

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年 6月 6日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500424

研究課題名（和文）培養心室細胞由来基質上でのES細胞の分化促進による
心室モデルの創出

研究課題名（英文）Enhancement of the Differentiation of Cardiomyocytes from Mouse Embryonic Stem Cells and Creation of Ventricular Model based on modification of scaffold

研究代表者

馮 忠剛（FENG ZHONGGANG）

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：10332545

研究成果の概要（和文）：

本研究は、ES/iPS細胞の心筋症治療の早期実現における二つの重要な課題：心筋細胞への効率的分化誘導と体外での再生組織の構築、を取り組んで、幹細胞工学、タンパク質工学及び細胞組織工学の融合により、新たな細胞分化培養基質支持層を開発し、この支持層上にマウスES細胞の分化促進と心筋組織単層の作成を行い、多数単層の積層によって心筋再生組織を構築した。上記の実験研究により、ES細胞の心筋細胞への分化誘導、培養基質の力学特性およびそのES細胞の分化に及ぼす影響、並びに体外心筋再生組織構築における新知見を得、課題の更なる進展に関する重要な方法を示した。

研究成果の概要（英文）：

This research deals with the two critical issues for the realization of the clinical use of ES/iPS cells in the treatment of heart failure: one is the effective differentiation into cardiomyocytes from ES/iPS cells, and another is the creation of cardiac tissue equivalent. By the integration of stem cell engineering, protein engineering, and tissue engineering, a novel method for fabrication of natural-ECM included scaffold layer was developed; differentiation into cardiomyocytes was enhanced on this scaffold; and furthermore, cardiac tissue equivalent was created through stacking multi such layers. The above experiments have brought out findings in the differentiation of mouse ES cells into cardiomyocytes, in the effect of mechanical characteristics of scaffold on the differentiation, and in the construction of cardiac tissue equivalent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：細胞・組織工学

1. 研究開始当初の背景

胚性幹（ES）細胞・iPS細胞は心筋障害に

対する新たな治療法として注目されている。しかし、その臨床応用を実現するためには、

まず貴重な細胞ソースの有効的な利用およびガン化防止のため、幹細胞を高効率に分化誘導しなければならない。次に、分化した細胞を患部に注入することだけでは、細胞接着率・自体細胞との統合の低下などの問題点によって、所望の治療効果が得られないことが分かってきたので、分化細胞を用いて体外に移植組織を構築してからの治療戦略は期待されている。

これまで ES 細胞・iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導法は心筋の正常発生過程を模倣することであって、主に生化学的誘導因子の培養液中の添加によって分化誘導を行う。しかしながらこのような方法は、まだ十分な分化効率を得ることができていない。体外心筋再生組織の構築においては、成型した scaffold または完全な心臓器官を脱細胞してその細胞外マトリクス構造を利用する Top-down の方法と東京女子医大の岡野教授が開発した細胞シート工学による Bottom-up の技法が存在するが、それぞれの方法は利点と問題点が併存し、いずれも満足していく構築方法ではない。近年、細胞外基質の生化学特性、物理特性が幹細胞の分化誘導・分化促進に大きな影響を及ぼすことが明らかになって来た (Engler A et al., Cells, 126:677-89, 2006; Chen S et al., Stem Cells, 25:553-61, 2007)。

申請者は細胞外基質を有効に利用することは幹細胞の効率的な分化誘導と優れた心筋再生組織の構築法の二つの課題の接点として考え、培養心室細胞由来基質上での ES 細胞の分化促進と心室モデルの創出を提案した。

2. 研究の目的

幹細胞工学、タンパク質工学及び細胞組織工学の融合による応用基礎研究として、本研究は：

(1) 培養した胎児心室細胞の産出した細胞外基質上に ES 細胞を心筋細胞に分化促進する。そのための基質支持層を作成し、その上に ES 細胞を培養・分化し、細胞組織工学的心筋単層を作成する；

(2) この心筋単層を基本要素として積層し、我々がこれまでに開発した心筋再生組織の構築手法を改良し、生体機能 (Frank-Starling 則) を有する心室モデルを創出する。

3. 研究の方法

我々はこれまでの研究成果を踏まえ、以下の独創かつ革新的な 3 段階の方法で ES 細胞から心筋再生組織を構築する。

(1) 胎児心室由来細胞を培養し、培養液・期間の調整により ES 細胞の心筋細胞の分化を促進する細胞外基質を分泌させ、細胞外基質支持層を作成する。

(2) その上にマウス ES 細胞を培養、心筋細胞に分化し、細胞組織工学的心筋単層を作成する。段階 (1)、(2) の特徴：幹細胞の増殖、分化誘導を細胞の monolayer 培養で行う；細胞外基質の分化促進作用を利用できる；構造の基礎強度が確保される。

(3) この心筋単層を積層し、心筋単層間に局所流れを培養液灌流によって作り出し、更に我々が既に開発した電気-応力バイオリアクタに基づき新たな電気-収縮・拡張-灌流微小管ネットワーク bioreactor を開発し、そこでの培養によって生体機能 (Frank-Starling 則) を有する心室モデルを創出する。段階 (3) の特徴：組織構築中での細胞播種・接着率などに当たる問題を回避できる。構造内部が灌流でき、更に毛細血管の生成も期待できる。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞の心筋細胞への分化誘導について

マウス ES 細胞の前期分化誘導においては、広く使われる BMP2 誘導-胚様体形成法を採用し、その分化は BMP2 で処理した後に分化を始めた細胞 (未分化状態のマーカーである SSEA-1 が発現されていない細胞、以下 SSEA-1⁻細胞) と始めなかった細胞 (SSEA-1 発現している細胞、以下 SSEA-1⁺細胞) を磁気分離法により分けて、それぞれの心筋細胞への分化の割合を比較した。BMP2 によって誘導され分化を始めた細胞は拍動する胚様体の割合がピークに達する時期は早かったもののその割合は低く、分化が始まらなかった細胞は拍動する胚様体の割合がピークに達する時期は遅かったもののその割合は高くなる、という結果が得られた (図 1)。

このような結果を引き起こした原因を検討するために、マウス ES 細胞の心筋細胞への

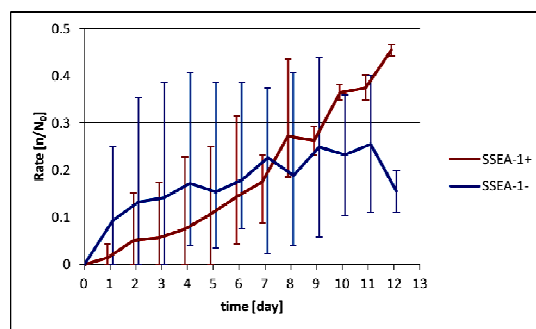


図 1 SSEA-1⁺細胞と SSEA-1⁻細胞の心筋細胞への分化の割合

分化過程の重要時期に細胞サンプルを採取し、分化過程を示す特異マーカーである Brachyury (Bry)T、Mespl、Islet (Isl)1、Nkx2.5、Hand2、および心筋細胞への分化促進因子である p300、Serum Response Factor (SRF) の mRNA 発現量を RT-Real Time PCR 法を用いて比較・検討した。その結果、BMP2 の処理に因って早期に分化を開始した SSEA-1⁻ の培養細胞では、細胞群内の分化促進が弱く、これに対して SSEA-1⁺ の細胞は主要転写因子の発現時期が遅れるが、再播種の刺激によって分化促進因子 p300 と SRF の高い発現を誘発し SSEA-1⁻ の培養細胞よりも高い分化割合を達成した (図 2)。この結果は分化促進因子の特定時期の高い発現が今後の ES 細胞の心筋細胞への高効率な分化誘導に重要であることを示唆した。

(2) 細胞外基質支持層の作成とマウス ES 細胞の心筋細胞への分化誘導について

ラット胎児心室由来細胞を培養し、培養液・期間の調整により ES 細胞の分化に促進する細胞外基質を分泌した培養細胞 monolayer を glutaraldehyde により固定化する後、Triton X-100 で透過し、残った細胞外基質に、分化したマウス ES 細胞を播種、心筋細胞の分化を促進する実験を行った。また、基質支持層として羊膜の優れた力学特性に着目し、脱細胞した豚羊膜を酢酸処理による構造改良を行い、その上に分化したマウス ES 細胞を播種し細胞組織工学的な心筋単層を作成した。支持層の主体である豚羊膜の力学特性を引張試験により詳細に調べた (図 3)。更に計測されたデータに基づき非線形粘弾性モデルを提案した。この非線形粘弾性モデルは、非線形弾性体 3 つと非線形粘性体 2 つによって構成されており、弾性係数 C_1 、 C_2 、ひずみ指数 α および応力緩和係数 λ_1 、 λ_2

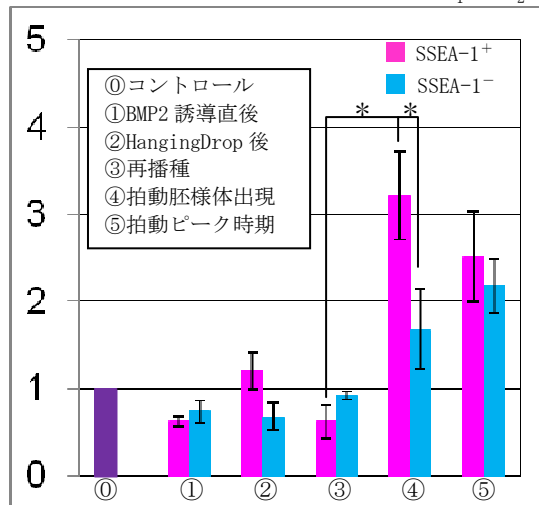


図 2 各分化時期に心筋分化促進因子 SRF の SSEA-1⁻ と SSEA-1⁺ 細胞における発現 (n=4)

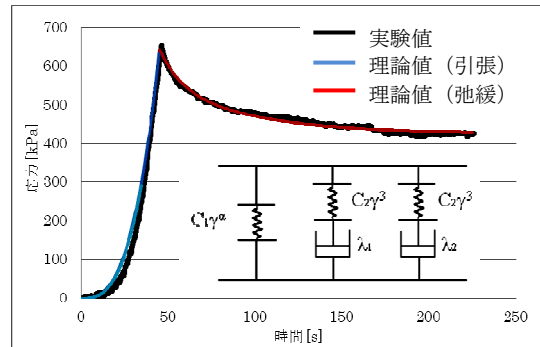


図 3 豚羊膜の粘弾性とその力学構成モデル

の 5 つのパラメータを持っている (図 3)。実験データの解析によって羊膜には等方性と局部的異質性の素材であることが分かった。粘弾性特性に関して、腹部の弾性係数 C_1 は 2.8 ± 1.8 MPa、 C_2 は 2.3 ± 1.7 MPa、ひずみ指数 α は 3.1 ± 0.6 、応力緩和係数 λ_1 は 13.9 ± 6.0 s、 λ_2 は 55.9 ± 11.3 s で、背部の弾性係数 C_1 は 1.3 ± 1.2 MPa、 C_2 は 0.8 ± 0.5 MPa、ひずみ指数 α は 3.3 ± 1.2 、応力緩和係数 λ_1 は 10.6 ± 2.8 s、 λ_2 は 48.5 ± 5.8 s である。弾性係数、応力緩和係数共に腹部の方が背部より大きいことが分かった。強度特性では、腹部の最大応力は 2.6 ± 0.9 MPa、最大ひずみは 0.8 ± 0.1 、ヤング率は 7.3 ± 1.7 MPa で、背部の最大応力は 0.8 ± 0.3 MPa、最大ひずみは 0.8 ± 0.2 、ヤング率は 2.3 ± 0.6 MPa である。このことから、腹部の羊膜は背部に比べて強度が高いことが分かった。このような羊膜の力学特性に関する詳細な検討は初めて (動物・ヒトを含めて) であり、取得したデータは重要な科学的な価値を有することを考えられる。

次に、心筋細胞基質付着と構造を改良した基質支持層に分化誘導した ES 細胞を再播種し、ES 細胞の分化促進と細胞組織工学的な心筋単層を作成した。この支持層は分化心筋細胞の拍動力の向上、拍動期間の延長に顕著な効果を示している。特に、一般培養法では胚様体の growth-out から採取した分化心筋細胞の再播種が自発的な拍動が著しく弱くなることに対して、支持層での培養は支持層全体に渡る強い拍動が一ヶ月位に維持している。また、支持層の平面変位から心筋細胞拍動の強度を評価する方法を提案し、分化心筋細胞の拍動を定量的に評価することが出来た。更に、支持層の力学特性を調整し、その胚様体の心筋細胞の分化率に及ぼす影響を調べたところ、支持層の最適な弾性特性が存在することが示唆された (図 4)。

(3) 心筋単層の積層に用いる電気刺激-培養液灌流バイオリアクタの開発

上記の心筋単層組織を用いて心室モデルを構築するために、複数の単層を積層する必

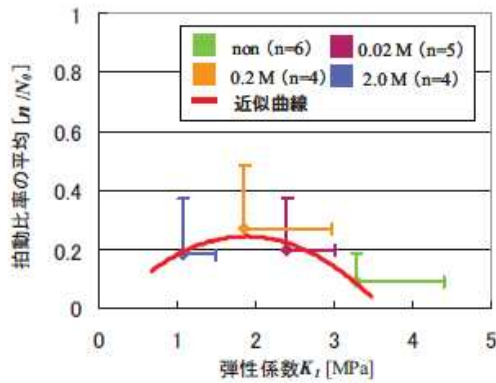


図4 基質支持層の弾性係数と心筋細胞の分化率との関係

要がある。このために、積層用培養液灌流バイオリアクタを開発した。このバイオリアクタは電気刺激装置と培養液灌流装置の二つの部分からなり、まずそれぞれの開発に進み、最後に統合して心室モデルの培養に利用する。電気刺激装置については我々既に開発した応力-電気刺激培養リアクタを改良し、特に電気刺激の強度、頻度、および duty ratio をより幅広い範囲で調整できるようになった。培養液灌流装置については、図5に示す市販CO₂-インキュベータ内に使用できる小型灌流装置を開発した。この装置の積層原理は多層積層構造上に適切な物理的圧力を等間隔で印加し、圧力を受けた部分は密な組織結合が出来、圧力を受けていない間隔の部分は培養液灌流が流れる部位で血管と血管新生促進の役割を担っている。図5の原型装置はこの積層培養原理を確認することができた。しかし、長期培養においては灌流流路の継続的な確保という問題点が出てきて、更なる改良が必要である。

上述の本研究の成果は ES 細胞の心筋細胞への分化誘導、培養基質の力学特性およびその ES 細胞の分化に及ぼす影響、並びに体外



図5 心筋単層の積層培養に用いる培養液灌流バイオリアクタ

心筋再生組織の構築における新たな知見を得、特に培養基質支持体の開発と有効的な利用は ES/iPS細胞の心筋症治療の早期実現に向けて、二つの重要な課題：心筋細胞への効率的分化誘導と体外での再生組織の構築、を解決する重要な鍵になっていることを示唆した。本研究に関する発表論文の内、Viscoelastic characteristics of contracted collagen gels populated with rat fibroblasts or cardiomyocytes. J of Artif Organs, 2010; 13(3):139-144. (Z Feng, D Seya, T Kitajima, T Kosawada, T Nakamura, M Umezumi) は2011年度日本人工臓器学会論文賞(広領域)を受賞した。

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3件)

1. I Suzuki, Y Shiraishi, S Yabe, Y Tsuboko, TK Sugai, K Matsue, T Kameyama, Y Saijo, T Tanaka, Y Okamoto, Z Feng, T Miyazaki, M Yamagishi, M Yoshizawa, M Umezumi, T Yambe. Engineering analysis of the effects of bulging sinuses in a newly designed pediatric pulmonary heart valve on hemodynamic function. J of Artif Organs. 2012;15:49-56. (査読有り)
2. Z Feng, S Fukuda, M Yokoyama, T Kitajima, T Nakamura, M Umezumi. Flux characteristics of cell culture medium in rectangular microchannels. J of Artif Organs. 2011;14:238-244. (査読有り)
3. Z Feng, D Seya, T Kitajima, T Kosawada, T Nakamura, M Umezumi. Viscoelastic characteristics of contracted collagen gels populated with rat fibroblasts or cardiomyocytes. J of Artif Organs. 2010;13:139-144. (査読有り)

[学会発表] (計12件)

1. Z Feng, Y Wagatsuma, S Kobayashi, T Kosawada, D Sato, T Nakamura, T Kitajima, M Umezumi, Analysis of the Contraction of Fibroblast-Collagen Gels and the Traction Force of Individual Cells by a Novel Elementary Structural Model. 35th Annual International IEEE EMBS Conference, July 3-7, 2013, Osaka, Japan. (査読有り)
2. Z Feng, T Kitajima, T Nakamura, N Shirasawa, M Umezumi. Modeling the contraction process of collagen gels

populated with living cells. Proceedings of JSS2012 International Conference on Simulation Technology (USB version) pp635-9. Sep 27-28, 2012, Kobe, Japan. (査読有り)

3. 菊地真郷, 佐々木 美季, 馮忠剛, 中村孝夫, 梅津光生: 足場素材の力学特性とマウス ES 細胞の心筋細胞への分化誘導に及ぼす影響. 生体医工学会シンポジウム 2012 講演予稿集 (USB 版) pp294-295, 2012. 9. 7-8, 大阪 (査読有り)

4. 馮忠剛, 中村孝夫, 白澤信行, 小沢田正, 北嶋龍雄, 梅津光生: コラーゲンゲル中のコラーゲン原線維の幾何学パラメータの測定. 第 51 回日本生体医工学会大会, 2012. 5. 10-12, 福岡 (概要査読有り)

5. 馮忠剛, 中村孝夫, 梅津光生: Modeling the contraction process of collagen gels populated with living cells. 第 49 回日本人工臓器学会, 2011. 11. 25-27, 東京 (概要査読有り)

6. 馮忠剛, 倉茂さくら, 中山綾子, 土原龍夫, 小沢田正, 白澤信行, 中村孝夫, 北嶋龍雄, 梅津光生: マウス ES 細胞からの分化細胞を播種したコラーゲンゲルの力学特性. 第 45 回日本生体医工学会東北支部大会, 2011. 10. 29, 盛岡 (概要査読有り)

7. Feng Z, Kosawada T, Nakamura T. A nonlinear structural constitutive model to capture the mechanical characteristics of contracted collagen gels populated with living cells. 日本機械学会東北支部第 47 期秋季講演会, 2011. 9. 22, 米沢 (査読有り)

8. 馮忠剛, 瀬谷大貴, 白澤信行, 小沢田正, 北嶋龍雄, 中村孝夫, 梅津光生. 生細胞の播種による収縮したコラーゲンゲルの力学特性とその非線形構造方程式. 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011. 4. 29-5. 1, 東京 (概要査読有り)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馮忠剛 (FENG ZHONGGANG)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 1 0 3 3 2 5 4 5

(2) 研究分担者

中村孝夫 (NAKAMURA TAKAO)

山形大学・医学(系)研究科(研究院)

・教授

研究者番号: 0 0 1 4 2 6 5 4

梅津光生 (UMEZU MITSUO)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号: 9 0 1 3 2 9 2 7

小沢田正 (KOSAWADA TADASHI)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 1 0 1 4 3 0 8 3