

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01215

研究課題名（和文）iPS細胞由来心筋細胞を用いた原始心臓型モデルの創製と心筋数理モデルの構築

研究課題名（英文）Development of primitive heart model using iPS cell derived cardiomyocytes and construction of cardiac mathematical model

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） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：心臓原始形態モデル開発のために、iPS細胞由来心筋細胞を用いた心筋シートを作製し、電気刺激を利用することで拍動特性の制御が可能であることを見出した。また、能動的応力と最小主ひずみの関係は、粘弾性的ヒステリシスループを描き、電気刺激によりその応答特性は変化することが分かった。次に心筋シートとPDMSチューブを組み合わせた心筋チューブの内部での流動特性は、拍動に対応した流動が生じており、流速の時間変動は、チューブの弾性変形挙動を考慮した理論モデルとよく一致していた。また、3Dバイオプリンターで作製したポリマー構造体は、目標とする心臓原始形態モデルのための足場構造体となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞由来心筋細胞シートを用いた心臓疾患の治療は、すでに臨床研究の段階であるが、その力学的特性に関する研究はほとんど行われていない。本研究は、電気刺激により拍動挙動の制御が可能であることを見出し、さらに電気刺激が粘弾性的応力-ひずみ応答特性に影響を与えることを明らかにした。これらの力学特性に関する知見は、心筋シートの臨床応用において有用となることが期待される。さらに、iPS心筋シートとPDMSチューブを組み合わせた3D構造体の流動特性、ならびに3Dバイオプリンターで作製した3D足場構造体に関する知見は、今後の心臓原始形態モデル開発に向けて重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cardiac cell sheets were successfully developed using iPS cells derived cardiomyocytes for the development of a fundamental heart model. It was found that electrical stimulation can be used to control the pulsation behavior. Such kind of stimulation was also found to change the viscoelastic hysteresis loops of the stress-strain response. The flow behavior in the inside of a hybrid construct of PDMS tube and iPS cardiac sheet was also examined. It was found that the flow velocity change can be modeled using a theoretical model developed by considering the elastic deformation of tube with pulsation. 3D bioprinter was also used to construct the scaffolds for the fundamental heart model. This kind of scaffold will be able to be used to construct simple heart-like models with use of iPS cardiac sheets.

研究分野：生体医工学

キーワード：iPS細胞 心筋細胞 細胞シート 3Dバイオプリンター 粘弾性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心臓は生命を維持するために、常時全身に血液を送る役割を担う「循環ポンプ」であり、生体内で唯一独立して運動している臓器である。機械工学的には、心臓は大変興味深いエネルギー変換システムといえる。心筋細胞内のミトコンドリアにおいて、ATPの化学反応によりエネルギーが生成され、アクチンとミオシンのタンパク質からなるサルコメアが滑り運動を引き起こし、心筋組織全体の収縮運動が生じる。この運動が心臓全体の拍動を引き起こし、最終的に血液の流動という外部仕事へと変換される。心臓の拍動は心房の拍動と心室の拍動に区別されるが、これらは、それぞれ洞房結節と房室結節という自発的に運動する結節細胞から形成される組織により制御されている。この制御は、電気的な刺激として心臓内部を伝わって行われる。このように、心臓は、化学的、電氣的、機械的エネルギーが巧妙に効率よく変換される理想的なエネルギー変換システムといえる。一方、心不全等で機能が低下した心臓に対して、現在の心臓外科では、人工心臓で一時的に置換した後、心臓移植を行う方法がとられているが、わが国におけるドナー不足や海外における高額な医療費が問題となっている。そのため再生医療に対する期待はますます高まっており、最近では、東京女子医大の岡野らによる細胞シート技術の確立<sup>(1)</sup>と大阪大学心臓血管外科の澤による手術法の確立<sup>(2)</sup>により、足の筋肉の筋芽細胞シートを患部に貼りつける再生治療の臨床研究が行われ、その有効性が示されている。さらに今年度より、iPS細胞由来心筋細胞(以下iPS心筋細胞)の細胞シートを用いた臨床研究も計画段階に入っている。しかし、大規模な組織や心臓そのものを置き換えるような再生医療の確立までには、解決すべき数多くの問題が残されているのが現状である。

このような現状の下、機械工学と再生医学の両方の観点から、学術的「問い」として、(i)心臓という高効率なエネルギー変換システムの機構を工学的に応用することは可能か、(ii)心筋細胞から基本的な心臓モデルを作製することは可能か、(iii)細胞から作製した心臓モデルで循環器システムを構築することは可能か、(iv)心臓モデルや循環器システムの数理モデルを構築することは可能か、(v)iPS心筋細胞は健全な心筋細胞と同等の機械的エネルギーを発現できるのか、などが挙げられるが、これらの「問い」を解決するための統合的研究(実験的研究と理論・数値解析研究)は、ほとんど実施されていないのが現状であった。

### 2. 研究の目的

当初の本研究の第一目的は、iPS心筋細胞と生体適合性ポリマーを用いた足場構造(骨組み構造)とを組み合わせ、1心房、1心室および弁から構成される基本的な原始心臓モデルを開発することであった。次に、作製した原始形態モデルを用いて生体内の循環器系を模擬した実験システムを構築し、心臓の原始形態における化学的エネルギー生成ならびに機械的エネルギー生成(拍動と流動)を定量的に評価することを第二の目的とした。これらを実現するために、基礎的研究として、iPS心筋細胞を用いた2次元構造体として細胞シートを作製し、その自発的拍動挙動を制御するために、電氣的刺激を用いて拍動挙動を制御することを目的とした。さらに3次元構造化への最初の試みとして、チューブ状構造体の作製を行い、チューブ内部の流動挙動を明らかにすることを目的とした。さらに、ポリマーゲルを原料とする3次元バイオプリンターを用いて3D構造体を作製し、iPS心筋シートと組み合わせハイブリッド構造体を作製することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) iPS心筋細胞シートの作製と評価

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。iPS心筋細胞からなる2次元構造体として細胞シートを作製した。細胞シートの概要を図1左に示す。細胞シートは拍動挙動を示すまで培養し、拍動解析システムを用いて、拍動挙動について計測した。拍動挙動を示す動画を画像相関法を用いて解析し、最小主ひずみを計測した。また、細胞シートに生じる能動的応力を評価するために、カルシウムイオン変動を考慮したサルコメア力学に基づいたGuccioneの理論を利用した。

表1 細胞培養条件

Cell type	Human iPS cell derived cardiomyocytes <b>CarryA (Myorige)</b>
Number of cells	1.0 × 10 <sup>6</sup> cells/well
Culture medium	Seeding: thawing medium (Myorige) During culturing: Maintenance medium (Myorige)
Amount of medium	Seeding: 500 μL/well Day1~day7: 2000 μL/well
Culture substrate	24well Temperature responsive culture plate (UpCell)
Culture days	7days (37°C, 5%CO <sub>2</sub> )

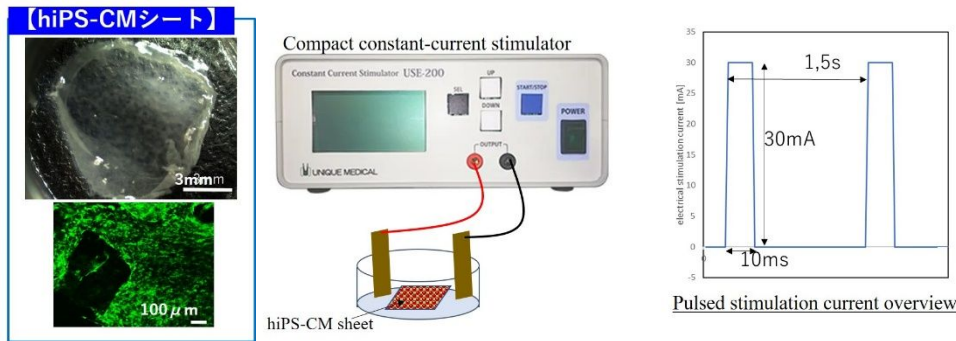


図1 iPS細胞シートと電気刺激装置

## (2) 3次心筋構造体の作製と評価

図2左に心筋チューブの作製法の概要を示す。まず最初にPDMSで微小なチューブを作成し、細胞の接着性を良くするためにFibronectinを表面にコーティングした。次にiPS心筋細胞を正方形に加工したシリコンの型の中で培養することで、1辺が3mm程度の正方形上の心筋細胞シートを作製した。この心筋シートをPDMSチューブの表面に貼りつけることで、心筋チューブを作製した。心筋チューブを培地に浸して培養するとき、培地に微小なセラミック粒子を分散させ、前述の高速動画撮影システムで撮影後、セラミック粒子のチューブ内部での変位を計測することで、心筋チューブの拍動にともなう流動状態を定量的に評価した。また、流動特性を表す単純な理論モデルを提案し実験結果との比較検討を試みた。また、表面での最小主ひずみの時間変動を計測し、能動的理論応力と組み合わせることで応力-ひずみ挙動を評価した。

次に3Dバイオプリンターで足場構造体の作製を行った。3DCADソフトウェアで構造体の設計を行い、3Dバイオプリンター(LumenX+, CELLINK社)と紫外線硬化型樹脂を用いて積層方式で3種類の3D構造体を作製した。さらに、その中のひとつの構造体を選択し、表面に心筋細胞シートを貼りつけることでハイブリッド構造体の作製を試みた。また、高速撮影システムを利用して表面での拍動挙動を測定し、最小主ひずみの時間変動を計測した。

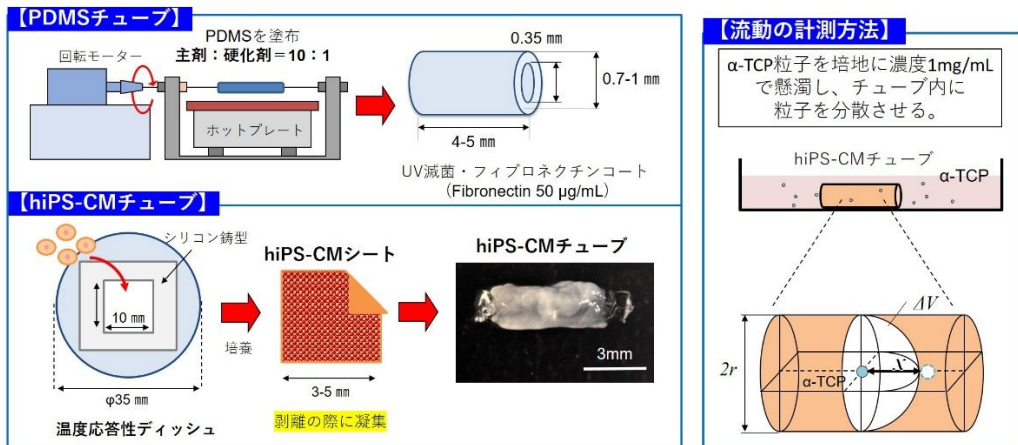


図2 心筋チューブの作製方法

## 4. 研究成果

### (1) 心筋細胞シートの拍動挙動に及ぼす電気刺激の影響

図3に自己拍動と強制拍動による最小主ひずみの時間変動を示す。自己拍動の周期は約16秒(周波数は0.061Hz)であるのに対し、電気刺激が0.2Hzと1Hzの場合は、それぞれ周期は5秒と1秒、周波数は0.19Hzと0.97Hzであった。このように電気刺激を加えることで、強制的な拍動が実現され、拍動の周期が制御可能であることが示唆された。次に応力-ひずみ挙動に及ぼす電気刺激の影響を図4に示す。自己拍動に比べて強制拍動では応力の最大値が低下する。これは十分に収縮が行われていないことを示している。その結果、強制拍動ではヒステリシスループが小さくなり、粘弾性的変形挙動におけるエネルギー散逸量が少なくなっていることを示唆している。その結果、周波数が1Hzの場合は、より弾性的な変形挙動になっていることが分かる。

### (2) 心筋チューブ内の流動特性と表面の変形特性

図5左にチューブ内を移動するセラミック粒子変位の時間変化から評価した流速の時間依存性を示す。流速は拍動挙動に対応しており、10-15 μm/sの最大流速に達した後、次第に減速し0に到達した後、反対方向の速度を有するようになり最終的には-15 μm/s程度に到達する。拍動にともなうチューブの変形挙動を考慮した理論モデルから得られた流速は、定性的にはこの挙動をよく表しているものの、流れが反対方向に変化して以降の流速では過小評価の結果に



なっている。次に表面での応力-ひずみ応答を図5右に示す。図4に類似の粘弾性的応力-ひずみ応答を示しているが、図4の自己拍動の場合に比べてヒステリシスループが小さい。このことは、PDMS 足場構造体の表面に貼り付けられたことで心筋細胞シートの変形が拘束されていることが予測される。また、測定を実施した3点間でのバラツキが大きく、変形が一様でないことが示唆された。

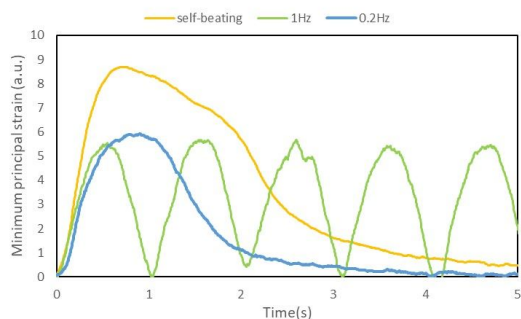


図3 主ひずみの時間変動

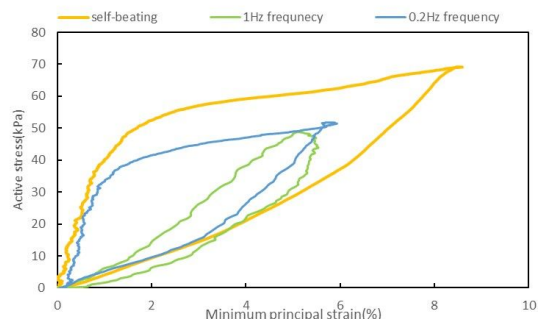


図4 応力 ひずみ挙動に及ぼす電気刺激の影響

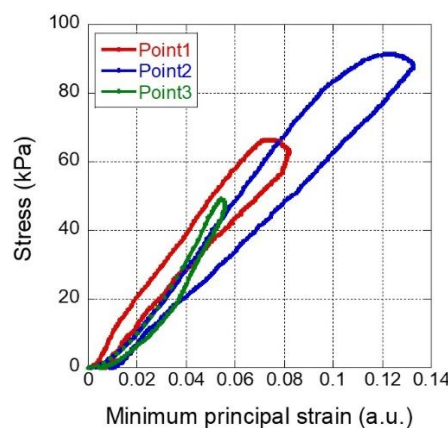
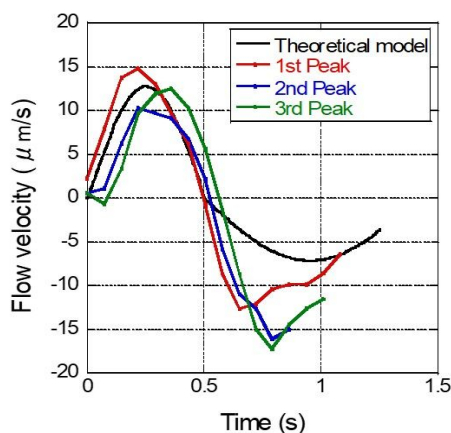


図5 心筋チューブ内の流動速度変化と応力-ひずみ変動

### (3) バイオプリンターと心筋シートを用いたハイブリッド構造体の作製と評価

図6左にバイオプリンターで作製した2種類のポリマー製足場構造体を示す。右側の構造体は心臓の原始形態を意識しており、1心房1心室から形成される心臓原始形態をよく再現している。作製した足場構造体表面に心筋細胞シートを貼りつけて自己拍動に伴う最小主ひずみの変化を計測した結果を図6右に示す。図3に類似の拍動に伴うひずみ変動が再現されているが、ひずみの値は小さい。このことは、足場構造体の剛性が高いために心筋細胞シートの拍動が拘束されていることを示している。

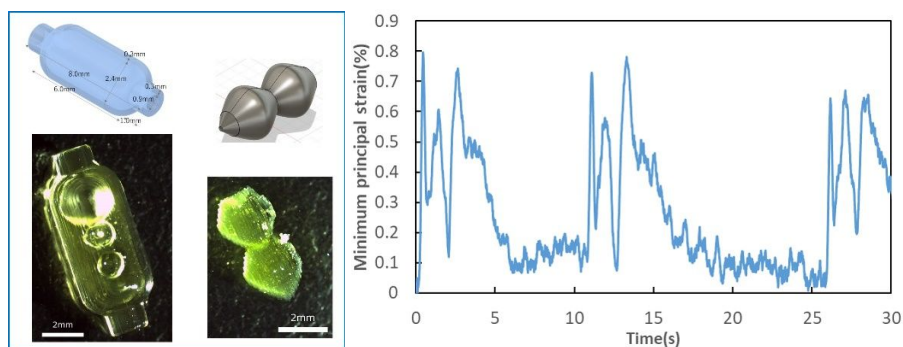


図6 3D足場構造体とハイブリッド構造体表面での主ひずみの時間変動

### 参考文献

- (1) H. Sekine, T. Shimizu, J. Yang, et al. : Pulsatile Myocardial Tubes Fabricated With Cell Sheet Engineering : Circulation, 114, 2006, I-87-I-93.
- (2) M. Kawamura, S. Miyagawa, S. Fukushima, et al.: Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart : Circulation, 128, 2013, S87-S94.
- (3) J. M. Guccione, L. K. Waldman, A. D. McCulloch : Mechanics of Active Contraction in Cardiac Muscle: Part II—Cylindrical Models of the Systolic Left Ventricle : Journal of Biomechanical Engineering, 115, 1993, 82-90.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Mitsugu Todo, Hiroko Kurita	4. 巻 5
2. 論文標題 Comparison of stress-strain response of iPS cell-derived cardiomyocytes sheet and tube structures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mechanics of Soft Materials	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Hiroko Kurita, Mitsugu Todo	4. 巻 165
2. 論文標題 Nonlinear active stress - principal strain relation during pulsation of human iPS cell derived cardiomyocyte sheet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mechanics of Materials	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mechmat.2021.104199	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 Hiroko Kurita, Mitsugu Todo	4. 巻 343
2. 論文標題 Development of Self-Pulsatile hybrid cylindrical structure using human iPS cell-derived cardiomyocytes and polydimethylsiloxane	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Materials Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.matlet.2023.134373	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 栗田寛子、東藤貢
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋3次元構造体の作製と拍動にともなう変形・流動の解析
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mitsugu Todo, Shahrul Hisyam Marwan
2. 発表標題 Effects of Viscoelastic Response on Dynamic Deformation of Artificial Polymeric Heart Valve
3. 学会等名 ICMR2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白澤 廉, 東藤 貢
2. 発表標題 心筋細胞とポリマーゲルを用いた3D構造体の開発
3. 学会等名 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東藤貢、栗田寛子
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた自己拍動チューブの作製と理論モデルの構築
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東藤貢、長崎快
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞組織体の拍動挙動に及ぼす電気刺激の影響
3. 学会等名 第35回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長崎快、東藤貢
2. 発表標題 iPS細胞由来心筋シートの応力 ひずみ応答に及ぼす強制拍動の影響
3. 学会等名 第34回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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