

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 :

氏 名 : 吉岡 貫太郎

論 文 名 : 組織工学的アプローチによる筋収縮モデルの構築

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

人体において筋肉は骨格の基礎となり、収縮運動による生命活動には必要不可欠である。筋肉は運動神経細胞からのシグナル伝達により筋収縮が起こるが、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) のような運動神経細胞が変性する疾患では正常に筋収縮が出来ず、筋萎縮により死に至る。またジストロフィンの欠損が筋肉自身にみられるデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) のような疾患でも、筋萎縮が引き起こされ、死に至る。このように筋収縮に関する疾患は死に直結するものの、その多くは未だ有効な治療法が確立されておらず、現在でも薬剤スクリーニング等により広く研究が進められている。既往の研究における運動神経疾患や筋疾患に対する薬剤スクリーニング系は細胞の形態や遺伝子解析等を主にしたものが多く、筋収縮に関する機能を調べた報告は未だ少ない。その一方で、筋分化を促進することが報告されている薬剤を筋管や筋組織に対して添加しても、分化率や筋管の太さと筋収縮活性が相関していないことが報告されており、この事実は筋収縮活性評価が薬剤スクリーニングにおいて重要であることを示している。

以上の背景を踏まえ、本研究ではマウス iPS 細胞由来運動神経細胞 (i-MN) と C2C12 細胞を共培養し、運動神経細胞の機能を評価可能な筋収縮モデル、筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞 (DMD-iPSc) を利用した筋収縮モデル、マイクロデバイスを用いたハイスループット性を有する筋収縮モデルの 3 種類のモデル系の構築を試みた。

第 1 章では、本研究の背景と目的を説明し、本研究の意義と方針を示した。

第 2 章では、本研究に関する既往の研究を概説し、本研究の位置付けを明確にした。

第 3 章では、i-MN とマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を共培養し、神経伝達物質であるグルタミン酸や アセチルコリン受容体阻害剤であるクラレの添加に応じて、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を構築した。平面培養において筋芽細胞上に i-MN を播種し、筋分化誘導を行なった。そして グルタミン酸を添加することで筋収縮が起こり、クラレ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、神経筋接合部の特徴であるアセチルコリン受容体の集積が観察され、グルタミン酸やクラレの添加に応じて収縮力が変化したことから、運動神経細胞の機能評価に有用であることが示唆された。

第 4 章では、健常人由来 iPS 細胞 (Healthy-iPSc)、DMD-iPSc、DMD-iPSc を遺伝子治療した iPS 細胞 (Cri-iPSc) を用いた筋収縮モデルを構築した。筋収縮活性が向上させるために 2 条件の電圧で電気刺激培養を全ての細胞株に対して行ったところ、Healthy-iPSc と Cri-iPSc に関しては電圧の強弱に関わらず筋収縮活性が向上した一方で、DMD-iPSc から分化誘導した筋管では、強い電圧の電気刺激培養では筋収縮活性の向上は見られなかった。この結果より、電気刺激培養は iPS 細胞由来筋管の筋成熟に有用であり、遺伝子治療が筋機能回復に対して有効であることが示唆され

た。また DMD-iPSc において筋収縮活性が向上しなかった原因を探るため、アポトーシス活性を TUNEL 法により調べたところ、DMD-iPSc を強電圧で電気刺激培養した条件で、TUNEL 陽性細胞が観察された。さらに Ca^{2+} のキレート剤添加により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は Ca^{2+} の細胞への流入が起因していることが示唆された。最後にアポトーシス阻害剤である Vax 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。この結果より、DMD 患者由来 iPSc 細胞を利用した筋収縮モデルが構築でき、DMD 治療の新たなアプローチの提案に繋がったと考えられる。

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磁力を利用し組織を作製する **Magnetic force-based tissue engineering (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 テストステロンやデキサメタゾンの添加に応じた収縮力の変化が観察されたことから、マイクロ筋組織が薬剤スクリーニングに適用できることを示した。また細胞源として hiPS 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-カルノシン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。

〔作成要領〕

1. 用紙はA4判上質紙を使用すること。
2. 原則として、文字サイズ10.5ポイントとする。
3. 左右2センチ，上下2.5センチ程度をあげ，ページ数は記入しないこと。
4. 要旨は2,000字程度にまとめること。
(英文の場合は，2ページ以内にまとめること。)
5. 図表・図式等は随意に使用のこと。
6. ワードプロ浄書すること（手書きする場合は楷書体）。
この様式で提出された書類は，「九州大学博士学位論文内容の要旨及び審査結果の要旨」
の原稿として写真印刷するので，鮮明な原稿をクリップ止めで提出すること。