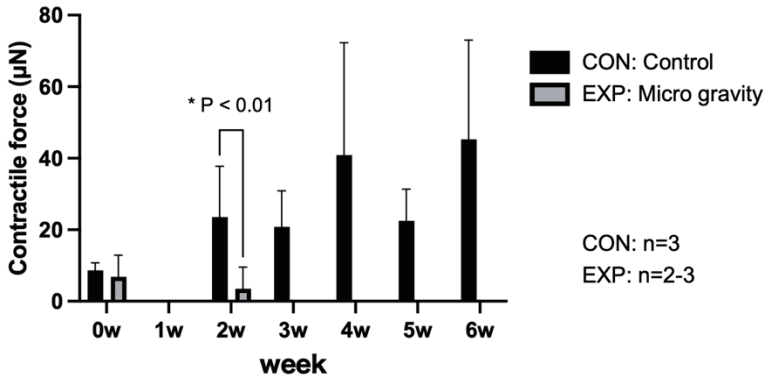
197　力学的環境制御に基づく筋疾患モデルの開発	横山　奨

【目的】近年、筋萎縮の予防・改善を目的とした機能性食品や新薬の開発が活発化している。これまでは、動物実験が薬物動態を予測する上で重要な役割を果たしており、人体に対する薬効評価を担ってきた。動物実験は外的要因が多く定量性に劣る面があり、より定量的かつ迅速に薬効評価が行える細胞アッセイツールが求められている。また、倫理的な指摘から動物実験の規模は縮小を余儀なくされており、これまでのような薬効評価プロセスの維持は難しくなっている。本研究テーマでは、著者グループが開発した筋オルガノイドに対して微小重力環境を付与することで擬似的に廃用性筋萎縮を再現し、力学的環境制御に基づく筋疾患モデルとして活用することを目標としている。

【方法】研究者グループが開発した人工骨格筋に対して、クリノスタットを用いて微小重力環境下で培養することで、力学的環境制御に基づく筋疾患モデルが実現可能かを検討した。クリノスタットのフレームに適した人工骨格培養デバイスを開発し、そのデバイスの中で人工骨格筋の培養を行った。細胞培養デバイスは、生分解性プラスチックの一種であるポリ乳酸（PLA）のフィラメントを用いて 3D プリンタで作製し、ガス透過性があるシリコーンゴムシートで密閉した。このデバイスの中に入れた人工骨格筋を微小重力環境下におき、電気刺激を付与する収縮力測定を行い、収縮力の評価を行うことで疾患モデルとして成立しているかを確認した。

【結果】人工骨格筋を通常培養する群（CON 群）とクリノスタットに入れて培養する群（EXP 群）に分けてそれぞれを培養したとき、2 週目には EXP 群の収縮力が大きく減少した。3 週目以降は、CON 群の収縮力が増大傾向を示すのに対し、EXP 群は収縮力が測定できないほど小さかった。以上の結果は、無重力状態による運動機能低下状態を再現でき、力学的環境制御に基づく筋疾患モデルの開発に成功したことを示唆している。しかし、いずれも n＝3 であることを留意する必要がある。これは、クリノスタット用人工骨格培養デバイスの性能不足に起因した実験回数の不足が原因である。開発したクリノスタット用人工骨格培養デバイスを用いての微小重力環境下での人工骨格筋培養は可能であることは確認できたが、ボルト締結の不備による液体培地の流出や、滅菌の困難さに伴うコンタミネーションの発生など様々な問題点が見つかった。今後は、ボルト締結を必要としない密閉方式を含めユーザビリティの改善を図る計画である。

人工骨格筋が発揮する収縮力の推移



197. 力学的環境制御に基づく筋疾患モデルの開発

横山　奨

大阪工業大学 工学部 機械工学科 マイクロ流体力学研究室

Key words：人工骨格筋，クリノスタット，筋疾患モデル，収縮力，薬効評価

緒　言

私たち人間は年齢を重ねるにつれて筋力が低下し、筋力の低下が各種疾患や寝たきりなどの日常生活が満足にできないような症状を誘発する。一般に、筋肉を構成しているタンパク質（筋タンパク質）は常に分解と合成を繰り返し、筋力量を一定に維持しているが、加齢や活動量の不足により筋タンパク質の合成量が低下し、分解量が合成量を上回る。これにより筋肉量が減少し、身体の運動機能が低下することで寝たきりの状態になる。このような症状をサルコペニア（加齢性筋肉減弱現象）といい、近年の高齢化に伴いサルコペニアの患者数は増加の一途を辿っている。現在、この症状に適した具体的な治療法はなく、効果的な治療法の確立を目指した研究が盛んに行われている。

従来の研究手法では、マウスなどのモデル動物を利用した動物実験による評価が一般的である。しかし、動物実験は外的要因が多く個体差によって定量性に劣る面があり、より定量的かつ迅速に薬効評価が行える細胞アッセイツールが求められている。

一般に、骨格筋は重力や運動負荷に対応してその構造や代謝を変化させることができる組織だが、微小重力環境下では骨格筋に対する物理的負荷が低下し、骨格筋が萎縮することが研究されている。マウス筋芽細胞株 C2C12 に関しては、微小重力環境が与える影響について幾つかの先行研究が報告されている。微小重力環境下で培養された C2C12 細胞株の mTOR 経路を調べ、骨格筋の萎縮の原因を調査している。実験の結果、微小重力環境下では細胞の成長に必要なタンパク質合成量やタンパク質合成速度が低下し、骨格筋の質量、サイズ、強度が低下していることが分かり、筋委縮が引き起こされることが実証されている［1，2］。

本研究では、研究者グループが開発した人工骨格筋［3］に対して、クリノスタットを用いて微小重力環境を付与し、筋疾患モデルを開発することを目的としている。クリノスタットのフレームに適した人工骨格培養デバイスを開発し、そのデバイスの中で人工骨格筋の培養を行った。細胞培養デバイスは、生分解性プラスチックの一種であるポリ乳酸（PLA）のフィラメントを用いて 3D プリンタで作製し、ガス透過性があるシリコーンゴムシートで密閉した。このデバイスの中に入れた人工骨格筋を微小重力環境下におき、電気刺激を付与する収縮力測定を行い、収縮力の評価を行うことで疾患モデルとして成立しているかを確認した。

方　法

1. クリノスタット用人工骨格培養デバイスの開発

クリノスタットとは、試料を搭載した回転体を直交 2 軸まわりに回転させ、搭載試料に作用する重力ベクトルの方向を変化させることにより、時間平均としての重力を相殺することのできる装置である。3 軸の時間平均重力が 0 に近づくため、見かけ上の無重力環境が作り出される。この装置を用いることで、宇宙空間での実験、航空機や落下塔などの大型の機械や施設を利用せずに研究室で微小重力実験が可能となる。細胞培養の研究だけでなく、植物や微生物の研究などの分野で使用されている。ただし、装置の性質上マウスなどを用いた動物実験への応用は難しく、実用的実験成果は少ない。動物実験の際は対象動物を壁面に固定する必要があり、微小重力環

境による影響なのか固定によるストレス等の影響なのかを切り分けることは困難である。結果として、微小重力再現装置は植物や細胞を用いた実験に限定されている。筋オルガノイドは固定によるストレス等を考慮する必要が無く生体再現性も高いため、微小重力再現装置の対象物としては最適と言える。

ただし、当然ではあるが対象物は 360°回転させられるため、一般的な細胞培養用シャーレやウェルプレートでは液体培地が流出してしまう。そこで、本研究ではガス交換と液体培地の密閉を実現するクリノスタット用人工骨格培養デバイスを開発した。

クリノスタット用人工骨格培養デバイスは 3D CAD を用いて市販のクリノスタット（Zeromo CL-1000、Kitagawa Iron Works Co. Ltd.）の内フレームに収容可能であり、また、本大学で開発した細胞培養台［4］を格納可能な設計とした（図 1）。クリノスタットを作動させている際の液体培地の流出を防ぐため、土台に蓋をしてボルトで締結するデザインとした。製作したデバイスの土台部分と蓋の部分の間に酸素透過性があるシリコーンゴムシートを PDMS（polydimethylsiloxane）で接着する。PDMS は、シリコーンゴムの一種で細胞親和性とガス透過性を有する。細胞を培養するうえで酸素と二酸化炭素の交換が必要なため、シリコーンゴムを PDMS で接着することでガス交換能を維持しつつ、液体培地を密閉することができる。シリコーンゴムシートを接着した後、70%エタノール内に浸漬し滅菌を行う。

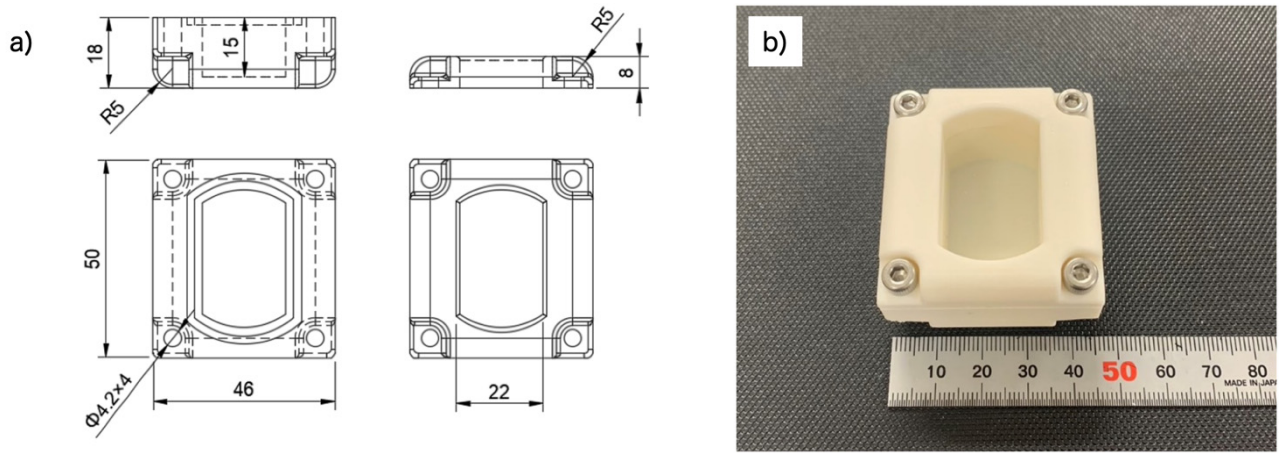


図 1. クリノスタット用人工骨格培養デバイス

a）クリノスタット用人工骨格培養デバイスの図面。Zeromo CL-1000の内フレームに収容可能なサイズとした。

b）3Dプリンタで作製したクリノスタット用人工骨格培養デバイス。生分解性プラスチックの一種であるポリ乳酸（PLA）のフィラメントを用いて3Dプリンタで作製し，ガス透過性があるシリコーンゴムシートで密閉。ステンレス製のボルトとナットを用いて締結する。細胞親和性を保ちつつ、液体培地の流出阻止とガス交換能維持を両立する。

2. 人工骨格筋の作製

本研究で使用する骨格筋は、収縮力を有する人工的に作り出した筋肉である。骨格筋はマウス横紋筋由来株化細胞である C2C12 細胞株とコラーゲンゲルを用いて作製する［3］。培養期間は 4 週間とし、1 週間に 1 度の頻度で収縮力の測定を行った。

3. 人工骨格筋の収縮力測定

マウス筋芽細胞株 C2C12 を培養した人工骨格筋 9 個（1 週目）のサンプルを 2 つのグループ（微小重力環境

下で培養する群と通常培養する群）に分ける。微小重力環境下で培養する群（EXP 群）は、作製したデバイスに人工骨格筋を取り付けた培養台と DM 培地（DMEM、gibco）を入れた状態でクリノスタットに挿入して CO_2インキュベータに入れる。一方で、通常培養する群（CON 群）はクリノスタットに搭載せずに CO_2インキュベータに入れて静置する。1 週間に 2 度、培地交換を行うと同時に電気刺激を付与して人工骨格筋の収縮力を測定する実験を行った。電気刺激装置（C-PACE EP、IONOPIX）により 20 V、30 Hz、2 mm/s の条件下で電気刺激を付与した。電気刺激装置から電極にコードを取り付け、倒立顕微鏡に取り付けられたカメラを使って電気刺激を付与時の人工骨格筋の様子を動画で撮影する。動画の撮影は 30 秒間行い、電気刺激装置を与える時間は 10 秒～20 秒の間とした。倒立顕微鏡に人工骨格筋を乗せ、電気刺激を付与したときの人工骨格筋の収縮に伴うピラーの変位を撮影した。撮影した動画から画像解析ソフト（ImageJ、NIH）を用いてピラーの変位を測定した。ピラーのバネ定数は事前に測定済みであるため、ピラーの変位量から人工骨格筋の収縮力を算出することが可能である。

結果および考察

1. 微小重力が人工骨格筋に及ぼす影響

人工骨格筋の培養開始 0 週目から 1 週目にかけては通常培養し、2 週目から EXP 群と CON 群に分けてそれぞれで収縮力測定を行った。図 2 に、6 週にわたっての収縮力の推移を示す。

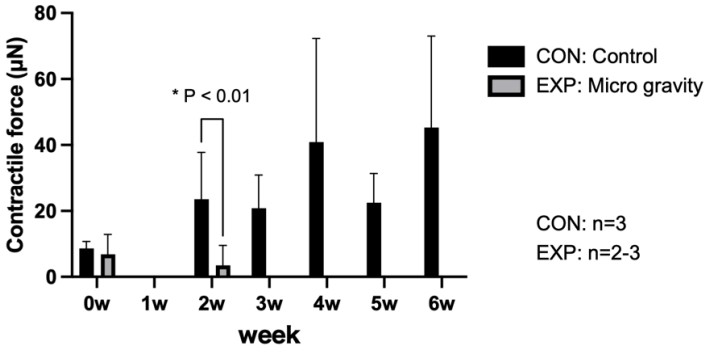


図 2. 人工骨格筋が発揮する収縮力の推移

通常培養する群（CON 群）は増減があるものの収縮力は増加傾向を示す。微小重力環境下で培養する群（EXP 群）は収縮力が 2 週目から減少、3 週目以降は測定できないほど減少した。そのため、3 週目以降は評価不可能であるが、2 週目時点では有意に収縮力が変化し、筋萎縮の傾向を確認した。ただし、いずれも n＝3 であることを留意する必要がある。エラーバーは平均値±標準偏差を示し、有意差は t 検定を用いて評価した。

人工骨格筋を通常培養する群（CON 群）とクリノスタットに入れて培養する群（EXP 群）に分けてそれぞれを培養したとき、2 週目には EXP 群の収縮力が大きく減少した。3 週目以降は、CON 群の収縮力が増大傾向を示すのに対し、EXP 群は収縮力が測定できないほど小さかった。以上の結果は、無重力状態による運動機能低下状態を再現でき、力学的環境制御に基づく筋疾患モデルの開発に成功したことを示唆している。しかし、いずれも n＝3 であることを留意する必要がある。これは、クリノスタット用人工骨格培養デバイスの性能不足に起因した実験回数の不足が原因である。開発したクリノスタット用人工骨格培養デバイスを用いての微小重力環境下での人工骨格筋培養は可能であることは確認できたが、ボルト締結の不備による液体培地の流出や、滅菌の困難

さに伴うコンタミネーションの発生など様々な問題点が見つかった。ポリ乳酸（PLA）のフィラメントを用いて3D プリンタで作製したクリノスタット用人工骨格培養デバイスは長期間の液体培地への接触により、膨潤し形状が変形することも確認された。以上の結果を踏まえ、素材の変更、ボルト締結を必要としない密閉方式への変更などユーザビリティの改善を図り、より効率的な実験遂行が可能になるようクリノスタット用人工骨格培養デバイスを改良する計画である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪工業大学生命工学科バイオマテリアル研究室の藤里俊哉教授である。また、実験の実施において大阪工業大学総合人間系教室健康体育研究室の中村友浩教授にご助力頂いた。

文　献

1） Mi-Ock B, Chi B A, Hye-Jeong C, Ji-Young C, Kuk H S, Mee-Sup Y. Simulated microgravity inhibits C2C12 myogenesis via phospholipase D2-induced Akt/FOXO1 regulation. Sci Rep-uk, 2019 9;1;14910. PMID: 31624287 DOI: 10.1038/s41598-019-51410-7

2） Yuzawa R, Koike H, Manabe I, Oishi Y. VDR regulates simulated microgravity-induced atrophy in C2C12 myotubes. Sci Rep-uk, 2022 12;1: 1377. PMID: 35082348 DOI: 10.1038/s41598-022-05354-0

3） Takagi S, Nakamura T, Fujisato, T. Effect of heat stress on contractility of tissue-engineered artificial skeletal muscle. J Artif Organs. 2018 21:207–214. PMID: 29362934 DOI: 10.1007/s10047-018-1020-y

4） Sugimoto T, Nakamura T, Yokoyama S, Fujisato T, Konishi S, Hashimoto T. Investigation of brain function-related myokine secretion by using contractile 3D-engineered muscle. Int J Mol Sci. 2022 23; 5723:1-10. PMID: 35628536 DOI: 10.3390/ijms23105723