細胞培養マイクロチップを用いた廃用性筋萎縮モデルの開発

清　水　一　憲*

Development of cell culture microchips for use of *in vitro* models of skeletal muscle disuse atrophy

Kazunori Shimizu*

We developed a microchip for culturing skeletal muscle tissues and investigated the method for inducing skeletal muscle atrophy *in vitro*. The continuous culture was performed using the microchips at different medium flow rates (2.1 and 0.42 μl/min) and we found that cultured skeletal muscle tissues at 2.1 μl/min had larger passive tension than that at 0.42 μl/min. Also, the developed tissues at 2.1 μl/min consisted longer and larger number of myotubes than that at 0.42 μl/min.

１．はじめに

廃用性筋萎縮とは、寝たきり状態などで筋肉を長期間使わないでいると筋肉が痩せて筋力が低下する病状のことである。目前に迫った超高齢化社会において社会問題になることが予想されており、廃用性筋萎縮を予防・治療する新薬の開発が求められている。医薬品開発のための廃用性筋萎縮モデルとして、後肢懸垂マウス（尾を糸で釣り上げたままにし、前肢だけで生活させるようにしたマウス）が頻用されているが、ヒトと動物の種差などからモデルとして不十分であり、動物愛護の観点からもこれに替わる新たなモデルの開発が必要である。

MEMS やμTAS 技術を応用した細胞培養マイクロチップは、培養細胞の微小環境をうまく制御することで、細胞が「生体内」で本来持っている特異的な機能を「生体外」で高度に発揮させることができる可能性があり、新たな薬効評価技術として非常に期待されている[1]。我々はこれまでに骨格筋細胞培養マイクロチップの開発を行ってきた。その中で、マイクロチップ上で骨格筋細胞を用いて骨格筋組織を作製し、その組織に「収縮する」という本来の機能を発揮させることに成功した。さらにマイクロチップに力測定機能を組み込むことで、その収縮力を測定することに成功した［2]。本研究では、これまでの知見をもとに、新たな骨格筋組織マイクロチップを開発し、収縮力変化を指標とする廃用性筋萎縮モデルを利用した薬効評価技術を開発すること目指した。

２．実験方法

デバイスの開発：使用したマイクロチップの概要を図1に示す。デバイス全体はシリコーンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン（PDMS）で作製した。マウス骨格筋筋芽細胞（C2C12）とフィブリンゲル、マトリゲルを混合した後にチップ内部に導入し、PDMS 製の両持ち梁を巻き込むように培養骨格筋組織を形成させた。形成させた骨格筋組織に電気刺激を負荷することで、筋組織が収縮し、梁のたわみ量を計測することで収縮力を算出した。

灌流培養：図2に示すように、シリンジポンプを用いて培地を灌流させながら、チップ内部での骨格筋組織の培養を行った。一定期間培養後、梁のたわみ量を測定し、

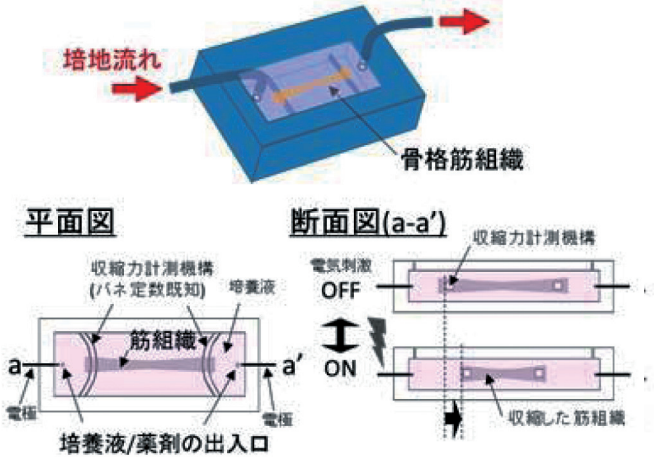

図　１．開発したマイクロチップの概要

2015年3月5日 受理
* 豊田理研スカラー
（名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻）

受動的張力と能動的張力の大きさを算出した。また分化した筋管細胞を可視化するために培養した組織の免疫染色を行った。抗α-アクチニン抗体を用いた。

リアルタイム PCR：Mouse Atrogin-1、Mouse MuRF1、Mouse Myosin Heavy Chain 2 (MYC2)、Mouse GAPDH の mRNA 発現量を定量した。

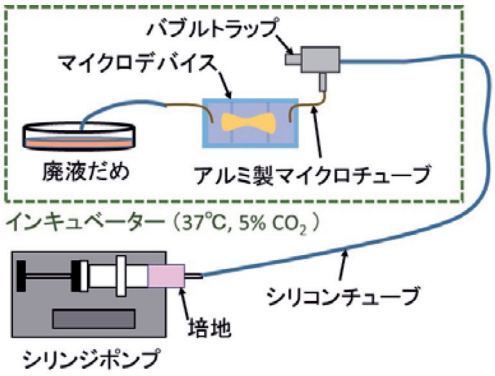

図 2．培地灌流の方法

3．結果・考察

初めに PDMS 製両持ち梁の構造解析を行った。解析には、構造解析ソフトウェアの ANSYS を利用した。両持ち梁の中心一点に荷重を負荷したところ、バネ定数が約 2 N/m と計算された。実際にデバイスを作製し、バネ定数を実測したところ、1 mN 以下で解析値と概ね一致した。これまでに C2C12 由来の培養骨格筋細胞の収縮力は数百 μN オーダーであることから、本両持ち梁で培養筋組織の収縮力を測定可能であることが示唆された。

次に開発したチップを用いて骨格筋組織の培養を行った。まず培地灌流を行わなかったところ（0 μl/min)、すべての細胞が死滅した。このことから、本チップでは培地の灌流が必須であると考えられた。そこで灌流培養の流速を変えて培養し、流速の違いが培養骨格筋組織の特性に影響を与えるのかどうかを調べた。用いた流速は 2.1、0.42 μl/min であり、それぞれの流速での滞留時間は 1、5 時間である。ゲルと混合した C2C12 をチップ内に導入した後に、分化培地（2%馬血清入り DMEM）をそれぞれの流速で 7 日間流し、培養を行った。その結果、2.1 μl/min での受動張力は 0.42 μl/min の約 1.6 倍となった（図 3)。7 日目の組織の免疫染色を行い、分化した筋管細胞を可視化し、蛍光顕微鏡で観察した（図 4)。組織全体写真（図 4 左）に示すように、2.1 μl/min で培養した組織は、0.42 μl/min で培養した組織に比べ、細くなっていた。また図 4 右に示すように、長くて太い筋管細胞を多く含んでいることが分かった。これらの結果から本チップでの培養は、流速 2.1 μl/min の方が適していることが示唆された。

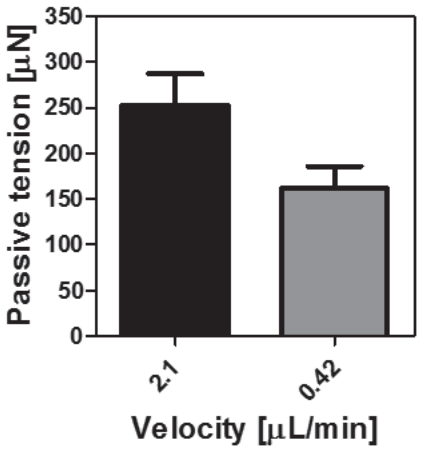

図 3．流速の受動張力への影響

さらに筋萎縮誘導法の検討も行った。培養筋組織に弛緩刺激を負荷することで萎縮が誘導されることが報告されている[3]。しかしどのようなメカニズムで萎縮を誘導しているのかは明らかになっていない。そこで萎縮モデル開発に弛緩刺激が有効であるのかを明らかにするため、弛緩刺激を負荷した培養筋組織の筋萎縮関連遺伝子の発現量変化を調べた。その結果、弛緩刺激を負荷することで MYC2 の発現量が一時的に低下することが示唆された。

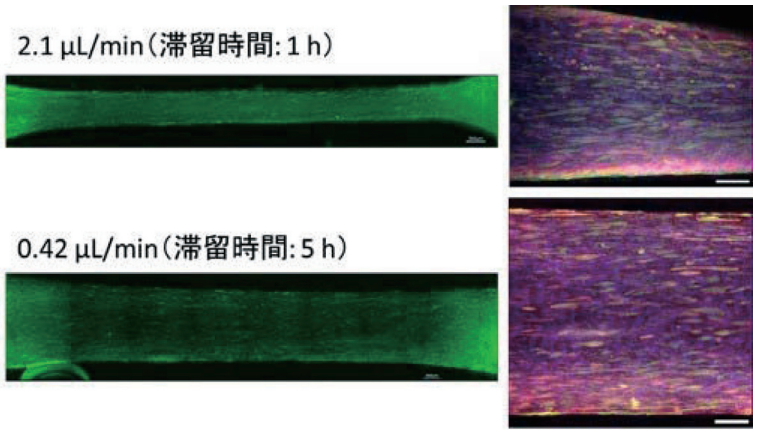

図 4．流速の分化への影響

4．おわりに

本研究では、灌流培養用の骨格筋組織培養チップを開発し、筋組織の特性に対する流速の影響を明らかにした。また筋萎縮誘導の方法として、弛緩刺激についての検討を進めた。現在、ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞の培養も行っており、今後、本成果への応用を進める予定である。

REFERENCES

（1）Williamson A, Singh S, Fernekorn U, Schober A, Lab Chip, 2013, 12, 3471-3480
（2）Shimizu K, Sasaki H, Hida H, Fujita H, Obinata K, Shikida M, Nagamori E, Biomed Microdevices, 2010, 12, 247-252
（3）Lee PH, Vandenburgh HH, Tissue Eng Part A, 2013, 19, 2147-2155