

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350521

研究課題名(和文) 分化制御と細胞選択機能を有する独創的な培養基質の創製による心筋再生組織構築の革新

研究課題名(英文) Cardiac tissue engineering through the creation of a novel culture substrate promoting cardiomyocytes differentiation and selection

研究代表者

馮 忠剛 (Feng, Zhonggang)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：10332545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では幹細胞の分化制御機能と標的細胞の細胞選択機能を有する新規機能性培養基質の創製により心筋再生組織構築の革新を目指す。動物心筋組織細胞外マトリクス由来ハイドロゲル培養基質を作成し、動物由来培養基質上に幹細胞の心筋細胞への分化誘導を行い、基質力学特性の変化によって幹細胞の心筋細胞、平滑筋細胞などの分化制御及び細胞選択の可能性を示唆した。更に応力印加バイオリアクタの応用によって心筋再生組織構築の中間モジュールを作成することができた。本研究ではES/iPS細胞から高度機能的な心筋再生組織の新たな構築法が提示された。

研究成果の概要(英文)：This research aims to develop a novel approach for cardiac tissue engineering through the creation of the culture substrate which promotes the cardiac differentiation of ES/iPS cells and the selection of the differentiated target cells cultured on its surface. The culture substrate, a biohydrogel, was made from decellularized animal ventricular extracellular matrix. The research showed that stem cell differentiation can be modulated by controlling the mechanical properties of the culture substrate, and the target cell selection can be realized by imposing dynamic stress on the substrate. Bioreactor with mechanical stress control was developed to create the intermediate module for the cardiac tissue construction. This research presents a promising approach to tissue-engineer the highly functional cardiac tissue equivalent.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：心筋再生組織 心臓血管系細胞分化 幹細胞分化誘導 培養基質 基質力学特性 細胞分化促進 細胞選択 応力バイオリアクタ

### 1. 研究開始当初の背景

末期心不全に対して ES/iPS 細胞を用いる再生治療には多大な期待が寄せられている。しかし、その臨床応用を実現するためには二つの大きな課題を解決しなければならない。一つ目は、貴重な細胞ソースの有効的な利用およびガン化防止のため、ES/iPS 細胞を高効率に分化誘導しなければならない。二つ目は、分化した細胞を単に注入することだけでは、細胞接着率の低下や自己組織との不十分な統合などの問題によって所望の治療効果が得られないため、体外に再生組織を構築してからの移植は最も効果的だと考えられるが、即ち心筋再生組織構築の課題がある。これまでは上記の二つの課題に対していずれも最良な解決方法はまだ確立されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記の二つの課題を協調的かつ同時に解決するため、下記の独創的なアプローチを考案・実施した。

まずは、組織構築の立場から ES/iPS 細胞の心筋細胞 “だけ” の高分化率を追求する必要は必ずしもない。ポンプ機能を有する心筋再生組織の構築では、単に心筋細胞のみではなく、特に血管系形成のための内皮細胞や平滑筋細胞も不可欠である。実際の心筋組織中の心筋細胞の割合はたかだか30%位に過ぎない。従って、心筋再生組織構築の立場から ES/iPS 細胞分化のストラテジーを考案する際、やはり再生組織構築に必要な心筋、内皮及び平滑筋細胞を一括で高効率かつ適切な割合で分化誘導することを目標に設定すべきである。

次は、これまでの心筋再生組織構築法の短所を回避、長所を十分に発揮するため組織構築方法論、即ち中間モジュール法 (intermediate module) を考案した。中間モジュールは、組織構築に必要な多種の細胞の分化・培養を特定機能の培養基質上で行う細胞-基質の統合的な構造であって、最終的な再生組織構築の基本的な構成ユニットとして用いる。

### 3. 研究の方法

中間モジュールの培養基質としての新規機能性培養基質の創製が上記の革新的アプローチの鍵となっている。これを実現するため下記の研究方法に取り組んできた。

#### (1) 新規機能性培養基質の開発

動物心室組織を脱細胞し、その細胞外基質を溶解・ゲル化して機能性培養基質のベースを作る。更に、塑性圧縮や生化学架橋を利用して細胞分化に最適な力学特性を有する基礎基質を得る (物理的要素)。そして、他の ECM 成分と細胞分化促進因子を基礎基質上にコーティングする (生化学的要素)。

(2) 心臓血管系多種類細胞の同時分化誘導  
上記の培養基質の基本構造に心筋、内皮、平滑筋細胞の同時分化誘導を行う。一般の培養

基質上の細胞生着は基質と細胞膜上に発現している粘着分子 (例えば integrin など) との相互作用によるので、基質上に培養されている分化した標的の心筋、内皮、平滑筋細胞の生着は心室由来の基質ハイドロゲルで他の非標的細胞よりも強く生着させる。

#### (3) 細胞選択機能の検討と中間モジュールの作成

上記培養基質上に標的細胞を培養・分化制御・成熟促進させるため、培養基質に力学的な繰り返し伸展負荷をかけ、心筋細胞の更なる成熟を促進するとともに、基質との結合力の弱い非標的細胞を基質の繰り返し変形により脱落させ、排除する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導における安価なプロトコルの確立。近年のヒト iPS 細胞研究の目覚ましい進展とその大きな将来性を見据えて、これまでの幹細胞ソースのマウス ES 細胞に加えてヒト iPS 細胞も本研究の幹細胞ソースとして重点にその心臓・血管系細胞の分化誘導を検討した。これまでの研究成果に基づいて独自の安価な分化誘導プロトコルを作成・実施・検証した (図 1)。この分化プロトコルの特徴は心筋細胞発生に関わる重要な二つの経路 (BMP と Wnt) を統合的に誘導し、かつ心筋前駆細胞段階の細胞増殖を重要視している。また、これまで検討してきた転写因子の遺伝子発現に加えて miRNA1 と miRNA133 の発現も心筋細胞への分化の定量評価の指標として利用した

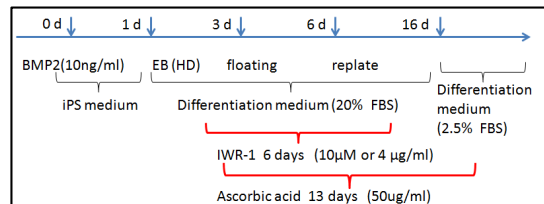


図 1. ヒト iPS 細胞の心臓血管系細胞分化プロトコル

(2) 胚様体拍動を拍動ひずみ・応力により定量的に評価する方法を確立した。拍動胚様体における心筋細胞の更なる成熟促進と細胞選択のため、胚様体拍動を拍動ひずみ・応力により定量的に評価する方法を確立した。この方法は培養基質に接着した胚様体を連続粘弾性体としてその物性特性と拍動変位を測定した上に拍動ひずみ・応力の解析ができた。この結果により、分化した心筋細胞の成熟に培養基質の力学特性の最適化を検討することが出来た。また、心筋細胞の選択について培養基質に印加する動的応力の頻度・振幅および位相の影響が示唆された。分化細胞の拍動力の評価についてはリング状心筋細胞 - コラーゲンゲル構造の拍動変位から細胞の拍動力を定量的に評価するプログラムを開発し、その評価精度と有効性を確認した (図 2)。

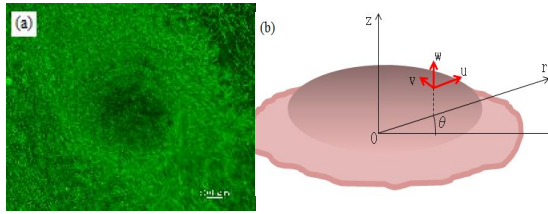


図 2 .(a) ヒト iPS 細胞胚様体拍動と (b) 拍動模式解析

(3) 動物心室組織細胞外マトリクスをベースに心血管系細胞分化・培養・選択の培養基質ハイドロゲルの開発。この培養基質の利点としては、心筋組織由来の分化促進因子を利用して、接着性因子と溶液性因子の基質との結合を同時に働き、安価かつ効率的な分化誘導を可能にする。また、基質の細胞適合性も確立した。培養基質の力学特性においては架橋剤 EDAC の利用及び塑性圧縮の併用により基質の弾性特性を心室組織の弾性と同一程度に調整できた (図 3)。

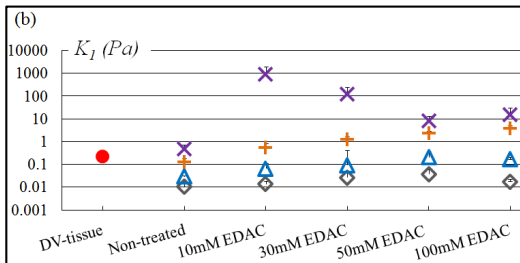
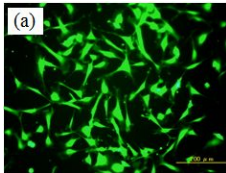


図 3 .(a) 培養基質の細胞培養適合性評価と (b) 基質力学特性の調整

(4) 培養基質の力学特性が細胞過程に及ぼす影響について、基質の粘弾性の影響が示唆された。基質の動的力学特性の検討を加えて心室筋細胞の分化促進を果たすため、静的弾性と動的弾性の役割、細胞選択の場合には静・動的弾性と外部印加動的応力とのマッチングの必要性を呈示した。基質の細胞適合性については蛍光染色によって細胞の増殖と基質の力学特性との関連性を示した。心室筋組織細胞外基質由来ハイドロゲルの力学特性を架橋剤 EDAC 及び塑性圧縮の併用により心室組織の弾性と同一程度に調整した上に、異なる力学特性を有するハイドロゲル上に心筋細胞を培養した。その結果細胞の拍動能にはゲルの粘弾性の影響が存在することがわかった (図 4)。

(5) 応力印加した基質での培養細胞の選択。細胞分化・選択のバイオリアクタの改良を行った。これまでの単一試料用のバイ

オリアクタを改良し、4 サンプルまでに同時実験できるようになった。また、改良後の装置は静的 pre-stress を基質に印加した上、動的振動を加え、拍動心筋組織の応力状態を再現でき、細胞分化・選択の有効な実験装置となった。また、豚羊膜の非線形力学特性を利用して、異なる応力の印加によって異なる弾性率の培養基質を得ることが出来た。その上に線維芽細胞を培養すると、高い弾性率の基質の中央部位に線維芽細胞の増殖抑制と細胞脱落が出来た。このことによって培養基質上に部位ごとに細胞の選択と分布制御が出来ることを示唆された (図 5)。

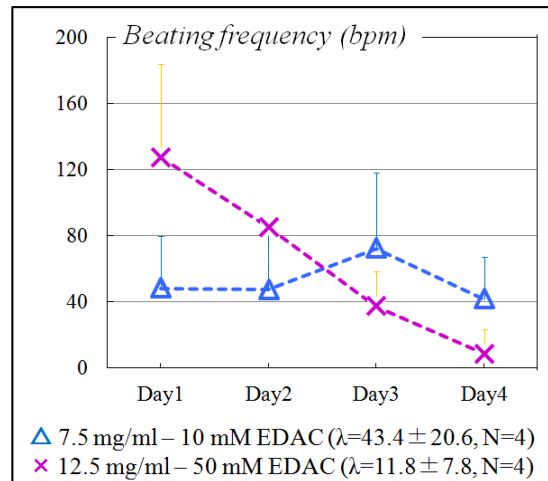


図 4 . 心筋細胞拍動に対する培養基質応力弛緩係数の影響

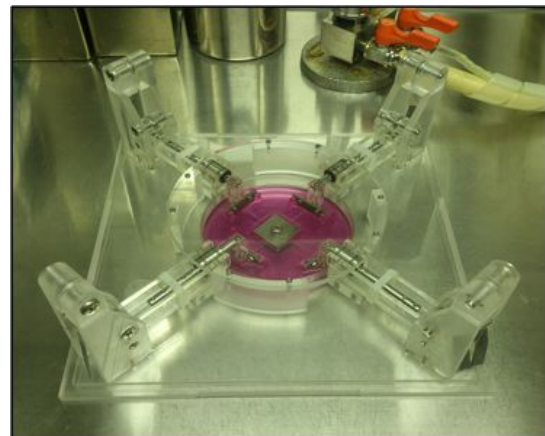


図 5 . 開発した培養基質に応力を印加したバイオリアクタ

(6) 心筋再生組織構築中間モジュールの作成。

ブタ羊膜を培養基質としてマウス ES 細胞を分化誘導したところに羊膜の力学特性の調整によって心筋細胞と平滑細胞の発現ができ、マウス ES 細胞の心筋細胞への分化実験では、BMP 誘導下における SSEA1- の分化細胞株は Wnt, Noggin の誘導因子と培養基質の弾性特性の調節によって、心筋細胞、内皮細胞および平滑筋細胞への分化を同時に進

行し、かつそれらの細胞の割合を調整することを可能にした。それを基に心筋再生組織構築の多種類細胞中間モデルを作成した。

#### 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8件)

Z Feng, Y Ishiguro, K Fujita, T Kosawada, T Nakamura, D Sato, T Kitajima, M Umez. A fibril-based structural constitutive theory reveals the dominant role of network characteristics on the mechanical behavior of fibroblast-compacted collagen gels. , *Biomaterials* , 査読有、Vol. 67、2015、pp365-381.

K Fujita, Y Tsuchida, H Seki, T Kosawada, Z Feng, Y Shiraishi, D Sato, T Nakamura, M Umez. Characterizing and modulating the mechanical properties of hydrogels from ventricular extracellular matrix. Proc. of 10th Asian Control Conference (ASCC) 2015;718-722, Kota Kinabalu, Malaysia. 査読有

Z Feng, T Kitajima, T Kosawada, T Nakamura, D Sato, M Umez. Dynamic Analysis of Circular Engineered Cardiac Tissue to Evaluate the Active Contractile Force. Proc. of LSMS/ICSEE 2014, Communications in Computer and Information Science 2014;461:198-208, Shanghai, China. 査読有

Z Feng, R Takahashi, T Nakamura, D Sato, N Shirasawa, A Nakayama, S Kurashige, T Kosawada, T Kitajima, M Umez. Expression of microRNA-1, microRNA-133a and Hand2 protein in cultured embryonic rat cardiomyocytes. In *Vitro Cell Development Biol - Animal* 査読有、Vol. 50、2014、pp700-706.

Z Feng, Y Wagatsuma, M Kikuchi, T Kosawada, T Nakamura, D Sato, N Shirasawa, T Kitajima, M Umez. The mechanisms of fibroblast-mediated compaction of collagen gels and the mechanical niche around individual fibroblasts. *Biomaterials* 査読有、Vol. 35、2014、pp8078-8091.

Feng Z, Kosawada T, Sato D, Nakamura T, Kitajima T, Umez M. TRACTION FORCE EXERTED BY INDIVIDUAL FIBROBLASTS OR CARDIOMYOCYTES IN COLLAGEN GELS. Proc of the JSME/ASME 2014 International Conference on Materials and Processing ICMP2014:

ICMP2014-4902 pp1-5, Detroit, USA. 査読有

Fujita K, Kayano Y, Feng Z, Kosawada T, Sato D, Nakamura T, Shiraishi Y, Umez M. MECHANICAL PROPERTIES OF BIO-HYDROGEL FROM CARDIAC EXTRACELLULAR MATRIX. Proc of the JSME/ASME 2014 International Conference on Materials and Processing: ICMP2014-5001 pp1-5, Detroit, USA. 査読有

Z. Feng, Y. Wagatsuma, S. Kobayashi, T. Kosawada, D. Sato, T. Nakamura, T. Kitajima, M. Umez. Analysis of the Contraction of Fibroblast-Collagen Gels and the Traction Force of Individual Cells by a Novel Elementary Structural Model. Proc of 35th Ann Intern Conf of the IEEE EMBS, pp6232-5, 2013. Osaka, Japan. 査読有

#### [学会発表](計11件)

Z Feng, K Fujita, T Kosawada, D Sato, T Nakamura, T Kitajima, M Umez. The Mechanical Properties of Biohydrogels and the Applications for Tissue Engineering. EMN Meeting on Hydrogel Materials, 2016.5.9-13, Singapore.

藤田 恭平, 馮 忠剛, 小沢田 正, 佐藤 大介, 中村 孝夫, 白石 泰之, 梅津 光生. カルボジイミド系架橋剤による心室組織 ECM 由来ハイドロゲルの力学特性の調整. 第15回日本再生医療学会総会. 2016年3月17-19日, 大阪国際会議場, 大阪市.

Feng Z, Nakamura T, Sato D, Kosawada T, Kitajima T, Umez M. Biomechanics of fibroblast-compacted collagen gels investigated under fibrillar framework. 6th ICMOBT, 2015.12.6-10, Hawaii, USA.

Fujita K, Feng Z, Sato D, Nakamura T, Kosawada T, Shiraishi Y, Umez M. Improvement of mechanical properties of hydrogel from ventricular extracellular matrix by carbodiimide crosslinker. 6th ICMOBT, 2015.12.6-10, Hawaii, USA.

藤田恭平, 馮忠剛, 小沢田正, 佐藤大介, 中村孝夫, 白石泰之, 梅津光生. カルボジイミド系架橋剤による心室組織 ECM 由来ハイドロゲルの力学特性の向上. 第37回日本バイオマテリアル学会大会 2015年11月9-11日, 京都テルサ, 京都市.

藤田 恭平, 馮 忠剛, 関 裕樹, 土田 裕己, 小沢田 正, 佐藤 大介, 中村 孝夫, 白石 泰之, 梅津 光生. 心室

組織 ECM 由来ハイドロゲルの力学特性および細胞接着性の検討. 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月 19-21 日, パシフィコ横浜, 横浜市.  
藤田恭平, 馮忠剛, 小沢田正, 佐藤大介, 中村孝夫, 白石泰之, 梅津光生.  
心室筋組織細胞外マトリクス由来ハイドロゲルの力学特性の検討. 第 52 回日本人工臓器学会, 2014 年 10 月 17-19 日, 京王プラザホテル札幌, 札幌市.

Feng Z, Kosawada T, Sato D, Nakamura T, Kitajima T, Umezu M. Mechanical niche in fibroblast-compacted collagen gels. ISMB 2014, 2014 年 5 月 20-23 日, 岡山大学 Junko Fukutake ホール, 岡山市.

彭卉, 土原龍夫, 菊地涼, 佐藤大介, 中村孝夫, 小沢田正, 馮忠剛. マウス ES 細胞の心筋細胞への分化誘導過程における BMP2 処理の効果. 第 13 回日本再生医療学会総会, 2014 年 3 月 4-6 日, 国立京都国際会館, 京都市.

Feng Z, Nakamura T, Sato D, Kitajima T, Umezu M. Nonlinear mechanical characteristics of soft tissue equivalent. 5th Congress of IFAO, 2013 年 9 月 27-29 日, パシフィコ横浜, 横浜市.

Feng Z, Kitajima T, Sato D, Nakamura T, Umezu M. Spontaneous beat behavior of circular engineered cardiac tissue. JSST 2013, 2013 年 9 月 11-13 日, 明治大学リバティタワー, 東京都.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

馮 忠剛 (FENG, Zhonggang)  
山形大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号 : 10332545

### (2)研究分担者

中村 孝夫 (NAKAMURA, Takao)  
山形大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号 : 00142654

小沢田 正 (KOSAWADA, Tadashi)  
山形大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号 : 10143083

梅津 光生 (UMEZU, Mitsuo)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号 : 90132927