

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22949

研究課題名(和文) iPS細胞由来生体模倣性人工心臓組織の代謝スイッチによる成熟化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of maturation mechanism of iPS cell-derived cardiac micro tissue by metabolic switch.

研究代表者

村田 梢 (Murata, Kozue)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80884329

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)：ヒトiPS細胞を用いた再生医療・創薬研究においては分化細胞の未成熟性が課題である。我々はヒトiPS細胞由来心筋細胞の成熟化においてエネルギー産生が主に糖代謝から脂肪酸代謝に変わる代謝スイッチが重要であることに着目し、脂肪酸存在下で3Dマイクロ心臓組織(CMT)の成熟化培養を行うことで、CMTを臨床応用に適用可能なレベルに成熟化させるかを検討した。その結果、パルミチン酸、オレイン酸、リノレン酸といった各種脂肪酸やDexamethazone, T3 hormone, PPARA agonistを複合的に作用することでCD36の発現が促進され電気刺激に対する応答性が成熟化傾向を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の独自のiPS由来3Dマイクロ心臓組織は心筋細胞以外の多種心臓構成細胞で構成されている。心筋細胞以外の多種心臓構成細胞で構成されている組織を、脂肪酸添加をはじめとする複合的刺激の下で培養した際の挙動に関する知見はこれまで報告されていない。本研究により人工心臓組織の成熟に関わる新たな知見を提唱することができた。一方、本研究の目的である、人工心臓組織を成熟化させる方法の確立には、物理的刺激の併用などさらなる因子が必要であることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：Regenerative medicine and drug discovery research using human iPS cells must overcome the problem of immaturity of differentiated cells. We focused on the importance of the metabolic switch in the maturation of human iPS cell-derived cardiomyocytes, in which energy production mainly changes from glucose metabolism to fatty acid metabolism. We investigated whether 3D microcardiac tissue (CMT) could be matured to a level applicable to clinical applications by culturing CMT in the presence of fatty acids. The results showed that the expression of CD36 was promoted by the combination of various fatty acids such as palmitic acid, oleic acid, and linolenic acid, Dexamethazone, T3 hormone, and PPARA agonist. Under these conditions, responsiveness to electrical stimulation showed a maturation trend.

研究分野：再生医療

キーワード：心臓 iPS細胞 マイクロ心臓組織 成熟化 脂肪酸 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞からの分化細胞に共通した課題は、細胞レベルでの未成熟性である。例えば、創薬研究ではヒト iPS 細胞由来心筋細胞が未成熟である故、新規治療薬のヒトの生体における反応を正確に評価しているとは言い難い。また、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた再生医療においても、その治療効果はパラクライン効果の域を出ず、移植片を長期保持できずにいる。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化が進むことで、移植片の長期保持が可能となり、心機能の直接的な補助といった治療効果が期待されるだけでなく、新規治療薬開発においてもより迫真性の高い評価が可能になると思われる。近年、電気刺激や流水刺激など物理的な刺激を加えることで心筋細胞の成熟化が促進されることも報告されている (Ronaldson-Bouchard, *Nature* 2018)。また、生体での心臓発生の過程と同様に、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化においても、主なエネルギー産生の糖代謝から脂肪酸代謝へのスイッチが重要であることが報告された (Funakoshi, *Nature communication* 2021/Mills, *PNAS* 2017/Yang, *Stem Cell Reports* 2019)。このような成熟化処理を単独、あるいは複数施された心筋細胞は、成熟化に關与する遺伝子の発現の上昇や筋収縮力の上昇が認められた。一方、我々が所持するような多種細胞間相互作用を三次元的に有する人工心臓組織において代謝スイッチによる細胞・組織レベルでの成熟が達成しうるかについては未だ検討されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞由来 3D 心臓組織の代謝スイッチによる成熟化メカニズムを解明し、そのプロセスを制御する方法を見出すことである。近年、心筋細胞内での代謝スイッチが脂肪酸代謝へと切り替わる過程が成熟化に重要であることが報告された。しかし、いずれの報告も心臓組織レベルでの十分な成熟化には至っていない。このことは、心筋細胞の成熟化と同時に、多種の心臓構成細胞間の三次元的な相互作用といった実際の生体心臓で起こっている生物学的プロセスの關与を考慮する必要があることを示唆している。我々の独自の iPS 由来 3D マイクロ心臓組織は心筋細胞以外の多種心臓構成細胞で構成されている。すなわち、この 3D マイクロ心臓組織を用いて代謝スイッチを引き起こす条件を特定し、複合的に処理すれば、心臓組織レベルの十分な成熟化を達成できるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

3. 研究の方法

(1) 3D マイクロ心臓組織の作製

3D マイクロ心臓組織を構成する細胞として、心筋細胞・血管内皮細胞・血管壁細胞を既報の方法 (Masumoto, *Sci Rep* 2014) およびその修正によって誘導し、細胞組成の比率の最適化を図った。我々の有する 1) 多層積層化シート技術、2) コラーゲン I などのバイオマテリアルを用いた立体化についてファインチューニングを実施し、以下の検討に用いる 3D マイクロ心臓組織を作製した。

(2) 代謝スイッチによる成熟化培養条件の特定

新生児脂肪酸組成 (Yang, *Stem Cell Reports* 2020) およびペルオキシソーム増殖因子活性化核内受容体 (PPAR) や、ホルモンの關与を示唆している報告 (Hirose, *Science* 2019 など)

を参考に各種化合物存在下で、1.で作成したマイクロ心臓組織を培養し、脂肪酸代謝へのスイッチがおこる条件を検討した。具体的にはパルミチン酸、オレイン酸、リノレン酸といった各種脂肪酸や Dexamethazone, T3 hormone, PPARA agonist といった化合物の濃度および処理時間の最適化を図った。これらの化合物添加を行った時の心臓組織の成熟化は、物理生物学的機能（電気刺激に対する応答性）、組織学的特性（蛍光免疫染色、組織免疫染色、電子顕微鏡観察）、生化学的特性（リアルタイム定量 PCR 解析）、および配向性の面から総合的に評価した。

4. 研究成果

(1) 3D マイクロ心臓組織の作製

本研究の成果として、新しい 3D マイクロ心臓組織の作製プロトコルが確立した。具体的には心筋細胞・血管内皮細胞・血管壁細胞を混合する時点で Filtration をかけることでより細胞の均一性が向上し、3D マイクロ心臓組織内の血管網様構造が発達しやすくなることを見出した。さらに、3D マイクロ心臓組織を Rocking 培養するときの培地量と培地交換頻度の検討において、より血管網様構造が発達しやすい条件を見出した（図 1）。

(2) 代謝スイッチによる成熟化培養条件の特定

本研究により、2次元培養と比較し、3D マイクロ心臓組織になることで、脂肪酸の取り込み効率が低下することが明らかとなった。そこで脂肪酸取り込みにかかわる因子である CD36 の発現効率に着目し、その発現量を向上させる化合物の最適濃度を検討した。その結果、脂肪酸だけではなく、Dexamethazone, T3 hormone, PPARA agonist を複合的に添加したときに CD36 の発現効率が向上することを見出した。またその時の電気刺激に対する応答性は、成熟化心筋細胞が示す挙動に近いものへと変わっていた。このことは脂肪酸取り込みが増加することで、3D マイクロ心臓組織の成熟化が促進されたことを示唆している。一方で、一般的な成熟化マーカー遺伝子といわれている TNNT1/TNNT3 の比率や MYH6/MYH7 の比率には顕著な変化は認められなかった。人工心臓組織を成熟化させるためには、物理的刺激的の併用などさらなる因子が必要であると考えられる。

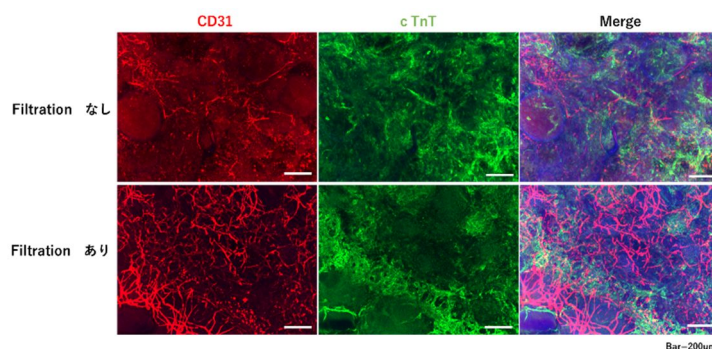


図 1 : 3D マイクロ心臓組織内の血管網様構造の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murata Kozue, Ikegawa Masaya, Minatoya Kenji, Masumoto Hidetoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Strategies for immune regulation in iPS cell-based cardiac regenerative medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-020-00145-4	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 -

1. 著者名 Abulaiti Mosha, Yalikun Yaxiaer, Murata Kozue, Sato Asako, Sami Mustafa M., Sasaki Yuko, Fujiwara Yasue, Minatoya Kenji, Shiba Yuji, Tanaka Yo, Masumoto Hidetoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Establishment of a heart-on-a-chip microdevice based on human iPS cells for the evaluation of human heart tissue function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76062-w	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田 梢, Mosha Abulaiti, 佐藤 麻子, 佐々木 裕子, 柴 祐司, 田中 陽, 升本 英利
2. 発表標題 ヒト心臓組織機能評価のためのヒトiPS細胞を用いたハートオンチップ型マイクロデバイスの開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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