

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670389

研究課題名(和文) ヒト人工心筋細胞の純化精製と機能的心臓の三次元再構築

研究課題名(英文) Three-dimensional reconstruction of bioartificial heart by reprogrammed human cardiomyocytes

研究代表者

王 英正 (OH, HIDEMASA)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：50372579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト心臓内幹細胞とラット心筋細胞の細胞間融合を介した人工心筋細胞の大量精製後、ラット全心臓の脱細胞化による細胞外マトリックスで形成された足場の作成をした。脱細胞化した心臓への人工ヒト心筋細胞およびヒト心血管前駆細胞の再播種化することで、再構築した自家細胞由来バイオ人工心臓の機能解析及び移植検討した。細胞は $5 \times 10^7$ 個の精製したヒト人工心筋細胞と $5 \times 10^7$ 個のヒト心臓内幹細胞をPBSに希釈し、27ゲージの針使用し5回に分けて左心室内に注入する。回路内を密閉後、約8から10日間持続灌流させることで三次元培養を行い、全周性で均一な生存心血管細胞で覆われた心臓器官の形成に成功した。

研究成果の概要(英文)：The shortage of donors for heart transplantation has become a critical issue to treat the patients with end-stage of cardiac failure. We have decellularized the rat whole heart by using pulsatile perfusion apparatus. Reprogrammed human cardiomyocytes were mixed with endothelial progenitor cells in culture and those were perfused to recellularize the acellular construct. Following 8 to 10 days in continuous perfusion, reseeded cells were engrafted onto the matrix to reconstruct the entire vascular beds and myocardium ex vivo.

研究分野：循環器内科学

キーワード：バイオ人工心臓 心臓内幹細胞 細胞外マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

心筋再生医療を成功させる重要な 3 要素として、組織工学を用いた局所の足場におけるドナー細胞の生着性の向上と各種組織保護因子の分泌、生体力学を応用した三次元培養を用いた前駆細胞の周期的電気刺激ならびに前後負荷による心筋細胞への分化誘導、そして前駆・幹細胞の系統的運命決定を司る幹細胞生物学の研究が必須不可欠である。一方、機能的な心臓を再構築するため、心臓の構造維持、生理学的機能、細胞の分化や増殖といった基本的な足場の研究が必須であり、これまでポリマー、コラーゲン、マトリジェルやジェルフォームなど多くの組織工学的手法が開発されてきた。しかしながら、これらの手法では、実質的なポンプ機能を発揮できるような生体吸収性で弾力性に富み、複雑な心血管の形態を保持し、かつ有効な収縮・拡張能と冠動脈血流を持った心臓の三次元レベルでの再構築は極めて困難とされてきた。

## 2. 研究の目的

摘出心臓をランゲンドルフ灌流装置用いて脱細胞化させることで立体的な足場を形成し、周期的な前後負荷及び電気刺激を与えつつ、三次元で人工ヒト心筋細胞およびヒト心血管前駆細胞を灌流培養させることで冠循環動態を保ち、緻密に作業心筋細胞が生着することで、より高い機能性のある自家細胞由来の心臓としての器官形成を目的とする。

当研究室では既にラット全心臓を 1% SDS 用いた還流循環により脱細胞化することに成功している。こ細胞外マトリックスからなる三次元の足場は冠動脈循環動態も保たれており、生着性の高い再播種に極めて有用なモデルである。本研究では上記の新規技術に加え、細胞喪失の少ない体外循環システムの確立と 緻密性と成熟性

の高いヒト心血管細胞を再播種させることで *ex vivo* における有効なポンプ機能を持つ心臓の再構築の他に、臓器移植にも用いることができる治療的確立を目指す。

具体的には以下のような過程で研究を進めていく。

ヒト心臓内幹細胞とラット心筋細胞の細胞間融合を介した人工心筋細胞の大量精製。

ラット全心臓の脱細胞化による細胞外マトリックスで形成された足場の作成。脱細胞化した心臓への人工ヒト心筋細胞およびヒト心血管前駆細胞の再播種化。

再構築した自家細胞由来バイオ人工心臓の機能解析及び移植検討。

## 3. 研究の方法

ヒト人工心筋細胞の純化法は、ヒト心臓内幹細胞を PGK-mcherry そしてラット心筋細胞を PGK-eGFP でそれぞれ標識、PEG 処理後二重陽性細胞をソーティングする。

麻酔下でラット心臓を摘出し、上行大動脈に灌流チューブを挿入、SDS ならびに 1% Triton-X をそれぞれ心腔内及び冠動脈内に 15 分ずつ循環灌流させ、全心臓の脱細胞化を行う。

脱細胞化した心臓の右房、上行大動脈にカニューレ挿入後、Radnoti 社製のワーキングハートシステム用いて、37°C、酸素化した灌流液内に  $5 \times 10^7$  個の心臓内幹細胞と同数の人工心筋細胞を注入し、細胞外マトリックスにヒト心血管細胞を再播種させる。

ミラーカテーテルを左房内通じて左室内に挿入し電気刺激を与え、左房・左室圧及び心電図を記録する。人工心臓はラットの腹部大動脈に他家移植し、術後組織と心機能を評価する。

#### 4. 研究成果

##### ヒト人工心筋細胞の作成

PEG 処理による細胞間融合による細胞の形質変換法は、iPS 細胞をはじめとする細胞の初期化や分化誘導といった従来の方法（2 週間から 1 ヶ月を要する）より、圧倒的にその精製過程がわずか 1 日と短く、かつ細胞ソーティングを併用することで、融合した細胞の純化率も 80%以上と飛躍的に向上させることが可能であった。

効率よくヒト細胞をラットの心筋形質に変換させるためには、ヒト：ラットの混合細胞比を 1：3 より開始し、ヒト心筋細胞の初期形成率を全細胞の 10%以上となるまで調節した。再播種後の生着性及び増殖性の相違を検討するため、PEG 処理後 24 時間目と 48 時間以降に分けて、異なった増殖能をもった人工心筋細胞の純化精製を行った。

##### ラット心臓の脱細胞化

12 週令の D-S ラットを麻酔し、全身へパリン化後、正中切開にて上、下大静脈、肺動静脈、胸部大動脈を剥離切断し、全心臓を摘出する。ランゲンドルフ法によって、1.8mm のカニューレを上行大動脈通じて逆行性に心臓内に灌流させた。

心筋保護目的で 10 $\mu$ M アデノシン入り PBS を冠動脈内に平均 80mmHg で 15 分間灌流させ、引き続き 1%SDS そして 1% Triton-X をそれぞれ 15 分間持続灌流させる。最終工程として、抗生剤入りの PBS でその後 120 時間灌流させ、脱細胞化した細胞外マトリックスを作成することに成功した。

##### 人工ヒト心筋細胞の細胞外マトリックスへの再播種化

脱細胞化した心臓は、左房及び上行大動脈に 18 ゲージのカニューレを挿入し心尖部まで電気刺激リードを入れる。37°C、

5%CO<sub>2</sub> で酸素化された細胞培地を心房内流量 20mL/min、冠動脈流量 6mL/min で 24 時間心臓内に栄養を入れる。前・後負荷は圧センサー介してそれぞれ 1-12mmHg と 1-60mmHg に制御し、ペーシングリード用いて 1Hz, 5-20V, 2ms で周期的に心外膜側より刺激を与えた。

細胞は 5x10<sup>7</sup> 個の精製したヒト人工心筋細胞と 5x10<sup>7</sup> 個のヒト心臓内幹細胞を 200 $\mu$ L の PBS に希釈し、27 ゲージの針使用し 5 回に分けて左心室内に注入する。回路内を密閉後、約 8 から 10 日間持続灌流させることで三次元培養を行い、全周性で均一化したヒト心血管細胞で覆われた心臓器官の形成に成功した。

#### 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 5 件)

Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, Ousaka D, Eitoku T, Kondo M, Okuyama M, Kobayashi J, Baba K, Arai S, Kawabata T, Yoshizumi K, Tateishi A, Kuroko Y, Iwasaki T, Sato S, Kasahara S, Sano S, Oh H.

Intracoronary Autologous Cardiac Progenitor Cell Transfer in Patients with Hypoplastic Left Heart Syndrome: The TICAP Prospective Phase 1 Controlled Trial. **Circ Res.** 2015;116:653-664. 査読有 doi:

10.1161/CIRCRESAHA.116.304671

Kobayashi J., Sano S., Oh H. Epigenetic modification in congenital heart diseases by using stem cell technologies **Stem Cell Epigenetics**

2015; 2;1 査読有 doi:

10.14800/sce.550

Kobayashi J., Yoshida M., Tarui S.,

Hirata M., Nagai Y., Kasahara S., Keiji K., Ito H., Sano S., **Oh H.** Directed Differentiation of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Identifies the Transcriptional Repression and Epigenetic Modification of NKX2-5, HAND1, and NOTCH1 in Hypoplastic Left Heart Syndrome. *PLOS One* 2014;9(7): e102796. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0102796.

Tarui S., Sano S., **Oh H.** Stem cell therapies in patients with single ventricle physiology. *Methodist Debaquey Cardiovascular Journal*. 2014;10(2):77-81. 査読有 PMID: PMC4117324

Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, Ikeda K, Yamada H, **Oh H.** Ueyama T. MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by  $\alpha$ 1-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(10):3811-6. 査読有 doi: 10.1073/pnas.1315359111.

〔学会発表〕(計 24 件)

**王 英正** 心臓内幹細胞を用いた先天性心疾患の病態解明と再生医療 ミニリトリート 徳島 (Jan. 10, 2015)

**王 英正** 心臓内幹細胞を用いた小児心疾患の解明と再生医療 第 34 回日本小児病理研究会学術集会 (Sep. 6, 2014) 岡山

**王 英正** 心臓内幹細胞を用いた小児心疾患の解明と再生医療 岡山先端医学研究会 (2014.9.26) 岡山

**王 英正** 臨床試験における具体

的な評価指標の定め方 技術情報協会セミナー 東京 (2014.10.7)

**王 英正** 心臓内幹細胞を用いた小児心疾患の解明と再生医療 高知小児循環器・川崎病研究会 (2014.12.4) 高知

**王 英正** 先天性心疾患への再生医療の現状 抗加齢医学会総会 (6. Jun.2014) 大阪

**王 英正** 小児心不全に対する心臓内幹細胞自家移植療法の第 I/II 相臨床研究 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 (Nov. 28, 2014) 岡山

Engineering bioartificial heart by human stem cells with three-dimensional extracellular matrix materials . Okuyama M, Ousaka D, Ishigami S, Kobayashi J, Sano S, **Oh H.** *International Society of Biomechanics* (May 14, 2014), Okayama.

Unique epigenetic and transcriptional regulation of induced pluripotent stem cells in patients with hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, **Oh H.** *International Society of Stem Cell Research* (June17-21, 2014) Vancouver, Canada.

Engineering bioartificial heart by human stem cells using nature's three dimensional platform of rat heart. Okuyama M, Ousaka D, Ishigami S, Kobayashi J, Sano S, **Oh H.** *International Society of Stem Cell Research* (June17-21, 2014) Vancouver, Canada.

Intracoronary cardiac progenitor cell infusion in patients with single ventricular physiology: Interim results

of phase I/III clinical trials. Ishigami S, Okuyama M, Tarui S, Ohtsuki S, Ousaka D, Eitoku T, Kobayashi J, Kasahara S, Sano S, **Oh H.** **International Society of Stem Cell Research** (June 17-21, 2014) Vancouver, Canada.

Epigenetic and transcriptional regulation of induced pluripotent stem cells in patients with hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, **Oh H.** **Basic Cardiovascular Sciences 2014 Scientific Sessions** (July 14-17, 2014) Las Vegas, U.S.A.

Late gadolinium enhancement on cardiac MRI identifies ventricular dysfunction and regional myocardial dyssynchrony in patients with univentricular heart diseases. Okuyama M, Ishigami S, Ousaka D, Kobayashi J, Kasahara S, Sano S, **Oh H.** **Basic Cardiovascular Sciences 2014 Scientific Sessions** (July 14-17, 2014) Las Vegas, U.S.A.

Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in children with hypoplastic left heart syndrome: 2-year results of the TICAP trial. Ishigami S, Tarui S, Okuyama M, Ousaka D, Kobayashi J, Kasahara S, Sano S, **Oh H.** **Basic Cardiovascular Sciences 2014 Scientific Sessions** (July 14-17, 2014) Las Vegas, U.S.A.

Shuta Ishigami, Shunji Sano, and **Hidemasa Oh.** Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in children with hypoplastic

left heart syndrome: 2-year results of the TICAP trial. **European Society of Cardiology YIA** (31. Aug, 2014)

Barcelona, Spain.

Shuta Ishigami, Michihiro Okuyama, Daiki Ousaka, Junko Kobayashi, Shingo Kasahara, Shunji Sano, **Hidemasa Oh** Delayed enhancement cardiac MRI identifies ventricular dysfunction and impaired regional myocardial mechanics in univentricular heart diseases.

**European Society of Cardiology** (31. Aug, 2014) Barcelona, Spain.

Michihiro Okuyama, **Hidemasa Oh.** Engineering bioartificial heart by human stem cells with perfusion-decellularized three-dimensional matrix materials.

**European Society of Cardiology** (31. Aug, 2014) Barcelona, Spain.

Junko Kobayashi, **Hidemasa Oh.** Unique epigenetic and transcriptional regulation of induced pluripotent stem cells in patients with hypoplastic left heart syndrome. **European Society of Cardiology YIA** (31. Aug, 2014) Barcelona, Spain.

Yoshida M, Tarui S, Kobayashi J, Tohru M, Nakamura Y, Maeshima S, Sano S, Ito H, **Oh H.** T-box5 controls age-dependent cardiac activity in human cardiac progenitor cells through insulin-like growth factor-1 receptor signaling. **European Society of Cardiology** (31. Aug, 2014)

Barcelona, Spain.

Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse,

Sano S, **Oh H.** NKX2.5, HAND1, and NOTCH1 regulate the cardiac development of induced pluripotent stem cells in patients with hypoplastic left heart syndrome. The 10th Japan-China-Korea Pediatric Heart Forum (4. Jul, 2014) Okayama

②① Kobayashi J, Sano S, **Oh H.** Epigenetic And Transcriptional Regulation Of Induced Pluripotent Stem Cells In Patients With Hypoplastic Left Heart Syndrome. **Best of American Heart Association Specialty Conference** (Nov. 15, 2014) Chicago, U.S.A.

②② S. Ishigami, S. Tarui, M. Okuyama, D. Ousaka, S. Ohtsuki, T. Eitoku, J. Kobayashi, S. Kasahara, S. Sano, None; **H. Oh**, Intracoronary Delivery of Autologous Cardiac Progenitor Cells in Children With Hypoplastic Left Heart Syndrome: The Ticap Trial With 18-Month Follow Up. **Cardiovascular Disease in the Young Outstanding Research Award. American Heart Association.** (Nov. 17, 2014). Chicago, U.S.A.

②③ Michihiro Okuyama, **Hidemasa Oh.** Cardiac magnetic resonance late gadolinium enhancement is associated with ventricular elastance that may predict latent ventricular dysfunction after Fontan procedure. **American Heart Association.** (Nov. 17, 2014). Chicago, U.S.A.

②④ Junko Kobayashi, **Hidemasa Oh.** Disease-specific induced pluripotent stem cells identify the transcriptional repression and epigenetic modification of NKX2-5, HAND1, and NOTCH1 during cardiac development of

hypoplastic left heart syndrome. **American Heart Association.** (Nov. 17, 2014). Chicago, U.S.A.

〔図書〕(計 1 件)

樽井俊、**王 英正**、佐野俊二 先天性心疾患外科手術における再生医療 循環器内科 医学出版 75(1): 87-93, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：Pluripotent stem cell derived from cardiac tissue

発明者：Hidemasa Oh

権利者：同上

種類：PCT 出願

番号：CA2600653

出願年月日：2013 年 9 月 8 日

取得年月日：2014 年 9 月 9 日

国内外の別：カナダ

〔その他〕

ホームページ等

<http://shin-iryu.jp/section/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 英正 (OH HIDEMASA)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：50372579

(2) 研究分担者

なし( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし( )

研究者番号：