

(続紙 1)

| | | | |
|--|--|----|-----|
| 京都大学 | 博士 (人間・環境学) | 氏名 | 丁 然 |
| 論文題目 | Construction of functional artificial skeletal muscle tissue by regulation of cell-substrate interaction using myogenic C2C12 cells | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>医学研究や医薬品開発分野において、<i>in vitro</i>で生体内と同様の挙動を示す人工組織の構築は非常に重要な課題である。特に、動物実験の世界的な規制の流れから、動物の代替となる人工組織の果たす役割は極めて大きい。骨格筋の筋肉組織は、人体において大きな割合を占めており、近年、<i>in vitro</i>における筋肉組織の構築に関して、世界中で多くの成果が報告されるようになった。しかし多くの場合は、組織内部での細胞分化の度合いや成熟が不十分であることや、組織構築までのプロセスが煩雑であることが多く、より簡便で高効率なプロセス開発が求められている。</p> <p>本論文では、マウス骨格筋由来筋芽細胞 (C2C12細胞) を用いて、細胞外環境、なかでも細胞-基質間相互作用の調整が分化や組織形成に与える影響を評価し、より効率的な人工筋肉組織の構築法の開発を試みている。</p> <p>本論文の第1章では、人工組織の構築法や、細胞外マトリックス (ECM) などに関する知見や研究の現状を概説している。ECMは、細胞外環境を司る重要な因子の一つであり、細胞接着や組織形態をサポートする役割だけでなく、インテグリンと呼ばれる細胞膜タンパク質と接着することで細胞の増殖、分化、シグナル伝達などに影響を与え、細胞挙動や運命決定において様々な役割を果たしていることが明らかになっている。さらに、細胞と細胞外環境の間には生化学的な関係に加え、物理的な作用も存在しており、ECMは、生体内で細胞を支え、保護する役割も果たしている。このように、細胞-基質間相互作用が、細胞の分化や組織形成に大きな影響を与えていることから、より効率的な人工筋肉組織の構築法の開発を行うために、細胞-基質間相互作用を調整し、分化や組織形成に与える影響を評価するという本論文の目的を導き出している。</p> <p>第2章では、ECMとインテグリン発現量が分化や組織形成に及ぼす影響について述べている。ECMの構成要素であるコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンや、マトリゲル (マトリゲル基底膜マトリックス) を、それぞれ用いてコートした培養容器で培養したC2C12細胞の接着率や遊走速度は、非コート容器で培養したコントロールと比べて向上しており、細胞-基質間相互作用が強化されていることが示唆された。一方、上記各ECMタンパク質でコートした培養容器で分化誘導した筋管を評価した結果、マトリゲルをコートした容器のみ分化率および筋管の径が、非コートの場合と同等であり、他のECMタンパク質によってコートした条件では抑制された。これらの結果から、分化や細胞の組織化に対してECMが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。次に、インテグリン$\alpha 7\beta 1$発現を調節することが報告されているサイクリン依存性キナーゼ阻害剤 (SU9516) を添加して影響を検討したところ、$10 \mu\text{M}$において筋管の径が有意に増大した。一方、分化率に対しては有意な効果は見られなかった。このことから、インテグリン$\alpha 7\beta 1$の発現向上は、細胞融合に寄与している可能性が示唆された。ここまでの結果から、細胞-基質間相互作用を司る細胞側および基質側のそれぞれの因子が分化や組織形成に影響を与えることが示唆されたため、本論文では、これらの組み合</p> | | | |
| (裏面に続く) | | | |

わせによる分化および筋管形成への影響を評価している。その結果、マトリゲルをコートした培養容器にSU9516を添加した条件において、コントロールと比較して有意に筋管の径および分化率が向上することが明らかになった。さらに興味深いことに、マトリゲルの主成分の一つであるラミニンをコートした培養容器にSU9516を添加した条件ではコントロールと同等であり、マトリゲルに含まれる複数のECM成分が複合的に影響を与えている可能性が示唆された。さらに、本論文では、細胞-基質間相互作用の調整が誘導された筋肉組織の本質的な機能である収縮に対してどのような影響を与えるかを評価している。その結果、マトリゲルとSU9516の両方を使用した条件において、成熟筋肉組織に見られるサルコメア構造がより鮮明に観察され、収縮力も強いことが明らかとなり、インテグリン発現量とECMの制御は人工筋肉組織構築においても重要な因子であることを示すことに成功している。

第3章では、筋芽細胞を培養する際の表面材料の柔軟性に注目している。ポリアクリルアミドゲルを用いる方法は、比較的簡便に再現性良く柔軟性の異なる表面材料を調整できる。そこで、この方法でいくつかの柔軟性の異なる表面材料を用意し、C2C12細胞の挙動に与える影響を系統的かつ定量的に検討している。その結果、柔らかい表面材料（弾性率：1 kPa）が優れており、第2章で優れた材料であることが明らかにされたマトリゲルとともに用いることによって、C2C12細胞のより良い自己組織化を誘導できることを明らかにしている。次に、筋肉組織を作成するために、培養容器中心に円柱状のプラグを配置した軟培養面上へ、高密度でC2C12細胞を播種し、その結果プラグ周囲に形成した環状組織を、腱の代替としてのステンレスピンの間に移し、張力をかけた状態で培養を行っている。その結果、形成されたバンド状の環状組織では、C2C12細胞の分化が不十分であったが、二次元培養系において分化促進の報告がある骨形成タンパク質（BMP）シグナル阻害剤を添加することにより、より多くの筋管形成が観察でき、筋管の径も有意に増大させることに成功している。

このように、本論文は、より簡便に分化・成熟した人工筋肉組織を誘導するために、ECMやインテグリン発現量、培養面の柔軟性といった条件を変えて細胞-基質間相互作用を調整することが有効であることを明らかにし、*in vitro*モデル構築の際に有用かつ重要な知見をもたらしている。

(論文審査の結果の要旨)

近年、動物愛護などの観点から、動物実験に関する規制が厳しくなっており、実験のために使用される動物の代替として利用できる細胞組織を、培養細胞を用いて人工的に構築できれば、その意義は極めて大きい。また、老化や細胞壊死に伴う組織や臓器の機能不全のような、これまで治療が難しいとされてきた疾患に対応し得る次世代の医療として期待されている再生医療を、現実のものとするうえで、細胞を用いて組織を人工的に構築するための研究は、非常に重要で、世界中の研究者が精力的に取り組んでいる。

骨格筋の筋肉組織は、人体において大きな割合を占めており、同じ方向に配列する骨格筋繊維によって構成されている。筋繊維は、筋管から構築され、筋管は筋芽細胞が融合しあって形成される。近年、日常の生命活動において引き起こされる骨格筋の損傷は修復され得ることが明らかになり、*in vitro*における筋肉組織の構築に関して、世界中で多くの成果が報告されるようになった。なかでも、筋芽細胞の筋管への分化に関しては、分化に関わる成長因子や遺伝子レベルでの分化制御などが、精力的に研究されている。

しかしながら、筋芽細胞からの筋肉組織の*in vitro*構築においては、まだまだ、数多くの問題点が存在している。例えば、構築された組織内部での細胞分化の度合いや成熟度が不十分であることや、組織構築までのプロセスが煩雑であることなどが挙げられる。したがって、成熟度の高い筋肉組織をより簡便で高効率に構築するプロセス開発が求められており、そのためには、本論文にて申請者が取り組んでいるような、筋芽細胞の分化や組織化に重要な因子の系統的かつ定量的な探索・検証が非常に重要になると考えられる。

本論文の第1章では、人工組織の構築法や、分化誘導させる環境因子として着目した細胞-基質間相互作用や、生体内における細胞-基質間相互作用の主役ともいえる細胞外マトリックス (ECM) などに関する既報の知見や現在の課題について、適切に述べられている。本章からも、申請者が、本論文における研究課題に関して、必要な学識を備えていることが分かる。

第2章では、筋芽細胞を用いて分化誘導させる際の環境因子として、まず、ECMに着目し、実際に検証を行っている。ECMは、細胞の周りに存在する微小環境として、細胞の接着、シグナル伝達、増殖、分化、アポトーシスなどの多様な生命活動に影響を与えていることが知られている。本論文では、ECMの構成要素として重要な、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンと、マトリゲル(マトリゲル基底膜マトリックス)を用いて研究を行っている。コラーゲンは、生体内における含有量が比較的豊富なECMの主要成分であり、フィブロネクチンは、ジスルフィド結合によって繊維状の構造を持つ糖タンパク質で、細胞骨格の形状を調節し細胞の伸展接着を促進するだけでなく、組織の損傷を修復するための細胞遊走に重要な役割を果たしている。ラミニンは、動物の胚と生体組織の基底膜を構成する分子量の大きいタンパク質であり、

(裏面に続く)

マトリゲルは、ECMタンパク質を豊富に含むEngelbreth-Holm-Swarmマウス肉腫から抽出した可溶性成分で、胚性幹（ES）細胞を維持培養する際のフィーダー細胞の代わりとしてよく用いられている。これらECM関連物質が細胞の分化や組織化にどのような影響を与えるかに注目したところが、本論文の優れた着眼点の一つである。

本章では、これらのECM関連物質が、筋管への分化率、筋管に分化した時に形成される筋管の長さや径、筋特異的遺伝子の発現などに与える影響について系統的かつ定量的に検討を加えている。さらに、マトリゲルでコートしたディッシュ表面上で培養する際に、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤（SU9516）を添加することにより、収縮力が優れた人工筋肉組織が誘導できることを示した。SU9516は、ECMと細胞の間の接着に関与しているインテグリンの発現を促進することが知られており、これらの結果は、インテグリン発現量とECMの制御が人工筋肉組織構築において重要な因子であることを示したものとして、高く評価できる。

第3章では、細胞-基質間相互作用の一つとして、筋芽細胞を培養する際の表面材料の柔軟性が筋芽細胞の挙動に与える影響を、系統的かつ定量的に検討している。その結果、柔らかい材料（弾性率：1 kPa）が、表面材料として優れており、第2章において優れた材料であることが明らかにされたマトリゲルとともに用いることによって、より良い状態に細胞を自己組織化できることを明らかにしている。本成果は、細胞培養を行う容器の表面材料の選択に大きく貢献すると考えられる。

さらに、本章では、骨形成タンパク質（BMP）シグナル阻害剤の添加によって、筋芽細胞の分化速度を促進し、かつ形成される筋管の径も増大することも明らかにするなど、注目に値する研究成果が示されている。

以上のことから、本論文は、ECMやインテグリン発現量、培養面の柔軟性といった条件を変えて細胞-基質間相互作用を調整することが、より簡便に分化・成熟した人工筋肉組織を誘導するために有効であることを明らかにし、筋芽細胞を用いた人工的な筋肉組織の構築に関する貴重な知見を与えており、未来社会を支える新しい機能性材料の研究開発を行うことを大きな目標の一つとしている人間・環境学研究所相関環境学専攻における博士論文としてふさわしい内容を備えたものであると判断される。

よって、本論文は、博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年1月28日、論文内容とそれに関連した事項について試問をおこなった結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 令和 年 月 日以降