

京都大学	博士（医学）	氏名	Abulaiti Mosha
論文題目	Establishment of a heart-on-a-chip microdevice based on human iPS cells for the evaluation of human heart tissue function (ヒト心臓組織機能評価のためのヒト iPS 細胞に基づくハートオンチップ型マイクロデバイスの開発)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p><b>【背景】</b> ヒト iPS 細胞由来心血管構成細胞から作製した細胞シートなどの三次元組織はヒト心臓機能を模倣しうる事から、疾患再現・創薬研究や心毒性評価にとって有用なツールになりうる事が期待されている。これまで、動画解析系や高感度ひずみセンサーを含む高度な機械工学的技術による収縮力評価系による細胞シート機能評価法が報告されているが、臨床外挿性に欠け、設備投資を要する等の問題がある。機能評価系の普及には、高汎用性・低コスト・高感度の系の構築が望ましい。従って本研究では、ハートオンチップ型マイクロデバイスを開発し、人工心臓組織の拍動機能を反映する粒子の変位の観察により検証した。</p> <p><b>【方法】</b> 微小電動機械システム(MEMS)ベースの微細加工技術によるジメチルポリシロキサン(PDMS)製のプッシュバー、チャンバー層、ダイアフラム膜層、マイクロチャンネル層を構成する事でマイクロ流体チップを設計した。ヒト iPS 細胞から心臓構成細胞を同時分化誘導し、温度感受性ポリマー(PIPAAm)を用いた培養皿に播種して細胞シートとして回収した後、1～2週間の動的流水培養トレニングにより、自己拍動を伴うマイクロ心臓組織を作製し、マイクロ流体チップのプッシュバー上に載せてハートオンチップ型マイクロデバイスを作製した。固定培養後に、マイクロチャンネル層に蛍光粒子を注入し、自己拍動を反映した各粒子の水平方向の前後の周期的変位を顕微鏡下で観察する事で、心筋シートの拍動の動態を可視化した。数値解析ソフトウェアの MATLAB を用いた自動多点粒子変位量で外部電気刺激 (30V) に対する心臓組織の反応性及び粒子変位量の評価、定量化を行い、既報の動画解析による心筋シート収縮評価系と比較する事で検証した。また心筋収縮における生物学的応答である細胞内カルシウムイオン濃度の外部電気刺激に対する変動を、カルシウムイオンセンサー蛋白質である遺伝子 (GCaMP) を導入した iPS 細胞を用いてマイクロ心臓組織を作製し、カルシウムイメージングで確認した。更に代表的なβ作動薬である Isoproterenol を用いて、循環作動薬に対するデバイスの反応性を検討した。</p> <p><b>【結果】</b> iPS 細胞由来細胞シートの動的流水培養により、内部に血管網を持つ、厚み 150～200 μm 程度の三次元的なマイクロ心臓組織を作製する事に成功した。外部電気刺激をデバイスに与える事により脈動周波数と粒子の変位距離および速度との間の強い負の相関を確認した (<math>R^2=0.971</math>)。粒子変位量を基にした計算により、今までに報告されている心筋細胞シートの収縮力評価系と比べて2桁高い感度となる、0.01 ミリニュートン以下の微小な拍動力を検出できた。既報の画像解析系により検出された変位量あるいはカルシウムイオン濃度の変動と、拍動の外部電気刺激周波数において、デバイスと同様の負の相関を認め、本デバイスが心筋細胞の拍動およびカルシウムイオン濃度変化を捉えている事が示された。Isoproterenol による拍動数変化と変位距離も強い相関を示した (<math>R^2=0.978</math>)。これらの結果により、ハートオンチップ型マイクロデバイスが、拍動の速さや強さ、細胞内カルシウムイオン濃度、薬理学的反応等において、生体の心臓機能を再現している事が示された。</p> <p><b>【結語】</b> ヒト iPS 細胞由来心筋シート作製技術及びマイクロ流体チップ技術の融合により創薬や心臓毒性試験のための人工心臓組織の生理学的パラメーターを高感度に機能評価できるバイオアッセイ系を開発した。候補化合物を用いた本デバイスの更なる薬理学的検証により、心臓の難病に対する創薬研究や新規開発薬の心毒性評価に寄与すると期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

iPS 細胞由来心臓組織は疾患再現・創薬研究や心毒性評価にとって有用なツールになりうるが、特に心収縮力を観察するためには微小な拍動を評価するための系が求められる。本研究では心臓組織の微小脈動を生体心臓の実質性能であるポンプ排出量・圧力として計測評価するためのシステムを開発し、人工心臓組織の拍動機能を反映する粒子の変位の観察により検証した。

微細加工技術によるポリジメチルシロキサン製のプッシュバー等の4つのパーツとヒト iPS 細胞由来マイクロ心臓組織により本システムを作製した。拍動を反映した各粒子の変位で、組織の拍動の動態を可視化した。電気刺激に対する組織の反応性及び粒子変位量の評価、定量化を行い、既報の動画解析による心筋シート収縮評価系と比較する事で検証した。電気刺激 (30V) をシートに与えることにより脈動周波数と粒子の変位距離および速度との間の強い相関を確認した ( $R^2=0.971$ )。β作動薬の Isoproterenol による拍動数変化と変位距離も同様に相関した ( $R^2=0.978$ )。今までに報告されている iPS 細胞由来心筋細胞シートの収縮力評価系と比べて2桁高い感度となる、0.01mN 以下の微小な拍動力を検出できた。本システムが、拍動の速さや強さ、薬理学的反応等において、生体の心臓機能を再現している事が示されている。

以上の研究は iPS 細胞由来心臓組織の微小な機能評価を可能とし循環器医療の発展に寄与するところが多い。

以上の研究は iPS 細胞由来心臓組織の微小な機能評価を可能とし循環器医療の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和3年9月1日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降