

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16494

研究課題名（和文）力学的及び電気生理学的に成熟型となる心筋組織のin vitro培養法の確立

研究課題名（英文）Establishment of an in vitro culture method for mechanically and electrophysiologically mature myocardial tissue

研究代表者

笹井 雅夫（Sasai, Masao）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師（常勤）

研究者番号：70598680

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：iPS細胞由来心筋細胞（cTnT陽性細胞率64.2%～91.2%）を用いて、電気的な刺激により成熟を促す方法（TW培養）と、Shear stressを与え、物理的な刺激により成熟を促す方法（RWV培養）を組み合わせた。培養基材にはポリ乳酸コグリコール酸のナノファイバーを用いた。拍動の解析で、TW培養では拍動回数が増加、収縮が減少傾向にあることが見出せた。培養上清を用いたELISAでは、特定の因子の変動が確認された。網羅的RNA解析により、心筋成熟関連遺伝子の変動が確認された。細胞代謝物プロファイル解析により、RWV培養でTCA回路関連産物の増加が見られ、ミトコンドリア活性向上が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存治療法で有効でない病状に対して、再生医療が注目されている。大阪大学では、虚血性心筋症や拡張型心筋症患者に対して、iPS細胞由来心筋細胞を用いた臨床試験を実施している。現在のiPS心筋細胞は、未成熟な段階の心筋細胞であり、移植によりレシピエント心臓に対して力学的な補強を発揮することは困難と言われている。また、薬剤スクリーニングでも、未成熟な心筋細胞で評価されているが、より電気生理学的に成熟した心筋細胞を用いることが望ましいと言われている。そのためより力学的及び電気生理学的に成熟した心筋組織を必要としており、本研究での培養法開発がその成熟心筋細胞を得る一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using iPS cell-derived cardiomyocytes (cTnT-positive cell rate 64.2%-91.2%), a culture method was developed that combines a method of stimulating maturation by electrical stimulation and a method of stimulating maturation by physical stimulation by applying shear stress. Poly(lactide-co-glycolide) nanofibers were used as the culture substrate. Analysis of beats revealed that in TW culture, the number of beats increased and contractions tended to decrease. ELISA using culture supernatants confirmed changes in several specific factors. Comprehensive RNA analysis confirmed variations in genes related to myocardial maturation. Cellular metabolite profile analysis showed an increase in TCA cycle-related products in RWV culture, suggesting improved mitochondrial activity.

研究分野：心臓、再生医療、規制科学

キーワード：心筋成熟化 回転浮遊培養 培養法開発

### 1. 研究開始当初の背景

既存の治療法では有効でない病状に対して、細胞加工物を用いた再生医療が注目されている。大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科学講座においては、「ハートシート®」の開発経験を活かし、虚血性心疾患患者に対して、iPS 細胞由来心筋細胞を用いた医師主導治療を実施している。現在使用している iPS 細胞由来心筋細胞は、ヒトでいう未成熟な段階の細胞であり、動物へ移植後に成熟型（明確なサルコメア構造が観察される等）となることは観察されている [1] (図 1) が、in vitro 培養においてヒト心筋細胞を成熟化させる培養法はいまだ確立されていない [2]。当科では、RWV により培養液の流れと重力を均衡させ、培養液の流れによって shear stress (力学的作用) を与えて培養することで、心筋組織が成熟型となり得る可能性を見出した (図 2)。この shear stress を与えて培養した心筋組織は、shear stress を与えていない心筋組織 (Control) に加え、成熟型で発現が高いと言われる MYH7 が多く確認され、また、イオンチャネルの遺伝子発現が多く、Gap junction の構築に必要な Connexin43 (Cx43) の発現も多く認められた。

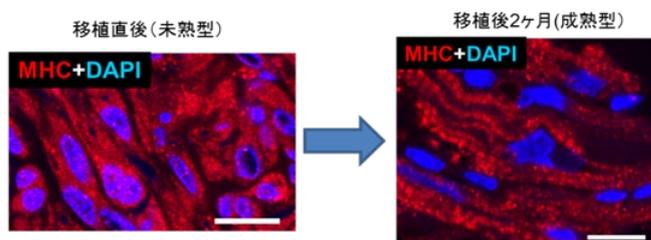


図 1 移植心筋細胞の成熟性の変化

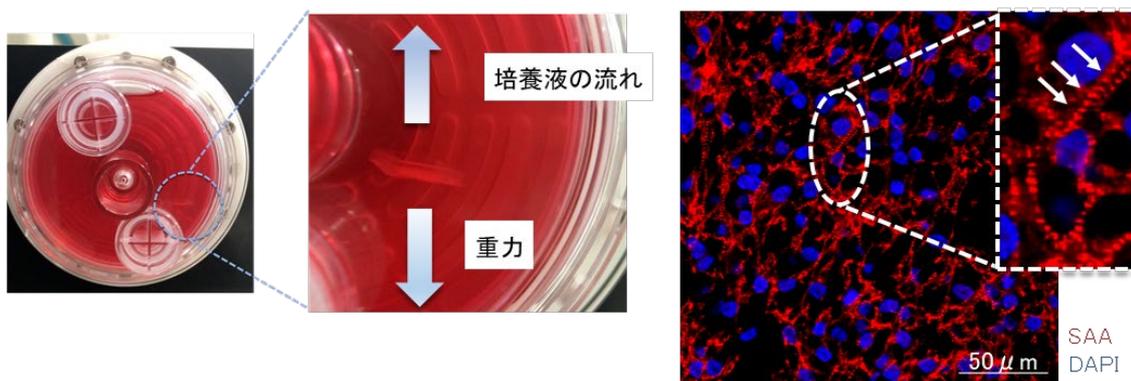


図 2 回転浮遊培養と心筋細胞の成熟型を示唆する組織画像 (明確なサルコメア構造)

また、円柱回りに播種した心筋細胞が、円柱周囲にリング状の組織体を自発的に形成することが知られており、リング状の組織体が連続的に電気的な刺激を伝達する Traveling wave という現象を引き起こすことが見出されている。この Traveling wave による連続的に生じる電気的な刺激が心筋組織の成熟化を促進すると言われている [3]。

### 2. 研究の目的

本研究は、回転浮遊培養と Traveling wave を組み合わせ、より力学的及び電気生理学的な成熟型を表現する心筋組織の培養方法の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、約 10 mm 角に成形されたナノファイバーシートの中央に円柱を取付け、そこに、iPS 細胞由来心筋細胞を播種し、一定期間 (7 日間程度) 静置培養によってナノファイバーに心筋細胞を接着させた。その後、回転浮遊培養を開始した。一定期間 (7 日間程度) 培養後、心筋組織を取り出して、心筋組織の成熟化が促進されているかを評価するため各種解析を実施した。

### 4. 研究成果

本研究は 2 つの培養法を複合させる条件検討に取り組んだ。1 つは心筋細胞が環状となる培養により Traveling wave を引き起こし、電気的な刺激により成熟を促す方法 (TW) と、回転浮遊培養による Shear stress を与え、物理的な刺激により成熟を促す方法 (RWV 培養) である。両者を組み合わせて成熟をより促すことができるかを検討した。なお、コントロールとして、心筋細胞が環状とならない培養基材 (円柱を設置していないナノファイバー培養

基材)を用いた培養も同時に並行させた (Ctrl)。検討条件として、Traveling wave を引き起こす培養及び培養期間を検討した。なお、回転浮遊培養は Shear stress により、培養基材から剥がれるため、一定期間の静置培養を必要とする。そのため、まずは Traveling wave による培養を行った上で、回転浮遊培養系に移行することとした。

培養基材にはポリ乳酸コグリコール酸 (poly (lactic-co-glycolic acid) : PLGA) のナノファイバー (NF) を用いた。PLGA ナノファイバー上に、iPSC 由来心筋細胞 (cTnT 陽性細胞率として 64.2%~91.2%) を播種し、3、5、7 日後に Cell Motion Analyzer (SI8000、SONY) による拍動の解析 (拍動回数、収縮の程度) を行った。7 日後に回転浮遊培養系へ移行し、7 日間の RWV 培養を行った。培養細胞を取り出し、培養上清を用いた ELISA、形態観察 (免疫染色)、電子顕微鏡観察、網羅的 RNA 解析、細胞代謝物プロファイリングによる心筋成熟度の評価を行った。

### (1) Cell motion analyzer による拍動解析

TW は NF 上に播種したのち、2~3 日以内に生じ (図 3)、培養 7 日目ではほとんど観察されなかった。NF 上に播種後 3 日目では、Ctrl と比較して、TW を引き起こすことで拍動回数 (Beating rate) が増加し、収縮速度 (Contraction velocity) が減少する傾向が見られた (図 4)。引き続き行った RWV では、培養基材である NF から細胞が剥離されることが多く、RWV 後に NF 上に生着した細胞の拍動回数は低下し、収縮速度は増加する傾向が示唆された。

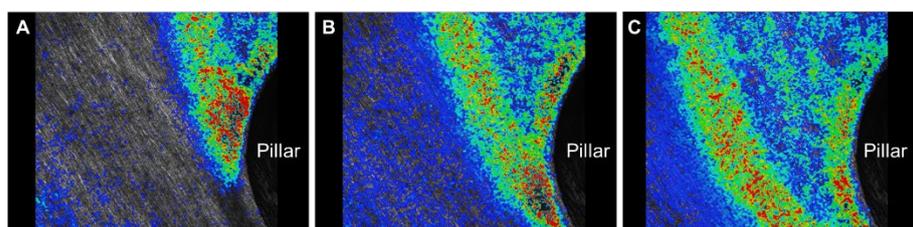


図 3 Traveling wave

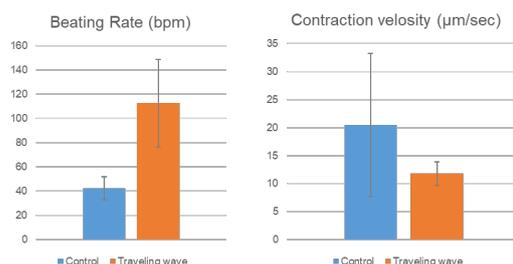


図 4 Motion analyzer による拍動解析

### (2) ELISA による培養上清解析

iPSC 心筋細胞を NF 上に播種し、培養 3、5、7 日目の培養上清を回収し、ELISA 測定を行った (Bio-Plex 48-Plex パネル)。その結果、多くの因子は共通して同程度産生されていたものの、経時的に TW で増加する因子 (HGF、MIP-1 $\alpha$ 、SCGF- $\beta$ )、減少する因子 (IL-6、IL-15、LIF、SDF-1 $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、VEGF、TGF- $\beta$ ) が見られた (図 5、図 6)。

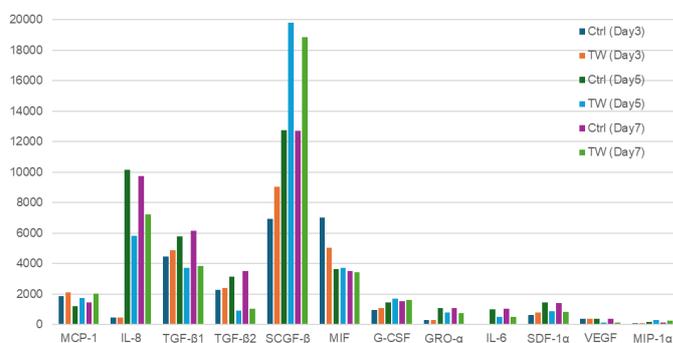


図 5 ELISA によるサイトカイン測定 1 (pg/mL)

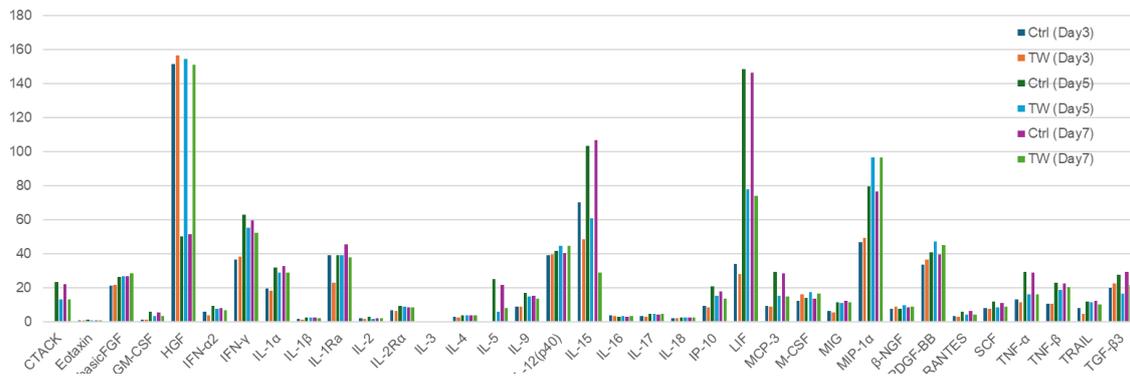


図 6 ELISA によるサイトカイン測定 2 (pg/mL)

(3) 免疫学的染色評価

静置培養 (Ctrl) を継続させた細胞 (図 7 A)、TW を引き起こした細胞 (図 7 B)、静置培養後に RWV 培養に移行した細胞 (図 7 C)、TW を引き起こした細胞を RWV 培養に移行した細胞 (図 7 D) を、ナノファイバーごと凍結切片としてサンプルを作製した。それぞれトロポニン T (緑)、アクチニン (赤)、核 (青) で染色した。すべての培養細胞でアクチニンの染色によるサルコメア構造を確認できた (図 7、White arrow)。Scale bar = 50 μm

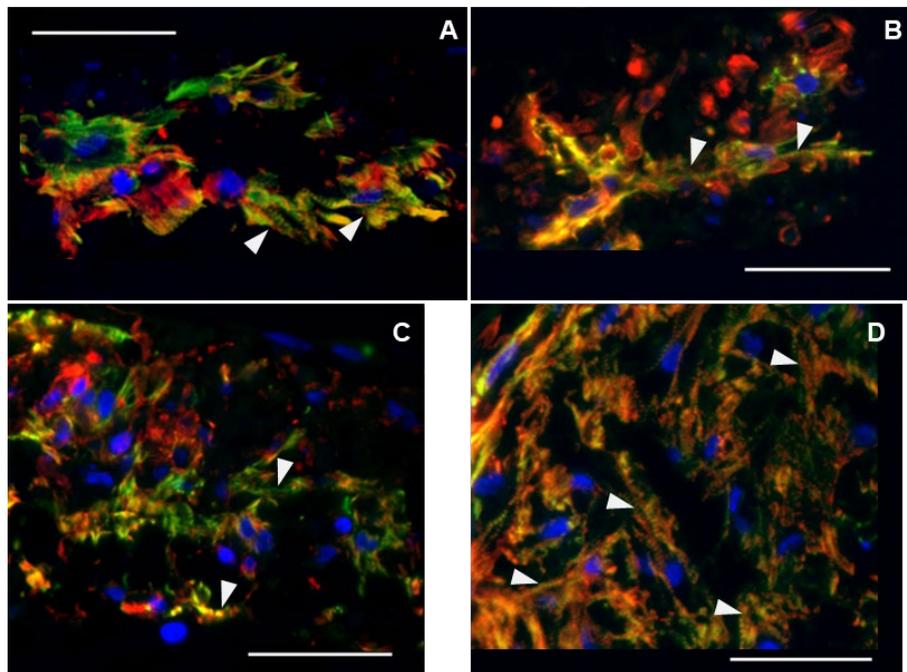


図 7 免疫学的染色画像

(4) 電子顕微鏡による解析

TW の有無及び RWV 培養の組み合わせによる培養後の細胞を用いて電子顕微鏡観察用試料を作製し、透過型電子顕微鏡 (HT7800、HITACHI) による細胞内部の解析を行った。その結果、TW を引き起こした細胞を引続き RWV 培養を行った細胞において、心筋における Z 帯 (図 8 中 Z)、I 帯 (図 8 中 I) が観察された。Scale bar = 2 μm

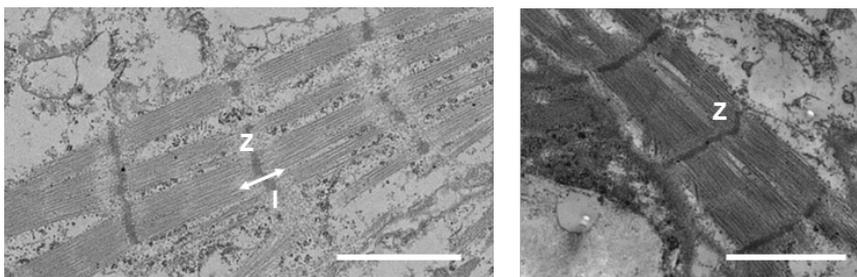


図 8 電子顕微鏡画像

### (5) mRNA 発現解析

TWの有無及びRWV培養の組み合わせによる培養後の細胞からそれぞれRNAを抽出し、網羅的なRNA解析(NovaSeq600 100bp paired end run 40M reads)を実施した。心筋成熟に関連すると報告されているMYH7、TNNI3、LMNA、ギャップジャンクションに関連するGJA1、イオンチャンネルに関連するKCNJ2、SCN5Aは培養前の心筋細胞をベースとして発現が向上し、幼若心筋に発現が多いとされるTNNI1やMYH2は、発現が減少した(図9)。また、TWやRWV培養によって、発現の変動を解析した結果、MYH7、SCN5Aの発現はTW及びRWV培養の組み合わせが発現を向上させた。GJA1はRWV培養のみで最も発現を高くするため、ギャップジャンクションの形成は力学的な作用が優位である可能性が示唆された(図10)。

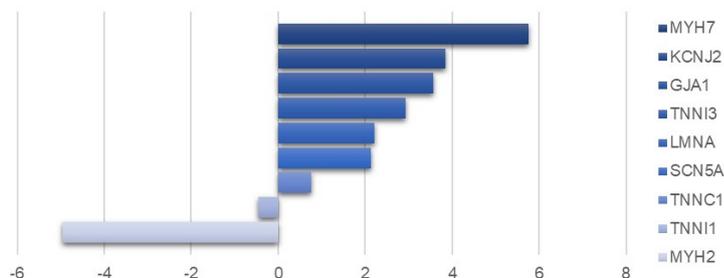


図9 網羅的RNA解析による主なRNA発現変動(log)

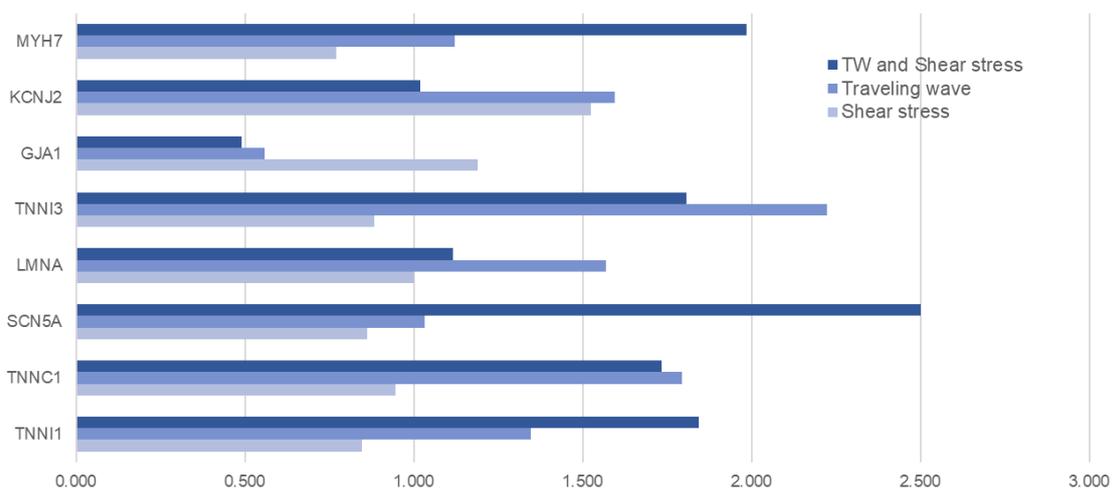


図10 培養法の違いによるRNA発現変動

### (6) 細胞培養プロファイリング解析

培養前の心筋細胞、NF上に培養した心筋細胞、RWV培養後の細胞を検体として、細胞代謝物プロファイリング解析を実施した。その結果、RWV培養によってShear Stressを加えることで細胞内及び培養上清ともにTCA回路に関連する因子(クエン酸、イソクエン酸、リンゴ酸、コハク酸)が多く検出されたことから、主にミトコンドリア機能の亢進と考えられる変化が示唆された(図11)。

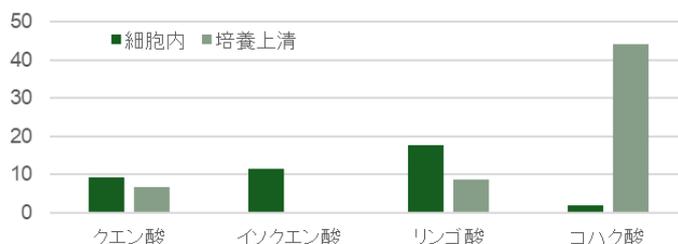


図11 TCA回路関連代謝物

<引用文献>

- [1] M. Kawamura, et al. Circulation.126, 2012
- [2] E. Karbassi et al. Nature reviews cardiology. 17, 341-359, 2020
- [3] Junjun Li et al. Commun Biol. 2020; 3: 122.

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

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