

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19968

研究課題名(和文) バイオ3Dプリンターを用いたスキャホールドフリー心筋構造体の作製及び機能の検討

研究課題名(英文) Fabrication of scaffold-free cardiac construct by using bio 3D printer and analysis of function

研究代表者

荒井 健一 (Arai, Kenichi)

佐賀大学・医学部・寄附講座助教

研究者番号：40752960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、初年度にヒトiPS細胞由来心筋細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞を組み合わせ、スフェロイドを作製する為の最適化を検討した。その結果、血管内皮細胞、繊維芽細胞を加えることでスフェロイド形成能が促進された。次に、バイオ3Dプリンターを用いて心筋構造体を作製した。心筋構造体は、剣山上で培養することでスフェロイド同士が融合し、拍動が同期した。剣山から回収後、バイオリアクター内で培養することで、心筋組織体は成熟し、電気刺激応答性、組織内部での血管網様構造の形成、心筋細胞の再配列が確認出来た。今後、移植することによる新規の心臓再生療法の開発が発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)： Firstly, we optimized cardiac spheroids by mixing human iPS derived cardiomyocytes, endothelial cell, and fibroblasts. This result indicates that the addition of fibroblasts and endothelial cells promotes rapid cell self-organization and enhances cardiac spheroid stability with regards to shape and size. Secondly, we fabricated cardiac constructs by using the bio-3D printer. Cardiac constructs were cultured on the needle arrays for 7 days. Beating of the fused constructs was observed. After removal from the needle array, we confirmed electrical stimulation response of constructs, micro-vascular formation and the rearrangements of cardiomyocytes inside the construct.

In future, we will transplant this tubular cardiac construct to develop a new cardiac regenerative therapy.

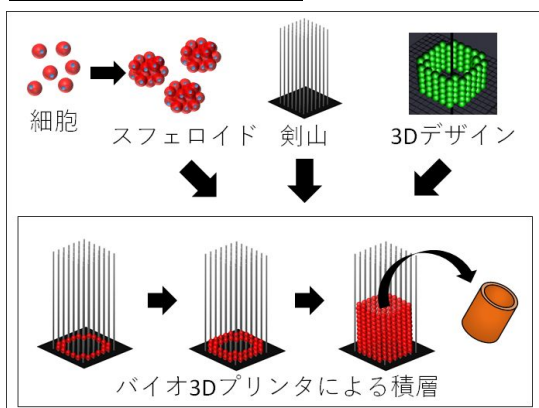
研究分野：組織工学

キーワード：バイオ3Dプリンター ヒトiPS細胞由来心筋細胞 心筋ポンプ 組織工学 再生医療 スフェロイド スキャホールドフリー

### 1. 研究開始当初の背景

先進諸国における心不全・血管不全の患者は急増している。治療法として、臓器移植、人工心臓、細胞移植などが挙げられる。臓器移植は健常者と同様の臓器機能回復が期待できるが、圧倒的なドナー不足や免疫抑制剤を服用しなければいけない。それに対して、人工心臓は、移植までの繋ぎとして心臓の拍動補助が可能だが、長期間の抗血栓性、生体適合性、耐久性、感染症のリスクに課題が残る。細胞移植は患者自身の iPS 細胞から心筋細胞を作製することで、拒絶反応が生じず、治療が可能だが、移植部へ接着する細胞数が低いなど課題も残る。

以上の背景から、臓器移植、人工心臓に代わる新しい医療技術として組織工学の研究が盛んに取り組まれていた。3次元の心臓組織を作製する技術としては、コラーゲン、マトリゲルなどの足場材料内に心筋細胞を包埋する手法が報告されているが、生体溶解性素材によるアレルギー、感染症などのリスク、更にゲルは心筋細胞間の接着を阻害して細胞同士の拍動の同期が困難などの問題点も生じる。上記の技術は、再生医療技術として極めて重要なツールだが、心筋の再生に形態学的特徴や力学的作用を有するような心筋、弁などの構築は困難を極める。我々の研究室では、細胞凝集塊であるスフェロイドを用いて、複雑な形状の組織をロボット(バイオ 3D プリンタ)にて作製するシステムを開発した(図 1)。本システムは、細胞の凝集体である直径 500 $\mu$ m 程度のスフェロイドを直径 0.2mm の剣山に積層することでスフェロイド間が融合して、最終的に立体構造体を作製することができる。本研究室では今までに血管様チューブ構造体、肝臓組織体の作製に成功している。



**図. バイオ 3D プリンタの概要**  
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できる

本システムの利点としては、足場材料を使用せずに、3次元組織を作製出来る為、コラーゲンゲルなどの足場材料を用いた手法では、生体溶解性素材によるアレルギー、感染症などのリスク、更にゲルは心筋細胞間の接

着を阻害して細胞同士の拍動の同期が困難などの問題点を克服できる。

### 2. 研究の目的

申請者は平成 27 年度からヒト iPS 由来の心筋細胞を用いて、心筋組織体を作製する為の初期検討を実施してきた。その結果、バイオ 3D プリンタを用いて簡易的な心筋シート構造体(縦×横×高さ=約 1.5mm×1.5mm×1mm)を作製することが出来た。以上のことから、ヒト iPS 由来の心筋細胞を用いてチューブ状や心臓弁の様な複雑な形態の構造体も作製可能ではないかと考えられる。そこで本研究では、**バイオ 3D プリンタを用いてチューブ状の心筋ポンプ構造体を作製し、構造体が血液を供給できるポンプとして機能するか検討した。**

### 3. 研究の方法

申請者は本研究を検討する為に、以下の実験項目を設けて、実施した。

#### ヒト心筋スフェロイドの作製

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てヒト心筋スフェロイドを作製する。作製したヒト心筋スフェロイドは、7日間培養後、バイオ 3D プリンタで組織体を作製する為に使用された。ヒト心筋スフェロイドの評価方法は拍動により変わる面積変化値の解析、組織標本による各細胞種の挙動解析、血管網形成能解析を検討した。

#### ヒト心筋チューブ組織体の作製

次に、バイオ 3D プリンタを用いてヒト心筋組織体を図のようなチューブ型のデザインに積層することで、チューブ組織体を作製出来るか検討した。作製したチューブ組織体は剣山上で7日間培養された。剣山から回収後、更に心筋組織体を成熟化させた。

#### ヒト心筋組織体の評価

作製したヒト心筋組織体は培養後、拍動による面積変化値の解析、電気刺激応答性、組織標本による各細胞種の挙動解析、血管網形成能解析を検討した。また、生体外でポンプ体として機能しているか検討する為に、蛍光標識されたマイクロ粒子とシリコンチューブを用いて、心筋構造体が拍動する度に、チューブ内の培地を押し出す力を有するか検討した。

#### ヒト心筋組織体のラット移植試験

作製した心筋組織体は、ラットの大動脈部分に移植した。移植した組織体が、内部で自律的に拍動しているか確認後、今後の移植試験の為の課題を検討した。

### 4. 研究成果

(1) ヒト iPS 由来心筋スフェロイドの作製  
我々が目的としているバイオ 3D プリンタ

を用いて3次元の心筋組織体を作製する為に、直径500-600 $\mu$ mの心筋スフェロイドが必要とされる。そこで我々はヒトiPS由来心筋細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞を様々な比率、細胞数で組み合わせてヒト心筋スフェロイドを作製した。その結果、繊維芽細胞、血管内皮細胞の比率が高い方が、細胞凝集能が促進された。培養7日目に各条件の心筋スフェロイドは、直径、真円度、収縮能を解析された。その結果、ヒトiPS由来心筋細胞:血管内皮細胞:繊維芽細胞=50%:25%:25%の比率がバイオ3Dプリンタで組織体を作製する為に最適であることが明らかになった。心筋スフェロイド内の細胞の挙動を確認する為に、組織標本を作製し、各細胞のタンパク質を免疫染色した。その結果、血管内皮細胞が内部で血管網様構造を形成していることが分かった。このことから、酸素と栄養素がスフェロイド内部まで供給されていることが期待される。

#### (2) ヒト心筋構造体の作製

(1)で作製したヒト心筋スフェロイドはバイオ3Dプリンタを用いて図のデザインで積層された。チューブ構造体は剣山上で7日間かん流培養された。積層から7日目には、剣山上で心筋組織体が拍動していることが確認された。心筋組織体は、剣山上からサーフロー上に移動され7日間培養された。剣山から回収後、構造体自体は回収直後と比べると多少、収縮していたが、拍動は持続していた。

#### (3) ヒト心筋組織体の評価

作製した心筋組織体は、サーフローから回収後、自律的な拍動の確認及び電気刺激応答性を確認した。その結果、10秒間に約5回の自律的な拍動を認め、2Hzの速度で電気刺激を供した際に、心筋組織体が電気刺激のペースに合わせて、拍動することが明らかになった。以上のことから、作製した心筋組織体は電気刺激応答性がある。

更に、作製した心筋組織体のポンプ機能を測定する為に、蛍光標識されたマイクロ粒子をPDMsチューブ内部に入れて、心筋組織体が拍動する時の粒子の動きを観察した。その結果、心筋組織体が拍動する度に、PDMsチューブ内の粒子は一定方向に移動していた。粒子の移動量から、心筋組織体の収縮力を算出しようとしたが、マイクロ粒子がPDMsチューブ内で自動沈降してしまい、顕微鏡で観察する際に、徐々に焦点が合わなくなり、算出が困難であった。今後、マイクロ粒子を解析する為のデバイスを作製することが課題として挙げられる。

最後に、組織標本を作製し、構造体内部の心筋細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞の挙動、血管網の形成など組織学的特徴を検討した。その結果、当初はバラバラに配列していた心筋細胞は組織体内で主に外側に配列しており、血管内皮細胞が組織体内部に配列している傾向が見れた。更に一部分で、血管網を形

成しているとおもわれる部分が観察出来た。

#### (4) 動物への移植試験

作製したヒト心筋組織体は、ポンプ体として有効か検討する為に、ラットの下大動脈への移植試験を検討した。しかし、作製した組織体が移植に耐えうる力学的強度を保持していない場合、血管の間に繋ぐことが困難である為、現在、最適な移植方法及び組織体の作製方法の再検討に取り組んでいる。今後、最適な心筋組織体が力学的強度を得た際に、ホスト側からの血液から栄養素が供給され、ポンプ機能を有することが期待される。

#### 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5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

荒井健一、中山功一、バイオ3Dプリンタを用いて作製した心筋組織体の薬理応答の検討、第17回日本再生医療学会総会、2018

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

Yosuke Mukae, Manabu Itoh, Kojiro Furukawa, Takahiro Kitsuka, Kenichi Arai, Jun-ichi Oyama, Koichi Nakayama, Koichi Node, and Shigeki Morita, Addition of Human iPS-derived Neural Progenitors Influences the Contractile Function of Cardiac Spheroid, Biofabrication 2016

Kenichi Arai, Atsuko Ojima, Yosuke Mukae, Shigeki Morita and Koichi Nakayama, Fabrication of scaffold-free cardiac construct by bio 3D-printer, Biofabrication 2016,

〔図書〕(計1件)

荒井健一、中山功一、バイオ3Dプリンタを用いた立体構造体の作製と将来的な展望、バイオ・医療への3Dプリンティング技術の開発最前線、2016年12月pp117-125

〔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

荒井 健一 (Kenichi Arai)  
佐賀大学 医学部 臓器再生医工学研究  
室 特任助教  
研究者番号：40752960

##### (2) 研究協力者

中山 功一 (Kochi, Nakayama)  
小林 英司 (Eiji, Kobayashi)