

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10732

研究課題名(和文) ヒトiPS由来心筋凝集体における神経前駆細胞と内皮細胞配合による収縮力向上の追究

研究課題名(英文) Addition of human iPS-derived neural progenitors and endothelial cells influences the contractile function of cardiac spheroids.

研究代表者

古川 浩二郎 (Furukawa, Kojiro)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90264176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経前駆細胞が混合型心筋スフェロイドの拍動に有利に働き、組織学的評価においてスフェロイド内にNestin、 β 3tubulin陽性細胞の発現を確認した。またiPS細胞由来血管内皮細胞を混合した心筋スフェロイドの成熟過程において血管新生促進、血管内皮増殖因子(VEGF)の産生分泌促進や神経保護作用をもつ合成化合物を用いることで、cAMP量の上昇と共に混合型心筋スフェロイドの収縮率の上昇を確認した。本研究において接着系細胞が元来もつ細胞凝集現象を利用して、細胞のみで拍動し、血管網、神経網を有するiPS細胞由来混合型心筋スフェロイドの作製、及びその高機能化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、心筋障害後の神経前駆細胞による新生血管誘導や心筋のRemodelingは注目されており、これまでも動物実験レベルやヒトの移植心臓では各種報告がある。本研究において接着系細胞が元来もつ細胞凝集現象を利用して、細胞のみで拍動し血管網、神経網を有するiPS細胞由来混合型心筋スフェロイドの作製、及びその高機能化に成功した。本基盤技術に組織工学技術を応用することで、免疫応答や感染症が極めて少ない自己細胞のみでできた構造体作製が可能である。ゆえに本成果は近未来の幹細胞を利用した再生医療の臨床応用に向けた一助となり得ると考える。

研究成果の概要(英文)：Neural progenitor cells favored the beating of mixed myocardial spheroids, and histological evaluation confirmed the expression of Nestin and β 3tubulin positive cells in the spheroids. In addition, by using a synthetic compound that promotes angiogenesis, stimulates the production and secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF), and has a neuroprotective effect in the maturation process of myocardial spheroids mixed with iPS cell-derived vascular endothelial cells, the mixing with the increase in cAMP amount is achieved. It was confirmed that the contraction rate of myocardial spheroids was increased. In this study, we succeeded in producing iPS cell-derived mixed myocardial spheroids that have vascular and neural networks, beating only by cells.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：ヒトiPS由来スフェロイド 神経前駆細胞 内皮細胞 組織工学 再生医療

1．研究開始当初の背景

薬剤抵抗性の重症心不全には、現時点で補助人工心臓か心移植のみだが治療を享受できる患者は限定されている。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、心筋細胞シート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細胞（心筋）シートも、シートそのものは非常に薄く、時間をかけて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 や 3D バイオプリンターは、培養後の懸濁液状態の細胞を一定の環境下で一度に再凝集させることで、自己凝集能のみで生体異物のない 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。我々は基盤技術となるこの細胞凝集現象により形成されるスフェロイドに着目し研究を進めてきた。

2．研究の目的

本研究の基盤となるスフェロイドには、複数種の細胞を混合して作れるという特徴があり、混合する細胞の種類や比率を変えることで、さまざまな性質を持たせることができる。本研究ではその構成細胞として主軸となるヒト iPS 細胞由来心筋細胞にヒト iPS 細胞由来の神経前駆細胞や血管内皮細胞、ヒト皮下線維芽細胞を配合させ、より高機能化した iPS 細胞由来混合型心筋スフェロイド（心臓オルガノイド）を作製することを目的とする。

3．研究の方法

未分化 iPS 細胞から心筋細胞まで分化させ、心筋細胞を純化させる必要があるが、そこに至るまで未分化 iPS 細胞の維持費用が高むことや、Flow cytometry による細胞組成の検索に細胞や時間のロスを生じる。したがって、本研究では、細胞組成の追究に焦点を絞って、混合型心筋スフェロイド作製に必要な iPS 細胞由来心筋細胞、iPS 細胞由来内皮細胞、iPS 細胞由来神経前駆細胞、線維芽細胞など市販されているものを購入して使用した。ま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分注した。培地は心筋培養培地と神経培養培地、内皮培養培地、あるいは血管新生促進、血管内皮増殖因子（VEGF）の産生分泌促進や神経保護作用をもつ合成化合物を用いた。出来上がった混合型心筋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し、形態や組織学的評価の一つとして免疫染色した。

4．研究成果

心筋細胞と神経前駆細胞の混合spheroidを作成し、神経前駆細胞が拍動に有利に働くことを研究期間内に報告(*The addition of human iPS cell-derived neural progenitors changes the contraction of human iPS cell-derived cardiac spheroids. Tissue and Cell 53:61-67*)し、混合型心筋スフェロイドの組織学的評価においてNestin、 α -tubulin、Neurofilament Medium chain、Synapsin1陽性細

胞の発現を確認した。またiPS細胞由来血管内皮細胞を混合した心筋スフェロイドの成熟過程で血管新生促進、血管内皮増殖因子(VEGF)の産生分泌促進や神経保護作用をもつ合成化合物を用いることで、cAMP量の上昇と共に混合型心筋スフェロイドの収縮率や拍動回数の上昇を確認した(2-Cl-C.OXT-A stimulates contraction through the suppression of phosphodiesterase activity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiac organoids. *PLoS One*.14(7): e0213114, 2019.)

(結語) 接着系細胞が元来もつ細胞凝集現象を利用して、細胞のみで拍動し血管網、神経網を有するiPS細胞由来混合型心筋スフェロイドの作製、及びその高機能化に成功した。本基盤技術に組織工学技術を応用することで、免疫応答や感染症が極めて少ない自己細胞のみでできた構造体作製が可能である。ゆえに本成果は近未来の幹細胞を利用した再生医療の臨床応用に向けた一助となり得ると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mukae Y, Itoh M, Noguchi R, Furukawa K, Arai K, Oyama J, Toda S, Nakayama K, Node	4. 巻 53
2. 論文標題 The addition of human iPS cell-derived neural progenitors changes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 61-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2018.05.002.	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 該当する

1. 著者名 伊藤学、五條理志、野出孝一、小林英司、森田茂樹、中山功一	4. 巻 29(3)
2. 論文標題 スキャフォールドフリーバイオ3Dプリンタを用いた小口径細胞製人工血管の開発	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 医工学治療	6. 最初と最後の頁 167-172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Kitsuka Takahiro, Itoh Manabu, Amamoto Sojiro, Arai Ken-ichi, Oyama Junichi, Node Koichi, Toda Shuji, Morita Shigeki, Nishida Takahiro, Nakayama Koichi	4. 巻 14
2. 論文標題 2-CI-C.OXT-A stimulates contraction through the suppression of phosphodiesterase activity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiac organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0213114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213114	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 該当する

1. 著者名 Itoh Manabu, Mukae Yosuke, Kitsuka Takahiro, Arai Kenichi, Nakamura Anna, Uchihashi Kazuyoshi, Toda Shuji, Matsubayashi Kumika, Oyama Jun-ichi, Node Koichi, Kami Daisuke, Gojo Satoshi, Morita Shigeki, Nishida Takahiro, Nakayama Koichi, Kobayashi Eiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of an immunodeficient pig model allowing long-term accommodation of artificial human vascular tubes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications 2244	6. 最初と最後の頁 2244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41467-019-10107-1	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kitsuka T, Itoh M, Amamoto S, Arai K, Oyama J, Node K, Nakayama K, Morita S, Nishida T.
2. 発表標題 2-CI-C.OXT-A Stimulates Contraction through Suppression of PDE Activity in hiPSC-Derived Cardiac Organoids
3. 学会等名 AHA Scientific Sessions 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manabu Itoh
2. 発表標題 Translational research of scaffold free tubular tissue modeled with Kenzan method Bio-3D Printer for cardiovascular surgery.
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤学
2. 発表標題 心臓血管外科領域における臓器再生への試み
3. 学会等名 第11回九州医療センター地域医療研修会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Itoh M
2. 発表標題 Translational research of Kenzan method Bio-3D Printer for vascular surgery.
3. 学会等名 Thailand-Japan International Symposium for Regenerative Medicine. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 学
2. 発表標題 心臓血管再生医療研究と臨床応用に向けて
3. 学会等名 第27回佐賀心不全研究会（招待講演）
4. 発表年 2019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
研究分担者	木塚 貴浩 (Kitsuka Takahiro) (20796487)	佐賀大学・医学部・医員 (17201)	
研究分担者	荒井 健一 (Arai Kenichi) (40752960)	佐賀大学・医学部・特任助教 (17201)	
研究分担者	中山 功一 (Nakayama Koichi) (50420609)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	
研究分担者	伊藤 学 (Itoh Manabu) (50555084)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	
研究分担者	野出 孝一 (Node Koichi) (80359950)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

