

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871234

研究課題名(和文)自己組織化誘導型体内バイオプロセスに基づく栄養血管網を有する重厚心筋組織体の開発

研究課題名(英文)Preparation of vascularized thick myocardial tissue by using in-body cell self-organization inducible technology

研究代表者

岩井 良輔 (Iwai, Ryosuke)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：60611481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：心筋再生治療として心筋細胞の3次元組織体を移植する方法が有効であると考えられているが、栄養血管網がなければ組織体の内部が移植後に壊死し十分な再生効果は得られない。本研究では、円筒形のアクリル製の鋳型基材と心筋細胞を組み合わせラットの皮下に埋植するだけで、毛細血管網と血管への連結が可能な導管構造を有する心筋組織体を自動的に得ることに成功した。一方で、遺伝子導入幹細胞塊を単に細胞を培養皿に播種するだけで作製することにも成功した。今後、鋳型基材と心筋分化誘導遺伝子を導入した幹細胞塊を組み合わせることで、体内でより純度の高い心筋組織を発生的に作製することが出来ると期待される。

研究成果の概要(英文)：Although the tissue-engineered myocardial tissues prepared by fabricating cardiomyocytes are considered to be a promising transplant for cardiac regeneration, large part of these tissues was not able to function as expected because the central ischemic necrosis was occurred in them. In this study, we developed in-body cell self-organization inducible technology to prepare vascularized myocardial tissues. Tubular tissues having 0.5 mm thickness containing cardiomyocytes layer and abundant nutrient capillary vessels were obtained by only subcutaneous placement of tubular acrylic mold embedded with cardiomyocytes. On the other hand, we successfully prepared cells aggregates containing gene-transfected cells by only seeding cells on gene-deposited culture surfaces using our developed CAT polymer. The combination of in-body cell self-organization inducible technology with gene-transfected cells aggregates might enable us to develop native-like high-density myocardial tissue.

研究分野：細胞工学

キーワード：再生医療 組織工学 自己組織化

1. 研究開始当初の背景

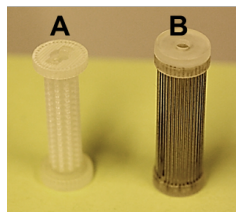
心筋細胞を用いた心不全の再生治療においては、組織工学的手法を用いて厚みを持った3次元の細胞組織体を作製し患部に移植する方法が有効であると考えられているが、組織体内部における酸素・栄養供給の不足による壊死が原因となり、患部を補填しうるといった顕著な心筋再生効果は示されていない。一方で、我々は培養細胞を鋳型基材と組み合わせて皮下に埋入するだけで生体内において鋳型周囲を被覆するコラーゲン性の組織と培養細胞が栄養血管網の構築を伴って一体組織化した『生きた』移植体が鋳型に沿った任意の形状で得られる新規の培養プロセスを開発してきた。また、培養皿表面で細胞の自己集合化を誘導する作用と、細胞に遺伝子を導入できる作用を有するポリマー (CAT) も開発している。

2. 研究の目的

本研究では、生体内バイオプロセスを心筋細胞に応用することで導管構造や毛細血管網を有する高厚な心筋組織体を作製することを目的とした。また、より高密度な心筋組織を体内で作製する方法として、CATを用いて遺伝子導入細胞の凝集塊を作製することも同時に目指した。

3. 研究の方法

主材として、多孔性のアクリル円筒材を3Dプリンターを用いて作製し(図1A)、その外周囲に副材としてステンレス棒を配した(図1B)鋳型基材を作製した。主材内部にラット脂肪より分離した間葉系幹細胞(ADSC)を充填するとともに、主材と副材の間にマトリゲルには懸濁した新生ラットの心筋細胞を塗布した。ラットの皮下組織に4週間埋植し、得られた組織体の組織学分析、および生理学的分析を行った。



主材：多孔性円筒形
副材：ステンレス棒 (φ0.3)
・主材外径：5mm
・主材長さ：2.4cm
・孔数：180
・主材-副材間：0.8mm

図1 心筋細胞の体内培養に用いた鋳型基材

4. 研究成果

埋植4週後、鋳型周囲は皮下組織で完全に被覆され、主材と副材をそれぞれ引き抜くと主管と36本の副管構造を持ち自立性を有する管状組織体を得られた(図2A)。組織体は

弾性に富む約0.5mmの壁厚を有していた(図2B)。

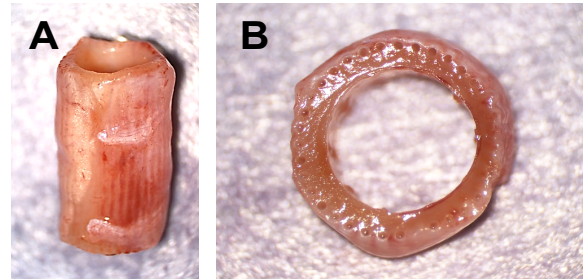


図2 組織体の実体観察像

組織分析の結果、得られた管状組織体の壁面は、心筋細胞がなければHE染色に淡染の疎な組織であったが、心筋細胞を主材-副材間に塗布するとHE濃染で毛細血管網が張り巡らされた約200~300μmの心筋マーカ(α-SAC)陽性の心筋組織様の層構造からなることが分かった(図3)。

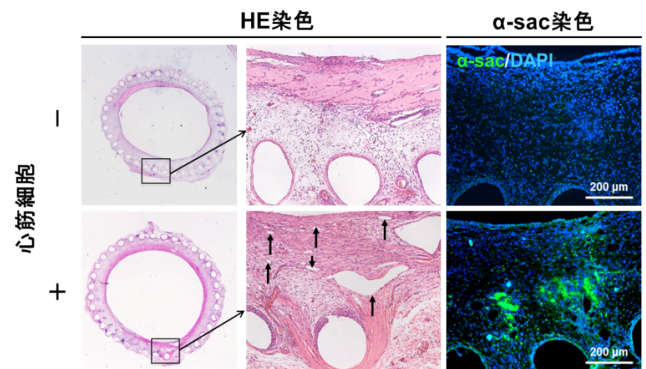


図3 組織体の組織分析結果
矢印：毛細血管

一方で、これらの心筋組織様組織体の生理学的な機能を調べたところ、拍動性に乏しく、機能的には目標とする患部心筋を補填しうるといった心筋移植体には程遠いことが分かった。そのような原因として、組織体中の心筋細胞の密度が低いことが考えられた。そこで、細胞を凝集塊とし鋳型に塗布するとともに、それらに心筋細胞への分化を誘導する遺伝子を導入しておくことで、体内で高密度な心筋組織を発生させることを考えた。

その第一歩として、CATとGFP遺伝子の混合液をコートした培養皿上にADSC(心筋への分化能を有することが示されている)を播種したところ、24時間後にはGFP陽性の遺伝子導入細胞が約50%の割合で認められた(図4A)。さらに、この上からADSCを高密度に追加播種すると、10時間程度で先に播種した細胞とともに一体凝集化した遺伝子導入細胞を含

む約 0.5 mm の巨大細胞凝集塊を得ることができた (図 4B)。

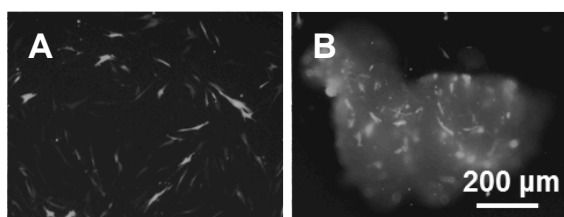


図 4 CAT と GFP 遺伝子の混合液のコート表面での ADSC への遺伝子導入 (A) と ADSC の凝集化 (B)

また、このような遺伝子導入細胞を含む細胞凝集塊は通常の接着培養用の培養皿に播種すると数時間で表面に接着した後、凝集塊から遺伝子導入細胞を含む細胞群が侵出し、増殖するなど、高い細胞活性を有していることが確かめられた (図 5)

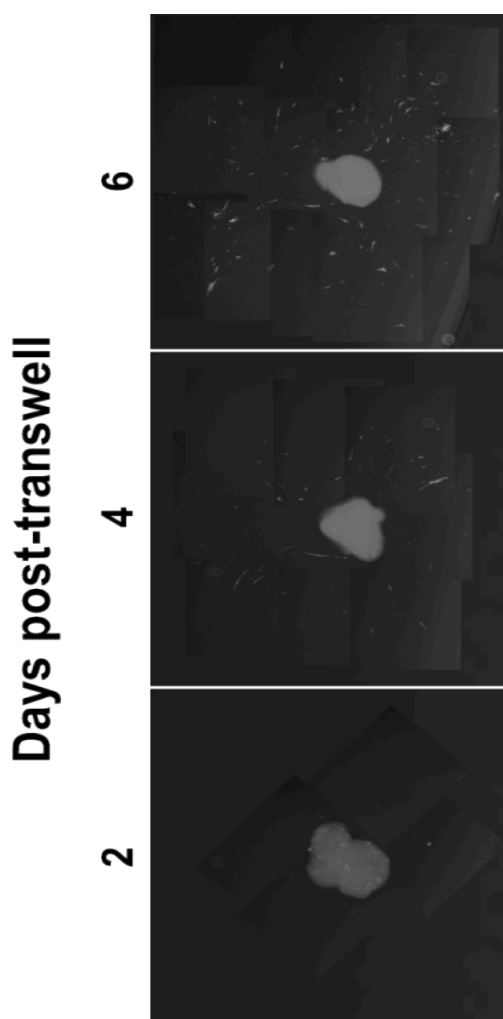


図 5 遺伝子導入 ADSC 凝集塊の培養

今後、このような遺伝子導入細胞を含む細

胞凝集塊と生体内バイオプロセスを組み合わせることで、体内での細胞の心筋分化による心筋組織体の発生的な形成により、本来の心筋組織に近い、高純度の心筋組織体の作製が可能になると期待される。

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)

[学会発表] (計 3 件)

1. 岩井良輔, 水野壮司, 中山 泰秀, 生体内組織形成術を用いた管状心筋組織体: 心筋バイオチューブ作製の試み, 第 14 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015 年 3 月 20 日
2. 岩井良輔, 春木涼多, 根本泰, 中山 泰秀, 培養で形を作る, 第 8 回生体再生技術研究会, 大阪, 2014 年 4 月 11 日
3. 春木涼多, 岩井良輔, 根本泰, 中山 泰秀, 感温性両極性高分子を用いた培養細胞の自己組織化誘導表面の開発, 第 51 回日本人工臓器学会大会, 横浜, 2013 年 9 月 29 日

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 3 件)

1. 名称: 移植材料
中山泰秀, 岩井良輔, 根本泰
権利者: 国立研究開発法人 国立循環器病研究センター, 株式会社ブリヂストン
種類: 特許
番号: 特願: 2015-008666
出願年月日: 2015 年 1 月 20 日
国内外の別: 国内
2. 名称: 核酸が導入された細胞構造体の製造方法
中山泰秀, 岩井良輔, 根本泰
権利者: 国立研究開発法人 国立循環器病研究センター, 株式会社ブリヂストン
種類: 特許
番号: 特願: 2015-008663
出願年月日: 2015 年 1 月 20 日
国内外の別: 国内
3. 名称: 細胞構造体の製造方法、及び該方法により製造された細胞構造体
中山泰秀, 岩井良輔, 根本泰

権利者：国立研究開発法人 国立循環器病研究センター，株式会社ブリヂストン
種類：特許
番号：特願：2014-190481
出願年月日：2014年9月18日
国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：温度応答性ポリマーの製造方法、温度応答性ポリマー、細胞培養器の製造方法、及び細胞培養器
発明者：中山泰秀，岩井良輔，根本泰
権利者：国立研究開発法人 国立循環器病研究センター，株式会社ブリヂストン
種類：特許
番号：特許 5746240 号
出願年月日：2013年2月25日
取得年月日：2015年5月15日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 良輔 (IWAI Ryosuke)

国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：60611481