

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15633

研究課題名(和文) スキャフォールドフリー心筋構造体の培養環境の検討

研究課題名(英文) Improvement of culture environment for scaffold-free cardiac construct

研究代表者

中山 功一 (Koichi, Nakayama)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：50420609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、接着性の細胞の凝集体であるスフェロイドを任意の形態に積層し、3次元の組織構造体を作製する技術としてバイオ3Dプリンタを開発した。本研究では、ドーム型心筋組織の作製及び最適な培養環境を検討した。

まず、ヒト繊維芽細胞のスフェロイドを用いて、ドーム型組織体の培養方法を検討した。その結果、培養方法を改良することで、形態を保持したまま、剣山から回収することが出来た。次に、ヒト心筋スフェロイド、ドーム型心筋組織体の培養を試みた。その結果、剣山から回収後、形態は保持していたが、自律的な拍動が著しく弱かった。今後は、剣山を改良することで、栄養素が組織体内に供給出来る様になることが必要である。

研究成果の概要(英文)： We developed a Bio-3D printer tissue engineering technology in which cells aggregated into spheroids can be printed onto a scaffold-free needle array according to the desired 3D design. In this study, we fabricated a dome shape cardiac construct and optimized a culture environment for that new form.

Firstly, we fabricated a dome shape construct using human neonatal dermal fibroblasts and studied the optimization of culture environment. As a result, a dome shape fibroblast construct could be removed from needle array and cultured in the improved culture method. The shape of constructs could be maintained onto needle array. Secondly, we fabricated dome shape constructs with human cardiac spheroids. Although desired dome shape of constructs was maintained after removing from needle array, the beating of the constructs was weak. In the next step, we plan to improve the culture environment of dome shape cardiac constructs by redesigning needle array.

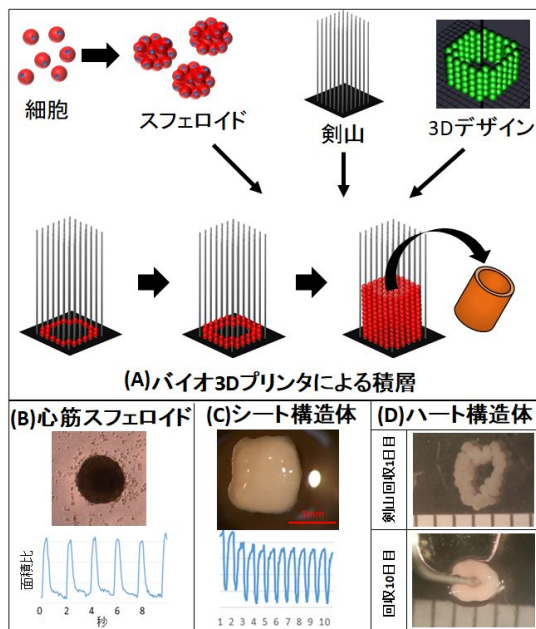
研究分野：組織工学

キーワード：組織工学 再生医療 心臓疾患外科学 スキャフォールドフリー バイオ3Dプリンタ

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療、組織工学技術は、臓器移植、人工臓器に代わる新しい医療技術として期待されている。その中でも心臓の再生は、心不全が死亡原因の上位を占める日本では非常に期待が高い。今までに細胞シート工学、足場材料を用いた3次元培養法が盛んに取り組みられてきたが、立体造形能、足場材料に対するアレルギー反応など未だ臓器移植の代わりになる為には課題が残る。

今までに申請者の研究室グループでは、上記の課題を克服する為に足場材料を使用せずに、**図1A**の装置と原理を用いて細胞のみの血管様構造体、肝臓構造体などの作製に成功している。作製した構造体は、生体内組織と同等の機能を有しており、臨床応用に向けた研究が進んでいる。そこで、平成27年度に上記の装置と原理を用いてヒト心筋構造体の作製に取り組んだ。その結果、簡易的なシート構造体、ハート構造体の作製に成功している(**図1C,D**)。しかし課題としては、**作製した心筋構造体を形態保持、生体外での最適な培養方法の検討の必要性が挙げられる。**



**図1. バイオ3Dプリンタを用いた心筋組織体作製の概要**  
細胞の凝集体であるスフェロイドを剣山上に積層することで、任意の3Dデザインの組織体を作製することが出来る(A)、自律的に拍動する心筋スフェロイド(B)、シート構造体(C)、ハート構造体(D)、剣山から回収直後の構造体はスフェロイドの形態が残っているが、培養することで、融合が促進される

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、上記の背景を基にして、(1)ヒト心筋スフェロイド、ドーム型ヒト心筋構造体の作製条件の最適化、(2)心筋構造体の生体外での最適な培養環境を検討することの2点を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)ヒト心筋スフェロイド、ドーム型心筋構造体の作製

##### ヒト心筋スフェロイドの最適化

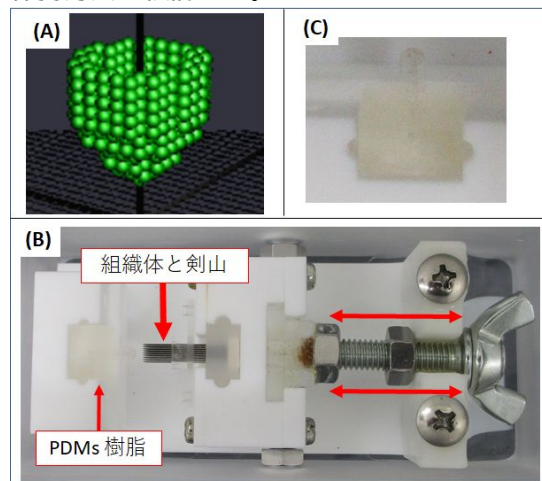
我々はバイオ3Dプリンタを用いて心筋組織体を作製する為に、心筋スフェロイドの作製条件の最適化を検討した。我々は心筋スフェロイドを作製する為に、ヒトiPS由来心筋細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞を組み合わせることで低接着性のU字型96ウェルプレート上に播種することで作製した。作製したスフェロイドは7日間培養後、組織標本を作製し、評価した。

##### ドーム型心筋組織体の作製

で作製したヒト心筋スフェロイドを**図2A**の様なデザインに積層した。積層後、1週間培養後、剣山から回収し、スフェロイド間の融合能、自律的な拍動を観察した。

##### ドーム型組織体回収装置の開発

我々はドーム型にデザインされた組織体を作製する上で、剣山から組織体を回収後、**図2B**の様な装置を作製し、剣山から回収後、PDMsのドーム型樹脂(**図2C**)に組織体を作製出来るシステムを設計した。我々はまず、繊維芽細胞の組織体を用いて組織体の形態の保持方法を検討した。



**図2. ドーム型組織体の3Dデザイン(A),ドーム型組織体の回収装置(B),PDMs樹脂(C)**

#### (2)心筋組織体の生体外での培養環境の検討

##### 剣山上での培養環境の改善

繊維芽細胞を基にしたドーム型の組織体では剣山上で静置培養した結果、スフェロイド同士が融合していたが、心筋組織体では、剣山回収直後は、スフェロイド同士の融合が乏しく、拍動も微弱であった。そこで、剣山内に積層された心筋組織体に栄養素を供給しやすい様に、**図**の様に改善を試みた。

##### 電気刺激装置の作製

培養環境を検討する為に我々は、電気刺激装置を自作した。電気刺激装置の制御は、マイクロコンピューターであるアルディーノを用いた。本装置は電極に白金電極を用いており、バイオリアクター内に設置することで、

培養しながら心筋組織体に電気刺激を供することが可能である。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト心筋スフェロイド、ドーム型心筋構造体の作製

###### ヒト心筋スフェロイドの最適化

我々は、ドーム型心筋組織体をバイオ 3D プリンタで作製する為に、最初にヒト心筋スフェロイドの作製条件の最適化を検討した。その結果、ヒト iPS 由来心筋細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞を組み合わせることで、同じサイズかつ、一定のリズムで拍動する心筋スフェロイドを作製することが出来た。1 週間培養することで、内部に血管網と思われる部分が確認出来た (図 3C)。

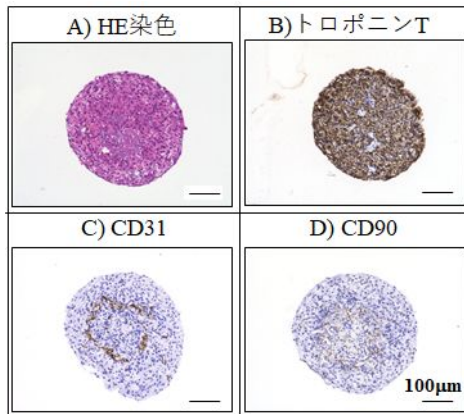


図 3. ヒト心筋スフェロイドの作製結果  
HE 染色(A)、トロポニン T(B)、CD31(C)、  
CD90(D)

###### ドーム型心筋組織体の作製

次に上記の心筋スフェロイドを用いて、ドーム型の心筋組織体の作製を試みた。我々は初期検討としてヒト繊維芽細胞のスフェロイドを用いて、組織体の作製を検討した。その結果、剣山上に組織体を形成することは出来たが、剣山からドーム型組織体を回収する際に、ドームの形態を保持することが出来なかった。そこで、剣山を回収する際に用いるグリッドプレートの形をドーム型にすることで、回収時に形態が変わることなく回収することが出来た。

###### ドーム型組織体回収装置の開発

ドーム型の心筋組織体を作製し、剣山から回収後、支持体が無ければ、ドームの内部が縮むことで、閉塞してしまう。そこで、剣山上の組織体とドーム型 PDMs 樹脂を組織体回収装置にセットし、図 4A-B の様に剣山上の組織体を回収する際に、ドーム型 PDMs 樹脂上に移動することが出来た。

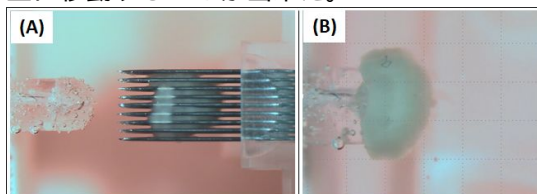


図 4. 剣山上の繊維芽細胞組織体のドーム型 PDMs 樹脂への移行前(A)と移行後(B)

##### (2) 心筋組織体の生体外での培養環境の検討 培養環境の最適化

研究成果(1)の で確立した組織体作製方法を繊維芽細胞の代わりに心筋細胞を用いてドーム型の心筋組織体を作製したが、剣山上でスフェロイド同士の融合が促進されず、組織体自身の拍動も微弱であった。理由としては、剣山内部まで培養液が供給出来ていない為だと考えられる。

そこで本研究では、剣山上に積層された心筋組織体の培養環境を改善することを検討した。我々は剣山の側面に培養液を直接供給出来るシステム上を作製し、1 週間培養した。その結果、静置培養環境条件よりもスフェロイド同士の融合は改善されていたが不完全であった。更に剣山から回収したドーム型の心筋構造体は、拍動が微弱なままであった。現在、培養環境を改善する為に様々な検討中である。

###### 電気刺激装置の作製

作製した心筋組織体内の心筋細胞の収縮力の向上、成熟させる為に、電気刺激装置を作製した。図 5A は我々が電気刺激装置を作製する為に設計した回路図である。ワンボードマイコンである Arduino を使用して、一定のリズムで任意の電圧を心筋組織体に供せる様にした。本システムは図 B の様にバイオリアクターにセットすることが可能である為、かん流培養しながら、電気刺激をすることが出来る。

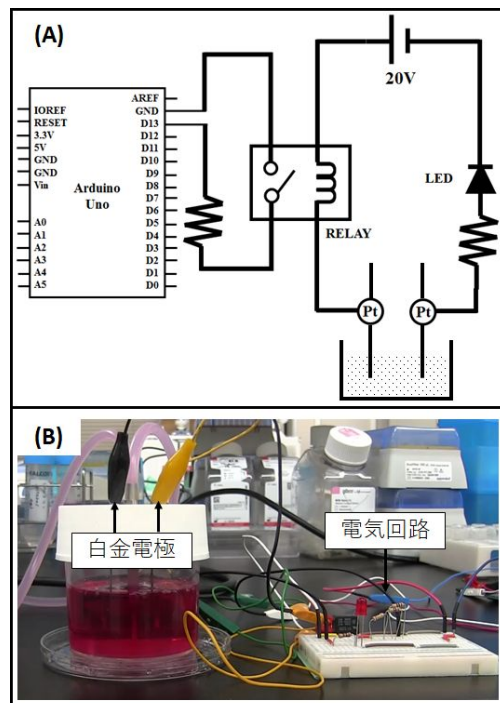


図 5. 電気刺激装置の回路図(A)、バイオリアクターと電気刺激装置(B)

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2件)

Moldovan N.I., Hibino N, Nakayama K.  
Principles of the 'Kenzan' method for robotic cell spheroid-based three-dimensional bioprinting. Tissue Engineering Part B:Reviews, June 2017, 23(3)237-244  
Verissimo A.R, Nakayama K.  
Scaffold-Free Biofabrication. 3D Printing and Biofabrication, 2017 pp.1-20

〔学会発表〕(計7件)

遠山周吾、荒井健一、川口新治、木村成卓、藤田淳、福田恵一、中山功一、小林英司、バイオ3Dプリンタを用いたヒトiPS細胞由来心筋組織構造体の作製、第17回日本再生医療学会総会(2018.03.21-23 横浜)

中山功一、バイオ3Dプリンタを用いた臓器再生研究の概要と今後の展望、第36回再生医療を推進する議員の会(2018.03.08 東京)

中山功一、臓器再生を目指したバイオ3Dプリンタの開発、ARO協議会第5回学術集会(2017.09.26 愛知)

Nakayama K. Scaffold-free bio-3D printing for solid organ fabrication, Printing the future of therapeutics in 3D (May. 05, 2017 Vancouver, Canada)

荒井健一、小島敦子、迎洋輔、伊藤学、森田茂樹、中山功一、バイオ3Dプリンタを用いたチューブ型心筋構造体の作製、第16回日本再生医療学会総会(2017)

Arai K., Ojima A, Mukae Y, Morita S, Nakayama K. Fabrication of scaffold-free cardiac construct by bio 3D-printer, International Conference on Biofabrication 2016

Nakayama K. Scaffold-free bio-3D printing for solid organ fabrication, European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative International Society 2016 (TERMIS)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
中山 功一 (Nakayama Koichi)  
佐賀大学・医学部・特任教授  
研究者番号：50420609

(2)研究分担者  
荒井 健一 (Arai Kenichi)  
佐賀大学・医学部・特任助教  
研究者番号：42752960

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )