

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04509

研究課題名(和文) 分子・細胞・組織レベル同時計測に基づく再生心筋組織の収縮力の発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) Development of a measurement method of contraction forces produced by regenerated myocardial tissues at molecular, cellular, and tissue levels

研究代表者

神戸 裕介 (Kambe, Yusuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員

研究者番号：30747671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再生心筋組織の階層構造における各レベル(分子群、細胞、組織)の拍動収縮力を計測する技術を開発し、再生心筋組織の拍動収縮力発現メカニズムの一端を解明することを狙った。分子群レベルの拍動収縮力計測系の構築には至らなかったが、心筋細胞の拍動収縮力と再生心筋組織のその計測技術を構築できた。その結果、組織レベルの計測で得られた再生心筋組織の単位面積当たりの拍動収縮力は、細胞レベルの計測で得られたその約30倍強いことが分かった。再生心筋組織の拍動収縮力は、個々の心筋細胞が生み出すその単純な足し合わせではなく、心筋細胞群の配向や拍動の同期性等が相乗的に作用する結果であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一の再生心筋組織サンプルの拍動収縮力を細胞レベルと組織レベルで計測する技術の創出とこれによって得られた知見は、再生心筋組織の階層構造に伴う拍動収縮力の増強機序の存在を示唆した。これを明らかにすることは、ナノ・マイクロスケールの構造体の機能や挙動が、それらの集合体としてのマクロ構造体の機能を生み出す機構の理解に繋がる。また、機能的に成熟した再生心筋組織が構築できるようになり、心臓の再生医療の発展にも結び付く。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a method to measure contraction forces produced by regenerated myocardial tissues at cellular and tissue levels simultaneously. A cantilever-based force measurement system revealed that regenerated myocardial tissues composed of neonatal rat cardiomyocytes and collagen type I hydrogel produced a contraction force of about 40 nN/mm² during their self-beating. In contrast, an imaging-based method showed that the force produced by single cardiomyocytes in the regenerated tissues was approximately 1.3 nN/mm². This difference indicated that the contraction force at the tissue level was not merely the sum of contraction forces produced by single cardiomyocytes. The force generated by regenerated myocardial tissues might be the result of synergistic effects of various factors such as orientation of cardiomyocytes and synchronization of self-beating.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：収縮力 心筋組織 ゲル FRET シルク コラーゲン 同期性

1. 研究開始当初の背景

血液のポンプとして働く心臓の再生医療においては、十分な収縮力をもって自己拍動する再生心筋組織を移植し、壊死した心筋組織の力学的な機能を補完することが望ましい。しかし、再生心筋組織は自己拍動するものの、遺伝子発現的な成熟度は新生児期にしか至っていない^[1]。また、多くの場合、再選心筋組織の拍動収縮力は、先人心筋組織のその10分の1にも満たない^[2-4]。それゆえ、心臓の再生医療の普及には、再生心筋組織の成熟度の向上、特に、拍動収縮力の増強が必要である。

心臓は、サルコメア(アクチン - ミオシン分子の集合体)、心筋細胞、心筋組織という階層構造(図1)を持ち、心筋細胞の拍動はサルコメアの収縮と弛緩に、心筋組織の拍動は心筋細胞のそれらに起因する。したがって、サルコメアの密度や配向性を高めることで心筋細胞の拍動収縮力を増強し、同様に、心筋細胞のそれらを増強することで再生心筋組織の拍動収縮力の増強が達成できると予想される。しかし、実際には、そうとは限らない。例えば、心筋細胞の配向によって再生心筋組織の拍動収縮力が強くなるとの報告^[5]がある一方、心筋細胞が配向しても再生心筋組織の拍動収縮力は変わらないとの報告^[2]もある。このように、再生心筋組織の拍動収縮力が発現されるメカニズムは不明であり、それゆえ、再生心筋組織の拍動収縮力を増強させる組織工学的な設計指針は確立されていない。

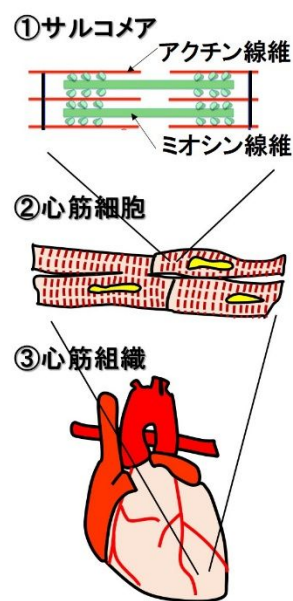


図1：心臓の階層構造

2. 研究の目的

本研究では、再生心筋組織の階層構造における各レベル(分子群、細胞、組織)の拍動収縮力を計測する技術を開発することで、再生心筋組織の拍動収縮力発現メカニズムの一端を解明することを目的とする。また、力の変化を可視化するセンサーやこれを固定したゲル状細胞足場材料の開発、さらに、再生心筋組織の成熟に重要な細胞足場材料の弾性率や生分解性の制御などの周辺技術の確立にも取り組む。

3. 研究の方法

3.1. 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)に基づく収縮力センサー固定ゲル状細胞足場材料の作製

先行研究にて、FRETに基づく収縮力センサーを得ている^[6]。本センサーは、FRETのアクセプター蛍光タンパク質、弾性リンカーペプチド、FRETのドナー蛍光タンパク質および細胞接着性RGDSペプチドから成る融合タンパク質である。本研究では、FRET収縮力センサーのN末端側に、シルクフィブロイン(シルク)結晶領域由来ペプチド^[7]をコードするDNAを挿入したタンパク質発現ベクターを構築した。シルク結晶領域由来ペプチド部がシルクゲルの物理架橋点に挿入されることで、センサー全体がシルクゲルに固定されることを意図している。

遺伝子組換え大腸菌にFRET収縮力センサーを発現させ、センサーの精製を行った。ゲル化反応を開始させたシルク溶液にFRET収縮力センサーを添加した。センサーを添加して作製したシルクゲルを界面活性剤入りの緩衝液で洗浄し、その前後での蛍光輝度を測定した。

Neonatal Cardiomyocyte Isolation System (Worthington製)によって新生ラットから単離した心筋細胞をセンサー固定シルクゲル上に播種し、10%牛胎児血清(FBS)含有MEM α で最長7日間培養した。そして、位相差顕微鏡(10倍対物レンズ搭載、TE300、ニコン製)を用いて細胞を観察した。

3.2. コラーゲンを足場材料とした自己拍動型再生心筋組織の構築と組織レベルの拍動収縮力の計測

I型コラーゲンの物理ゲル(セルマトリックス、新田ゼラチン製)をメーカーの説明書に従って作製し、得られたゲルのせん断弾性率(G)をレオメーター(MCR301、Anton Paar製)を用いて計測した。

4ウェルガラススライド(ミリセル、Millipore製)のウェル中にコラーゲンを作製し、新生ラット心筋細胞を播種して、10%FBS含有MEM α で培養した。培養3日目にウェルから取り出した再生心筋組織(心筋細胞とコラーゲンを成る)は、自己拍動した。極薄板ガラス(ホウケイ酸ガラス、長さ:45mm、幅(b):1.5mm、厚さ(h):0.03mm、ヤング率(E):71.4GPa、松浪硝子工業製)とステンレス棒をそれぞれカンチレバー、固定端とした拍動収縮力計測系に再生心筋組織をセットした(図2)。そして、CCDカメラ(15frame/sec、DP-80、オリンパス製)を取り付けたマクロズーム顕微鏡(0.3倍レンズ搭載、MVX10、オリンパス製)を用いた組織レベ

ルの観察を実施した。得られた動画を解析することで、再生心筋組織に拍動に伴うカンチレバーのひずみ()や心筋組織中央部からカンチレバー固定端までの距離(L)を得た。そして、式1を用いて、カンチレバーと固定端との間に存在する再生心筋組織が生み出す拍動収縮力(F)を得た。

$$F=3EI L^{-3} \quad (1)$$

ただし、Iは、式2で表される、極薄板ガラスの断面二次モーメントである。

$$I=bh^3/12 \quad (2)$$

本計測系により再生心筋組織の拍動収縮力の変化が検出できることを確認するため、再生心筋組織にアドレナリン(第一三共製、再生心筋組織の拍動収縮力を増加させる効果を示す^[4])を作用させ、作用前後での拍動収縮力を比較した。

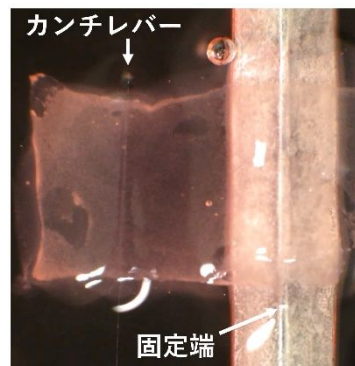


図2：組織レベル拍動収縮力計測系に再生心筋組織をセットした様子

3.3. 再生心筋組織の細胞・組織レベルの拍動収縮力計測

3.2節に記載の方法で、再生心筋組織を組織レベルの拍動収縮力計測系にセットした。そして、CCDカメラ(25 frame/sec、FLOYD、WRAYMER製)を取り付けた位相差顕微鏡、もしくは、細胞観察装置(BioStudio-mini、ニコン製)を用いて、細胞レベルの観察を実施した。得られた動画をSI8000ソフトウェア(ソニー製)で解析し、心筋細胞が拍動する際のせん断ひずみ()を得た。そして、式3を用いて、心筋細胞が拍動時に生み出すせん断応力()を算出した。

$$\sigma = G \gamma \quad (3)$$

組織レベル拍動収縮力計測系のカンチレバーと固定端との間に存在する再生心筋組織の面積を画像解析により求め、この面積で組織レベルの最大拍動収縮力を割ることで、単位面積当たりの最大拍動収縮力を求めた。これを最大せん断応力と比較することで、組織レベルで計測した拍動収縮力と細胞レベルで計測したそれとを比較した。

3.4. 足場材料の弾性率が心筋細胞群の拍動の同期性に及ぼす影響

再生心筋組織の拍動収縮力の増強には、心筋組織中の心筋細胞群が同期して拍動することが重要と考え、コラーゲンの弾性率が心筋細胞群の拍動の同期性に及ぼす影響の解明に取り組んだ。

I型コラーゲンの物理ゲル作製時に、化学架橋剤である1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC、TCI製)を終濃度0.5 mg/mLとなるよう添加した。得られたゲルのせん断弾性率をレオメーターで計測した結果、EDC無添加の物理ゲルよりも有意に大きいせん断弾性率を示したことから、物理架橋点と化学架橋点の双方が混在するゲル(物理化学ゲルと呼称する)が得られたと考えられる。

24 ウェルプレート内に形成した物理ゲル、物理化学ゲル上に新生ラット心筋細胞を播種し、10%FBS含有MEMαで最長5日間培養した。1日毎に、CCDカメラを取り付けた位相差顕微鏡を用いて、自己拍動の様子を観察した。得られた動画をSI8000ソフトウェアで解析し、視野内の心筋細胞群の拍動の同期性を定量した。また、培養1、3、5日目に、テトラメチルローダミンメチルエステル(TMRM、Thermo製、膜電位を有するミトコンドリアを染める)で心筋細胞を染色^[8]し、視野内の心筋細胞の占有率を定量した。さらに、ヘキスト33342(Thermo製)、ローダミン標識ファロイジン(Thermo製)、心筋トロポニンT(cTnT)抗体(abcam製)とAlexa Fluor448標識抗ウサギIgG抗体(Cell Signaling製)を用いて、それぞれ心筋細胞の核、アクチン、cTnTを染色した。

4. 研究成果

4.1. FRET収縮力センサー固定シルクゲル

FRET収縮力センサーを添加して作製したシルクゲルを界面活性剤入りの緩衝液で洗浄し、その前後でのドナー、アクセプター由来の蛍光輝度を求めた結果、洗浄による蛍光輝度の変化は認められなかった。これより、センサーがシルクゲルに固定されたことが確認できた。

FRET収縮力センサー固定シルクゲル上に新生ラット心筋細胞を播種したが、ゲルへの細胞接着は認められなかった。センサーのC末端に細胞接着性のRGDSペプチドが融合してあるにも関わらず、細胞が接着しなかったことから、センサー全体がシルクゲルの物理架橋点に潜り込んでしまったのかもしれない。以上より、融合タンパク質をシルクゲルに固定化する方法は確立できたものの、分子群レベルの拍動収縮力を計測可能なシステムの構築には至らなかった。

4.2. 再生心筋組織の組織レベルでの拍動収縮力計測系の構築

新生ラット心筋細胞をコラーゲンゲル(せん断弾性率: 7.9 ± 5.5 Pa)上に播種した結果、細胞はゲルによく接着し、培養2日目からは自己拍動が見られた。

心筋細胞とコラーゲンゲルから成る再生心筋組織を、カンチレバーに基づく組織レベル拍動収縮力計測系にセットした結果、再生心筋組織の自己拍動に伴いカンチレバーがたわんだ。このたわみの経時変化を基に、拍動収縮力の経時変化を算出した結果を図3に示す。拍動に伴い、収縮力が増減することが分かった。また、アドレナリン添加前後での最大拍動収縮力を比較すると、アドレナリン添加によって最大収縮力が約15%増加することが分かった。この増加割合は、他の計測系でのそれと同程度^[4]であることから、本研究での組織レベルの拍動収縮力計測系が妥当なものであると確認できた。

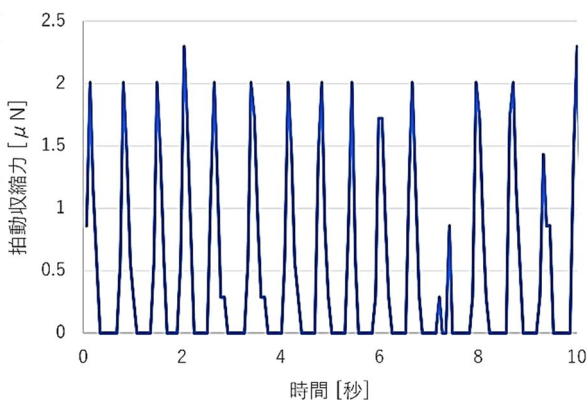


図3: 再生心筋組織の組織レベルの拍動収縮力の経時変化

4.3. 再生心筋組織の細胞・組織レベルでの拍動収縮力の比較

再生心筋組織を構成する心筋細胞の自己拍動の観察像をSI8000ソフトウェアで解析することで得られた単位面積当たりの拍動収縮力(せん断応力)の経時変化を図4に示す。細胞レベルの計測で得られた単位面積当たりの最大拍動収縮力(最大せん断応力)は、 1.3 ± 0.4 nN/mm²であった。一方、組織レベルの計測で得られたそれは、 40.8 ± 3.9 nN/mm²であった。まだ試行数が少ないものの、組織レベルの計測で得られた単位面積当たりの最大拍動収縮力は、細胞レベルの計測で得られたその約30倍強いことが示唆された。この結果は、再生心筋組織の組織レベルの拍動収縮力は、個々の心筋細胞が生み出す拍動収縮力の単純な足し合わせではないことを意味している。詳細なメカニズムは不明であるが、心筋細胞群の配向や拍動の同期性が相乗的に作用することで、組織レベルの強い拍動収縮力が生み出される可能性がある。

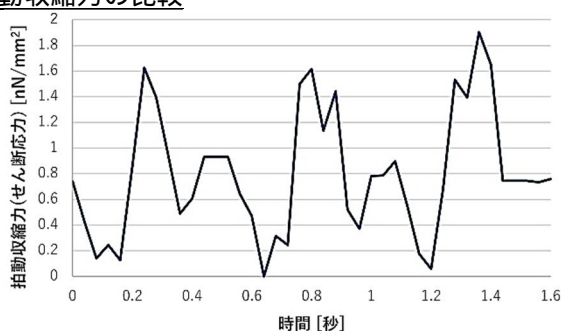


図4: 再生心筋組織の細胞レベルの拍動収縮力(せん断応力)の経時変化

4.4. 足場材料の弾性率が心筋細胞群の拍動の同期性に及ぼす影響

コラーゲンゲル作製時に、化学架橋剤であるEDCを添加することで、ゲルのせん断弾性率が30.8 Paに増加した。これより、EDC添加により、コラーゲンゲルには物理架橋点のみならず化学架橋点も形成されたと考えられる。

物理ゲル、物理化学ゲル上で新生ラット心筋細胞を培養し、自己拍動の画像解析により心筋細胞群の拍動の同期性を定量した結果、物理化学ゲル上の心筋細胞群は、物理ゲル上のそれに比べて、有意に高い拍動の同期性を示すことが分かった。また、物理化学ゲル上では、心筋細胞数が少ないものの、拍動関連タンパク質であるcTnTが陽性の細胞が多い傾向にあった(図5)。

なお、組織培養用ポリスチレン(圧縮弾性率: 3 GPa)上で培養された心筋細胞群の拍動の同期性は、物理ゲル、物理化学ゲル上の新細胞群のそれよりも低かった。以上より、足場材料の弾性率によって心筋細胞群の拍動の同期性が変化することが示され、また、同期性を高めるには、拍動関連タンパク質の発現を上げることが重要であると示唆された。

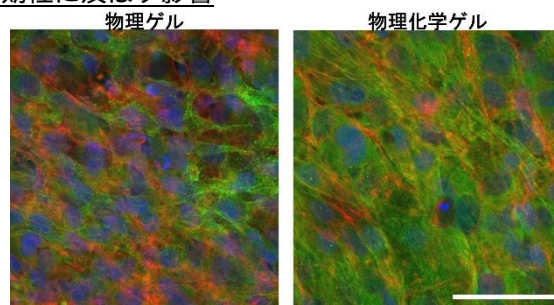


図5: 物理・物理化学ゲル上の心筋細胞の核(青)、アクチン(赤)、cTnT(緑)染色像。スケールバー = 200 μm

参考文献

- [1] Cell Rep 2015;13:1705, [2] Sci Rep 2016;6:29933, [3] Circulation 2016;134:1557, [4] PLoS One 2018;13:e0198026, [5] Circ Res 2011;109:47, [6] J Mater Chem B 2016;4:649, [7] J Mater Chem B 2017;5:7557, [8] Nat Methods 2010;7:61

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kambe Y, Yamaoka T	4. 巻 130
2. 論文標題 Initial immune response to a FRET-based MMP sensor-immobilized silk fibroin hydrogel in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 199 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2021.05.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kambe Y	4. 巻 53
2. 論文標題 Functionalization of silk fibroin-based biomaterials for tissue engineering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 1345 ~ 1351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41428-021-00536-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kambe Y, Mizoguchi Y, Kuwahara K, Nakaoki T, Hirano Yi, Yamaoka T	4. 巻 179
2. 論文標題 Beta-sheet content significantly correlates with the biodegradation time of silk fibroin hydrogels showing a wide range of compressive modulus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymer Degradation and Stability	6. 最初と最後の頁 109240 ~ 109240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kambe Y, Ogino S, Yamanaka H, Morimoto N, Yamaoka T	4. 巻 31
2. 論文標題 Adipose tissue regeneration in a 3D-printed poly(lactic acid) frame-supported space in the inguinal region of rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 203 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/BME-201103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 神戸 裕介	4. 巻 99
2. 論文標題 “衣料”ではなく“医療”用材料としてのシルク	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 134 ~ 134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.99.3_134	査読の有無 無
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 神戸 裕介	4. 巻 78
2. 論文標題 再生医療用の細胞足場材料への応用を目指したシルクの機能化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 繊維学会誌	6. 最初と最後の頁 240 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2115/fiber.78.240	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aytemiz DG, Kambe Y, Hirata M, Nishi H, Kameda T	4. 巻 34
2. 論文標題 Effects of RGD-fused silk fibroin in a solution format on fibroblast proliferation and collagen production	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bio-Medical Materials and Engineering	6. 最初と最後の頁 183 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/BME-221430	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 4件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 神戸 裕介
2. 発表標題 農研機構におけるシルクバイオマテリアル研究
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2022(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神戸 裕介, 山岡 哲二
2. 発表標題 シルクハイドロゲルの生分解性は心筋梗塞ゲル注入療法の治療効果に影響する
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神戸 裕介
2. 発表標題 循環器疾患のための医用高分子材料・デバイスの設計開発
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神戸 裕介, 山岡 哲二
2. 発表標題 FRET-MMPセンサーによるシルクフィブロインゲルに対する免疫反応の可視化
3. 学会等名 第50回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神戸 裕介, 山岡 哲二
2. 発表標題 FRET-MMPセンサーによる絹フィブロインゲルの初期生分解の可視化
3. 学会等名 第68回日本シルク学会研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kambe Y, Yamaoka T
2. 発表標題 Initial immune response to a FRET-MMP sensor-modified silk fibroin hydrogels
3. 学会等名 8th Asian Biomaterials Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kambe Y, Yamaoka T
2. 発表標題 Initial immune responses to silk fibroin hydrogels modified with FRET-MMP sensor
3. 学会等名 2022 Joint Symposium SFB+JSB (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神戸 裕介
2. 発表標題 医療応用を目指したシルクの機能化と成形加工
3. 学会等名 プラスチック成形加工学会 第33回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神戸 裕介
2. 発表標題 医療用材料としてのシルク
3. 学会等名 日本繊維機械学会 第29回秋季セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aytemiz DG, Kambe Y, Kameda T
2. 発表標題 Cell compatibility and nanopartile formation of coiled-coil silk from Vespa Cameron
3. 学会等名 第69回日本シルク学会研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aytemiz DG, Kambe Y, Kameda T
2. 発表標題 Cell compatibility and nanopartile formation of coiled-coil silk from hornets
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------