

コラーゲンスポンジを用いた培養骨格筋組織の構築

Collagen Sponge scaffold for Tissue-Engineered Skeletal Muscle

○ 掃部貴文 (大阪工大) 中村友浩 (大阪工大) 藤里俊哉 (大阪工大)

Takafumi KAMON, Osaka Institute of Technology
Tomohiro NAKAMURA, Osaka Institute of Technology
Toshia FUJISATO, Osaka Institute of Technology

Abstract: Tissue-engineered skeletal muscle has been attempted using natural macromolecular scaffolds for the reconstruction of skeletal muscle loss. However, it is still a big challenge to construct a matured muscle tissue in vitro having applicable mass to tissue transplantation. In this study, a collagen sponge having uniaxial porous structure was developed and applied to a scaffold for skeletal muscle cell seeding. After the cell seeding, the construct was cultured by medium flow bioreactor to have tissue-engineered skeletal muscle. The tissue engineered muscle was then implanted under the skin of adult nude mouse and subjected to histological evaluation. Bioreactor could maintain the tissue-engineered skeletal muscle of three-dimensional structure having diameter of about 13 mm and length of 20 mm. This system may support the formation of oriented myotube structure and improve the nutrient supply in large tissue-engineered construct.

Key Words: Tissue-Engineered Skeletal Muscle, Collagen Sponge, Bioreactor

1. 緒言

三次元培養骨格筋は事故や腫瘍の摘出で広範囲に欠損した骨格筋の移植片として期待できる。また、筋ジストロフィーのような先天性の遺伝子疾患を治療する手段としても使用できる可能性がある。先行研究では *in vitro* で細胞自身を集めて収縮する培養筋の作製⁽¹⁾や配向したスキャフォールド上で筋細胞を培養し三次元化する⁽²⁾試みが報告されている。我々はすでにコラーゲングルを用いた直径 0.4 mm, 長さ 15 mm の三次元構造を持つ培養骨格筋を作製した。そして、電気刺激により、生体のような収縮特性を示すことを報告してきた。しかしながら、移植片として利用するにはスケールアップし、かつ成熟した筋組織構造を構築することが課題である。組織工学的に大きな構造物を作製するには栄養供給をする血管構造が必要である。そこで、本研究では培養骨格筋構造の大型化を目的として、一軸配向空隙を有するコラーゲンスポンジを開発し、筋芽細胞をスキャフォールド内に循環させ播種した。播種後、バイオリアクターによる培養骨格筋の維持及びヌードマウスへの移植を施し、組織学的な評価を行った。

2. 実験

2-1 コラーゲンスポンジ

直径 13 mm, 長さ 20 mm のテフロンチューブに Type I コラーゲン溶液を充填し、液体窒素でチューブの下部から上部にかけて徐々に凍結した。チューブ内のコラーゲン溶液全体が凍結した後、 -20°C で 3 日間凍結乾燥を行い、 120°C で 1 日間の熱架橋処理を施した。走査型電子顕微鏡(SEM)による観察を行った。

2-2 細胞培養

筋芽細胞として、マウス横紋筋由来株細胞 C2C12 細胞を使用した。C2C12 細胞は 0.25 % Trypsin-EDTA 溶液を使用し、回収した。増殖培地(GM)は 10 %ウシ胎児血清、抗生物質を含む High-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium(HG-DMEM)を使用した。分化培地(DM)は 7 %ウマ血清、抗生物質を含む HG-DMEM を使用した。培養は 37°C , 5 % CO_2 , 95 %大気, 湿度 100 %の環境下で行い、培養液の交換は 2 日毎に行った。

2-3 バイオリアクター

シリコンチューブ, アクリル, ゴム栓, 50 ml シリンジ, 5 ml シリンジ, エラスターを用いて培養槽を作り, コラーゲンスポンジをエラスターに吊下げ, ローラーポンプで強制的に循環させるバイオリアクターを作製した(Fig. 1A)。コンフルエントになった C2C12 細胞を 0.25 % Trypsin-EDTA 溶液でディッシュから剥がし, 細胞数 1.0×10^7 cells, 10 ml GM の細胞懸濁液を作製し, 流量 0.2 ml/s でコラーゲンスポンジへ循環させた(Fig. 2)。1 日間循環播種後, ポリカーボネート, キルシュナー鋼線を用いて培養骨格筋を長さ 20 mm に固定し(Fig. 1B), バイオリアクターに取り付け, 10 ml DM にて 1 週間循環培養を行った。培地交換は毎日行った。

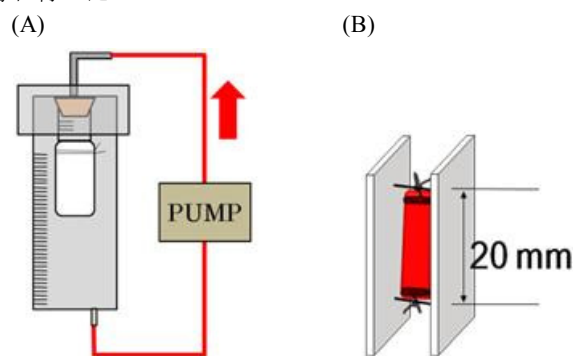


Fig.1 Bioreactor

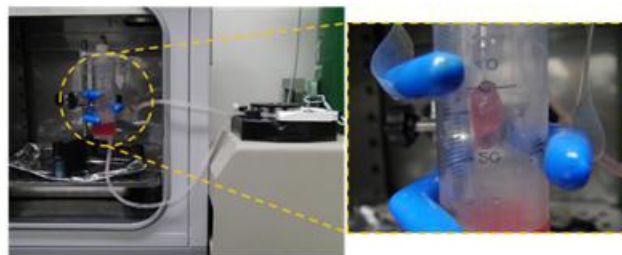


Fig. 2 Bioreactor system

2-4 組織学的評価と移植

成体ヌードマウスへ1日間循環播種したコラーゲンスポンジを皮下に移植した。1週間後、取り出し組織学的評価を行った。尚、動物実験は大阪工業大学ライフサイエンス実験倫理委員会の承認を得て行った(2010-5)。培養骨格筋は10%中性緩衝ホルムアルデヒドで1日間固定後、脱水及びキシレン置換を行った。その後、パラフィン包埋し、HE染色を行った。

3. 結果と考察

作製したロッド状コラーゲンスポンジの軸方向及び半径方向断面のSEM写真をFig. 3に示した。液体窒素内へコラーゲン溶液を徐々に浸漬させることで、一軸方向に空孔が連通した構造体が得られたことがわかる。スポンジのような空孔構造はスキヤフォールド全体にわたって形成されていた。

バイオリクターを用いて1日間循環播種した後のHE染色写真をFig. 4Aに示した。細胞懸濁液を強制的にコラーゲンスポンジ内へ循環させることで、広範囲に細胞が浸潤し、播種されている様子がわかる。培養骨格筋をDMで1週間循環培養したHE染色写真をFig. 4Bに示した。筋芽細胞は分化して筋管細胞に融合し、コラーゲンスポンジ内の配向した空孔方向に沿って筋管を形成していた。これは構造物の長さを固定することによって、細胞接着によりコラーゲンスポンジの長軸方向へ張力が加わり、配向したものであると思われる。また、コラーゲンスポンジの一軸配向構造をC2C12細胞が認識し、幾何学的環境に応じて接着し配向したと考えられる。

ヌードマウスへ移植1週間後に摘出した培養骨格筋のHE染色写真をFig. 6Aに示した。培養骨格筋構造の深部の細胞まで生存していることが確認できた。これに対して、移植1週間後のコラーゲンスポンジは表層部のみ細胞の浸潤が見られた(Fig. 6B)。

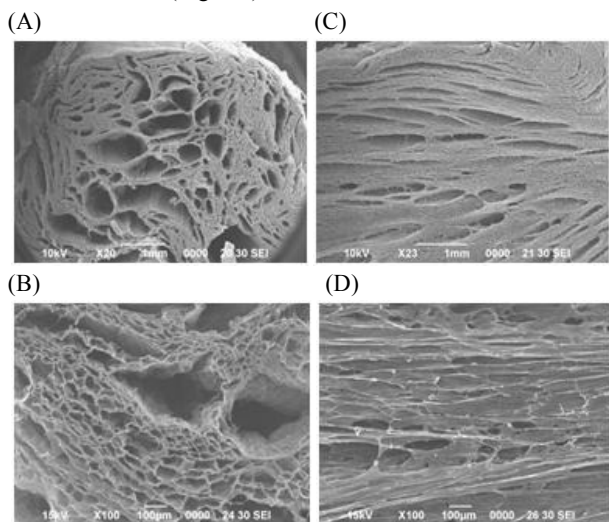


Fig. 3 The SEM images of collagen sponge scaffold. (A, B) Transverse sections. (C, D) Longitudinal sections.

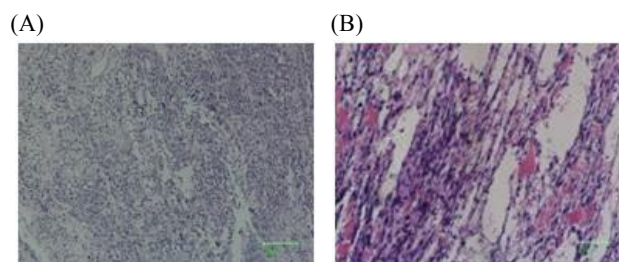


Fig. 4 Histological evaluation of collagen sponge scaffold. (A) The HE staining of seeded skeletal muscle cells in collagen sponge scaffold. Bar = 200 μ m. (B) The HE staining of cultured tissue-engineered skeletal muscle in vitro for one week. Bar = 100 μ m.

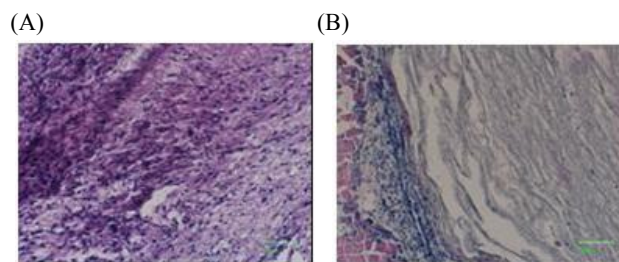


Fig. 6 (A) The HE staining of implanted tissue-engineered skeletal muscle for one week. Bar = 100 μ m. (B) The HE staining of implanted collagen sponge for one week. Bar = 100 μ m

4. 結言

C2C12細胞はバイオリクターを用いることで、構造物全体への播種及び細胞の維持ができた。そして、一軸配向構造を有するコラーゲンスポンジスキヤフォールドは筋細胞を三次元的に一方に配向させることが可能であり、配向した筋管を形成させる培養基材として有用である。さらに、内部まで栄養が浸潤しやすい構造を有していることから組織の大型化に有効である。

参考文献

- (1) Dennis, R.G., Kosnik, P.E., Excitability and contractility of skeletal muscle engineered from primary cultures and cell lines. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: C288, 2001.
- (2) V. Kroehne, H. Jockusch, Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts, *J. Cell. Mol. Med.* Vol 12, No. 5A, pp. 1640-1648, 2008.