

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12661

研究課題名(和文) ナノグラフェン-心筋ECM複合基質に基く心房・心室野を有する3D再生心組織の創出

研究課題名(英文) Creation of 3D atrial and ventricular fields from human iPS cells by means of nanographene-cardiac ECM scaffold

研究代表者

馮 忠剛 (Feng, Zhonggang)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：10332545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：柔軟性と弾性を有するナノグラフェン電極への機能因子の吸着を行って、動的ひずみと電気刺激を同時印加するバイオリアクタにヒトiPS細胞からサブタイプ心筋細胞への分化と成熟実験で心筋細胞の電気誘導遊走現象を確認され、心筋組織機能野の構成に寄与する重要な研究結果を得た。豚心室筋組織から抽出した心室筋細胞外基質を用いた3次元心筋組織の拍動についてその動的特性を考慮した拍動力測定方法を確立し、心房・心室の拍動特徴を検討した。また、心筋細胞クラスターの形成が3D再生心組織の拍動力における影響を分析し、心房性優位細胞クラスターにおける自発拍動の非同期現象から心房細動異所性始点を誘発する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、ヒトiPS細胞から分化した心筋細胞の臨床研究を心筋再生医療の大きな進展として注目されている。しかしながら、多種のサブタイプ心筋細胞の混在を解決するため、サブタイプ心筋細胞の“無損傷”的単離法は一つ重要な課題である。本研究は、より深層な心臓発生過程に関する「原始心臓管の自発的収縮律動とそれに伴う電気活動がサブタイプ心筋細胞の分化・成熟および定方向的な遊走にどのような影響を及ぼすのか」の問いをin vitroで3次元組織スケールにおいて検討した。その成果によってサブタイプ心筋の単離法や心筋疾患メカニズムおよび創薬モデルに関する有力な研究方法論として、学術的・社会的に多大な波及効果を有する。

研究成果の概要(英文)： Through adsorption and release of functional factors on our flexible nano-graphene electrodes and application of dynamic strain and electrical stimulation in a bioreactor, we confirmed electrically induced migration of cardiomyocyte subtypes derived from human iPS cells while their differentiation and maturation. This contributed to the formation of atrial or ventricular myocardial tissue. A method for measuring the beating force under consideration of the dynamic characteristics of three-dimensional myocardial tissue made from porcine ventricular extracellular matrix was established, and the beating characteristics of atria and ventricles were analyzed. Furthermore, the influence of the formation of cardiomyocyte clusters on the beating force of 3-dimensional regenerated myocardial tissue was investigated, and it was suggested that the spontaneously asynchronous beating in atrial-dominant cell clusters could induce alike ectopic foci happening with atrial fibrillation.

研究分野：再生医療工学

キーワード：3D高度機能的な心筋組織の構築 サブタイプ心筋細胞 心室・心房機能野 複合基質 ナノグラフェン 機能材料 心室ECM基質

1. 研究開始当初の背景

心筋再生医療の分野はヒト iPS (hiPS) 細胞から心筋細胞への高効率的分化誘導、分化した心筋細胞の純化回収および分化心筋細胞の拍動機能の成熟促進において目覚ましい発展を遂げている。本研究申請の当初に本邦では、世界に先駆け既に2件のヒト iPS 細胞から分化した心筋細胞の臨床研究を厚生労働省が了承し、心筋再生医療の大きな進展が注目されている。

しかしながら、サブタイプの心室筋、心房筋および洞房結節細胞が混在した状態で利用されると、再生治療において不整脈を惹き起こす危険性や、疾患再現または創薬スクリーニング特異性の低下などの問題点が指摘されている。現行の遺伝子組み換えや細胞種特異レポーターへの識別子付きの方法は臨床応用の観点から不向きであるため、サブタイプ心筋細胞の“無損傷”的単離法の重要性が注目されている。心筋細胞に対しては現行の分化プロトコルによればその大半が心室筋細胞である。しかしながら、これらの分化法は均一液性誘導因子により、分化期間が長く、サブタイプ心筋細胞の遺伝子発現の正確性も課題である。心房野と心室野が同一組織モデル構造中に存在することの重要性と新規性は最新の研究報告に強調されている (Cell 2019 ; 176 : 913)。

このような状況を背景に、本研究は、より深層な心臓発生過程に関する学術的「問い」:

「心臓発生ルーピング過程において原始心臓管の自発的収縮律動とそれに伴う電気活動がサブタイプ心筋細胞の分化・成熟および定方向的な遊走にどのような影響を及ぼすのか」

に対する探求を動機に付けて研究を展開する。

2. 研究の目的

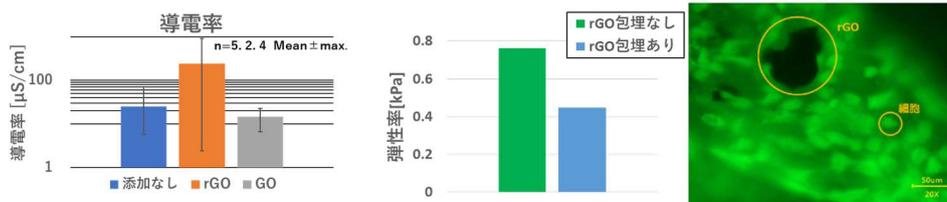
- 1) ヒト iPS 細胞を用いて体外 3 次元培養環境下において組織スケールでサブタイプ心筋細胞の分化を制御するために心室野と心房野を有する 3 次元再生心組織を創出する。
- 2) 3 次元再生心組織に基づく心筋細胞疾患に関する創薬モデルへの展開を試みる。

3. 研究の方法

- 1) ナノグラフェン-導電性ポリマー (PEDOT:PSS) -Latex 複合電極 (nGPL 複合電極) のナノグラフェンと機能因子との π - π 相互作用又はナノグラフェン部分酸化による水素結合を利用して機能因子を吸着する。
- 2) サブタイプ心筋細胞分化・遊走を検討する。具体的に、サブタイプ心筋の分化・遊走を蛍光レポーターで追跡することを実現する。
- 3) 分化した心筋細胞をプラットフォームで 3 次元培養；電気刺激およびゲル組成と力学特性の調整を行い、心室筋・心房筋細胞の分化・成熟を評価する方法の確立と応用。
- 4) 組織スケールの心房野/心室野を有する再生心組織の創出と心筋細胞疾患モデルに関する創薬実験研究の展開。

4. 研究成果

- 1) 柔軟性と弾性を有するナノグラフェン電極への機能因子の吸着・徐放；ナノグラフェン-導電性ポリマー (PEDOT:PSS) -Latex 複合電極 (nGPL 複合電極) のナノグラフェンと機能因子との π - π 相互作用又はナノグラフェン部分酸化による水素結合を利用して機能因子を吸着した。このような電極を動的ひずみと電気同時印加バイオリアクタに利用され、優れた細胞培養適合性を確認された (図 1)。更に、コラーゲンゲルの中に還元型酸化グラフェンを添加し、還元度の違いによってゲル基質の導電性を制御し、心房野組織構築の支持体を作成した (図 2)。一方、コラーゲンゲルの中にブタ



(a) 機能因子添加により導電率の変化 (b) 力学特性の変化 (c) 細胞培養適合性の検討

図 1(a-c). nGPL 複合電極の特性

心室筋組織由来細胞外基質 (vECM) を添加し、心室野組織構築の支持体と利用した (図 3)。また、ヒト iPS 細胞を心筋細胞に分化させる度に機能因子として多価不飽和脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) 及びアラキドン酸 (AA) を培養系に添加し、分化心筋細胞クラスター形成の誘発や心室筋細胞と心房筋細胞特異遺伝子発現定量比 (MLC2a/MLC2v) により心室筋にシフトする傾向を確認した (図 4)。

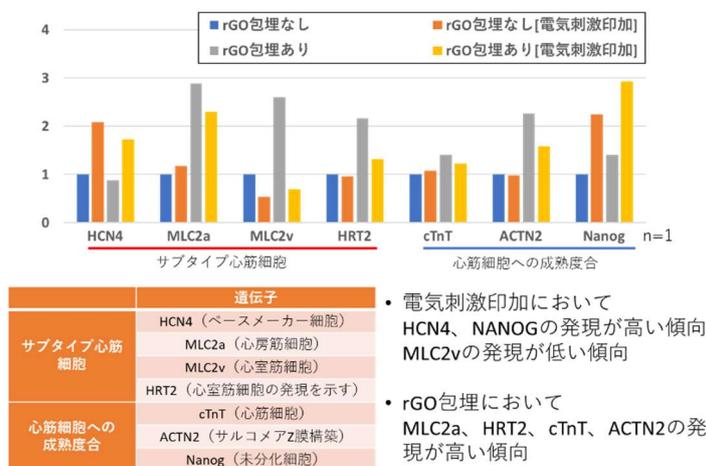


図 2. rGO の添加によりヒト iPS 細胞のサブタイプ心筋細胞分化への影響

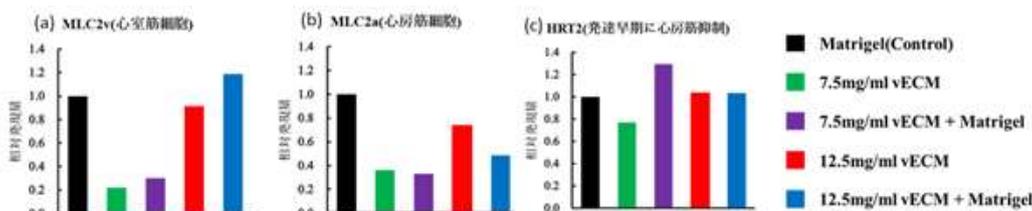


図 3. ブタ心室筋組織由来細胞外基質 (vECM) の添加により心室筋細胞分化への影響

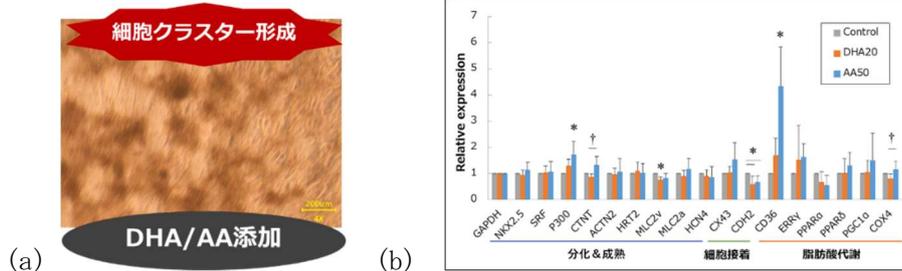


図 4. 脂肪酸添加により (a) 分化した心筋細胞のクラスター形成と (b) 分化心筋細胞の発現に及ぼす影響

2) ヒト iPS 細胞から誘導分化した心筋細胞を 3 次元的に筋組織を構築・培養し、培養組織の拍動についてその動的特性を考慮した拍動力測定方法を確認し、拍動特徴から分化心筋細胞サブタイプへの促進と成熟の検討手法として利用された。具体的に、測定梁を片持ち梁と考え、運動方程式やモーメントのつり

合いから拍動変位測定によって得られた変位データを用いて、時間ごとの収縮力波形を導出することに成功した (図 5)。この動的な分析の結果は分化心筋細胞の拍動機能の未成熟と心室細胞外基質の心室筋細胞分化促進に対する有用性を示唆した (図 6)。

拍動力 $B(t)$

$$= B_0 + \sum_j \frac{1}{EI} \{ PC_1 k^3 (\sinh k l - \sinh k l) + PC_2 k^3 (-\cosh k l + \cos k l) \} * \cos(\omega_j t + \varphi_j)$$

※ $\frac{S_0}{2} = \frac{B_0 l^3}{3EI}$ より $B_0 = \frac{3EIS_0}{2l^3}$

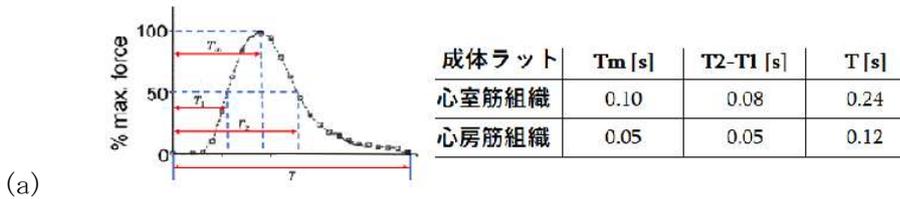
↑ $x = l$ に B_0 の集中荷重を与えたときのたわみ量

E = 片持ち梁のヤング率
 I = 断面 2 次モーメント
 l = 片持ち梁の長さ
 $k = \sqrt[4]{\frac{\rho A \omega^2}{EI}}$ ρ = 片持ち梁の密度
 PC_1, PC_2 は境界条件と S_j から求められる

測定データ $y(l, t)$ をフーリエ変換することで振幅 S_j と位相 φ_j が求められることから $y(l, t)$ は以下のように表せる

$$y(l, t) = \frac{S_0}{2} + \sum_j S_j * \cos(\omega_j t + \varphi_j)$$

図 5. 拍動動的特徴の解析方法



vECM の効果：培養基質中に vECM の含有は拍動力の増強と心室筋拍動特徴へのシフトを示唆

	F_{max} [μ N]	T2-T1	Tm
Control	0.76 ± 0.24	(0.37 ± 0.12)T	(0.32 ± 0.10)T
Gel1	2.05 ± 0.02	(0.44 ± 0.00)T	(0.38 ± 0.03)T
Gel2	1.82 ± 0.02	(0.46 ± 0.03)T	(0.30 ± 0.01)T

Control Collagen 1.5 [mg/ml] ひずみ 10%; mean ± SE, n=3
 Gel1 Collagen 1.5 [mg/ml] + vECM 0.56 [mg/ml]
 Gel2 Collagen 1.5 [mg/ml] + vECM 1.11 [mg/ml]

(b)

図 6. (a) 成体ラットの心室・心房拍動の動的特徴 (b) 再生心筋組織構築に支持体への vECM の添加により拍動動的特徴に及ぼす影響

また、有限要素分析法を用いて心筋細胞凝集体の形成が再生心組織の拍動力における影響を分析した (図 7 と図 8)。その結果、分化心筋細胞のクラスター化やスフェロイド形成は組織構造の拍動力を弱めることが分かった。

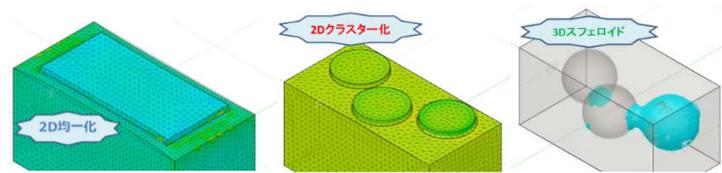


図 7. 構築した心筋再生組織のモデル化と有限要素分析

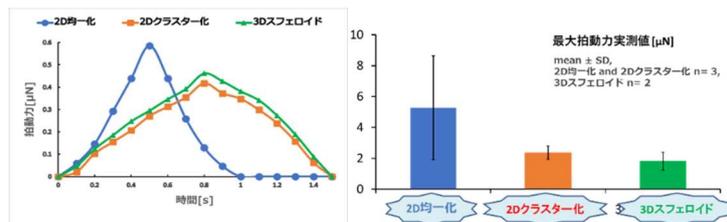


図 8. 構築した再生心筋組織における分化した心筋細胞群の形態が拍動力に及ぼす影響、(a) 有限要素法解析した結果、(b) 実測値

更に、上記ゲルの機械的強度を調整するためゲニピン架橋を利用または機械的にゲルを圧縮した。力学特性について再生組織の粘弾性特性の影響を注目し、応力弛緩を有するゲルのうち、中程度の弾性率 (25.0–60.0 [kPa]) を有するゲル上で細胞の生着と細胞体の伸展を促進することが確認できた。

3) 動的ひずみと電気刺激を印加できるバイオリアクタを用いてヒト iPS 細胞由来心筋細胞の培養を行い、ヒト iPS 細胞のサブタイプ心筋細胞への分化と成熟にどのように影響するかを検討した。まず、nGPL 複合電極を利用した場合に、高い刺激頻度で (6 Hz) 再生組織の拍動力は約 6 倍まで高くなり、vECM の添加も拍動力を約 1.8 倍に高くした。次に、アース電極付近に心房筋 (cTnT+, MLC2v-) 優位に細胞遊走、刺激 (+) 電極側付近に心室筋 (MLC2v+) 優位に細胞の遊走を蛍光染色で観察された (図 10)。

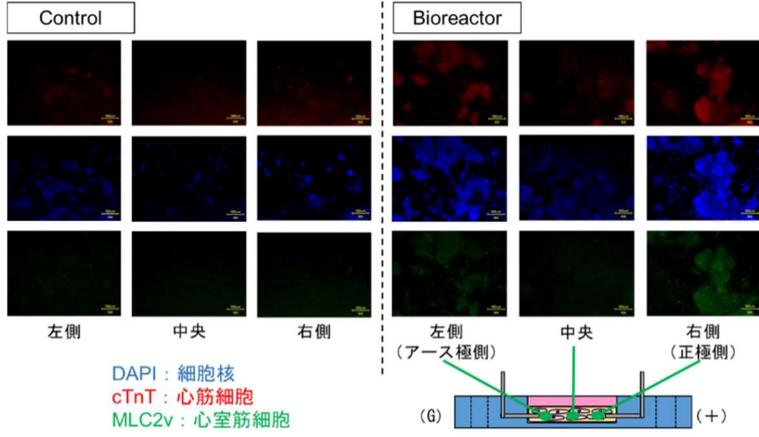


図 10. nGPL 複合電極により電気刺激を印加する時のサブタイプ心筋の遊走

特に柔軟性と弾性を有するナノグラフェン電極を用いることで分化心筋細胞の電気誘導遊走現象を確認され、サブタイプ心筋細胞による心筋組織機能野の構成に対する重要な研究結果となった。また、心筋細胞クラスターの形成が 3D 再生心組織の拍動力における影響を分析し、心房性優位細胞クラスター (図 11) における自発拍動の非同期現象から心房細動異所性始点を誘発する可能性を示唆した (図 12)。

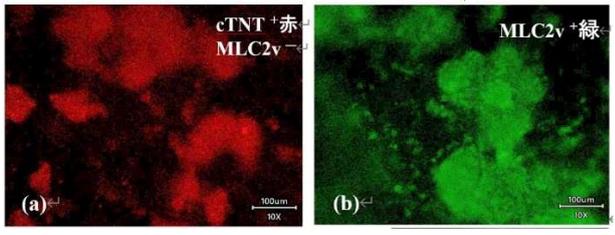


図 11. (a) アース電極付近に心房筋 (cTnT+, MLC2v-) 優位に細胞遊走、(b) 刺激 (+) 電極側付近に心室筋 (MLC2v+) 優位に細胞遊走

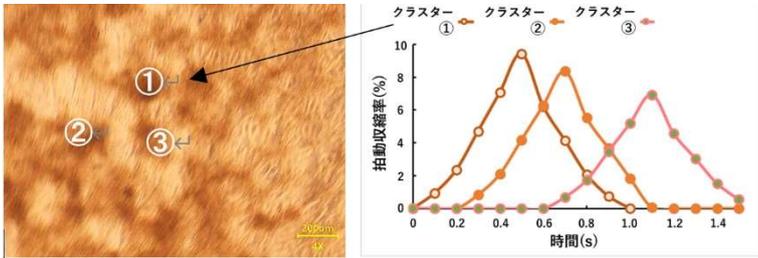


図 12. 心房筋優位細胞クラスターにおける自発拍動の非同期現象、心房細動異所性始点を誘発する可能性を示す

以上の研究成果により当初設定した研究目標は概ねに達成した。しかしながら、創薬スクリーニングへの応用展開については、コロナの影響により、試薬生産・輸送の遅れが生じたことや試薬価額の高騰により研究費不足になったなどの原因で、実施しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 MIZUNA YANO; KOTA HIROI; TETSUYA YUASA; KENJI INOUE; OSAMU YAMAMOTO; TAKAO NAKAMURA; DAISUKE SATO; ZHONGGANG FENG	4. 巻 47
2. 論文標題 Effects of docosahexaenoic acid or arachidonic acid supplementation on the behavior of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BIOCELL	6. 最初と最後の頁 1095-1106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32604/bioCELL.2023.028186	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 Feng Zhonggang, Fujita Kyohei, Yano Mizuna, Kosawada Tadashi, Sato Daisuke, Nakamura Takao, Umezu Mitsuo	4. 巻 126
2. 論文標題 Physically-based structural modeling of a typical regenerative tissue analog bridges material macroscale continuum and cellular microscale discreteness and elucidates the hierarchical characteristics of cell-matrix interaction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 1~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmbbm.2021.104956	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 -

1. 著者名 YANO MIZUNA, UMEHARA YUTA, KUDO TOMOKAZU, NAKAMURA TAKAO, KOSAWADA TADASHI, NISHINA ATSUYOSHI, SAZUKA MASAKI, SATO DAISUKE, FENG ZHONGGANG	4. 巻 45
2. 論文標題 Effects of docosahexaenoic acid or arachidonic acid supplementation on gene expression and contractile force of rat cardiomyocytes in primary culture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIOCELL	6. 最初と最後の頁 1213~1229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32604/bioCELL.2021.016281	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高橋花奈、斎藤諒太、澤田幸太、佐藤大介、小沢田正、馮忠剛
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞を包埋したバイオハイドロゲルの拍動ダイナミクスによる分化心筋細胞の評価
3. 学会等名 第62回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 廣井洸太、矢野瑞菜、中村孝夫、佐藤大介、馮忠剛
2. 発表標題 多価不飽和脂肪酸の培地内添加によるクラスター形成がヒトiPS細胞由来心筋細胞の拍動に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 馮忠剛、廣井洸太、高橋花奈、澤田幸太、安藤伊織、佐藤大介
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞による再生心筋組織モデルの拍動ダイナミクス
3. 学会等名 第61回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤田 幸太、高橋 花奈、廣井 洸太、矢野 瑞菜、佐藤 大介、馮 忠剛
2. 発表標題 多価不飽和脂肪酸の培地内添加がヒト iPS 細胞から 分化した心筋細胞の拍動に及ぼす影響
3. 学会等名 第 57 回 日本生体医工学会東北支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zhonggang Feng, Takumi Takahashi, Nobutaka Ono, Azusa Sumi, Daisuke Sato, Tadashi Kosawada
2. 発表標題 The effects of composition, elasticity, and viscoelasticity of culture substrates on cellular behavior of fibroblasts or cardiomyocytes derived from human iPS cells
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics, Taipei (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mizuna YANO, Ryota SAITO, Ryota KATO, Kota HIROI, Kana TAKAHASHI, Takao NAKAMURA, Tadashi KOSAWADA, Masaki SAZUKA, Daisuke SATO, Zhonggang FENG
2. 発表標題 Beating behavior of cardiomyocytes cultured with supplementation of docosahexaenoic acid or arachidonic acid
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics, Taipei (国際学会)
4. 発表年 2022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	小沢田 正 (Kosawada Tadashi) (10143083)	山形大学・大学院理工学研究科・客員教授 (11501)	
研究分担者	佐藤 大介 (Sato Daisuke) (60536960)	山形大学・大学院理工学研究科・助教 (11501)	

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