

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 9 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19925

研究課題名(和文) 組織工学を用いたiPS細胞由来心筋組織の神経細胞配合による心機能改善効果の検討

研究課題名(英文) Investigation for an effect of heart function by mixing neural cell for induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte using tissue engineering

研究代表者

迎 洋輔 (Mukae, Yosuke)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：90746570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：初年度でヒトiPS細胞由来神経前駆細胞を同細胞由来心筋細胞と配合させ、拍動するスフェロイドを作製した。2年目では心筋細胞と神経前駆細胞との配合比率を90:10, 80:20, 70:30, 60:40と変え、各スフェロイドの拍動の違いを観察したところ、心筋細胞40%の群のみがスフェロイド作製後2週間以内に拍動停止し、また神経前駆細胞を30%配合した群が40%配合した群と比べ有意に収縮率が良かった。神経前駆細胞の配合が心筋スフェロイドの拍動を変えうると考えられた。また2週間拍動した神経前駆細胞配合スフェロイド内部に神経特異抗体陽性の神経線維様構造を認め、神経線維への分化の可能性をも示した。

研究成果の概要(英文)：At first year, we could fabricate beating spheroids by mixing human induced pluripotent stem cell (hiPS) cell derived neural progenitors (hiPS-NPs) for hiPS cell derived cardiomyocyte. The second year, the ratio of hiPS-NPs was set at 0%, 10%, 20%, 30%, and 40% of the spheroids. These spheroids were observed and recorded. The only 40% of hiPS-NPs group stopped beating by 14 days after spheroid fabrication. The spheroids involving 30% of hiPS-NPs showed functional shortenings rather than the 40% of hiPS-NPs spheroids. These results mean that adding hiPS-NPs to cardiomyocyte can change the contractile function of cardiac spheroid. Furthermore, we demonstrated neuro-specific antibody positive structure in the spheroid which beat for two weeks by immunofluorescence study. This result indicated the possibility of differentiation of hiPS-NPs to neural fibers in the mixed spheroid.

研究分野：心筋再生

キーワード：ヒトiPS細胞由来心筋細胞 ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞 スフェロイド 収縮率 心筋再生

1. 研究開始当初の背景

薬剤抵抗性の重症心不全に対しては、現時点では補助人工心臓か心移植が有効とされるが、社会的要因や倫理的要因により、治療を享受できる患者は非常に限定されている。ヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞は自己細胞での心不全治療を理論的に可能とし、現在、心筋細胞や筋芽細胞などを不全心臓に移植することで心機能改善、生命予後改善が動物実験レベルで示され、臨床応用が期待されている。細胞生着率や生体異物への炎症反応や感染症などの問題を考えると有力な細胞シートも、シートそのものは非常に薄く、多層に積層しているのが現状で、未だなお開発途上である。

Molding system は培養後の懸濁液状態の細胞を一定の環境下で再凝集させることで、自己凝集能のみで3次元細胞凝集塊 (スフェロイド) を形成・融合し、機能的な3次元組織を構築する性質を利用している。我々をこれに着目し研究を進めてきた。

スフェロイドは複数の細胞を配合することで、機能性質を変化させうる一方で、その細胞選択や細胞数、細胞比率といったことは未だ定まっていない。より機能的かつ実現可能な条件の設定や、その先の心不全モデルへの応用、そしてそれを可能とする三次元構造体の開発が求められている。

2. 研究の目的

当研究室では従来、古典的な細胞自己凝集現象 (スフェロイド形成) に着目してきた。スフェロイドは単一細胞からのみでなく、任意の細胞の配合によっても作製可能であり、さらにスフェロイド同士は融合することもでき、その現象を利用し、任意の3次元組織を構築する技術を開発してきた。

本研究では、薬剤抵抗性の重症心不全に対し、心移植や人工心臓に変わる新たな、異物を含まないヒト iPS 細胞由来3次元機能的な心筋組織の作製・動物移植実験、網羅的解析を行う。特に、その細胞ソースとして、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞のみならず、ヒト iPS 細胞由来の神経・血管内皮細胞やヒト皮下線維芽細胞を配合させて、より心機能改善効果を高める工夫・検討・改善を行うことを目的としており、特にヒト iPS 細胞由来の神経細胞の心筋細胞への影響を、3次元化されたスフェロイドを用いることで、平面培養ではできない拍動評価などを可視化することを目標とした。

3. 研究の方法

まずはヒト iPS 細胞由来の心筋細胞と同細胞由来の神経細胞を配合し、より高機能なスフェロイドの作製を試みた。そのスフェロイドが作製可能であるか、拍動可能であるか、心筋細胞のみと比べて、どのように機能面で変化を来しうるのかなどを検証する。

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞やヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞は、まずは条件を一定とするために市販で購入することとした。

スフェロイドの作製は、市販の細胞を解凍後に Single cell とした細胞を Cell count し、96 well の超低接着性プレート上に 1well あたり 2500 細胞数となるように分注することで、比較的均一で条件の同じスフェロイドの作製を試みる。培地は心筋培養培地と神経培養培地を半々で配合することとした。

また、そのスフェロイドを動画撮影することにより、拍動回数や拍動動態を観察することとした。

また形態評価の一つとして配合したスフェロイドを免疫染色することとした。

なお、統計解析は JMP12.2 software program (SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan) による ANOVA 検定を用いて評価した。

4. 研究成果

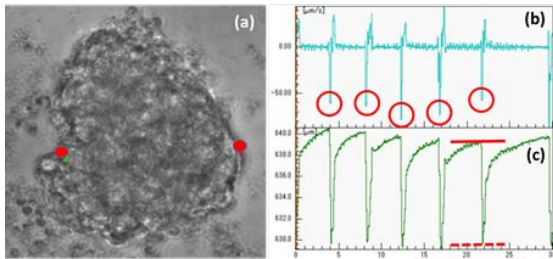
本研究は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞にヒト iPS 細胞由来の神経細胞を配合することにより、心筋細胞のみからできた細胞凝集体 (スフェロイド) の機能を向上させ、さらにそのスフェロイドからできた三次元構造体の機能向上を目指した研究である。平成 27 年度は、まず購入した神経前駆細胞を、神経細胞に分化させた後に、心筋細胞と配合させようと試みた。しかし、poly-L-lysine コーティング上の神経細胞の剥離に難渋し、安定して一定数の神経細胞を得ることが困難であった。そのため、購入時凍結保存されていた心筋細胞と神経前駆細胞を同時に解凍し、解凍直後に同じ超低接着性 96well プレート上の well 内で混ぜ合わせることにより、安定的に目標数 (2500 細胞 / スフェロイド) を満たした細胞分注を行うことができた。分注した神経前駆細胞の割合は 0%, 20%, 40% の 3 群に分ける条件検討を行った。

分注された細胞は 2 日後には、どの群でも凝集が確認でき、歪でありながらも、ほぼ均一なサイズのスフェロイドができた。心筋 100% の群では凝集が不十分であったのが、神経前駆細胞を配合した群では、より凝集や歪さも改善されている印象であった。

さらに 3-4 日後には、ほぼ全てのスフェロイドが順次拍動を開始した。このことからヒト iPS 細胞由来心筋細胞は同細胞由来の神経前駆細胞を少なくとも 40% 配合してもスフェロイド作製および拍動が可能であることが示された。作製されたスフェロイドは作製後連日 30 秒間ずつ動画撮影され、拍動数なども記録された。そして、神経前駆細胞を 40% 配合した群のみスフェロイド作製後、約 2 週間あたりで全て拍動が停止したが、0%, 20% の群では少なくとも 30

日以上は拍動が継続することを確認できた。平成 28 年度では、前年度での配合比率をより詳細に検討すべく神経前駆細胞の配合比率を 10%や 30%でも、同様の方法でスフェロイドを作製したところ、どの群も 2 日程で凝集し、3-4 日ほどで拍動を開始し、拍動は 30 日以上継続し続けた。拍動数に関してまとめると、スフェロイド作製後 2~3 日後より拍動開始し、神経前駆細胞を 10%~30%配合した群ではスフェロイド作製 1~2 週間目あたりで拍動数のピークを認め、その後緩やかに拍動数の低下を認めながらも、少なくとも 1 ヶ月以上は拍動を継続した。一方で神経前駆細胞を 40%した群では、2 週間以内に全てのスフェロイドの拍動が停止した。

さらに、神経前駆細胞を配合した 10~40%の群で、スフェロイドの拍動解析として以下の図 1 のように動画解析ソフトを用いてスフェロイド辺縁 2 点を 30 秒間追尾することにより収縮率や収縮速度の計測を行った。



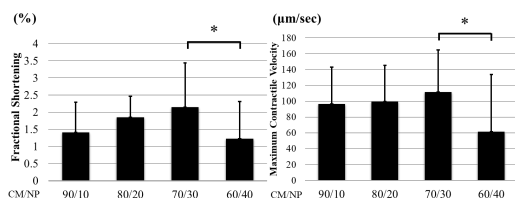
(図 1. スフェロイド計測)

収縮率 (Fractional Shortening (%)) は、以下の図 2 のように 30 秒間における各拍動において、2 点の (最大拡張距離 - 最大収縮距離) / 最大拡張距離 × 100 で求め、収縮速度は、同じく 30 秒間の中での各拍動における 2 点の最大収縮速度のそれぞれ平均を算出することで求めた。

$$\text{Fractional Shortening (\%)} = \frac{\text{Maximum Length} - \text{Minimum Length}}{\text{Maximum Length}} \times 100$$

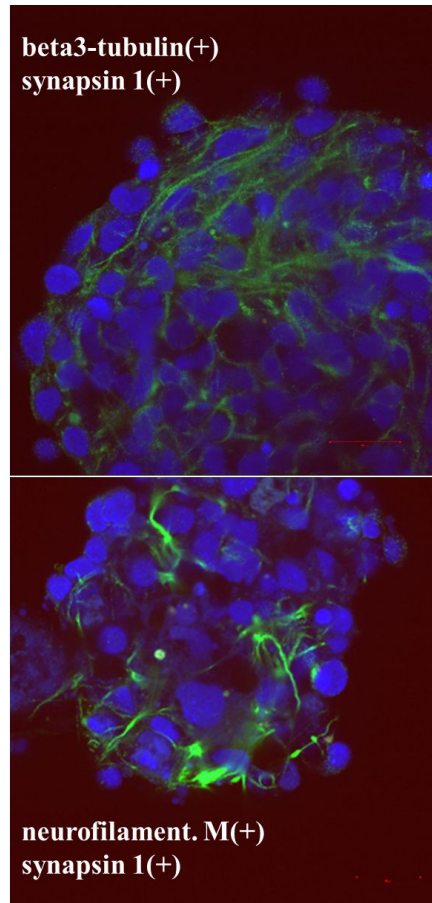
(図 2. 収縮率の算出方法)

神経前駆細胞を 30%配合した群と 40%配合した群では以下のグラフ (図 3) のように有意に収縮率や最大収縮速度の差異を認め、神経前駆細胞の配合比率によって、拍動動態が変化しうることを示唆した。



(図 3. 配合比率毎の収縮率と収縮速度)

また、その配合スフェロイドを蛍光免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察したところ、神経線維特異抗体である 3 tubulin 陽性細胞および Neurofilament medium chain 陽性細胞をそれぞれ認め、その細胞分布も以下の図 4 のように神経線維様の形態に類似し、同時に認めた Synapsin 1 陽性細胞が点在しているのも確認できた。神経前駆細胞がスフェロイド内において、神経細胞へ分化しうる可能性を示唆し、形態変化をも来しうることを示した。



(図 4. 蛍光免疫染色)

ただし、この形態変化が拍動動態へどのような影響を及ぼしているのかはまだ明らかにはできておらず、さらなるメカニズムの解明が必要である。また、血管内皮細胞や線維芽細胞などの配合による、さらなる高機能スフェロイドの作製や、そのスフェロイドを用いて作製された三次元構造体による心不全動物モデルへの移植が今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

The Addition of human iPS cell-derived neural progenitors changes the

contraction of human iPS cell-derived cardiac spheroids. Yosuke Mukae, Manabu Itoh, Ryo Noguchi, Kojiro Furukawa, Ken-ichi Arai, Jun-ichi Oyama, Shuji Toda, Koichi Nakayama, Koichi Node, Shigeki Morita, *Tissue and Cell* 53 (2018) 61-67.

〔学会発表〕(計 2 件)

Addition of human iPS-derived neural progenitors influences the contractile function of cardiac spheroids, Yosuke Mukae, Manabu Itoh, Kojiro Furukawa, Takahiro Kitsuka, Ken-ichi Arai, Jun-ichi Oyama, Koichi Nakayama, Koichi Node, Shigeki Morita, *Biofabrication* 2016.

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞凝集塊の機能的解析, 迎洋輔, 伊藤学, 古川浩二郎, 中山功一, 野出孝一, 森田茂樹, 第 68 回日本胸部外科学会定期学術集会 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

迎 洋輔 (Mukae, Yosuke)

佐賀大学 胸部・心臓血管外科 助教

研究者番号：90746570

(2)研究協力者

森田 茂樹 (Morita, Shigeki)

古川 浩二郎 (Furukawa, Kojiro)

伊藤 学 (Itoh, Manabu)

野口 亮 (Noguchi, Ryo)

木塚 貴浩 (Kitsuka, Takahiro)

中山 功一 (Nakayama, Koichi)

荒井 健一 (Arai, Ken-ichi)

野出 孝一 (Node, Koichi)

尾山 純一 (Oyama, Jun-ichi)

戸田 修二 (Toda, Shuji)