

# 論文の内容の要旨

## 骨格筋アクチュエータの立体的構築

氏名 森本 雄矢

### 1. 序論

生体外にて構築された骨格筋組織は、再生医療や創薬分野だけでなく、生体ロボットの駆動素子として工学分野での応用が期待されている。このような応用を実現するためには、体外にて骨格筋の収縮運動を実現する必要がある。しかし、従来の単一骨格筋組織を用いた駆動系では、自身の張力により短縮が発生し収縮性を喪失するため、継続的な収縮運動を実現することが困難であった。本問題の解決には、拮抗筋構造を構築し、互いの骨格筋組織間で張力の釣り合いを達成する必要がある。拮抗筋構造の構築には、収縮性と配置性を有する方法にて 3 次元骨格筋組織を作製する必要がある。しかし、従来の方法では、任意の位置に収縮性を有する骨格筋組織を構築することが困難であった。

そこで、本論文では収縮性を有し任意の位置に配置可能な 3 次元骨格筋組織を体外で構築する方法を考案し、拮抗筋構造を有する骨格筋アクチュエータを実現するとともに、創薬や生体ロボットへの応用可能性を示すことを目的とする。寸法を最適化したゲル構造中で筋芽細胞を培養することで、骨格筋線維の同一方向への整列と筋芽細胞から骨格筋線維への多核化の促進を実現し、骨格筋の収縮力向上が可能となる。加えて、このゲル構造を含むシートを培養液中で操作し積層させることで、任意の位置に高収縮力な骨格筋線維束を構築することを目指す。さらに、提案の方法によりデバイスの駆動部に対して対称の位置に骨格筋組織を構築することで、駆動可能な拮抗筋構造の構築を目指す。本拮抗筋構造では張力の釣り合いが取られるため、継続して収縮性を発揮可能であることを示す。以上より、収縮性と配置性を有した骨格筋線維束の構築法の考案と拮抗筋構造の構築は、体外において骨格筋組織の継続的な収縮運動を達成するのに適した技術であると考えている。

### 2. 設計・製作

筋芽細胞含有のゲル溶液を PDMS スタンプで押し付けた状態でゲル化させることで、寸法を制御したゲル構造を含むシートを構築する。図 1 に示すように、ゲルシートを固定部材上に積層させることにより、シート端部を固定部材に固定する。この状態で筋芽細胞を骨格筋線維へと多核化させ、骨格筋線維束を構築する(図 2)。

骨格筋線維束に独立して電気刺激を供給するため、パリレン電極を基板としたデバイスを構築した。図 3 にデバイスの構築方法を示す。このデバイス上の固定部材に図 1 と同様の方法で骨格筋線維束を構築した。本デバイスでは、金電極の末端部のみ電極が露出しており、それ以外の部分は絶縁されているため、培養液中にて電気刺激を骨格筋に伝達させることが可能になっている。

### 3. 骨格筋線維束の構築と特性評価

筋芽細胞含有のゲル構造の寸法により、構築された骨格筋線維束の特性が変化することを明らかにした。まず、骨格筋線維の成熟度の指針として、骨格筋線維の構築時に発現する myogenin 陽性細胞核の割合の計測を試みた。myogenin を免疫染色した骨格筋線維の観察結果と、ゲル構造の寸法と myogenin の発現割合の関係を図 4 に示す。この結果から、ゲル構造寸法によって骨格筋線維での myogenin の発現割合が変化し、細幅のゲル構造中で筋芽細胞を培養することで骨格筋線維の成熟度が促進されることが分かった。次に、高速フーリエ変換(FFT)による画像解析を用いて、骨格筋線維束中における骨格筋線維の配向性を評価した。骨格筋線維束画像と FFT 図を図 5(a, b)に示す。この FFT 図における各角度に対する輝度値から骨格筋線維束中の骨格筋線維の方向分布を表した(図 5(c))。この方向分布を配向度として定量化した結果を図 5(d)に示す。本結果より、細幅のゲル構造中で筋芽細胞を培養することで配向度も向上することが明らかになった。最後に、骨格筋線維束の収縮力を評価した。図 6(a)に示す PDMS デバイスを用いて、骨格筋線維束の収縮から引き起こされた PDMS 片持ち梁の撓みから、収縮力を計測した(図 6(b))。この結果から、骨格筋線維束の収縮力特性も細幅のゲル構造中で筋芽細胞を培養することで向上することが分かった。以上の結果より、配向度・成熟度・収縮力特性といった骨格筋線維束特性を向上させるためには、筋芽細胞を含んだゲル構造の寸法を制御する必要があることが示された。

上記結果より、細幅のゲル構造を複数含むゲルシートを積層することで骨格筋線維束を構築した。この骨格筋線維束の凍結切片を作製し、断面を解析した結果を図 7 に示す。ゲルシートの積層により作製された骨格筋線維束は約  $1.5 \text{ mm}^2$  の断面積を有し、内部まで細胞が生存しており、また骨格筋線維がほぼ同一方向に整列していることが分かった。この骨格筋線維束の収縮力を図 8(a)に示す PDMS 片持ち梁の撓みから計測した結果を図 8(b, c)に表す。細幅のゲル構造を含むシートの積層から作製された骨格筋線維束は約  $5.36 \text{ mN}$  の収縮力を有しており、細幅のゲル構造を含まないゲルブロックから作製された骨格筋線維束の収縮力約  $1.32 \text{ mN}$  より大きいことが分かった。また、シート積層により作製された骨格筋線維束の収縮力は自身が有している張力より 4 倍以上大きく、収縮力によりデバイスを駆動させるのに適していると考えられる。

シート積層法では、シートを運ぶことによりパリレン電極を基板としたデバイス上に骨格筋線維束を構築可能となる。本骨格筋アクチュエータにおいて、電極を通じて骨格筋線維束を電気刺激して屈曲駆動を実現した(図 9)。この骨格筋アクチュエータの駆動は電気刺激により制御可能であり、またパリレン電極の厚さにより骨格筋アクチュエータの駆動量が変化することが分かった。以上より、シート積層法は、任意の位置に骨格筋線維束を配置でき、デバイスの構造に関わらず変形による屈曲運動が発揮できることが示された。

### 4. 骨格筋線維束を用いた応用検討

作製された骨格筋線維束の応用例を検討し、創薬やバイオアクチュエータへの応用可能性を実証する。まず、単一骨格筋線維束を用いて、神経刺激による骨格筋線維束の駆動と空気中での骨格筋線維束の駆動を実現する。両応用例は拮抗筋構造にて実現するのが理想であるが、拮抗筋構造へ拡張可能な方法を用いることで、将来の拮抗筋構造への応用可能性

を示す。加えて、リンク機構を駆動部とする拮抗筋アクチュエータを作製し、体外において骨格筋線維束の形状と収縮特性が継続的に維持されるだけでなく、収縮・伸展運動が可能であることを示す。

神経刺激による筋駆動の実現にあたっては、神経幹細胞と骨格筋線維束の共培養を実現した。骨格筋線維束上に神経幹細胞を接着させた状態で培養することで、神経幹細胞が神経細胞に分化し神経-筋肉組織を構築する。この神経-筋肉組織では神経細胞と骨格筋線維の接合部にアセチルコリン受容体の集合、つまり神経筋接合部が構築できていることが分かった(図 10(a))。この神経-筋肉組織にグルタミン酸溶液(400  $\mu\text{M}$ )を添加すると神経細胞が活性化され神経刺激が伝達し、骨格筋線維の収縮が発生することが確認された(図 10(b))。また、アセチルコリン受容体の阻害剤であるクラレ(50  $\mu\text{M}$ )を添加すると、グルタミン酸溶液の添加によって神経細胞が活性化させても骨格筋線維の収縮が発生しないことが確認された(図 10(c))。本結果は、神経-筋肉組織の収縮が神経筋接合部を通して伝わった神経刺激により制御可能なことを示唆しており、本系は神経筋接合部に関する病態モデルとして応用可能であると考えている。

培養液外でも骨格筋アクチュエータが使用できることを示すために、コラーゲン構造内に骨格筋線維束を埋め込み、空気中で骨格筋線維束の駆動を試みた(図 11(a))。骨格筋線維束がコラーゲン構造に覆われることにより湿潤環境を維持できるため、空気中で電気刺激による骨格筋アクチュエータの駆動制御を実現できることを示した(図 11(b, c))。加えて、アクチュエータの駆動によりビーズを押すという物体操作を空気中で達成できることも示した(図 11(d))。本結果は、骨格筋アクチュエータの適用環境を広げたと考えている。

シート積層法では任意の位置に骨格筋線維束を構築可能なため、図 12(a, b)に示すようにデバイス表裏で骨格筋線維束が存在する拮抗筋付き骨格筋アクチュエータが実現可能となる。拮抗筋が存在することで両骨格筋の力の釣り合いが取られるため、リンク機構を有するデバイス上において骨格筋線維束を培養することが可能となった。拮抗筋付き骨格筋アクチュエータではパリレン電極が表裏に存在しており、各々の電極から電気刺激を骨格筋線維束に与えることで、アクチュエータの選択的駆動を実現した(図 12(c))。拮抗筋構造における骨格筋線維束の形状と収縮運動は短縮が起きないため継続的に維持されることも確認された(図 12(d, e))。以上の結果より、拮抗筋構造は収縮性の継続的な維持と収縮・伸展運動が可能であり、骨格筋線維束の収縮運動に適した構造であると考えている。

## 5. 結論

細幅のゲル構造中で筋芽細胞を培養することにより、骨格筋線維束の配向度・成熟度・収縮力特性を向上できることを明らかにした。細幅のゲル構造を含む筋芽細胞含有ゲルシートを積層させることにより、任意の位置に配置可能な高収縮力を有する骨格筋線維束を体外にて実現できる。

提案の方法で作製された骨格筋線維束の応用例として、神経の刺激による筋駆動と空気中で駆動可能な骨格筋アクチュエータを実現した。本結果は作製された骨格筋線維束が創薬や生体ロボットの駆動素子としての応用可能性を示している。また、拮抗筋を有する骨格筋アクチュエータを例示した。この拮抗筋アクチュエータでは電極を通じた骨格筋線維束の選択的駆動が可能であり、さらに継続的な形状と収縮特性の維持が可能となる。以上の特性より、拮抗筋構造を含むアクチュエータは従来の骨格筋アクチュエータよりも生体ロボットの駆動要素として適していると考えている。

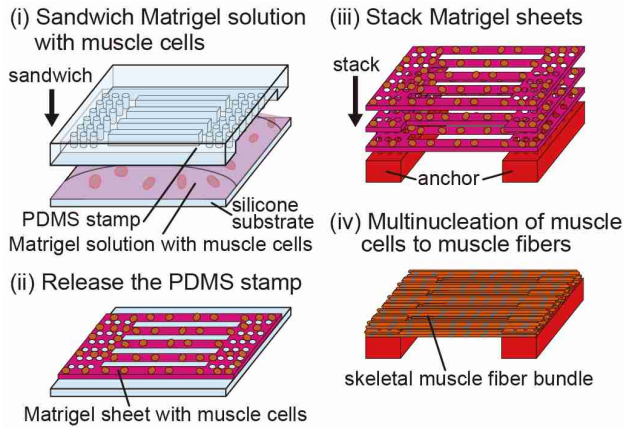


図1. シートの積層による骨格筋線維束の構築方法

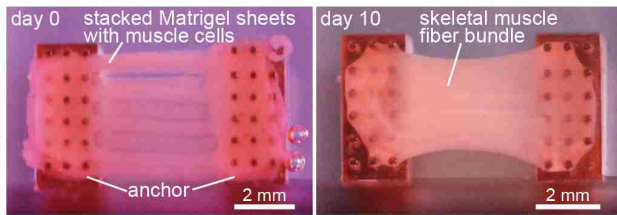


図2. 骨格筋線維束の構築

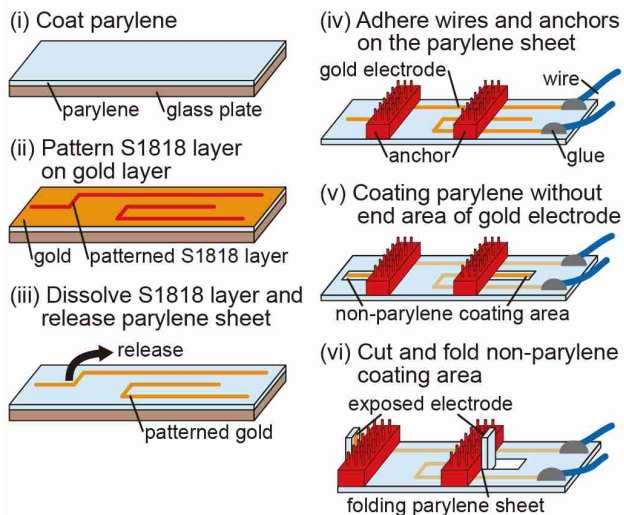


図3. パリレン電極を基板としたデバイスの構築方法

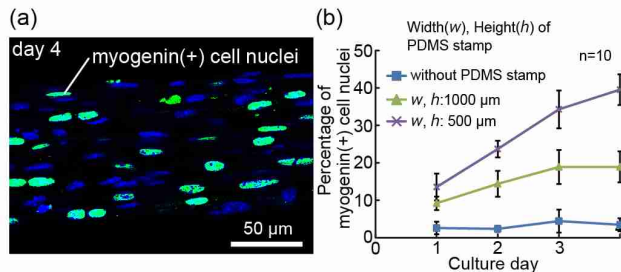


図4. (a)細胞核(青)とmyogenin(緑)の免疫染色画像(ゲル構造の幅と高さ:500 μm)  
(b)筋芽細胞含有ゲル構造の寸法とmyogenin発現割合の関係

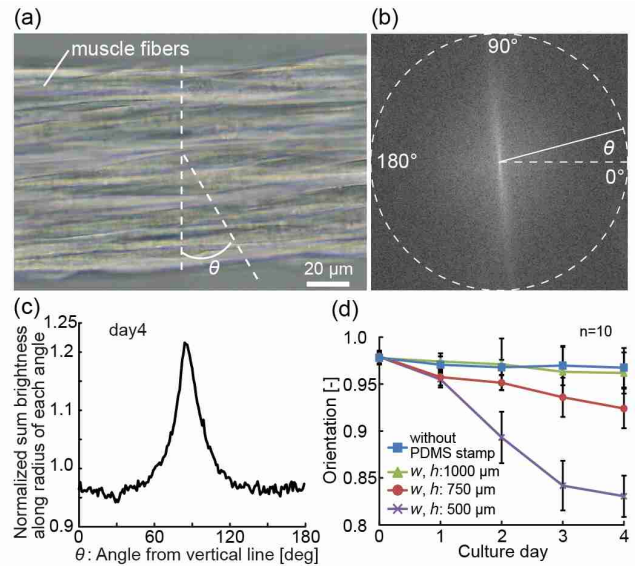


図5. (a)骨格筋線維束の画像  
(b)骨格筋線維束のFFT図  
(c)骨格筋線維束中の筋線維の方向分布  
(d)骨筋芽細胞含有ゲル構造の寸法と配向度(配向度は値が少なくなると、高配向度を示す)の関係

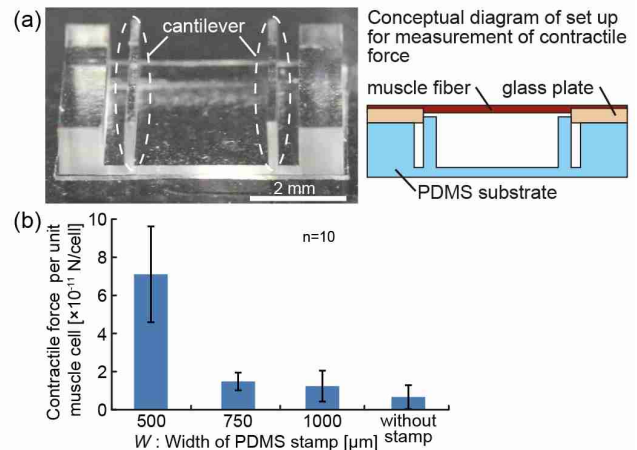


図6. (a)片持ち梁を有するPDMSデバイス  
(b)骨筋芽細胞含有ゲル構造の寸法と収縮力特性の関係

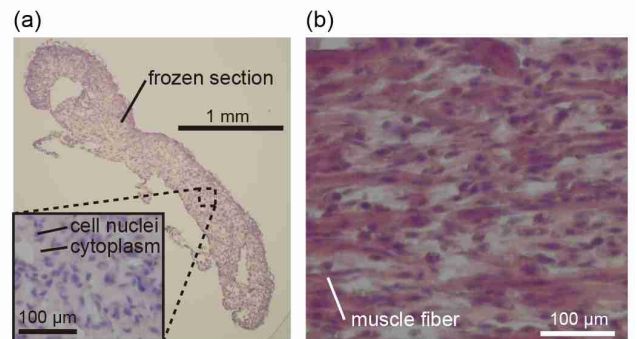


図7. (a)骨格筋線維束短軸方向の凍結組織切片(細胞核(青), 細胞質(ピンク))  
(b)骨格筋線維束長軸方向の凍結組織切片

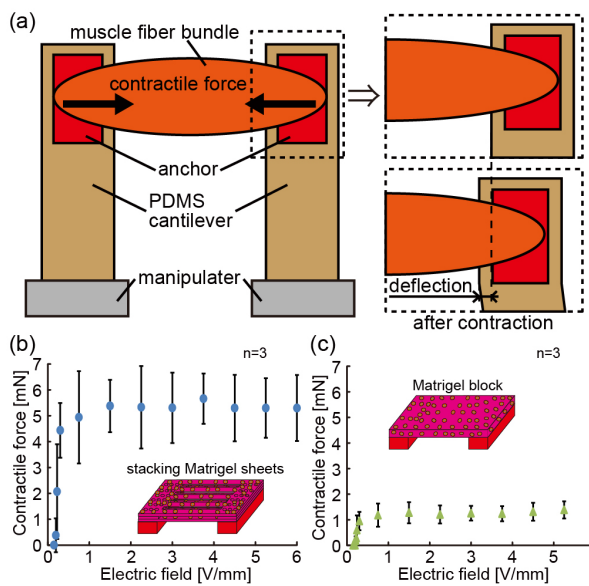


図8. (a)骨格筋線維束の収縮力計測の概念図  
 (b)シート積層により構築された骨格筋収縮力特性  
 (c)ゲルブロックから構築された骨格筋収縮力特性

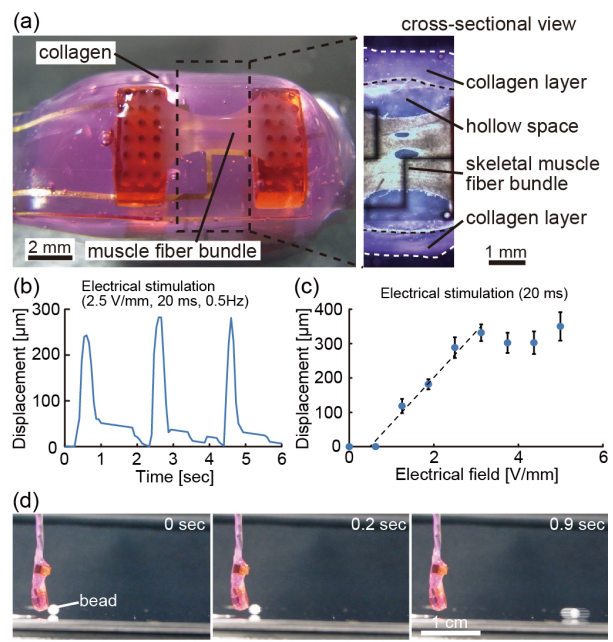


図11.(a)コラーゲン層で覆われた骨格筋アクチュエータ  
 (b)電気刺激に対するアクチュエータの駆動特性  
 (c)電気刺激の強さとアクチュエータ駆動量の関係  
 (d)空気中にて骨格筋アクチュエータでビーズを押ししている様子

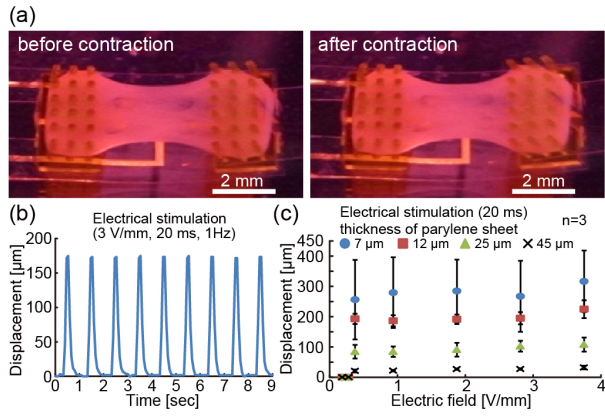


図9. (a)骨格筋アクチュエータの駆動の様子  
 (b)電気刺激と骨格筋アクチュエータ駆動量の関係  
 (c)パリレン厚さとアクチュエータ駆動量の関係

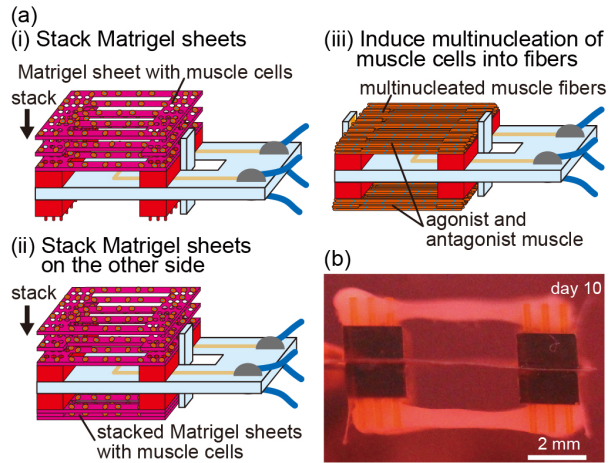


図12.(a)拮抗筋付き骨格筋アクチュエータの構築方法  
 (b)拮抗筋付き骨格筋アクチュエータの様子  
 (c)リンク機構を有する拮抗筋付き骨格筋アクチュエータの選択的駆動の様子  
 (d)拮抗筋構造の継時的な屈曲角度の変化量  
 (e)拮抗筋構造の継時的な骨格筋長の変化量

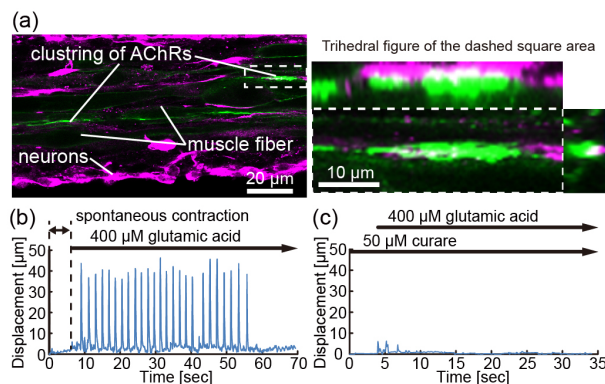


図10.(a)神経-筋肉組織の共焦点画像  
 (神経細胞(マゼンタ), アセチルコリン受容体(緑))  
 (b)グルタミン酸溶液による神経-筋肉組織の収縮  
 (c)カラーレ添加後のグルタミン酸溶液による刺激