

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26220203

研究課題名(和文)メカノメディスン：メカノ医工学を駆使した再生医療・生殖医療への展開

研究課題名(英文)Mechanomedicine: Application of mechanobiological engineering to regenerative and reproductive medicine

研究代表者

成瀬 恵治 (NARUSE, Keiji)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40252233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 157,200,000円

研究成果の概要(和文)：メカノ心臓再生医療に関し、ヒトiPS細胞から自発的に収縮する心筋細胞への分化誘導を行った。この分化誘導は周期的伸展刺激により早期化し、ヒト線維芽細胞との共培養により促進された。小児拡張型心筋症に対する心臓内幹細胞の自家移植療法に関し、TICAP-DCM第1相臨床研究を3症例に対し行い、細胞移植を無事に実施した。

メカノ生殖補助医療に関し、マウス受精卵を用いてメカニカルストレスの有無による遺伝子発現の違いを網羅的に解析したところ、胚発育、細胞死、環境ストレス等に関する遺伝子発現に有意差が見られた。また従来のマウス用チャンバーに対し、ヒト受精卵に利用可能な高純度シリコン樹脂製チャンバーを完成させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト由来のiPS細胞の心筋分化誘導を、メカニカルストレス負荷により効率化したことは、これまでの動物由来成分に依存した系を凌駕し、メカノ心臓再生医療をより現実に近づけるものである。小児拡張型心筋症に対し心臓内幹細胞の自家移植療法を行うTICAP-DCM試験での移植に成功したことは、この治療法の実現に寄与した点で意義が大きい。メカニカルストレス付加による体外受精胚の遺伝子発現変化を捉えたことにより、メカノ生殖補助医療が高品質な受精卵発育を促すメカニズムの解明に近づいたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We induced differentiation of human induced pluripotent stem cells into spontaneously beating cardiomyocytes. We elucidated that the cardiac differentiation is facilitated by cyclic stretch stimulus and co-culture with human fibroblasts. It is suggested that stretch stimulus to cardiac stem cells induces release of paracrine factors, thereby increase cardiac contractility. With regard to autotransplantation of cardiac stem cells in pediatric dilated cardiomyopathy, we conducted the TICAP-DCM phase I trial and performed surgery for three patients successfully.

We also studied the effect of mechanical stimulus on gene expression of fertilized eggs in mice and found that the expression of genes related to embryo development and cell death was altered in response to mechanical stimulus. In addition, we successfully developed a high-quality silicone resin incubation chamber for human fertilized eggs. Furthermore, we found that hydrostatic pressure activates sperm activity.

研究分野：生体医工学、循環器生理学、メカノバイオロジー

キーワード：再生医療 オロロジー 生殖補助医療 機械刺激 人工多能性幹細胞(iPSC) 心臓幹細胞 体外受精胚 着床前胚 メカノバイ

1. 研究開始当初の背景

我々の体は様々な機械的刺激(メカニカルストレス)を受容し、これにตอบสนองすることで正常な生理機能を維持している。その破綻により病態が起こる。再生医療・生殖医療を行う上で、メカニカルストレスを積極的に取り入れた方法論が必要である。申請者らは血管前駆細胞においてシェアストレスは内皮細胞に、ストレッチは平滑筋細胞に分化させることを示した。しかし、ヒト幹細胞から心筋細胞への分化誘導の効率化に関し、メカニカルストレスを応用した研究は稀な状況であった。

また、現状の生殖医療技術は母胎における生理的生殖過程とはかけ離れた環境下で行なわれ、受精率・着床率・生児獲得率などの向上は限界に達している。臨床現場からはブレークスルーとなる技術が渴望されている。卵管内での生理的メカニカルストレスを模した斬新な人工卵管システムは、国内では申請者のグループが、国外では米国ミシガン大学のグループが開発しているに過ぎない状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに研究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する。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

(1) 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と、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に経冠動脈注入を行う。

(2) メカノ生殖医療：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。

4. 研究成果

(1) メカノ心臓再生医療

(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

ラット胎児心臓から単離した細胞を用いた予備実験において、厚さ約1mmの3次元心筋組織を構築した。これに伸展刺激を与えると、心筋組織の収縮力が増大することを確認した。次に2次元培養系において、ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)から自律的に拍動する心筋細胞への分化誘導に成功した。この培養系において線維芽細胞との共培養を行うとiPS細胞から心筋細胞への誘導が効率的に行われることを見出した。さらに周期的な伸展刺激を与えると、自律的な収縮の頻度が変化し、メカノストレスの刺激が無い細胞より早期に拍動を示すことが示唆された。

3次元の培養系において、iPS細胞または線維芽細胞のみでは安定的な構造が保たれなかった。これらの細胞の混合比率、培養基質の種類(マトリゲル、コラーゲン、パナセアゲル)および培地投与条件の検討を行い、共培養3次元組織の構造的安定性を最適化するパラメータを得た。培養容器の形状に関しては、細胞組織の強度を十分に保ち、線維芽細胞の配向を一定に維持するためには、特別な形状をモデルする必要があることが明らかとなった。ライブイメージングにより、3次元培養組織が自発的な細胞内カルシウム濃度変化を示すことを確認した。得られた3次元組織に心臓収縮を模擬した繰り返し伸展刺激を与えたところ、組織の強度および構成が変化することが肉眼的観察およびHE染色像により確認された。さらに3次元の基質中で培養した細胞組織に対し、伸展刺激と剪断応力を同時に負荷するチャンバーを開発し、iPS細胞および歯肉線維芽細胞の共培養を行った(図1)。

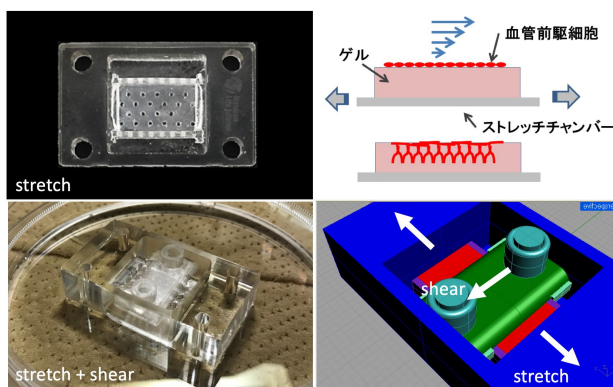


図1. 3次元シェアストレッチチャンバー

3次元培養組織に血管を導入する実験において、iPS細胞/線維芽細胞の共培養系に血管内皮細胞を加えることによりiPS細胞の心筋分化誘導が促進することが示唆されたものの、管腔構造を持つ血管の形成には至らなかった。このため、前臨床試験としての慢性心不全動物への3次元心筋組織の移植は今後の課題で準備中である。

(1)- 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

本研究成果から、機械的伸展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ライン因子や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。

心臓幹細胞の移植に関しては、平成28年度に実施承認された小児拡張型心筋症に対する第1a相臨床研究(TICAP-DCM試験)について、平成29年7月に第1症例目を登録開始した。平成29年度内には合計3例の18歳未満の適応症例に対して、心筋生検による組織採取ならびに大量培養後の冠動脈注入法による自家細胞移植を実施した(図2)。

小児拡張型心筋症に対する心臓内幹細胞の自家移植療法について、TICAP-DCM第1相臨床研究の実施計画書に沿って、平成30年度は適応基準を満たす3症例に対し登録し、細胞移植を無事プロトコル通りに実施した。伸展刺激を負荷した細胞を用いることにより、治療効果がさらに増大する可能性がある。

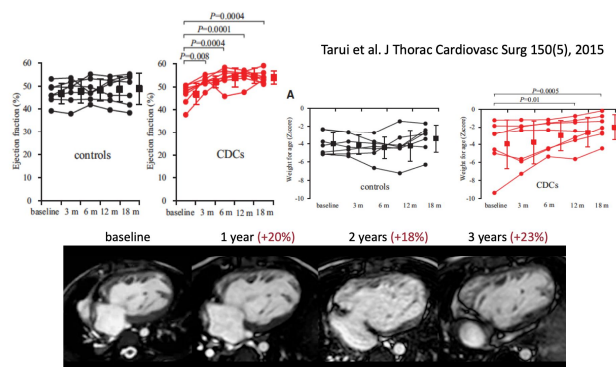


図2. TICAP-DCM試験

(1)- 培養心筋ブロックの力学機能評価

カーボンファイバーを用いた心筋細胞の力学評価を行った。亜急性の伸展刺激によって起こる緩やかな張力増加(slow force response)におけるカルシウム動態の変化を確認し、そのときの筋小胞体カルシウム容量の変化を確認した。

心筋細胞のメカニクス解析については、心筋細胞伸展に伴う細胞内カルシウム濃度の緩徐な増加は、伸展によるアンジオテンシンII受容体活性化を介してTRPC3チャネルが活性化し、ナトリウムやカルシウムが細胞内に流入することにより起こることが明らかとなった。また、伸展刺激によりミトコンドリア膜電位が過分極し、NOX2由来の伸展刺激誘発性ROS産生増加にもミトコンドリア電子伝達系が関与していることが明らかとなった。また、メカノセンサーとして報告したTRPV2が心筋の興奮-収縮連関発達に関与していることが明らかになった(Nature Communicationsリバイス最終段階)。

(2) メカノ生殖補助医療

本研究の成果により、ヒト受精卵に利用可能な高純度PDMS製チャンバーが完成した。マウス受精卵に関しては、マウス二細胞期胚から胚盤胞まで体外で培養する際に、静置培養で培地成分の違いやメカニカルストレス(MS)の有無による遺伝子発現の違いを網羅的に解析した。培地の差異とMSの有無により、胚発育、細胞死、環境ストレスに関与する幾つかの遺伝子発現に有意差がみられた。

非生理的な環境が初期胚発育に及ぼす様々な影響を検討するため、マウス2細胞期胚から分化が生じる胚盤胞まで体外培養した場合と、その体外受精胚を胚盤胞まで培養した場合において、遺伝子発現網羅的解析を行った。培地の差異、メカノストレスの有無、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栄養外胚葉に働き掛ける作用があり、メカノストレスやAutocrine/Paracrine作用では胚盤葉上層活性化に影響を及ぼす可能性がある。メカニカルストレス付加による体外受精胚の遺伝子発現変化を捉えたことにより、メカノ生殖補助医療が高品質な受精卵発育を促すメカニズムの解明に近づいたと考えられる。また当初計画には含まれていなかったが、メカニカルストレスとしてストレッチおよびシアー刺激に加え、静水圧付加に関する知見も得られた。ヒト精子に高静水圧処理を行なったところ、精子の活性化が見られた。本研究の推進により、生殖補助医療のさらなる発展が期待される。

〔雑誌論文〕(計 34 件)

Takahashi K, Hayashi S, Miyajima M, Omori M, Wang J, Kaihara K, Morimatsu M, Wang C, Chen J, Iribe G, Naruse K, Sokabe M. L-type calcium channel modulates mechanosensitivity of the cardiomyocyte cell line H9c2. *Cell Calcium* (査読有) 79. 2019, 68-74. Doi: 10.1016/j.ceca.2019.02.008

Matsuda Y, Takahashi K, Kamioka H, Naruse K. Human gingival fibroblast feeder cells promote maturation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* (査読有) 503. 2018, 1798-1804. Doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.116

Naruse K. Mechanomedicine. *Biophysical Reviews* (査読有) 10. 2018, 1257-1262. Doi: 10.1007/s12551-018-0459-7

Naruse K. Mechanomedicine: applications of mechanobiology to medical sciences and next-generation medical technologies. *J Smooth Muscle Res* (査読有) 54. 2018, 83-90. Doi: 10.1540/jsmr.54.83

Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, Ousaka D, Eitoku T, Kondo M, Okuyama M, Kobayashi J, Baba K, Arai S, Kawabata T, Yoshizumi K, Tateishi A, Kuroko Y, Iwasaki T, Sato S, Kasahara S, Sano S, Oh H. Intracoronary Autologous Cardiac Progenitor Cell Transfer in Patients with Hypoplastic Left Heart Syndrome: The TICAP Prospective Phase 1 Controlled Trial. *Circ Res* (査読有) 116. 2015, 653-664. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304671

Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Nagai Y, Kasahara S, Naruse K, Ito H, Sano S, Oh H. Directed differentiation of patient-specific induced pluripotent stem cells identifies the transcriptional repression and epigenetic modification of NKX2-5, HAND1, and NOTCH1 in hypoplastic left heart syndrome. *PLoS One* (査読有) 9(7) 2014, e102796. Doi: 10.1371/journal.pone.0102796

〔学会発表〕(計 120 件)

Naruse K. Mechanomedicine. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019)(招待講演)(国際学会) 2019 年

成瀬恵治. メカノメディスン:メカノ医工学を駆使した再生医療・生殖医療への展開. 第 17 回日本再生医療学会総会 (招待講演) 2018 年

Yuka Asano, Koji Matsuura, Keiji Naruse. Gene expression patterns of in vitro cultured mouse blastocysts: Differences between in vitro-fertilized embryos and 2-cell stage collected embryos. 3 The 3rd International Symposium on Mechanobiology (国際学会) 2017 年

高橋 賢、王英正、入部玄太郎、松浦宏治、成瀬恵治. 発表タイトル メカノ医工学を駆使した再生医療・生殖医療への展開. 第 56 回日本生体医工学会大会 (シンポジウム) 2017 年

Naruse K. MECHANOMEDICINE. 2017 annual meeting of the Australian Society for Biophysics (招待講演)(国際学会) 2017 年

仁科咲織、松浦宏治、成瀬恵治. ヒト精子が螺旋運動する流路条件の検討. 第 55 回日本生体医工学会大会 2016 年

成瀬恵治. 自己集合性ペプチドゲルの医学・医療応用. 第 25 回ポリマー材料フォーラム (招待講演) 2016 年

成瀬恵治. メカノ再生医療・生殖医療. 第 39 回日本分子生物学会年会 (招待講演) 2016 年

Yamaguchi Y, Iribe G, Kaneko T, Takahashi K, Numaga-Tomita T, Nishida M, Birnbaumer L, Naruse K. TRPC3 participates in the angiotensin II type 1 receptor-dependent slow force response to stretch in mouse cardiomyocytes. 45th European Muscle Conference (国際学会) 2016 年

Naruse K. Mechanomedicine. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (招待講演) 2016年

Shuta Ishigami, Suguru Tarui, Takuya Goto, Daiki Ousaka, Michihiro Okuyama, Kenji Baba, Shingo Kasahara, Shinichi Ohtsuki, Shunji Sano, Hidemasa Oh. Transcoronary infusion of cardiac progenitor cells in hypoplastic left heart syndrome: 3-year results of the TICAP trial. European Society of Cardiology (国際学会) 2015年

Matsuda Y, Sakai N, Takahashi K., Naruse K. A search for scaffold condition suitable for inducing cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells. 37th annual international conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (国際学会) 2015年

〔図書〕(計 4件)

石神修大、大月審一、笠原真悟、佐野俊二、王英正. メディカルビュー社. Heart View:先天性心疾患に対する心筋再生医療. 2017年, 116(547-551)

石神修大、大月審一、笠原真悟、佐野俊二、王英正. 臨床医薬研究協会. 臨床医薬:体性幹細胞を用いた心臓再生医療の最前線. 2017年, 85(307-311)

Takahashi K., Piao H, Naruse K. Blackwell Publishing. Mechanobiology: Exploitation for Medical Benefit. 2017, 410(175-189)

成瀬恵治、松浦宏治、原鐵晃. 化学同人. メカノバイオロジー. 2015, 368(251-261)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 4件)

名称: Therapeutic method using cardiac tissue-derived pluripotent stem cells

発明者: Oh H

権利者: 同上

種類: 特許

番号: US 9867854 B2

取得年: 2018年

国内外の別: 外国

名称: 自己組織化ペプチドおよび高強度ペプチドゲル

発明者: 永井祐介、横井秀典、上杉晃司、成瀬恵治

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 6159359

取得年: 2017年

国内外の別: 国内

名称: 自己組織化ペプチドおよび高強度ペプチドゲル

発明者: 永井祐介、横井秀典、上杉晃司、成瀬恵治

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2757108

取得年: 2016年

国内外の別: 外国

名称: 自己組織化ペプチドおよび高強度ペプチドゲル

発明者: 永井祐介、横井秀典、上杉晃司、成瀬恵治

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 8,951,974

取得年：2015年
国内外の別：外国

〔その他〕

国際研究集会開催（計 3 件）

9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress
2019年3月28日～31日、神戸

第39回日本分子生物学会年会
2016年11月30日～2016年12月2日、横浜

The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan: Plenary Lecture
2016年3月22日～2016年3月22日、北海道

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：王 英正

ローマ字氏名：(OH, hidemasa)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：教授

研究者番号（8桁）：50372579

研究分担者氏名：高橋 賢

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, ken)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学院医歯薬学総合研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：50432258

研究分担者氏名：松浦 宏治

ローマ字氏名：(MATSUURA, koji)

所属研究機関名：岡山理科大学

部局名：工学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70443223

研究分担者氏名：入部 玄太郎

ローマ字氏名：(IRIBE, gentaro)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学院医歯薬学総合研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90284885

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。