

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01338

研究課題名(和文) 心臓原始形態モデルを用いた循環器システムの開発とエネルギー変換機構のモデル化

研究課題名(英文) Development of cardiovascular system using fundamental heart model and modelling of energy conversion mechanism

研究代表者

東藤 貢 (Todo, Mitsugu)

九州大学・応用力学研究所・准教授

研究者番号：80274538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：心臓原始形態モデル開発のための基本的材料として、iPS細胞由来心筋細胞を用いて自己的に拍動する心筋細胞シートを作製した。さらに、拍動挙動を表す数理モデル開発に必要な構成則を、能動的応力の理論式と粘弾性直列モデルを組み合わせることで導出し、実験結果と一致することを確認した。次に、心臓原始形態モデルの部分的構造部材として、心筋細胞シートを利用してチューブ状3次元構造体の開発に成功した。さらに、チューブの拍動により内部で拍動に連動した流動が存在することを確認した。また、心筋シートと同様に、能動的応力と粘弾性モデルを組み合わせることで導出した構成則が、応力-ひずみ挙動をよく再現することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物心筋細胞やiPS細胞由来心筋細胞を用いて自己的に拍動するアクチュエータを作製した研究例は見受けられるが、その力学挙動の詳細に関する研究は少なく、特に応力-ひずみ応答に関連した理論的研究はほとんど行われていなかった。本研究は、世界で初めてiPS細胞由来心筋細胞シートと3次元チューブ状構造体の拍動に関連した応力-ひずみ応答が、能動的応力の理論式と粘弾性モデルを組み合わせることで表現できることを明らかにした。さらに、本研究で開発したチューブ状構造体は、循環器系システムモデルの開発に利用可能であり、循環器系医学への貢献も期待される。

研究成果の概要(英文)：Cardiac cell sheets with natural pulsation were successfully constructed using iPS cells derived cardiomyocytes as the basic material for the development of a fundamental heart model. A constitutive law to express the stress-strain response was derived from a theoretical model of active stress combined with a simple viscoelastic model. The constitutive model was found to coincide with the experimental result well. A 3D tube structure was successfully developed using the cardiac cell sheets. It was then found that the internal fluid flow was connected with the pulsation behavior. It was also confirmed that the theoretical model of the constitutive law can be used to predict the stress-strain response of the 3D tube model.

研究分野：生体医工学

キーワード：iPS細胞 心筋細胞 拍動 サルコメア力学 粘弾性 能動的応力

1. 研究開始当初の背景

心臓は生命を維持するために、常時全身に血液を送る役割を担う「循環ポンプ」であり、生体内で唯一独立して運動している臓器である。機械工学的には、心臓は大変興味深いエネルギー変換システムといえる。心筋細胞内のミトコンドリアにおいて、ATPの化学反応によりエネルギーが生成され、アクチンとミオシンのタンパク質からなるサルコメアが滑り運動を引き起こし、心筋組織全体の収縮運動が生じる。この運動が心臓全体の拍動を引き起こし、最終的に血液の流動という外部仕事へと変換される。心臓の拍動は心房の拍動と心室の拍動に区別されるが、これらは、それぞれ洞房結節と房室結節という自発的に運動する結節細胞から形成される組織により制御されている。この制御は、電気的な刺激として心臓内部を伝わって行われる。このように、心臓は、化学的、電氣的、機械的エネルギーが巧妙に効率よく変換される理想的なエネルギー変換システムといえる。このような心臓のメカニズムについては、細胞レベルでの化学的プロセスとミクロ運動と心臓レベルでのマクロ運動を結び付ける理論モデルがいくつか発表され、詳細なメカニズムが明らかになりつつあるのが現状である。

一方、心不全等で機能が低下した心臓に対して、現在の心臓外科では、人工心臓で一時的に置換した後、心臓移植を行う方法がとられているが、わが国におけるドナー不足や海外における高額な医療費が問題となっている。そのため再生医療に対する期待はますます高まっており、最近では、東京女子医大の岡野らによる細胞シート技術の確立⁽¹⁾と大阪大学心臓血管外科の澤による手術法の確立⁽²⁾により、足の筋肉の筋芽細胞シートを患部に貼りつける再生治療の臨床研究が行われ、その有効性が示されている。さらに今年度より、iPS細胞由来心筋細胞(以下 iPS 心筋細胞)の細胞シートを用いた臨床研究も計画段階に入っている。しかし、大規模な組織や心臓そのものを置き換えるような再生医療の確立までには、解決すべき数多くの問題が残されているのが現状であった。

このような現状の下、機械工学と再生医学の両方の観点から、学術的「問い」として、(i)心臓という高効率なエネルギー変換システムの機構を工学的に応用することは可能か、(ii)心筋細胞から基本的な心臓モデルを作製することは可能か、(iii)細胞から作製した心臓モデルで循環器システムを構築することは可能か、(iv)心臓モデルや循環器システムの数理モデルを構築することは可能か、(v) iPS 心筋細胞は健全な心筋細胞と同等の機械的エネルギーを発現できるのか、などが挙げられるが、これらの「問い」を解決するための統合的研究(実験的研究と理論・数値解析研究)は、ほとんど実施されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

当初の本研究の第一目的は、iPS心筋細胞と生体適合性ポリマーを用いた足場構造(骨組み構造)とを組み合わせ、1心房、1心室および弁から構成される基本的な原始心臓モデルを開発することであった。次に、作製した原始形態モデルを用いて生体内の循環器系を模擬した実験システムを構築し、心臓の原始形態における化学的エネルギー生成ならびに機械的エネルギー生成(拍動と流動)を定量的に評価することを第二の目的とした。これらを実現するために、基礎的研究として、iPS心筋細胞を用いた2次元構造体として細胞シートを作製し、その自発的拍動挙動を変形体力学を用いて解析し、基本的な能動的応力と主ひずみの関係性を明らかにすることを目的とした。さらに3次元構造化への挑戦として、チューブ状構造体の作製を行い、拍動挙動、チューブ内部の流動挙動、チューブの能動的応力と主ひずみの関係を明らかにすることを目的として、研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの作製と評価

研究に利用した iPSC-CM は市販のものである。細胞培養条件を表 1 に示す。iPS 心筋細胞からなる 2 次元構造体として細胞シートを作製した(図 2 左)。細胞シート作製の概要を図 1 左に示す。細胞シートは拍動挙動を示すまで培養し、光学顕微鏡、高速度カメラ、動画解析システムから構成される拍動解析システムを用いて、拍動挙動ならびにカルシウムイオン変動について計測を試みた。拍動挙動を示す動画を画像相関法を用いて解析し、最小主ひずみ(最大の圧縮応力)

表 1 細胞培養条件

Cell type	Human iPS cell derived cardiomyocytes (Myorige)
Number of cells	1.0 × 10 ⁶ cells/well
Culture medium	Seeding : thawing medium (Myorige) During culturing : Maintenance medium (Myorige)
Amount of medium	Seeding : 500 [μL/well] Day1 ~ day14 : 2.00 [mL/well]
Culture substrate	24well Temperature responsive culture plate (UpCell)
Culture days	14 days (37°C, 5%CO ₂)

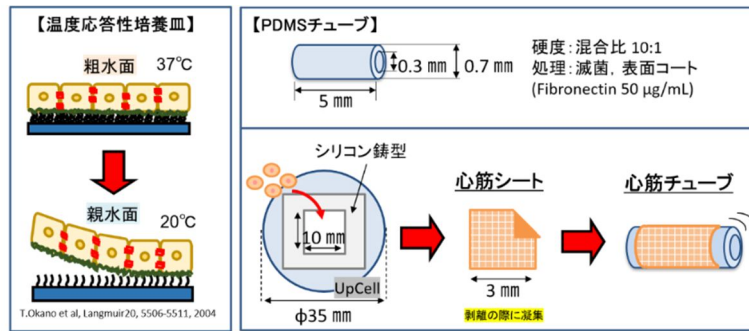


図1 細胞シートと心筋チューブの概要

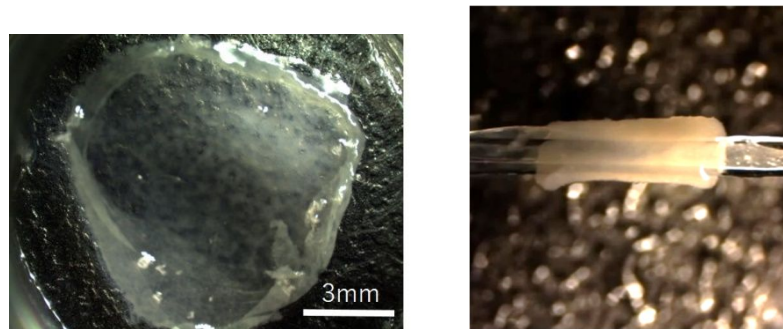


図2 心筋細胞シートと心筋チューブ

を計測した。また、細胞シートに生じる能動的応力を評価するために、カルシウムイオン変動を考慮したサルコメア力学に基づいた Guccione の理論を利用した。一方、粘弾性の基本的モデルのひとつである Maxwell モデルを用いて、応力-ひずみ関係（構成則）を導出し、能動的応力と組み合わせて応力-ひずみ関係の理論式を導出した。

(2) 3次元心筋チューブ構造体の作製と評価

図1に心筋チューブの作製法の概要を示す。まず最初に PDMS で微小なチューブを作成し、細胞の接着性を良くするために Fibronectin を表面にコーティングした。次に iPS 心筋細胞を正方形に加工したシリコンの型の中で培養することで、1辺が 3mm 程度の正方形上の心筋細胞シートを作製した（図2右）。この心筋シートを PDMS チューブの表面に貼りつけることで、心筋チューブを作製した。心筋チューブを培地に浸して培養するとき、培地に微小なセラミックス粒子（リン酸カルシウム系粒子）を分散させ、前述の高速動画撮影システムで撮影後、セラミックス粒子のチューブ内部での変位を計測することで、心筋チューブの拍動にともなう流動状態を定量的に評価した。また、培地の温度を変えて培養しながら拍動挙動を計測し、培養温度が拍動の周波数や振幅に及ぼす影響を定量的に評価した。一方、心筋シートの力学特性評価と同様に、拍動を撮影した動画に画像相関法を適用して、主ひずみを評価した。また、Guccione 理論による能動的応力の評価⁽³⁾、粘弾性 Maxwell モデルを用いた構成則の定式化を行い、非線形能動的応力-最小主ひずみ関係の評価した。

4. 研究成果

心筋シートの拍動挙動とカルシウムイオン変動を図3に示す。作製した心筋シートは自発的に拍動し、その拍動挙動はカルシウムイオンの変動挙動とリンクしていることが分かる。このことは、カルシウムイオン変動を導入した能動的応力の理論モデルが妥当であることを示唆している。

図4に画像相関法を用いて計測した最小主ひずみの時間変動を示す。拍動が開始され心筋シートが収縮し始めるのに伴い最小主ひずみは増加を開始し、約 0.2s でピークを迎え（最大収縮状態）、その後弛緩と共に最小主ひずみは減少する。能動的応力の理論値と最小主ひずみの実験値より得られた応力-ひずみ挙動と粘弾性モデルより得られた応力-ひずみ挙動を合わせて図5に示す。実験と理論はよく一致しており、粘弾性特有のヒステリシスループを描いていることが分かる。図6に心筋チューブの応力-ひずみ挙動を示す。心筋シートの応力-ひずみ挙動に類似した粘弾性的ヒステリシスループが観察された。

一般的に、ポリマー等の粘弾性材料で現れるヒステリシスループは、それぞれの材料で特有のエネルギー散逸機構と関係していることが知られている。心筋シートあるいは心筋チューブの場合は、心筋細胞内でのエネルギー変換およびエネルギー消費のメカニズムとして、ヒステリシスループの関係を考察することができる。そのメカニズムの概要を図7に示す。たとえばエネルギー消費メカニズムとして考えられるのは、細胞間の摩擦仕事や細胞小器官の粘弾性変形あるいは粘性流動等である。

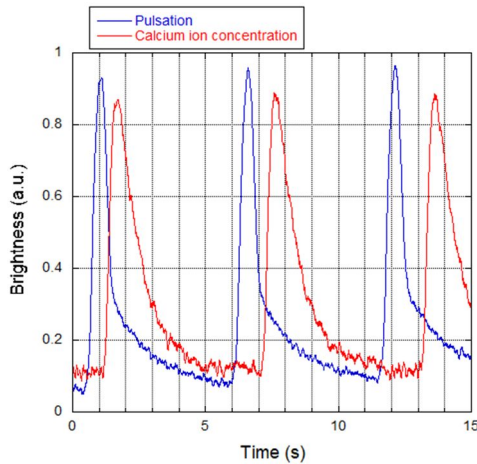


図3 拍動挙動とカルシウムイオン変動

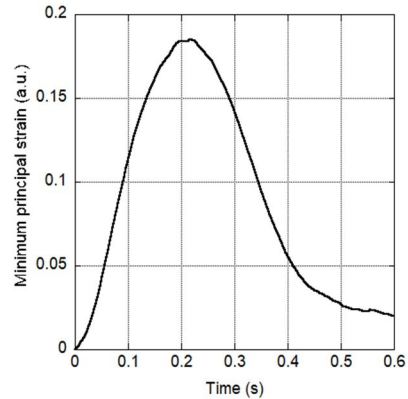


図4 最小主ひずみの時間変動

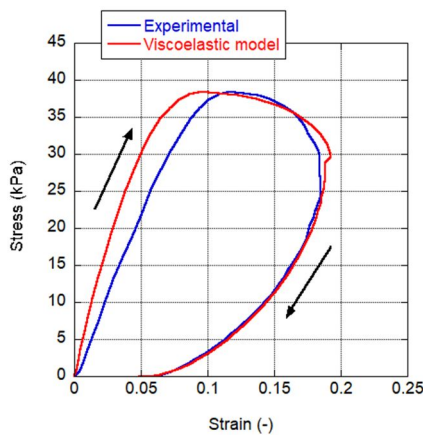


図5 心筋シートの応力-ひずみ挙動

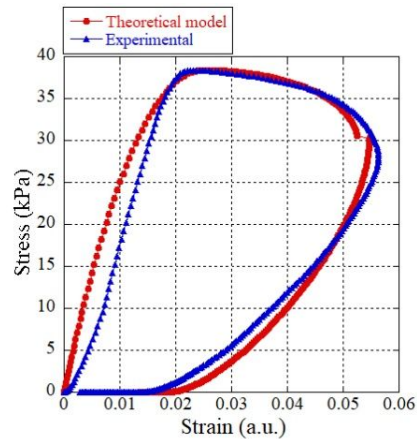


図6 心筋チューブの応力-ひずみ挙動

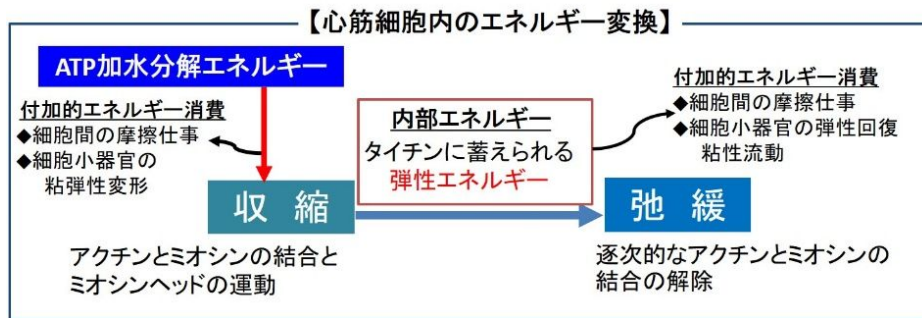


図7 心筋細胞内のエネルギー変換機構のモデル化

参考文献

- (1) H. Sekine, T. Shimizu, J. Yang, et al. : Pulsatile Myocardial Tubes Fabricated With Cell Sheet Engineering : Circulation, 114, 2006, I-87-I-93.
- (2) M. Kawamura, S. Miyagawa, S. Fukushima, et al.: Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart : Circulation, 128, 2013, S87-S94.
- (3) J. M. Guccione, L. K. Waldman, A. D. McCulloch : Mechanics of Active Contraction in Cardiac Muscle: Part II—Cylindrical Models of the Systolic Left Ventricle : Journal of Biomechanical Engineering, 115, 1993, 82-90,

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shahrul Hisyam Marwan, Mitsugu Todo	4. 巻 4
2. 論文標題 Biomechanical Analysis of Myocardial Infarction and Regenerative Therapy of Human Heart using Dynamic Finite Element Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biotechnology and Biomedicine	6. 最初と最後の頁 10-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26502/jbb.2642-91280034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroko Kurita, Saki Ikeda, Yasuyuki Morita, Mitsugu Todo
2. 発表標題 Mechanical analysis of pulsation behavior of human iPSC-derived cardiomyocytes
3. 学会等名 International Conference on Advanced Technology in Experimental Mechanics 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東藤貢、近藤聖奈、池田沙樹、栗田寛子
2. 発表標題 心筋力学モデルを用いたヒトiPS細胞由来心筋細胞の拍動挙動の解析
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsugu Todo, Azizah Intan Pangesty
2. 発表標題 Development and characterization of biodegradable polymeric scaffolds for cardiovascular tissue engineering
3. 学会等名 5th International Conference on Materials and Reliability（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗田寛子、東藤貢
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞の拍動を表現する数理モデルに関する基礎的研究
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗田寛子、東藤貢
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いたチューブ状構造体の作製と評価
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------