

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560209

研究課題名（和文）心臓組織工学の更なる飛躍への挑戦：テラヘルツ波と微細加工技術の融合

研究課題名（英文）Heart Tissue Engineering: Integration of microfabrication technology and THz wave

研究代表者

亀井 謙一郎 (Kamei, Ken-ichiro)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点准教授

研究者番号：00588262

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）：本研究は、今まで困難であったヒトES/iPS細胞から成熟した3次元心筋組織を構築する方法の開発を目的とした。この目的を達成するために、マイクロ流体デバイス（microFD）とテラヘルツ（THz）波を融合した新技術を開発する。具体的には、A. microFDを応用した3次元心筋組織構築デバイスの開発、B. THz顕微鏡とmicroFDの実験系を開発、C. microFDとTHz顕微鏡を融合し、3D心筋組織の成熟化を目指した。開発する新技術は、ヒトES/iPS細胞の実用化と心臓組織工学の発展を促進することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop a new platform to obtain functional and mature cardiomyocytes derived from human embryonic stem (ES) and induced pluripotent stem (iPS) cells by utilizing a microfluidic device in combination with THz wave. Specifically, A. to develop a microfluidic device allowing three-dimensional cell culture for cardiomyocytes, B. to combine the experimental setups of both THz microscope and microfluidic devices, C. to make mature cardiomyocytes by irradiating THz wave. Our devices would be very beneficial for regenerative medicine as well as drug screening for heart diseases.

研究分野：幹細胞工学

キーワード：幹細胞 マイクロ流体デバイス THz 組織工学 心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

心疾患は日本国内では2番目に高い死因であり、重篤化すると最終的には心臓移植が必要となる。しかし現在、心臓移植は深刻なドナー不足であり、それに替わる治療法の開発が急務となっている。代替治療方法として最も期待されるのがヒト ES/iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を使用する細胞移植治療であり、既に小分子のみを用いて高効率・高純度に心筋細胞に分化誘導する方法の開発に成功している (*Cell Reports*, 2012)。しかし、細胞移植治療には成熟化した心筋細胞・組織が必要だが、従来法では未熟な心筋細胞しか得られないことが問題となっている。

2. 研究の目的

申請者は、従来法では考慮されなかった「3次元組織構築」と「適度な物理的刺激」をこの問題を解く重要な鍵とした。この2つを自在に制御する手法として申請者はマイクロ流体デバイス (μ FD) とテラヘルツ (THz) 波を応用する。そして今まで困難であったヒト ES/iPS 細胞から成熟した3次元心筋組織を構築する方法を開発することを目的とする。この目的を達成するために、マイクロ流体デバイス (μ FD) とテラヘルツ (THz) 波を融合した新技術を開発する。具体的には、

A. μ FD を応用した3次元心筋組織構築デバイスの開発
B. THz 顕微鏡と μ FD の実験系を開発
C. μ FD と THz 顕微鏡を融合し、3D 心筋組織の成熟化を行う。

μ FD は、細胞を3次元空間配置、細胞刺激因子の時・空間制御、など3次元組織構築に必要な要素を持っている。

THz 波とは波長約 300 μ m の電磁波であり、近年、細胞刺激に応用する機運が世界的に高まりつつある (*Sci. Reports*, 2013)。そこで本申請では、THz 波を心筋細胞の物理的刺激に応用する。連携研究者である京都大学廣理助教は世界最高の強度である 1 Mega V/cm の電磁波を照射できる THz 波顕微鏡の開発に成功している (Hirori et al., *Nature Commun*, 2011)。この電位は細胞膜電位レベルに相当し、この THz 顕微鏡を用いて細胞に非侵襲的な物理的刺激を行い、心筋組織の成熟化を行う。

この2つの技術を融合することで、従来法では辿りつけない心筋組織の「成熟化」を達成する。

3. 研究の方法

A. マイクロ流体デバイス (μ FD) を用いた3次元心筋組織構築法の開発

本研究では、申請者が開発した3Dプリンタを応用した鋳型作製法(特許申請中)を用いて μ FD を作製する。3Dプリンタを用いて、複雑な3次元構造を一度にプリント可能になり、さらに、デザイン作成から新しいデバイスを得るまでの工程が3日間と、劇的に時間

を短縮できる。本申請で使用する3Dプリンタは平面解像度が50 μ m、高さ解像度が15 μ m と、細胞培養用のマイクロ流体デバイス作製には十分な性能である。鋳型としてプリントされる材料は樹脂性であり、熱耐性が70°Cと比較的低温であるため、 μ FD の材料である polydimethylsiloxane (PDMS) への転写には、温度を65°Cに保って行う。

作製した μ FD 内に、ヒト多能性幹細胞から分化誘導して得られた心筋細胞を導入し、3次元組織化を行う。申請者はこれまでに、心筋細胞は μ FD に導入後、適した条件下で自然に3次元組織を形成することを見出しているが、より最適な3次元心筋組織作製の条件を見出すために μ FD をハイスループット化し (HT- μ FD) し、効率的な組織形成を行う。スクリーニングの指標として成熟心筋細胞マーカーである β -MHC を選び、その発現量を申請者が開発した定量的免疫細胞染色法を用いて定量化し、最も発現量の高い組織を以降の実験に用いる。

B. THz 顕微鏡と μ FD を融合した実験系の開発と細胞実験への最適化

THz 波は水に吸収されることが問題となっていた。そこで、細胞までの水透過距離を出来るだけ短くする必要がある。本申請では、水の影響を軽減するためにも μ FD を使用する。 μ FD 内の細胞培養チャンバーの高さを出来るだけ低くし (50 μ m 以下)、細胞培養液による THz 波の減衰を最小限にする。また、長期培養・実験を行うために、必要に応じて培養液をシリンジポンプによって送液する。さらに、細胞観察を行うために、蛍光顕微鏡としての機能も設置する。また、細胞培養を長時間可能にするために、サンプル台は37°C、5% CO₂ 環境下に置く。

作製したシステムでの細胞培養の条件最適化は、細胞生死判定や細胞増殖速度などで評価する。

C. μ FD と THz 顕微鏡の融合による3D心筋組織の成熟化

目的 A. で開発・構築した3次元心筋組織細胞に THz 波を照射することで心筋組織の更なる成熟化を行う。その際に、THz 波を細胞に照射する時間、強度、回数などを検討し、成熟化に最適な条件を見出す。

3次元組織化した心筋組織の機能評価を行うために、まず免疫染色法による成熟心筋細胞マーカー発現の確認 (β -MHC など)、細胞周期測定、電気生理学的評価 (パッチクランプ法、Microelectrode array (MEA) 法)、蛍光プローブによる細胞機能イメージング (膜電位、細胞内 Ca²⁺ など)、走査型電子顕微鏡による心筋細胞に特徴的な微細構造の確認 (T-tubules) などの方法を用いて評価する。また得られた組織に於ける全遺伝子発現パターンを、成人心筋組織のそれと比較することによって、本申請で得られた心筋組織

がどれだけ成人組織に近づけたかを評価する。また、THz 波が細胞に与える影響が明らかとなっていないこともあるので、予定外の影響の有無も併せて確認・評価する。

4. 研究成果

本研究では、申請者が開発した 3D プリントを応用した鋳型作製法を用いて μ FD を作製する。

作製した μ FD 内に、ヒト多能性幹細胞から分化誘導して得られた心筋細胞を導入し、3 次元組織化を行った。また、申請者はこれまでに、心筋細胞は μ FD に導入後、適した条件下で自然に 3 次元組織を形成することを見出しているが、より最適な 3 次元心筋組織作製の条件を見出すために μ FD をハイスループット化し (HT- μ FD) し、効率的な組織形成を行った。以降、スクリーニングの指標として成熟心筋細胞マーカーである β -MHC を選び、その発現量を申請者が開発した定量的免疫細胞染色法を用いて定量化し、最も発現量の高い組織を以降の実験に用いる。

B. THz 顕微鏡と μ FD を融合した実験系の開発と細胞実験への最適化

THz 波は水に吸収されることが問題となっていた。そこで、細胞までの水透過距離を出来るだけ短くする必要がある。本申請では、水の影響を軽減するためにも μ FD を作製した。 μ FD 内の細胞培養チャンバーの高さを出来るだけ低くし (50 μ m 以下) 細胞培養液による THz 波の減衰を最小限にした。また、長期培養・実験を行うために、必要に応じて培養液をシリンジポンプによって送液した。さらに、細胞観察を行うために、蛍光顕微鏡としての機能も設置した。

作製したシステムでの細胞培養の条件最適化は、細胞生死判定や細胞増殖速度などで評価する。

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 4 件)

1. **K. Kamei**^{†*}, Y. Mashimo[‡], M. Yoshioka, Y. Tokunaga, C. Fockenberg, S. Terada, M. Nakajima, T. Shibata-Seki, L. Liu, T. Akaike, E. Kobatake, E. S. How, M. Uesugi and Y. Chen* “Microfluidic-nanofiber hybrid array for screening of cellular microenvironments” *Small*, **13**(18), 1603104; DOI: 10.1002/sml.201603104 (*Corresponding authors; [‡]These authors contributed equally to this work.)
2. L. Liu[†], **K. Kamei**^{†*}, M. Yoshioka, M. Nakajima, J.J. Li, N. Fujimoto, S.

Terada, Y. Tokunaga, Y. Koyama, H. Sato, K. Hasegawa, N. Nakatsuji and Y. Chen “Nano-on-micro fibrous extracellular matrices for scalable expansion of human ES/iPS cells” *Biomaterials*, **124**, 47-54 (2017); DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.01.039 (*Corresponding authors)

3. **K. Kamei**^{*}, Y. Koyama, Y. Mashimo, M. Yoshioka, C. Fockenberg, M. Nakashima, R. Mosbergen, O. Korn, J. Li, C. Wells and Y. Chen* “Characterization of phenotypic and transcriptional differences in human pluripotent stem cells under two- and three-dimensional culture conditions” *Advanced Healthcare Materials*, **5**(22), 2951-2958 (2016); DOI: 10.1002/adhm.201600893 (*Corresponding authors)
4. Y. Kato, Y. Hirai, **K. Kamei**, T. Tsuchiya and O. Tabata, “Development of a Body-on-a-Chip Using 3-D Microstructuring Technique” *IEEJ Trans. SM*, **136**(6), 229-236 (2016) (in Japanese); DOI: 10.1541/ieejsmas.136.229

[学会発表](計 19 件)

1. **K. Kamei**, Y. Hirai, Y. Kato, T. Tsuchiya, O. Tabata “Body on a chip towards understanding of the side effects of anti-cancer drug in vitro The 29th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT) 2016, Kobe, Japan (2016.11.9-12)
2. **K. Kamei** “Solving the environmental issues for cells: Towards precise regulation of stem cell functions” South China University of Technology, Guangzhou, China (2016.11.3)
3. **K. Kamei** “Solving the environmental issues for cells: Towards precise regulation of stem cell functions” Sun-yet Sun University, Guangzhou, China (2016.11.3)
4. **K. Kamei** “Body on a Chip: Towards new generation of drug screening” The 10th International Conference of Nano/Molecular Medicine and Engineering (IEEE-Nanomed), Macau SAR, China (2016.11.1)
5. **K. Kamei**

- “Solving the environmental issues for cells: Towards precise regulation of stem cell functions”
Wuhan University, Wuhan, China (2016.10.29)
6. **K. Kamei**
“Solving the environmental issues for cells: Towards precise regulation of stem cell functions”
Jinghan University, Wuhan, China (2016.10.28)
 7. **K. Kamei**
“Towards in vitro recapitulation of the side effects of anti-cancer drugs”
CBI 学会 2016 年大会, 東京 (2015.10.25-27)
 8. **K. Kamei**
“Nanoengineered extracellular matrix for scaled-up culture of human ES/iPS cells”
TERMIS-AP 2016, Tamsui, Taiwan (2016.9.3-6)
 9. **K. Kamei**
“Solving the environmental issues for cells: Towards precise regulation of stem cell functions”
Department of Chemistry and Chemical Biology, Rutgers, The State University of New Jersey, New Jersey, USA (2016.7.5)
 10. **K. Kamei**
“Nanoengineered extracellular matrix for scaled-up culture of human ES/iPS cells”
Nature Conference on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Ocean Hotel, Guangzhou, China (2016.4.7-9)
 11. **K. Kamei**
“Nanoengineered extracellular matrix for scaled-up culture of human ES/iPS cells”
The 9th International Conference of Nano/Molecular Medicine and Engineering (IEEE-Nanomed), Waikiki Beach, Hawaii, USA (2015.11.15-18)
 12. **K. Kamei**
“Nano/micro engineered cellular microenvironments for regulating stem cell functions”
Paris Symposium on Integrated Cell-Material Sciences, Institut Pierre-Gilles de Gennes pour la Microfluidique, Paris, France, (2015.10.12-13)
 13. **K. Kamei**
“Body on a Chip: Towards new generation of drug screening”
MicRO Alliance Workshop 2015, University of Freiburg, Freiburg, Germany, (2015.09.24-25)
 14. **K. Kamei**
“Creating the right microenvironments for controlling stem cell phenotypes”
Department of Electrical Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA (2015.03.10)
 15. **K. Kamei**
“Creating the right microenvironments for controlling stem cell phenotypes”
STEM CELLS & REGENERATIVE MEDICINE SEMINAR, King's Centre for Stem Cells & Regenerative Medicine, King's College of London, London, UK (2015.02.25)
 16. **K. Kamei**
“Creating the right microenvironments for controlling stem cell phenotypes”
Department of Bioengineering, University of California, Berkeley, CA, USA (2015.02.23)
 17. **K. Kamei**
“Bio-inspired microfluidic platform to create artificial cellular environments for control cellular functions”
ETH Basel, Basel, Switzerland, (2014.03.24)
 18. **亀井 謙一郎**
「Body on a Chip : 人体の再構成と創薬への応用」
電子情報技術部会、MEMS分科会講演会 (2014.02.17)
 19. **K. Kamei**
“Nano/microengineering cellular niche to control human pluripotent stem cells”
University of Bristol, Bristol, UK, (2014.01.09-10)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔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 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

<https://ken1kamei.wordpress.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 謙一郎 (KAMEI, Ken-ichiro)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
特定拠点准教授
研究者番号： 0 0 5 8 8 2 6 2

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

廣理 英基
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特
定拠点准教授
研究者番号： 0 0 5 1 2 4 6 9

(4) 研究協力者

()