

[研究助成 (A)]

心臓機能を調整する自律神経活動の in vitro
モニタリング・コントロール技術の開発

Development of in vitro monitoring and control technology for ANS-innervating cardiac tissues

2201012



研究代表者

産業技術総合研究所
細胞分子工学研究部門

主任研究員

高山 祐三

[研究の目的]

生体臓器は自律神経系を構成する交感/副交感神経の拮抗作用による機能制御を受けており、それゆえに自律神経作用の恒常性が破綻することで不整脈等の疾患が誘起される。自律神経作用により臓器機能を制御・破綻に導く詳細なメカニズム解析、および疾患状態に対する創薬応用のためには、生体外において自律神経作用を再構成する技術の確立と自律神経活動のモニタリング・コントロール技術開発が必須である。本研究では心臓機能を自律神経シグナルにより人為的に制御するための自律神経活動の計測・制御インターフェース構築を行う。その先にはヒト自律神経系への機械的な介入による、生体モニタリング・次世代治療へと発展できると考えている。

申請者は本研究課題に先立ちヒト多能性幹細胞 (iPS, ES 細胞) から自律神経前駆細胞及び交感副交感神経の作製技術を開発してきた。特に前駆細胞の段階から細胞密度、神経栄養因子の添加濃度を調整することで交感/副交感神経の選択的誘導が可能となっている点が大きな利点である (Takayama et al., Sci. Rep., 2020; 特6593811)。

一方で、異なる培養環境による細胞誘導手法では、標的細胞組織 (心筋など) との共培養を行う際に片方のみとの神経結合になってしまう

という課題があった。標的臓器への自律神経作用の評価には交感/副交感神経支配を同時に再現することが必須である。

このために本研究課題では交感/副交感神経のハンドリングを容易にする3次元交感/副交感 sphere を作製する。更には電極基板上でヒト心筋組織への交感/副交感神経支配を行うための微細加工デバイスを作製することで、オンチップ上で心筋活動への自律神経作用をリアルタイムに観測・評価可能なシステム開発を行う。

[研究の内容、成果]

①自律神経 sphere の作製

本研究課題ではまずヒト心筋組織との共培養を行うためのヒト自律神経 sphere の作製を試みた。生体内の神経節構造を模擬した3次元状の細胞 sphere を作製することで、ハンドリング操作性を向上させることが可能となり、これまで困難であった交感/副交感神経の同時共培養が可能になると想定した。

研究代表者らがこれまでに構築したヒト iPS 細胞から自律神経前駆細胞への誘導時に行っていた3次元胚様体作製と浮遊培養法を、自律神経への成熟過程においても継続して行うことで自律神経 sphere の作製を行った。

なお、交感神経/副交感神経の誘導のためにそれぞれ異なる培養液を用いた神経成熟を行っ

ている。

上記の通りに作製した交感神経/副交感神経 sphere の評価のために遺伝子発現解析を行った。qPCR による評価の結果、それぞれの sphere において交感神経マーカーである TH や DBH (交感神経マーカー) 及び CHAT や VACHT (副交感神経マーカー) の顕著な上昇を確認した。また、免疫細胞染色実験からも同様の実験結果を得ており、交感神経/副交感神経 sphere の構築を問題無く行えていることを確認している (図 1)。

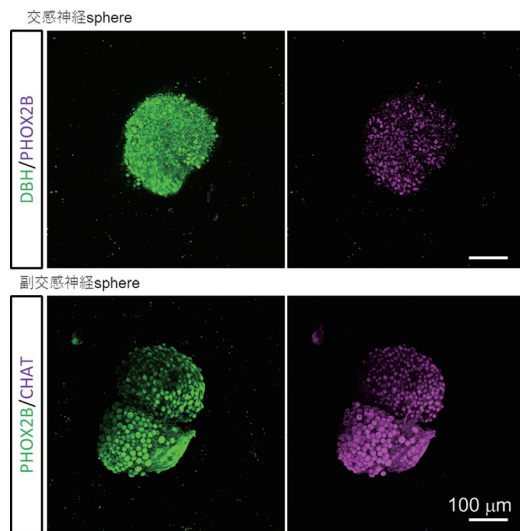


図 1 自律神経 sphere の免疫染色結果

一方で、交感神経 sphere 内に副交感神経マーカーの遺伝子発現上昇や陽性細胞が、副交感神経 sphere 内に交感神経マーカーの遺伝子発現上昇や陽性細胞が確認されており、神経細胞の混入が今後課題となる可能性がある。これに対しては、例えば交感神経の選択的な神経毒である 6-OHDA 等を用いることで副交感神経 sphere 内の交感神経の大部分を除去可能であることを確認しており、培養法の工夫による分化効率の改善を必要に応じて検討する予定である。

また、作製した自律神経 sphere 内には神経以外にも線維芽細胞や間葉系細胞等の増殖性細胞が増加していることも確認した。後述の通り、現状では作製した自律神経 sphere と心筋組織

との機能的結合には問題が無いと判断できるが、今後の実験で自律神経 sphere-心筋組織との結合に問題が生じた場合には、自律神経 sphere の誘導効率上昇等のプロトコル改善を検討する予定である。

②自律神経 sphere と心筋組織の共培養

上記で作製した自律神経 sphere と心筋組織との共培養系構築を行い、機能的結合が生じるかの解析を行った。

心筋活動の解析に当たり、心筋細胞が発生する活動電位及び局所電場電位 (LFP: Local Field Potential) を計測するために微小電極アレイ基板 (MEA: Microelectrode Array) 上にヒト iPS 由来心筋細胞 (iCell cardiomyocytes; CDI Japan 社) を播種し、更に自律神経 sphere を播種し共培養を行った。

ヒト心筋細胞のみを培養したサンプル及び交感神経/副交感神経 sphere との共培養を行ったサンプルにおいて、自律神経作動薬であるニコチンを添加した際の心筋活動変化の計測を行った。その結果、心筋細胞のみにサンプルにおいてはニコチン添加による心筋活動への影響は観測されなかった。一方、交感神経 sphere との共培養系においてはニコチン添加により顕著な心拍頻度の増大が、副交感神経 sphere との共培養系においては心拍頻度の減少傾向が見られた (図 2~4)。

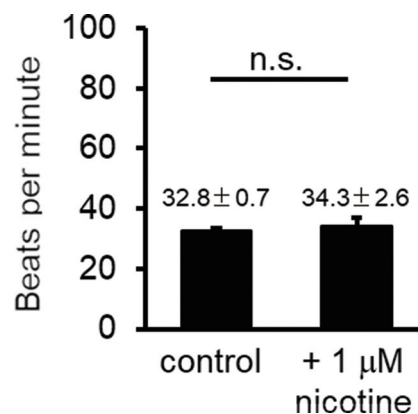


図 2 心筋組織のみのサンプルに対するニコチン添加による活動変化

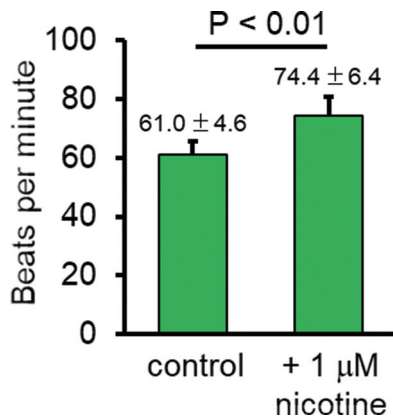


図3 交感神経-心筋組織サンプルに対するニコチン添加による活動変化

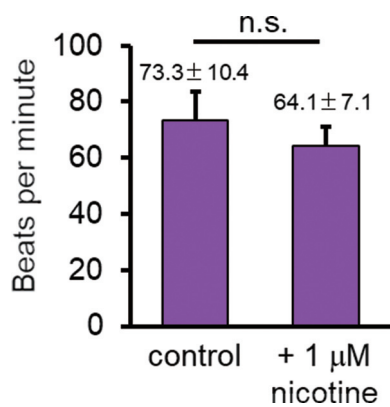


図4 副交感神経-心筋組織サンプルに対するニコチン添加による活動変化

以上の結果より、作製したヒト交感神経/副交感神経 sphere はヒト心筋組織と機能的な結合を形成することが可能であり、自律神経シグナルにより人為的に心筋活動を制御可能であることが示唆された。

③自律神経由来の心筋毒性解析

②までに構築したヒト自律神経-心筋システムを用いた薬理解析への有用性検証を目的とし、抗がん剤の一種である Paclitaxel 添加実験を行った。Paclitaxel は副作用として末梢神経障害と共に催不整脈作用があることが報告されているが、この催不整脈作用が直接的な心毒性による作用なのか、末梢神経障害を介した作用なのかは報告されていない。Paclitaxel を心筋組織のみのサンプル及びヒト自律神経と共培養したサンプルそれぞれに添加した際の心筋活動へ

の影響を解析した。心電図の QT 間隔に相当する指標である FPDcF (Field potential duration corrected by Fridericia's formula) に関して、心筋組織のみのサンプルでは 1 μMPaclitaxel 添加前後で大きな変化が見られないのに対し、自律神経-心筋組織のサンプルでは FPDcF の顕著な変化が見られた (図 5)。FPDcF の大きな変動は催不整脈作用の指標となることが知られており、この結果は Paclitaxel は自律神経への障害を介して心筋活動への悪影響を及ぼすというこれまでの in vitro 実験系では解析困難であったメカニズムを示唆するものである。

以上の結果より、自律神経-心筋共培養システムによりこれまでにない化合物アッセイが可能であることが示唆されたと考えている。

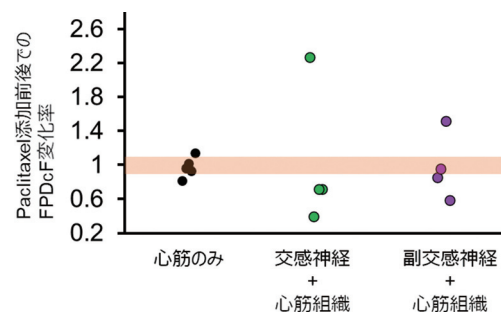


図5 Paclitaxel 添加による FPDcF の変化率解析。色帯部は FPDcF の変化率が 10% 以内の部分を示す。

[今後の研究の方向, 課題]

本研究ではヒト自律神経 sphere とヒト心筋細胞を共培養することで自律神経-心筋において相互作用が形成されること、及び自律神経を介した心毒性をアッセイ可能な in vitro 系であることを示した。

一方で当初からの目標である交感神経/副交感神経作用の独立的な心筋組織への作用に関してまだ未解決であり、今後は各 sphere の独立した播種と心筋組織への神経突起投射を可能となる培養デバイスの作製に注力する必要があると考えている。

[成果の発表, 論文等]

1. Specification of peripheral neurons from human pluripotent stem cells allows construction of nerve-innervating culture models, Yuzo Takayama, Yuka Akagi, Yasuyuki S. Kida, FENS Forum 2020, online (virtual conference), 2020/07/14
2. Selective derivation of human peripheral neurons in the autonomic nervous system facilitate precise control of cardiomyocyte beating, Yuzo Takayama, Hiroko Kushige, Yuka Akagi, Yutaka Suzuki, Yutaro Kumagai, Yasuyuki S. Kida, ISSCR 2020 Virtual, online (virtual conference), 2020/06/26