

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23607

研究課題名（和文）心臓再生医療に向けた3次元組織培養法の開発

研究課題名（英文）Development of three-dimensional tissue culture method for cardiac regenerative medicine

研究代表者

松田 祐典（Matsuda, Yusuke）

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：90845752

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では成熟した心筋組織の作成を目的に、ヒト由来のiPS細胞とヒト歯肉線維芽細胞を共培養させ、心筋細胞へ分化誘導させる過程に培養細胞伸張システムによるストレッチ刺激を加えた。作成した心筋組織に対して遺伝子レベルでの評価のためqPCR、タンパク質レベルでの評価のため免疫染色を行った。さらに組織の微細構造の形態学的比較のため電子顕微鏡を用いて観察し、組織の動画像を撮影し収縮能の解析を行った。結果として、ストレッチ刺激がiPS細胞の心筋細胞への分化の成熟に影響を及ぼす可能性が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

心臓移植は、薬物療法と機械的補助療法だけでは治療が困難であった末期心不全の唯一の治療法である。iPS細胞で心臓を作ることが可能になれば、ドナー不足の問題は解決される。これまでiPS細胞の心筋組織への分化を誘導するための様々な方法が考案されており、本研究では、ストレッチ刺激を適用することにより、iPS細胞の心筋組織への分化の成熟に影響を及ぼす可能性が示唆され、将来的な臨床応用に向けて前進していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, for the purpose of creating mature myocardial tissue, human-derived iPS cells and human gingival fibroblasts were co-cultured, and stretch stimulation was applied by a cultured cell extension system in the process of inducing differentiation into cardiomyocytes. The prepared myocardial tissue was subjected to qPCR for evaluation at the gene level and immunostaining for evaluation at the protein level. Furthermore, for morphological comparison of the fine structure of the tissue, observation was performed using an electron microscope, and a moving image of the tissue was taken to analyze the contractility. As a result, it was suggested that stretch stimulation may affect the maturation of iPS cell differentiation into cardiomyocytes.

研究分野：生理学

キーワード：再生医療 iPS細胞 心臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界保健機構 (World Health Organization : WHO) の発表した 2015 年の世界全体の死亡原因のトップは虚血性心疾患であり、その後には生じる心不全は罹患率・死亡率が高く、深刻な医学的問題である。心不全に対して内科的・外科的治療は日々進歩しているが、心臓は自己再生能が乏しいため現状の治療方法では回復が困難であり、その最終的な治療方法は心臓移植のみである。しかしながら、著しいドナー心臓の不足が問題となっている。そこで iPS (induced Pluripotent Stem) 細胞を用いた再生医療が、代替医療として注目されている。

iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導は将来的に臨床応用が期待され、様々な方法が考案されてきた。しかし、腫瘍形成のリスクがあること、心筋細胞への分化誘導効率が低いこと、また異種動物由来材料の混入による安全性のリスク等が課題と指摘されている。先行研究において iPS 細胞の分化誘導は、より生体を再現した環境が心筋細胞への成熟に影響を及ぼすと示唆されている。本研究では異種動物由来材料の非存在下で iPS 細胞を 3 次元的環境下にて分化誘導することで、より成熟した心筋組織が作成されると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、再生医療により虚血性心疾患患者に移植可能な心臓組織を作成することである。この大目的を達成するために、本研究では安全性のリスクを回避した異種動物由来材料の非存在下でより成熟した心筋組織を作成することを目的とする。

先行研究において 2 次元培養で iPS 細胞をヒト歯肉線維芽細胞と共培養した。さらにこの研究を進展させ、iPS 細胞を 3 次元培養し、立体的な心筋組織を作成することは、心臓移植の実用化に近づくと考えられる。3 次元培養により成熟した心筋組織が作成された場合、心臓移植のみならず、創薬の実験モデルの使用できる可能性も考えられ、さらなる研究の発展が期待されると考えた。

3. 研究の方法

ヒト由来の iPS 細胞とヒト歯肉線維芽細胞を共培養させ、心筋細胞へ分化誘導させる過程に培養細胞伸展システムによるストレッチ刺激を加えた。

iPS 細胞は 201B7 型を使用した。本研究で使用した iPS 細胞は 7 代目から 20 代目のものを使用した。ヒト歯肉線維芽細胞は岡山大学病院矯正歯科の患者の歯肉組織から採取した。

iPS 細胞は PDMS ストレッチチャンバー上で StemFit AK02N を用いて培養した。分化誘導には PSC cardiomyocyte Differentiation Kits を使用した。分化誘導開始から 14 日目に培養細胞伸展システム「ShellPa」を用いてストレッチ刺激を 72 時間加えた。ストレッチ刺激を加えたストレッチ群と、ストレッチ刺激を加えず定常状態で培養したサンプルを対照群とした。

作成した心筋組織 (iPS-CM) に対して、(1) 遺伝子レベルでの分化度の評価のため qPCR を行った。心筋細胞関連マーカーとして Nkx2.5、cTnT、多能性マーカーとして Sox2、Oct4 を使用した。(2) タンパク質レベルでの評価のために免疫染色を行った。心筋細胞関連マーカーとして cTnT、MYL2 を使用した。(3) 組織の微細構造の形態学的比較のため電子顕微鏡を用いて観察を行った。(4) iPS-CM の収縮について位相差顕微鏡動画を撮影し、収縮能をベクトル場を用いて定量化した。

4. 研究成果

(1) qPCR

- ・ストレッチ刺激を与えた組織は対照群と比較して有意に心筋関連マーカーが増加した。
- ・ストレッチ群の多能性マーカーは統計学的に有意でないものの、対照群と比較して減少傾向にあった。

Nkx2.5 は心筋細胞への分化の初期に発現するが、cTnT は比較的成熟した心筋組織に発現するマーカーである。ストレッチング群における Nkx2.5 と cTnT の有意な増加は、機械的ストレッチ刺激が iPS 細胞の心筋組織への分化を促進することを示している。さらに、多能性マーカー Oct4 および Sox2 の減少は、iPS 細胞の分化の進行を示している。対照群と比較して、Oct4 と Sox2 の発現はストレッチ群で減少する傾向があり、ストレッチ群において分化が増強されたことが示唆される。

(2) 免疫染色

- ・Nkx2.5、cTnT の発現はストレッチ群、対照群の両方で著明であり、いずれもサルコメア構造が認められた。
- ・cTnT の発現は比較的広い領域で観察されたが、MYL2 の発現はストレッチ群と対照群の両方でまばらであった。
- ・組織の配列について、ストレッチ群では伸展方向と平行な心筋組織の配列が観察されたが、対照群では明らかではなかった。

(3) 電子顕微鏡観察

- ・対照群のサルコメア構造の長さは $1.164 \pm 0.158 \mu\text{m}$ であったが、ストレッチ群のサルコメア構造の長さは $1.586 \pm 0.194 \mu\text{m}$ であり、ストレッチ群は有意に大きなサルコメア構造を有していた。

成熟した心筋のサルコメア構造の長さは $1.6 \sim 2.2 \mu\text{m}$ であるが、ストレッチ群のサルコメア構造の長さはこれに近似している。ストレッチ群では、暗部と明部のサルコメア構造が見られ、成熟した心筋に近い構造を示した。したがって、サルコメア構造は機械的なストレッチ刺激によって成熟が促進される可能性が示唆された。

(4) 収縮能の定量化

- ・ストレッチ群は収縮能の増加が観察された。
- ・ストレッチ刺激前後の収縮能の増加は対照群と比較してストレッチ群に有意に観察された。

対照群の心筋組織は収縮性を有意に増加させる場合があり、サンプル間に大きな差があった。ストレッチ群では、すべてのサンプルで収縮の減少は見られず、収縮能の安定した増加が観察された。これは、心筋組織への分化誘導中にストレッチ刺激を加えると、心筋組織の収縮能を増加させる可能性があることが示唆している。

以上の研究結果より、ストレッチ刺激は iPS 細胞の心筋細胞への分化の成熟に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。3次元培養の前段階である2次元培養によって得られた本研究結果は、今後の3次元培養において重要な知見であり、成熟した心筋組織を作成することへ前進していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	成瀬 恵治 (Naruse Keiji)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究協力者	高橋 賢 (Takahashi Ken)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・研究准教授 (15301)	

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