

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26630093

研究課題名(和文) コラーゲンナノファイバーを足場とした細胞培養によるバイオアクチュエータの創製

研究課題名(英文) Development of a bio-actuator by cell culture using collagen nanofibers

研究代表者

橋本 稔 (HASHIMOTO, Minoru)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：60156297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体筋の有する優れた特性を發揮することのできる細胞培養バイオアクチュエータの創製を目指して、その基礎技術となる筋芽細胞の配向性制御手法の確立と培養筋細胞の収縮弛緩電気刺激条件の探索を目的として研究を実施した。その結果、単層配向コラーゲンシートによる配向性制御実験では約半数の筋管細胞がシートの配向に対して平行に配向させることができた。また、培養筋細胞の電気刺激条件の研究では、強縮を利用した電気刺激条件によって収縮弛緩の変位量を制御することができることを見出し、細胞培養バイオアクチュエータを制御する基礎技術を確立した。

研究成果の概要(英文)： To aim at creating a cell culture bio-actuator capable of exhibiting superior characteristics such as biological muscle, we studied the establishment of the myoblasts orientation control technique and the research of the electrical stimulation condition of cultured muscle cells.

As a result, about half of myotube cells for the orientation of the sheets was able to orient parallel, by the orientation control experiment with the monolayer oriented collagen sheet. And also in the study of the electrical stimulation condition of the cultured muscle cells, we found that the amount of displacement of the contractile relaxation could controlled by an electrical stimulation condition using strong contraction and we established the basic technology to control the cell culture bio-actuator.

研究分野：ロボティクス

キーワード：バイオアクチュエータ 人工筋肉 コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

近年、日本の高齢者数は人口の25%以上となり超高齢社会を迎えた。これを受けて医療・福祉分野へのロボットや機械システムの導入が進められている。医療・福祉といった最も人に近い現場で活躍するロボットに求められる能力はアシスト力のみならず、柔軟性や軽量性などの人への親和性や安全性、静音性など数多く要求される。近年ではそれらを解決すべく生体組織を用いたバイオアクチュエータの研究開発が進められている。これには骨格筋のようなセンチオーダーの3次元的な生体筋組織を構成する必要があるが、これまで実現に至っていない。

研究代表者らによる共同研究チームは23年度より、マウス筋芽細胞により筋線維の培養を行ってきたが、それは二次元構造に限られ、また筋線維の配向を揃えることが困難であった。そこで研究代表者らはコラーゲンファイバーを足場として筋芽細胞を培養することで筋線維の配向と培養液の浸透性を保証し、ファイバー状の筋線維集合体を束ねて3次元構造を形成するという発想に至った。

2. 研究の目的

生体筋の有する優れた特性を発揮することのできる細胞培養アクチュエータの創製のために、コラーゲンナノファイバーを足場として筋芽細胞の培養を行い、ファイバー状筋線維集合体に成長させることを目的とする。さらに、培養筋細胞の電気刺激条件を探索し、適切な筋収縮条件を明らかとする。これらにより、バイオアクチュエータの実現のための基礎技術を確立する。

3. 研究の方法

(1)筋芽細胞包埋コラーゲンナノファイバーの作製

研究代表者らの共同研究により、コラーゲン内に筋芽細胞を分散させることで筋線維への成長速度が促進されることが確認されている。よって、コラーゲンナノファイバー中に筋芽細胞を包埋させる手法をとる。コラーゲン溶液中に筋芽細胞(C2C12)を播種し、エレクトロスピンニング装置を用いて筋芽細胞包埋コラーゲンナノファイバーを作製する。このエレクトロスピンニング法によって筋芽細胞が影響を受ける場合には、コラーゲンナノファイバー表面に細胞を接着させる方法をとる。

(2)細胞培養によるファイバー状筋線維集合体の作製

(1)で作製したコラーゲンナノファイバーを培養液の中に入れ、細胞培養を行う。CO₂イ

ンキュベータにより温度 37℃、CO₂ 濃度 5% で培養を行う。数日増殖培養した後、分化誘導を行い、筋芽細胞から筋管細胞へと成長させる。筋管細胞へと成長した段階では、直径 500nm オーダーのコラーゲンナノファイバーの軸方向に筋管細胞が配向制御されていると考えられる。この段階で電気刺激実験を実施し、パルス刺激による筋線維集合体の収縮挙動を確認する。

(3)培養筋細胞の特性評価と改善

培養筋細胞の特性評価を実施する。電極には白金を用いて、パルス刺激による収縮弛緩挙動を観察する。その際の印加電圧、パルス幅、周波数など印加条件を数種組み合わせ、収縮挙動を比較し、筋収縮に適切な印加条件を決定する。また、収縮変位を測定することにより、培養筋細胞の応答性を評価する。

4. 研究成果

(1)コラーゲンファイバーの作製及び筋芽細胞の接着

紡糸装置として NANON-02(株式会社メック)を用いてエレクトロスピンニング法でコラーゲンナノファイバーの作製を試みた。本実験では、コラーゲン粉末 5.0 g をリン酸緩衝液(PBS(-)) 6.55 ml に溶解し、99 % エタノール 6.55 ml と混合したもの(コラーゲン最終濃度 16 wt%)を紡糸溶液とした。紡糸条件は印加電圧 20 kV、押出し速度 1 ml/h、ニードル-コレクタ間距離 10 cm、ニードル径 21 G とした。得られたファイバーマット形状を走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察した結果、ファイバーマット形状はシミのようなものを形成し、ファイバーを形成する事はできなかった。また、紡糸溶液中に細胞を混合させた場合、作製時の印加電圧が細胞に影響及ぼすことが分かった。

そこで、(株)アトリー製のコラーゲンファイバー(ID-001 String 50um)に細胞を接着させる方法へと転換した。寒天中にコラーゲンファイバーを埋め込み、その溝へ筋芽細胞を播種する。この方法によりファイバーの浮きなどを防止して固定すると同時に播種濃度を高める。その結果、播種2日目にコラーゲンファイバーへの接着が確認され(図1)、ファイバーの様な湾曲面でも増殖培養が可能であることが分かった。

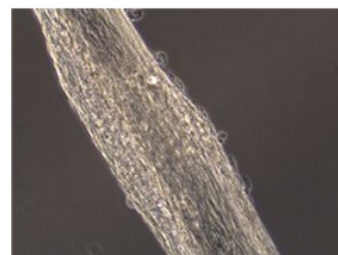


図1 コラーゲンファイバーへの接着

しかし、ファイバー表面に均一に細胞を広げることが困難であり、ファイバー上にいくつかの細胞の塊が形成された。そのため、電気刺激に対する挙動観察では一方向への収縮運動となり難く、一部の細胞の運動に留まった。

(2) C2C12 細胞の配向性制御

ファイバー近傍での配向評価

コラーゲンファイバー近傍で培養した筋芽細胞の配向性を評価した。具体的には、直径 50 μm 、長さ 1 mm のコラーゲンファイバーをディッシュ底面に配置する。ディッシュに 10% Fetal bovine serum 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (high Glucose) を 3ml 入れ、その液中に筋芽細胞 C2C12 を播種した。それを数日間増殖培養し、コンフルエントの状態を確認した後、培養液を分化誘導用の 3% Newborn calf serum 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (high Glucose) に交換し C2C12 細胞の分化誘導を行った。

成長した筋管細胞を撮影し、画像処理ソフト (ImageJ) を用いて画像解析を行った。細胞の端と端を結んだ線分の角度情報を抽出し、基準となるコラーゲンファイバーの角度からどの程度の差が生じているかを評価した。その結果を図 2 に示す。コラーゲンファイバー (50 μm) 以内では多くの C2C12 細胞の配向が $\pm 20^\circ$ 以内であった。これは、C2C12 細胞を播種した際にコラーゲンファイバー近傍に細胞が接着し、成長の方向が限定されたことによるものであると考えられる。

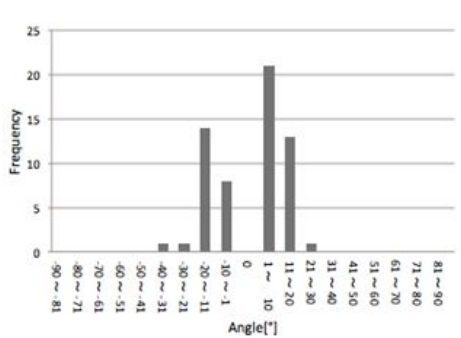


図 2 C2C12 細胞の配向性評価

コラーゲンシートによる配向制御

(1) の結果より、コラーゲンを足場として細胞培養が可能であること、(2) の結果より、凹凸が配向性を付与することが分かった。そこで、単層配向性コラーゲンシートを足場として細胞培養を実施し、配向制御実験を行った。(株)アトリー製の単層配向コラーゲンシート (ID-002 Single layer sheet t=10 μm) を用いた。配向の幅は約 10 μm 、配向の間隔は約 800 μm である。コラーゲンシートの配向が縦方向となるように、シートの両端を動物実験用ディスプレイクリップで固定して培養を行った。

増殖培養期間 6 日間、分化誘導期間 13 日

間の C2C12 細胞を図 3 に、この細胞の配向性評価の結果を図 4 に示す。

図 4 より、コラーゲンシートの単層配向とほぼ平行 (30°以下) に配向した筋管細胞は全体の約 48% を占めた。また、シートの単層配向に対して垂直 (90-120°) に配向した筋管細胞は約 27% であった。それぞれの平均の長さは、縦方向に配向した筋管細胞では約 1118 μm 、横方向に配向した筋管細胞では約 1765 μm と横方向の筋管細胞の方が約 1.6 倍長いことが確認された。

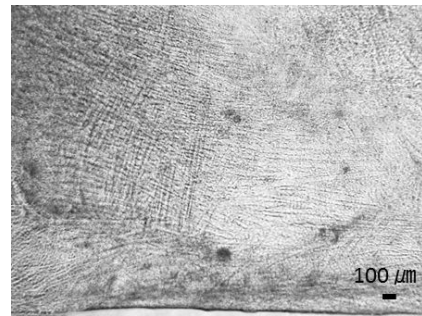


図 3 C2C12 の配向

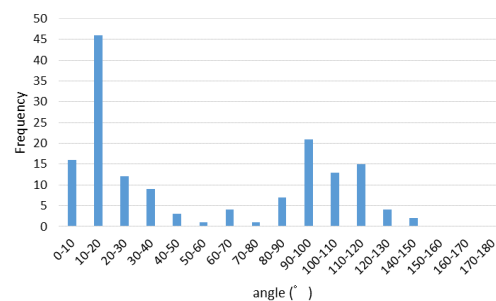


図 4 C2C12 の配向性評価

筋管細胞の配向性を評価した結果、縦方向の筋管細胞の方が横方向の細胞よりも数が多く、縦方向よりも横方向の筋管細胞の方が長いことが分かった。これらがどのように収縮運動に影響するのかを調べるために、配向性評価と同一の細胞を用いて電気刺激実験を行った。1Hz、1V、パルス幅 20ms のパルス電圧を出力し、アンプで 30V に増幅して筋管細胞に電気パルス刺激を与え、筋管細胞の挙動を観察した結果、筋管細胞は横方向に約 30 μm 収縮が確認された。

(3) 培養筋細胞の特性評価と改善

C2C12 細胞を培養し、入力電圧や周波数などの刺激条件を変えて培養筋細胞の収縮弛緩挙動の変化を比較し、より大きな挙動を得るための刺激条件の検討を行った。

実験系を図 5 に示す。ファンクションジェネレータ (FGX-2220 TEX10) を用いてパルス電圧を出力し、ピエゾドライバ (M-2682 MESS-TEK) で増幅して筋管細胞に電気パルス刺激を与える。本実験では入力電圧 10-30V、周波数 0.5-10Hz の範囲で電気刺激条件を変

化させた。また、この時のパルス幅は 20ms 一定とした。

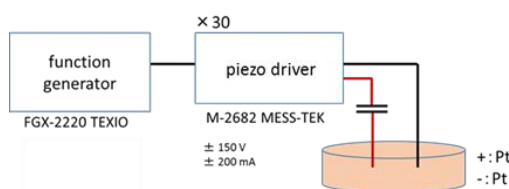


図 5 電気刺激実験装置

印加電圧

周波数 1Hz, パルス幅 20ms の電気パルス刺激を筋管細胞に与えた。結果を図 6 に示す。収縮弛緩ともに追跡点の移動距離にバラつきがあるが、収縮時の移動距離は 30V の方が大きいことがわかる。印加電圧 10V では収縮弛緩挙動は見られなかった。

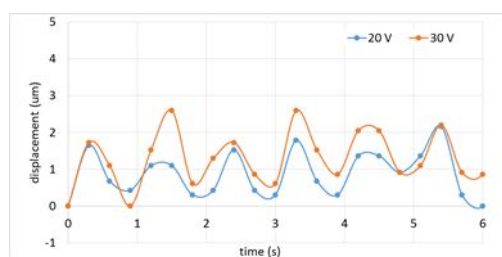


図 6 印加電圧による変位量の比較

周波数

印加電圧 30V, パルス幅 20ms の電気パルス刺激を筋管細胞に与えた。周波数は 0.5, 1, 2, 3, 5, 10Hz とした。結果を図 7 に示す。

0.5Hz では収縮弛緩が周期的に繰り返されており、筋管細胞が十分に弛緩しきったところでパルス刺激が与えられていることが分かった。一方 2Hz 以上では収縮弛緩開始前の位置に戻ることはなく、弛緩が間に合っていない。また 5Hz 以上になると弛緩挙動が見られず、強縮していることが分かった。

特性の向上

の結果を踏まえ、より大きな収縮を安定して得るために以下の実験を行った。印加電圧 30V, パルス幅 20ms で 10Hz の電気パルスを on/off 0.5Hz 間隔で繰り返した。結果を図 8 に示す。図 7 の 0.5Hz よりも大きな収縮が繰り返し起こっていることから、強縮の状態でも電圧の印加と除去を繰り返すと、強縮を繰り返し挙動として取り出せることが分かった。よって、電気刺激条件によって収縮弛緩の変位量を増幅し一定の値で取り出すことが可能と考えられる。

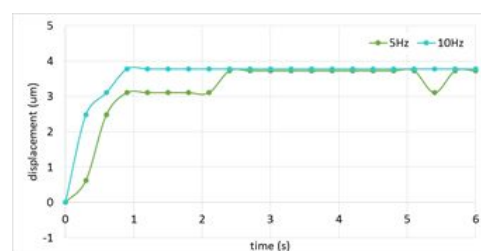
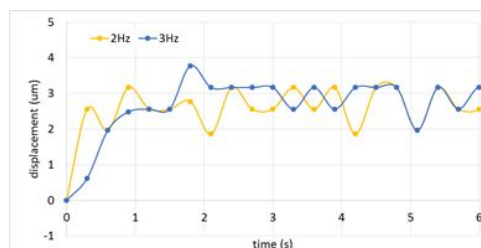
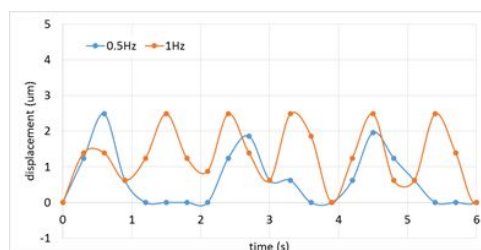


図 7 周波数による変位量の比較

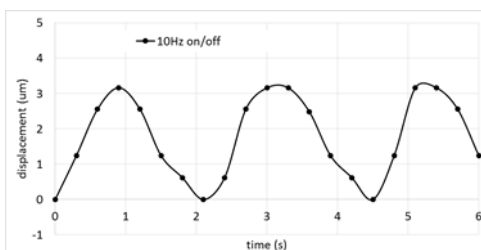


図 8 10Hz(0.5Hz 間隔で ON/OFF) 時の変位量

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 3 件)

「培養筋細胞の収縮挙動による電気刺激条件の検討」鈴木彩, 橋本稔, 木村建, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2017 2P1-M03(2017.5.10-5.13)ビックパレットふくしま 福島県郡山市

「コラーゲンシートを用いた培養筋芽細胞の配向性評価」鈴木彩, 橋本稔, 木村建, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2016 2A2-12b3 (2016.6.8-6.11)パシフィコ横浜 神奈川県横浜市

「コラーゲンファイバーおよび、その集合体を用いた筋芽細胞の配向制御」谷中

拓実, 橋本稔, 木村建, 日本機械学会口
ボテイクス・メカトロニクス講演会 2015
1P1-U09 (2015.5.17-5.19)京都市勧業館
みやこめっせ 京都府京都市

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 稔 (HASHIMOTO, Minoru)
信州大学・学術研究院繊維学系・教授
研究者番号：60156297

(2)研究分担者

木村 建 (KIMURA, Ken)
信州大学・学術研究院繊維学系・教授
研究者番号：20143993

(3)研究協力者

鈴木 彩 (SUZUKI, Aya)
信州大学・繊維学部・研究推進支援員