

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09098

研究課題名(和文) 微小血管構造を有するヒトiPS細胞由来心筋球を用いた新しい細胞移植法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cell transplantation method using cardiomyocytes derived from human iPS cells with microvessel structure

研究代表者

金澤 英明 (Kanazawa, Hideaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40338033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：酸素透過性のポリジメチルシロキサン(poly-dimethylsiloxane; PDMS)膜を底面とする特殊な培養器(PDMS培養器)を用いることによって、心筋塊(スフェロイド)の作製が可能となった。これらの心筋細胞は、成熟化マーカーであるmyosin light chain (MLY2)が高い傾向にあり、心筋細胞が成熟化傾向にあった。一方、酸素透過しない従来の培養器では、低酸素誘導因子(HIF: Hypoxia-Inducible Factor)のtarget遺伝子発現が高い傾向が確認された。

研究成果の概要(英文)：By using a special incubator with an oxygen permeable poly-dimethylsiloxane (PDMS) membrane as the bottom surface, it was possible to produce myocardial spheroids. These cardiomyocytes tended to have a high myosin light chain (MLY2) which is a maturation marker. On the other hand, in the conventional incubator that does not permeate oxygen, the tendency of target gene expression of Hypoxia-Inducible Factor (HIF) was high.

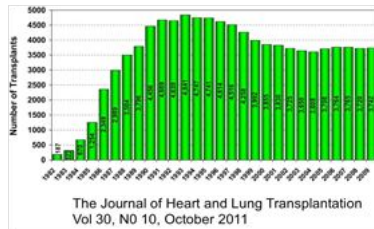
研究分野：心筋再生

キーワード：心筋再生医療 iPS由来心筋細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全の予後は悪性腫瘍と同等に悪く、重症心不全の根治療法には心臓移植以外の方法が存在しない。しかし、移植心臓のドナー不足は深刻な問題であり心臓移植の数は全世界で4,000例にも満たない(下図)。

世界の心臓移植数



これまで欧米では骨格筋芽細胞、骨髄幹細胞、血管内皮前駆細胞など様々な体性幹細胞を用いた臨床試験が虚血性心疾患を対象に数多く行われてきたものの、一定の臨床成果は認められず、依然として細胞治療の最適化を模索している状況である。

一方、iPS細胞(人工多能性幹細胞)を用いた再生医療を目指した研究は、我が国を中心に急速に発展し、心臓移植にかわる治療として再生医療が注目され、再生心筋細胞の移植治療が理論上は可能となった。しかし、再生心筋細胞を用いた細胞移植療法には、克服すべき課題も多い。これまでの基礎研究により安全、かつ効率的な心筋細胞の純化精製が可能となり、心筋再生医療の具現化は目の前まで来ているが、最後に残された課題は最適な移植法の開発である。

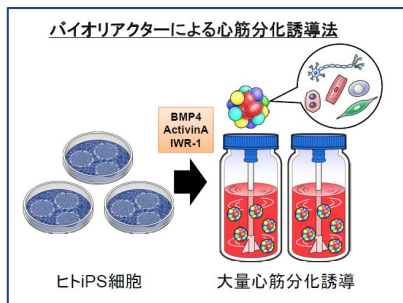
2. 研究の目的

本研究では、Tissue engineering 技術を活用して、iPS由来心筋細胞と微小血管構造を有するマイクロゲル心筋球の作製を行い、より効率的な移植法を確立し、iPS細胞を用いた心筋再生医療の具現化を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

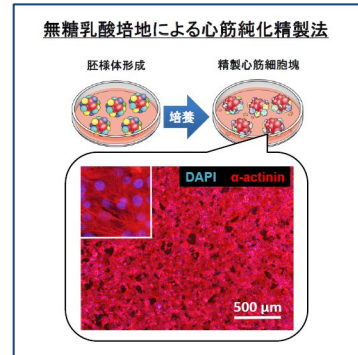
(1) バイオリアクターによる大量培養システムを用いた心筋分化誘導

本研究では、大量のiPS細胞が必要になるため、我々の開発したバイオリアクターによる大量培養システムを用いて分化誘導した心筋細胞を含む細胞群を無糖乳酸培地に曝露させ、未分化幹細胞や非心筋細胞を除去し、純化心筋細胞のみを回収する(下図)。



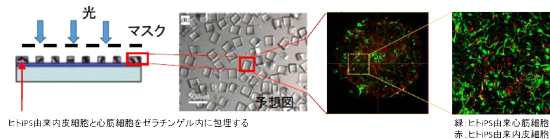
(2) ヒト iPS 由来精製心筋細胞の作製

分化誘導した心筋細胞を含む細胞群を無糖乳酸培地に曝露させ、2日おきにピペッティングおよび40μmのフィルターを用いた培地交換を行い、未分化幹細胞や非心筋細胞を除去し、純化心筋細胞のみを回収する(下図)。



(3) HUVEC 細胞による微小血管網を有するヒト iPS 由来心筋塊の作製

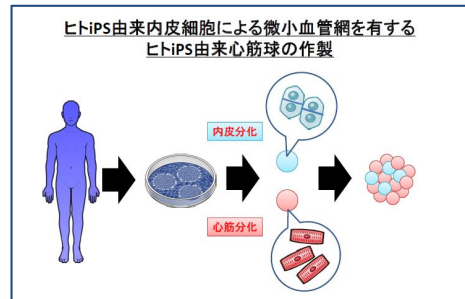
横浜国立大学工学部(福田淳二准教授)との共同研究により、Tissue engineering 技術を導入し、効率的な細胞生着機能を有する移植細胞塊を作製する。具体的には、光パターニング法によって200μm前後の球状のマイクロゲルを作製し、ヒト iPS 由来血管内皮細胞、および純化精製心筋細胞をゲル内に包埋、培養することによって3次元構造を持った移植細胞塊を作製する(下図)。



(4) ヒト iPS 由来内皮細胞による微小血管網を有するヒト iPS 由来心筋球の作製

(3)において心筋球内に微小血管網が確認できた際には、株化細胞であるHUVECをヒト

iPS 由来血管内皮細胞に置き換えることにより、同様の現象が観察できるか否か確認する(下図)。



(5) 大動物(ブタ)心機能低下モデルの作製および移植実験

マイクロミニブタを用いて心筋傷害モデルを作製し、他のプロジェクトにて開発している移植デバイスを用いて血管網を有するiPS由来心筋細胞含有マイクロゲルをモデル動物に移植し、長期的な心筋内の細胞生

着・生存率の解析を行う。

4. 研究成果

本研究では、細胞移植に際し高純度の iPS 由来心筋細胞が大量に必要なため、その培養、純化精製システムの構築が重要な課題であった。また、腫瘍化のリスクを克服するために、未分化幹細胞や心筋以外の細胞の代謝特性と心筋細胞の代謝特性を詳細に解析することで、培養液を変えるだけで心筋細胞を純化精製する技術を確立してきた。さらに、心筋細胞の量産化に関しても、2 次元系あるいは 3 次元系の大量培養技術を確立し、移植に必要な数億個の心筋細胞を一度に作製することを可能とした。そして、この細胞の凍結保存、解凍培養が可能な条件を見出したため、研究室間の細胞輸送が可能となり、研究の進捗促進に繋がった。

また、スフェロイドの作製については、当初、光パターニング法、コラーゲンモールドイング法を検討してきたが、培養細胞が培養皿に接着せず浮遊してしまうなどの問題点も明らかとなり進捗が得られなかったが、酸素透過性のポリジメチルシロキサン (poly-dimethylsiloxane; PDMS) 膜を底面とする培養器 (PDMS 培養器) を用いることによって、ある程度の大きさ (100~300 μm) のマイクロゲルでも拍動する成果が得られた。そして、酸素透過性の PDMS 膜を底面とする培養器を用いて作製した細胞の解析では、成熟化マーカーである myosin light chain (MLY2) が高い傾向にあり、心筋細胞が成熟化傾向にあった。一方、酸素透過しない従来の培養器では、低酸素誘導因子 (HIF: Hypoxia-Inducible Factor) の target 遺伝子発現が高い傾向が確認された。以上の成果より、心筋移植により適した心筋塊 (スフェロイド) の作製が可能となった。

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)

(1) Tohyama S, Fujita J, Fujita C, Yamaguchi M, Kanaami S, Ohno R, Sakamoto K, Kodama M, Kurokawa J, Kanazawa H, Seki T, Kishino Y, Okada M, Nakajima K, Tanosaki S, Someya S, Hirano A, Kawaguchi S, Kobayashi E, Fukuda K. Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports* 9;2017, p1406-1414. 査読あり、DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.08.025.

(2) Tohyama S, Tanosaki S, Someya S, Fujita J, Fukuda K. Manipulation of Pluripotent Stem Cell Metabolism for Clinical Application. *Curr Stem Cell*

Rep.3;2017,p28-34. 査読あり、DOI: 10.1007/s40778-017-0073-9.

(3) Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K. Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metab.* 23;2016, p663-674. 査読あり、DOI: 10.1016/j.cmet.2016.03.001.

(4) Nakajima K, Fujita J, Matsui M, Tohyama S, Tamura N, Kanazawa H, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Sano M, Goto S, Tabata Y, Fukuda K. Gelatin Hydrogel Enhances the Engraftment of Transplanted Cardiomyocytes and Angiogenesis to Ameliorate Cardiac Function after Myocardial Infarction. *PLoS One* 10(7);2015, e0133308. 査読あり、DOI: 10.1371/journal.pone.0133308.

(5) Kishino Y, Seki T, Yuasa S, Fujita J, Fukuda K. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral T Cells Using Sendai Virus in Feeder-free Conditions. *J Vis Exp.* 105;2015, e53225. 査読あり、DOI: 10.3791/53225.

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 福田恵一、遠山周吾、関倫久、中嶋一晶、湯浅慎介、金澤英明、藤田淳、臨床応用前夜となった iPS 細胞による心筋再生医療の今後の展開、第 21 回日本心不全学会学術集会、2017 年

(2) 福田恵一、遠山周吾、金澤英明、関倫久、中嶋一晶、藤田淳、湯浅慎介、臨床応用前夜となった iPS 細胞による心筋再生医療の今後の展開、第 65 回日本心臓病学会学術集会、2017 年

(3) 田部井亮太、金澤英明、藤田淳、遠山周吾、平野暁教、川口新治、志水秀行、田畑泰彦、小林英司、福田恵一、iPS 由来心筋細胞を用いた重症心不全に対する心筋再生医療における移植デバイスの開発、第 20 回日本適応医学会学術集会、2016 年

(4) 大野麗、遠山周吾、藤田淳、福田恵一、Generation of NKX2-5 DsRed/w hiPSCs using TALE nucleases. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年

〔図書〕(計 1 件)

(1) Seki T, Yuasa S, Fukuda K. Human iPSC Cells in Disease Modelling. Recent Improvements and Emerging Issues in iPSC Generation for the Modeling of Disease. Springer. 2016.p1-10.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金澤 英明 (KANAZAWA, Hideaki)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師
研究者番号 : 40338033

(2)連携研究者

藤田 淳 (FUJITA, Jun)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・特任准教授
研究者番号 : 10306706

福田 恵一 (FUKUDA, Keiichi)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授
研究者番号 : 20199227

福田 淳二 (FUKUDA, Junji)
横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号 : 80431675