

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293298

研究課題名(和文) 新規組織工学によるiPS細胞からの心臓血管臓器再生療法の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative therapy for cardiovascular organ from induced pluripotent stem cells using new tissue engineering

研究代表者

森田 茂樹 (Morita, Shigeki)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：70243938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：接着系細胞が元来有する細胞凝集現象により細胞のみで構成される細胞凝集塊＝スフェロイドに着目し、さらにスフェロイドを一つの単位として複雑な形状の組織をロボットにて作成するシステムを開発し、研究を進めてきた。本研究ではiPS細胞技術を我々の3次元化システムに導入し、ヒトiPS由来細胞を用いた心筋・血管構造体を構築するモデルの確立と機能解析を行った。構造体同士の連結による組織の大型化、高機能化のため、より生理的な環境下で長期的に培養できるバイオリアクターを開発した。線維芽細胞を主体とする体細胞からなる血管構造体を用いて大動物(ミニブタ)に短期移植可能な構造体の作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel method to create scaffold-free tissue from spheroid using a robotics system. This system enables the creation of pre-designed three-dimensional structures using a computer controlled system. In this research, we introduced induced pluripotent stem cell technology into our three-dimensional system, established a model for building the myocardium and the vascular structure using cells derived from human iPS, and carried out functional analysis. For the purpose of upsizing and high functionality of the tissue, a bioreactor was developed in which tissues can be cultured over the long term within a more physiological environment. The manufacture of a structure that was implantable for the short term in an animal (mini-swine) was successful.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療 組織工学 心筋再生 血管再生 心臓血管外科

1. 研究開始当初の背景

2012年のノーベル医学・生理学賞を受賞した、京都大学山中教授のiPS細胞技術を筆頭に、近年の幹細胞技術の発展、臨床応用への開発・研究は目覚ましいものがある。幹細胞由来細胞の臨床応用を目指した、分化効率や安全性、純化の研究など世界中でなされる一方で、同時に細胞から組織等を構築し移植する技術の開発も急務である。これらの技術により得られた細胞の臨床への利用方法としては、古くは細胞を直接臓器へ注入したり、経カテーテル的に静脈あるいは動脈内に注入することによりなされてきたが、生着効率などで問題視されている。1993年に Vacanti らにより組織工学という概念が提唱され、コラーゲンやポリ乳酸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報告されてきた。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。さらに近年では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膜や角膜、食道粘膜の再生医療として臨床応用されている。これらの画期的な手法は、再生医療に向けた極めて有効な技術であるが、シート(膜)状のものが主であり複雑な形態学的特徴や力学的作用を有する心筋、血管、弁、気管などを細胞だけで構築するような立体造形技術は開発途上であるといえる。我々は、近年、接着系細胞が元来有する細胞凝集現象により細胞のみで構成される細胞凝集塊 = スフェロイド (Spheroid) に着目し、さらにスフェロイドを一つの単位として複雑な形状の組織をロボットにて作成するシステムを開発し、研究を進めてきた。

本技術を用いて3次元構造体を構築する利点は、2次元培養と比較してスフェロイド形成段階で細胞外マトリックスが生理的に産生されており、より生体に近い機能を発現できること。足場 (Scaffold) としての外来異物を全く含まず細胞のみで組織を構築できること。

移植対象に適合させた、さまざまなデザインが可能であること。等が挙げられる。

2. 研究の目的

当該技術は接着系細胞ならほぼすべての細胞種でスフェロイドを形成し本システムを応用することが出来る。本研究では我々の3次元化システムでヒトiPS由来細胞を用いた心筋・血管・弁構造体を構築するモデルを確立する。さらに、3次元化した構造体の成熟方法の検討、中・大動物(免疫抑制ウサギやミニブタなど)への移植モデルの構築とその検証まで行う

3. 研究の方法

iPS細胞からの心筋細胞、血管内皮細胞、壁細胞(血管平滑筋細胞)の分化・純化・大量培養法の確立を行う。同時に、生物学的に機能する組織型スフェロイドの作製についての条件検討、機能解析を行う。条件が決まれば、心筋、血管、弁の作成に進む。組織の大型化、高機能化が必用となるため、システムの改良および、完成した立体組織を、より生理的な環境下で長期的に培養できるバイオリクターの開発を行う。作製した構造体を動物に移植し可能なら長期データを採取する。

4. 研究成果

京都大学iPS細胞研究所(CiRA)のプロトコールを用いてSNLフィーダー細胞や

MEF の準備および、ヒト iPS 細胞(201B7 および 251G1)の維持培養を行いつつ、その未分化 iPS 細胞を拍動する心筋細胞へと分化させ、心筋スフェロイド作製まで可能であることを確認した。心筋細胞への分化効率を安定的に上げられるような培地やフィーダー細胞の検討を行った結果、AK03 培地にて効率的に未分化 iPS 細胞を増やすことができ、さらに SNL フィーダーもしくは MEF を用いた方が、フィーダーフリーよりも安定的に心筋に分化誘導できた。将来的にヒトへの移植を行う場合は、動物由来細胞の混入は避けられるべきであるが、本研究に関しては、まずは確実な心筋細胞確保がデータの安定性につながると考え、フィーダー細胞を用いた iPS 細胞維持を行った。心筋組織型スフェロイドの機能解析においては心筋細胞が純化されている市販のヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、ヒト皮下線維芽細胞やヒト iPS 細胞由来内皮細胞を任意の配合比率で混ぜることによりスフェロイドを作製し、それぞれの拍動数や拍動維持日数などを確認した。適正な環境下に置くことで心筋組織型スフェロイドは数か月以上拍動し続けることを確認した。培地成分のみでなく線維芽細胞や内皮細胞などの配合比率が拍動維持に影響した。

血管構造体に関してはヒト iPS 細胞由来内皮細胞と線維芽細胞を混合し、iPS 細胞由来血管組織型スフェロイドの作製に成功した。体細胞を用いた血管組織型スフェロイドの中に混合する線維芽細胞がコラーゲン産生の促進、血管構造体強度維持に関与している結果を得た。本結果を参考に混合する線維芽細胞の比率を上げ、かつ培養期間の延長により、正常生体血圧の 6~8 倍以上の内腔圧力に耐え得る強度を確認できた。さらに管状の構

造体内腔をより生理的な拍動流下に灌流培養できるバイオリクターの開発にも成功した。線維芽細胞を主体とする体細胞からなる血管構造体を用いて短期であるが大動物(ミニブタ)への移植に成功した。本結果を参考にヒト iPS 細胞由来内皮細胞、壁細胞等を調整、配合するなど、より機能的な血管構造体構築、移植後より長期的な検証へと発展させたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Itoh M, Nakayama K, Noguchi R, Kamohara K, Furukawa K, Uchihashi K, Toda S, Oyama J, Node K, Morita S. Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae. PLoS One 10(9) : e0136681 2015
- 2) Noguchi R, Nakayama K, Itoh M, Kamohara K, Furukawa K, Oyama J, Node K, Morita S. Development of a Three-Dimensional Prevascularized Scaffold-Free Contractile Cardiac Patch for Treating Heart Disease. J Heart Lung Transplant.35-1.137-48 2016
- 3) 伊藤 学, 中山功一, 野出孝一, 森田茂樹 バイオ 3D プリンターで立体造形した Scaffold Free の血管組織構築. 最新医学 70(8) : 79-86 2015
- 4) 伊藤 学, 中山功一, 野出孝一, 森田茂樹 バイオ 3D プリンティング技術を利用した scaffold Free 小口径細胞人工血管の開発.血管組織構築. 血

管医学 17 : 63-68 2016

〔学会発表〕(計4件)

- 1) Noguchi R, Nakayama K, Itoh M, Kamohara K, Furukawa K, Oyama J, Node K, Morita S. Development of 3-Dimensional Prevascularized Scaffold-Free Contractile Cardiac Patch for Heart Regeneration. ISHLT 2013.4.25(Montreal)
- 2) Itoh M, Nakayama K, Noguchi R, Kamohara K, Furukawa K, Uchihashi K, Toda S, Oyama J, Node K, Morita S. Implantation of Scaffold-Free Tubular Tissue Using a Bio-3D Printer Augments Vascular Remodeling and Endothelialization. American Heart Association SCIENTIFIC SESSIONS 2014.11.17 (Chicago)
- 3) Itoh M, Mukae Y, Matsubayashi K, Kawakatsu M, Furukawa K, Uchihashi K, Toda S, Oyama J, Node K, Nakayama K, Morita S. The effectiveness of using a bio-3D printer in the development of a scaffold-free regenerative vascular graft. 2015 4th TERMIS World Congres 2015.9.8-11(Boston)
- 4) 迎 洋輔, 伊藤 学, 古川浩二郎, 中山功一, 野出孝一, 森田茂樹. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞凝集塊の機能的解析. 第 68 回日本胸部外科学会定期学術集会 2015.10.19 (神戸)

〔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、中山功一、野出孝一、野口亮

権利者 : 佐賀大学

種類 : 特許

番号 : 2013-053037

出願年月日 : 2013 年 3 月 15 日

国内外の別 : 国内

6 . 研究組織

研究代表者

(1) 森田茂樹 (Morita Shigeki)

研究者番号 : 70243938

「佐賀大学・医学部・教授」

研究分担者

(2) 中山功一 (Nakayama Kouichi)

研究者番号 : 50420609

「佐賀大学・医学部・教授」

(3) 伊藤 学 (Itoh Manabu)

研究者番号 : 50555084

「佐賀大学・医学部・助教」

(4) 野口 亮 (Noguchi Ryo)

研究者番号 : 70530187

「佐賀大学・医学部・助教」

(5) 野出孝一 (Node Kouichi)

研究者番号 : 80359950

「佐賀大学・医学部・教授」