

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01352

研究課題名（和文）vECM-ナノグラフェン複合基質の創製によるiPS細胞由来機能的な心室筋組織の構築

研究課題名（英文）Construction of ventricular tissue from human iPS cell-derived cardiomyocytes on vECM-nanographene composite substrate

研究代表者

馮 忠剛（Feng, Zhonggang）

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：10332545

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はiPS細胞の分化誘導、細胞選択及び組織構築をin vivoのように一貫して統合的に模擬する革新的なストラテジーを提唱し、その実現のため、心室組織細胞外マトリクス由来ハイドロゲルをベースとして、形状パターンを有するナノグラフェン薄膜を包埋し、生化学・構造・電気特性が調整できるvECMgel+nGraphene基質を開発した。また、この培養基質により、心臓・血管系細胞の分化誘導を行い、再生組織構築における新たな方法論「中間モジュール法（intermediate module）」で、生体組織の階層的な構造を持つ再生心室組織を構築した。分化心室筋細胞の遺伝子発現向上と配向組織化を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、vECMgel+nGraphene培養基質による心臓・血管系の多種細胞の系統的な同時分化誘導および組織発生を目指して、まず独創的な生化学・構造・電気特性が調整できるvECMgel+nGraphene基質を開発した。また、再生組織構築についての新たな方法論「中間モジュール法」を提唱しiPS細胞からorganoid発生の新たな研究展開と相まって組織構築発生の本質をつきとめる斬新なストラテジーを実行した。これらの革新的な方法は全ての再生組織構築に利用できることを示唆され、ヒトiPS細胞をセルソースとする心筋再生組織の構築による心筋症の治療と創薬モデルの開発に極めて有意義な成果を得た。

研究成果の概要（英文）：In this study, we pursued the strategy of integrating the cardiomyocyte differentiation, selection, and tissue construction into a continuous in-vivo simulation process. To this end, a vECM+nGraphene culture substrate was developed, which was based on ventricular extracellular matrix hydrogel and patterned stretchable nanographene electrodes were embedded in. The biochemical, biomechanical, and electrical properties of the substrate can be adjusted by means of crosslinker, concentration change, and application of strain and electrical stimuli. Cardiomyocyte differentiation was conducted on the substrate, and ventricular tissue was engineered by stacking intermediate modules, which were the construction blocks developed by the above strategy. It was confirmed that the hierarchical structure can be formed based on the substrate. The enhancement of the specific genetic expression and cellular orientation were also implicated.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：特性調節複合培養基質 ヒトiPS細胞心筋分化 心筋サブタイプ分化誘導 再生組織構築 中間モジュール法 電気・ひずみ刺激 バイオリアクタ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞をセルソースとして細胞組織工学的に構築した心筋再生組織は、重症心不全に対する再生治療法や創薬スクリーニング用の組織モデルとして多大な期待が寄せられている。その一般的な方法では、iPS 細胞の心筋細胞への効率的な分化誘導をはじめ、標的心筋細胞の選択そして心筋再生組織の構築が主要な過程である。研究当初では、iPS 細胞の懸濁培養・分化法 (Nature Protocol 2015;10:1345-61) や iPS 細胞から分化した心筋細胞を用いて構築した心筋組織モデルの拍動機能向上 (Biomaterials 2016;111:66-79) などの発展は目覚ましかったが、それぞれの過程の独立・分割性は、操作の重複や高コストをもたらし、遺伝的変異が起こりやすいなどの問題点を引き起こす上、特に自然な組織発生過程が乱されて血管構造の欠如に陥り、健全な機能的再生組織の構築が極めて困難とされている。

申請者はこれまでマウスやヒトの ES/iPS 細胞に対して小分子量の化学物質や遺伝子組み換え誘導法などを用いて高効率に心筋細胞に分化誘導する研究を行ってきて、特に分化誘導過程で培養基質の化学的組成と力学的特性が ES 細胞の心臓・血管系細胞の分化に及ぼす影響について取り組んできた。一方、これまでの研究において一般的な幹細胞培養・分化から組織構築までのそれぞれの過程の独立・分割性による欠点も痛感した。そこで、組織・臓器の発生は多種の細胞間の相互作用に基づく連続一貫した過程であって、細胞分化から組織構築までの一貫した統合的ストラテジーは極めて自然であり、実現可能なはずであると考えた。また、近年ナノグラフェン薄膜の新たなバイオマテリアルとしての優れた生体適合性、柔軟性及び電気伝導性が示されつつあり、そのような優れたバイオマテリアルを、申請者がこれまで開発したハイドロゲルに組み入れ、心筋再生組織構築技術を前進させることを構想した。

2. 研究の目的

本研究は iPS 細胞の分化誘導、細胞選択及び組織構築をより *in vivo* のように一貫して統合的に模擬する革新的ストラテジーを提唱し、生化学・構造・電気特性が調整可能な発生過程適合培養基質、即ち心室組織細胞外マトリクス由来ハイドロゲルをベースとして、形状パターンを有するナノグラフェン薄膜を包埋し、生化学・構造・電気特性が調整できる vECMgel+nGraphene 基質を開発し、この培養基質による以下の二点の研究目標を実現する。

(1) 最終目標である心筋組織構築を目指すため、単一心筋細胞だけの分化ではなく、心臓・血管系細胞の系統的分化誘導を行い、*in vivo* のような多種細胞間の相互作用と自己組織能を利用して、より自然な発生過程により心筋細胞、内皮細胞および平滑筋細胞の多種細胞の集積的分化誘導とその相互作用を利用することを目標とする。

(2) 再生組織構築について新たな方法論 中間モジュール法 (intermediate module) で行う。生体組織が階層的な構造を持つことに対して、まず必要な多種の細胞の分化・選択・組織構造の発生を特定機能の基質上で行わせ、細胞-基質の統合的な中間構造 (中間モジュールと呼ぶ) を作製し、多数の中間モジュールを基本的な構成ユニットとして積層して再生組織を構築する。

3. 研究の方法

本研究では上記の細胞分化から組織構築までの一貫・統合したストラテジーを実現するため以下の革新的技術方法を開発した。

(1) 動物心室組織細胞外マトリクスのハイドロゲル (vECMgel) を培養基質のベースとし、その構造力学特性と電気伝導特性を向上させるためナノグラフェン薄膜を包埋する。生化学機能分子の更なる修飾やナノグラフェン薄膜の形状パターンの最適設計などにより応力・電気刺激の印加によってその生化学・構造・電気特性を調節し、心筋発生過程適応培養基質 (vECMgel + nGraphene 基質) を創製する。

(2) 上記の vECMgel + nGraphene 基質上でヒト iPS 細胞から系統的に心室筋・血管系細胞に分化誘導を行う。心臓・血管系細胞の代謝的特徴及び応力・電気特性を利用して心臓・血管系細胞を選択し、多種細胞間の相互作用と自己組織能の利用に適した応力・電気培養条件下で微小心室筋組織の発生を実現し、最終的な組織構築用の中間モジュールを作成する。

(3) 上記中間モジュールに積層などの技法とバイオリアクタを用いて、階層的構造を有する心室筋再生組織を構築し、ヒト iPS 細胞の分化 選択 組織構築の一連の過程を一貫して統合的に行うことで、iPS 細胞から機能的再生心室筋組織を創出する。

4. 研究成果

(1) 心室筋細胞外基質由来ハイドロゲル (vECMgel) と分化心筋細胞刺激用のグラフェンペーパー電極の作成と統合

vECMgel はヤギの心室筋を細切、脱細胞、pepsin での消化処理によって得られた ECM 溶液を pH 値と塩濃度の調整によりハイドロゲルを作成した。さらに vECMgel を架橋剤 EDAC の処理によってゲルの力学特性を調整した (図 1)。そして、ピクロシリウスレッド染色によって、コラーゲン線維のネットワーク構造の確認 (図 2) および細胞培養適合性を検証した (図 3)。

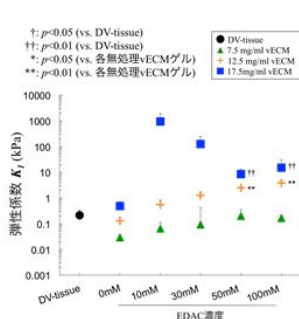


図1. vECMgel の非線形 Kelvin モデルの弾性係数 K_1 の調整

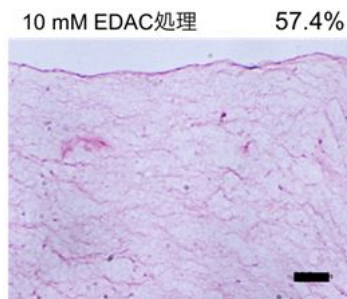


図2. vECMgel の Picro-sirius red 染色画像 (scale bar = 20 μ m)

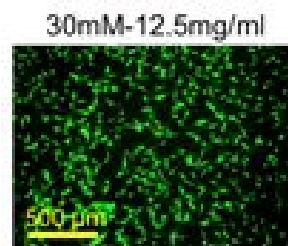


図3. vECMgel 上ラット 胎児線維芽細胞培養

グラフェンペーパー電極については酸化グラフェンのアスコルビン酸溶液での加熱還元処理と真空濾過により厚さ数十ミクロンのペーパーを作成し、多種形状の電極を完成した (図 4a)。更に、動的応力を印加する時に vECMgel の力学特性に適合するため、複合ナノグラフェン伸展性薄膜電極 (PEDOT:PSS-nGraphene-latex 電極) を開発した (図 4b)。ナノグラフェン薄膜の形状パターンの最適設計などにより応力・電気刺激の印加によってその生化学・構造・電気特性を調節し、心筋分化に適応する培養基質 (vECMgel + nGraphene 基質) を創製した。



図4. 異なる形状(a)の複合 ナノグラフェン伸展性薄膜

(2) vECMgel 基質上でのヒト iPS 細胞の心臓・血管系分化と細胞選択

ヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導は培養単層の状態下で Wnt 経路の制御によって高効率で行った。分化誘導された心筋細胞は力学特性を調整した vECMgel 基質上で培養し、サブタイプ心筋細胞分化の制御を試みた。vECMgel 基質上では、分化誘導 7 日目から基質上での播種は、15 日目からの播種より拍動の頻度が低くなったが (図 5)、免疫蛍光染色画像から Matrigel 上と比べて細胞が密集している箇所には心室筋細胞がより発現された (図 6)。Real Time PCR の結果からも心室筋細胞、洞房結節細胞に関しては早期再播種のほうが分化を促進できる可能性が考えられた (図 7)。また、心室筋・心房筋細胞は生体心筋組織の力学特性に比べて顕著に低い弾性率を有する vECMgel 基質上で有利に分化・成熟する傾向があった。この結果はヒト iPS 細胞のサブタイプ心筋細胞分化の促進と選択に新たな方法を示唆した。

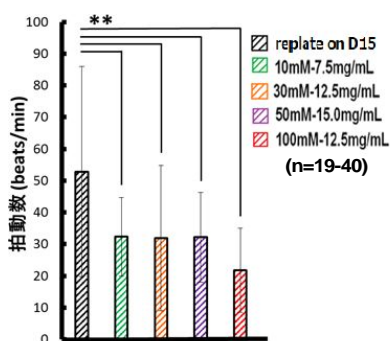


図5. vECMgel 上再播種時期による拍動数の変化

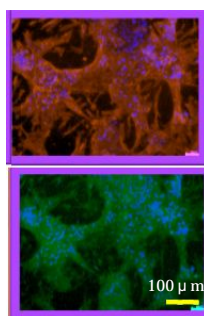


図6. vECMgel 上に分化した心筋細胞 (緑 MLC2v; 赤 cTnT; 青 DAPI)

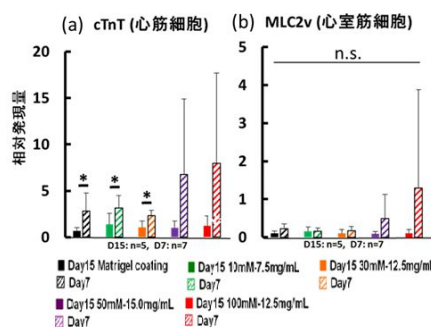


図7. 分化した心筋細胞における mRNA の発現

(3) vECMgel + グラフェンペーパー電極基質上での組織構築中間モジュールの構築

新たに開発した動的応力 - 電気刺激印加バイオリアクタ (図 8) を用いて、組織構築中間モジュールの培養を行った。中間モジュールには vECMgel、培養細胞および柔軟電極から構成され、動的応力 - 電気刺激印加下で培養・観察した。培養細胞は刺激下で配向・組織化傾向が現れ (図 9) さらに電気刺激により細胞選択の可能性も示唆された。免疫蛍光染色により観察を行い、成熟心筋細胞マーカー cTnT、心室筋細胞マーカー MLC2v の発現が確認された。更に、中間モジュールに積層などの技法による 3 次元培養では vECMgel + nGraphene 基質上の 2 次元培養より更なる階層的構造を有する心室筋再生組織の構築とヒト iPS 細胞の分化 選択 組織構築の一連の過

程を一貫して統合的な機能的再生心室筋組織の創出可能性を示唆した（図 10）。



図 8 . 新たに開発した動的応力 - 電気刺激印加バイオリアクタ

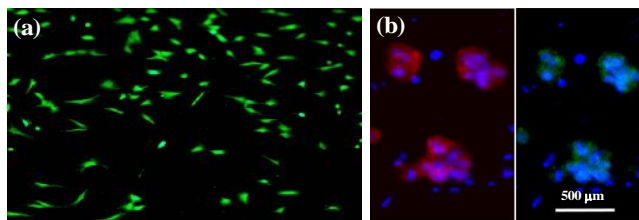


図 9 . 培養細胞は刺激下での配向性(a)と組織化(b)

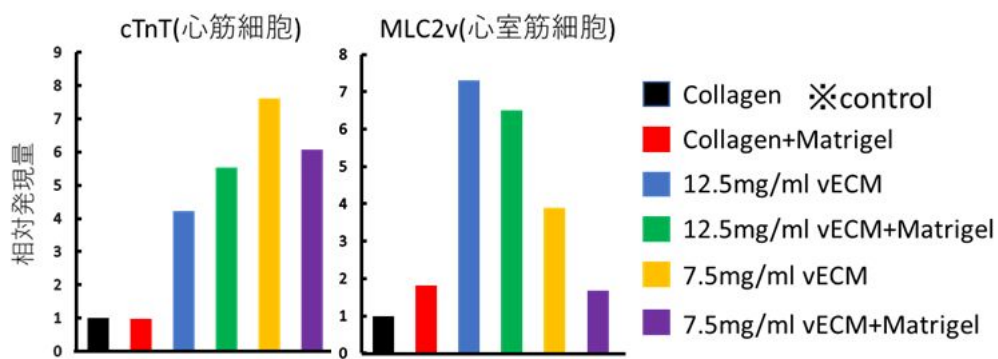


図 10 . 中間モジュール積層技法による 3 次元培養心筋細胞の分化・培養における発現

以上の研究成果により当初設定した研究目標は概ねに達成した。しかしながら、中間モジュールに積層などの技法による 3 次元培養では vECMgel + nGraphene 基質において電気・応力刺激下の心室筋再生組織の血管新生の促進について更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujita Kyohei, Feng Zhonggang, Sato Daisuke, Kosawada Tadashi, Nakamura Takao, Shiraishi Yasuyuki, Umezu Mitsuo	4. 巻 5
2. 論文標題 Modulation of the mechanical properties of ventricular extracellular matrix hydrogels with a carbodiimide crosslinker and investigation of their cellular compatibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 AIMS Materials Science	6. 最初と最後の頁 54 ~ 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3934/matricsci.2018.1.54	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Feng Zhonggang, Kosawada Tadashi, Nakamura Takao, Sato Daisuke, Kitajima Tatsuo, Umezu Mitsuo	4. 巻 4
2. 論文標題 Theoretical methods and models for mechanical properties of soft biomaterials	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 AIMS Materials Science	6. 最初と最後の頁 680 ~ 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3934/matricsci.2017.3.680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Nakamura Takao, Sato Daisuke, Yamaguchi Riku, Suzuki Ryou, Sasaki Hiroyuki, Kusunoki Masataka, Feng Zhonggang
2. 発表標題 Supplementation of arachidonic or docosahexaenoic acid in culture medium improves contractile performance of cardiomyocytes
3. 学会等名 WCMPBE 2018, Prague (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hamada Fumika, Fujita Kyohei, Feng Zhonggang, Kosawada Tadashi, Sato Daisuke, Nakamura Takao, Shiraishi Yasuyuki, Umezu Mitsuo
2. 発表標題 Differentiation of subtype cardiomyocytes derived from human iPS cells on extracellular matrix hydrogels
3. 学会等名 6th Internat Conf Smart Systems Eng (SMASYS2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馮忠剛, 藤田恭平, 糸山廣章, 濱田文花, 小沢田正, 佐藤大介, 中村孝夫, 白石泰之, 梅津光生
2. 発表標題 心室筋細胞外基質ハイドロゲルにおけるヒトiPS細胞の心筋細胞への分化
3. 学会等名 第56回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋口俊介, 藤田恭平, 小松由佳, 馮忠剛, 小沢田正, 佐藤大介, 中村孝夫, 白石泰之, 梅津光生
2. 発表標題 心室筋ECM ゲルの作製および細胞培養適合性の検討
3. 学会等名 第57回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 糸山廣章, 藤田恭平, 樋口俊介, 濱田文花, 小松由佳, 小沢田正, 馮忠剛, 佐藤大介, 中村孝夫, 白石泰之, 梅津光生
2. 発表標題 心室筋ECM足場を用いたヒトiPS細胞のサブタイプ心筋細胞の分化
3. 学会等名 第57回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 恭平, 馮 忠剛, 小沢田 正, 佐藤 大介, 中村 孝夫, 白石 泰之, 梅津 光生
2. 発表標題 心室組織ECM由来ハイドロゲルの力学特性の向上と細胞適合性の評価
3. 学会等名 第56回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 馮 忠剛, 小沢田 正, 中村 孝夫, 佐藤 大介, 梅津 光生
2. 発表標題 コラーゲンゲルにおける細胞・組織の力学
3. 学会等名 第56回日本生体医工学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hamada Fumika, Fujita Kyohei, Feng Zhonggang, Kosawada Tadashi, Sato Daisuke, Nakamura Takao, Shiraishi Yasuyuki, Umezu Mitsuo
2. 発表標題 Investigation on the cardiomyocyte subtypes derived from human iPS cells on ventricular ECM hydrogels
3. 学会等名 The 8th meeting of the international federation for artificial organs (IFA02019, Osaka) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshino Shin, Suenaga Takuya, Feng Zhonggang, Kosawada Tadashi, Sato Daisuke, Nakamura Takao, Umezu Mitsuo
2. 発表標題 A bioreactor system for the cardiac differentiation of human iPS cells
3. 学会等名 The 8th meeting of the international federation for artificial organs (IFA02019, Osaka) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhonggang Feng, Shunya Kuramochi, Tadashi Kosawada, Daisuke Sato, Takao Nakamura, Mitsuo Umezu
2. 発表標題 Investigation on the Poisson's ratio of fibroblast-compacted collagen gels
3. 学会等名 第59回日本生体医工学学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://mech.yz.yamagata-u.ac.jp/lab/robo/feng_lab.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中村 孝夫 (Nakamura Takao) (00142654)	山形大学・大学院医学系研究科・教授 (11501)	
研究 分担者	小沢田 正 (Kosawada Tadashi) (10143083)	山形大学・大学院理工学研究科・教授 (11501)	
研究 分担者	梅津 光生 (Umezu Mitsuo) (90132927)	早稲田大学・理工学術院・教授 (32689)	