

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00542

研究課題名(和文)重症心不全を根治する“3D Mini Heart”創成

研究課題名(英文)Creating "3D mini heart" for transplantation of heart failure

研究代表者

澤 芳樹 (Sawa, Yoshiki)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授

研究者番号：00243220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまでにiPS細胞由来心筋シート治療法を開発し、臨床研究まで有効性安全性を確認されている。しかし厚みは0.1mm程度であるため、更なる厚み組織の形成が望まれる。本研究では、より高い心機能改善効果が期待できる“3D Mini Heart”を生体外で創成し移植に用いることを目的とする。我々は生体分解性材料で作製した足場を用いて、心筋以外、線維芽細胞と血管内皮細胞、血管誘導因子を融合し、3次元回転培養装置を利用して、最終的に1mm厚みを有する3次元配向性のMini Heart組織の開発に成功した。心筋梗塞モデル小動物へ移植の有効性と安全性を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題を通して、組織工学技術を駆使した高機能化心筋組織による新規移植法の有効性が判明され、今後虚血性心不全の大動物試験、拡張型心筋症への適応性、さらに臨床試験への実現が期待できる。また、本研究課題は複数分野の独創的技術およびアイデアにより開発したシステムであり、医工学融合の成功例でもある。今後、次世代の機能型心筋組織製品として心機能回復させる移植治療や、新たな病態解析用モデルあるいは創薬スクリーニング系として応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Pluripotent stem cell-derived cardiac patches have been extensively used for treating myocardial infarction and have shown potential for clinical application. However, the limited thickness of the patch can hamper its therapeutic effect. We previously developed a fibrous scaffold that allowed the formation of well-organized cardiac tissue constructs. In this study, based on the above technology, we created a mini heart tissue with cardiomyocyte, fibroblast and vascular endothelial cells. Under a dynamic perfusion culture system, we organized into thick and viable tissue of 1 mm thickness. The 3D mini heart tissue demonstrated enhanced contractile properties and up-regulated cytokine and ECM secretion compared to the single-layer fiber sheet control group. Notably, The 3D mini heart tissue group showed improved functional recovery and less fibrosis when used to treat the myocardial infarction model.

研究分野：組織医工学

キーワード：iPS由来心筋細胞 組織構築 デバイス ファイバー 回転培養

1. 研究開始当初の背景

致死的な重症心不全に対する虚血性心筋症や拡張型心筋症の根本的治療法は、心臓移植や補助人工心臓などの置換型治療が中心であるが、耐用性やドナー不足に課題がある。我々は自己骨格筋由来の筋芽細胞シートによる心筋再生治療法を開発し、2015年に世界初の心不全治療用再生医療等製品「ハートシート」の製造販売承認を取得し、販売が開始された。一方、拍動する機能的な心筋細胞は増殖できないため、多能性を持つ未分化iPS細胞を増殖させたのち心筋細胞へ分化誘導する再生医療が注目されており、私たちは安全性の高い大量培養・分化誘導法を確立し、現在虚血性心筋症患者を対象としてiPS細胞由来心筋細胞シートのFrist in Humanの臨床への展開が2020年開始され、今まで8例の臨床試験を行ってきた。全ての患者の病状が回復され、安全性と有効性評価が認められた。

iPS由来心筋シートの構築及び移植による心機能改善のメカニズムとしては、移植心筋から分泌されるサイトカインによる血管新生などのパラクライン効果、移植心筋を介した梗塞領域の電氣的同期性の向上、移植心筋の拍動収縮による心臓ポンプ機能の補助が考えられる。いずれも、移植細胞数を増加させ、実際的心筋と同じように組織化することで、機能改善が増強されると予想される。一方、ヒト心室壁の厚みは1 cmであるため、移植心筋組織の厚みもミリメートル以上であることが望ましい。現時点のiPS心筋シートは顕著な治療効果を示しているが、ハンドリング性や酸素・栄養供給性が低いことや、ミリメートル以上の厚みを持つ組織を形成するうえで課題となっている。他方、ゲル材料等を用いて多層化する技術が他グループから報告されているが、心筋組織中に大きな隙間が生じ、心筋細胞密度が低く、拍動が同期せず、配向性もない分断された組織で、厚みも1mm以下であるなどの欠点がある。

そこで、我々は新たにナノファイバー足場材料を用いた工学的手法により上記課題の解決を図る。我々はすでにFDA認証済みの生体分解性高分子PLGAで作成した配向性ナノファイバー上で、iPS心筋細胞を培養し、配向性がある多層性の0.2 mmの厚みを持つ心筋組織片(単層ナノファイバー心筋組織片)の構築に成功している。さらに、これを小・大動物の心筋梗塞モデルへ移植した結果、顕著な心機能改善効果が確認された(J. Li et. al., Stem Cell Reports, 2017 ; K. Suzuki et.al., J. Heart and Lung Transplantation, 2021)。今後実際の心室組織の構造を模倣しながら、心筋組織を更に多層化・高機能化させるために、組織工学技術を駆使して新たなiPS細胞由来心筋組織の構築を開発することを目指す。回転培養装置を利用して栄養供給しながら、配向・立体構造を持つ多層ファイバー上で、心筋だけでなく血管や結合組織の細胞を培養し多層化することで、1ミリメートル以上の重厚な移植心筋組織を構築する。さらに、慢性心筋梗塞モデル動物における治療効果のPOC取得および長期有効性、安全性試験、実用性評価を行う。最終的に生体心臓内の微小環境を模倣して、生体外で“3D Mini Heart”を創成する技術を開発し、心不全の根治治療を目指す。

2. 研究の目的

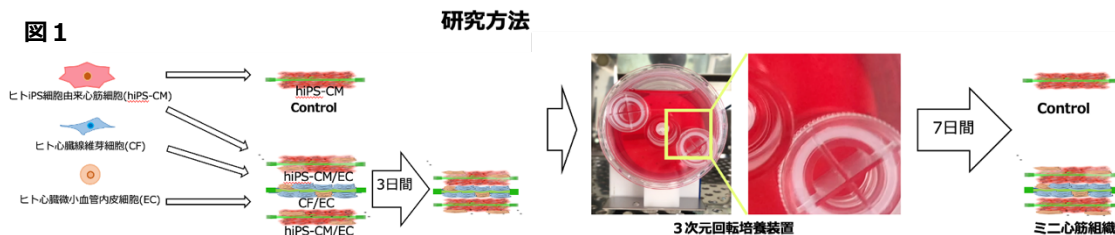
本研究では、より高い心機能改善効果が期待できる“3D Mini Heart”を生体外で創成し移植に用いることを目的とする。我々はこれまでに、FDA認証済の生体分解性高分子材料(PLGAポリマー)で作製したナノファイバーを用いて、3次元配向性的心筋組織片の開発に成功した。このナノファイバーは操作性に優れ、適度な間隙を作り多層化しやすい性質を持つ。そこで、生体心臓内の微小環境を再現する多層化した重厚な“3D Mini Heart”の構築を目指し、多層化で課題となる栄養・酸素供給を確保するため、心筋組織の中に微小血管構造を構築し、最終的1mm以上の重厚な心筋組織を構築した上で、動物心筋梗塞モデルへの移植実験及びPOC取得を行う。最終的に組織工学技術を駆使した高機能化心筋組織による次世代心不全根治法の開発を目指す

3. 研究の方法

本研究課題を達成するために、以下の方法を用いて実験に持ち込んでいる (図1)。

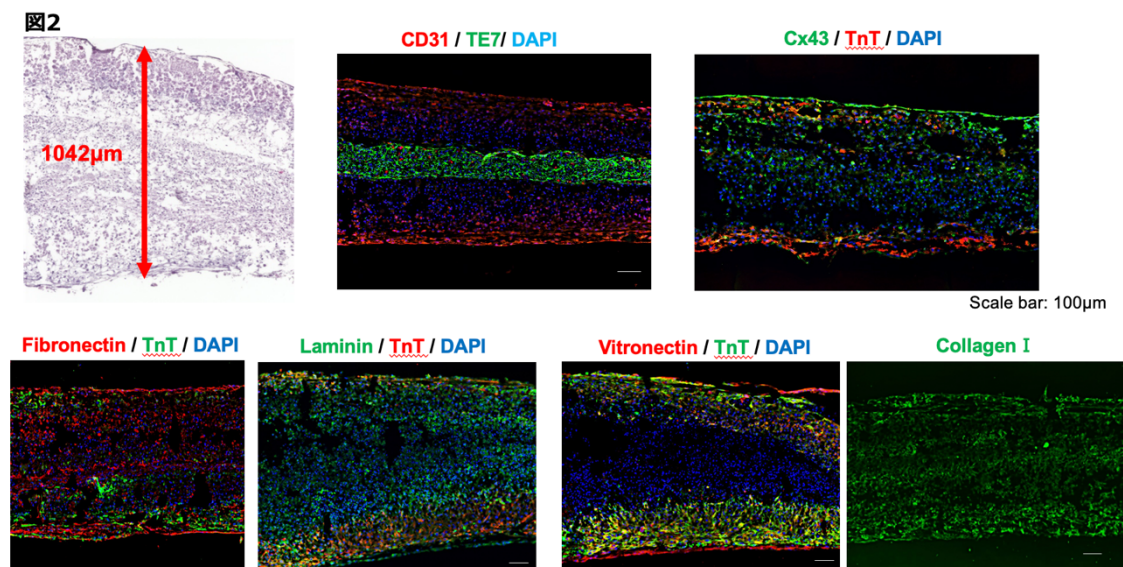
- (1) 生体内の心室壁構造を模倣し、心筋細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞を含んだ心筋組織を構築するデバイス作製条件の最適化を見出す。血管新生を促進するた、多層化ファイバーデバイスに血管新生誘導因子や化合物を添加する。
- (2) 回転培養装置を導入して、多層化構造『Mini Heart』の酸素・栄養を提供する。
- (3) 構築された『Mini Heart』の有効性を評価するために、免疫染色や、分泌因子の量や、電気信号、収縮力などin vitroで分子生物的方法と物理的方法で評価する。

さらに構築された『Mini Heart』を用いて、虚血性心筋症モデル小動物に移植して、有効性と安全性を確立する。

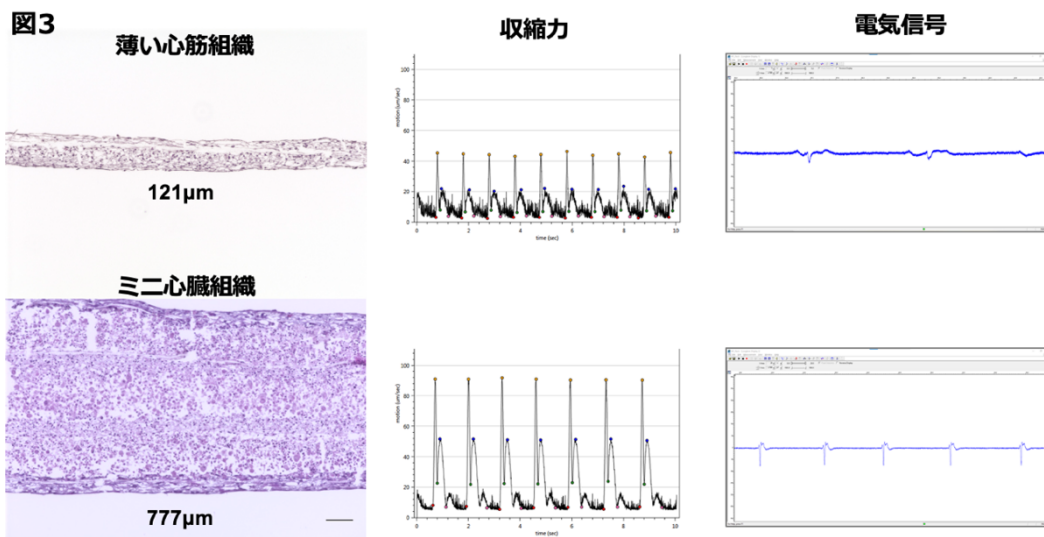


4. 研究成果

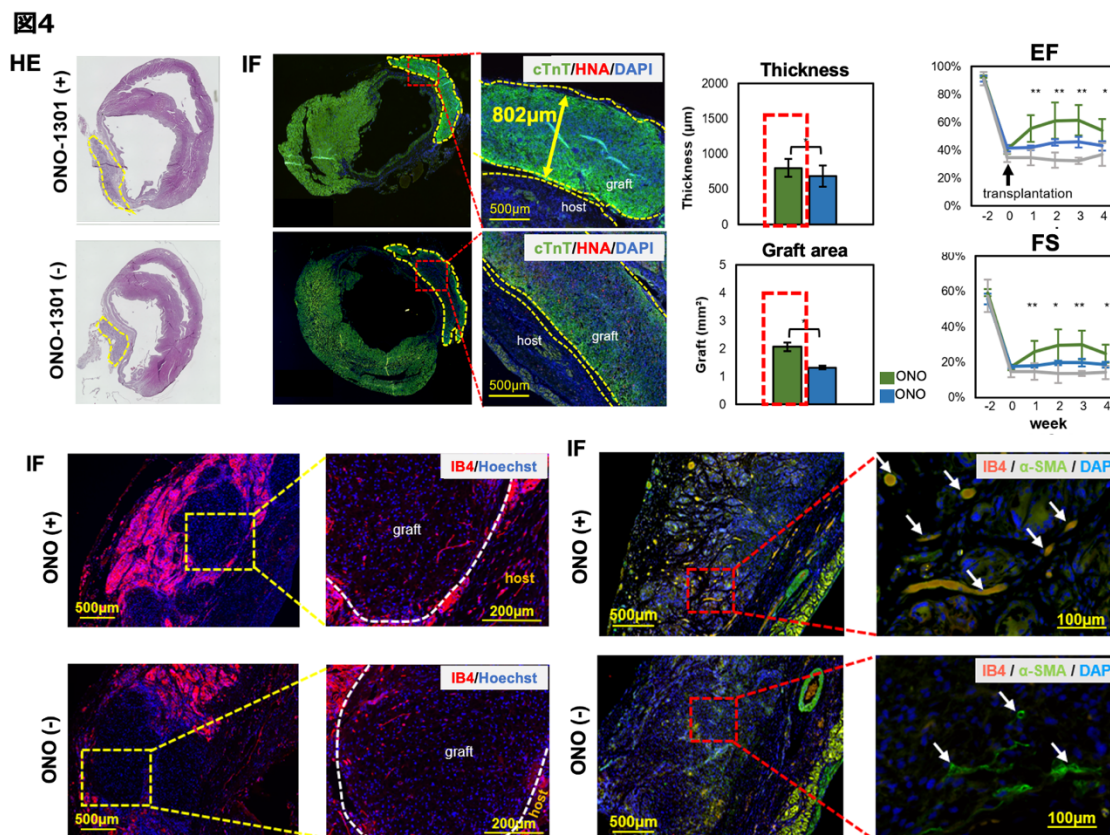
本研究課題の目的を達成するために、生体内の心室壁構造を模倣し、心筋細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞を含んだ心筋組織を構築するデバイスの開発に取り込んでいた。まず、それぞれ種類の細胞の特徴に合わせて、ファイバーの作製条件の検討を行った。細胞の接着向上させるために、ファイバーの表面に細胞外基質となるタンパク質でコーティング処理を行った。Collagen I、Laminin、Fibronectin、Vitronectinなどで検討した結果、Lamininは三種類の細胞とも共通で利用できることがわかった。そして、血管誘導因子ONO-1301をファイバーに添加して、ファイバーが分解されると共にONO-1301も放出することにより、構築した組織の中で血管内皮の促進効果がみられた。さらに、それぞれ心筋細胞層、繊維芽細胞層、血管内皮の層を構築するための最適培養条件を見出すために、細胞の播種密度、適切な培養液、各細胞種の構成割合、細胞の純度、各細胞層の位置関係、配置と分布など、それぞれ検討して、『Mini Heart』構築を構築する条件を決定した。特に培地の検討に工夫して、基礎培地の中に血管内皮を維持する因子を添加することによって、3種類細胞を共通培養できるようになった。最後に、*in vitro*レベルで十分な組織機能を生かせるために、酸素・栄養を十分提供するような培養システムが必要になる。我々は既に軟骨組織構築に実績ある3次元回転培養装置を導入した。その結果、最終的1mm以上の重厚な複合体心筋組織を構築した(図2)。



引き続き、得られた組織を解析するため、まず、組織を用いて各細胞種の特異的のマーカ(心筋細胞：TnT2；繊維芽細胞：TE7；血管内皮細胞：CD31)で染色した結果、それぞれの細胞層にそれぞれのマーカは強く発現され、細胞間繋がりがよい、生存率が高いことが確認された。また、既存技術で構築した薄い心筋シートと比較して、『Mini Heart』組織から分泌された細胞外基質(Collagen I, laminin, Fibronectin, Vitronectin)の量は多く見られて、特に血管誘導因子であるVEGFの量は薄い心筋シートの三倍であることがわかった。さらに、構築された『Mini Heart』組織の機能を評価するために、多電極システムを用いて電気信号を行い、モーションアナライザ装置を用いて収縮力を測定した。その結果、薄い心筋シートと比較して、『Mini Heart』組織の方は明らかに電気信号と収縮力が強いことを検証した(図2-3)。

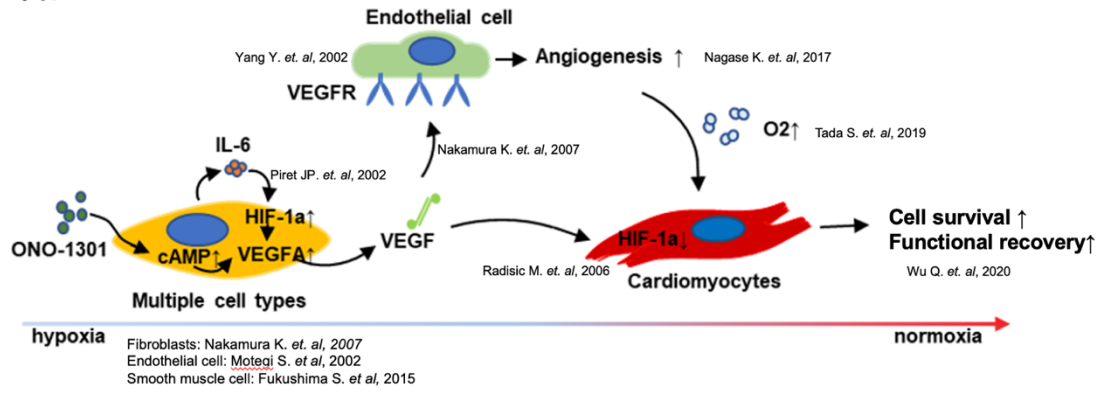


最後に、*in vivo*レベルで構築した『Mini Heart』組織の有効性と安全性評価を行うために、虚血性心筋梗塞モデル小動物への移植実験を行い、非臨床試験POC取得を行った。移植1ヶ月の間に渡って、エコーで測定した結果、薄い心筋シートと比較して、心機能が大幅に改善された。一ヶ月後心臓を回収して、切片を作って、病理方法で組織評価を行った結果、移植された心筋組織は大量に検出されて、組織の強い生着能を示した。心筋梗塞部位の繊維化面積も有意的に減少された。心筋梗塞周りの部位において、血管新生状態(微小血管マーカー：IB4)も明らかに改善された。特に興味深いのは成熟した血管構造(成熟血管マーカー： α -SMA)は多く見られた。一方、安全性評価において、ファイバーの移植による炎症反応は全く観察されなかった(図4)。



以上の結果を解明するために、我々は全遺伝子発現を調べた結果、移植の細胞数の増加による血管誘導因子が増え、心筋梗塞周りの血管の新生の改善が促進されて、最終的に治療効果が見られたことが予想されている(図5)。

図5



本研究課題を通して、組織工学技術を駆使した高機能化心筋組織による新規移植法の有効性が判明され、今後虚血性心不全の大動物試験、拡張型心筋症への適応性、さらに臨床試験への実現が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Qu Xiang, Li Junjun, Liu Li, Zhang Jingbo, Hua Ying, Suzuki Kota, Harada Akima, Ishida Masako, Yoshida Noriko, Okuzaki Daisuke, Sakai Yoshiki, Sawa Yoshiki, Miyagawa Shigeru	4. 巻 42
2. 論文標題 ONO-1301 enhances post-transplantation survival of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue sheet by promoting angiogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 716 ~ 729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.healun.2023.01.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li Junjun, Liu Li, Zhang Jingbo, Qu Xiang, Kawamura Takuji, Miyagawa Shigeru, Sawa Yoshiki	4. 巻 9
2. 論文標題 Engineered Tissue for Cardiac Regeneration: Current Status and Future Perspectives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 605 ~ 605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/bioengineering9110605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hua Ying, Yoshimochi Kenji, Li Junjun, Takekita Kazuhiro, Shimotsuma Motoshi, Li Lingjun, Qu Xiang, Zhang Jingbo, Sawa Yoshiki, Liu Li, Miyagawa Shigeru	4. 巻 13
2. 論文標題 Development and evaluation of a novel xeno-free culture medium for human-induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-022-02879-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakazato Taro, Kawamura Takuji, Uemura Toshimasa, Liu Li, Li Junjun, Sasai Masao, Harada Akima, Ito Emiko, Iseoka Hiroko, Toda Koichi, Sawa Yoshiki, Miyagawa Shigeru	4. 巻 17
2. 論文標題 Engineered three-dimensional cardiac tissues maturing in a rotating wall vessel bioreactor remodel diseased hearts in rats with myocardial infarction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1170 ~ 1182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2022.03.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 劉莉	4. 巻 51
2. 論文標題 iPS由来心筋組織構築技術の現状	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 人工臓器	6. 最初と最後の頁 173-177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 依田崇典、劉莉、李俊君、笹井雅夫、植村壽公、森田健一、上村葉、小野貴弘、澤芳樹、宮川繁
2. 発表標題 配向性を持つ多層化心筋組織の作製
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Xiang Qu, Jingbo Zhang, Ying Hua, Junjun Li, Kota Suzuki, Akima Harada, Yoshiki Sakai, Liu Li, Yoshiki Sawa, Shigeru Miyagawa
2. 発表標題 ONO-1301 Enhanced Survival of Transplanted hiPSC Derived Cardiomyocytes Tissue in a Rat MI Model
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 X. Qu, J. Li, I. Minami, S. Miyagawa, A. Harada, L. Liu, Y. Sawa,
2. 発表標題 Transplantation of hiPSC derived Cardiac Tissue-Like Construct Utilizing Angiogenic Agent ONO-1301 Improves heart function of Myocardial Infarction Model
3. 学会等名 AHA (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞培養方法及びその装置	発明者 劉莉 李俊君 澤芳 樹 宮川繁など	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-038842	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	劉 莉 (Liu Li) (50380093)	大阪大学・医学系研究科・特任准教授 (14401)	
研究分担者	李 俊君 (Li Junjun) (10723786)	大阪大学・医学系研究科・特任助教 (14401)	
研究分担者	植村 寿公 (Uemura Toshimasa) (60176641)	大阪大学・工学研究科・特任教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------