

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15506

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた冠循環を構築する三次元心筋組織の創生

研究課題名(英文) iPSC derived three dimensional cardiac tissue having circulatory system

研究代表者

宮川 繁 (Miyagawa, Shigeru)

大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：70544237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：重症心不全の治療方法として心臓移植、人工心臓装着があるが、様々な課題があり、新しい治療開発が急務である。近年、細胞工学技術の革新、iPS細胞の普及により臓器を体外で作成できるようになった。今回、in vitroでiPS由来三次元心筋組織チップを作成し、今までの単層心筋細胞と比較して、薬剤応答性良好な組織を作成評価した。薬剤スクリーニングシステムとしての有用性が示唆された。その次に、in vivoにおいて、iPS由来三次元心筋組織を小動物心不全モデルの心臓に移植することで、心機能回復を促すことを確認できた。1ヶ月後の3次元心臓組織も生体内で残存しており移植前と比較して、構造的に成熟を認めていた。

研究成果の概要(英文)：Despite a remarkable progress in the treatment for severe heart failure such as heart transplantation and left ventricular assist device, heart failure is still a leading cause of mortality. Recently, it has become possible to make organ tissue outside the body by remarkable innovation of cell engineering technology and a spread usage of human iPSC. In this study, we made a human iPSC derived 3D myocardial tissue chip in vitro, and we could find a good drug responsiveness of the chip compared with the conventional monolayer cardiomyocytes. It suggests the utility as a drug screening system. Next, we transplanted the human iPSC-derived three-dimensional myocardial tissue on the heart to heart failure models, and we could find the recovery of cardiac function. The implanted cardiac tissue after one month also remained in vivo, and the maturation was recognized compared with the tissue in vitro.

研究分野：心臓再生医療

キーワード：iPS細胞 in vivo iPS由来三次元心筋組織 重症心不全 心機能回復

1. 研究開始当初の背景

重症心不全の究極的治療手段は心臓移植と人工心臓装着にかかる社会基盤の脆弱性などから、新しい治療開発は急務である。近年の細胞組織工学の発展により、自己細胞から心臓を含めた臓器を体外にて作成することが理論的には可能になりつつあり、脱細胞した心臓に iPS 細胞由来心筋細胞を生着させた報告もあるが、循環を回復できるレベルには至っていない。ヒト iPS 細胞由来三次元心筋組織が in vitro での有用性を確認し、その組織を心不全モデルに移植することで心臓機能改善に至るかを確認する必要がある。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞由来三次元心筋組織チップを使用することで、薬剤スクリーニングシステムとしての有用性を明らかにする。

ヒト iPS 細胞由来三次元心筋組織を小動物心不全モデルへ移植し、心臓超音波検査および組織学的検索にて心筋組織の生体適合性機能評価、有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

三次元組織化された心筋組織チップと単層心筋細胞との薬剤応答性を細胞内カルシウム動態・収縮特性に関するパラメータの変化率で比較する。

三次元組織化した心筋組織を小動物心不全モデルに移植し心臓機能改善を確認する。

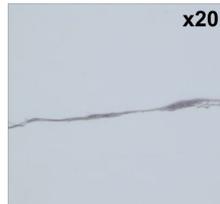
4. 研究成果

薬剤スクリーニング

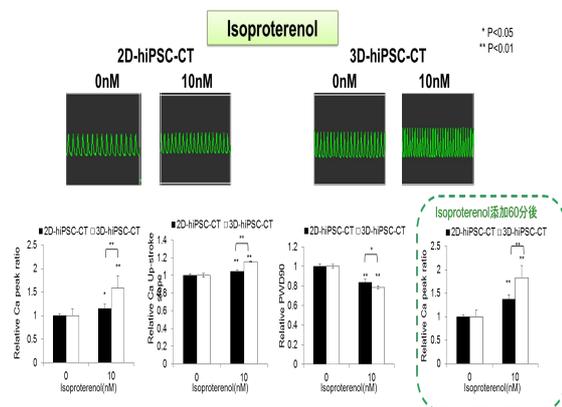
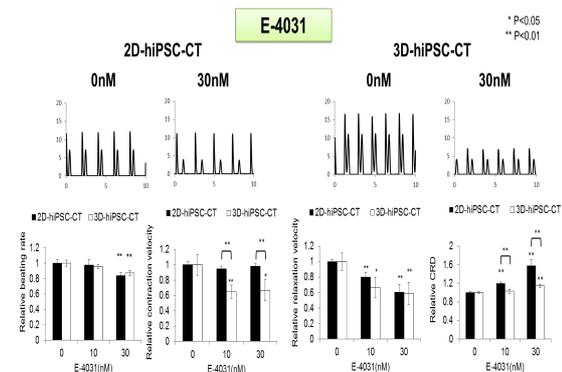
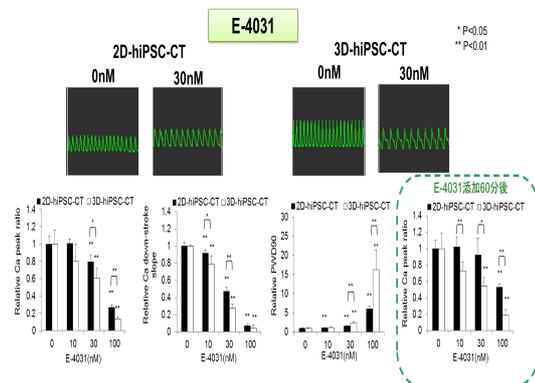
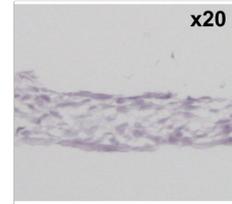
ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いて、フィルターLbL 法を用いた細胞集積法により構築した心筋組織チップ (3D-hiPSC-CT) と、従来薬剤スクリーニングに用いられている単層心筋細胞 (2D-hiPSC-CT) との薬剤応答性を比較した。HERG K チャンネルブロッカー (E-4031) 添加後、両群ともに濃度依存的な細胞内カルシウムピーク数・down-stroke slope の減少、PWD90 (立ち上がり時間) の増加をみとめたが、心筋組織チップは単層心筋細胞と比較して変化率が大きく、また応答が長く持続することが確認された。収縮特性においても、細胞内カルシウム動態と同様の傾向がみとめられた。一方、Isoproterenol 添加後、両群ともに濃度依存的な細胞内カルシウムピーク

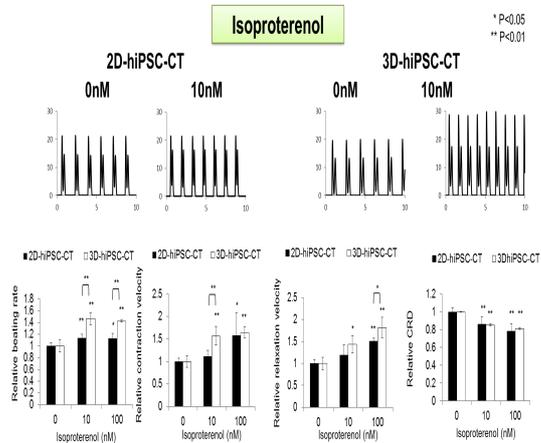
数・up-stroke slope の増加、PWD90 減少をみとめたが、心筋組織チップは単層心筋細胞と比較して変化率が大きく、また応答が長く持続することが確認された。収縮特性においても、細胞内カルシウム動態と同様の傾向がみとめられた。心筋組織チップにおける以上の反応は、生体内と類似しており、薬剤スクリーニングシステムとしての有用性が示唆された。

2D-hiPSC-CT

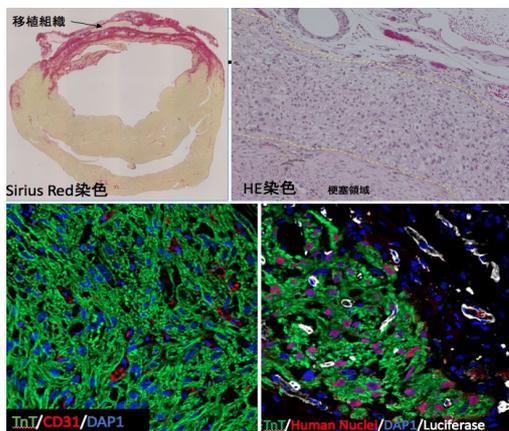


3D-hiPSC-CT





小動物心不全モデルへの移植
 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞(75%)、線維芽細胞(25%)、血管内皮細胞(ヒト iPS 心筋細胞+線維芽細胞総数の10%)をLbL法でコーティングし、集積法で作成した心筋構築を作成した。それらの心筋構築組織を移植した群と移植しない群で割付した。
 移植後2週目、4週目に心臓超音波検査にて心機能の評価し左室拡張末期径は両群(移植群 12%、非移植群 10%拡大)共に拡大しており有意差はなかった。また左室駆出率は移植群において、有意に改善していた(移植群: $8.0 \pm 7.0\%$ 、非移植群: $-12.2 \pm 4.3\%$; $p < 0.05$)。4週目に犠死し、心臓摘出したあとに、組織学的検査、mRNA定量検査を施行した。
 HE染色において、心筋構築組織が残存しているのを確認した。また免疫染色にて移植片のサルコメアの所見、human nuclei 陽性所見を確認している。また移植心筋組織に新生血管が流入しているのを確認できた。Cox43の発現も認めており電気的繋がりも確認できた。また RT-PCR を用いた検討では梗塞周囲領域で血管新生のサイトカインである VEGF は移植群で有意に高値出会った。(移植群 vs コントロール群: 1.2 ± 0.2 vs 1)、HGF も移植群で有意に高値(移植群 vs コントロール群: 2.6 ± 2.3 vs 1)であった。



5. 主な発表論文等
 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1: 発表演題: Effectiveness of human iPS cell-derived cardiac 3D-tissue constructs with cardiomyocytes and endothelial cells. Oral,

発表者: Yokoyama J, Miyagawa S, Fukushima S, Takamura Y, Shima Y, Akashi M, Toda K, Ueno T, Kuratani T, Sawa Y,

学会名: AHA2016 2016/11/12, USA 国外

2: 発表演題: Building a new drug screening system for evaluating drug response and toxicity by three dimensional cardiac constructs derived from human induced pluripotent stem cells, Poster,

発表者: Takeda M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Ito E, Harada A, Matsuura R, Matsunaga Y, Mochizuki-Oda N, Matsusaki M, Akashi M, Sawa Y,

学会名: AHA2016, 2016/11/12, USA 国外

3: 発表演題: ヒト iPS 細胞由来 3 次元心筋組織を用いた創薬スクリーニングシステムの検討、ポスター

発表者: 武田真季、宮川繁、福嶋五月、齋藤充弘、伊東絵望子、原田明希摩、松浦良平、小田 望月紀子、松崎典弥、明石満、澤芳樹
 学会名: 第 16 回日本再生医療学会

2017/3/7 仙台

4: 発表演題: LBL 法で作成したヒト iPS 由来 3D 心筋構築組織のラット慢性心不全モデルへの移植、口頭

発表者: 横山淳也、宮川繁、福嶋五月、原田

明希摩、高村寧、島史明、明石満、上野高義、
戸田宏一、倉谷徹、澤芳樹
学会名：第 16 回日本再生医療学会 2017/3/7
仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)
大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)
研究者番号：70544237

(2) 研究分担者

福島 五月 (FUKUSHIMA, Satsuki)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医長
研究者番号：80596867
(削除：平成 28 年 12 月 2 日)

秦 広樹 (HATA, Hiroki)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80638198
(追加：平成 28 年 12 月 2 日)