

## 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 5 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591546

研究課題名（和文）

Scaffold を用いない自己細胞由来心臓弁の作成

研究課題名（英文）

Development of scaffold-free heart valve using autologous cell

研究代表者

古川 浩二郎（FURUKAWA KOUJIROU）

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：90264176

研究成果の概要（和文）：

元来接着系細胞が有する自己凝集能（細胞の自己組織化）を利用して細胞のみで生体に移植可能な 3 次元的心臓弁構造体を作成した。血管平滑筋細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞を適切な細胞数、比率で混合して 3 次元培養（スフェロイド形成）し、スフェロイドを融合させながら、心臓弁の形態に構築することで最大径 1cm の Valsalva 洞構造を有する三尖弁の心臓弁構造体を作成した。

研究成果の概要（英文）：

We fabricated scaffold-free 3-Dimensional cardiac valve structure using spheroid based technology. Proper vascular like tissue spheroids are fabricated with vascular smooth muscle cells, dermal fibroblasts, and vascular endothelial cells. We also fabricated 3-D heart valve structure with sinus of valsalva using robotic procedure. These structure contain rich extracellular matrix similar to native vascular and heart valve.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心臓大血管外科、再生医療、心筋再生、組織工学

## 1. 研究開始当初の背景

心臓弁膜症による手術は、現代の高齢化社会を反映して増加傾向にある。心臓の弁機能を再建する手段のひとつとして、心臓弁置換術がある。心臓弁の種類には現在、機械弁と生体弁が存在する。耐久性、術後の抗凝固療法の必要性などの観点から使い分けがなされる。さらに異物であるため感染の合併症を起こした場合致命的になるという点、小児など成長し、心臓のサイズが大きくなる場合、人工物では追従できないなどの問題があり、万

能な心臓弁は今のところ存在しない。

以上のような背景のなか、自己の組織からなる心臓弁を作成できれば上記問題を解決できる次世代型心臓弁となりうると考えられる。

近年の iPS 細胞を筆頭とした再生医療技術の開発は目覚ましいものがあり、近未来的な自己細胞による臓器再生医療を実現しうるものと考えられる。これらの細胞の臨床への利用方法として、古くは細胞を直接臓器へ注入したり、静脈・動脈注射による手法によりなされてきたが、生着効率の悪さなどが問題視さ

れている。一方 1993 年頃から Vacanti らにより組織工学 (Tissue Engineering:TE) という概念が提唱され、コラーゲンや PLA などの生体溶解性の足場を利用し組織を構築する技術が提唱されている。本手法は足場に外来異物を用いる為、生体溶解性素材に対するアレルギー、感染症など問題の解決という課題が残されている。細胞のみで機能的な組織作製する技術として、近年、温度感応性シートという手法を用いて細胞のみで構築されるシートを形成し心筋再生や角膜、食道の再生医療として臨床応用されている。これらの画期的な技術は、再生医療に向けた極めて有効なルールであるが、例えば、再生に形態学的特徴や力学的作用を有するような、心筋、血管、軟骨、弁などを細胞だけで構築するような技術はなく未だ開発途上であるといえる。臨床応用を見据えた細胞のみで形成される、副作用の少ない

3次元機能的な心臓弁組織作成技術の開発が期待される。

## 2. 研究の目的

我々は、3次元培養法であるスフェロイド形成に着目し、より生体に近い機能を持たせるため目的とする臓器特有の細胞を組み合わせより高機能化させる技術、および複数種類の細胞が混合したスフェロイドをさらに融合させより立体的、高機能な組織を形成する技術開発を行う。最終的に、細胞のみで複雑な形態かつ高機能な組織である心臓弁の作成を作成することを目的とする。

## 3. 研究の方法

細胞の調節

### ヒト大動脈血管平滑筋細胞

Human Aorta Smooth Muscle Cells (HASMC) : (Sciencell)、10%DMEMにて培養P5-9の内皮細胞を使用した。目的の細胞数を得るまで10cmディッシュおよび15cmディッシュで培養。

### 血管内皮細胞 (EC)

Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells (HCMEC) : (Sciencell)。専用の ECM (Endothelial Cell Medium) で培養P5-9の内皮細胞を使用した。目的の細胞数を得るまで10cmディッシュおよび15cmディッシュ (Type I Collagen Coated Dish) で培養した。

### 繊維芽細胞 (FB)

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (成人) (NHDF-Ad) 販売元 CMW (LONZA) より購入。DMEM (Low Glucose) (和光純薬) +10%FBS (sigma) +P/S

液で培養し P5-10 の細胞を使用。Passage は 0.05%トリプシンを使用。培養容器は 10cm ディッシュ、15cm ディッシュ (NUNC、Corning 社製等)、あるいは5層のBD Falcon セルカルチャー マルチフラスコにて目的細胞数を得るまで培養した。

### スフェロイド形成方法

上記の細胞を必要量培養し、トリプシン処理して適切な培養液を用いて細胞懸濁液を作成する。この際、2種類、あるいは複数種類の細胞を一定の配分で混合して懸濁液を作成した。プレートは主に住友ベークライト社製 96 ウェルプレート (prime surface) に一定の細胞数で播種すると 12-48 時間でスフェロイドを形成する。

作成したスフェロイドを免疫染色、HE 染色、cell tracker を用いた生細胞イメージングなどで解析して条件を最適化した。

以下の図 1 に示す、佐賀大学理工学部の中山教授が、Cyfuse 社と澁谷工業と開発中の 3-D Biofabrication System

### 3次元心臓弁組織作成方法

住友ベークライト社製 96 ウェルプレート

(prime surface) に平滑筋細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞を 8000 : 16000 : 4000 で混合して弁組織型スフェロイドを作成した。培養液は 10%DMEM を用いた。構造体作成は

以下の図 1 に示す、佐賀大学理工学部の中山教授が、Cyfuse 社および澁谷工業と開発中の 3-D Biofabrication System を用いて、スフェロイドを任意のデザインで3次元化した。

図 1 : 3-D biofabrication system

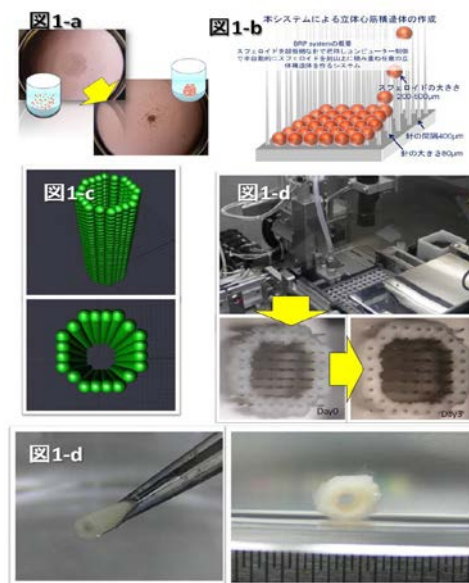


図1:スフェロイドを任意の大きさ(細胞数)、細胞種類、混合比率で調節して作成することで機能的な生存率の高い組織型スフェロイドを作成できる。さらに、スフェロイドを最小単位としてを任意の3次元構造をプログラムし、ロボットにより精密に積層して3次元化していく。積層は剣山システム(図1-b、d)を用い、1週間程度剣山で静置培養後、剣山を除去すると完全に Scaffold フリーの構造体を作成できる。

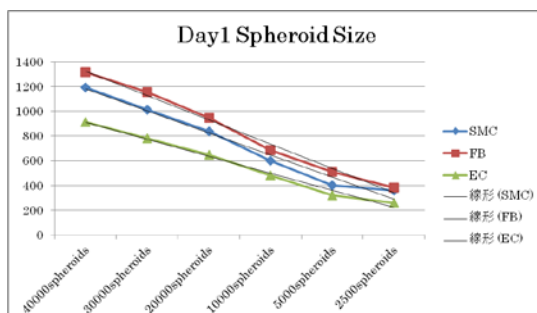
弁組織として、最大径1cmの三尖弁(バルサルバ洞付)と、半月弁の弁尖1枚、および人工心膜を想定した、血管パッチの作成を行った。評価は、肉眼的評価とHE、マツソントリクローム染色、EVG染色などを行い評価した。

#### 4. 研究成果

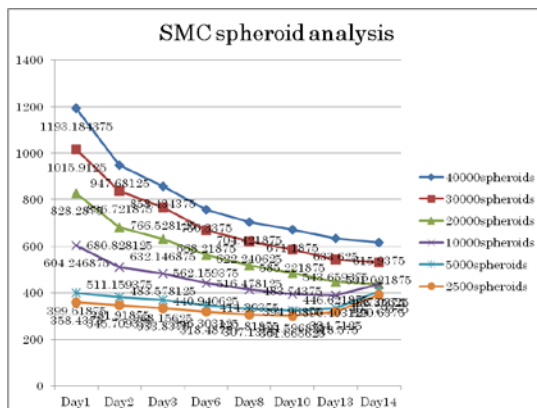
##### (1) 弁組織型スフェロイドの条件検討。

血管平滑筋細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞を用いて弁組織型スフェロイドを作成、細胞数、大きさの関係や細胞種類の配合で内部の細胞配列がどう変化するかを評価、定量化した。

表1:SMC(血管平滑筋)、FB(繊維芽細胞)、EC(血管内皮細胞)スフェロイドの播種細胞数とスフェロイドの直径の関係



同細胞数で播種した場合はFB>SMC>ECで若干大きくなる。播種細胞数とスフェロイド直径には相関関係がある。



(表2)スフェロイドは時間とともに凝集を強めそのサイズは縮小していくが、約10-14

日程度で定常状態になる。

##### (2) 細胞種類、混合比率の検討。

混合比率の検討

SMC、FB、ECを2:2:1、1:2:1、2:1:1等配分を変化させスフェロイド形成過程における血管内皮細胞や平滑筋細胞の局在を示した(図2)

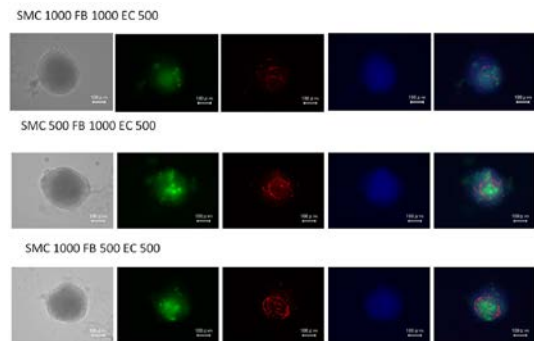


図2: SMCを緑色、ECを赤色、繊維芽細胞を青でtracingし、混合培養してスフェロイド形成した。内部に血管網や血管腔を有する血管・弁組織型スフェロイドの作成が可能である。内皮細胞の比率を変化させることで血管構築率を変化させることができる。

弁組織は本来は細胞数が少なく、弾性繊維メインで構築されている。そのため、同様の強度を出すためには繊維芽細胞、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞間相互作用により単独細胞のみでは産生できない蛋白賛成を目的として、SMC:FB:EC=2:3:1でスフェロイドを作成することとした。

##### (3) 組織型スフェロイドは適切な配置・条件で互いに融合し新たな組織を作る(自己組織化)

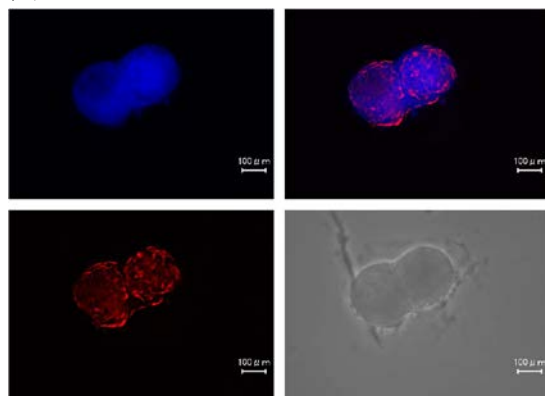


図3:血管内皮細胞を混合させた組織型スフェロイド同士を近接させると融合してさらに立体的な3次元組織を構築できる事が確認できた。本現象は他の細胞腫および複数種の細胞を混合させたスフェロイドでも再現できることも確認した。

スフェロイド構築後1-7日目までの範囲で時期をずらして融合させたところ、24時間以内

にスフェロイド同士が融合することを確認した。

#### (4) 半月弁尖の作成

SMC、FB、EC を 8000 : 12000 : 4000/spheroid で混合させ弁組織用スフェロイドを作成した。スフェロイドを図 4-1 の 3D デザインで積層して弁尖組織の構築を行った。

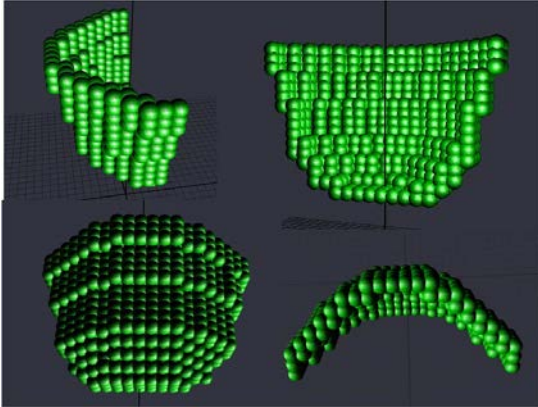
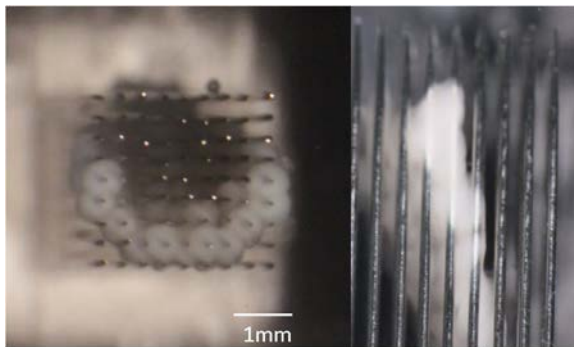


図 4-1  
弁尖 3 次元デザイン。大きさ 3X3X5mm 程度。緑の球一つがスフェロイドに相当する。

図 4-2 temporal scaffold (剣山システム) での培養

スフェロイドを上述の 3 次元デザインとするためスフェロイドを一時的に固定させる temporal scaffold として 8X8 の微針による剣山モールドを開発して静置培養している図。約 1 - 7 日間の培養で融合して組織化する。写真は剣山上で融合しつつあるスフェロイド。



#### 図 4-3 弁尖の組織学的評価

上述図 4-2 の剣山上で 1 週間静置培養を行った後に剣山からリリースしてホルマリン固定ごパラフィン切片を作成して HE 染色、MT 染色、EVG 染色を行った。

弾性繊維は認められなかったが、コラーゲンリッチな組織構築に成功した。弾性繊維の構築には外的刺激やサイトカインの添加が必要かと考えられた。

得られた組織は高密度細胞凝集体であり、外来異物を全く内部に含まない構造体の作成に成功した。

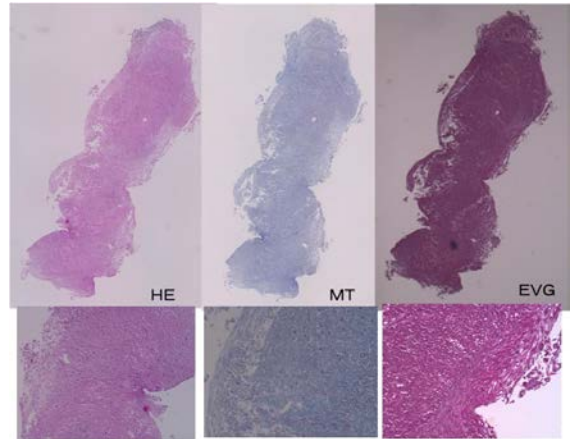


図 4-3

#### (5) Valsalva 洞を有する大動脈弁様構造体の作成

SMC、FB、EC を 8000 : 12000 : 4000/spheroid で混合させ弁組織用スフェロイドを作成した。スフェロイドを図 5-1 の 3D デザインで積層して弁尖組織の構築を行った。

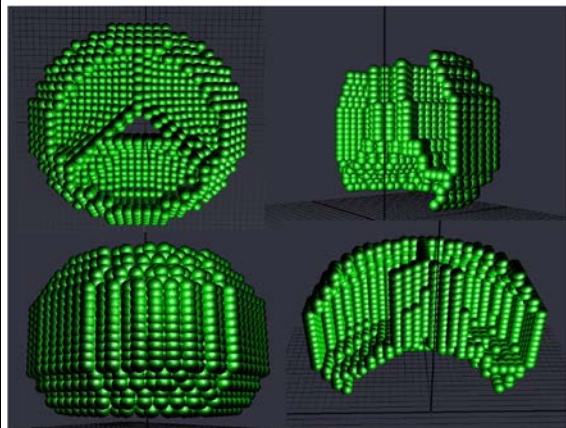


図 5-1 3 次元弁モデル

最大径 10x10x10mm、上記デザインで弁組織型スフェロイドを積層して新規開発した微針が 26x26 搭載されたの大型剣山上にある弁組織 (図 5-2)

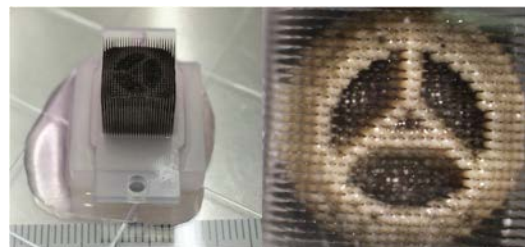


図 5-2

剣山上で培養される三尖弁型心臓弁構造体

### (6) バイオリアクターの開発

上述の(5)の大型弁構造体作成において大型剣山の中心部は、静置培養条件下において培養液の循環効率が極めて悪く構造体の部分的崩壊を認めた。そのため、循環効率をアップさせることと、組織に力学的流れ刺激などを与えることを目的としてバイオリアクターの開発を行った。(図6-1)



図6-1 構造体内部を培養液で還流する簡易型バイオリアクター(現在開発段階)

### (7) 結語

本研究では、細胞のみで複雑な構造である心臓弁の形態を構築することに成功した。組織学的評価でも、細胞外マトリックスが豊富な組織を細胞のみで構築できていた。

#### 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1件)

- ① 森田茂樹、野口亮、野出孝一、中山功一：  
再生医療による人工臓器研究の最近の進歩：Scaffold free の心臓・血管組織の構築、人工器 査読なし 41.3.168-171.2012  
[学会発表] (計5件)

① 野口亮、ISHLT 2013  
Development of 3-Dimensional Prevascularized Scaffold-free Contractile Cardiac Patch for Heart Regeneration  
2013.4.24~27 カナダ モントリオール国際会議場

② 野口亮、第113回日本外科学会定期学術集会、新しい組織工学を用いた自己細胞のみで形成される3次元組織構築法の開発  
2013.4.11~13、福岡国際会議場

③ Morita Shigeki, Ryo Noguchi<sup>1</sup>  
第77回日本循環器学会

Title : Spheroid Based Cardiovascular Regeneration using Robotics Engineering  
2013.3.15~17 パシフィコ横浜

④ 野口亮、第9回 CTRC (Cardiovascular Translational Research Conference)

2013年1月12日 新規組織工学による心臓・血管再生医療、福岡グランドハイアット  
⑤ 野口亮、第29回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会

2012年10月26日 27日 Title: Spheroids Based Scaffold-free Tissue Engineering for Cardiovascular Regeneration、九州大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：心臓又は血管組織型スフェロイド

発明者：森田茂樹、野口亮

権利者：佐賀大学

種類：特許

番号：特願 2013-053037

出願年月日：2013年3月15日

国内外の別：国内

○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

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 浩二郎 (FURUKAWA KOUJIROU)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：90264176

(2) 研究分担者

森田 茂樹 (MORITA SHIGEKI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：70243938

野出 孝一 (NODE KOUICHI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80359950

中山 功一 (NAKAYAMA KOUICHI)

佐賀大学・工学系研究科・教授

研究者番号：50420609