

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01178

研究課題名（和文）力学刺激の知能化によるin vitro3次元組織の超効率的成熟化

研究課題名（英文）Efficient maturation of 3D tissues in vitro by intelligent mechanical stimuli

研究代表者

尾上 弘晃（Onoe, Hiroaki）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授

研究者番号：30548681

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 35,900,000円

研究成果の概要（和文）：知能化培養システムとして、力学刺激および電気刺激が可能な3次元培養チャンバを作製し、組織培養しながら形態をリアルタイムで蛍光観察可能なシステムを構築した。筋芽細胞株C2C12およびヒトiPS由来心筋細胞を培養し、刺激を印加しながら成熟化を評価した。C2C12と電気刺激の系において、画像処理により成熟化指標を抽出し、ベイズ的最適化で条件を最適化し、成熟化指標の向上を目指す実験サイクルを確立した。またヒトiPS由来心筋細胞を3次元ファイバ形状に構築して電気刺激により成熟化し、薬剤を作用させることで組織の収縮力変化が認められ、形成された心筋組織の薬剤試験応用の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ベイズ最適化による実験パラメータの機械的な最適化アルゴリズムを、3次元組織構築という生命科学や再生医療分野に重要な研究分野へ適用可能であることが示された。本研究の成果は、国際学術誌および関連の国際会議で成果として世界に対して発信された。今後本研究の成果をもとに研究を継続することで、心疾患に関する薬剤の開発や、心臓移植医療における新しい医療への発展に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：A three-dimensional culture chamber with mechanical or electrical stimulation was constructed as an intelligent culture system, enabling real-time fluorescent observation of morphology while culturing tissue. We cultured myoblast cell line C2C12 and human iPS-derived cardiomyocytes, evaluated their maturation while applying stimuli, and established an experimental cycle to improve maturation indices by extracting maturation indices by image processing and optimizing conditions by Bayesian optimization in the C2C12 and electrical stimulation system. In addition, we constructed human iPS-derived cardiomyocytes in the shape of 3D fibers and matured them by electrical stimulation and observed changes in tissue contractility when drugs were applied, indicating the possibility of applying the formed cardiomyocytes to drug testing.

研究分野：マイクロ工学・Organ-on-a-chip

キーワード：ヒトiPS由来心筋組織 In vitro 組織成熟化 力学刺激 ベイズ的最適化 画像処理 再生医療

1. 研究開始当初の背景

力学刺激は、個々の組織が有する特徴的な組織形態や機能の発現に必要不可欠である。例えば、血管網や骨の形態形成は、生体内に形成される力学場をメカノセンサー分子が感知し、力学刺激を生体シグナルへと変換することでリモデリングされている。同様に、iPS細胞などの幹細胞を用いた再生医工学においても、力学刺激が細胞・組織の成熟化に与える重要性は経験的に認識されている。例えば、再生医療の重要なターゲットの一つである心筋組織の成熟化には、張力 (Tallawi M, et al., *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2015) や電気刺激 (Nunes SS, et al., *Nat. Methods*, 2013) などに代表される心筋細胞への力学的刺激が重要な役割を担っていることが知られており、多くの研究グループが生体と同等レベルでの *in vitro* 心筋組織の成熟化を試みている。

3次元組織を成熟化させるためには、実に多様な力学刺激の中から適した条件を網羅的に選択して組織を培養し、培養後の組織の成熟度を遺伝子発現や免疫染色などで評価することで、より効果的な力学刺激条件を絞り込むのが一般的である。しかしながら、力学刺激の組合せは膨大であり、かつ組織の成熟化には長い培養期間を要することから、適切な力学刺激条件の発見には金銭的・時間的・人的の全てにおいて多大なコストを要する。それがゆえに、*in vitro* による組織培養において生体に近い成熟化した組織の形成は、いまだに困難な科学技術的な課題となっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、力学刺激による *in vitro* 3次元心筋組織の成熟化のプロセスにおいて、計算機制御された力学刺激培養装置と単一細胞ライブイメージング、深層学習およびベイズ的最適化を駆使することにより、迅速かつ効率的・効果的な *in vitro* 組織の高度成熟化の実現、およびその方法論を創出すること、である。

3. 研究の方法

(1) 単一細胞ライブイメージング可能な力学刺激装置の構築

力学刺激および電気刺激が可能な3次元組織培養装置にライブイメージングを適用する。心筋組織の両端を把持して力学刺激を印加し、それと同時に共焦点顕微鏡を用いて単一細胞レベルでライブイメージングを可能とする装置の開発を行う (図1)。3次元組織への力学刺激は、機械的な伸長を用い、全て計算機により Python で記述したプログラムでの制御を行う。また心筋組織のライブ観察のために、共焦点顕微鏡の焦点距離内で培養可能な薄型チャンバを力学刺激装置と統合する。

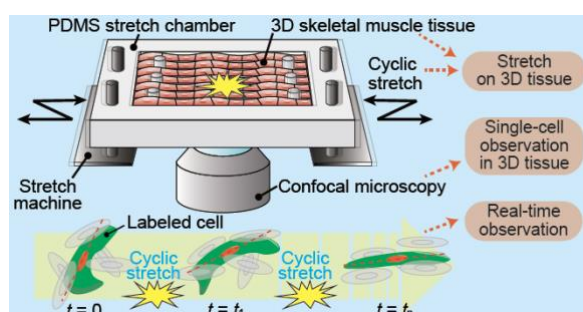


図1 3次元力学刺激培養装置

(2) ベイズ的最適化による3次元組織培養のオンライン制御系の構築

心筋の成熟過程とその制御をブラックボックスと捉え、ブラックボックス最適化の手法の中で高い性能を誇るベイズ的最適化を用いることで高効率な実験条件の探索を行う。培養プラットフォームの構築のために筋芽細胞株 C2C12 を用い、電気刺激を用いた刺激培養により、組織の筋管形成におけるサルコメアや組織のアライメントを成熟化指標と設定する。ある刺激条件を初期値として培養を開始し、一定時間経過後に取得した心筋組織の蛍光画像より、画像解析アルゴリズムにて成熟度評価を行う。設定した力学刺激条件と得られた成熟度の評価を元に、ベイズ的最適化を用いてより成熟度が向上する力学刺激条件を推定し、刺激培養装置にフィードバックする。これによりベイズ的最適化による組織成熟化システムを評価する (図2)。

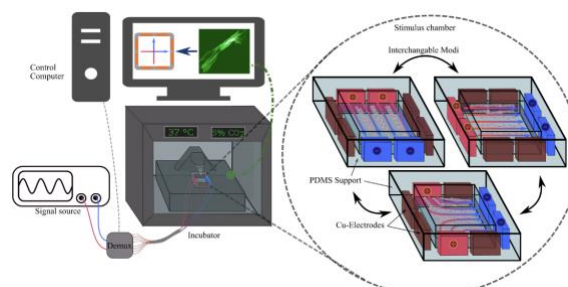


図2 ベイズ的最適化によるフィードバック

設定した力学刺激条件と得られた成熟度の評価を元に、ベイズ的最適化を用いてより成熟度が向上する力学刺激条件を推定し、刺激培養装置にフィードバックする。これによりベイズ的最適化による組織成熟化システムを評価する (図2)。

(3) ヒト iPS 由来心筋組織の成熟化評価

力学刺激による組織の成熟化手法を、ヒト iPS 由来心筋組織に適用する。マイクロ流体デバイスを利用してヒト iPS 由来心筋細胞をファイバ形状の3次元構造に形成し、電気刺激による成熟化を行う(図3)。免疫蛍光染色による画像処理に加え、細胞形態以外の電気生理学および分子細胞生物学的な見地から評価する。候補としては、connexinの発現の上昇による拍動伝播速度の上昇、成熟心筋の指標となるマーカー遺伝子の発現などを検討項目とする。



電気刺激デバイスの写真

図3 ファイバ心筋組織用の電気刺激培養チャンバ

(4) 成熟化心筋組織の薬剤スクリーニング応用

力学的刺激により成熟化したファイバ形状心筋組織の医療応用展開として、薬剤応答試験の評価系の構築を検討する。用いたファイバ形状心筋組織は組織外層にハイドロゲルによるシェル層があるため、心筋組織の拍動に伴うハイドロゲル層の変形量から、組織から生じる収縮力を画像処理により計測する(図4)。薬剤投与によりこの収縮力の変化を画像処理により計測することで、形成した心筋組織が薬剤スクリーニングに応用可能かを検討する。

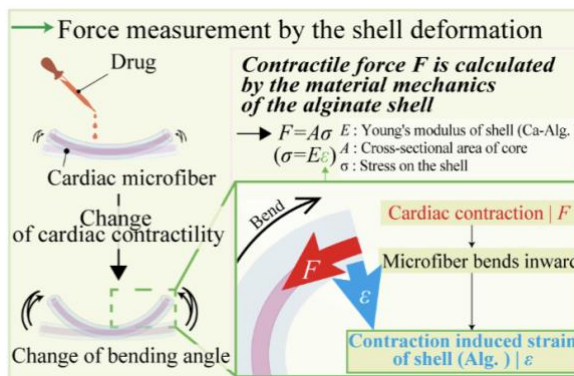


図4 ファイバ状心筋組織の収縮力計測

4. 研究成果

(1) 単一細胞ライブイメージング可能な力学刺激装置の構築

3次元組織に対して引張刺激を印加可能な力学刺激装置を開発し、共焦点顕微鏡上でライブイメージング可能な実験セットアップを構築した。引張可能な培養チャンバ内に繊維芽細胞を3次的に培養し

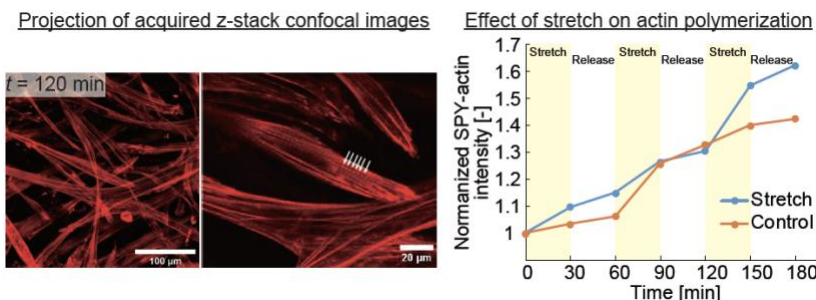


図5 3次元組織内の単一筋細胞ライブイメージング

て組織を形成し、その組織内の一部の細胞を遺伝子導入により細胞核と細胞膜を蛍光タンパクプローブで標識することで、引張刺激による細胞の形態変化を単一細胞レベルで観測することに成功した(図5)。また蛍光顕微鏡画像のタイムラプス画像より、組織の様態の変化を単一細胞レベルで3次元画像処理によって得ることに成功した。

(2) ベイズ的最適化による3次元組織培養のオンライン制御系の構築

ベイズ的最適化を用いることで高効率な実験条件の探索を実証するために、C2C12骨格筋細胞による電気刺激の系を導入し、組織の筋管形成におけるmyogeninの発現、およびアクチンの配向を指標として、それらを画像処理により自動的に取得できるシステムを構築した。ある刺激条件を初期値として培養を開始し、一定時間経過後に取得した心筋組織の蛍光画像

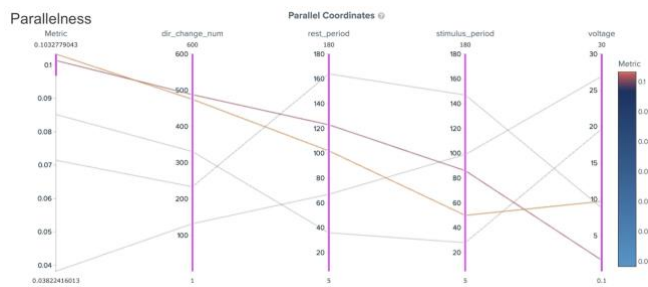


図6 ベイズ的最適化による刺激パラメータの成熟化指標に対する関係

より、画像解析アルゴリズムにて成熟度指標を算出した。設定した刺激条件と得られた成熟度の指標を元に、ペイズ的最適化を用いてより成熟度が向上する刺激条件を推定し、力学刺激装置にフィードバックするサイクルを確立した (図6)。

(3) ヒト iPS 由来心筋組織の成熟化評価

ファイバ状心筋組織への力学刺激の確立と単一細胞イメージング可能な刺激装置を構築した。マイクロ流体デバイス技術と高純度ヒト iPS 由来心筋細胞を用い、コアシェル型アルギン酸ゲルマイクロチューブ内に、直径 100 μm 、長さ数 m 程度のファイバ形状の 3 次元心筋組織の形成と安定した培養条件を策定した。その際、心筋細胞に対して一定の心組織由来線維芽細胞を混在させることにより、長期的にファイバ形状の組織を安定化させることが可能である知見を得た。

3 次元的なファイバ状心筋組織を刺激するために、電極付きチャンバを構築し、ファイバ形状ヒト iPS 由来心筋細胞に電気刺激を印加し成熟化を促進させた。ヒト iPS 由来心筋組織の成熟度を、心筋の拍動の伝搬速度から評価するために Fluo-4 を用いたカルシウムイメージングにより可視化しその速度を測定した (図7, 8)。またその際の組織の成熟度をサルコメア構造の Z 帯の間隔と比較した結果、伝搬速度と成熟度に正の相関が確認された。これにより画像処理から得られる拍動伝搬速度が成熟化指標に有用であることが示された。qPCR による成熟化マーカー遺伝子の発現においても発現の上昇が確認され、電気刺激により促進されたヒト iPS 由来心筋組織の成熟化を評価する手法を確立した。

(4) 成熟化心筋組織の薬剤スクリーニング応用

刺激により成熟化したファイバ形状心筋組織の医療応用展開として、薬剤応答試験の評価系を構築した。具体的には拍動によるファイバ形状ヒト iPS 由来心筋組織の変形量を、組織が発生する収縮力に変換する画像処理および有限要素法数値計算の方法を確立した。この系に対し、isoproterenol および propranolol を投与することにより、組織の収縮力がそれぞれ 202.7%に上昇および 43.7%に減少することが確認された (図9)。これにより、薬剤の投与により収縮力が変化することを画像処理により得ることに成功した。

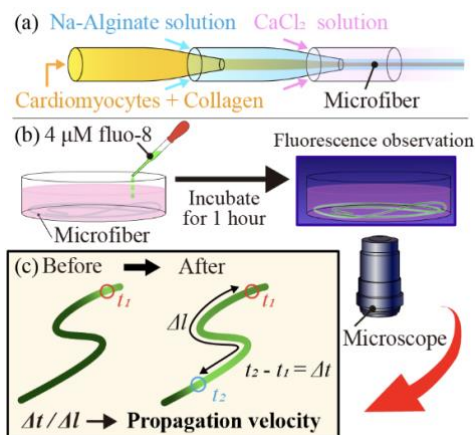


図7 拍動伝搬速度のカルシウムイメージングによる計測

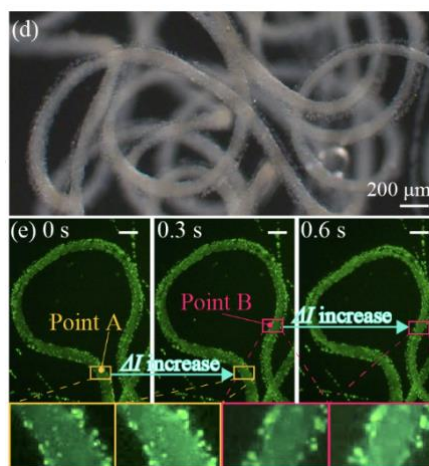


図8 形成したファイバ形状ヒト iPS 由来心筋のカルシウムイメージング画像

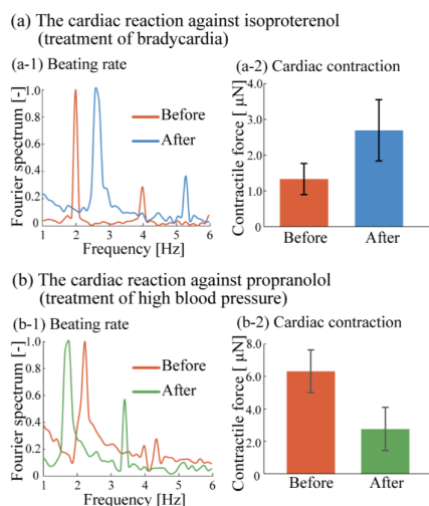


図9 薬剤の投与による心筋の収縮力の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 2件）

1. 著者名 Yuta Kurashina, Ryo Sato, Hiroaki Onoe	4. 巻 3
2. 論文標題 Microfiber-shaped building-block tissues with endothelial networks for constructing macroscopic tissue assembly	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 APL Bioengineering	6. 最初と最後の頁 46101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5109966	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 Keisuke Fukada, Koji Tachibana, Yuta Kurashina, Yosuke Kaneko, Tatsuaki Matsumoto, Takeshi Miyamoto, Yasuo Niki, Masaya Nakamura, Hiroaki Onoe	4. 巻 119
2. 論文標題 A novel fabrication process of up-scalable microfiber-shaped tendon-like tissue with high cell density for uniformed macroscale assembly	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1327-1336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bit.28039	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 Jun Fujita	4. 巻 70
2. 論文標題 Development of Cardiac Regenerative Medicine Using Human iPS Cell-derived Cardiomyocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Keio Journal of Medicine	6. 最初と最後の頁 53-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2302/kjm.2020-0009-IR	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 Tanosaki S, Akiyama T, Kanaami S, Fujita J, Ko M, Fukuda K, Tohyama S	4. 巻 3
2. 論文標題 Purification of Cardiomyocytes and Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cell by Inhibition of De Novo Fatty Acid Synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101360	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 Tani H, Tohyama S	4. 巻 10
2. 論文標題 Human Engineered Heart Tissue Models for Disease Modeling and Drug Discovery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 855763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.855763	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17件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Sergio Robert Molina Ramirez, Takahiro Yamada, Akira Funahashi, Hiroaki Onoe
2. 発表標題 Electrical field chamber with dynamically adaptable stimulator for myocyte orientation during cultivation
3. 学会等名 The 34th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keitaro Kasahara, Yuta Kurashina, Shigenori Miura, Shogo Miyata, Hiroaki Onoe
2. 発表標題 Real-time three-dimensional single-cell-resolution monitoring system for observation of dynamic cell behavior under mechanical stimuli
3. 学会等名 The 34th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾上弘晃
2. 発表標題 ECMゲルのマイクロ加工により形成されたin vitro 3次元組織内の細胞挙動観察
3. 学会等名 第93回日本生化学学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keitaro Kasahara, Yuta Kurashina, Shigenori Miura, Shogo Miyata, Hiroaki Onoe
2. 発表標題 Shape deformation analysis of single cell in 3D tissue under mechanical stimuli
3. 学会等名 The 20th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠原啓太郎, 倉科佑太, 三浦重徳, 宮田昌悟, 尾上弘晃
2. 発表標題 引張刺激環境下におけるin vitro3次元組織内細胞形態観察システム
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深田佳祐, 倉科佑太, 遠山周吾, 石倉恵子, 藤田淳, 福田恵一, 尾上弘晃
2. 発表標題 マイクロファイバ状心筋組織のための電気刺激デバイス
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 舟橋 啓, 徳岡 雄大
2. 発表標題 機械学習による画像分類
3. 学会等名 AIによる生物画像解析トレーニングコース (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 細胞内代謝機構に基づくヒトiPS由来心筋細胞の大量作製とその応用
3. 学会等名 第30回日本医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠山周吾
2. 発表標題 細胞内代謝機構に基づくヒトiPS細胞由来心筋作製と心臓再生医療への応用
3. 学会等名 第53回河口湖心臓討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠山周吾、藤田淳、福田恵一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来の超高純度心筋組織球を用いた再生医療の現状と今後の展望
3. 学会等名 第67回日本心臓病学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬雄輔，遠山周吾，藤田淳，中嶋一晶，岸野喜一，岡田麻里奈，田野崎翔，染谷将太，森田唯加，谷英典，金澤英明，福田恵一
2. 発表標題 Large-scale production of purified human iPSC-derived cardiomyocytes for cardiac regenerative therapy
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田淳, 竹村研治郎
2. 発表標題 心筋再生医療を実現するiPS細胞由来心筋細胞の大量培養
3. 学会等名 慶應義塾大学理工学部 創立80周年記念イベント 医工連携シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akari Masuda, Keisuke Fukada, Shun Itai, Yuta Kurashina, Shuichi Akizuki, Shugo Tohyama, Jun Fujita, Hiroaki Onoe
2. 発表標題 Fixation-free evaluation of cardiac contractile force by human iPSC-derived cardiac core-shell microfiber
3. 学会等名 The 35th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keitaro Kasahara, Yuta Kurashina, Shigenori Miura, Shogo Miyata, Hiroaki Onoe
2. 発表標題 Real-time single-cell-resolution observation of three-dimensional skeletal muscle tissues under mechanical stimuli
3. 学会等名 Japan Satellite Session, Mimics, and Microfluidics: Engineering Tools for Mechanobiology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 益田緋里, 板井駿, 高倉直輝, 倉科佑太, 遠山周吾, 尾上弘晃
2. 発表標題 マイクロファイバ状心筋組織の成熟化のための電気刺激デバイス
3. 学会等名 日本機械学会 第12回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠山 周吾
2. 発表標題 代謝機構を基盤としたヒトiPS細胞由来心筋細胞の製造と再生医療への応用
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠山 周吾
2. 発表標題 代謝制御に基づくヒトiPS細胞由来心筋細胞の作製と再生医療への応用
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学 理工学部 機械工学科 尾上研究室 http://www.onoe.mech.keio.ac.jp/index-j.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	倉科 佑太 (Kurashina Yuta) (40801535)	東京工業大学・物質理工学院・助教 (12608)	

6. 研究組織（つづき）

	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	舟橋 啓 (Funahashi Akira) (70324548)	慶應義塾大学・理工学部（矢上）・准教授 (32612)	
研究分担者	山田 貴大 (Yamada Takahiro) (20837736)	慶應義塾大学・理工学部（矢上）・助教 (32612)	
研究分担者	三浦 重徳 (Miura Shigenori) (70511244)	東京大学・生産技術研究所・特任講師 (12601)	
研究分担者	遠山 周吾 (Tohyama Shugo) (90528192)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	藤田 淳 (Fujita Jun) (10306706)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任准教授 (32612)	

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