

課題番号 7

## 心室組織 ECM ハイドロゲルによるヒト iPS 細胞の 心室筋細胞への分化促進

### [1] 組織

代表者：馮 忠剛

(山形大学大学院理工学研究科)

対応者：白石 泰之

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：藤田 恭平

(山形大学大学院理工学研究科)

研究費：物件費 10 万円

### [2] 研究経過

加齢に伴う心臓疾患の治療に患者由来の人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から分化させた心筋細胞の応用が期待されている。現在ではヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化効率は最大 80% との高い水準で報告されている。

一方、心臓はペースメーカー細胞、心房筋細胞、心室筋細胞といったサブタイプの心筋細胞から構成されている。心疾患の有効な治療には、疾患部位に特異的なサブタイプの心筋細胞の移植が必要不可欠である。しかしながら、ヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導法の研究においては心臓を構成するサブタイプの心筋細胞への分化促進法がまだ確立されていない。

近年では幹細胞の分化に対して接着する足場素材の影響が重要視されつつある。その理由は足場が分化誘導の特定接着性因子を持つことと、または足場素材の力学特性が分化に対するトリガーな役割を発見されたことである。最近の研究ではヒト ES 細胞を心筋細胞へ分化させるための足場素材として心臓組織の細胞外マトリクス (Extracellular Matrix, ECM) が利用されている。

本研究の目的は、心室筋組織より抽出した ECM から作製したハイドロゲルを足場素材としてヒト iPS 細胞を心室筋細胞への分化を促進する。

以下、研究活動状況の概要を記す。

本共同研究は研究計画に従って以下の実験を行った。

#### 1. 心室筋組織の脱細胞と心室筋 ECM ゲルの作製

ヒト iPS 細胞の足場となる心室筋 ECM ゲルを作製した。ヤギ由来心室筋組織を細切、脱細胞して、消

化液で組織を溶解し、心室筋組織の ECM 溶液を調整した。その後、ECM 溶液を 37°C でゲル化させた (図 1)。

#### 2. 心室筋 ECM ゲルの力学特性の調整

心室組織と同等の力学特性になるため固定剤 (EDAC) と塑性圧縮を併用して調整した。

#### 3. 心室筋 ECM ゲルの圧縮試験

心室筋 ECM ゲルの力学特性を圧縮試験によって測定した (図 2)。

#### 4. ゲル上での培養細胞の挙動を検討した。

実験研究の際に、ヤギ心室筋組織の採取、脱細胞の処理や力学特性のデータ解析などについて研究代表者、対応者、分担者全員で二回の研究打ち合わせを行った (一回目：2015 年 6 月 1 日 Kota Kinabalu 国際会議の場を利用、二回目：2015 年 7 月 3 日山形大学工学部)。

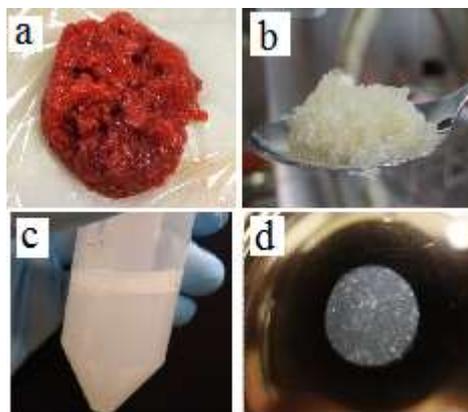


図 1. ヤギ心室筋(a)、脱細胞処理した心室筋 ECM(b)、ECM の消化処理(c)、心室筋 ECM ゲル(d)

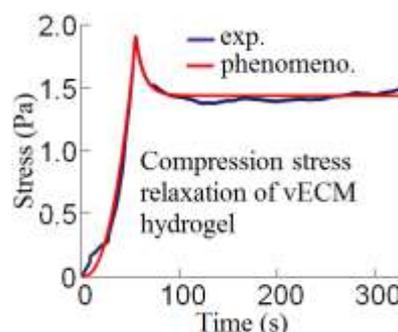


図 2. 心室筋 ECM ゲルの圧縮力学特性

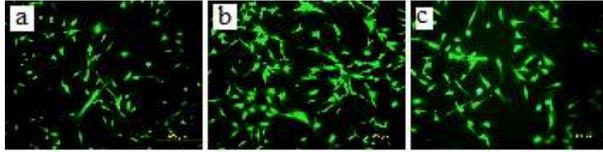


図3. 心室筋 ECM ゲルにおけるラット線維芽細胞の増殖 : a) 低い弾性率ゲル、b) 心室筋と同じ力学特性を有するゲル、c) 心室筋と同じ弾性率但し速い応力弛緩ゲル。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、独自の心室筋組織ECMゲルの作成方法を確立した。細切りした心室組織の脱細胞処理(1% SDS溶液および1% triton溶液でそれぞれ液浸)を行ってから、組織ECMを1.0mg/ml Pepsin溶液中で粉碎・消化し、心室ECM溶液を調整する。その後ECM溶液を37度で静置しゲル化させる。このプロトコルは従来の工程より乾燥・粉碎の過程を省いて短期間・低コストで心室筋ECMゲルを作ることができた。更に、ゲルの力学特性の調整には、架橋剤のEDACを用い、元の心筋組織の力学特性に近付けることができた。

第2に、心室筋ECMゲルの力学特性の解明。開発した生体軟組織圧縮試験装置でゲルの粘弾性特性を測定し、非線形 Kelvinモデルを用いその特性を解析した。試験によりECMゲルは粘弾性体に特有な応力弛緩を有することが分かった。

第3に、心室筋組織ECMゲルの細胞培養特性の検討。ゲル上にラット胎児線維芽細胞や心筋細胞を培養し、その力学特性が細胞挙動に及ぼす影響を検討した(図3)。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は、ヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導に新たな効率・安価な手法を開発する基礎検討であって、有意義な結果と更なる発展性を示した。共同研究にあたって、若手研究者の育成にも効果的である。研究分担者のアジア制御学会での本研究についての発表は高く評価され、The 10th Asian Control Conference The Shimemura Young Author Award に受賞された。また、6<sup>th</sup> International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues、6-10 December 2015 Hawaii での発表によって本研究に関する国際的共同研究も検討した。

### [4] 成果資料

#### 学会発表

1. Kyohei Fujita, Yuuki Tuchida, Hiroki Seki, Daisuke Sato, Takao Nakamura, Tadashi Kosawada, Zhonggang Feng, Yasuyuki Shiraishi, Mitsuo Umezu.

Characterizing and Modulating the Mechanical Properties of hydrogels from Ventricular Extracellular Matrix. The 10<sup>th</sup> Asian Control Conference 2015(ASCC2015), Kota Kinabalu, Malaysia, June 2015

2. Kyohei Fujita, Zhonggang Feng, Daisuke Sato, Takao Nakamura, Tadashi Kosawada, Yasuyuki Shiraishi, Mitsuo Umezu. Improvement of mechanical properties of hydrogel from ventricular extracellular matrix by carbodiimide crosslinker. 6<sup>th</sup> International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues(ICOMBT2015), Waikoloa, Hawaii, USA, December 2015

3. 藤田 恭平, 馮 忠剛, 小沢田 正, 佐藤 大介, 中村 孝夫, 白石 泰之, 梅津 光生. カルボジイミド系架橋剤による心室組織ECM由来ハイドロゲルの力学特性の調整. 第15回日本再生医療学会総会. 2016年3月, 大阪府大阪市.

4. 藤田 恭平, 馮 忠剛, 小沢田 正, 佐藤 大介, 中村 孝夫, 白石 泰之, 梅津 光生. カルボジイミド系架橋剤による心室組織ECM由来ハイドロゲルの力学特性の向上. 第37回日本バイオマテリアル学会大会. 2015年11月, 京都府京都市.

#### 論文

現在国際誌への投稿を準備中。