

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12613

研究課題名（和文）自律神経作用を付加したon chip心筋モデルの構築

研究課題名（英文）Construction of an On-Chip Cardiomyocyte Model incorporated with Autonomic Neurons

研究代表者

高山 祐三（Takayama, Yuzo）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：60608438

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではまず自律神経sphereの作製を行い、遺伝子発現評価により、交感神経/副交感神経sphereの作製を確認できた。次に、自律神経sphereと心筋組織の共培養系構築を行った。自律神経sphereとの共培養を行った心筋組織において、神経刺激による心筋活動変化を観測することができ、自律神経sphereと心筋組織の機能的な結合を確認した。更に、共培養系を用いた心筋毒性解析を行い、末梢神経障害と催不整脈作用を有するある種の抗がん剤は神経障害を介して心筋活動に影響を与えることを示唆する結果が得られ、本共培養システムの有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題ではヒト心筋組織と自律神経sphereを共培養することで、自律神経-心筋組織において機能的な結合・相互作用が構築されること、および自律神経を介した心毒性をアッセイ可能な培養アッセイ系となりうることを示した。生体においては自律神経作用により臓器機能の調整や臓器間相互作用が行われており、自律神経作用を再現した培養系は次世代の創薬アッセイ系として貢献することが期待できる。また、細胞組織機能を自律神経シグナルにより人為的に制御するための自律神経活動の計測・制御インターフェース構築の先には、ヒト自律神経系への機械的な介入による生体モニタリング・次世代治療への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we first induced ANS spheres and confirmed the generation of sympathetic/parasympathetic spheres through gene expression evaluation. Next, we developed a co-culture system of these ANS spheres and cardiomyocytes. In cardiomyocytes co-cultured with ANS spheres, we could detect changes in electrical activity of cardiomyocytes responded to neuronal stimulation, confirming functional coupling between the ANS spheres and cardiomyocytes. Furthermore, using the co-culture system for cardiotoxicity analysis, we suggest that certain anticancer drugs, known to cause peripheral neuropathy and arrhythmogenic effects, influence cardiomyocyte activity via changes in neuronal activity. These findings highlight the potential utility of our co-culture system.

研究分野：細胞工学、神経工学

キーワード：自律神経 心筋 ヒトiPS細胞 生体モデリング

1. 研究開始当初の背景

生体臓器は自律神経系を構成する交感/副交感神経の拮抗作用による機能制御を受けており、それゆえに自律神経作用の恒常性が破綻することで不整脈等の疾患が誘起される。自律神経作用により臓器機能を制御・破綻に導く詳細なメカニズム解析、および疾患状態に対する創薬応用のためには、生体外において自律神経作用を再構成する技術の確立と自律神経活動のモニタリング・コントロール技術開発が必須である。しかし、ヒト自律神経系細胞を生体より採取することは困難であり、またヒト多能性幹細胞より自律神経系細胞を誘導する技術に関してもこれまで報告されていなかった。

研究代表者は本研究課題に先立ちヒト多能性幹細胞 (iPS, ES 細胞) から自律神経前駆細胞及び交感/副交感神経の作製技術を開発してきた。特に前駆細胞の段階から細胞密度、神経栄養因子の添加濃度をパラメータとすることで交感/副交感神経の選択的誘導を可能とした点が大きな利点である (Takayama et al., Sci. Rep., 2020; 特許 6593811; PCT/JP2019/033019)。一方で、異なる培養環境による細胞誘導手法では、標的細胞組織 (心筋など) との共培養を行う際に片方のみとの神経結合になってしまうという課題があった。標的臓器への自律神経作用の評価には交感/副交感神経支配を同時に再現することが必須であると考えられる。

2. 研究の目的

上記 1. の背景に基づき、本研究では交感/副交感神経のハンドリングを容易にする 3 次元交感/副交感 sphere を作製し、ヒト交感/副交感神経両者の神経支配を再現した心筋との共培養系を構築することで、自律神経シグナルによる心筋機能への影響を電気活動計測から評価可能な機能評価システムの確立を目的とした。本研究の目指すヒト自律神経系の生体外再構成技術は培養組織の高機能化に繋がるものであり、更には再生医療及び創薬応用へと発展が期待できる技術である。

本研究課題の技術的課題は主に 1) 3 次元ヒト交感/副交感神経 sphere の作製手法確立と、2) チップデバイス上での心筋組織-自律神経 sphere の共培養組織構築、の 2 つである。1) に関して、研究代表者らはヒト多能性幹細胞から交感/副交感神経を高効率で誘導する世界的にも先駆けた新規手法を確立していることより、3 次元培養技術との融合により達成可能であると考えている。2) に関して研究代表者の有する微細加工技術に基づく神経共培養技術を応用することで達成可能であると考えており、幹細胞生物学と微細加工技術、電気生理学を融合した分野横断型の技術融合による独創的な研究テーマとして発展していくと考えている。

3. 研究の方法

本研究は下記に記す、3 ステップのアプローチにて行った。

(1) 自律神経 sphere の作製と評価

まず、3 次元状の交感/副交感 sphere の作製を行う。具体的には、自律神経前駆細胞を浮遊培養環境で 3 次元細胞塊を形成させながら培養液 A/B 内を用いて培養することで、成熟した交感/副交感神経の凝集体 (sphere) を作製する。生体内の神経節構造を模擬した 3 次元状の細胞 sphere を作製することで、共培養時の神経分化過程を省略すると共にハンドリング操作性を向上させることが可能となる。ヒト多能性幹細胞より浮遊培養下にて誘導した自律神経前駆細胞を、浮遊培養状態を維持した状態で神経成熟を行いそれぞれ交感/副交感神経へと分化誘導を行う (図 1)。作製した交感/副交感 sphere の構造的・機能的評価としては自律神経マーカーである PHOX2B 遺伝子、交感神経マーカーである TH 遺伝子、副交感神経マーカーである CHAT 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 解析・免疫染色を用いて解析した。

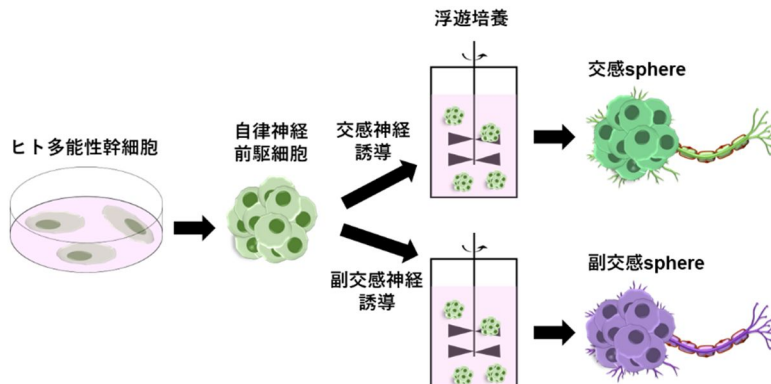


図 1 ヒト交感/副交感 sphere の作製

(2) ヒト自律神経 sphere と心筋組織の共培養系構築

上記で作製した自律神経 sphere と心筋組織との共培養系構築を行い、機能的結合が生じるかの解析を行った。

心筋活動の解析に当たり、心筋細胞が発生する活動電位及び局所電場電位(LFP: Local Field Potential)を計測するために微小電極アレイ基板 (MEA: Microelectrode Array)上にヒト iPS 由来心筋細胞 (iCell cardiomyocytes; CDI Japan 社)を播種し、更に自律神経 sphere を播種し共培養を行った。

(3) 共培養系を用いた心筋毒性解析

(2)までに構築したヒト自律神経-心筋システムの薬理解析への有用性を評価する実験を行う。具体的には、末梢神経障害と催不整脈の副作用があることが知られている抗がん剤を使用し、催不整脈が直接的な心毒性によるものなのか、末梢神経障害を介したものなのかは明らかにするため、本抗がん剤を心筋組織のみのサンプルと、ヒト自律神経と共培養したサンプルにそれぞれ添加し、心筋活動への影響を分析した。この結果を通じて、本抗がん剤の心臓への影響メカニズムを評価した。

4. 研究成果

(1) 自律神経 sphere の作製と評価

上記に沿って誘導・作製した交感神経/副交感神経 sphere を評価するために遺伝子発現解析を行った。定量 PCR による評価の結果、それぞれの sphere において TH や DBH (交感神経マーカー)及び CHAT や VACHT(副交感神経マーカー)の顕著な上昇を確認できた。また、免疫染色実験からも同様のタンパク質発現結果を得ており、各種自律神経 sphere の構築を行えたことを確認できた。

一方で、交感神経 sphere 内に副交感神経の、副交感神経 sphere 内に交感神経の混入が確認されており、各種神経の選択的な誘導方法の改善が今後課題となると考えられる。これに対しては、交感神経に対する選択的な神経毒である 6-OHDA を用いることにより副交感神経 sphere 内の交感神経を除去可能であることを確認しており、培養手法の改善を必要に応じて検討する予定である。

(2) ヒト自律神経 sphere と心筋組織の共培養系構築

自律神経 sphere による心筋機能制御系構築の確認するため、ヒト心筋細胞のみを培養したサンプル、及びヒト心筋細胞と交感神経/副交感神経 sphere との共培養を行ったサンプルの双方に対して自律神経アゴニストであるニコチンを添加し、心筋電気活動の計測を行った。その結果、心筋細胞のみの培養サンプルにおいてはニコチン添加による心筋活動の変化は観測されなかった。一方、交感神経 sphere と心筋細胞との共培養系においてはニコチン添加により顕著な心拍頻度の増大が、副交感神経 sphere と心筋細胞との共培養系においては心拍頻度の減少傾向が観測された (図 2)。

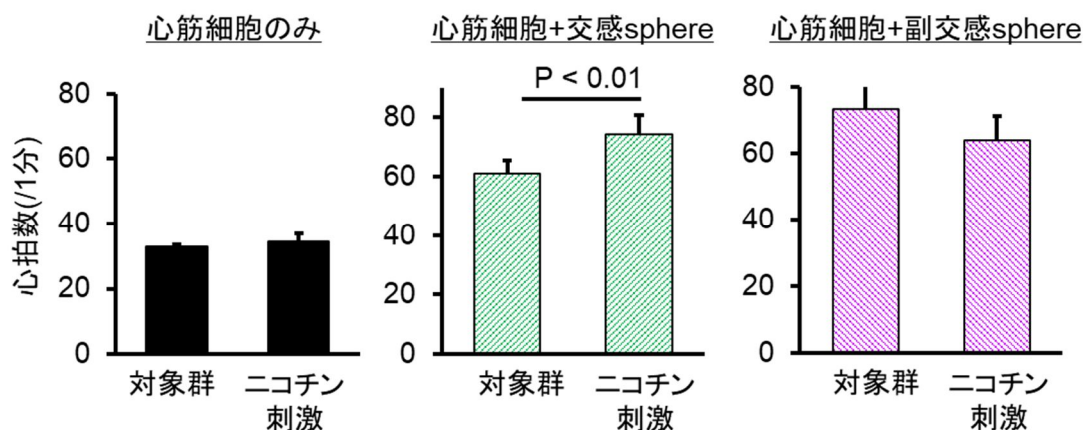


図 2 心筋細胞と自律神経 sphere との共培養系に対するニコチン刺激による心筋細胞の活動変化

(3) 共培養系を用いた心筋毒性解析

心筋細胞の電気活動波形において心電図での QT 間隔に相当する指標である FPDcF (Field potential duration corrected by Fridericia's formula)に関して解析を行った結果、心筋細胞のみのサンプルでは抗がん剤添加前後で顕著な変化は見られなかったのに対し、自律神経 sphere-心筋組織の共培養サンプルでは FPDcF の顕著な変化が見られた。FPDcF の大きな変動は催不整脈作用の指標となることがわかっており、この結果は末梢神経障害と催不整脈作用を有する該当抗がん剤は自律神経への障害を介して心筋活動への悪影響を及ぼすというこれまでの

in vitro 実験系では解析困難であったメカニズムを示唆するものである。以上の結果より、自律神経 sphere-心筋共培養システムによりこれまでになく化合物アッセイが可能であることが示唆されたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 高山 祐三、櫛笥 博子、赤木 祐香、鈴木 穰、熊谷 雄太郎、木田 泰之
2. 発表標題 Selective derivation of human peripheral neurons in the autonomic nervous system facilitate precise control of cardiomyocyte beating
3. 学会等名 ISSCR 2020 Virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高山 祐三
2. 発表標題 自律神経を備えたヒト培養組織の構築とその応用
3. 学会等名 CBI学会2020年大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高山祐三、赤木祐香、鈴木穰、熊谷雄太郎、木田泰之
2. 発表標題 自律神経作用を付加したヒト培養組織の構築とその応用
3. 学会等名 第29回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞分子工学研究部門ステムセルバイオテクノロジー研究グループ
<https://unit.aist.go.jp/cmb5/group/3-9Group.html>
研究者個人HP
<https://sites.google.com/site/yuzotaka0124/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------