

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713044

研究課題名(和文) ヒト幹細胞から機能的3次元心筋組織の構築法および移植法の開発

研究課題名(英文) Fabrication of 3-dimensional functional cardiac tissue from human iPS cell derived cardiomyocytes for heart regeneration

研究代表者

野口 亮 (Noguchi, Ryo)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70530187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒトiPS細胞由来心筋から、細胞凝集現象であるスフェロイド形成およびスフェロイドを立体構築し機能的かつ臨床にて心不全を治癒せしめる心筋構造体を作成する基盤技術開発を行った。ヒトiPS細胞由来心筋をベースに、内皮細胞や、線維芽細胞、神経細胞などを混合させ、機能的な心筋組織型スフェロイドを作成する条件を模索した。また、組織型スフェロイドを、立体的に効率よく構築できる3次元化システムの開発を行った。細胞配合の条件検討、および、効率的3次元化システムにて、簡便に円筒形の立体構造体を作る技術を与えた。得られた構造体は、心血管系に必要な細胞外マトリックスを十分に有していた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to fabricate 3-Dimensional functional cardiac tissue from human iPS derived cardiomyocytes which treats human failed heart. We focused on and utilize well known phenomenon spheroid formation of cell. Human iPS cell derived cardiomyocytes, human vascular endothelial cells, fibroblasts, and neural cell were fused to form contractile cardiac spheroids. Firstly, we optimize the cell amount, combination ratio, and another cell source to create better contractile spheroid. We found the addition of iPS cell derived neural cell increase function of cardiac spheroid. Second, we developed 3-Dimensional fabrication system. Utilizing this system, spheroids were easily arranged to fabricate cardiovascular patch construct, and tubular construct. Combining spheroids phenomenon and tissue engineering devices, these constructs contain enough extracellular matrix, microvascular networks in the construct.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療 心筋再生 心不全治療 組織工学

1. 研究開始当初の背景

高度先進医療が次々と開発され応用される現代においても、日本を含む先進諸国において心不全は依然として死亡原因の上位をしめ、かつその比率は増加している。薬物治療でも治療できない重症心不全患者に対する最終的な治療法は、心臓移植あるいは左心補助装置しかなく、その適応、実施数は世界的に不足している。ゆえに、従来の心臓移植や左心補助装置が有する問題を解決する、新規重症心不全治療技術の開発が望まれている。

本邦の山中教授による iPS 細胞の開発は、自己由来心筋細胞を大量に得る事を理論的に可能とし、新たな心不全治療法を示唆する画期的な技術である。世界中が熾烈な研究開発を行っており、得られた心筋細胞を不全心臓に移植することで心機能の改善、生命予後の改善が動物実験レベルで示されており臨床応用が期待されている。

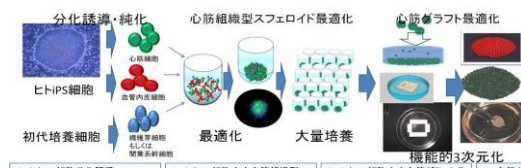
iPS 細胞由来細胞の心不全治療への臨床応用のためには、より高度な細胞移植法の開発が必要である。

2. 研究の目的

細胞が元来有する自己凝集能に着目し、懸濁液状態の細胞を一定の環境下で再凝集することで、細胞のみで3次元的な細胞凝集塊(スフェロイド)を形成する現象であり、スフェロイド同士も機能を維持しながらより立体的、機能的な3次元組織を構築する性質(自己組織化能)を有している。本研究ではヒト iPS 細胞から分化誘導させた、心筋細胞と血管内皮細胞、およびヒト初代線維芽細胞か神経幹細胞を用いて iPS 由来細胞の心筋細胞と混合させ scaffold-free な3次元心臓組織を作成すること。より、3次元か、効率的な3次元化システムを構築することおよび、心筋構造体を移植できるような基盤技術を開発する事を目的とする。

3. 研究の方法

図：研究方法概要



ヒト iPS 細胞由来、心筋細胞、血管内皮細胞、壁細胞などとヒト皮下由来線維芽細胞、あるいは間葉系幹細胞を組み合わせ、自己凝集能で心筋組織型スフェロイドを作成し、さらにスフェロイドを融合させ任意の大きさの心筋グラフトを作成する。計画書には分化誘導後にセルソーターなどで分取した心筋を実験に使用する予定としていたが、近年市販の iPS 細胞由来細胞が手に入るようになったため購入して使用した。その他の細胞も、市販の細胞を購入して使用した。

本研究機関では大きく以下の項目の検討を行った。

○ヒト iPS 細胞由来心筋から、より機能的な3次元化心筋スフェロイドの作成。

ヒト iPS 細胞由来心筋と、血管内皮細胞、線維芽細胞、神経幹細胞などを組み合わせ、配合を変化させ心筋組織型スフェロイドを作成。その構造解析、拍動効率など条件を変えて検討した。

○3次元化心筋組織構築のための効率的組織形成システムの開発。

心筋組織型スフェロイドを、より効率よく3次元化し生理的機能を維持したまま構築、あるいは心臓本来の形である円筒型に立体化させるためのデバイスおよび、システムを構築開発した。

組織型スフェロイドを、PTFE という、組織低接着型の表面構造をもつプラスチックと従来の培養シャーレを組み合わせ、短時間かつ簡便に心筋組織型組織が作れるシステムを開発する。デバイスのマトリックスの条件検討や培地の容量、デバイスの容量と播種するスフェロイド数の関係のデータを取り、播種してからの培養時間と、得られる構造体

の組織学的所見を解析し指摘な手順を検討した。

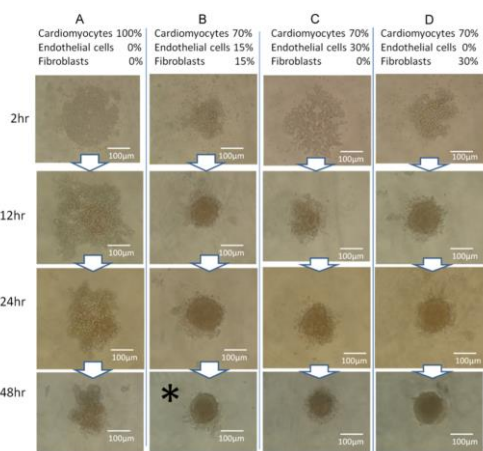
○3次元化構造体の細胞外マトリックスの評価。開発したデバイスにて作成した3次元化しつつある構造体にて、パッチ形成した直後を Day1 とし、Day3、までの、形態と組織学的評価を、マクロ像と、HE、EVG、マッソン染色、細胞外マトリックスの評価として Collagen Type 1, 2, 3, 5, 7, 8、などを染色した。

4. 研究成果

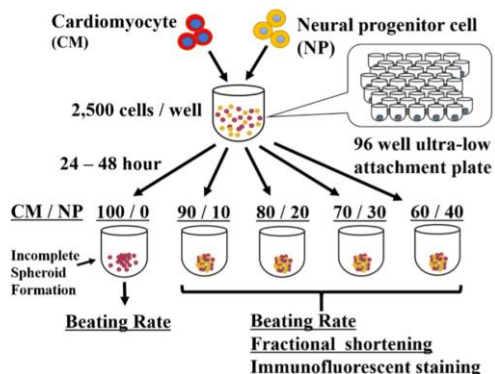
ヒト iPS 細胞由来心筋から、より機能的な3次元化心筋スフェロイドの作成。

ヒト iPS 細胞由来細胞もこれまで我々が、研究してきたラット胎児由来心筋と同様に、単独細胞のみの凝集塊では極端に凝集効率が悪く細胞を混合させることで凝集時間や、拍動に差があることを見出した。

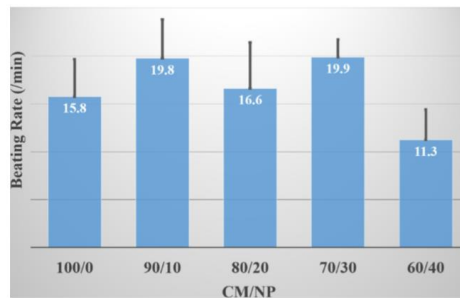
(図2：ラット胎児心筋による凝集現象の差を時系列にて解析。)



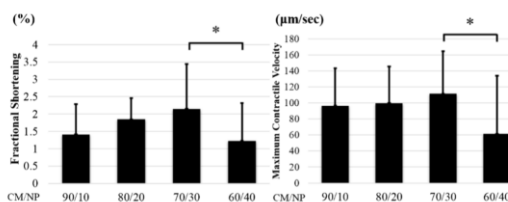
さらに本研究期間内で、神経幹細胞を心筋構造体に神経細胞を添加するとより収縮効率がアップすることを見出した。(図3：神経細胞添加による。研究プロトコル。)



(図4：神経細胞混合率と心拍数の関連図)



(図5：細胞混合比と FS (fractional shortening) との関連)

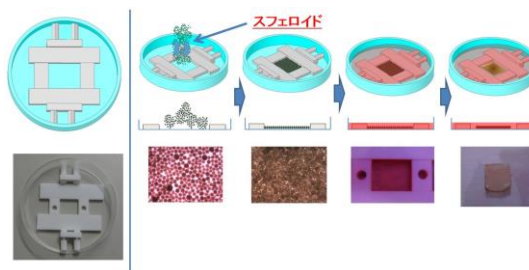


以上の結果から、各種細胞の混合や神経細胞の混入により収縮効率の最適化をはかり、70%の心筋細胞の混入が最適であると判断した。

3次元化心筋組織構築のための効率的組織形成システムの開発。

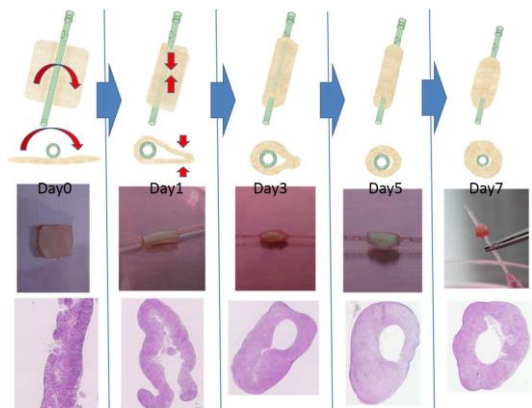
PTFE と従来の低接着性培養皿を組み合わせ、簡便にかつ安価にスフェロイドを効率よく融合させるシステムを開発した。

(図6：3次元培養装置)



得られた構造体はパッチの形態を保たせたまま浸透培養することで、強度を増すこと。また、細胞外マトリックスを維持させたまま培養させることができるほか、適正なタイミングで加工し、円筒形の血管構造体、心室様構造体を作成できる技術を開発した。

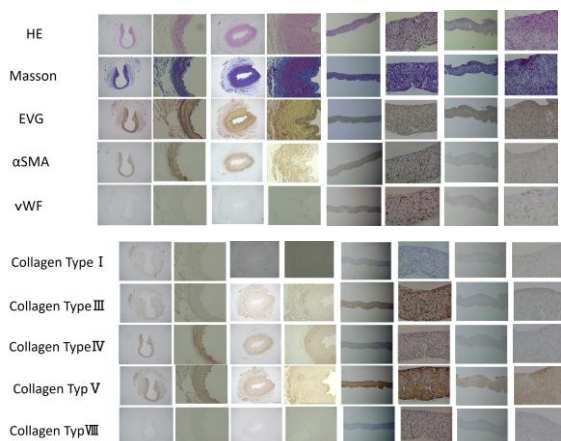
(図7: デバイスを用いて作成したパッチ状の3次元化構造体を円筒形や心室型構造体へ加工する技術開発)



3次元化構造体の細胞外マトリックスの評価。

得られた構造体を時系列にて染色し顕微鏡にて評価した。

(図8: HE、Masson、EVG 染色、各種 Collagen などによる評価)



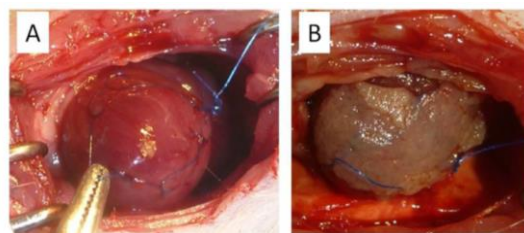
3次元化構造体は、培養日数とともに厚みをまし内部に壊死らしき構造もみられるが、内部には十分な細胞外マトリックスを賛成していることが判明した。実際の心血管系組織と比較すると、量や局在に違いがあり、今後の3次元培養でより機能的にする技術や条件を検討する必要があると考えられた。

移植法の開発

今回開発している構造体は、左室全面を覆う規模のサイズを想定して開発している。実際に移植するにあたり、組織の脱落、迷入が危

惧される。実際、ラットでの移植実験を行ったが、細胞が予想以上にもろく、縫合などによる固定は困難であった。心臓に移植するにあたり、自己心臓に生着するまでの外科的固定方法が必要と考え、移植方法を工夫した。ヒトの心臓手術で使用する縫合糸を移植予定部位の心臓を覆うような形でフェンス上に縫合し、その糸で軽く固定する手技を開発した。この手法により、組織の脱落などを効率に予防することができた。

図9: 心筋組織移植の手術手技の開発



縫合糸にて柵を作成し、その中に組織を置くことで、組織の破壊、脱落を防ぎ、安定して心臓に付着させることができる。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① 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. 2016;35:137-145.
- ② 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. 2015;
- ③ Yosuke Mukae, Manabu Itoh, Ryo Noguchi, Kojiro Furukawa, Ken-ichi Arai, Jun-ichi Oyama, Shuji Toda, Koichi Nakayama, Koichi Node, Shigeki Morita, The addition of human iPS cell-derived neural progenitors changes the contraction of human iPS cell-derived cardiac spheroids, Tissue and Cell, Volume 53, 2018, Pages 61-67,

〔学会発表〕（計 1 件）

2018 年 1 月 B2B カンファレンス（東京）

内胸動脈の細胞を立体化して新たに内胸動脈を作る基盤技術開発

野口亮、古賀亜由美、隈元清仁、田爪宏和、岡本健、福井寿啓

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：組織体形成装置・キット

発明者：野口亮、小網博之、森田茂樹、中山功一

権利者：国立大学法人佐賀大学

種類：特許

番号：特願 2015-55254

出願年月日：平成 27 年 3 月 18 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

野口亮 (NOGUCHI, Ryo)

熊本大学附属病院 心臓血管外科 助教

研究者番号：70530187

(2) 研究協力者

迎洋介 (MUKAE, Yosuke)

佐賀大学医学部心臓血管外科