

筋-腱連結構造組織体作製のための筋芽細胞と腱細胞の組織化培養検討

吉鶴 歩実*・藤原 溪**・米田 大珠**・伊豆 弥生**
 森脇 健司***・橋本 真悟****・岩井 良輔*****

*岡山理科大学工学部 生命医療工学科

**岡山理科大学獣医学部 獣医学科

***弘前大学大学院 理工学研究科 知能機械工学コース

****岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 形成再建外科学

*****岡山理科大学フロンティア理工学研究科

2022年12月27日受理



1. 緒言

軟骨と骨、骨と腱、そして腱と筋のように生体の骨格を成す組織は連続的につながっており、それぞれの組織間では細胞やその生産物であるタンパク質が相互作用（コミュニケーション）していることが少しずつ明らかになってきている¹⁻³。ここで、骨格組織間のコミュニケーションは主に実験動物を用いて研究されているが、個体差や体内環境の複雑さにより目的とするコミュニケーションを正確にとらえることが困難である場合がある。さらに、体内の細胞やタンパク質の働きを経時的に観察して分析・解析できる簡便な手法はほとんどなく、極めて特殊な顕微鏡や分析装置が必要となる。また、実験動物とヒトとの種差については人体実験が行えないため検証することはできない。ここで、体外で培養細胞を用いて生体組織の機能や形状を模倣した組織体を作製できれば個体差の影響のない均一な培養環境下にて、ヒトの細胞を用いて正確に目的

とする細胞やタンパク質間のコミュニケーションを解析できると考えられる。しかしながら、生体骨格を模倣したような複数種の組織が連結した構造体の作製方法はほとんど確立されていない（表1）。

我々は、細胞の自己凝集化技術（Cell self-Aggregation Technique：CAT）を開発した^{4,5}。CAT用のポリマーを手動で塗布またはインクジェットプリントにて自動で塗布印刷した培養皿に細胞を播種すると、CATを塗布した領域にのみ細胞が接着して単層を形成した後、約1日の培養の間に細胞単層がCATポリマーの塗布表面から剥離すると同時に凝集塊して、CATポリマーの塗布形状と同様の3次元の細胞凝集塊が形成する。我々は、これまでにスフェア、ファイバーやリング形状の細胞組織体の作製に成功してきた⁶⁻⁹。ここで、我々はCATを用いることでファイバー状の筋芽細胞の凝集塊と腱細胞の凝集塊が細胞間結合によって連結した構造体を予備的検討により作製できることを確かめた。

表1 生命科学，医学研究用の実験モデルの種類と特徴

		生体近似性	種差の影響	分析の簡便性	培養方法
生体組織 (実験動物)		◎	✕ 人体実験不可	△ 生きた状態での 経時的な分析不可	
培養細胞	細胞  2次元 (細胞単層)	✕	◎ ヒト細胞使用可	○ 経時的に分析可能	○
	 3次元 (細胞組織体)	○ 生体組織に 近い機能を発揮	◎ ヒト細胞使用可	○ 経時的に分析可能	△ 未確立

一方、培養で筋組織や腱組織を作製するには、それぞれの細胞を組織固有の形態へと変化させたり固有のタンパク質を生産、蓄積させたりすることで秩序立った組織とするための培養工程が必要となる。すなわち、筋組織作製においては、複数個の筋芽細胞が融合し筋管を形成する、腱組織作製においては腱組織の主成分であるコラーゲンを腱細胞が多産するような培養液でそれぞれの細胞を培養する。ここで、すでに筋芽細胞の筋管形成や腱細胞のコラーゲン産生に最適な培養液が知られてされているが、筋芽細胞と腱細胞を同じ培養皿上、すなわち同一バッチで同時に組織化させるような培養液の組成や、培養液の添加の順序などの培養条件に関してはほとんど検討されていない。

本研究では、生体骨格の駆動力である“筋”と骨をつなぐ“腱”のとのコミュニケーションを培養下で解

明するための新規の培養モデルとして我々が考案した、筋-腱連結構造組織体の作製に向けて、筋芽細胞および腱細胞を同一バッチで組織化し得る培養条件を検討することを目的とした。

2. 実験方法

マウス骨格筋芽細胞とマウス腱細胞を6：4の数比率で混合した細胞懸濁液を細胞低接着性のU底ウェルに添加して約1日培養することで、ウェル底に沈積した細胞から成る直径約0.5 mmの細胞凝集小塊をウェル当たり1個形成させた（図1-1）。細胞凝集小塊は筋管形成誘導と腱細胞のコラーゲン産生誘導用の2種の培養液を用いて、4パターンの異なる培養液の添加条件にて14日培養した（図1-2）。

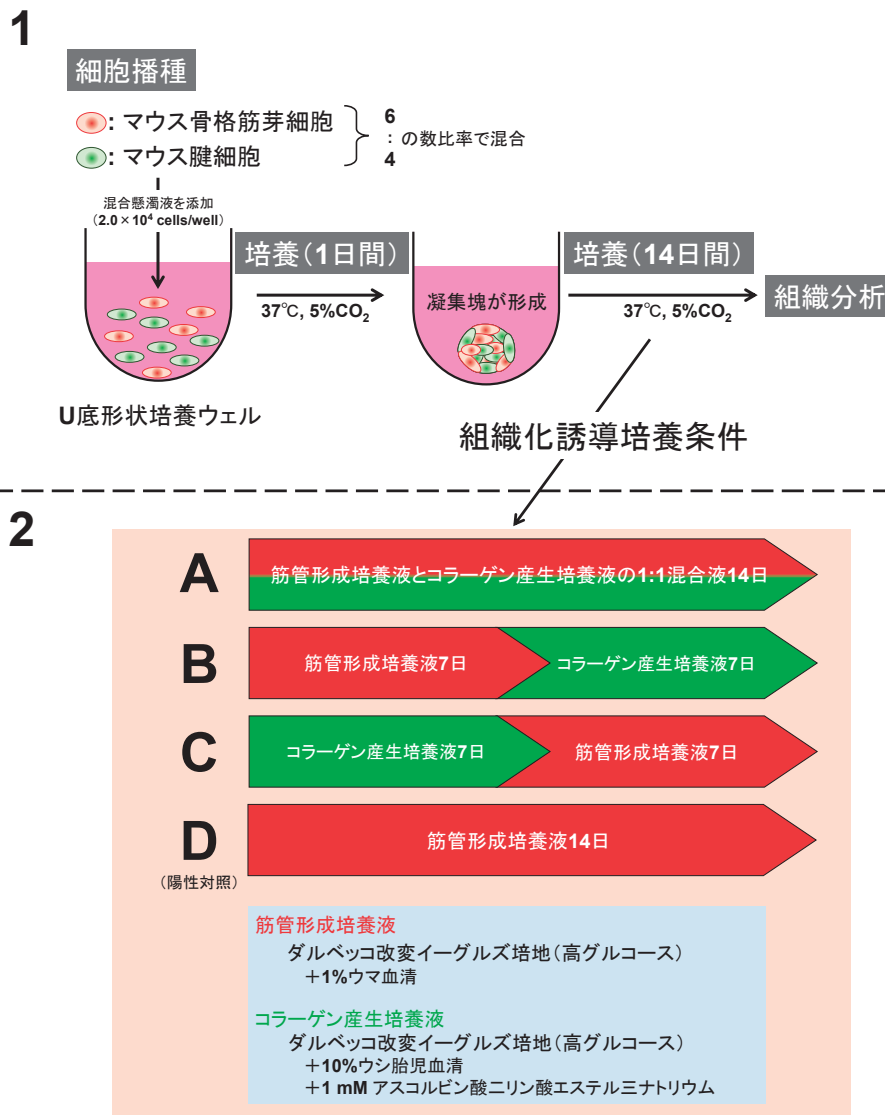


図1 培養法 (1) と培養液の添加条件 (2)

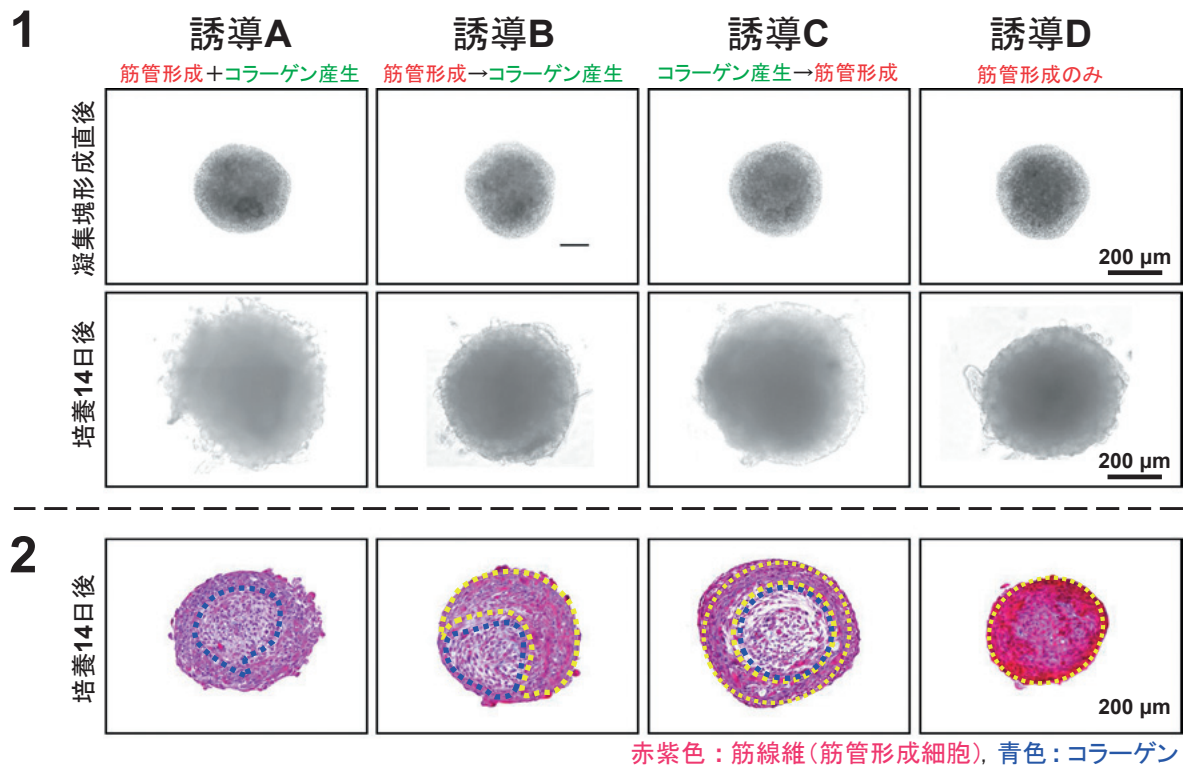


図2 筋芽細胞と腱細胞の混合凝集塊の位相差顕微鏡写真 (1) と薄切断面のMasson's Trichrome 染色写真 (2)
黄色点線枠内: 筋管形成細胞、青点線枠内: コラーゲン産生部分

3. 実験結果と考察

全ての培養液の添加条件において、細胞凝集小塊は14日間の培養の間に直径が約1.5倍に増大した (図2-1)。これらの細胞凝集塊の薄切片の組織化学分析を行った結果、腱細胞のコラーゲン産生誘導培養液を用いて培養した誘導A、BおよびCの条件では、凝集塊の概ね中央付近にMasson's Trichrome染色によりわずかに青色に染まるコラーゲンを含む組織の形成を認めたが、筋管形成誘導培養液のみで14日間培養した誘導Dの条件においては、コラーゲン産生は全く認められず、凝集塊を成す細胞のほぼすべてがMasson's Trichrome染色により赤紫色に染まる筋線維を含む筋管形成した細胞からなる筋様組織を形成した (図2-2)。すなわち、筋管形成誘導培養液のみで培養すると腱細胞はコラーゲンをほとんど産生できず、腱様組織は形成しないことが分かった。そこで、誘導A、BとCの条件において筋管形成の程度を比較してみると、筋管形成とコラーゲン産生誘導の2種の培養液を1:1の割合で混合して14日間培養した誘導Aの条件では、筋線維を含む筋管形成した細胞は非常に少なく、ほとんど筋様組織は形成していなかった。一方、2種の培養液をそれぞれ7日ずつに分けて単独で添加して培養した誘導BとCの条件においては、凝集塊の中央付近に認められたコラーゲン産生領域の周りを取り囲むようにして筋

線維を認める筋管形成細胞の層、すなわち筋様組織化層が形成していることが分かった (図2-2)。

3. まとめ、課題と今後の展望

筋芽細胞と腱細胞のそれぞれの組織化に対して最適化された2種の培養液をそれぞれを単独で細胞に添加 (作用) して培養する期間を設けることで、筋様組織と腱様組織の両方を含む混合組織体を得ることができた。一方で、本研究にて試作された筋-腱様組織体は生体の筋-腱組織と比較して組織学的に非常に未成熟であり、生命科学や医学研究に適用できる培養組織モデルにはなり得ない。今後は、より生体に近い組織を得るために培養期間の検討や筋-腱様組織体の力学的刺激などによる高度成熟化を検討していく予定である。

参考文献

- 1) Tendon-to-bone attachment: from development to maturity. Zelzer E, Blitz E, Killian ML, Thomopoulos S. Birth Defects Res C Embryo Today. 2014 102(1):101-12.
- 2) Muscle and tendon interaction during human movements. Fukunaga T, Kawakami Y, Kubo K, Kanehisa H. Exerc Sport Sci Rev. 2002 30(3):106-10.
- 3) Microenvironment in subchondral bone: predominant regulator for the treatment of osteoarthritis. Hu W, Chen Y, Dou C, Dong S. Ann Rheum Dis. 2021 80(4):413-422.

- 4) The effect of electrically charged polyion complex nanoparticle-coated surfaces on adipose-derived stromal progenitor cell behaviour. Iwai R, Nemoto Y, Nakayama Y. *Biomaterials*. 2013 34(36):9096-102.
- 5) Induction of cell self-organization on weakly positively charged surfaces prepared by the deposition of polyion complex nanoparticles of thermoresponsive, zwitterionic copolymers. Iwai R, Haruki R, Nemoto Y, Nakayama Y. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(5):1009-1015.
- 6) Preparation and characterization of directed, one-day-self-assembled millimeter-size spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells. Iwai R, Nemoto Y, Nakayama Y. *J Biomed Mater Res A*. 2016 104(1):305-12.
- 7) Induction and expansion of human PRRX1+ limb-bud-like mesenchymal cells from pluripotent stem cells. Yamada D, Nakamura M, Takao T, Takihira S, Yoshida A, Kawai S, Miura A, Ming L, Yoshitomi H, Gozu M, Okamoto K, Hojo H, Kusaka N, Iwai R, Nakata E, Ozaki T, Toguchida J, Takarada T. *Nat Biomed Eng*. 2021 5(8):926-940.
- 8) Fabrication of scaffold-free mesenchyme tissue bands by cell self-aggregation technique for potential use in tissue regeneration. Ota T, Iwai R, Kitaguchi Y, Takarada T, Kimata Y. *Biomed Mater*. 2022 2;17(6).
- 9) Successful tracheal regeneration using biofabricated autologous analogues without artificial supports. Hiwatashi S, Iwai R, Nakayama Y, Moriwaki T, Okuyama H. *Sci Rep*. 2022 12(1):20279.

Optimization of culture protocols of myoblasts and tenocytes for the preparation of skeletal-like muscle-tendon connected tissue

Ayumi Yoshitsuru^{*}, Kei Fujiwara^{**}, Taiju Yoneda^{**}, Yayoi Izu^{**}, Shingo Hashimoto^{***}, Takeshi Moriwaki^{****} and Ryosuke Iwai^{*****}

**Faculty of Biomedical Engineering, Okayama University of Science,
1-1, Ridai-cho, Kita-ku, Okayama, 700-0005, Japan*

*** Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Okayama University of Science,
1-3 Ikoinooka, Imabari-shi, Ehime, 794-8555, Japan*

**** Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
Graduate School of Medical, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University
2-5-1 Shikata-cho, Kita-ku, Okayama, 700-8558 Japan*

***** Course of Mechanical Science and Engineering, Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University,
1 Bunkyo-cho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8560, Japan*

******Institute of Frontier Science and Technology, Okayama University of Science,
1-1, Ridai-cho, Kita-ku, Okayama, 700-0005, Japan*

We have designed a novel culture model for muscle-tendon connective tissue to understand the communication between “muscle”, the driving force of the skeleton, and “tendon”, the bone-connecting tissue, under in vitro culturing. In this study, we could successfully obtain mixed tissue constructs containing muscle-like and tendon-like tissues by adding two types of culture media optimized for myogenesis of myoblasts and tendon-like tissue formation by collagen production of tenocytes, respectively, independently at different culturing periods. Further studies are planned to examine the culture period and mechanical stimulation of the muscle-tendon-like mixed tissue obtained in this study in order to mature them into more histologically and functionally similar to native muscle-tendon connected tissues.

Keywords: Tendon; Muscle; Cell culture model.