

報告日： 2024年 6月 14日

報告者： 東京工業大学 工学院 助教

高田 敦

1. 研究概要

(和文)

(1) 課題名

筋細胞に多方向刺激を与える培養器一体型ソフトアクチュエータの開発

(2) 研究者氏名、職名

高田 敦 東京工業大学 工学院 助教

(3) 研究概要

筋肉の再生医療の促進や創薬研究のため、筋肉の形成プロセスにおける、筋芽細胞が周囲の筋肉から引張刺激を受けて成長する機序の解明が求められている。先行研究では1方向に引張を与えている。しかし、体内の引張刺激は複数方向のはずである。そこで本研究では、ソフトアクチュエータと一体化した培養デバイスを製作し、筋芽細胞を複数方向から繰り返し引張りながら培養する。3つの空圧人工筋肉で培養部を引張るデバイスを開発した。このデバイスを用いて筋芽細胞を1方向、2方向に刺激しながら2日間培養を行った。その結果、両条件でも成長度合いを表すタンパク質が強く発現したものの、1方向に刺激した細胞の方が強く発現した。

(4) キーワード

ソフトロボット, 組織工学, 再生医療

(英文)

(1) Research title

Pneumatic soft actuator to stretch muscle cells in multiple directions

(2) Name of researcher with title of position

Atsushi Takata, Assistant Professor, Tokyo Institute of Technology

(3) Summary

In our body, myoblasts grow in response to the stretches by muscles. The mechanism of muscle formulation has been investigated. Previous studies applied a stretch in one direction on cells. However, the stretches in vivo should be in multiple directions. Therefore, in this study, a culture device integrated with soft actuators was developed. Myoblasts were cultured for two days while being stimulated in one and two directions. As a result, proteins indicating how much the cells grow were strongly expressed under both conditions, but the expression was stronger in one direction condition.

(4) Key Words

Soft robot, Tissue engineering, Regenerative medicine

2. 本研究の意義、特色

本研究の意義は、生体医工学における細胞培養に、流体駆動ソフトアクチュエータを導入したことである。多自由度化、小型化に適するという流体駆動の利点によって、より生体内の多自由度の刺激を模倣できる培養アクチュエーションデバイスが開発された。アクチュエータとして採用されたパウチモータは空圧人工筋肉の 1 種である。空圧人工筋肉は近年ソフトロボットの文脈において、“生物らしい柔らかさ”を持つことが注目されている。これは、位置制御された電磁アクチュエータには無い流体デバイス特有のバックドライバビリティである。生体筋肉もバックドライバビリティを持って筋芽細胞を刺激していると考えられることから、培養細胞に刺激を印加するのに空圧ソフトアクチュエータを用いることは、生体模倣だからこそ生体を対象とした実験に適するという意義を流体駆動ソフトアクチュエータに与える可能性がある。

2. 実施した研究の具体的内容、結果

申請時に定めたソフトアクチュエータの目標仕様は下記の 3 つであった。

- A) 耐熱温度 120℃以上の材料で構成すること
- B) 顕微鏡にセットでき、下から観察できること
- C) 生体筋と同じく 10%までの伸展を 3 方向から培養部に与えられること

3.1 培養器一体型ソフトアクチュエータの設計変更

当初、ソフトアクチュエータの構造は図 1 のように負圧で屈曲する 3 本の肢で培養部を囲った構造を予定していた。しかし、培養中はインキュベータという高さに制約がある装置に納める必要があること、培地と呼ばれる液体を細胞付近に十分量確保する必要があることなどから設計変更を行い、図 2 に示すデバイスを開発した。

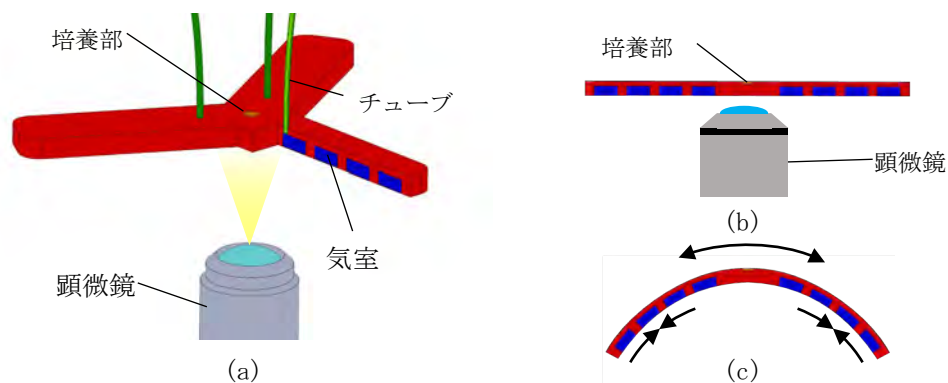


図 1 (a)申請当初の培養器一体型ソフトアクチュエータの概念設計,
(b) 負圧印加前の状態, (c) 負圧印加後の屈曲

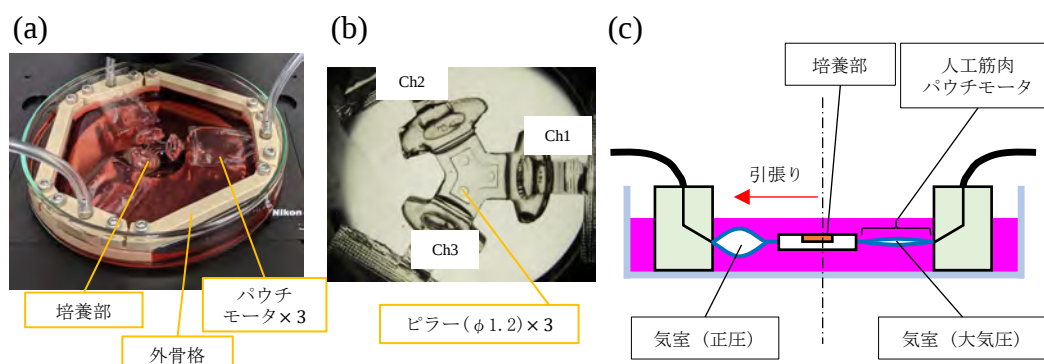


図 2 (a) 開発したソフトアクチュエータ, (b) 培養部, (c) パウチモータの動作原理

図 2(a)がデバイスの最終的な設計であり, 要求仕様 A),B)を達成し C)をおおむね満たす. 図 2(b)は培養部の拡大図である. この培養部を周囲に 3 等配で設置された人工筋肉, パウチモータが拮抗して支えている. パウチモータとは新山らが提案した人工筋肉の一種で, 図(c)のように袋状のアクチュエータに正圧を印加すると長手方向に収縮する. パウチモータの外側は外骨格で保持されており, パウチモータの収縮によって培養部が引張られる. 培養部はモールド成型したポリジメチルシロキサン, パウチモータは PET シート, 外骨格は PEEK 材で構成されており, 要求仕様 A)耐熱温度 120℃以上を満たす. また, 細胞毒性のある物質を含んでいない. 加えて, 図 2(b)のように培養部を上下から顕微鏡により観察でき, 要求仕様 B)を満たす. 培養部のくぼみには 3 つのピラー(柱)が設置されている. このくぼみに細胞をコラーゲン溶液で懸濁した細胞組織が充填される. コラーゲンはピラーの運動を細胞に伝達する役目を持っている. パウチモータによって変位させられたピラーがコラーゲンを引張り, コラーゲンの変形が細胞に伝わる. 3 つのパウチモータは反時計回りに Ch1, Ch2, Ch3 とする.

3.2 ソフトアクチュエータを駆動する空圧回路と電装系

図 3 はパウチモータを駆動・制御する電空回路である. コンプレッサから圧縮空気 (200 kPa)が電空レギュレータ 3 個に供給される. 電空レギュレータによってアナログに制御された空気圧は 3 つのパウチモータそれぞれに印加される. これらの空圧機器・電装系はインキュベータ(恒温器)の外に設置され, 空圧配管でインキュベータ内のデバイスまで接続されている. そのため, 加熱加圧滅菌が必要なのはデバイスとシャーレのみである. また, 空圧配管を分岐させて複数のデバイスを並列に繋ぐことで, 同条件での実験が容易である.

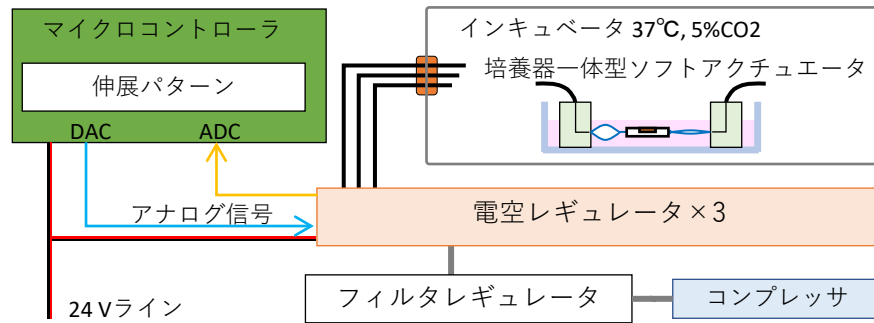


図3 ソフトアクチュエータの駆動用電空回路

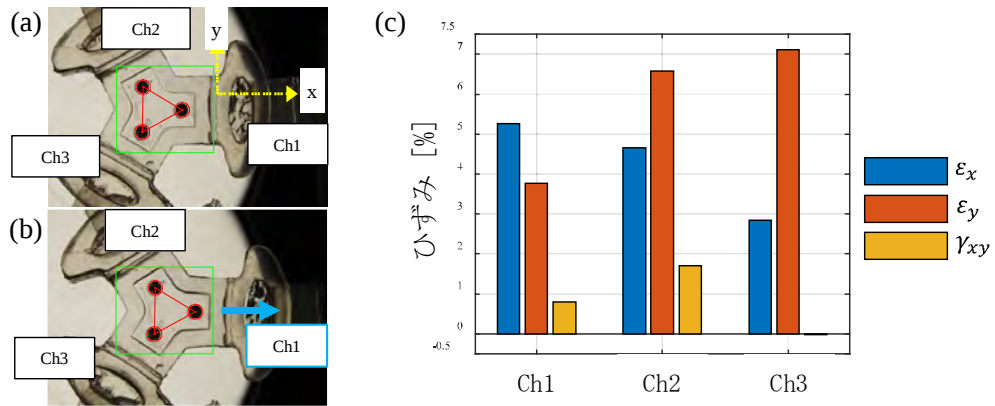


図4 印加空気圧と培養部のひずみの関係

このデバイスと電空回路を接続し、空気圧印加によって生じるひずみ量を測定した。ピラーの変位を上からカメラで撮影し、ピラー3本がなす三角形の変形からひずみを計算した。Ch1 Ch2 Ch3 に順に 60 kPa 印加した。図 4(a)は無印加時のときの、(b)は Ch1 に 60 kPa を印加した時の培養部の画像である。図 4(c)は x 方向, y 方向の引張ひずみ, xy 方向のせん断ひずみをそれぞれ棒グラフで示している。最大 7.1%の引張ひずみが生じたものの 10%ひずみには至らず、要求仕様 C)は未達となった。

3.3 伸張を与えながら培養した細胞の成長度評価

開発したデバイスを用いて細胞に引張を与えながら培養する実験を行った。実験に先立ち、理化学研究所から提供されたマウス筋芽細胞(C2C12, RCB0987)を培養した。培養はT型フラスコとインキュベータ(37 °C, 5% CO2)で行われた。培地にはダルベッコ改変イーグル培地にウシ胎児血清を 10%, ペニシリン ストレプトマイシン(X100)溶液を 1%添加したものをを用いた。細胞継代の際には 0.25% trypsin-EDTA 溶液を用いて培養フラスコから細胞を剥離し、遠心分離(1500 rpm, 3 min)で細胞ペレットを得た。

細胞の継代は3日おきに行われ、細胞の増殖性に問題が無いことが確認された。

培養により得られた細胞ペレットをコラーゲン溶液で懸濁し、デバイス培養部のくぼみに流し込みゲル化させた。コラーゲン溶液としては0.4% I型コラーゲン再構成溶液とマウス細胞外基質であるマトリゲルを9:1の割合で混合させたものを用いた。培養部が浸るように培地を加えて、インキュベータで1日間、静置培養した。サンプルとしては、培養器一体型ソフトアクチュエータは2個、静置培養用の培養部のみを1個準備した。1日目の培養後、サンプルをインキュベータから取り出し、顕微鏡で細胞の生存を確認した。再びサンプルをインキュベータに設置し、空気配管を繋いだ。コンプレッサや電空回路を起動し、2日間、引張を加えながら培養した。条件(a)ではCh1に1秒間60 kPa印加、全Chに1秒間無印加を繰り返した。条件(b)ではCh1に1秒間60 kPa印加、Ch2とCh3に1秒間30 kPa印加を繰り返した。条件(c)は培養部のみの静置培養とした。

伸展培養が終わったサンプルは、4%PFA溶液で細胞を固定し、TritonX-100で透過処理し、ウシ血清アルブミンでブロッキング処理した。その後、筋芽細胞の成長度合いを示すタンパク質であるアクチンフィラメントをファロイジンで染色した。共焦点顕微鏡を用いて20倍で撮影した画像が図5である。それぞれ条件(a)、(b)、(c)の画像であり、(d)は3つのサンプルの輝度分布である。画像からも明らかであるが、条件(c)静置培養に比べ、伸展を与えた条件(a)と(b)ではアクチンフィラメントが強く発現した。輝度分布は全条件で単峰となり、そのピークの位置は条件(a)、(b)、(c)の順に大きかった。条件(b)の2方向に伸展させた方が高い成長度合いとなると予想されていたが、条件(a)の1方向に伸展させた場合の方が勝る結果となった。

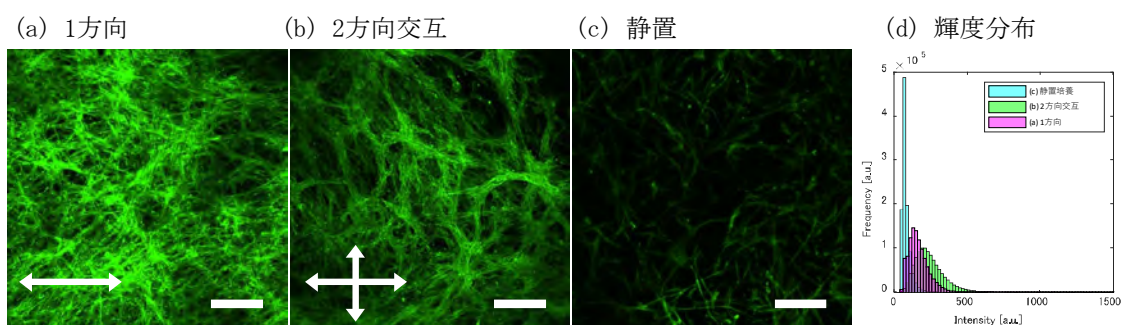


図5 デバイスにて1日間静置培養後、2日間伸展させながら培養した細胞の細胞骨格タンパク質(アクチンフィラメント)を免疫染色した画像。(a)1方向に伸展させた場合、(b)2方向に伸展させた場合、(c)静置培養の場合、(d)3つの画像の輝度分布。

4. 本研究を実施したグループに属する主な研究者の氏名、職名

倉科佑太 東京農工大学 准教授

5. 研究実施時期

2023年 4月 1日から 2024年 3月31日まで

6. 本研究に関連して発表した主な論文等

Atsushi TAKATA, Takayoshi KAMADA, Yuta KURASHINA, “Soft Robot for Cell Culture with Multi-directional Mechanical Stretches,” The 16th IFToMM World Congress, 7A1 -084, Tokyo, Nov. 2023.

(投稿中) Atsushi TAKATA, Yuta KURASHINA, “A Multi-Degree-of-Freedom Soft Robotic Chamber for Myoblast Differentiation,” IEEE Transactions on Medical Robotics & Bionics.

7. 内外における関連研究の状況

細胞の成熟プロセスに力学的な刺激が与える影響については以前から調査されてきた。先行研究では、アクチュエータと力学刺激の伝え方は電磁アクチュエータによる引張り[1], PZTによる振動[2], ポンプによる静水圧などがある。

近年、ソフトロボットを用いて生体組織の形を模倣した培養デバイスによって、より生体に近い力学刺激を再現する研究が行われている。例えば、腱駆動ヒューマノイドロボットの肩に培養デバイスを置いて、肩の動きによって細胞を刺激する研究[3]や、管組織の内壁の圧縮力を屈曲する空圧ソフトロアクチュエータの内側で模倣した研究[4]が報告されている。これらの研究では刺激のかけ方が1パターンであるのに対し、本研究の培養デバイスは3つの人工筋肉を備え、平面内の変形(2つの引張り・1つのせん断)を生成することができる。これは、三角筋といった骨格筋が層状の構造であるため、微視的な細胞が受ける変形が平面3自由度と仮定できることから着想を得たものである。

[1] Keitaro Kasahara et al. „Spatiotemporal single-cell tracking analysis in 3D tissues to reveal heterogeneous cellular response to mechanical stimuli.Sci. Adv.9,eadf9917(2023).DOI:10.1126/sciadv.adf9917

[2] Kosawada, T., Ohnishi, K., Satoh, H. et al. Novel methods to apply micro dynamic stimulations on cultured adhesive cells and its application in constructing gel-embedded three-dimensional neuronal structures differ-

- entiated from human iPS cells. *Microsyst Technol* 24, 625–638 (2018).
<https://doi.org/10.1007/s00542-017-3399-4>
- [3] Mouthuy, P.A., Snelling, S., Hostettler, R. et al. Humanoid robots to mechanically stress human cells grown in soft bioreactors. *Commun Eng* 1, 2 (2022). <https://doi.org/10.1038/s44172-022-00004-9>
- [4] Paek, J., Song, J.W., Ban, E. et al. Soft robotic constrictor for in vitro modeling of dynamic tissue compression. *Sci Rep* 11, 16478 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-94769-2>

8. 今後の発展に対する希望

本研究で開発したデバイスのコンセプトは生体筋肉を育てる人工筋肉デバイスとも表現でき、新たな学術的展開が期待される。開発した伸展培養器の人工筋肉の動きを様々にプログラムすることで、どのような引張り刺激パターンが細胞の成熟度を高めるのか探索的に調査できる。

再生医療の分野では、患者自身の細胞を取り出し、体外で培養した組織を移植する直培養と呼ばれる手法が注目されている。軟骨組織、表皮組織の移植の例が報告されている。今後、移植可能な組織の種類を増やすことは世界中で求められている。ここで課題となっているのは、体の中の組織に匹敵する成熟度まで組織を体外で培養する技術である。筋組織の成熟度には力学的な刺激が重要な因子であるとみられ、本研究のような培養デバイスが筋組織の再生医療にとって重要な知見をもたらす可能性がある。