

《様式B》

研究テーマ「多能性幹細胞の共分化誘導に基づく細胞機能最大化培養プロセスの開発」

研究責任者 所属機関名 国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学

官職又は役職 助教

氏 名 秋山裕和 Email: hirokazu.akiyama@chembio.nagoya-u.ac.jp

共同研究者 所属機関名

官職又は役職

氏 名

(令和4年度募集) 第35回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要(1,000字程度)

[目的] 本研究では、重症心不全症の心機能再生に向けて、**iPS細胞から心筋組織構成細胞群(心筋細胞・血管内皮細胞・間質細胞)**を最適構成に共分化誘導(同時分化誘導)し、**複数細胞種間相互作用に基づき心筋成熟(高機能化)**を最大化できる培養プロセスの確立を目指し研究を行なった(**Fig.1**)。

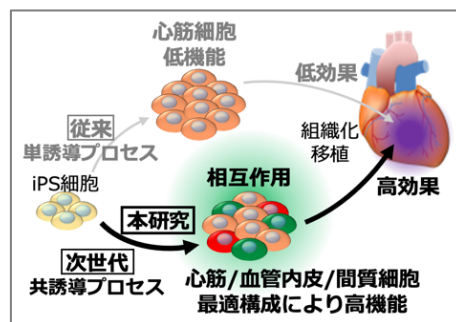


Fig.1 研究戦略

[成果] 当初の計画通り、①複数の分化誘導因子(サイトカイン・低分子化合物)濃度・組合せを変数とした共分化細胞構成予測モデルを構築し、②狙いの細胞構成に共分化誘導できる条件を見出し、プロセスを確立した。さらに、③確立した共誘導プロセスの有効性を示す実験として、従来の心筋細胞を単誘導するプロセスで得られた心筋細胞と、共分化誘導プロセスで得られた心筋細胞の遺伝子発現解析を行うことで、共分化誘導プロセスで得られた心筋細胞の方が、成熟度が向上することを確認できた。以上より、狙い通りの成果を得ることができた。

[今後予想される効果] マウス心筋梗塞モデル実験において、成熟度が高い心筋細胞を移植した方が、より有効な効果を得られることが報告されている [S.Funakoshi et al. Nat Commun. 2021]。従って、同様の実験を行った場合、共誘導プロセスで得られる心筋細胞で優位な効果が得られる可能性が高い。一見、共誘導プロセスの確立は難解であるが、モデリングを駆使することで、狙い通りの細胞構成に誘導できるプロセスの確立が可能であることを実証した。従来の単誘導プロセスに基づく iPS 細胞由来心筋細胞は、実用化に向けて臨床応用が進行中である。動物実験等による有効性・安全性評価が必要であるが、より有効な第2世代のプロセスとして実用化を目指せる可能性がある。

2. 実施内容および成果の説明（A 4 で、5 ページ以内）

本研究では、iPS 細胞から心血管系 3 細胞種（心筋・血管内皮・壁細胞）を狙いの構成に誘導できる共誘導プロセスの確立を目指し研究を行った。助成前の時点で、iPS 細胞から心血管系前駆細胞までの誘導プロセスを確立済みであったため、助成後は、心血管系前駆細胞から心血管系 3 細胞種への共誘導プロセス確立に向けた検討を行った。

これらの 3 細胞種は、共通の前駆細胞が異なる分化誘導因子の刺激を受けて誘導される。従って、3 細胞種の共誘導には複数の分化誘導因子が必要であるが、狙いの細胞構成に誘導するための各因子の濃度選定は難解である。そこで、複数の分化誘導因子の濃度と、共誘導後の各細胞種の構成をモデル化することにより、狙いの構成に誘導できる条件の同定を試みた。予備検討により、心筋細胞は、培地に添加する Wnt シグナル阻害剤の濃度を上げると誘導効率上がり、壁細胞はこの阻害剤濃度を下げると誘導効率上がる結果が得られた。一方で、血管内皮細胞は、培地に添加する血管内皮細胞増殖因子 VEGF 濃度をあげると誘導効率が向上することが分かった。そこで、2 つの因子（Wnt シグナル阻害剤と VEGF）の濃度をさまざまな水準に設定し共誘導を行なった際の 3 細胞種の構成を計測し、そのデータに基づきモデリングを行なった。これにより、因子濃度別に細胞構成を細かく予測できるようになった。

心筋細胞と非心筋細胞の共培養研究はこれまで数多く行われており、多くの研究で、心筋細胞の割合が 70-80%程度有的时候に心筋成熟が認められていること、また、壁細胞と血管内皮細胞の生体心臓における割合は、およそ 3:1 であること、の 2 つの視点から、心筋細胞を 70-80%、壁細胞と血管内皮細胞をおおよそ 3:1 に誘導できる共誘導条件で、心筋成熟が促進する可能性が高いと考え、この構成に共誘導できる条件をモデルに基づき選定した（心筋 70%と心筋 80%の 2 条件を選定）。実際にその構成に共誘導できるかを培養実験により検証したところ、予測と実験値が同様の結果となり（Fig.2）、モデリングにより、狙いの構成に誘導できる共誘導条件の選定が可能であることが確認できた。

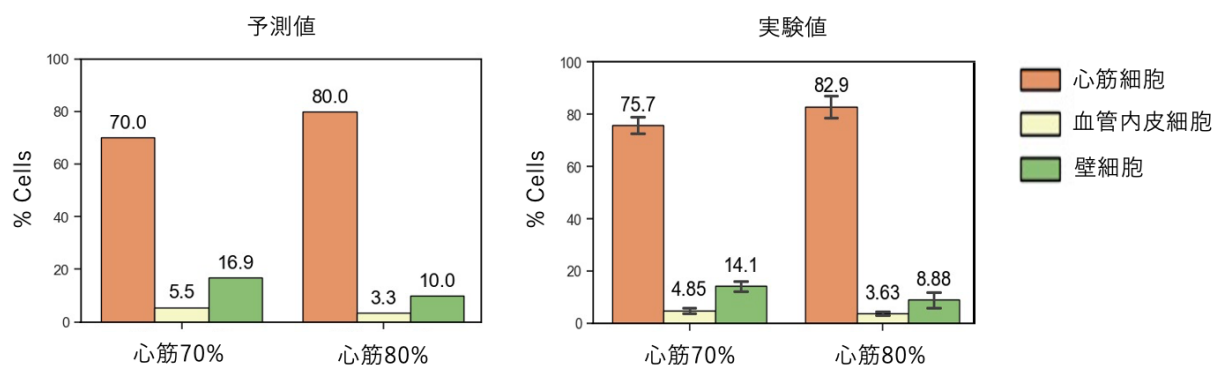


Fig.2 共誘導細胞の構成に関する予測値と実験値

上記の結果を受け、共誘導プロセスにより得られる心筋細胞の方が、従来の単誘導プロセスの心筋細胞より成熟度が向上するかを確認するために遺伝子発現解析を行なった。具体的には、心筋 70%、心筋 80%の 2 つの共誘導条件と、心筋単誘導条件、合計 3 条件について、心筋成熟指標されている TNNI3/TNNI1（心筋トロポニン）、MYL2/MYL7（ミオシン軽鎖）、MYH7/MYH6（ミオシン重鎖）の発現比にて評価を行なった（いずれも未熟型に対する成熟型の遺伝子発現の比率）。TNNI3/TNNI1 については、有意な結果は得られなかったものの、上昇傾向が確認できた（Fig.3 左）。さらに、MYL2/MYL7、MYH7/MYH6 については、有意かつ明確な向上を確認することができ、共誘導により成熟度が高まることが確認できた（Fig.3 中/右）。

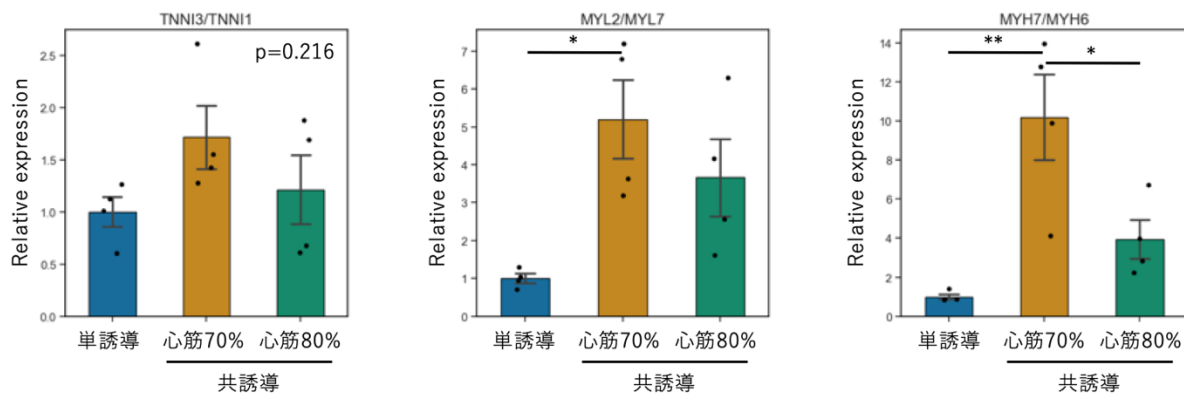


Fig.3 遺伝子発現解析に基づく成熟評価 (* $p < 0.05$)

以上より、狙いの細胞構成に共誘導できるプロセスを確立できたのみならず、心筋細胞の成熟度が向上することも実証することができた。本成果について、現在、論文執筆の準備を進めている。また、本研究で得られた成果は、以下の学会で発表を行っている。

1. **秋山裕和**、片山陽介、清水一憲、本多裕之、実験計画法による高効率かつ安定な iPS 細胞由来心血管前駆細胞誘導プロセスの開発、第 23 回再生医療学会総会、新潟、2024.03
2. **Hirokazu Akiyama**, Yosuke Katayama, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda, Process Optimization of Multipotent Cardiovascular Progenitor Cell Generation from iPSCs using Design of Experiments, the 36th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2023), Nagoya, 2023.11
3. 片山陽介、**秋山裕和**、清水一憲、本多裕之、実験計画法を用いた iPS 細胞由来心臓前駆細胞誘導プロセスの最適化、第 75 回日本生物工学会大会、名古屋、2023.09

以上