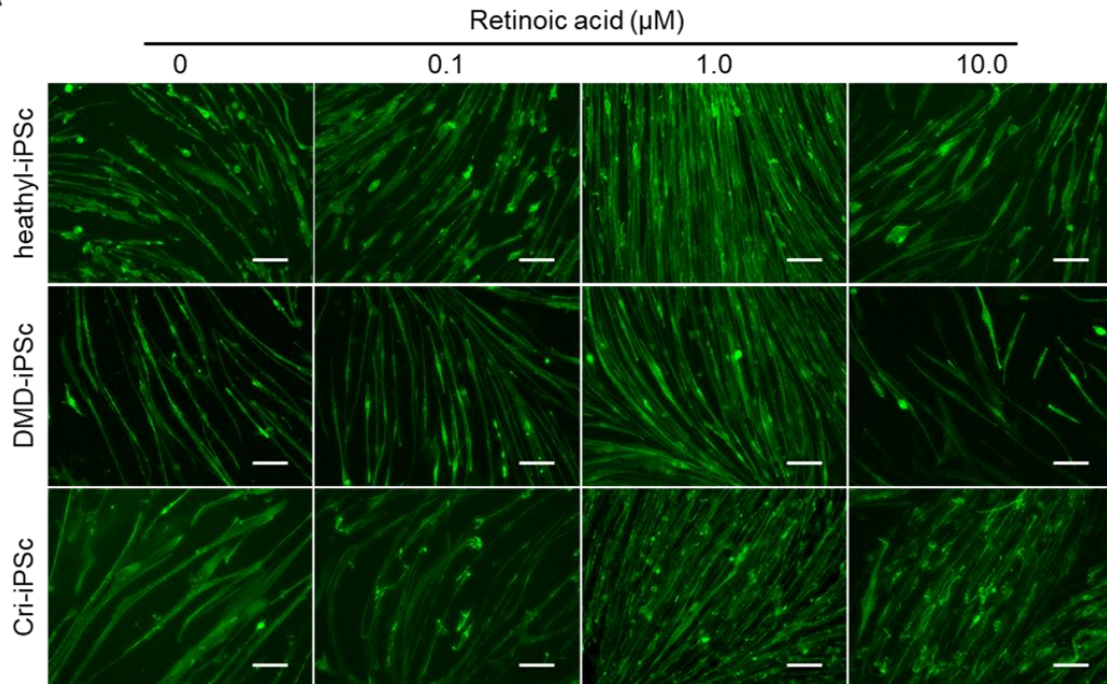
統計解析はマンホイットニー順位和検定を用いて行い、 $P < 0.05$ の時、有意差があると判断した。

4.2.3 実験結果と考察

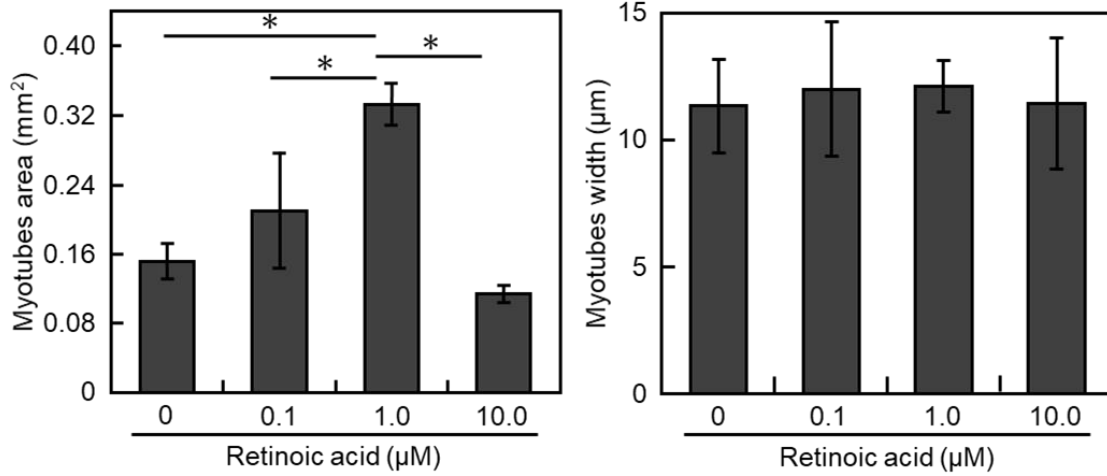
iPS 細胞から筋管への分化効率を向上させるため、RA の添加培養を行い、最適濃度の検討を行った。RA は筋分化の際に Pax3 等の発現を向上させることで筋分化に寄与する報告がある⁵⁹⁻⁶¹。Healthy-iPSc、DMD-iPSc、Cri-iPSc を分化誘導する際に 0.1、1.0、10.0 μ M RA を加えて培養し、筋管の形態学的観察を行うことで最適添加濃度を評価した。筋管の太さに関しては RA の添加培養の有無に関わらず、全ての細胞株において 12 μ m 程度で有意差は見られなかった (Fig. 4-1)。この結果より、RA は筋肥大のような筋成熟には影響しないと考えられる。一方で、筋管面積は 1.0 μ M RA を添加して培養した条件において全ての株で有意に上昇していた。筋管の太さが変わらず、面積が増大したことは筋管数の増大ひいては筋分化効率が向上したことを示唆している。これらの結果より、RA 添加培養は iPS 細胞の筋分化効率の向上に有用であることが示唆された。これ以降では、1.0 μ M RA を添加する条件で筋化誘導を行った。

第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

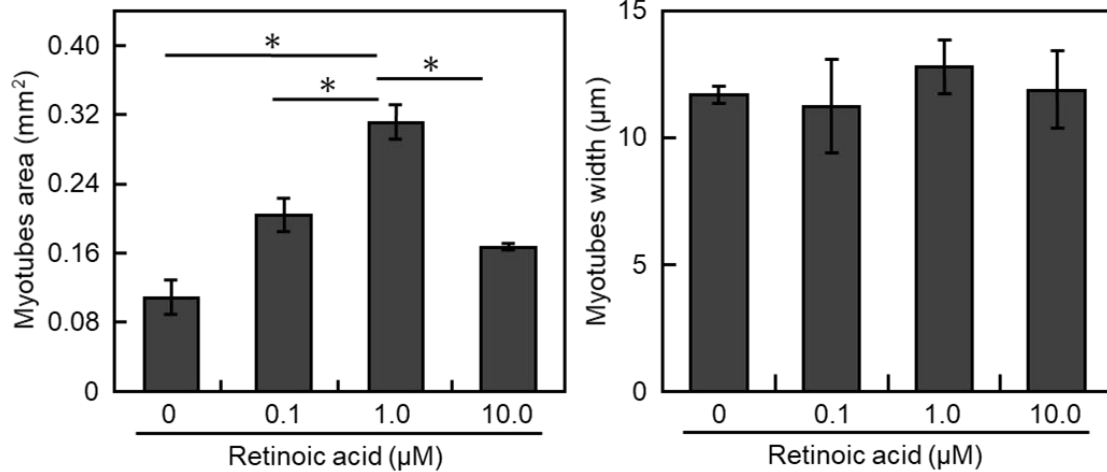
A



B



C



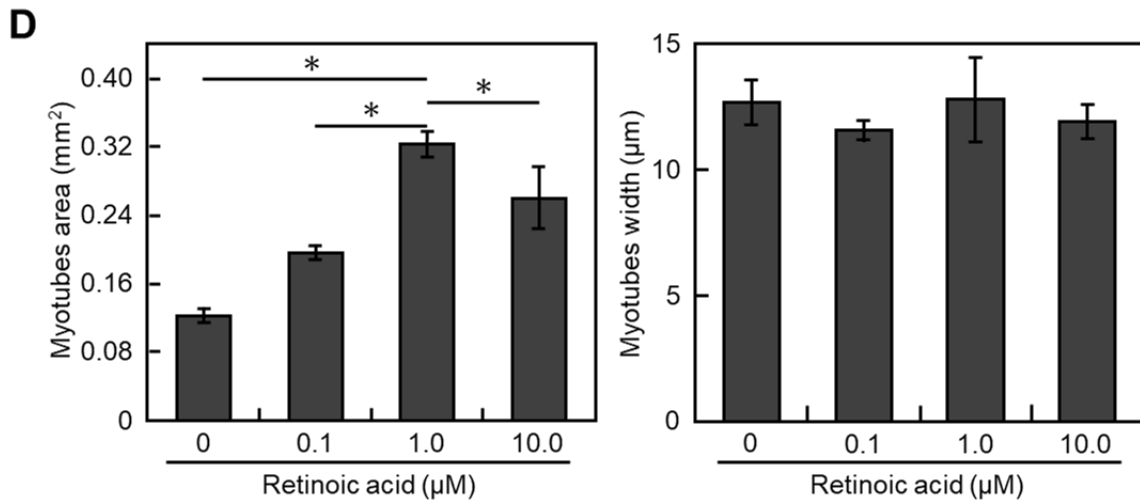


Figure 4-1. Morphological observation of iPS-derived myotubes with or without RA addition culture. (A) Fluorescence microscopy of cells immunostained with anti- α -actinin antibody. Scale bar, 100 μ m. Quantitative analysis of myotube area and myotubes width in (B) healthy-iPSc, (C) DMD-iPSc, (D) Cri-iPSc-derived myotubes, respectively. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). *P < 0.05.

4.2.4 本節のまとめ

iPS 細胞から筋管へと分化誘導をする際に RA を添加して培養することで、筋肥大は促進されなかったものの、筋管面積が有意に向上した。また、健常人由来の iPS 細胞だけでなく、DMD 患者由来 iPS 細胞、CRISPR-Cas9 により遺伝子修復を行った iPS 細胞においても同様の結果が得られたことから、ジストロフィン遺伝子の欠損に関わらず、RA 添加培養が筋分化効率の向上に有用であることが示唆された。

4.3 iPS 細胞由来筋管の電気刺激培養

4.3.1 本節の目的

これまでに株化細胞である C2C12 細胞由来の筋管などは電気刺激培養を行うことで、筋成熟が促進され、収縮活性が向上することが報告されている^{30, 58}。一方で、ヒト

第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

iPS 細胞から分化誘導した筋管に対して電気刺激培養を行った報告はない。そこで本節では 3 種の iPS 細胞から分化誘導した筋管においても同様に電気刺激培養を行うことで筋成熟が促進され、収縮活性が向上するかを調べた。

4.3.2 実験方法

(1) 電気刺激培養^{30,58}

4.2 節で示した方法で分化誘導した iPS 細胞由来筋管に対して、ファンクションジェネレーター (NF Corporation) からディッシュ上部に取り付けた C-Dish (IonOptix) を介して、印加電圧 0.17 or 0.30 V/mm、パルス幅 4 ms、周波数 1 Hz の条件で分化誘導 day 7 から day 14 まで電気刺激培養を行った。

(2) 収縮挙動解析

Day 14 まで分化誘導を行った細胞に対して、ファンクションジェネレーター (NF Corporation) からディッシュ上部に取り付けた C-Dish (IonOptix) を介して、印加電圧 0.30 V/mm、パルス幅 4 ms、周波数 1Hz の条件で電気刺激を与え、その様子を BZ-9000 蛍光顕微鏡により各条件 3 視野分、3 dish ずつ動画撮影した。収縮幅は各条件において最も動いている 3 本の筋管を 3 dish 分ずつ motion analyzer によって解析した。また収縮割合に関しては各条件で 1 視野当たり 16 本の筋管を無作為に選び、選んだ筋管の収縮の有無を観察することで評価した。

(3) アポトーシスの解析⁶²

細胞を 4.2 節に示す方法で免疫染色後、ディッシュをヒートカッターで切断して底面部分だけを取り出し、氷上で permeabilisation buffer (Takara Bio) で 5 分間処理した。

第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

その後、1×PBS で 3 回洗浄し、TdT enzyme (Takara Bio) と labeling safe buffer (Takara Bio) を 1 : 9 で混合した溶液を用いて 37°C、1 時間処理した。その後、1×PBS で 3 回洗浄し、BZ-9000 蛍光顕微鏡により観察を行った。アポトーシスの評価は 1 dish につき 3 枚ずつ 3 dish 分写真を撮影し、 α -actinin 陽性面積内における総核数 (DAPI 陽性) に対する TUNEL-陽性細胞数を算出した。

(4) Ca^{2+} キレート剤および Bax inhibitor の添加培養

4.2 節 2 項 (2) に示す方法で 0.30 V/mm の電圧で電気刺激培養している細胞に対して、分化誘導 day 9 に Ca^{2+} キレート剤である Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) (Dojindo Laboratories) を 1、2、4、8、16 mM の濃度で添加し、24 時間培養した⁶³。その後、4.3 節 2 項 (3) に示す方法でアポトーシスの評価を行った。

また、上述と同様に電気刺激培養している細胞に対して、分化誘導 day 9 から Bax inhibitor peptide V5 (Bax inhibitor: Med Chem Express LLC) を 0.1、1.0、10.0 μM 濃度で添加培養し、分化誘導 day 14 で筋収縮活性およびアポトーシス解析をそれぞれ、4.3 節 2 項 (2) および 4.3 節 2 項 (3) に示す方法で行った⁶⁴。

(5) 統計解析

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

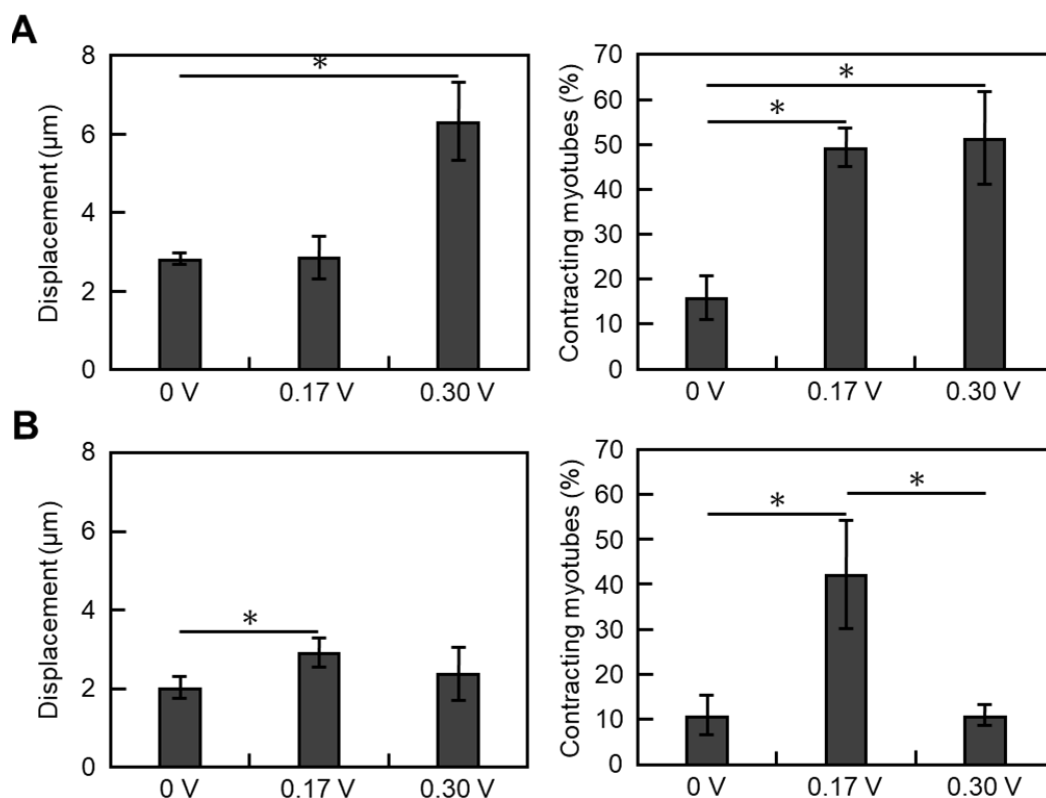
4.3.3 実験結果と考察

(1) 電気刺激培養による iPS 細胞由来筋管の収縮活性への影響

収縮機能を有する筋管へと筋成熟を促すために、3 種類の iPS 細胞から分化誘導

第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

した筋管に対して電気刺激培養を行った。電気刺激条件は以前報告されている C2C12 細胞に対する電気刺激条件を参考に、0.17 V/mm と 0.30 V/mm の 2 条件で電気刺激培養を行った³⁰ (Fig. 4-2)。Healthy-iPSc 由来筋管の収縮幅が 0.30 V/mm と強い電圧を加えた条件において有意に上昇しており、筋管の収縮割合は 0.17 V/mm と弱い電圧条件から有意に上昇していた。また Cri-iPSc 由来筋管においては Healthy-iPSc 由来筋管と同様に収縮幅が 0.30 V/mm で有意に向上しており、収縮割合は 0.17 V/mm から有意に上昇していた。一方で DMD-iPSc 由来の筋管では筋管の収縮幅と収縮割合のどちらも弱い電圧を加えた条件で有意に向上していたものの、強い電圧を加えた条件では収縮活性は向上していなかった。これらの結果は電気刺激培養が iPS 細胞由来の筋管に対しても筋成熟や筋収縮活性の向上に有用であることを示している。また DMD-iPSc 由来の筋管が強い電圧による電気刺激培養では収縮活性が向上しなかったのに対し、Cri-PSc 由来の筋管において収縮活性が向上したことは遺伝子修復がジストロフィン発現の回復だけでなく、筋機能の回復に対しても有用であることを示唆している。また、強い電圧条件では DMD-iPSc 由来筋管に対して何らかのダメージが加わることで、収縮活性が低下していると考えられる。



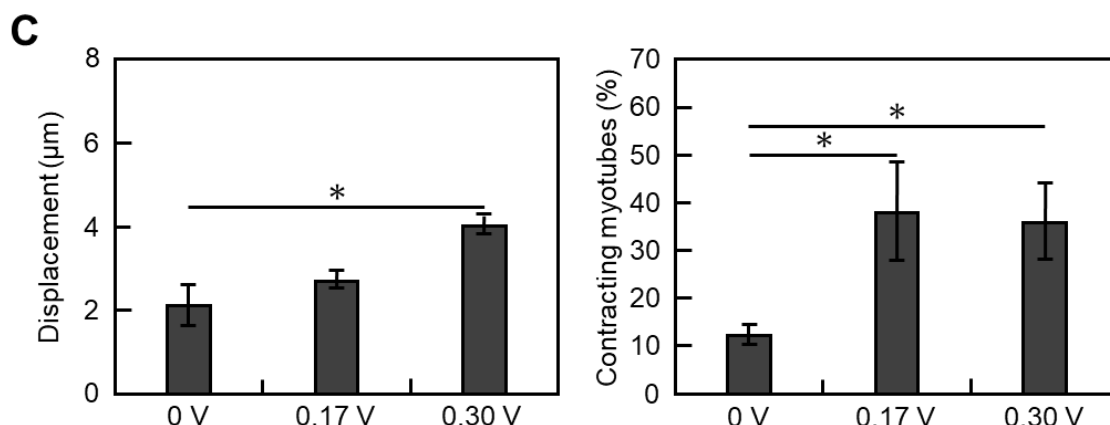


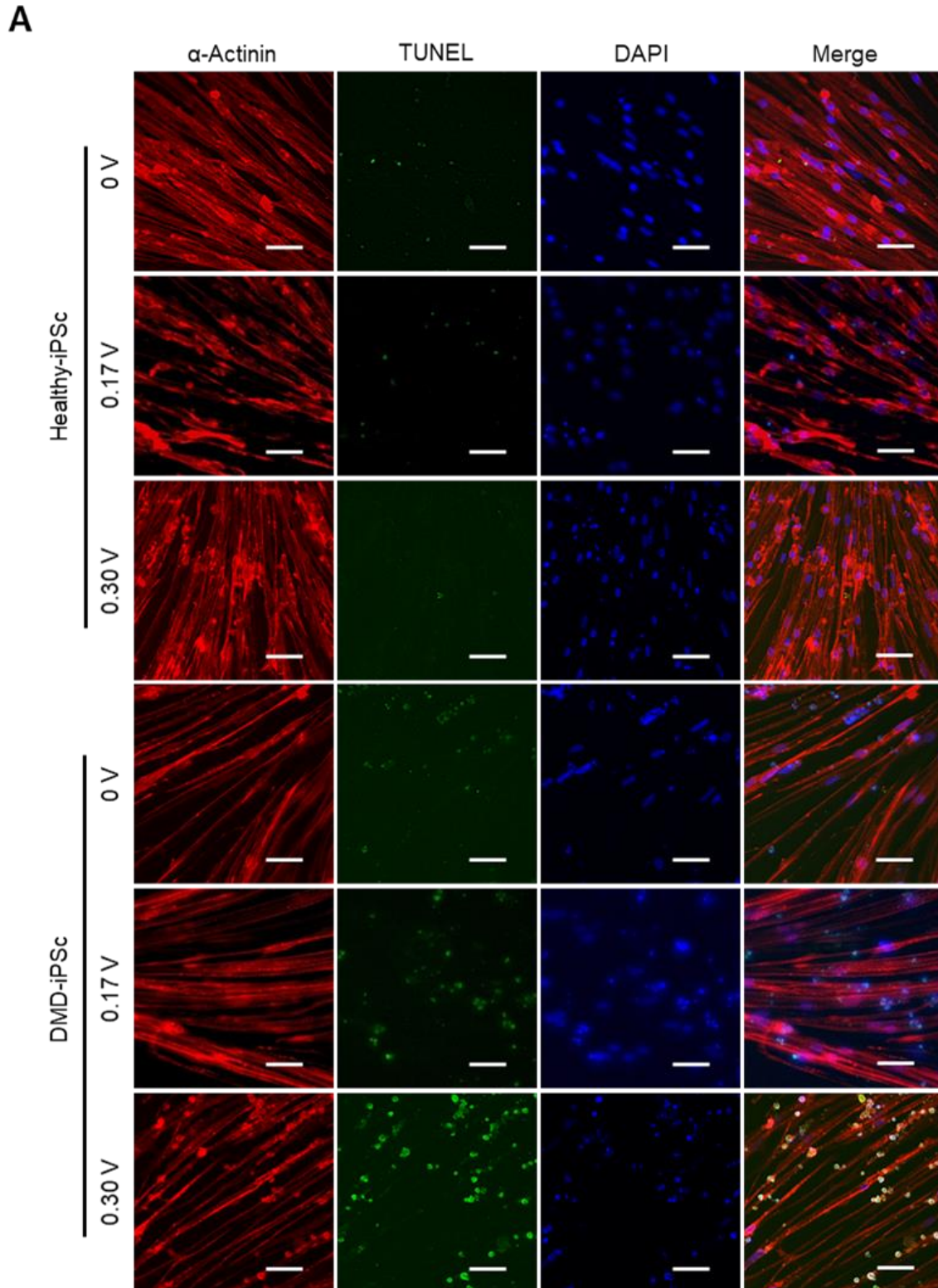
Figure 4-2. Contractile activity of iPSc-derived myotubes with EPS culture (voltage, 0.17 or 0.30 V/mm, 4ms, 1Hz). Quantitative analysis of (A) healthy-iPSc or (B) DMD-iPSc or (C) Cri-iPSc derived-myotubes displacement and contractile rate. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). *P < 0.05.

(2) 電気刺激培養による DMD-iPSc のアポトーシス誘導

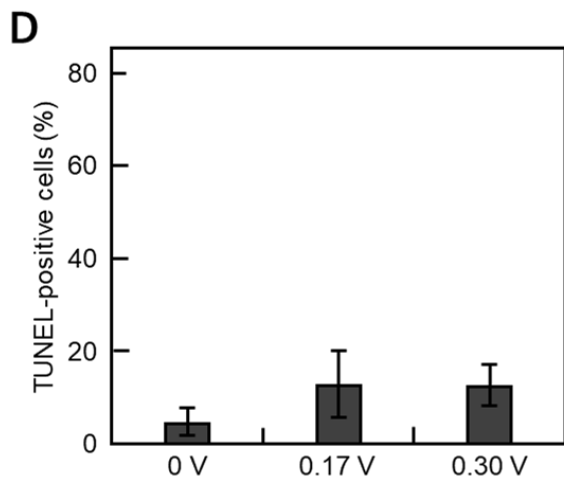
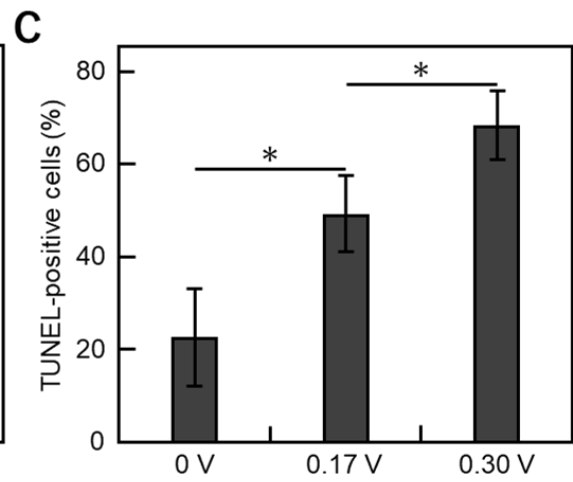
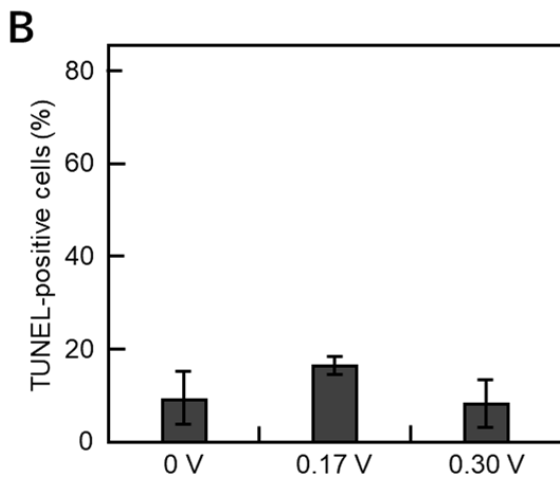
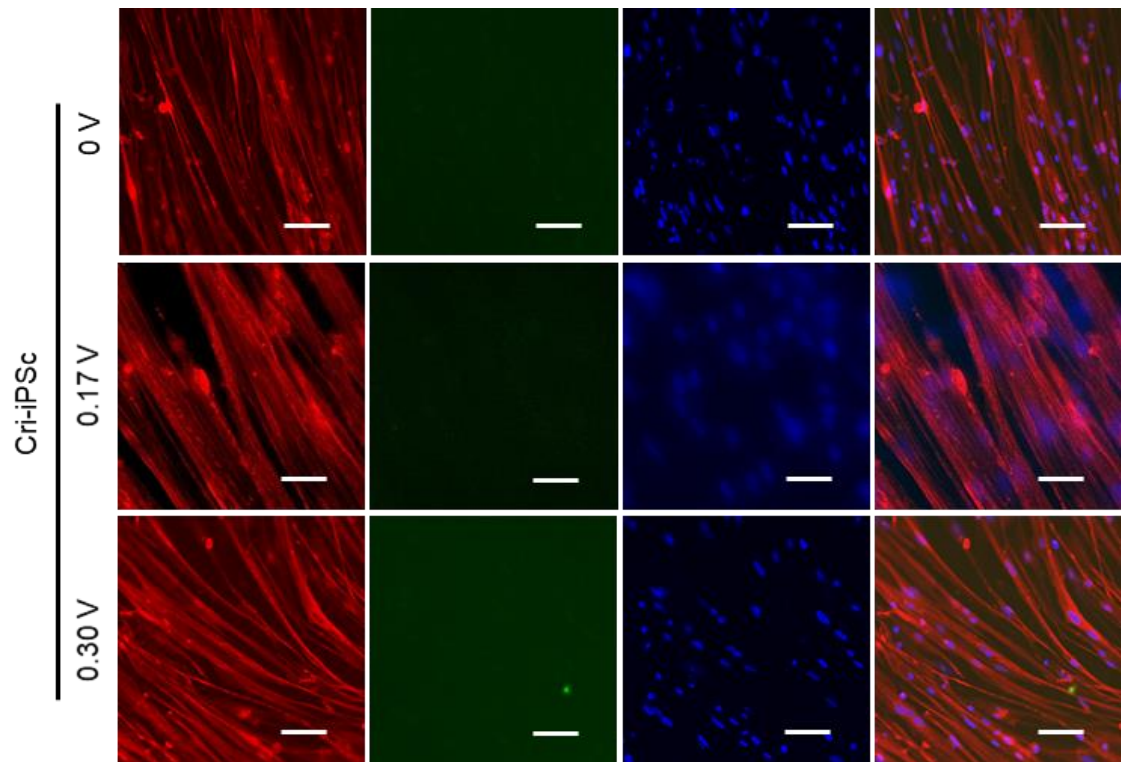
前述のように、healthy-iPSc と Cri-iPSc 由来筋管の収縮活性が強い電圧による電気刺激培養で向上したにもかかわらず、DMD-iPSc 由来筋管の収縮活性が向上しなかった原因を調べた。我々はこの原因として、電気刺激培養により DMD-iPSc 由来の筋管において収縮活性が向上した筋管のアポトーシスが誘導されているため、解析の際には収縮活性の向上が見られないのではないかと考えた。そこで 3 つの細胞株において 0.30 V/mm の条件で電気刺激培養を行った後のアポトーシスを TUNEL 法によって調べた⁶²。その結果、Healthy-iPSc と Cri-iPSc においては電気刺激培養の有無、電圧の強弱に関わらず、TUNEL 陽性細胞の割合が 20%未満で有意な差は見られなかった (Fig. 4-3)。しかし、DMD-iPSc では電気刺激培養をしていない条件で 22.6 \pm 10.5%だった TUNEL 陽性細胞の割合が、0.17 V/mm の電気刺激培養では 49.2 \pm 8.3%と上昇しており、0.30 V/mm で電気刺激培養した条件では 68.3 \pm 7.4%と弱い電圧条件と比較しても有意に上昇していた。この結果は、DMD-iPSc 由来の筋管が

第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

電気刺激培養により収縮活性が向上しない原因には、強い電圧の電気刺激培養によるアポトーシス誘導が関与していることを示唆している。



第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築



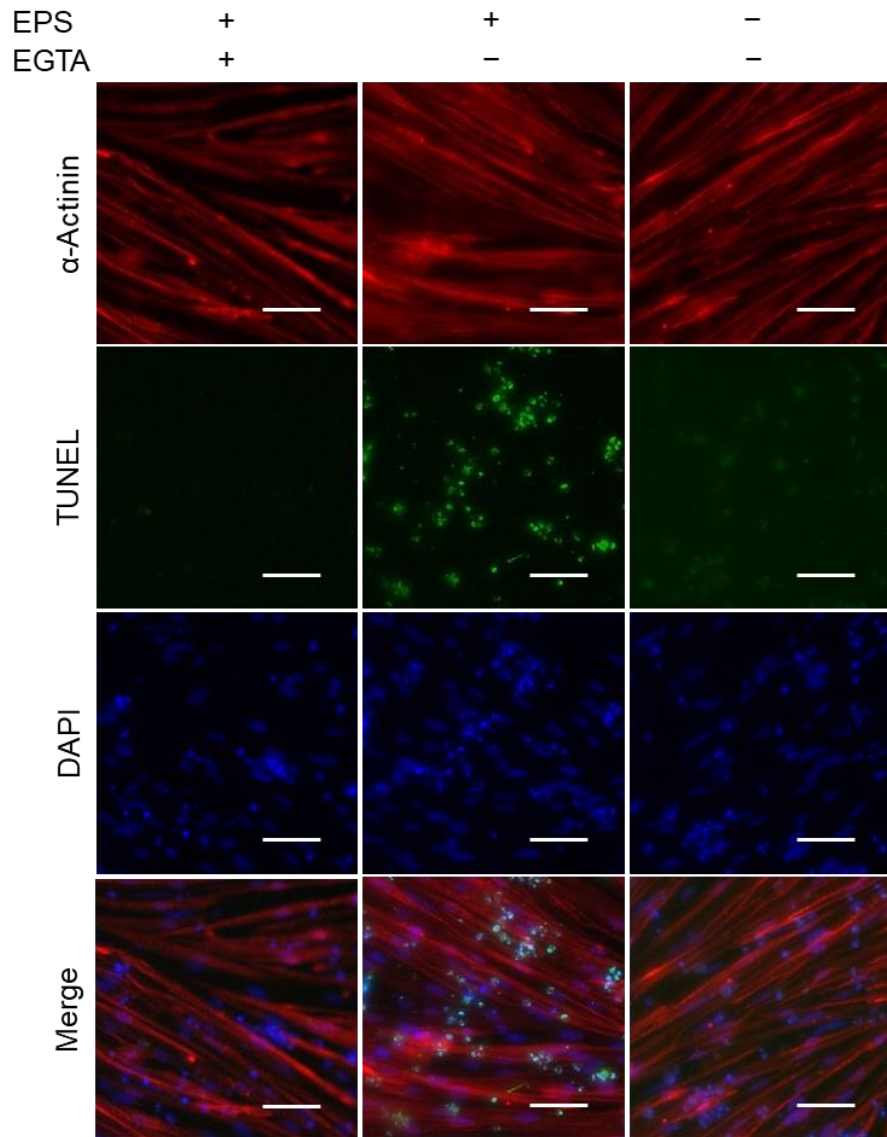
第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

Figure 4-3. Morphological observation of iPS-derived myotubes using EPS culture of 0.17 or 0.30V/mm, 4ms and 1Hz. (A) Fluorescence microscopy of cells immunostained with anti- α -actinin antibody (red) and DAPI (blue). In addition, apoptotic cells were stained by TUNEL assay (green). Scale bar is 50 μ m. Quantitative analysis of TUNEL-positive myotubes derived from (B) healthy-iPSc or (C) DMD-iPSc or (D) Cri-iPSc in each EPS culture conditions. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). *P < 0.05.

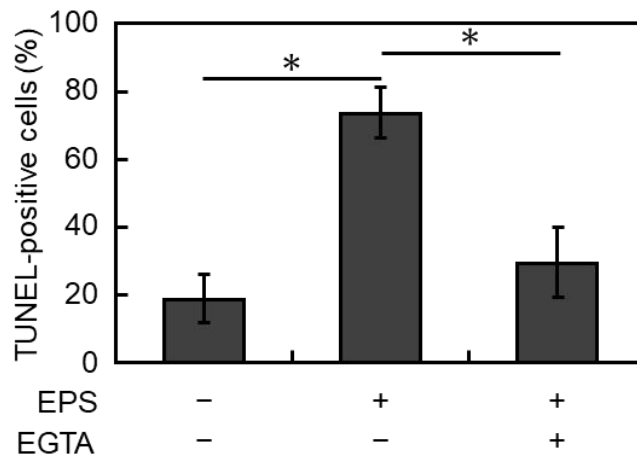
(3) Ca^{2+} キレート剤によるアポトーシスの抑制

次に DMD-iPSc 由来筋管におけるアポトーシスの原因を調べた。DMD の病態の原因として細胞膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンの欠損により、細胞への Ca^{2+} の過剰な流入を制御できなくなるために細胞死が引き起こされると考えられている¹⁹。そこで我々は電気刺激培養下の DMD-iPSc から分化誘導した筋管でも同様に Ca^{2+} の過流入が起きているのではないかと考えた。そのため、電気刺激培養時に培地中の Ca^{2+} をキレート剤 (EGTA) によってキレートすれば、筋管のアポトーシスが抑制されるのではないかと予想し、実験を行った⁶³。初めに 0.30 V/mm の電気刺激培養を day 7 から始めて、どのタイミングで細胞死が始まるのかを調べるために、day 8, 10, 12, 14 で経時的に TUNEL 法により細胞死を観察した。その結果、day 8 では TUNEL 陽性細胞はあまり見られなかった一方で、day 10 より細胞死が引き起こされた細胞が多く見られた (data not shown)。そこで day 7 から電気刺激培養している DMD-iPSc 由来の筋管に対して day 9 に 1 mM EGTA を添加し、24 時間後に TUNEL 法によりアポトーシスを観察した (Fig. 4-4)。その結果、EGTA を添加していない条件と比較して EGTA を添加することで、電気刺激培養を行わない条件と同程度までアポトーシスが抑制されていた。これにより DMD-iPSc 由来筋管の電気刺激培養におけるアポトーシスには Ca^{2+} が大きく関与していることが示唆された。

A



B



第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

Figure 4-4. Morphological observation of DMD-iPS-derived myotubes using EPS culture of 0.30V/mm, 4ms and 1Hz with or without EGTA. (A) Fluorescence microscopy of cells immunostained with anti- α -actinin antibody (red) and DAPI (blue). In addition, apoptotic cells were stained by TUNEL assay (green). Scale bar is 75 μ m. (B) Quantitative analysis of TUNEL-positive cells in each EPS culture conditions. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). *P < 0.05.

(4) Bax inhibitor によるアポトーシスの抑制および筋収縮活性の向上

前述の結果より、電気刺激培養によるアポトーシスは Ca^{2+} 依存であることが明らかになった。アポトーシス経路において Ca^{2+} がミトコンドリアに蓄積されると、ミトコンドリア膜透過性遷移孔が開放される。それによりミトコンドリアからシトクロム C が放出されることで、アポトーシスが引き起こされる⁶⁵。そこで我々はミトコンドリアへの Ca^{2+} の取り込みを促進する Bax を阻害することでアポトーシスが抑制できると考え、実験を行った⁶⁶。0.30 V/mm で電気刺激培養している DMD-iPSc の分化誘導 day 9 に Bax inhibitor を 0.1、1.0、10.0 μ M の濃度で添加培養し、分化誘導 day 14 で収縮活性とアポトーシスを評価した (Fig. 4-5、6)。その結果、Bax inhibitor 非添加条件では $1.83 \pm 0.17 \mu$ m だった筋管の収縮幅が 0.1、1.0 μ M Bax inhibitor の濃度で添加培養した条件ではそれぞれ 2.67 ± 0.15 、 $2.76 \pm 0.17 \mu$ m と有意に上昇していた。また筋管の収縮割合も非添加条件では $9.0 \pm 2.4\%$ だったが、0.1、1.0 μ M Bax inhibitor の濃度で添加培養した条件ではそれぞれ 32.6 ± 4.8 、 $36.8 \pm 1.2\%$ と有意に上昇していた。また TUNEL 陽性細胞の割合も非添加条件では $66.4 \pm 4.5\%$ だったが、0.1、1.0 μ M の濃度で添加培養した条件でそれぞれ 42.5 ± 6.6 、 $51.2 \pm 7.2\%$ と有意に減少していた。これらの結果は Bax inhibitor の添加が電気刺激により誘発された DMD-iPSc 由来筋管のアポトーシスを抑制し、筋収縮活性が向上したことを示唆している。

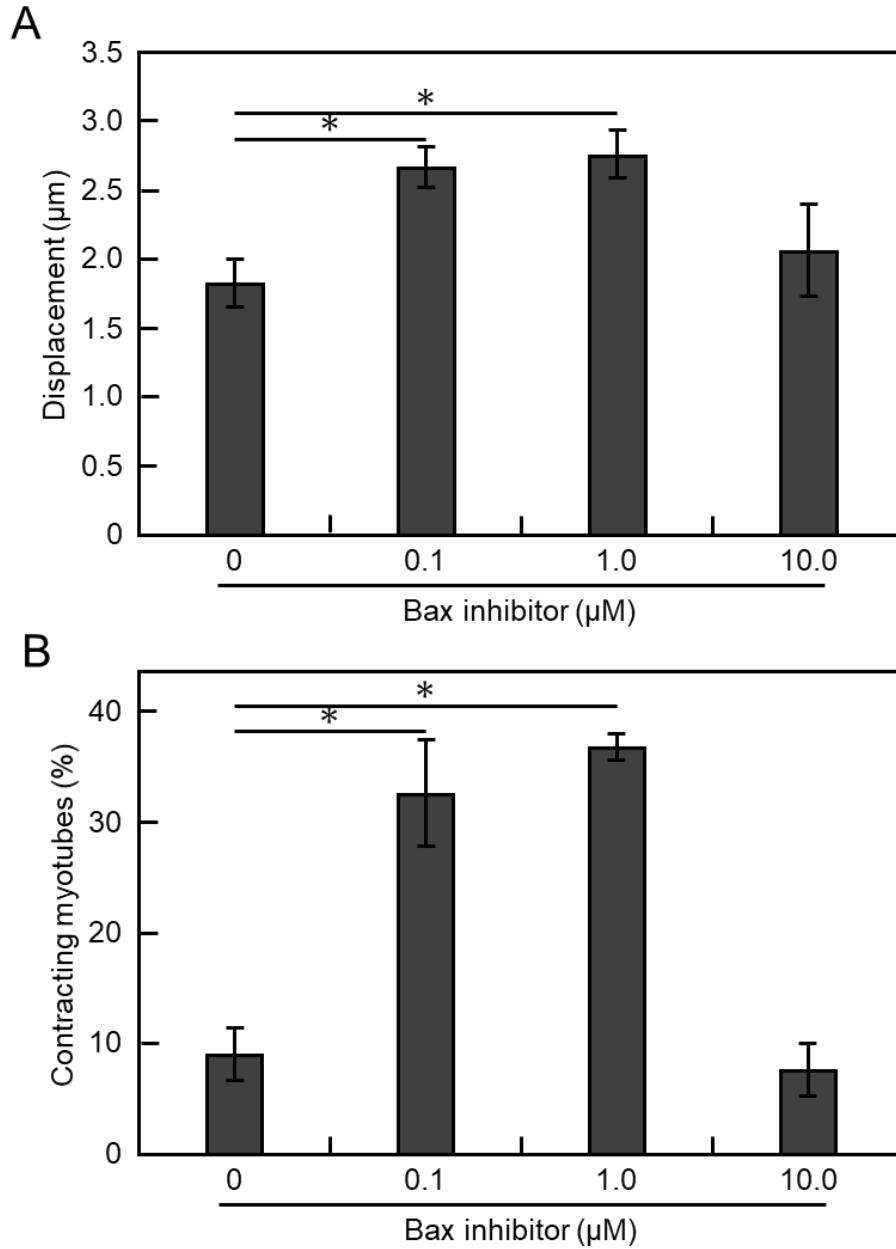


Figure 4-5. Contractile activity of DMD-iPSc-derived myotubes with 0.1, 1.0, 10.0 μM bax inhibitor. (A) Quantitative analysis of iPSc-derived myotubes displacement, (B) contractile rate. Data are expressed as the mean ± SD (n=3). *P < 0.05.

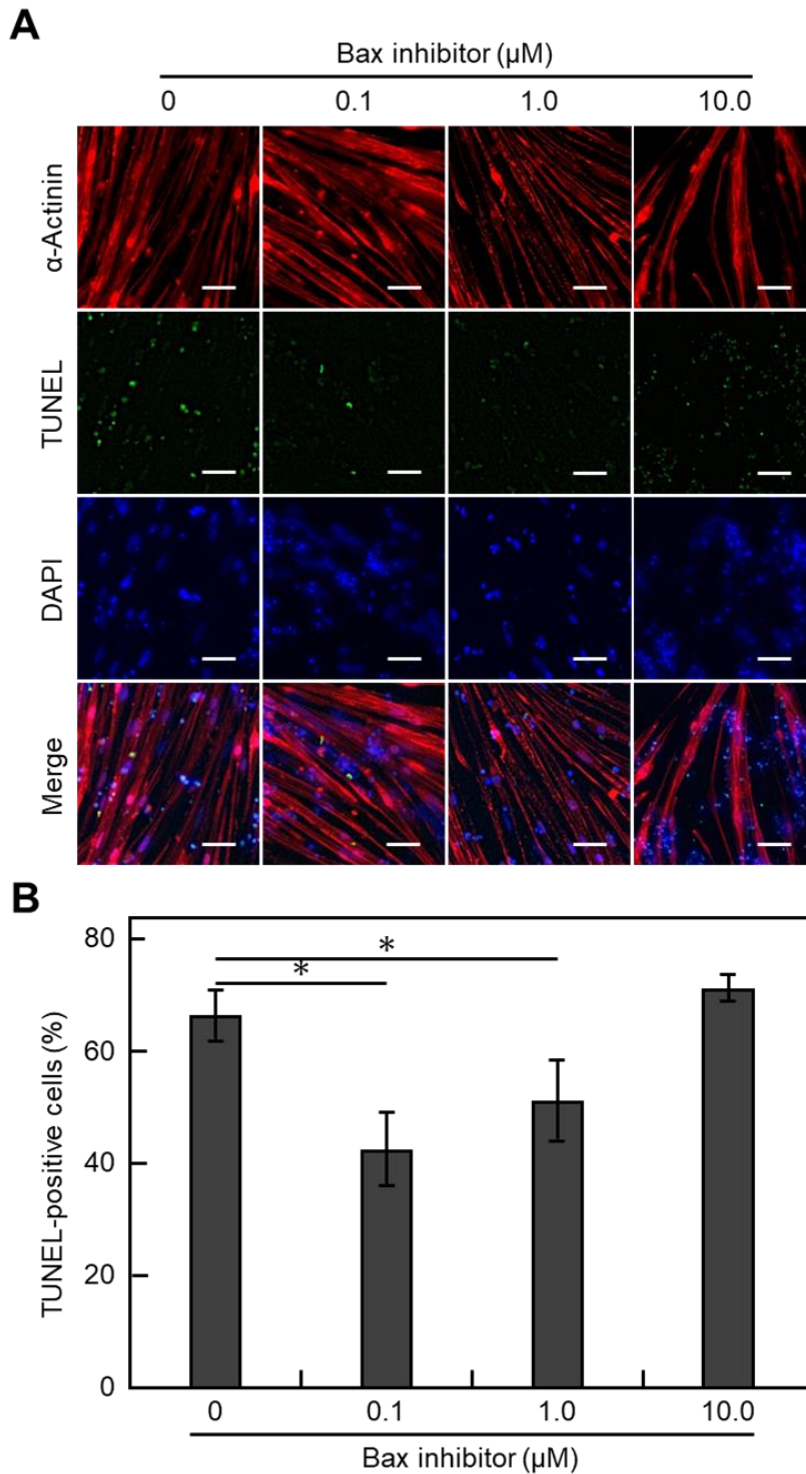


Figure 4-6. Morphological observation of iPS-derived myotubes using EPS culture of 0.17 or 0.30V/mm, 4ms and 1Hz. (A) Fluorescence microscopy of cells immunostained with anti- α -actinin antibody (red) and DAPI (blue). In addition, apoptotic cells were stained by TUNEL assay (green). Scale bar is 50 μm . (B) Quantitative analysis of TUNEL-positive cells in each EPS culture conditions. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). *P < 0.05.

4.3.4 本節のまとめ

本節では 0.30 V/mm の条件の電気刺激培養により healthy-iPSc および Cri-iPSc 由来の筋管の収縮活性が向上した。しかし、DMD-iPSc 由来筋管は 0.17 V/mm の電圧での電気刺激培養では筋収縮活性が向上したものの、0.3 V/mm の電圧では向上しなかった。また DMD-iPSc 由来の筋管の収縮活性が向上しない原因として電気刺激培養でアポトーシスが誘導されているためであるという可能性を TUNEL 法により示した。さらにそのアポトーシスの原因として Ca^{2+} のキレート剤を用いることで、 Ca^{2+} の流入が寄与していることが示唆された。最後に Ca^{2+} 依存性のアポトーシスに関わる Bax の働きを Bax inhibitor により阻害することで、DMD-iPSc 由来筋管においてアポトーシスが抑制されただけでなく、収縮活性も向上した。

4.4 本章のまとめ

本章では初めに RA を添加培養することで healthy-iPSc、DMD-iPSc、Cri-iPSc の筋管への分化効率が向上することを示した。これは今後 iPS 細胞由来筋管を用いた研究において役立つことが期待される。

また電気刺激培養により ヒト iPS 細胞由来筋管の収縮活性が向上した。これは株化細胞である C2C12 細胞に対する電気刺激培養が筋成熟に対して有効であることと同様にヒト iPS 細胞由来の筋管に対しても有効であることを示している。また DMD 患者由来 iPS 細胞から分化した筋管が強い電圧に対して収縮活性が向上せず、アポトーシスを生じたのに対し、CRISPR-Cas9 技術を用いて遺伝子修復した細胞株由来の筋管では、健常人由来の細胞株と同様に収縮活性が向上し、筋管のアポトーシスが見られなかった。この結果より、DMD に対する遺伝子修復が筋機能を回復させるためにも有用な方法であることが示唆された。

また、DMD 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した筋管において強い電圧でアポトーシスが生じた原因として、 Ca^{2+} が関係していることを Ca^{2+} キレート剤である EGTA を用

第4章 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築

いることで明らかにした。さらに、 Ca^{2+} 依存性のアポトーシスを抑制できる **Bax inhibitor** を添加培養することでアポトーシスを抑制できただけでなく、筋機能の回復が見られた。これらの結果より、収縮活性を指標として、DMD-iPSc の機能だけでなく遺伝子修復や薬剤による機能回復を評価できたことから、薬剤スクリーニング等に利用可能な患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルの構築に成功したと考えられる。既往の研究として、DMD 以外の筋疾患患者から iPS 細胞を作製した例も報告されており、それらの細胞を今回作製した筋収縮モデルに適用することで、様々な筋疾患に対する薬剤スクリーニングへの応用が期待できる^{44,47}。

第 5 章 マイクロデバイスを用いた筋収縮モデルの構築

5.1 緒言

薬剤スクリーニングにおいて、3R (replacement、reduction、refinement) の観点から実験動物をその他の実験方法に置き換えることが求められている。実際に iPS 細胞の樹立以来、病態モデルである実験動物から、患者由来の iPS 細胞を使用することで置き換えることが徐々に可能になっている^{26, 27}。このように、病気のフェノタイプを細胞で再現することが可能になった一方で、生体を三次元的に再現することも求められている。特に筋疾患に関する薬剤スクリーニングにおいては筋芽細胞から筋管への分化率や筋管の太さと、筋管の収縮活性に相関がないことを我々は報告しており、Mag-TE 法により作製した三次元筋組織を使用した薬剤スクリーニング系の構築に成功している²³。しかし既存の Mag-TE 法では三次元筋組織の構築や収縮力の測定が煩雑であり、薬剤スクリーニングに適したハイスループット性の高く、より簡便な組織作製法が必要である。

近年では前述の問題点を解決するためにマイクロデバイスを利用したマイクロ三次元筋組織を利用した薬剤スクリーニングが報告されている^{39, 67}。このマイクロデバイスは 96 well plate で培養できるため、従来の筋収縮モデルと比べ、ハイスループット性が高い。そこで本研究ではマイクロデバイスと Mag-TE 法を組み合わせることでマイクロ三次元筋組織を構築し、収縮活性を指標とした薬剤スクリーニング系の構築を目指した。

5.2. マイクロデバイスを用いた C2C12 細胞由来マイクロ筋組織の構築

5.2.1 本節の目的

前述のように既往の研究でマイクロデバイスを利用した三次元筋組織の構築は報告されているが、磁力を利用したマイクロ筋組織の作製は報告されていない。そこで本節

第 5 章 マイクロデバイスを用いた三次元筋組織の構築

ではマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いて、Mag-TE 法をマイクロデバイスに対して適用し、磁力を利用したマイクロ組織の作製を試みた。

5.2.2 実験方法

(1) 細胞培養

C2C12 細胞 (ATCC) の培養には増殖培地として DMEM (1) に 56°C、30 分で非動化した FBS、5.96 mg/ml HEPES、3.7 mg/ml 炭酸水素ナトリウム、0.05 mM ペニシリン G カリウム、50 µg/ml ストレプトマイシン硫酸塩を加えたものを用いた。細胞は 37 °C、5 % CO₂、95 % air の CO₂ インキュベーターで培養した。

(2) MCL の作製³⁷

粒子系 10 nm のマグネタイト (Fe₃O₄) を 1 時間超音波処理することで分散マグネタイト溶液を得た。次にそれぞれクロロホルムに溶解した TMAG、DLPC と DOPE を 1 : 2 : 2 で混合し、疎水性処理を施したナス型フラスコに加えた。フラスコ内壁に均等に脂質膜が形成されるようにロータリーエバポレーターで吸気しながら、37°C で 1 時間湯浴攪拌した。脂質膜形成後、10 mg/mL に調製した分散マグネタイト溶液を脂質膜が形成されたナス型フラスコに加え、15 分間ボルテックス攪拌することで、マグネタイトを脂質膜で包埋した MCL を作製した。最後に分散・滅菌処理のため、1 時間超音波により処理した。

(3) Mag-TE 法を利用したマイクロ人工筋組織の作製^{23, 30-32, 38, 39, 52}

マイクロ人工筋組織作製に用いる PDMS デバイスは名古屋大学の清水一憲 准教授に作製して頂いた。Mag-TE 法により組織を作製するため、80%コンフルエントまで

第 5 章 マイクロデバイスを用いた三次元筋組織の構築

培養した C2C12 細胞を 100 pg/cells の濃度で MCL を加えた培地により 4 時間培養することで磁気標識した。組織 1 つにつき、0.3 % Type I collagen solution (Nitta Gelatin) 3.0 μL 、10 \times DMEM (1) 0.4 μL 、再構成溶液 0.4 μL 、Matrigel (Corning) 3 μL 、細胞溶液 (C2C12 細胞増殖用培地に C2C12 細胞 0.75、1.5、3.0 $\times 10^5$ cells/tissue) 13.2 μL の割合で混合した混合溶液を調製した。調製は全て氷上で行った。事前に、96 well plate (Thermo) の well に PDMS デバイスをグリースにより固定しておき、磁石上に鉄シートを設置した物を下に敷いた。次に 1 well あたり混合溶液 20 μL を PDMS デバイス上に播種した。播種した細胞を磁石の上に置き、30 分間 37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベート後、DMEM (1) に 0.4 % Ultrosor G、0.05 mM ペニシリン G カリウム、50 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン硫酸塩を加えた培地を加え、再度 37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。その後、毎日培地交換を行い、5% CO_2 インキュベーター内で 7 日間培養した。

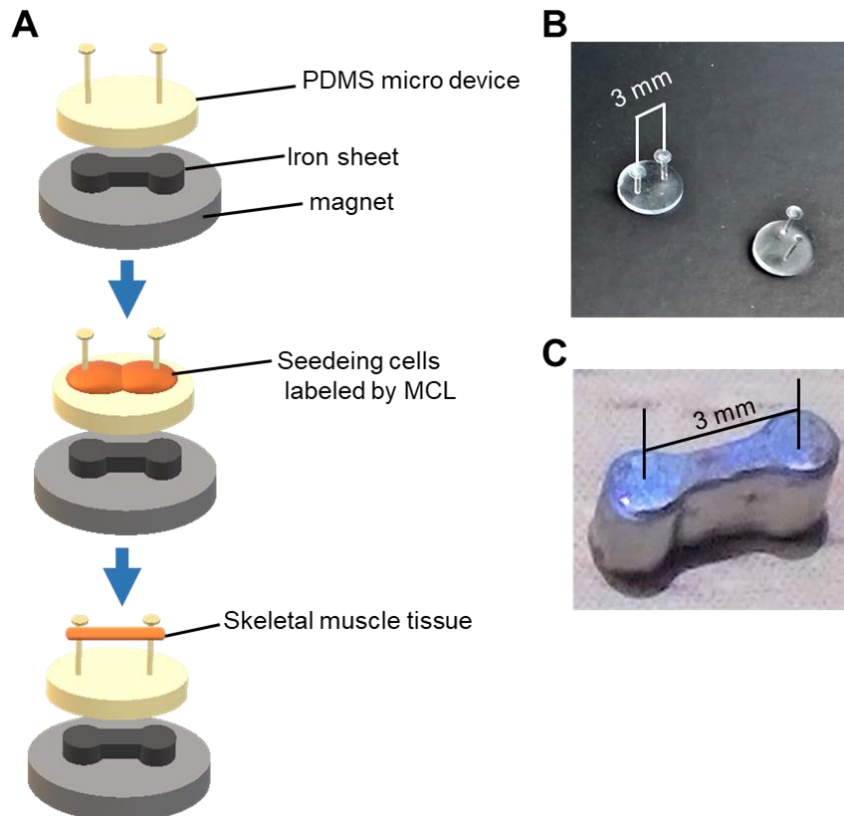


Figure 5-1. (A) Fabrication of micro skeletal muscle tissue by Mag-TE method. (B) PDMS micro device, (C) iron sheet.

(4) 平面培養における C2C12 細胞由来筋管に対するモデル薬剤の添加培養

C2C12 細胞を 35 mm ディッシュに 3.0×10^4 cells/well で播種し、C2C12 増殖培地にてコンフルエントになるまで培養した。その後、C2C12 増殖培地の血清を 2% 仔牛血清に置き換えた培地にて培地交換を行った。4 日後、testosterone を 0.01、0.1、1.0 μM あるいは dexamethasone を 0.01、0.1、1.0 mM の濃度で添加し、3 日間培養した。毎日培地交換を行い、5% CO_2 インキュベーター内で 7 日間培養した²³。

(5) マイクロ組織に対するモデル薬剤の添加培養

5.2 節 2 項 (2) に示す方法でマイクロ組織を作製して 4 日後、testosterone を 0.1 μM あるいは dexamethasone を 1.0 mM の濃度で添加し、3 日間培養した。毎日培地交換を行い、5% CO_2 インキュベーター内で 7 日間培養した。

(6) 収縮挙動解析

平面で 7 日間分化誘導した C2C12 細胞由来の筋管に対して、ファンクションジェネレーターからディッシュ上部に取り付けた C-Dish から、印加電圧 0.3 V/mm、パルス幅 4 ms、周波数 1Hz の条件で電気刺激を与え、その様子を BZ-9000 蛍光顕微鏡により各条件 3 視野分、3 dish ずつ動画を撮影した。収縮幅は各条件において最も動いている 3 本の筋管を 3 dish 分ずつ motion analyzer によって解析した。

7 日間培養したマイクロ筋組織を PDMS デバイスごと 35 mm ディッシュに移し、ファンクションジェネレーターからディッシュ上部に取り付けた C-Dish を介して、印加電圧 0.3 V/mm、パルス幅 4 ms、周波数 1Hz の条件で電気刺激を与え、その様子を BZ-9000 蛍光顕微鏡により動画撮影した。収縮幅は motion analyzer によって解析し次に示す式を用いて収縮力として算出した^{39,67}。

$$F = \frac{3\pi ER^4\delta}{4L^3}$$

$\left(\begin{array}{l} E: \text{elastic modulus (1.7 MN/m}^2\text{)} \\ R: \text{radius of a micro post (0.5 mm)} \\ \delta: \text{musdcle tissue displacement (\mu m)} \\ L: \text{length of a micro post (4 mm)} \end{array} \right)$

(7) 免疫染色

Day 7 まで分化誘導を行った細胞を 4% PFA にて室温で 15 分間反応させて固定した。次に細胞を 1×PBS にて 3 回洗浄後、0.2% TritonX-100 溶液に室温で 15 分間インキュベートし、膜透過処理を行った。再度 1×PBS で 3 回洗浄し、1×PBS に BSA を加えた 1% BSA 溶液を使用して、室温で 30 分間インキュベートしブロッキングした。また筋管の染色に関しては抗 α -actinin 抗体を 1/1000 濃度で 1% BSA 溶液に加え、1 時間室温でインキュベートした。その後、1×PBS で 3 回洗浄し、1% BSA 溶液で濃度を 1/1000 で調製した 2 次抗体 Alexa Fluor 546 (red) 入り溶液に DAPI を加え、45 分間インキュベートした。3 回 1×PBS で洗浄後、1×PBS を加え、BZ-9000 蛍光顕微鏡にて観察した。筋分化効率は 1 dish につき 5 枚ずつ 3 dish 分写真を撮影し、BZ-Analyzer ソフトウェアにて算出した。筋管の太さはそれぞれ撮影した写真から 1well につき 10 細胞ずつ 3 well 分を BZ-Analyzer ソフトウェアを用いて算出した。

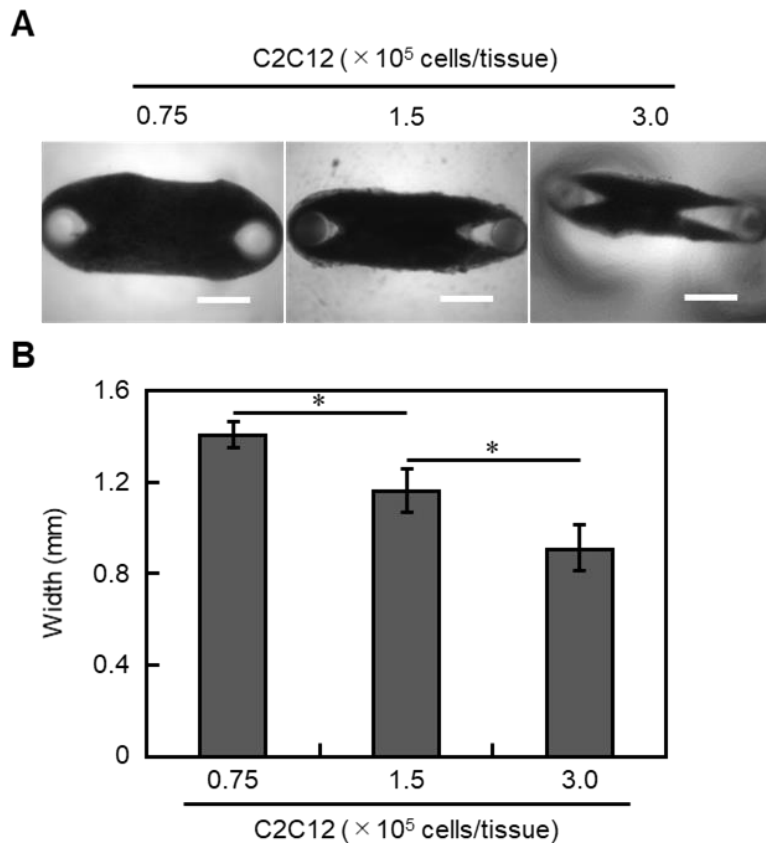
(8) 統計解析

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

5.2.3 実験結果と考察

(1) C2C12 細胞由来マイクロ筋組織の最適細胞数の検討

初めにマイクロ組織を作製に最適な細胞数の検討をするため、 0.75 、 1.5 、 3.0×10^5 cells/tissue の条件で組織を作製し、デバイスの上部から撮影した画像より、組織体の太さ（縦方向の幅）を測定した（Fig. 5-2A、B）。その結果、細胞数が増加するごとに組織の縦幅が細くなっていた。これは細胞数が多い条件では、細胞が磁力によって高密度に堆積した後、細胞-細胞間相互作用が強まることで、組織が収縮していく力が増大し、細胞が高度に密集した組織体が形成されたためと考えられる。加えて、今回作製した筋組織はゲルに包埋されていることから、細胞が組織体の外部に漏出する可能性は低く、細胞数が多い条件では多層化していることが予想される。また、収縮力を測定したところ 1.5×10^5 cells/tissue 以上の条件で収縮力が一定となった（Fig. 5-2C）。そこでこれ以降の実験では 1.5×10^5 cells/tissue の条件でマイクロ組織を作製した。



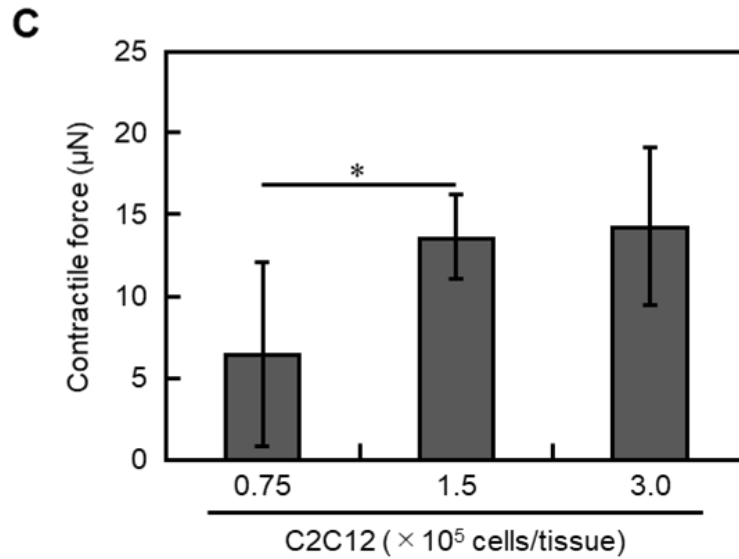


Figure 5-2. Optimization of seeding cell density (0.75, 1.5 or 3.0×10^5 cells/tissue) onto the micro device. (A) Phase contrast image of micro skeletal muscle tissue. Scale bar is 800 μm . Quantitative analysis of width (B), contractile force (C) of micro skeletal muscle tissue. Data are expressed as the mean \pm SD (n=5). *P < 0.05.

(2) Mag-TE によるマイクロ組織の収縮力の向上

次に Mag-TE 法を利用して作製したマイクロ組織の有用性を調べるために、磁石の有無により組織の作製を試みた。MCL を取り込ませた C2C12 細胞をマイクロデバイスに対して播種し、その後、マイクロデバイスを磁石上において培養した条件と、磁石を使用せずに培養した条件の 2 条件で培養し、作製から 7 日後に収縮力を測定した (Fig. 5-3)。磁石を下に敷き作製した組織は、磁石を使用せず作製した組織と比較すると、組織の太さが細くなっていた。また、磁石を使用することでマイクロ組織の収縮力も 2 倍程度強くなっていた。これは、磁石を使用して Mag-TE 法により組織を作製することで、細胞密度が高くなり、細胞融合による筋分化が促進されたことでマイクロ組織の収縮力が向上したと考えられる。

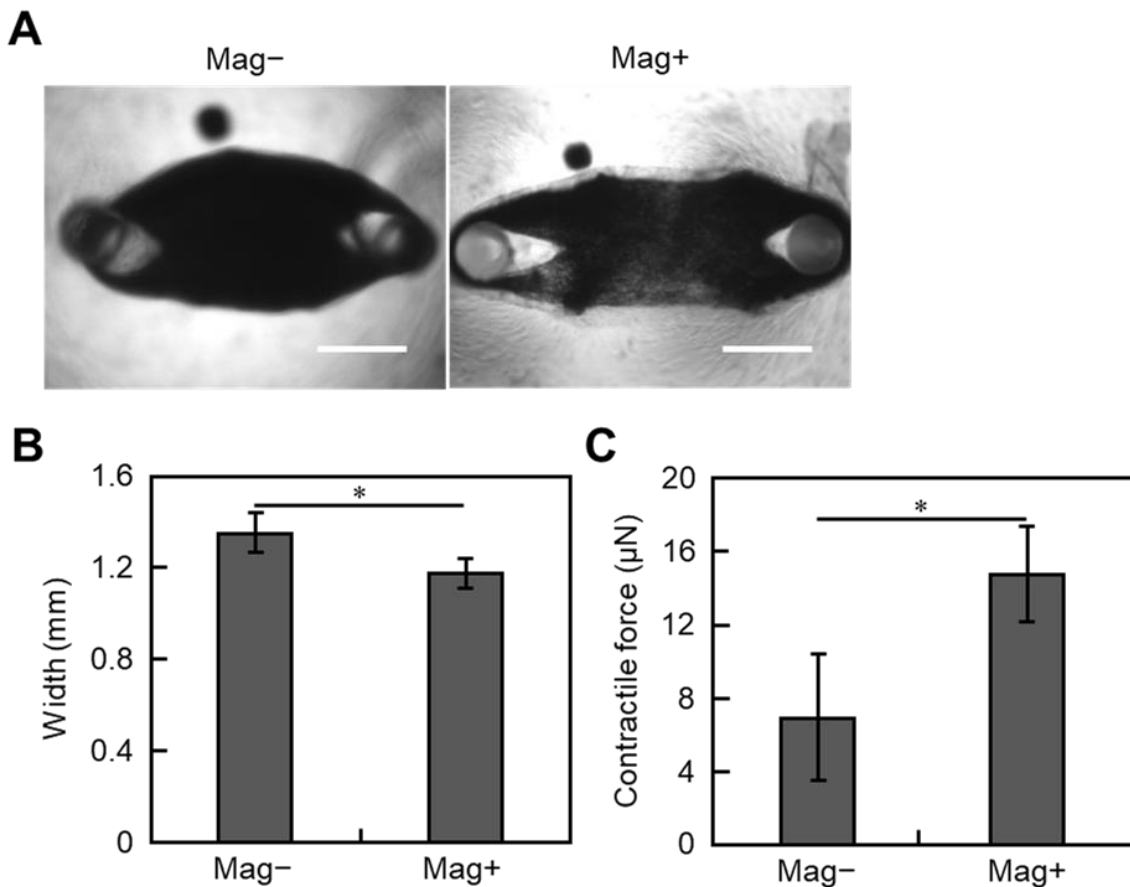


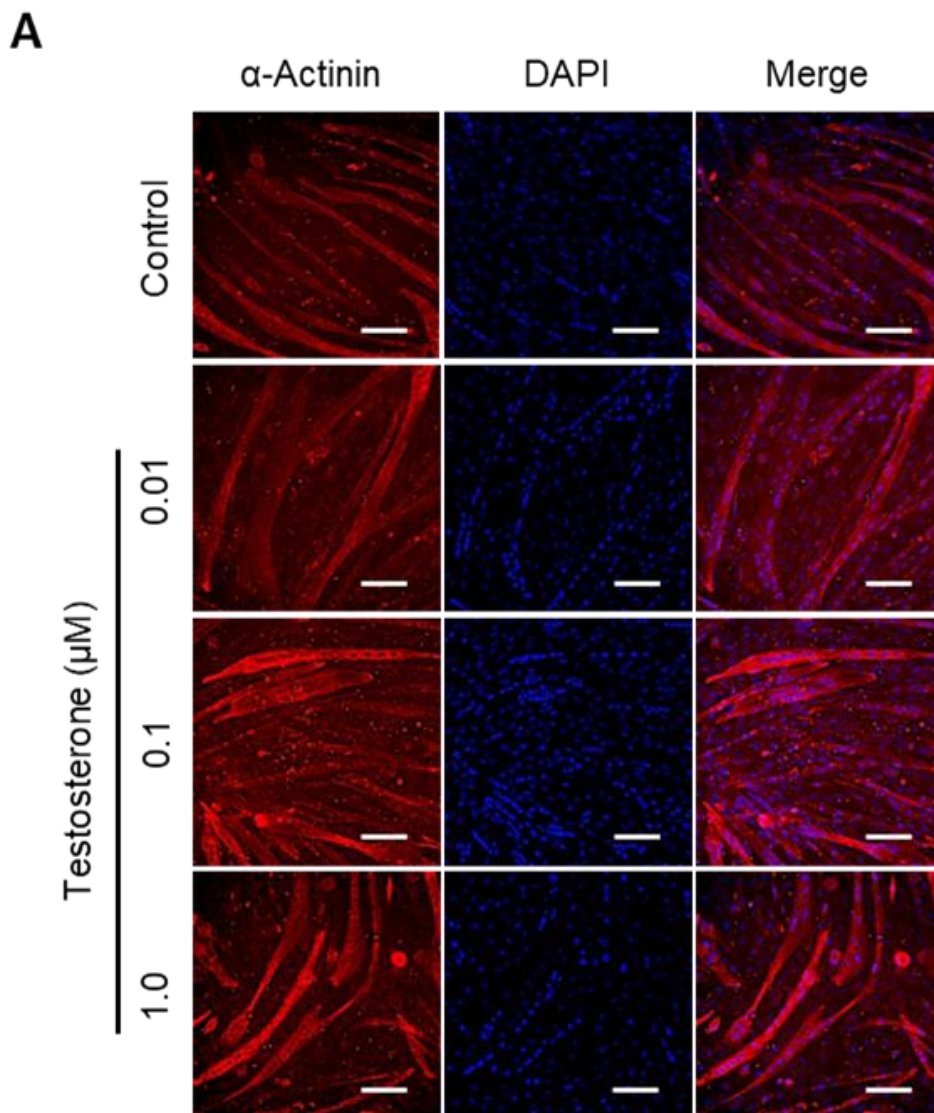
Figure 5-3. Effect of magnetic force during fabricate of micro tissue. (A) Phase contrast image of micro skeletal muscle tissue. Scale bar is 800 μm . Quantitative analysis of width (B), contractile force (C) of micro skeletal muscle tissue. Data are expressed as the mean \pm SD (n=5). *P < 0.05.

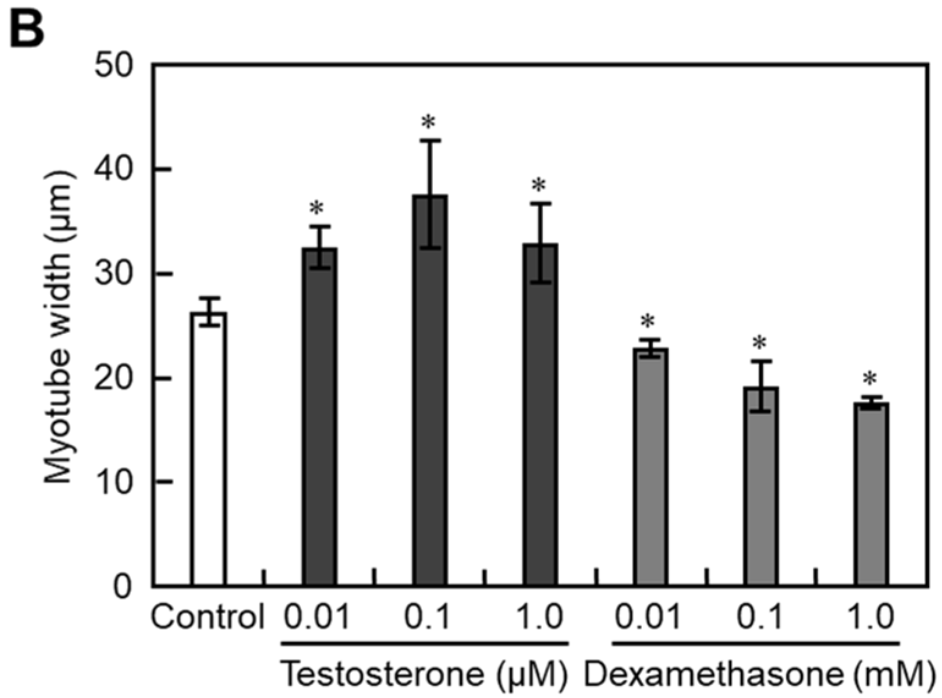
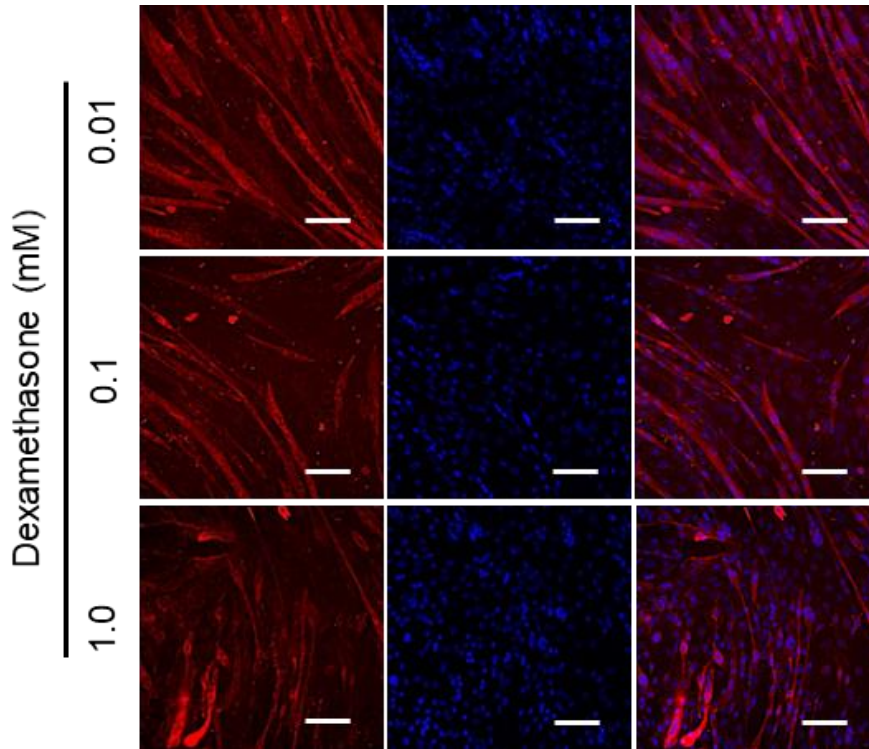
(3) マイクロ組織に対するモデル薬剤の影響

Mag-TE 法で作製したマイクロ組織が薬剤スクリーニングに対して適用可能かどうか調べるために、testosterone と dexamethasone を添加培養した際の収縮力を観察した。testosterone は 5α -reductase により細胞内で活性型アンドロゲンである dihydrotestosterone (DHT) へと変換され、糖輸送担体の一つである GLUT-4 の発現の向上や、筋タンパク質合成を促進することで、筋肥大や筋力向上に関与することが知られている⁶⁸。また dexamethasone はミオスタチンの発現を増加させることで、筋肉

第5章 マイクロデバイスを用いた三次元筋組織の構築

量の低下を引き起こすことが知られている⁶⁹。初めに、マイクロ組織に対する最適なモデル薬剤の添加濃度を決定するため、平面培養において testosterone を 0.01、0.1、1.0 μM あるいは dexamethasone を 0.01、0.1、1.0 mM の濃度で添加培養し、収縮幅、分化率、筋管の太さを測定した (Fig. 5-4)。その結果、testosterone を添加した全ての条件で収縮幅が向上し、0.1 μM の濃度で添加した条件で最も収縮幅が向上しており、分化率や筋管の太さについても同様に 0.1 μM の条件で最大となった。また、dexamethasone を添加培養することで全ての条件で収縮幅が減少しており、1.0 mM の濃度条件で分化率、筋管の太さ、収縮幅の全てが最小となった。





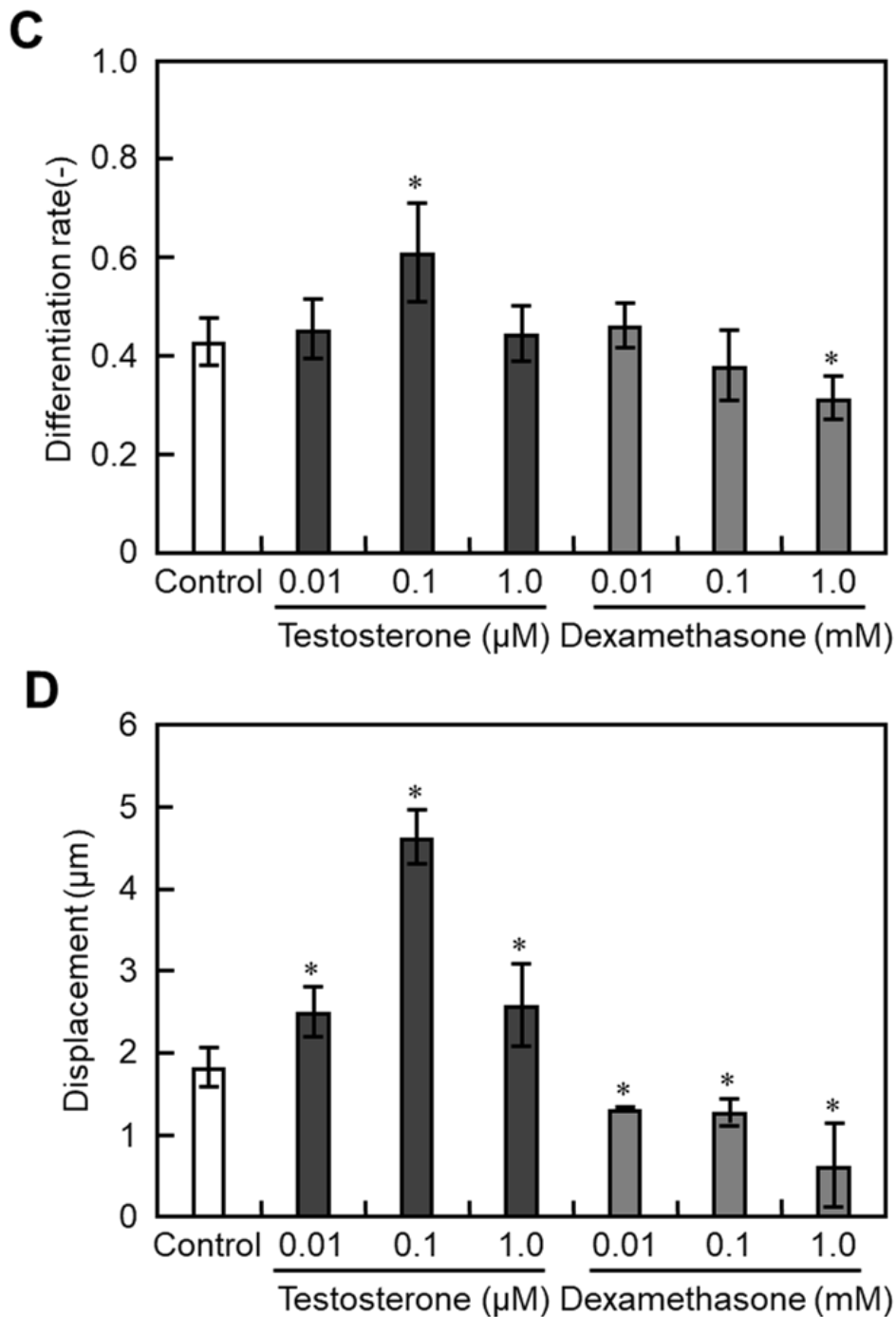


Figure 5-4. Optimization of testosterone (0.01, 0.1, 1.0 μM) and dexamethasone (0.01, 0.1, 1.0 mM) concentration by morphological analysis and C2C12-derived myotubes contractile activity. (A) Fluorescence microscopy of cells immunostained with anti- α -actinin antibody (red) and DAPI (blue). Scale bar is 100 μm. Quantitative analysis of (B) myotube width, (C) differentiation efficiency, and (D) contractile displacement with EPS (voltage, 0.3 V/mm, 10 ms, 1Hz). Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). *P < 0.05 vs control.

第5章 マイクロデバイスを用いた三次元筋組織の構築

そこでマイクロ組織に対して、testosterone を $0.1 \mu\text{M}$ 、あるいは dexamethasone を 1.0 mM の濃度で添加培養した。なにも添加していない条件ではマイクロ組織の収縮力が $10.10 \pm 1.23 \mu\text{N}$ だった一方で、testosterone を加えた条件では $12.92 \pm 5.09 \mu\text{N}$ と収縮力の上昇が見られた。また、dexamethasone を加えた条件では $5.73 \pm 1.94 \mu\text{N}$ と有意に減少していた (Fig. 5-5)。Mag-TE 法により作製したマイクロ組織はモデル薬剤の添加に応じて収縮力が変化したことから、薬剤スクリーニングにも応用可能であると考えられる。

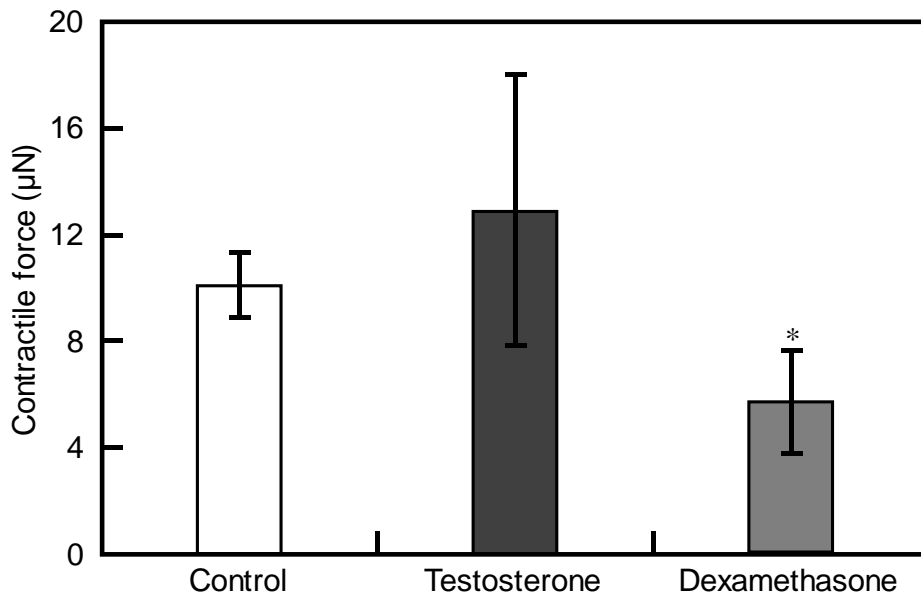


Figure 5-5. Effect of adding $0.1 \mu\text{M}$ testosterone or 1.0 mM dexamethasone to contractile force of micro skeletal muscle tissue. Contractile force generated by micro skeletal muscle tissue on day 7. Quantitative analysis of contractile force with EPS (voltage, 0.3 V/mm , 10 ms , 1Hz). Data are expressed as the mean \pm SD ($n=3$). * $P < 0.05$ vs control.

5.2.4 本節のまとめ

磁力を利用せず作製したマイクロ組織と比較して、Mag-TE 法を利用してマイクロ組織を作製することで、収縮力が向上した。またモデル薬剤としての testosterone や

dexamethasone の添加に応じてマイクロ組織の収縮力が変化したことから、Mag-TE 法を利用して作製したマイクロ組織は薬剤スクリーニングに応用できると考えられる。

5.3 iPS 細胞を利用したマイクロ組織の作製と L-carnosine の添加培養

5.3.1 本節の目的

5.2 節では Mag-TE 法を利用した C2C12 細胞由来のマイクロ筋組織を作製し、モデル薬剤に対して応答した収縮力を示したことから、薬剤スクリーニングに対して応用可能であることが示された。そこで本節では有用性を高めるために、マウス由来の細胞である C2C12 細胞でなく、ヒト iPS 細胞を細胞源としたマイクロ組織を作製できるか検討した。また、マイクロ組織がジペプチドである L-carnosine に対して応答した収縮力を示すかを調べた。

5.3.2 実験方法

(1) 細胞培養

京都大学の櫻井英俊 准教授より puromycin 耐性遺伝子を有するテトラサイクリン誘導性 MyoD1 発現ベクターを導入したヒト iPS 細胞をいただいた。ヒト iPS 細胞を培養するために 6-well plate を $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ laminin 511-E8 で 37°C で 1 時間以上コートした。その後、ヒト iPS 細胞を 6.5×10^4 cells/well で laminin コートに対して播種し、Healthy-iPSc は Stem Fit AK02N に $10 \mu\text{M}$ Y-27632、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin を添加した培地により培養した。それ以降は Stem Fit AK02N から Y-27632 を除いた培地により培養した。継代はヒト iPS 細胞を accutase (Innovative Cell Technologies) で 10 分、 37°C で処理することによりプレートから剥がし、 6.5×10^4 cells/well で laminin コートしたプレートに再播種した。ヒト iPS 細胞は 37°C 、 5% CO_2 、 95% air の CO_2 インキュベ

ーターで培養した。

(2) ヒト iPS 細胞の筋分化誘導

6 well-plate もしくは 35 mm ディッシュを 50 倍希釈した matrigel growth factor reduced で 2 時間以上コート処理を施した。分化誘導 day 0 で ヒト iPS 細胞をそれぞれ 3.0×10^5 cells/well でマトリゲルコートしたプレートに播種し、Stem Fit AK02N に 10 μ M Y-27632、1.0 μ M RA、と 0.5 μ g/ml puromycin を加えた培地により培養した。Day 1 で培地を Repro Stem に 1.0 μ M RA、と 0.5 μ g/ml puromycin もしくは 0.1 mg/ml neomycin を加えた培地に交換した。翌日、培地を Repro Stem に 1.0 μ M RA と 1.0 μ g/ml dox を加えた培地により培養した。分化誘導 day 3 以降は α -MEM に 5% KSR、1.0 μ M RA、1.0 μ g/ml Dox を添加した培地により、day 4 でマイクロ組織作製に利用した。

(3) 生細胞数測定

5.3 節 2 項 (2) に示す方法で分化誘導した ヒト iPS 細胞由来筋芽細胞に対して、MCL を 0、20、40、60、80、100 μ g/cell の濃度で 4 時間取り込ませて磁気標識した。MCL を加えてから 24 時間後、細胞を回収し、血球計算板とトリパンブルーを用いて制細胞数を算出した。

(4) 鉄濃度測定

MCL を取り込ませてから 24 時間後の細胞を 1×10^6 cells 回収し、ソニケーションによって細胞を破碎した。破碎した細胞を 7500 rpm、4°C、5 min で遠心分離後、上清を回収し、サンプルとした。MilliQ 水で希釈したサンプルに対して 12 N HCl (Fujifilm Wako Pure Chemical) を 200 μ l 加え 40°C で 30 min 反応させた。反応後、 H_2O_2

第 5 章 マイクロデバイスを用いた三次元筋組織の構築

(Fujifilm Wako Pure Chemical) 10 μ l、0.1 M チオシアン酸カリウム (Fujifilm Wako Pure Chemical) 4 ml を加え、吸光度測定器 (BIO-RAD) を用いて、490 nm の波長で測定を行った。

(5) ヒト iPS 細胞を用いたマイクロ組織の構築

3 節 2 項 (2) に示した方法で分化誘導した ヒト iPS 細胞由来筋芽細胞に対して 60 pg/cells の濃度で MCL を加えた培地により 4 時間培養することで磁気標識した。組織 1 つにつき、0.3 % Type I collagen solution 3.1 μ L、10 \times DMEM (1) 0.4 μ L、再構成溶液 0.4 μ L、Matrigel 3 μ L、細胞溶液 (α -MEM に 5% KSR、1.0 μ M RA、1.0 μ g/ml Dox を添加した培地) に ヒト iPS 細胞由来筋芽細胞を 0.15、0.50、1.0、2.0 $\times 10^6$ cells/tissue) 12 μ L の割合で混合した混合溶液を調製した。調製は全て氷上で行った。事前に、96 well plate (Thermo) の well に PDMS デバイスをグリースにより固定しておき、磁石上に鉄シートを設置した物を下に敷いた。次に 1 well あたり混合溶液 20 μ L を PDMS デバイス上に播種した。播種した細胞を磁石の上に置き、30 分間 37°C でインキュベート後、 α -MEM に 5% KSR、1.0 μ M RA、1.0 μ g/ml Dox を添加した培地を加え、再度 37°C でインキュベートした。その後、毎日培地交換を行い、5% CO₂ インキュベーター内で 11 日間培養した。またファンクションジェネレーターからディッシュ上部に取り付けた C-Dish を介して、印加電圧 0.17 or 0.3 V/mm、パルス幅 4 ms、周波数 1 Hz の条件で分化誘導 day 7 から day 14 まで電気刺激培養を行った。その後、5.2 節 2 項 (6) に示す方法で収縮挙動の測定および解析を行った。

(6) L-carnosine の添加培養

5.2 節 2 項 (4) に示す方法で筋分化誘導した C2C12 細胞由来筋芽細胞、5.2 節 2 項 (3) に示す方法で作製した C2C12 細胞由来マイクロ筋組織に対して、分化誘導 day 4 から L-carnosine を 0.01、0.1、1.0 μ M あるいは β -alanine を 0.01、0.1、1.0 μ M で

加え、分化誘導 day 7 まで培養した。

また、5.3 節 2 項 (2) に示す方法で平面培養において分化誘導した ヒト iPS 細胞由来筋芽細胞、5.3 節 2 項 (5) に示す方法で作製した ヒト iPS 細胞由来マイクロ筋組織に対して、分化誘導 day 10 から L-carnosine を 0.01、0.1、1.0 μM あるいは β -alanine を 0.01、0.1、1.0 μM で加え、分化誘導 day 14 まで培養した。

(7) 統計解析

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

5.3.3 実験結果と考察

(1) ヒト iPS 細胞由来筋芽細胞に対する MCL 添加量の検討

ヒト iPS 細胞からマイクロ筋組織を作製する前に、ヒト iPS 細胞由来筋芽細胞に対する最適な MCL 添加量を検討した。分化誘導 day 3 の ヒト iPS 細胞由来筋芽細胞に対して、20、40、60、80、100 pg/cell の濃度で 4 時間 MCL を取り込ませ、MCL を添加してから 24 時間後に細胞生存率と鉄取り込み量を測定した (Fig. 5-6)。MCL の添加濃度が高くなることで細胞死が引き起こされる傾向にあり、60 pg/cell 以上の濃度で 40%程度筋芽細胞が死んでいた。また鉄取り込み量は 60 pg/cell で $14.00 \pm 6.22 \text{ pg}/\text{cell}$ となっており、これは C2C12 細胞から Mag-TE 法で筋組織を作製する際の鉄取り込み量が約 9.7 pg/cell となっていることから、組織を作製するには十分な値と考えられる。そこでこれ以降の実験では 60 pg/cell の条件で MCL を取り込ませ、実験を行った。

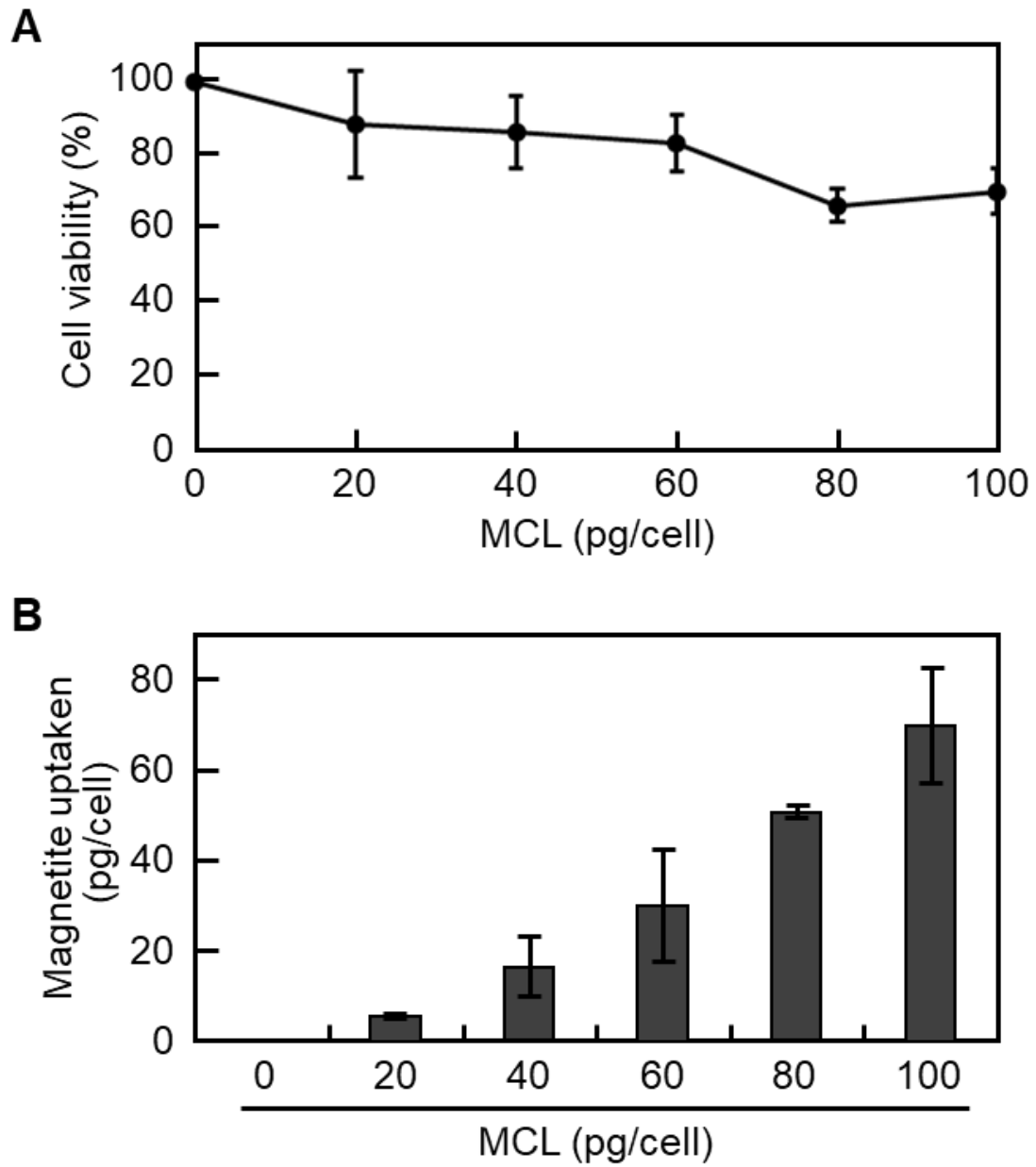


Figure 5-6. Optimization of MCL concentration (20, 40, 60, 80, 100 pg/cell) into iPS cell-derived myoblast. (A) Cell viability 24 hour after adding MCL. (B) Magnetite uptake 24 hour after adding MCL. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3).

(2) ヒト iPS 細胞由来マイクロ筋組織の最適細胞数の検討

次にマイクロ組織を作製するにあたり、最適な細胞数の検討をするため、 0.15 、 0.5 、 1.0 、 2.0×10^6 cells/tissue の条件で組織を作製した (Fig. 5-7)。その結果、 0.5×10^6 cells/tissue で収縮力が最大となっており、それより多い細胞数では収縮力が減少していた。これは 1.0 、 2.0×10^6 cells/tissue の条件では ヒト iPS 細胞から筋管へと分化できていないために、収縮力が減少したと考えられる。これ以降の実験では 0.5×10^6 cells/tissue の条件でヒト iPS 細胞由来マイクロ筋組織を作製し、実験に用いた。

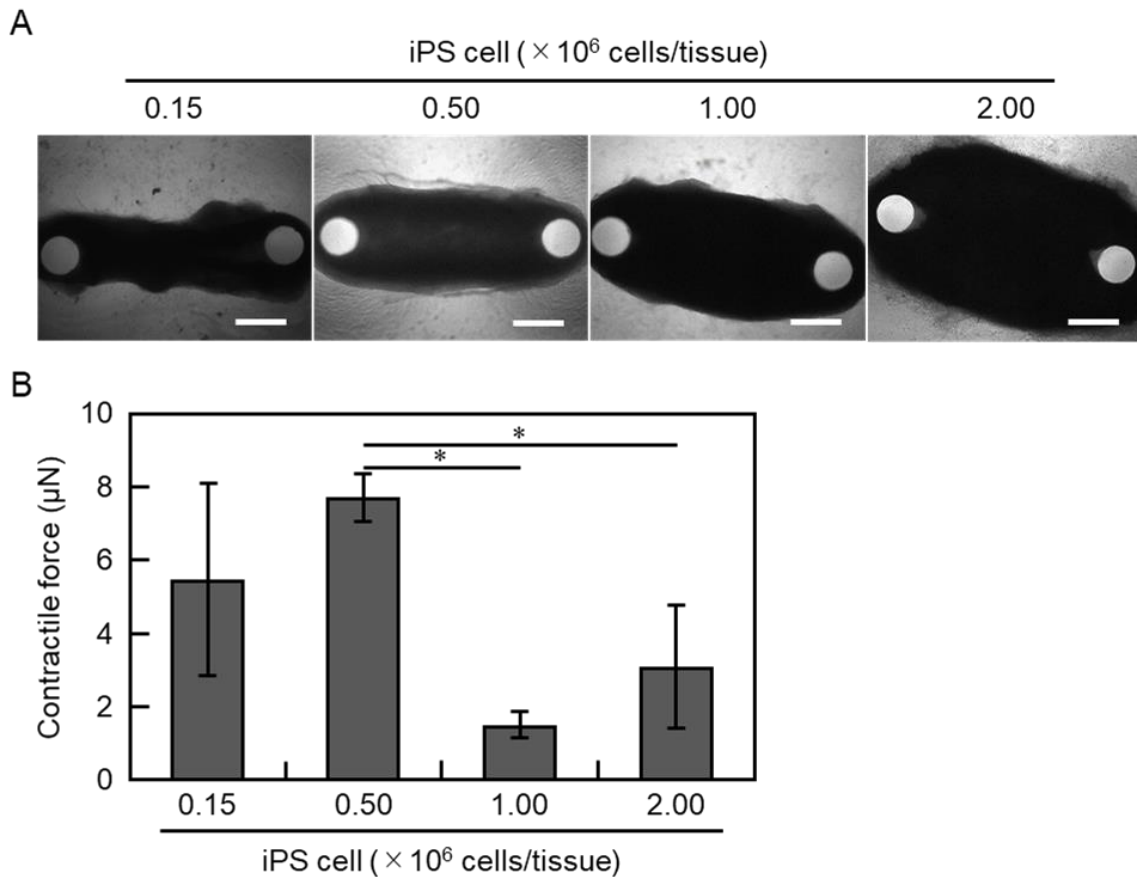


Figure 5-7. Optimization of seeding iPS cell-derived myoblast cell density (0.15 , 0.50 , 1.0 or 2.0×10^6 cells/tissue) onto the micro device. (A) Phase contrast image of micro skeletal muscle tissue. Scale bar is $800 \mu\text{m}$. (B) Quantitative analysis of micro skeletal muscle tissue contractile force. Data are expressed as the mean \pm SD ($n=5$). * $P < 0.05$.

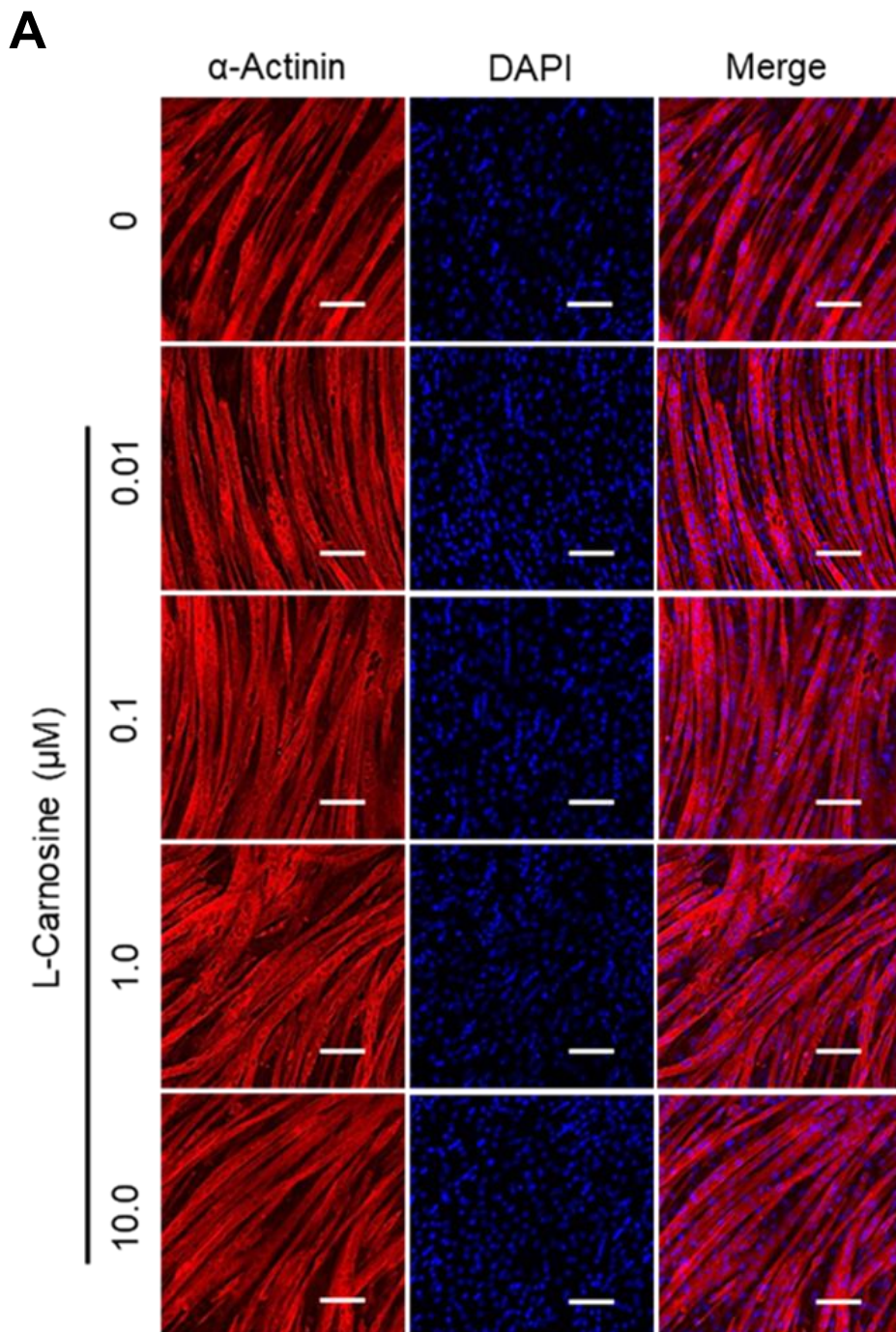
(3) L-carnosine 添加によるマイクロ筋組織の筋機能向上

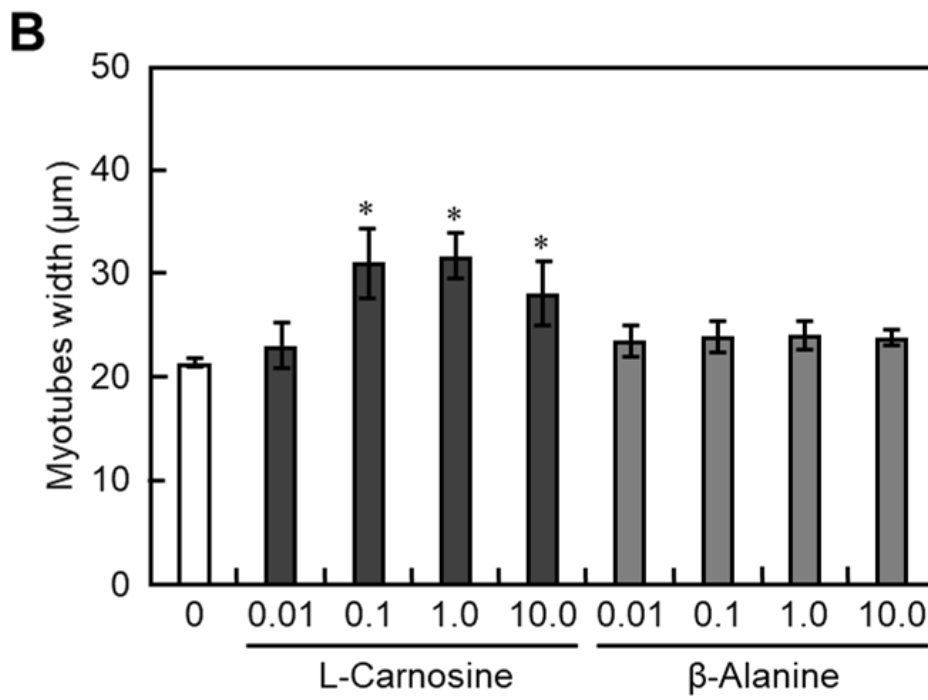
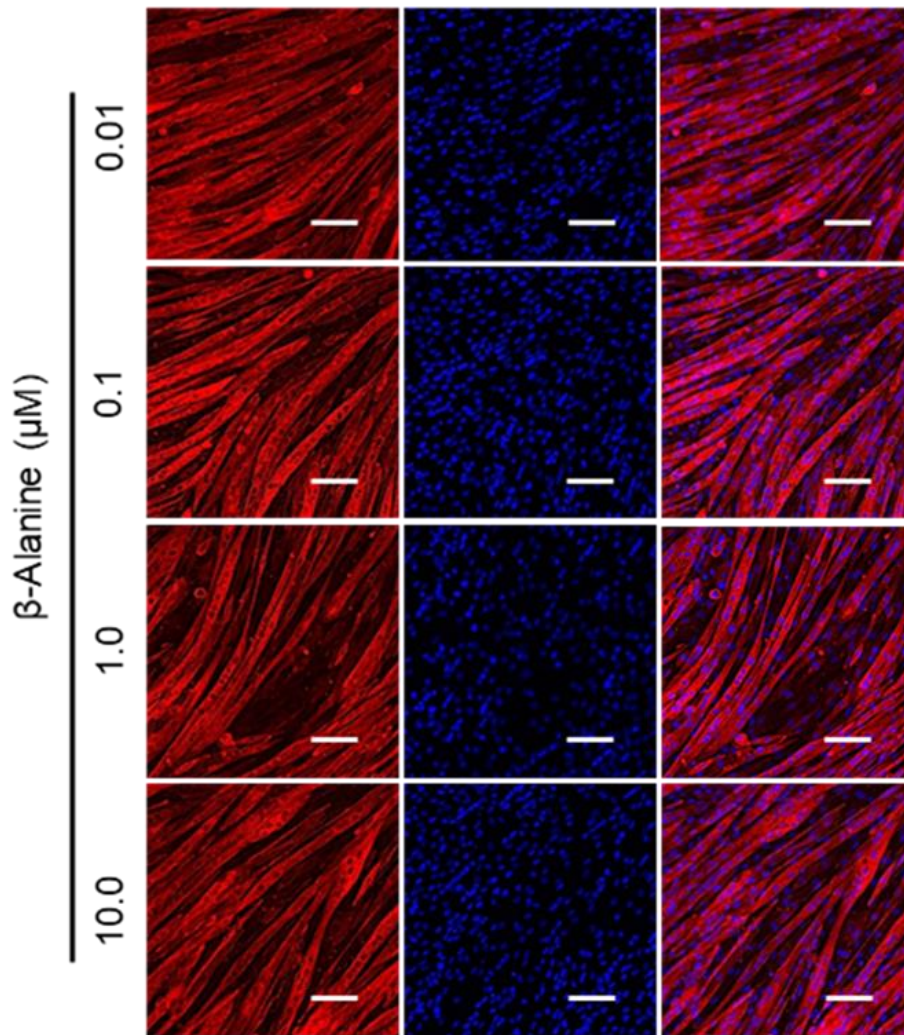
L-carnosine は抗酸化作用を示すだけでなく、筋小胞体に作用して筋小胞体から Ca^{2+} が放出されやすくなることで、筋収縮に関与する物質であると考えられている⁷⁰。しかし、*in vitro* において L-carnosine 添加によって収縮力が増大した報告は未だされていない。そこで C2C12 細胞と ヒト iPS 細胞から作製したマイクロ筋組織に対して、L-carnosine を添加培養することで、筋収縮力に対する影響を調べ、ヒト iPS 細胞から作製したマイクロ筋組織の有用性を検証した。L-carnosine は β -alanine と histidine からなるジペプチドであり、 β -alanine のみでは筋力は増強しないと報告されていることから、ネガティブコントロールとして β -alanine を使用した⁷¹。初めに、平面培養において筋分化誘導をしている C2C12 細胞に対して、筋分化誘導 day 4 より、L-carnosine を 0.01、0.1、1.0 μM あるいは β -alanine を 0.01、0.1、1.0 μM で添加培養し、筋管の太さ、分化率、収縮幅を調べた (Fig. 5-8)。筋管の太さおよび分化率は、L-carnosine を 0.1 μM 以上加えた条件から、何も添加していない条件と比較して有意に上昇しており、収縮幅も同様に 0.1 μM 以上添加した条件で有意に上昇していた。また全ての指標において 1.0 μM L-carnosine 添加した条件で最大となった。一方で、 β -alanine を添加した条件では筋管の太さ、分化率、収縮幅に変化は見られなかった。この結果より、L-carnosine が筋機能を向上させることが示唆された。

最後に C2C12 細胞および ヒト iPS 細胞から作製されたマイクロ筋組織の筋収縮活性が L-carnosine 添加培養により向上するかを調べた。C2C12 細胞もしくはヒト iPS 細胞からマイクロ筋組織を作製し、それぞれの筋分化誘導 day 4 もしくは day 10 から L-carnosine を 0.01、0.1、1.0 μM あるいは β -alanine を 0.01、0.1、1.0 μM で添加培養し、収縮力を測定した (Fig. 5-9)。その結果、C2C12 細胞から作製したマイクロ筋組織では何も添加していない条件で $10.10 \pm 1.23 \mu\text{N}$ だったが、L-carnosine を 0.1、1.0 μM 添加した条件でそれぞれ、 13.24 ± 0.95 、 $14.32 \pm 0.27 \mu\text{N}$ と収縮力が有意に上昇していた。またヒト iPS 細胞から作製したマイクロ筋組織では何も添加していない条件で $4.13 \pm 2.00 \mu\text{N}$ であったものの、L-carnosine を 1.0 μM 添加した条件で、

第 5 章 マイクロデバイスを用いた三次元筋組織の構築

10.93 ± 2.74 μN と有意に上昇していた。またどちらの細胞種から作製した筋組織も、 β -alanine を添加した条件では収縮力に変化は見られなかった。C2C12 細胞とヒト iPS 細胞から作製したマイクロ筋組織それぞれで、L-carnosine の添加濃度ごとに同様の収縮力の増大を示したことから、ヒト iPS 作製したマイクロ筋組織は薬剤スクリーニングに応用できることが示唆された。





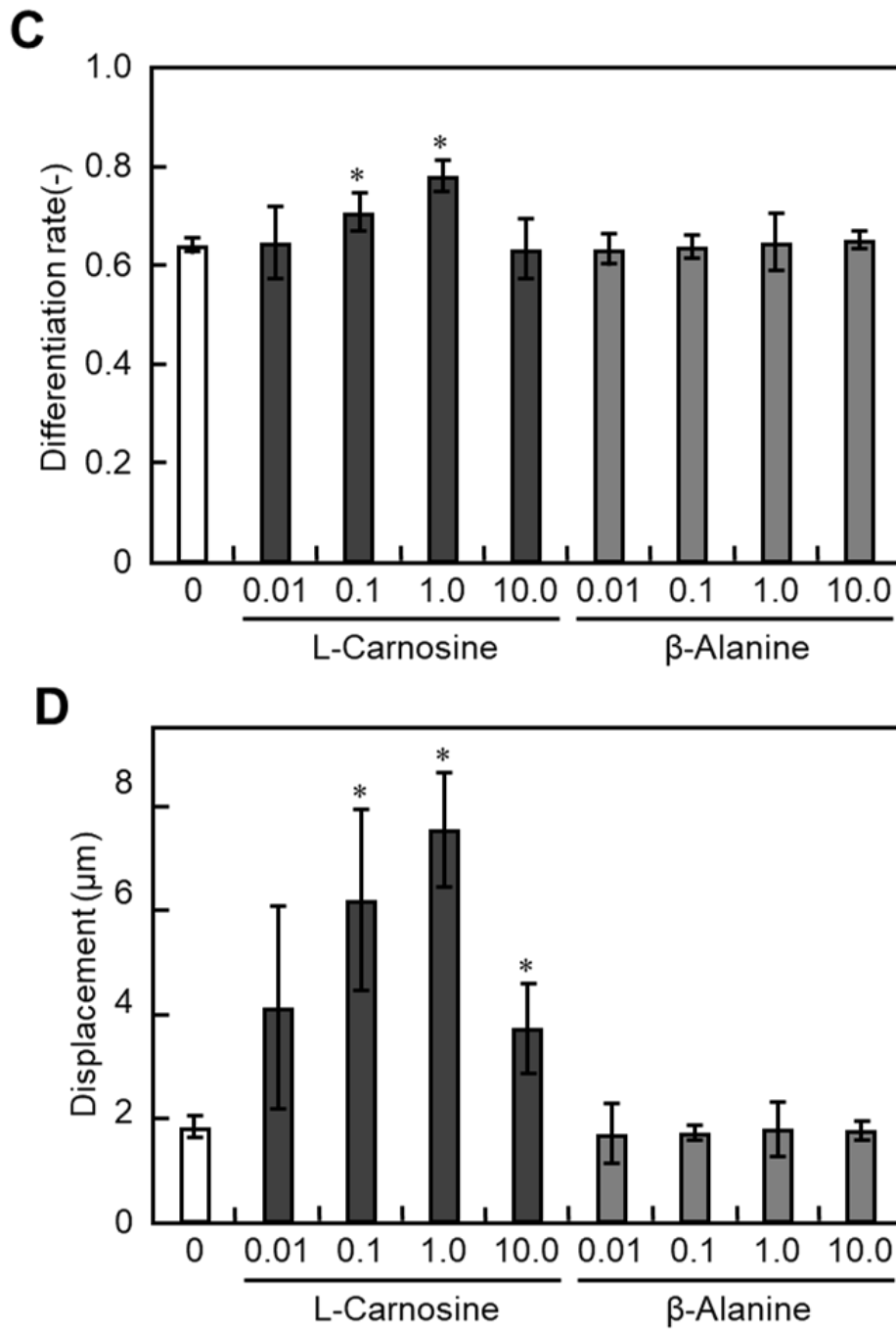


Figure 5-8. Effect of adding L-carnosine (0.01, 0.1, 1.0, 10 μ M) and β -alanine (0.01, 0.1, 1.0 mM) to C2C12 cell-derived myotubes morphology and contractile activity. (A) Fluorescence microscopy of cells immunostained with anti- α -actinin antibody (red) and DAPI (blue). Scale bar is 100 μ m. Quantitative analysis of (B) myotube width, (C) differentiation efficiency, and (D) contractile displacement with EPS (voltage, 0.3 V/mm, 10 ms, 1Hz). Data are expressed as the mean \pm SD (n=3). *P < 0.05 vs 0 μ M.

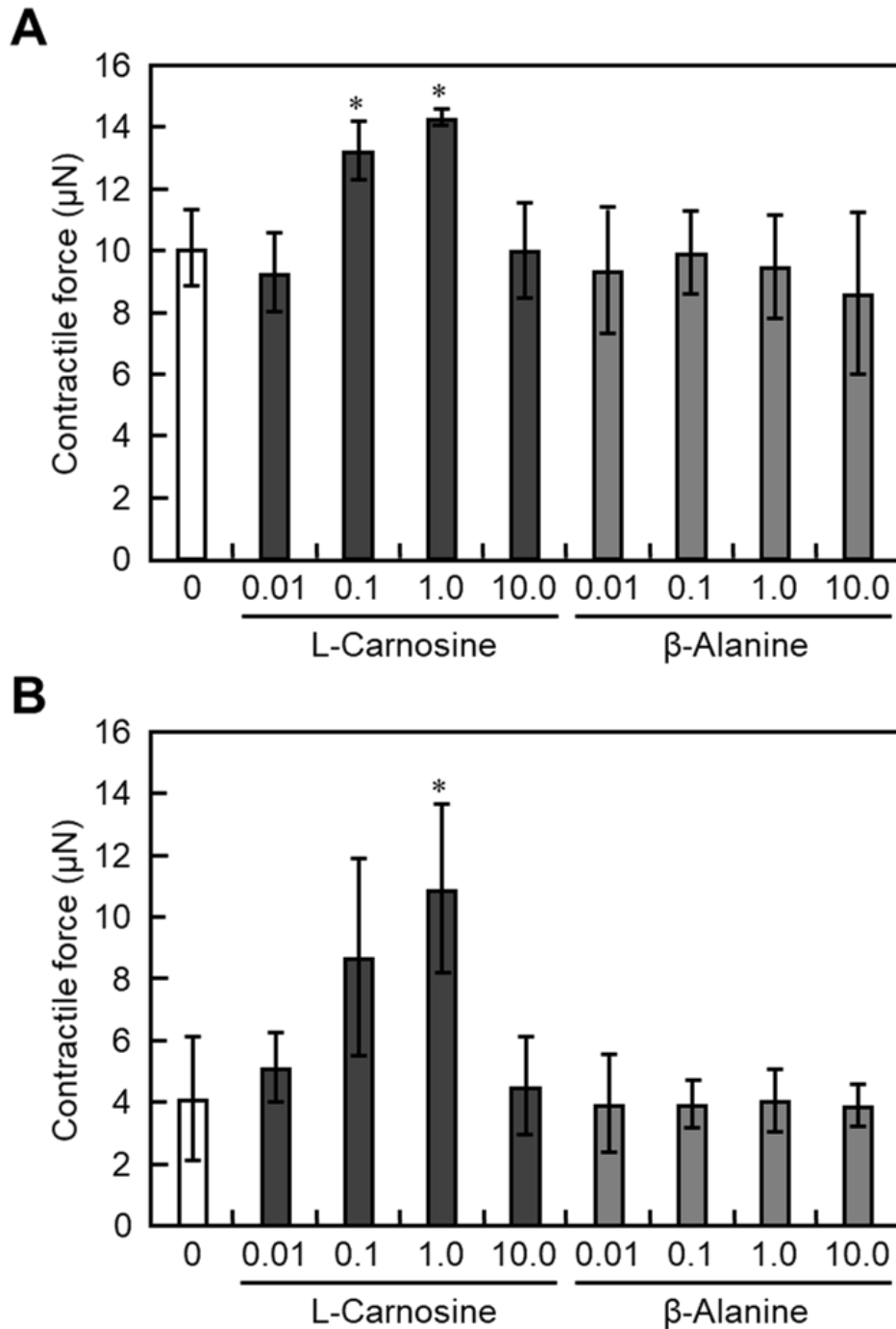


Figure 5-9. Effect of adding L-carnosine (0.01, 0.1, 1.0, 10 µM) and β-alanine (0.01, 0.1, 1.0 mM) to C2C12 cells or iPS cells-derived myoblast produced micro muscle tissue. Quantitative analysis of contractile force by micro skeletal muscle tissue produced from (A) C2C12 cells or (B) iPS cells-derived myoblast. Data are expressed as the mean ± SD (n=3). *P < 0.05 vs 0 µM.

5.3.4 本節のまとめ

本節ではヒト iPS 細胞から分化誘導した筋芽細胞を用いてマイクロ筋組織を作製した。これにより Mag-TE 法を利用したマイクロ筋組織の有用性を高めることに成功したと考えられる。また前節で使用した testosterone や dexamethasone とは異なるモデル薬剤である L-carnosine に対してもマイクロ筋組織の応答が見られたことから、Mag-TE 法を利用して作製したマイクロ筋組織は薬剤スクリーニングへの応用に適していると考えられる。

5.4 本章のまとめ

本章ではハイスループット性を有するマイクロ筋組織を C2C12 細胞を細胞源として Mag-TE 法により作製することに成功した。これまでの Mag-TE 法による組織作製手順では、作製した組織をピンに固定する操作等が求められた。一方で今回の手法では、それらの操作手順を踏む必要がないことから、より簡便に組織作製が行うことが出来る。また、Mag-TE 法を利用して作製したマイクロ筋組織が Mag-TE 法を利用せずに作製した組織と比較して、強い収縮力を示した。さらにモデル薬剤として用いた testosterone や dexamethasone に対する応答が見られたことから、薬剤スクリーニングへの応用が可能であると考えられる。

作製したマイクロ筋組織の有用性を高めるために、ヒト iPS 細胞由来のマイクロ筋組織を作製し、testosterone や dexamethasone 以外のモデル薬剤である L-carnosine に応答して収縮力が向上した。

これらの結果より、Mag-TE 法を利用して作製したマイクロ筋組織はハイスループット性を有しながら、筋肉の最も重要な機能である収縮力を評価できることが示された。ヒト iPS 細胞を細胞源としたマイクロ筋組織の作製にも成功したことから、将来的には病態由来のヒト iPS 細胞を細胞源とすることで、新薬の発見への貢献が期待できる。

第 6 章 総括

6.1 本論文のまとめ

筋肉における最も重要な収縮機能を再現する筋収縮モデルは薬剤スクリーニングのみならず、再生医療への応用も期待できる。本研究では平面培養と三次元組織において、生体における筋収縮に関わる運動神経細胞を用いることで、生体と同様の神経筋伝達により収縮する筋収縮モデルを作製した。また、筋収縮モデルの細胞源として患者由来 iPS 細胞と遺伝子修復 iPS 細胞を用いることで、遺伝子修復が筋収縮活性の機能回復にも寄与していることを示した。さらに、マイクロデバイスを用いた三次元筋組織を作製することで、薬剤スクリーニングにも応用可能なハイスループット性を有する筋収縮モデルを構築した。

第 1 章では本研究を行なうにあたり、研究背景、目的、意義を示し、研究方針について記述した。

第 2 章では既往の研究を紹介することで、本研究の背景と意義を明確に示した。

第 3 章では i-MN と筋芽細胞を共培養し、神経伝達物質である L-glutamate や AChR 阻害剤である curare の添加に応じて、運動神経細胞からのシグナル伝達で収縮挙動が変化する筋収縮モデルの構築を行った。初めに平面培養において筋芽細胞上に i-MN を播種し、共培養を行った。そして L-glutamate を添加することで筋収縮が起こり、curare 添加により筋収縮が停止したことから、平面培養において神経筋接合を有する筋収縮モデルの構築に成功した。さらに三次元筋組織においても運動神経細胞を混合することで、自発収縮が向上するだけでなく、curare の添加に応じて収縮力が減少した。また神経筋接合部の特徴である AChR の集積が観察された。

第 4 章では、健常人、DMD 患者、DMD 患者の細胞を遺伝子修復した iPS 細胞から筋分化誘導し、筋収縮活性を調べることで、遺伝子修復の効果を評価し、DMD 患者由来 iPS 細胞を用いた筋収縮モデルを構築した。既存の筋分化誘導法に加え、培養中に RA を添加することで、効率的かつ安定的に筋分化誘導が可能となった。さらに電気刺激培養を ヒト iPS 細胞由来筋芽細胞に対して行うことで、筋収縮活性の向上が見られたものの、DMD-iPSc から分化誘導した筋芽細胞では、強い電気刺激条件では筋収縮活性の向上は見られなかった。この原因として、アポトーシス活性を TUNEL 法により調べたところ、DMD-iPSc を電気刺激培養することで、健常人や遺伝子修復した細胞株ではあまり見られなかったアポトーシスが観察された。この原因として、電気刺激培養と Ca^{2+} のキレート剤添加を併用して分化誘導した際に、アポトーシスが抑制されたことから、電気刺激培養に依存したアポトーシスが Ca^{2+} の細胞への流入が原因であることが示唆された。さらにアポトーシス阻害剤である Bax 阻害剤を添加することでアポトーシスが抑制され、筋収縮活性が向上した。

第 5 章では、マイクロデバイスを用いた三次元筋組織を構築し、モデル薬剤に応じた収縮力を調べることで有用性を示した。初めにマイクロデバイスと Mag-TE 法を組み合わせた C2C12 細胞由来マイクロ筋組織を作製した。また、磁力を利用しないマイクロ筋組織との収縮力を比較し、磁力を使用した条件で収縮力が向上したことから、Mag-TE 法によるマイクロ筋組織の有用性を示した。さらに作製したマイクロ筋組織にモデル薬剤である testosterone や dexamethasone の添加に応じた収縮力の変化が観察されたことから、マイクロ筋組織の有用性が示された。細胞源として ヒト iPS 細胞由来筋芽細胞を使用してマイクロ筋組織を作製することにより有用性を高めた。最後に L-carnosine の添加培養によりその筋組織の収縮力が向上したことから、薬剤スクリーニングに応用可能であることが示唆された。

第 6 章では、本論文の総括を行い、本研究の成果を踏まえた今後の展望について述べた。

6.2 今後の展望

本研究では組織工学的アプローチを用いて複数の筋収縮モデルを構築した。そこでそれぞれの筋収縮モデルに対する今後の展望を以下にまとめる。

運動神経細胞を含む筋収縮モデルでは平面培養と三次元組織において神経筋接合を有する筋収縮モデルの構築に成功した。今回作製した筋収縮モデルは運動神経細胞の機能を筋収縮という直接的な指標で評価できるため、治療効果を調べるための薬剤スクリーニングへの利用に加え、薬剤の毒性評価等にも用いることが可能である。またこの筋収縮モデルは運動神経細胞として iPS 細胞を用いているため、将来的には病態由来 iPS 細胞を用いることで、病態を再現した筋収縮モデルを構築できる可能性がある。それを実現するには、マウス由来 iPS 細胞ではなく、将来的にはヒト由来の細胞を用いる必要がある。加えて、筋芽細胞に関してもマウス由来の細胞であるため、ヒト由来の細胞を用いることで薬剤スクリーニングに適用した際の有用性を高めることが出来ると考えられる。さらに今回作製した複合三次元筋組織では運動神経細胞と筋管の局在を制御していないために、その点で生体を模倣できていないことが考えられる。この解決策の一つとして、細胞シート等を重ねていくことで組織を構築するビルディングブロック法がある⁷²。この手法と Mag-TE 法を併用することで筋芽細胞とそれ以外の細胞の局在を制御し、生体を模倣した三次元組織の作製に近づける可能性がある。

DMD 患者由来 iPS 細胞を用いた研究では、CRISPR-Cas9 技術に基づいた遺伝子修復がジストロフィンタンパク質の発現だけでなく、筋収縮機能も回復させることを電気刺激培養後の筋管の収縮幅や収縮割合の結果より明らかにした。近年の研究で筋疾患患者から iPS 細胞を作製した報告は多くなされているものの、それらの細胞から分化誘導した筋管または筋組織の収縮活性を測定した報告は少ない。そのため、患者由来 iPS 細胞由来筋芽細胞と本評価法を適用することで、今回と同様に遺伝子修復の効果だけでなく、薬剤スクリーニングに対しても応用が期待できる。実際に現在開発されているエキソンスキッピング法などは特定のエキソンのみを対象としているために、

一つの薬剤を全ての DMD 患者に用いることができない問題点がある。しかし、今回の実験で電気刺激培養によって引き起こされるアポトーシスが Bax inhibitor によって抑制でき、筋収縮活性も向上させられることを示した。このように筋収縮活性を指標として薬剤による筋機能回復を評価できたことから、他の薬剤に対しても今回作製した筋収縮モデルの適用が可能であると考えられる。

当研究室でこれまでに報告してきた Mag-TE 法により作製した筋組織は収縮力を指標とした薬効評価が可能である一方で、作製の手法が煩雑であることから、ハイスループットなスクリーニング系への適用は困難であった。しかし、今回開発したマイクロデバイスを用いたマイクロ筋組織を利用することで、ハイスループット性を有した筋収縮活性が評価可能となっただけでなく、従来必要とされた手順が短縮できたことから、操作性の点においても有用性が向上できたと考えられる。またマイクロ筋組織は ヒト iPS 細胞においても作製できていることから、患者由来の iPS 細胞を用いることで、将来的には薬剤スクリーニングや遺伝子修復評価などの点で応用可能である。ただし今回作製したマイクロ筋組織は生体中における筋組織とは構造的には程遠い。これを改善するためには、今後、線維芽細胞や脂肪細胞などと共培養することで、より複雑な筋組織を構築していくことが必要である。また近年では複数の組織を単一のデバイス内で分けし、流路をつなぐことで生体を模倣した **Body on a Chip** という概念も提唱されている⁷³。この **Body on a Chip** の中に我々が作製したマイクロ筋組織を組み込むことで、今まで以上に生体を模倣した薬剤スクリーニング系が構築できる可能性がある。

今回作製した筋収縮モデルはそれぞれ、運動神経細胞の機能評価、平面での筋収縮活性評価、ハイスループット性を有する筋収縮活性評価が可能であることを示しており、用途に応じて使い分けることによって筋収縮に関わる疾患のための薬剤スクリーニングに利用可能であると考えられる。

参考文献

1. 石井直方, 筋肉学入門, 講談社, p43-44., 2009.
2. Huxley, H., and Hanson, J., Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation, *Nature*, 173 (4412), 973-976, 1954.
3. Mater, D. V., Añó, L., Blum, J. M., Webster, M. T., Huang, W., Williams, N., Ma, Y., Cardona, D. M., Fan, C. M., and Kirsch, D. G., Acute tissue injury activates satellite cells and promotes sarcoma formation via the HGF/c-MET signaling pathway, *Cancer Res.*, 75 (3), 605-614, 2015.
4. Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., and Rudnicki, M. A., Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells, *Cell*, 102 (6), 777-786, 2000.
5. Cornelison, D. D., and Wold, B. J., Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells, *Dev. Biol.*, 191 (2), 270-283, 1997.
6. Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.*, 117 (4), 500–544, 1952.
7. Herbst, R. and Burden, S. J., The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling, *EMBO J.*, 19 (1), 67–77, 2000.
8. Jones, G., Meier, T., Lichtsteiner, M., Witzemann, V., Sakmann, B., and Brenner, H. R., Induction by agrin of ectopic and functional postsynaptic-like membrane in innervated muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94 (6), 2654–2659, 1997.
9. Dale, H. H., Feldberg, W., and Vogt, M., Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings, *J. Physiol.*, 86 (4), 353–380, 1936.
10. Hicks, M. R., Cao, T. V., Campbell, D. H., and Standley, P. R., Mechanical strain

- applied to Human fibroblasts differentially regulates skeletal myoblast differentiation, *J. Appl. Physiol.*, 113 (3), 465-472, 2012.
11. Li, F., Li, Y., Duan, Y., Hu, C. A., Tang, Y., Yin, Y., Myokines and adipokines: involvement in the crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 33, 73-82, 2017.
 12. Li, N., Yang, Q., Walker, R. G., Thompson, T. B., Du, M., and Rodgers, B. D., Myostatin attenuation *in vivo* reduces adiposity, but activates adipogenesis, *Endocrinology*, 157 (1), 282-291, 2016.
 13. Toda, C., Shiuchi, T., Kageyama, H., Okamoto, S., Coutinho, E. A., Sato, T., Okamatsu-Ogura, Y., Yokota, S., Takagi, K., Tang, L., Saito, K., Shioda, S., and Minokoshi, Y., Extracellular signal-regulated kinase in the ventromedial hypothalamus mediates leptin-induced glucose uptake in red-type skeletal muscle, *Diabetes*, 62 (7), 2295-2307, 2013.
 14. Bruijn, L. I., Miller, T. M., Cleveland, D. W., Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS, *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 723-749, 2004.
 15. Kabashi, E., Lin, L., Tradewell, M. L., Dion, P. A., Bercier, V., Bourgouin, P., Rochefort, D., Hadj, S. B., Durham, H. D., Velde, C. V. Rouleau, G. A., and Drapeau, P., Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits *in vivo*, *Hum. Mol. Genet.*, 19 (4), 671-683, 2010.
 16. Govoni, A., Magri, F., Brajkovic, S., Zanetta, C., Faravelli, I., Corti, S., Bresolin, N., and Comi, G. P., Ongoing therapeutic trials and outcome measures for Duchenne muscular dystrophy, *Cell. Mol. Life Sci.*, 70 (23), 4585-4602, 2013.
 17. Hoffman, E. P., Brown, R. H., and Kunkel, L. M., Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus, *Cell*, 51 (6), 919-928, 1987.
 18. Sharma, P., Tran, T., Stelmack, G. L., McNeill, K., Gosens, R., Mutawe, M. M., Unruh, H., Gerthoffer, W. T., and Halayko, A. J., Expression of the dystrophin-glycoprotein complex is a marker for human airway smooth muscle phenotype

- maturation, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 294 (1), L57-68, 2008.
19. Khairallah, R. J., Shi, G., Sbrana, F., Prosser, B. L., Borooto, C., Mazaitis, M. J., Hoffman, E. P., Mahurkar, A., Sachs, F., Sun, Y., Chen, Y., Raiteri, R., Lederer, W. L., Dorsey, S. G., and Ward, C. W., Microtubules underlie dysfunction in duchenne muscular dystrophy, *Sci. Signal.*, 5 (236), ra56, 2012.
 20. Yokota, T., Lu, Q., Partridge, T., Kobayashi, M., Nakamura, A., Takeda, S., and Hoffman, E., Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne Dystrophy dogs, *Ann. Neurol.*, 65 (6), 667-676, 2009.
 21. Aoki, Y., Nakamura, A., Yokota, T., Saito, T., Okazawa, H., Nagata, T., and Takeda, S., In-frame dystrophin following exon 51-skipping improves muscle pathology and function in the exon 52-deficient mdx mouse, *Mol. Ther.*, 18 (11), 1995-2005, 2010.
 22. Levinson, A. I. and Wheatley, L. M., The thymus and the pathogenesis of myasthenia gravis, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 78 (1), 1-5 (1996).
 23. Ikeda, K., Ito, A., Imada, R., Sato, M., Kawabe, Y., and Kamihira, M., *In vitro* drug testing based on contractile activity of C2C12 cells in an epigenetic drug model, *Sci. Rep.*, 7, 44570, 2017.
 24. Langer, R., and Vacanti, J. P., Tissue engineering, *Science*, 260 (5110), 920-926, 1993.
 25. Cao, Y., Vacanti, J. P., Paige, K. T., Upton, J., and Vacanti, C. A., Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear, *Plast. Reconstr. Surg.*, 100 (2), 297-302, 1997.
 26. Takahashi, K. and Yamanaka, S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126 (4), 663-676, 2006.
 27. 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.
 28. Inoue, K., Yamasaki, S., Fushiki, T., Kano, T., Moritani, T., Itoh, K., and Sugimoto,

- E., Rapid increase in the number of androgen receptors following electrical stimulation of the rat muscle, *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 66 (2), 134-140, 1993.
29. Fink, J., Schoenfeld, B. J., and Nakazoto, K., The role of hormones in muscle hypertrophy, *Phys. Sportsmed.*, 46 (1), 129-134, 2018.
30. 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, 2014.
31. 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, 2013.
32. Shimizu, S., Narita, M., and Tsujimoto, Y., Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome C by the mitochondrial channel VDAC, *Nature*, 399 (6735), 483-487, 1999.
33. Dennis, R. G., and Kosnik, P. E., Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered *in vitro*, *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 36 (5), 327-335, 2000.
34. Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, H., and Sakurai, Y., Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces, *Biomaterials*, 16 (4), 297-303, 1995.
35. Kushida, A., Yamato, M., Konno, C., Kikuchi, A., Sakurai, Y., and Okano, T., Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.*, 45 (4), 355-362, 1999.
36. Takahashi, H., Shimizu, T., and Okano, T., Engineered human contractile myofiber sheets as a platform for studies of skeletal muscle physiology, *Sci. Rep.*, 8 (1), 13932, 2018.

37. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., and Kobayashi, T., Medical application of functionalized magnetic nanoparticles, *J. Biosci. Bioeng.*, 100 (1), 1–11, 2005.
38. Akiyama, H., Ito, A., Sato, M., Kawabe, Y., and Kamihira, M., Construction of cardiac tissue rings using a magnetic tissue fabrication technique, *Int. J. Mol. Sci.*, 11 (8), 2910-2920, 2010.
39. Shimizu, K., Genma, R., Gotoh, Y., Nagasaka, S., Honda, H., Three-dimensional culture model of skeletal muscle tissue with atrophy induced by dexamethasone, *Bioengineering*, 4 (2), 56, 2017.
40. Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A., and Moore, K. J., X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81 (4), 1189-1192, 1984.
41. Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G., Barnard, P. J., The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, 244 (4912), 1578-1580, 1989.
42. Shimatsu, Y., Katagiri, K., Furuta, T., Nakura, M., Tanioka, Y., Yuasa, K., Tomohiro, M., Kornegay, J. N., Nonaka, I., and Takeda, S., Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ), *Exp. Anim.*, 52 (2), 93-97, 2003.
43. Darabi, R., Arpke, R. W., Irion, S., Dimos, J. T., Grskovic, M., Kyba, M., and Perlingeiro, R. C. R., Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice, *Cell Stem Cell*, 10 (5), 610-619, 2012.
44. Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., and Jaenisch, R., MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle, *Cell*, 75 (7), 1351-1359, 1993.
45. Tanaka, A., Woltjen, K., Miyake, K., Hotta, A., Ikeya, M., Yamamoto, T., Nishino, T., Shoji, E., Sehara-Fujisawa, A., Manabe, Y., Fujii, N., Hanaoka, K., Era, T., Yamashita, S., Isobe, K., Kimura, E., and Sakurai, H., Efficient and reproducible myogenic

- differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy *in vitro*, PLoS One, 8 (4), e61540, 2013.
46. Uchimura, T., Otomo, J., Sato, M., Sakurai, H., A human iPS cell myogenic differentiation system permitting high-throughput drug screening, *Stem Cell Res.*, 25, 98-106, 2017.
47. Kokubo, Y., Nagino, T., Sasa, K., Oikawa, T., Miyake, K., Kume, A., Fukada, M., Fuse, H., Tozawa, R., and Sakurai, H., Phenotypic drug screening for dysferlinopathy using patient-derived induced pluripotent stem cells, *Stem Cells Transl. Med.*, 8 (10), 1017-1029, 2019.
48. Imamura, K., Izumi, Y., Watanabe, A., Tsukita, K., Woltjen, K., Yamamoto, T., Hotta, A., Kondo, T., Kitaoka, S., Ohta, A., Tanaka, A., Watanabe, D., Morita, M., Takuma, H., Tamaoka, A., Kunath, T., Wray, S., Furuya, H., Era, T., Makioka, K., Okamoto, K., Fujisawa, T., Nishitoh, H., Homma, K., Ichijo, H., Julien, J. Obata, N., Hosokawa, M., Akiyama, H., Kaneko, S., Ayaki, T., Ito, H., Kaji, R., Takahashi, R., Yamanaka, S., and Inoue, H., The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis, *Sci. Transl. Med.*, 9 (291), eaaf3962, 2017.
49. Li, H. L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., Yamamoto, T., Yamanaka, S., Hotta, A., Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Reports*, 4 (1), 143-154, 2015.
50. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337 (6096), 816-821, 2012.
51. Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Yamada, Y., Morizane, A., Takahashi, J., Ayaki, T., Ito, H., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Watanabe,

- D., Hioki, H., Kaneko, T., Makioka, K., Okamoto, K., Takuma, H., Tamaoka, A., Hasegawa, K., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kawata, A., Yoshida, M., Nakahata, T., Takahashi, R., Marchetto, M. C. N., Gage, F. H., Yamanaka, S., and Inoue, H., Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells, *Sci. Transl. Med.*, 4 (145), 145ra104, 2012.
52. Arifuzzaman, M., Ito, A., Ikeda, K., Kawabe, Y., and Kamihira, M., Fabricating muscle-neuron constructs with improved contractile force generation, *Tissue Eng. Part A*, 25 (7-8), 563-574, 2019.
53. Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S. I., and Sasai, Y., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity, *Neuron*, 28 (1), 31–40, 2000.
54. Mizuseki, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Muguruma, K., Ikeya, M., Nishiyama, A., Arakawa, A., Suemori, H., Nakatsuji, N., Kawasaki, H., Murakami, F., and Sasai, Y., Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (10), 5828–5833, 2003.
55. Paerhati, P., Ito, A., Yoshioka, K., Iwamoto, K., Fujiwara, S., Horie, M., Kawabe, Y., and Kamihira, M., Neural differentiation of mouse induced pluripotent stem cells using cadherin gene-engineered PA6 feeder cells, *J. Biosci. Bioeng.*, 127 (5), 633–640, 2019.
56. Seidl, K., Erck, C., and Buchberger, A., Evidence for the participation of nerve growth factor and its low-affinity receptor (p75^{NTR}) in the regulation of the myogenic program, *J. Cell. Physiol.*, 176 (1), 10–21, 1998.
57. Greene, L. A., Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium, *J. Cell Biol.*, 78 (3), 747–755, 1978.
58. Ikeda, K., Ito, A., Sato, M., Kawabe, Y., and Kamihira, M., Improved contractile

- force generation of tissue-engineered skeletal muscle constructs by IGF-I and Bcl-2 gene transfer with electrical pulse stimulation, *Regen. Ther.*, 3, 38-44, 2016.
59. Kennedy, K. A. M., Porter, T., Mehta, V., Ryan, S. D., Price, F., Peshdary, V., Karamboulas, C., Savage, J., Drysdale, T. A., Li, S., Bennet, S. A. L., and Skerjanc, I. S., Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative beta-catenin, *BMC Biol.*, 7, 67, 2009.
60. Pawlowski, M., Ortamann, D., Bertero, A., Tavares, J. M., Pedersem, R. A., Vallier, L., and Kotter, M. R. N., *Stem Cell Reports*, 8 (4), 803-812, 2017.
61. Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M., *Nature*, 435 (7044), 948-953, 2005.
62. Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A., Identification of programmed cell death in Situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J. Cell Biol.*, 119 (3), 493-501, 1992.
63. Tatsumi, T., and Fliss, H., Hypochlorous acid mobilizes intracellular zinc in isolated rat heart myocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 26 (4), 471-479, 1994.
64. The involvement of the apoptosis-modulating proteins ERK 1/2, Bcl-xL and Bax in the resolution of acute inflammation *in vivo*, Sawatzky, D. A., Willoughby, D. A., Colville-Nash, P. R., and Rossi, A. G., *Am. J. Pathol.*, 168 (1), 33-41, 2006.
65. Csordás, G., Madesh, M., Antonsson, B., Hajnóczky, G., tcBid promotes Ca²⁺signal propagation to the mitochondria: control of Ca²⁺permeation through the outer mitochondrial membrane, *EMBO J.*, 21 (9), 2198-2206, 2002.
66. Roy, S. S., Nadesh, M., Davies, E., Antonsson, B., Danial, N., and Hajnóczky, G., Bad targets the permeability transition pore independent of Bax or Bak to switch between Ca²⁺-dependent cell survival and death, *Mol. Cell*, 33 (3), 377-388, 2009.
67. Vandeburgh, H., Shansky, J., Benesch-Lee, F., Barbata, V., Reid, J., Thorrez, L., Valentini, R., and Crawford, G., *Muscle Nerve*, 37 (4), 438-447, 2008.

68. Sato, K., Iemitsu, M., Aizawa, K., and Ajisaka, R., Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 294 (5), E961-968, 2008.
69. Wang, H., Kubica, N., Ellisen, L. W., Jefferson, L. S., Kimball, S. R., Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1, *J. Biol. Chem.*, 281 (51), 39128-39134, 2006.
70. Dutka, T. L., Lambole, C. R., McKenna, M. J., Murphy, R. M., and Lamb, G. D., Effects of carnosine on contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in human skeletal muscle fibers, *L. Appl. Physiol.*, 112 (5), 728-736, 2012.
71. Hannah, R., Stannard, R. L., Minshull, C., Artioli, G. G., Harris, R. C., Sale, C., β -Alanine supplementation enhances human skeletal muscle relaxation speed but not force production capacity, *J. Appl. Physiol.*, 118 (5), 604-612, 2015.
72. Mironov, V., Visconti, R. P., Kasyanov, V., Forgacs, G., Drake, C. J., and Markwald, R. R., Organ printing: tissue spheroids as building blocks, *Biomaterials*, 30 (12), 2164-2174, 2009.
73. Kamei, K., Kato, Y., Hirai, Y., Ito, S., Satoh, J., Oka, A., Tsuchiya, T., Chen, Y., and Tabata, O., Integrated heart/cancer on a chip to reproduce the side effects of anti-cancer drugs *in vitro*, *RSC Adv.*, 7, 36777-36786, 2017.

謝辞

本論文は九州大学大学院工学府化学システム工学専攻において行われた研究の成果についてまとめたものであります。

本研究を遂行するにあたり、5年間の研究生活の中で終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜り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するとともに厚く御礼申し上げます。先生からは研究だけでなく、研究に取り組む上での姿勢や正しい研究者像を学ばせていただきました。また様々な学会参加の機会を与えていただき、広い視野と多くの知見を身に付けることができました。誠に有難うございました。

本論文の審査にあたり、有意義な議論をさせていただき、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、並びに九州大学大学院工学研究院機械工学部門 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、実験手法から実験を進める上での考え方に至るまで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（現、名古屋大学大学院工学研究科化学システム工学専攻 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。

本研究の第 4 章において実験に使用する細胞や資料を提供していただいた 京都大学 iPS 細胞研究所 櫻井 英俊 准教授、並びに 京都大学 iPS 細胞研究所臨床応用研究部門主任研究員 堀田 秋津 博士には心より感謝申し上げます。また、第 5 章において実験に使用するマイクロデバイスを提供していただいた 名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻 清水 一憲 准教授にも心より感謝申し上げます。

本研究に取り組むにあたり、iPS 細胞の培養技術や知識に関して事細かに教えて頂いた 京都大学環境安全保健機構放射線管理部門 堀江 正信 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、同じ研究チームとして多大な御協力を頂いた、池田 一史氏、吉開 太一氏、佐藤 圭一郎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。

令和 2 年 1 月

吉岡 貫太郎