

C319

機能性磁性ナノ粒子を用いて作製した人工筋組織の機能評価

(九大院シス生命) ○ (学) 山本泰徳, (九大院工・化工) (正) 井藤 彰, (正) 河邊佳典,
(豊田中研) 藤田英明, (正) 長森英二, (九大院シス生命, 九大院工・化工) (正) 上平正道

1. 緒言

筋芽細胞を用いて作製した筋組織は、再生医療分野やアクチュエータへの応用が可能と考えられる。従来の筋組織作製法では、人工足場材料がしばしば用いられるが、足場材料を使用する場合は、高密度の細胞が特定方向に配向した生体内の筋組織と同様な、筋組織を誘導することは困難である。我々は以前、足場材料を使わない新しい三次元筋組織構築法として、機能性磁性ナノ粒子で標識した細胞を磁石で集積し、筋分化誘導培地で培養することで、高密度の細胞が特定方向に配向した誘導筋組織の作製に成功している (参考文献1)。今回は、筋分化誘導した人工筋組織の生化学的および力学的評価の結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 誘導筋組織の生化学的評価

磁力を用いた筋組織作製法については、我々が以前開発した方法で行った (参考文献1)。筋組織分化誘導7日目の筋組織について、抗 α -actinin 抗体、ファロイジンおよび DAPI による免疫組織染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。また、筋分化誘導マーカーに関する Myogenin、筋形成・筋収縮に関する Myosin Heavy Chain および Tropomyosin の発現を確認するために、分化誘導0、2、7、12、17日目の筋組織においてウエスタンブロット解析を行った。

2.2 誘導筋組織の力学的評価

分化誘導7日目の筋組織で、Rheobase、Chronaxie を測定することで、誘導筋組織の興奮性について評価した。Rheobase はパルス幅を 10 ms に固定して、印加電圧を変化させた時の最大収縮応答をプロットし、最大収縮応答時の 50% (50%Pt) 時の印加電圧を Rheobase とした。また、Chronaxie は印加電圧を Rheobase の 2 倍値に固定して、パルス幅を変化させた時の最大収縮応答をプロットし、50%Pt 時のパルス幅を Chronaxie とした。Chronaxie の値が低ければ低い程、興奮性の高い筋組織といえる。また、分化誘導7日目の筋組織で、周波数を変化させた時の収縮応答について調べた。

3. 実験結果及び考察

3.1 誘導筋組織の生化学的評価

Fig. 1A に α -actinin 染色、ファロイジン染色、DAPI 染色の共焦点レーザー顕微鏡像を示す。筋芽細胞同士が細胞融合して筋細胞になり、その後、成熟すると筋収縮装置である横紋が形成され、筋繊維となる。矢印で示したように、筋収縮を制御している横紋を観察す

ることができた。ウエスタンブロット解析の結果、筋分化誘導マーカーである Myogenin については、day2 において最も発現量が高く、その後は低く保たれた。これは、Myogenin が筋分化誘導の転写因子であるため、分化初期の段階で最も多く発現し、その後、筋分化が進行するにつれて減少していったと考えられる。筋形成、筋収縮に関する Myosin Heavy Chain、Tropomyosin については、day2 から徐々に発現量が増加した。

3.2 誘導筋組織の力学的評価

人工筋組織3本に対して Rheobase と Chronaxie を求めた結果、Rheobase は 4.45 ± 0.65 V、Chronaxie は 0.72 ± 0.087 ms となった。これらの値は、生理的な筋組織の範囲内であり、興奮性の高い筋組織を作製することができたものと考えられる。次に周波数を変化させた時の収縮応答について調べたところ、周波数に応じた収縮応答を示した (Fig. 1B)。また、周波数が高くなった際に発生する力が大きくなったが、これは、生体内の骨格筋で見られる強縮が生じたためと考えられる。

これらの結果から、機能性磁性ナノ粒子を用いて作製した人工筋組織は、生体組織と同様の機能性を有していることが明らかになった。

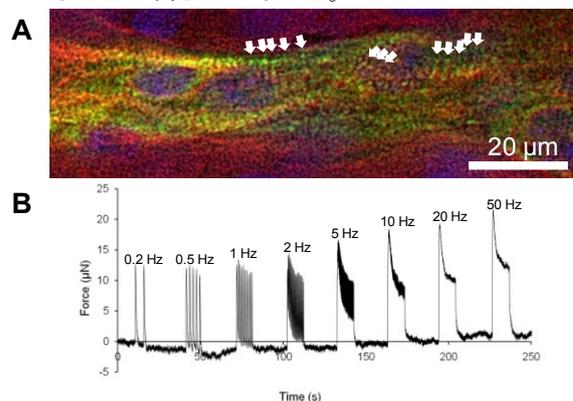


Fig. 1 誘導筋組織の生化学的評価と力学的評価

A) 誘導筋組織の組織学的評価 (免疫染色)

B) 周波数を変化させた時の収縮応答

参考文献:

1) Yamamoto, Y., Ito, A., Kato, M., Kawabe Y., Shimizu, K., Fujita, H., Nagamori, E., and Kamihira, M.: Preparation of artificial skeletal muscle tissues by a magnetic force-based tissue engineering technique, J. Biosci. Bioeng., 108(6):538-43 (2009).

*Tel: 092-802-2743, Fax: 092-802-2793.

e-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp