

令和元年6月4日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18832

研究課題名（和文）iPS細胞由来心筋細胞と多孔質高分子構造体の融合によるバイオポンプの開発

研究課題名（英文）Development of bio-pump by combining iPS-derived cardiomyocytes and porous polymeric scaffold

研究代表者

東藤 貢（Todo, Mitsugu）

九州大学・応用力学研究所・准教授

研究者番号：80274538

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：自己拍動するバイオポンプ開発のための基礎研究として、iPS細胞由来心筋細胞シートを作製し、心筋拍動解析システムを用いて、拍動挙動の定量的評価を実現した。さらに、画像相関法を用いて、細胞シートの動的変位場とひずみ場の定量的評価に成功し、拍動とひずみ変化の関係性を明らかにした。また、表面改質を行ったPDMSを平面シート状に加工し、心筋細胞シートを貼り付けることで、心筋細胞と足場材料の2層構造体の作製に成功した。さらに、2層構造体の自律的拍動挙動を確認し、心筋拍動解析システムを用いて拍動の定量的評価に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療に対する期待は益々高まっており、特にiPS細胞の応用については多くの期待が寄せられている。その中でも、重度の心不全患者に対するiPS細胞を用いた再生医療の期待は高く、最近では、大阪大学を中心にiPSC-CMで作製した細胞シートの心不全治療への応用について検討されている。しかし、特に工学的観点から検討すべき課題は多い。本研究である得られた拍動する2層構造体、および心筋力学モデルを用いた拍動解析法は、今後、iPSC-CMの心臓再生治療への応用が進み、より大規模な心筋組織への適用や最終的な完全心臓体の作製と移植が検討されるときに、重要な知見を与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：As a basic research for the development of self-beating biopump, the beating behavior of iPS-derived cardiomyocyte sheet was successfully analyzed quantitatively using an analyzing system of cardiac beating. Furthermore, dynamic displacement and strain fields of the cell sheet was also analyzed using the image correlation method. Based on these results, the relationship between the beating and strain variation was clarified. As a scaffold, surface modified PDMS flat sheet was fabricated and a dual layer structure of the cardiac cell sheet and the PDMS sheet was successfully constructed. The self-beating behavior of the layered structure was then quantitatively analyzed using the analyzing system.

研究分野：生体力学

キーワード：心筋細胞 組織工学 拍動 細胞シート 画像相関法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療の技術的基盤となるのが組織工学であり、細胞と人工足場材料を組み合わせることで、様々な組織を *in vitro* で構築しようとする試みが行われている。組織工学的研究の一環として、本研究代表者は、再生医療への応用を目指して、間葉系幹細胞(MSC)と人工足場材料とを組み合わせたハイブリッド型人工組織の開発を進めている。対象とする組織は、MSCが分化能を有する骨・軟骨・血管・心臓である。MSC研究を推進する一方で、再生医療用の細胞源として注目される iPS 細胞にも着目し、2015 年より研究用材料として市販が始まった iPS 細胞由来心筋細胞(iPSC-CM)をいち早く入手し、基礎的研究として細胞集合塊の拍動挙動について研究を進めてきた。その結果、iPSC-CM と MSC を共培養することで、iPSC-CM 単独の場合よりも、より大きな集合塊が形成され、より強く拍動することを見出した。

一方、心臓再生医療の分野で世界をリードする大阪大学心臓血管外科の臨床試験において、重症の心不全患者に対して、足から採取した筋芽細胞の細胞シートを移植する治療法の有効性が示されてきた。しかし、筋芽細胞は自己拍動能を持たないため、より効果的な治療を目指して、iPSC-CM の細胞シートを用いた臨床試験を 2017 年から開始する方向で検討されている。このような現況を鑑みると、将来的に iPSC-CM の心臓治療への応用が進むにつれ、より広範囲で大規模な心臓部位の置換が可能となり、最終的には心臓全体の移植まで可能となる日が来ることも期待される。しかし、その実現のためには、iPSC-CM を用いて、より心臓壁の構造に近い再生組織を作製する必要があり、さらに、再生組織の拍動挙動が人間の心臓に類似の挙動を示す必要がある。

このように、再生医療に対する期待は益々高まっており、特に iPS 細胞の臨床応用については大きな期待が寄せられている。心臓の再生医療に対する応用についても、大阪大学心臓血管外科を中心に、iPSC-CM で作製した細胞シートの心不全治療への応用について検討が進められている。しかし、現時点ではシート状組織に関する研究が中心であり、より大きく複雑な構造に関する研究は少なく、さらにその拍動挙動の工学的解析については、ほとんど見受けられなかった。そこで、iPSC-CM を用いて自己拍動型バイオポンプを作製し、その拍動挙動の工学的解析を行うという本研究課題を提案した。

### 2. 研究の目的

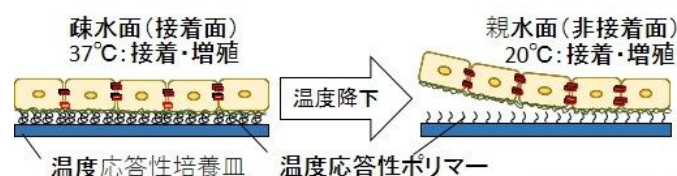
当初の本研究の目的は、高分子多孔質シートと iPSC-CM と間葉系幹細胞の共培養系を融合することで、人工心臓壁の基本構造となるハイブリッド型バイオ材料を作製し、バイオポンプを構築すること。および、バイオポンプの循環型拍動実験システムを開発し、その拍動挙動を解析するとともに、拍動の力学モデルの構築とコンピュータ・シミュレーションによる拍動の再現を行うことであった。これらを実現するために、基礎的研究として、iPSC-CM を用いた細胞シートの作製方法の確立、細胞シートの拍動挙動の定量的評価、心筋力学モデルと動的有限要素法を組み合わせた拍動解析システムの構築、細胞シートと人工足場材料を積層させた 2 層型心筋組織の開発を目的として設定し、研究を遂行した。

### 3. 研究の方法

研究に利用した iPSC-CM は市販のものである。細胞培養条件を表 1 に示す。また、細胞の集合体としてスフェロイドと細胞シートの 2 種類を作製した。細胞シート作製の概要を図 1 に示す。細胞集合体は拍動挙動を示すまで培養し、光学顕微鏡、高速度カメラ、動画解析システムから構成される拍動解析システムを用いて、拍動挙動ならびにカルシウムイオン変動について計測を試みた。

表 1 細胞培養条件

Cell type	Human iPS cell derived cardiomyocytes (Myorige)
Number of cells	$1.0 \times 10^6$ cells/well
Culture medium	Seeding: thawing medium (Myorige) During culturing: Maintenance medium (Myorige)
Amount of medium	Seeding: 500 [μL/well] Day1~day14: 2.00 [mL/well]
Culture substrate	24well Temperature responsive culture plate (UpCell)
Culture days	14 days (37°C, 5%CO <sub>2</sub> )



T.Okano et al, Langmuir20, 5506-5511, 2004

図 1 細胞シートの概要

得られた動画を画像相関法を用いて解析することで、変位分布とひずみ分布を取得した。

また、Walker らの心筋力学モデルを組み込んだ動的 FEA コード LS-DYNA を用いてスフェロイドとシート状の 2 種類の心筋組織の解析を試みた。数値解析から得られたひずみ分布を実験から得られたひずみ分布と比較検討した。

バイオポンプ作製のための足掛かりとして、基本構造体としてゴム系材料である PDMS をシート状に作製し、表面に細胞接着性を向上させるためにコラーゲンを修飾した後、細胞シートを積層化することで、拍動する 2 層型構造体を作製した。拍動挙動とカルシウムイオン変動を前述の観察・解析システムを用いて測定した。

#### 4. 研究成果

図 2 に心筋細胞シートの拍動挙動の測定結果を示す。作製した心筋細胞は順調に拍動挙動を示しており、培養日数が経過すると拍動間隔は安定してきた。また、図 3 に示すように細胞シートは収縮するため面積が低下する傾向にあった。

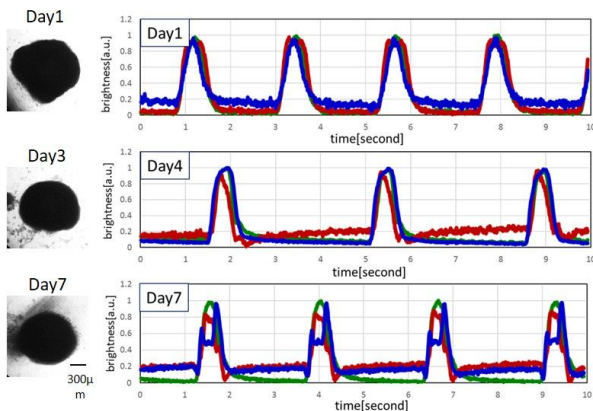


図 2 細胞シートの拍動挙動

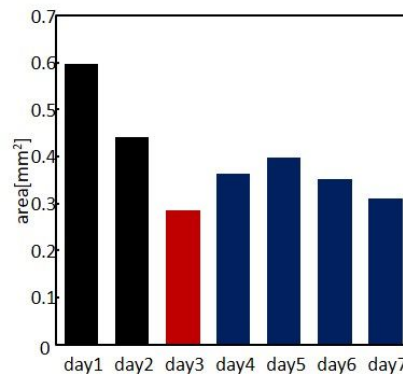


図 3 面積変化

図 4 に心筋シートモデルの解析から得られたひずみ分布を示す。中央部に圧縮ひずみが集中していることがわかる。また、図 5 と図 6 にスフェロイドと細胞シートのひずみ変動の実験値と解析値を比較した結果をそれぞれ示す。定量的には問題があり解析モデルについてさらなる検討が必要であるが、定性的には拍動挙動を再現することに成功した。

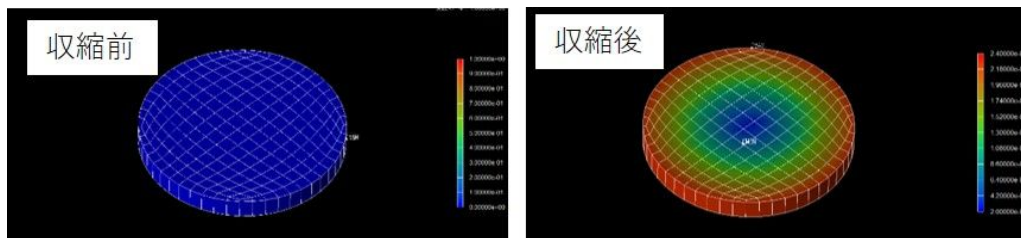


図 4 収縮前後での細胞シートのひずみ分布

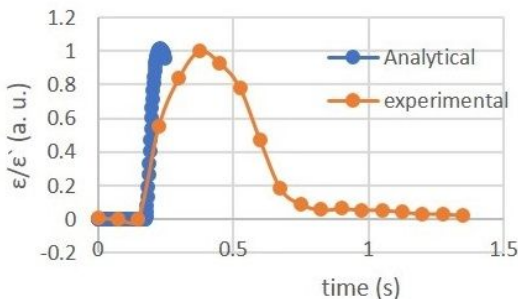


図 5 スフェロイドのひずみ変化の比較

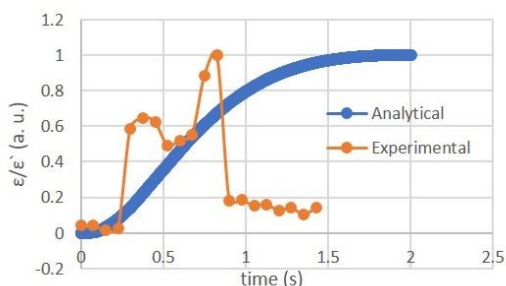


図 6 細胞シートのひずみ分布の比較

図 7 に心筋細胞シートと PDMS シートを積層した 2 層構造体の画像と拍動挙動を示す。細胞シートの PDMS シートに対する接着性は良好であり、良好な拍動挙動を示した。図 8 にバイオポンプ用足場構造体として作製した中空球状 PDMS の外観を示す。内部は中空構造であり左右にはキャピラリーが接着されており、液体を内部に送り込める構造になっている。この表面をコラーゲン等でコーティングし細胞接着性を向上させて心筋シートを接着させれば、バイオポンプの作製が可能となる。バイオポンプの作製法の確立は今後の検討課題である。

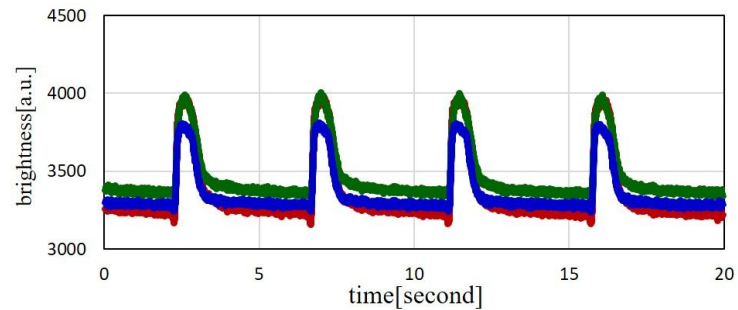
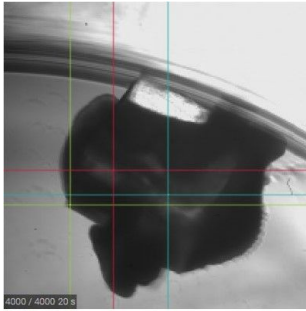


図7 2層型構造体の拍動挙動

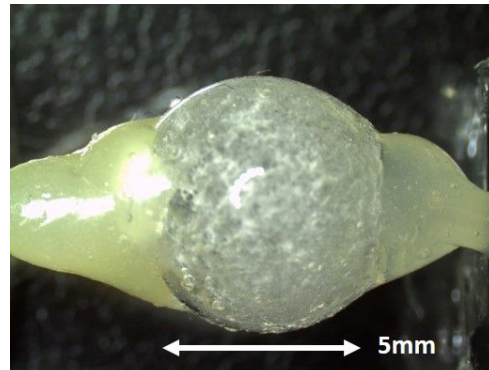


図8 バイオポンプのためのPDMS中空構造体

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計5件)

遠藤喜嗣, 東藤貢, 生分解性繊維を用いたシート状足場材料の創製と評価, 第39回日本バイオマテリアル学会, 2017年11月20日, 東京

Azizah Pangesty, Mitsugu Todo, Development of PLCL tubular scaffold using melt spinning technique for cardiovascular tissue engineering, The 28<sup>th</sup> Annual Conference of the European Society for Biomaterials, 2017年9月5日, アテネ, ギリシャ

東藤貢, 新口加奈子, iPS細胞由来心筋細胞とhMSCの複合コロニーの拍動解析, 第17回日本再生医療学会総会, 2018年3月22日, 横浜

Azizah Pangesty, Mitsugu Todo, Agung Purnama, Marlene Durand, Laurence Bordenave, 第17回日本再生医療学会総会, 2018年3月22日, 横浜

東藤貢, 近藤聖奈, 池田沙樹, 栗田寛子, 心筋力学モデルを用いたヒトiPS細胞由来心筋細胞の拍動挙動の解析, 第18回日本再生医療学会総会, 2019年3月22日, 神戸

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

東藤 貢 (TODO MITSUGU)

九州大学・応用力学研究所・准教授

研究者番号: 80274538

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。