

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19414

研究課題名（和文）ヒト心筋の自律性獲得による次世代創薬技術の開発

研究課題名（英文）Construction of cultured cardiomyocyte models with autonomic nervous systems

研究代表者

木田 泰之（kida, yasuyuki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：20396526

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトiPS由来の心筋細胞と自律神経と共培養し機能的に接続させることで「高次機能制御系を組み込んだ心筋組織の作製」を行うことを目的とした。誘導したヒト自律神経への光活性化イオンチャンネル(ChR2: チャンネルロドプシン2)の発現と神経活動制御を行う光刺激条件を同定し、自律神経シグナルにより心筋拍動を拮抗的に制御することに成功した。また、この共培養システムの神経由来心毒性のアクセス系としての有用性についても示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、我々の独自技術であるヒト自律神経の作製技術を基に、ヒト心筋とヒト自律神経の機能的結合に世界で初めて成功している。また、神経由来の心毒性についてもこの共培養系を用いることで評価できる可能性が示唆されている。本研究の成果を基に、神経支配を再現した多臓器培養モデルへと発展させることで、疾患状態を含め様々な生体状態を再現することが可能となり、医薬品スクリーニングの汎用性を高めることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to construct cultured cardiomyocyte models which incorporated autonomic nervous systems (ANS). To do this, we co-cultured human iPS-derived cardiomyocytes and ANS neurons, and then confirmed their functional connections. We succeeded in controlling cardiomyocyte beating with the ANS signals, which were evoked by nicotine application or photostimulation to ChR2 (channelrhodopsin 2)-expressing ANS neurons. The usefulness of this co-culture system as a novel assay system for cardiotoxicity was also tested and suggested.

研究分野：幹細胞工学

キーワード：自律神経

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心毒性は創薬のあらゆる安全性試験において重要なテーマであるが、細胞培養系にて評価することは依然として困難である。この理由として、ヒト iPS 細胞から成熟した安定拍動する心筋を分化誘導させることは容易でなく、長期的な培養を要しても不安定な拍動を示す幼若な心筋性質を保ったままであることが挙げられる (Kamakura et al., *Circ.J.* 2013)。しかし、アカデミアでの顕著な技術開発や、細胞加工業者の参入等によって、ヒト iPS 細胞を用いた心毒性試験の目的が立ちつつある。また、心臓病の創薬に市販のヒト iPS 由来心筋細胞の使用が企業で広まりつつある。一方で、現存の iPS 細胞由来心筋は自律神経系から独立しており心房・心室細動などの神経性疾患、神経由来の心毒性を評価することが困難である。それは、成人および疾患を見据えた創薬研究に可能な *in vitro* モデルとなる安定した分化細胞構成技術が充分には確立されていないのが一因である。また一般的な創薬での毒性試験だけでなく、疾患患者由来の分化細胞を用いた研究においても、これらは克服すべき大きな課題である。

我々はヒト多能性幹細胞より自律神経を高効率で誘導する手法開発を世界に先駆けて行っており、カプサイシンやメンソール等の感覚刺激には反応せず、ニコチンに反応する成熟自律神経の作成に成功している (特 6593811)。これにより、自律神経をはじめとした末梢神経を用いた毒性試験の目的が立ちつつある。我々の有する独自のヒト自律神経作製技術を応用して自律神経を包含する心筋ブロックを作製することができれば、神経性の遅発性心不全の発症メカニズムを解析するための実験ツール、創薬支援のためのデバイス構築など、基礎・応用研究の両面への発展が期待できる。

2. 研究の目的

1.の背景に基づき、本研究では我々が有する独自技術である自律神経誘導技術を用い、ヒト iPS 由来の心筋細胞と自律神経を共培養し機能的に接続させることで「高次機能制御系を組み込んだ心筋組織の作製」を行うことを目的とする。チップデバイス上への搭載行い、自律神経を包含した心筋組織 (心筋ブロック) による薬理試験の有用性実証を目指す。本研究達成から期待される成果として、末梢神経シグナルによる臓器機能の統合的制御により、疾患状態を含めた様々な生理状態を再現することが可能となり、医薬品スクリーニングの特異性、効率、汎用性を高めることが期待できる。

3. 研究の方法

本研究は、誘導したヒト自律神経への光活性化イオンチャネル(ChR2: チャネルロドプシン 2)の発現と神経活動制御を行う光刺激条件の同定、誘導したヒト自律神経とヒト心筋細胞との共培養条件の同定、デバイス上で共培養した自律神経-心筋組織の機能解析と薬剤試験への応用可能性の検討、のステップで行った。

(1) ヒト自律神経への ChR2 発現実験

我々はこれまでにヒト iPS 細胞等の多能性幹細胞から自律神経、特に交感神経/副交感神経をそれぞれ選択的に誘導する技術を開発してきた。一方で、作製した自律神経を標的組織 (本研究では心筋細胞) と共培養する際には、以下にして自律神経シグナルを人為的に心筋組織へと作用させるかが課題となる。ニコチン等の自律神経アゴニストを添加することが一つの方法であるが、共培養組織においてはこうした薬物添加は自律神経以外の組織にも影響を及ぼす可能性がある。そこで、我々は青色光の照射により神経細胞の活動電位を誘起することが可能な人工のイオンチャネルである ChR2 を自律神経に発現するアプローチを取る。このアプローチにより自律神経のみを選択的に刺激することが可能であり、また光刺激は周波数や刺激時間等の実験パラメータの設定が容易であるというメリットがある。

自律神経へ選択的に ChR2 を発現するために SYNAPSIN-1 プロモーターの下流に ChR2 遺伝子と YFP 遺伝子を挿入したウイルスベクター (Addgene 社)を用い、作製した自律神経に感染させた。なお、活動電位を非侵襲的に測定可能な微小電極アレイ基板 (MEA; microelectrode array) 上で自律神経培養と ChR2 の感染実験を行うことで、光照射により ChR2 が活性化されるかの検討を電気活動計測から解析した。

(2) 自律神経と心筋細胞の共培養条件の検討

我々はこれまでにヒト自律神経の作製過程において、細胞密度と2種の神経栄養因子 (BDNF, CNTF)の添加濃度に依存して交感神経/副交感神経への分化経路が決定することを見出している。この培養環境に依存した交感神経/副交感神経への分化誘導が心筋細胞との共培養条件下においても再現可能であるかを検証する必要がある。

このために誘導した自律神経と心筋細胞を共培養する際の培養液や細胞密度の条件検討を行った。また、自律神経シグナルによる心筋拍動への影響を解析するために MEA 上で共培養を行った。共培養サンプルにおいて交感神経/副交感神経が狙い通りに誘導されているかを確認するために、交感神経マーカーである TH (tyrosine hydroxylase)と副交感神経マーカーである CHAT (choline acetyltransferase)の抗体を用いて免疫染色を行った。

(3) デバイス上で共培養した自律神経-心筋組織の機能解析

MEA 上で共培養を行った自律神経-心筋細胞サンプルの機能解析を行うために、心筋細胞の電気活動解析を行った。ここではニコチン刺激及び ChR2 を発現させた状態での青色光刺激を行った際の心筋活動への影響に注目した。また、末梢神経障害及び心毒性を示す抗がん剤を添加した際の心筋活動への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞から 13 日間の誘導後、34 日間神経培養を行った自律神経に対して ChR2 ウイルスベクターを感染させた。感染後、9 日目には図 1 の通りに神経細胞にのみ YFP が発現していることを確認した。このことより、自律神経に特異的に ChR2 を発現させることが可能となった。さらに、MEA 上で培養を行い、ChR2 を発現させた自律神経（培養 47 日目）に対して青色光を照射した結果、青色光の照射タイミングにおいて高頻度の神経活動が計測された（図 2）。以上の結果より、自律神経に発現させた ChR2 が正常に機能していることを確認でき、青色光照射により人為的に自律神経活動を誘起することが可能となった。

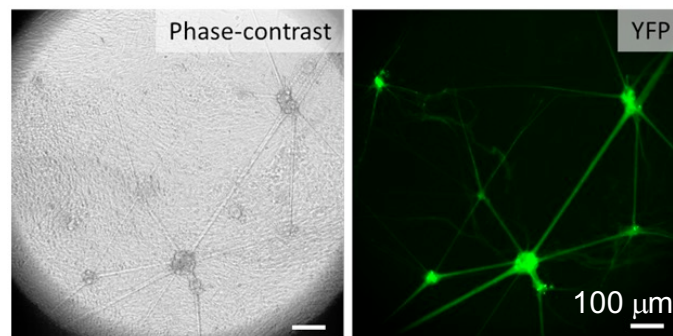


図 1 自律神経への選択的な ChR2 発現。YFP を発現する神経細胞に同時に ChR2 が発現している。

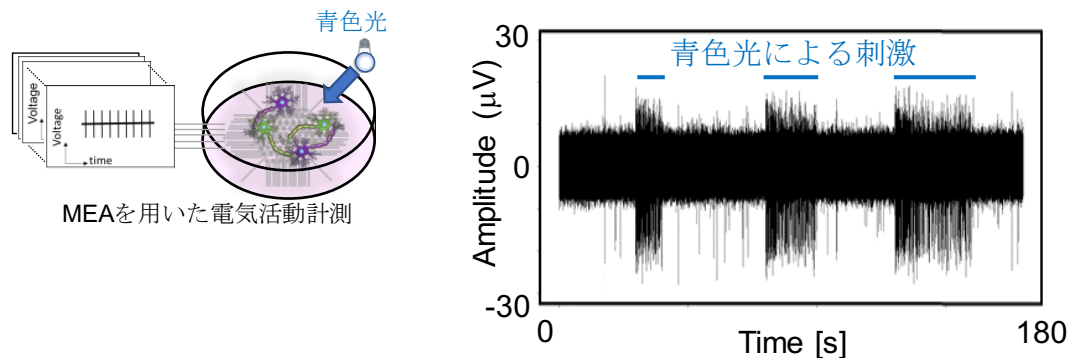


図 2 ChR2 を発現した自律神経の活動解析。MEA 上で培養した自律神経に対して ChR2 を発現させ青色光刺激を行った際の電気活動を解析することで、ChR2 の機能を確認する（左図）。1つの電極から得られた活動電位波形図（右図）。青線で示したタイミングで青色光照射を行っており、青色光に反応して顕著な電気活動が発生していることがわかる。

(2) 自律神経と心筋細胞の共培養に関して、複数条件での最適化を行い、下記の通りのプロトコルを作成した。具体的には、まず MEA 上にヒト iPS 由来の心筋細胞(CDI 社, iCell cardiomyocyte)を 1.6×10^4 cells 播種した。この翌日に、ヒト iPS 細胞から 13 日間の誘導を行った自律神経前駆細胞を播種する。この際、交感神経へと誘導するサンプルでは播種する細胞数を 1×10^5 cells とし、BDNF、CNTF を添加しない神経用培養液と心筋用培養液を 1:1 で混合した条件で培養を行った。一方、副交感神経へと誘導するサンプルでは細胞数を 2×10^4 cells とし、BDNF、CNTF を高濃度で添加した神経用培養液と心筋用培養液を 1:1 で混合した条件で培養を行った。

上記の条件で培養を行った結果、心筋細胞上でシナプス関連タンパク質である SYNAPSIN-1 の発現が観測され、心筋細胞と自律神経の接続を確認した(図 3)。また、TH と CHAT を用いた

二重染色の結果、交感神経/副交感神経への誘導培養が心筋上においても維持されることを確認でき(図 4)、心筋細胞と交感神経または副交感神経との共培養サンプルを作製できる条件を見出すことができた。

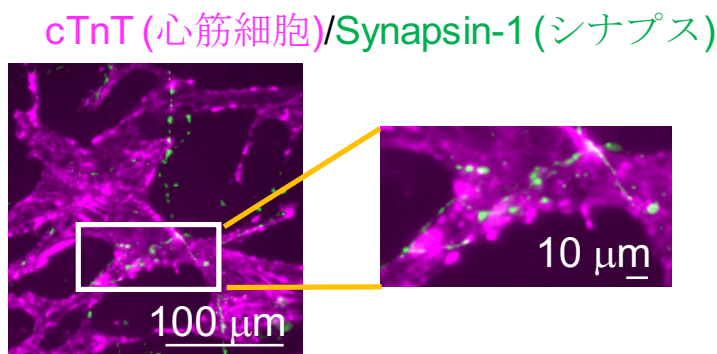


図 3 心筋細胞と自律神経の共培養実験。心筋細胞上でシナプス形成が確認できる。

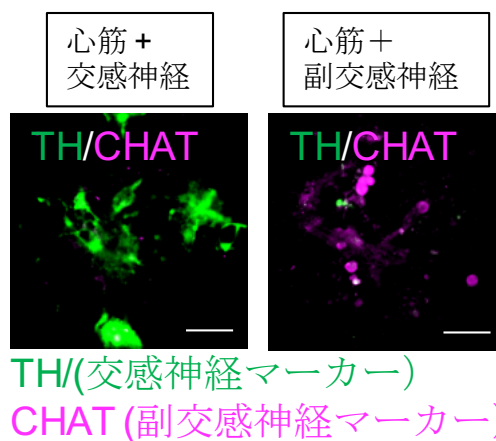


図 4 心筋細胞上での交感神経/副交感神経の選択的誘導。

(3) 上記の通りに構築した心筋-交感神経および心筋-副交感神経の共培養サンプルに対して、ニコチンを添加し自律神経刺激を行った結果、交感神経との共培養サンプルでは心筋拍動頻度が上昇し、副交感神経との共培養サンプルでは心筋拍動頻度が減少することを確認した(図 5)。更に、ChR2 を発現させた交感神経と心筋細胞との共培養サンプルに対して青色光刺激を行った結果、光刺激により心筋拍動頻度が上昇すること、交感神経由来のノルアドレナリンシグナルのブロッカー (propranolol) の存在下ではこの心筋拍動変化が起こらないことを観測した (図 6)。以上の結果より、我々の作製したヒト自律神経はヒト心筋細胞と機能的な結合を形成し、ChR2 を利用することで、光刺激による心筋拍動の制御を可能にした。また、心筋-自律神経の共培養サンプルに対して末梢神経障害及び心毒性を示す抗がん剤を添加したところ、心筋細胞のみの培養サンプルと自律神経との共培養サンプルでは、心筋拍動ダイナミクスへの影響に顕著な差が見られることを確認している (特許申請の都合上、詳細は割愛する)。

以上より、本研究課題で行った心筋-自律神経の共培養系は神経由来の心毒性アッセイシステムとして発展可能であることが示唆された。なお、この研究成果については論文投稿を行っている。

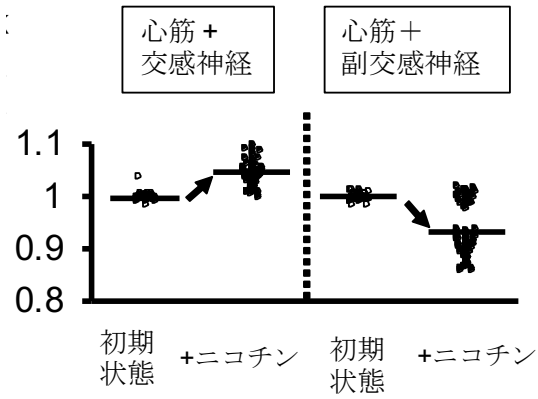


図 5 自律神経シグナルによる心筋拍動への影響。交感神経との共培養サンプルでは神経刺激により心筋拍動頻度が上昇し、副交感神経との共培養サンプルでは心筋拍動頻度が減少する。

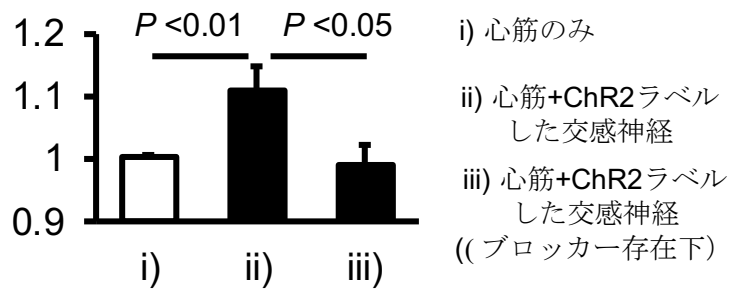


図 6 光刺激による自律神経および心筋拍動の制御。ChR2 を発現した交感神経への青色光刺激により、心筋拍動が顕著に増加することがわかる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 高山 祐三, 榑笥 博子, 木田 泰之	4. 巻 55
2. 論文標題 自律神経系の再構築に迫る	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本自律神経学会誌	6. 最初と最後の頁 192-195
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 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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高山 祐三, 森 宣仁, 若林玲実, 劉 潔, 木田 泰之
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来末梢神経を用いた遺伝性末梢神経障害のアッセイ系構築への取り組み
3. 学会等名 細胞アッセイ技術の現状と将来
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山 祐三, 若林玲実, 榑笥 博子, 木田 泰之
2. 発表標題 末梢神経系細胞の新規誘導技術の開発
3. 学会等名 電気学会 電子・情報・システム部門大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山 祐三, 木田 泰之
2. 発表標題 Construction of human peripheral nerve-innervating culture model from pluripotent stem cells using microfabricated culture device
3. 学会等名 11th FENS Forum of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木田 泰之
2. 発表標題 Reconstitution of organs and their functional connections using human pluripotent stem cell-derived autonomic nerves
3. 学会等名 第8回オルソオルガノジェネシス検討会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山 祐三、木田 泰之
2. 発表標題 微細加工技術に基づいた神経回路の構成的培養手法開発とその応用
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第37回研究会 (37th CHEMINAS)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 副交感神経細胞の作製方法	発明者 高山 祐三、木田 泰之	権利者 産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、2018-157466	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----