

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分
平成29年3月17日現在

メカノメディシン：メカノ医工学を駆使した再生医療・生殖医療への展開
Mechanomedicine: Application of mechanobiological engineering to
regenerative and reproductive medicine

課題番号：26220203

成瀬 恵治 (Naruse Keiji)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授



研究の概要

我々の体は力学的な刺激に適切に応答することで正常な機能を維持している。メカノバイオロジーの知見を応用することにより、これまでの医療に革新的な技術を提供することが可能となる。本研究は少子高齢化対策の一助として、心臓再生医療および生殖医療分野に対し臨床応用可能な新技術を開発する。

研究分野：複合領域

キーワード：生体情報・計測、メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

我々の体は様々な力学的・機械的刺激（メカニカルストレス）を受容し、応答することで正常な生理機能を維持し、またその破綻により病的状態におちいる。各種疾患においてその成因解明・治療にメカニカルストレスを考慮に入れたメカノメディシンが重要である。

2. 研究の目的

これまでに申請代表者が培ってきた分子・細胞・組織・個体レベルでのメカノバイオロジー理論に基づき、少子高齢化対策の一助としてメカノ心臓再生医療とメカノ生殖医療のトランスレーショナルリサーチを展開し、医療現場でのニーズをフィードバックし臨床利用可能な革新的次世代メカノ医療技術を開発する。

3. 研究の方法

I. メカノ心臓再生医療

心筋および血管前駆細胞に対しストレッチとシェアストレスを負荷し自己組織化によるvascularized心筋ブロックを作成する。慢性心筋梗塞モデル動物への前臨床試験を行うとともに、ストレッチ心筋幹細胞を適切に分化させるための条件探索及び慢性心不全モデル動物への経冠動脈注入を行う。

1. ストレッチ・シェアストレス負荷vascularized心筋ブロックの作成

・心筋ブロック作成法の確立と解析、血管前駆細胞に対するストレッチ・シェアストレス刺激条件の探索、血管前駆細胞+心筋ブロッ

クに対するストレッチ・シェアストレス刺激システムの開発

2. ストレッチ心筋幹細胞およびその経冠動脈注入法の確立

・心臓内幹細胞2次元ストレッチシステムの開発、ストレッチの最適条件探索、経冠動脈ストレッチ刺激負荷心臓内幹細胞懸濁液注入法の確立、産業化に向けた専用チャンバー(2D用)の量産化技術の確立

II. メカノ生殖補助医療

卵管内メカニカルストレスを模した人工卵管システムを創生し前臨床試験を行うと同時に受精卵のメカノトランスダクションの分子基盤を解析する。

1. 卵管内メカニカルストレスを模した人工卵管システムの開発、2. 人工卵管システムのヒト生殖補助医療への適用、3. ヒト受精卵の機械受容チャネルや機械刺激応答分子レベル評価、4. 人工卵管システムを用いた数日間体外培養とその応答に関する評価、5. メカニカルストレス負荷培養時における遺伝子発現解析

4. これまでの成果

I. メカノ心臓再生医療

2次元および3次元の培養系において、iPS細胞から自律的に収縮する心筋組織を作成した。また心筋細胞への分化誘導に際し、iPS細胞単独ではなく他種細胞との共培養により心筋細胞の収縮力が増強することを見出した。さらに2次元・3次元の培養系で周期的な伸展を付加しつつ培養する実験系を確立した他、伸展刺激と剪断応力を同時に付加

する 3次元の培養装置を開発した。

iPS 心筋組織の移植に際し心部位ごとの収縮特性を明らかにするため、マウス単離心筋を用いた実験を行った。その結果、最大収縮到達時間 (Tmax) は前負荷が低い状態では心内膜側の細胞の方が長く、そこから前負荷を増加させていくと心内膜側も心外膜側も Tmax が増加した。しかしその増加程度は心外膜側の方が大きく、全体として心室内外膜両側の不均一性を減少させることがわかった。

心臓内幹細胞を冠動脈内注入する研究においては、2015年に世界に先駆けて小児心不全に対し自家移植療法を実施し、合計 48 症例における安全性及び治療有効性について報告した。さらに、心臓内幹細胞に対する低酸素刺激による細胞機能の向上を *in vitro* ならびに *in vivo* において確認した。

一方で機械的幹細胞の伸展による刺激は、幹細胞より直接遊離するエクソソームが様々なパラクリン因子や micro RNA を分泌することで、*in vivo* での治療効果を向上させていることが明らかとなった。この新たな知見により、機械的伸展刺激により通常に培養している幹細胞からより多くのエクソソームの遊出を促進させ、cell-free での心筋再生医療の開発に繋げることが可能となった。

II. メカノ生殖補助医療

各培養条件における胚盤胞到達率は、1: mW-S、2: KSOM-S、3: mW-T、4: mW×2-S、で、それぞれ 62.6%、94.1%、70.8%、60.4% であり、 χ^2 検定によって、1: mW-S-2: KSOM-S 間と 2: KSOM-S-3: mW-T 間と 3: mW-T-4: IVF KSOM-S 間に有意差 ($P < 0.008$) があった。IVF 胚から培養した際 5: IVF KSOM-S の胚盤胞到達率は 73.6% であり、2: KSOM-S と比較したところ、有意差が見られた ($P < 0.001$)。1: mW-S と 2: KSOM-S における遺伝子発現結果を比較したところ、KSOM 培養環境では、TE の発育に関連する遺伝子発現の増加がみられた。また、2: KSOM-S-5: IVF KSOM-S 間で遺伝子発現を比較すると、PE 活性化と EPI 抑制がみられた。一方、3: mW-T および 4: mW×2-S では、1: mW-S と比較して、EPI の働きが活性化される可能性がある。培地の差異、MS の有無、胚培養数の違い、初期胚培養開始段階の差異により、胚発育、細胞死、環境ストレス、DNA やヒストン、細胞接合に関与する幾つかの遺伝子発現に有意差や特異的差異がみられた。興味深い傾向としては、着床前胚は培地成分や初期胚培養開始段階の差異は TE に働き掛ける作用があり、MS や Autocrine/ Paracrine 作用では EPI 活性化に影響を及ぼす可能性がある。EPI、PE、TE 関連遺伝子の発現パターンは、培地の差異、MS の有無、胚培養数の違い、初期胚培養開始段階の差異で変化したことから、異なるシグナル経路での胚発

育を促す誘導過程の存在が示唆された。将来体になる EPI の発育を体外培養で促進させるためには胚近傍の分泌物や胚移動に伴う Dynamic な培養環境が影響を与えると考えられる。

5. 今後の計画

I. メカノ心臓再生医療

iPS 心筋細胞へのストレッチ刺激負荷による 3次元培養技術を用い心筋ブロックの作製技術を確認する。目標厚み 1 mm 程度を実現するための細胞ブロックの培養条件を明らかにする。また iPS 細胞から血管内皮細胞および血管平滑筋細胞への分化誘導を行う。伸展刺激/ 剪断応力を付加することにより、分化誘導効率の向上を図る。

大型動物実験に応用展開できる large scale の細胞伸展装置を作成し、幹細胞より抽出したエクソソームを各種心不全モデル動物に対して冠動脈内注入し、手技的安全性と治療有効性に関して引き続き検討を行う。

II. メカノ生殖補助医療

網羅的遺伝子発現から得られた結果を基に、シェアストレスや物質拡散状態を定量化して動的な胚培養環境と遺伝子発現産物を測定し、体外培養胚の品質と培養環境を定量的に議論できる系の構築を試みる。胚培養を効率的に行い、使い易く、胚発育を促進できるようなメカニカルストレス負荷装置の開発も検討する。

それらの結果に基づいて、効果的なメカニカルストレス負荷培養装置および胚品質に関係するマーカーとその評価手法を提案することを最終の目標とする。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. The neutral self-assembling peptide hydrogel SPG-178 as a topical hemostatic agent. Komatsu S, Nagai Y, Naruse K, Kimata Y. PLoS One 9(7): e102778 (2014)
2. Induced NCX1 overexpression attenuates pressure overload-induced pathological cardiac remodelling. Ujihara Y, Iwasaki K, Takatsu S, Hashimoto K, Naruse K, Mohri M, Katanosaka Y. Cardiovasc Res. 111(4): 348-361 (2016)
3. Oh H, Ito H and Sano S. Challenges to success in heart failure: Cardiac cell therapies in patients with heart diseases. J Cardiol. 2016; 68:361-367.
4. 細胞培養器. 成瀬恵治, 高橋 賢, 徳山英二郎, 永井祐介. 特許番号 6074860, 登録日 2017/1/20
ホームページ等
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/phy2/GASR/>