

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K08763
研究課題名（和文）バイオ3Dプリンタを用いたスカフォールドフリー心筋組織体の薬理試験方法の確立

研究課題名（英文）Drug response of scaffold-free cardiac constructs fabricated using bio-3D printing

研究代表者
荒井 健一（Arai, Kenichi）

富山大学・医学部・客員助教

研究者番号：40752960
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：新薬開発に於いて心毒性や薬理応答性を評価する為に、ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた3次元心筋組織体の開発は有用である。我々は、以前にバイオ3Dプリンタを用いて足場材料を使用せずに心筋組織体を作製する技術について報告してきた。本研究では、作製した心筋組織体の薬理応答性を評価する為に収縮力を測定する方法を開発した。我々は、剣山上に積層された心筋組織体が収縮する際の針の移動量を測定した。イソプロテレノール、プロプラノロール、プレビスタチン、E-4031を添加した際の収縮力と拍動回数を測定した。その結果、開発した方法を用いることで心筋組織体の収縮力、薬理応答性を評価することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品、化粧品を開発する為には、動物実験が必要不可欠だが、動物とヒトの種差の違いから薬効が異なることが課題として挙げられており、ヒト細胞を用いた新しい動物実験代替法が強く望まれている。本研究で開発した手法は、3次元心筋組織体を作製する為に足場材料を使用していないこと、心筋組織体作製に用いる剣山の針を利用することで、収縮力を評価することが出来る為、収縮力に影響を及ぼす様な薬剤の薬理応答性を評価するのに有効だと考えている。医薬品販売に於いて、心毒性が開発中止の一番の要因になっていることから、本手法が確立出来れば、新薬開発に貢献できる為、社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：3D cardiac constructs fabricated using human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes are useful for evaluating the cardiotoxicity and drug response to new drug. We previously reported the fabrication of scaffold-free 3D cardiac constructs using a bio-3D printer, which can load cardiac spheroids onto a needle array. In this study, we developed a method to measure the contractile force in order to evaluate the drug response in cardiac constructs. We measured the movement of needle tip upon contraction of cardiac constructs on needle array. In order to evaluate drug response, contractile properties of cardiac constructs were measured following treatment with isoproterenol, propranolol, blebbistatin and E-4031. As a result, the developed method can evaluate the contractile force and drug response of cardiac constructs.

研究分野：組織工学

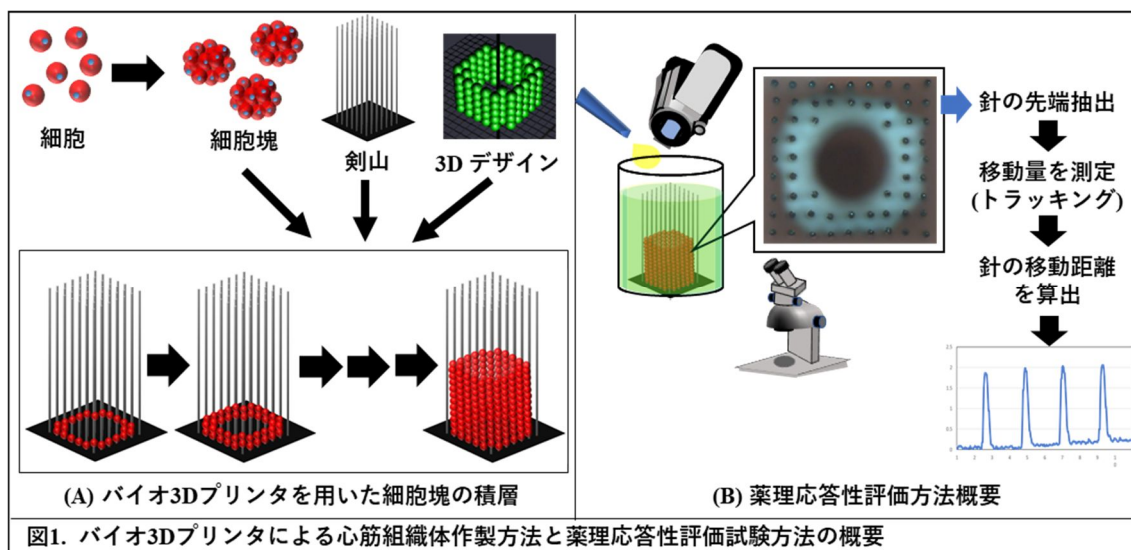
キーワード：バイオ3Dプリンタ ヒトiPS細胞由来心筋細胞 組織工学 スカフォールドフリー 薬理学 動物実験代替法

1. 研究開始当初の背景

医薬品、化粧品を開発する為には、動物実験は必要不可欠である。しかし世界各国で動物愛護の規制が厳しくなっており、新しい動物実験代替法が望まれている。上記の背景から再生医療、組織工学技術による組織体の作製は臓器移植代替法だけでなく、動物実験代替法としても着目されている。その中でも心臓への薬理応答の理解は医薬品の販売中止理由の中で心毒性が一番多い為、新薬を開発する上で重要な課題となっている。

我々の研究室では今までに細胞の凝集体であるスフェロイドを用いて、足場材料を使用せず(スキャフォールドフリー)に3次元の組織体を形成できるバイオ3Dプリンティング技術を確立している。本手法は、細胞の凝集塊をマイクロ剣山上に任意の形態に積層することで、細胞塊同士が融合して、スキャフォールドフリー組織体を作製することが出来る。我々の研究グループは今までに血管、肝臓、軟骨構造体の作製に取り組んできた。我々は、ヒトiPS由来心筋細胞を用いて心筋構造体の作製に取り組んでいる(K Arai et al, PLoS One . 2018 Dec 17;13(12):e0209162.)。作製した構造体は一定のリズムで拍動し、構造体内部に血管様構造を有していることが明らかになった。我々は本技術が臨床に適用出来るか検討する為に動物実験の準備をしている。しかし、小動物での移植試験から始まり、組織体のボトムアップ化、大動物での移植実験等、臨床応用まで到達するまでに多くの時間と研究費用を要する。

本研究では上記の技術が、臓器移植の代替法だけでなく、創薬領域に対して、新しい動物実験代替法としてより早く医療に貢献できることが期待される。そこで本研究では、バイオ3Dプリンタを用いてヒト心筋構造体を作製し、薬理作用を観察出来るシステムを確立する(図1)。



2. 研究の目的

本研究では、生体内同様に薬剤応答するスキャフォールドフリーヒト心筋組織体の作製及び、その構造体を用いた薬剤の新しい評価方法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) バイオ3Dプリンタを用いた心筋組織体の作製

心筋組織体を作製する為に、ヒトiPS細胞由来心筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞を組み合わせることで、約500μmの心筋スフェロイドを作製した。作製から5日後、バイオ3Dプリンタを用いてマイクロ剣山上に管状のデザインで心筋スフェロイドを積層した。心筋組織体を作

製後、自作のかん流装置内で培養液をかん流しながら、培養することで、スフェロイド同士の融合を促進させた。7日間培養後、電気刺激、温度応答性の評価、又、薬剤の薬理応答性、心毒性を評価するのに用いた。

(2)心筋組織体の収縮力を測定するシステム開発

剣山上に積層された心筋組織体の収縮力と拍動回数を解析する為に、心筋組織体が収縮する度にたわむ針の移動量は実体顕微鏡を用いて測定された。測定は、デジタルカメラ(Leica MC120HD)により撮影した動画を我々の研究室で開発したソフトウェアを用いて解析した。このソフトウェアは、剣山の針の先端を認識し、移動距離を追跡することが出来る。本研究にて開発された自作のソフトウェアは、以下のホームページからダウンロードできる様になっている(https://github.com/Nlabs-7652/Bending_Analyzer/releases/)。薬剤添加前の針の移動量を基準にして、薬剤添加時の針の移動量を測定した。

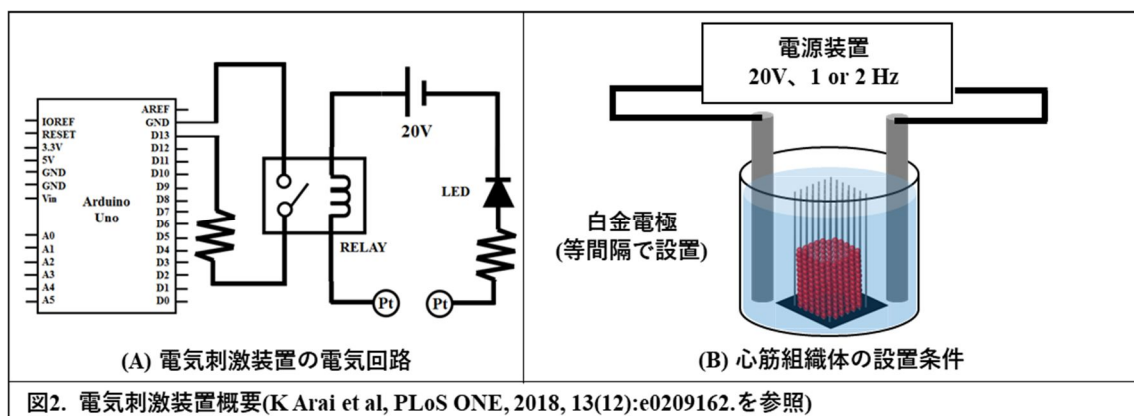
(3)組織学的な評価

心筋組織体は10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋後、5 μ mの切片を作製後、HE染色、免疫染色(トロポニンT、CD31、ビメンチン)、TUNEL染色をした。1次抗体として、トロポニン(100倍希釈、MS-295-P0, Thermo Fisher Scientific, Inc.)、CD31(75倍希釈、NCL-CD31-1A10, Leica Biosystems)、ビメンチン(300倍希釈、Biocare Medical)を使用した。TUNEL染色に関しては、*in situ* cell death detection kit (Roche Applied Science)を使用した。染色後、BZ-X700顕微鏡を用いて観察及び、陽性細胞数を解析した。

(4)電気刺激、温度応答性の評価

電気刺激装置に関しては、白金電極と電源装置(PSW 80-13.5)を組み合わせで検討した(図2)。剣山上に積層された心筋組織体は、白金電極間の中心に設置され、電気刺激を供された。電気刺激条件は、20V、1Hz又は2Hzで実施された。

心筋組織体の温度応答性を評価する為に、27 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、43 $^{\circ}$ Cにウォーターバスを設定し、30分間インキュベートした。インキュベーション後、心筋組織体の拍動回数、収縮力は顕微鏡を用いて観察した。



(5)薬理応答性の評価

薬理応答性を評価する為に、イソプロテレノール(1 μ M、Sigma-Aldrich)、プロプラノロール(5 μ M、Sigma-Aldrich)、プレビスタチン(500nM、Wako Pure Chemical Industries)、E-4031(500nM、Wako Pure Chemical Industries)を検討した。各濃度の薬剤を添加後、以下の時間(添加直後、10分後、20分後、30分後)に心筋組織体の収縮を観察した。観察した後、培地で3回洗浄後、薬理応答性に対して可逆性を有するか検討する為に洗浄直後、洗浄10分後、洗浄20分後、洗浄30分後、洗浄60分後に心筋組織体の収縮を測定した。

(6)心毒性の評価

心毒性を評価する為に、抗がん剤として知られているドキソルピシンを使用した。10 μ M ドキソルピシンを添加して、24 時間後、72 時間後に心筋組織体の収縮力の測定、トロポニン T(心筋細胞特異的なマーカー)、CD31(血管内皮細胞特異的なマーカー)、ビメンチン(間葉系細胞特異的なマーカー)の染色、TUNEL 染色による細胞の生存率の測定を実施した。撮影された画像は、Image analysis software BZ-X series により解析された。

(7)薬理応答性観察システムの改良

針の先端をより正確にトラッキング出来る様に、剣山を設置するスタンドを微調整出来る様にした。更に剣山の針先のみを光らせること出来る為、LED ライトを代わりに使用した。

4. 研究成果

(1)心筋組織体作製条件の最適化

作製した心筋組織体の培養期間を最適化した。その結果、作製してから、培養 7 日目で細胞塊同士が剣山上で融合し、管状の心筋組織体を作製することが出来た。次に、作製直後から作製して 7 日目の心筋組織体の収縮力を剣山の「針の移動量」により測定した。その結果、培養 7 日目では作製直後よりも拍動回数が減少しており、針の移動量は増加していた。本研究で使用している細胞はヒト iPS 細胞由来心筋細胞であり、成人ヒト心筋細胞と比べると、幼若だと報告されている。従って、バイオ 3D プリンタで 3 次元細胞組織体として構築することで、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞が 3 次元培養環境を付与され、成熟化したと我々は想定している。

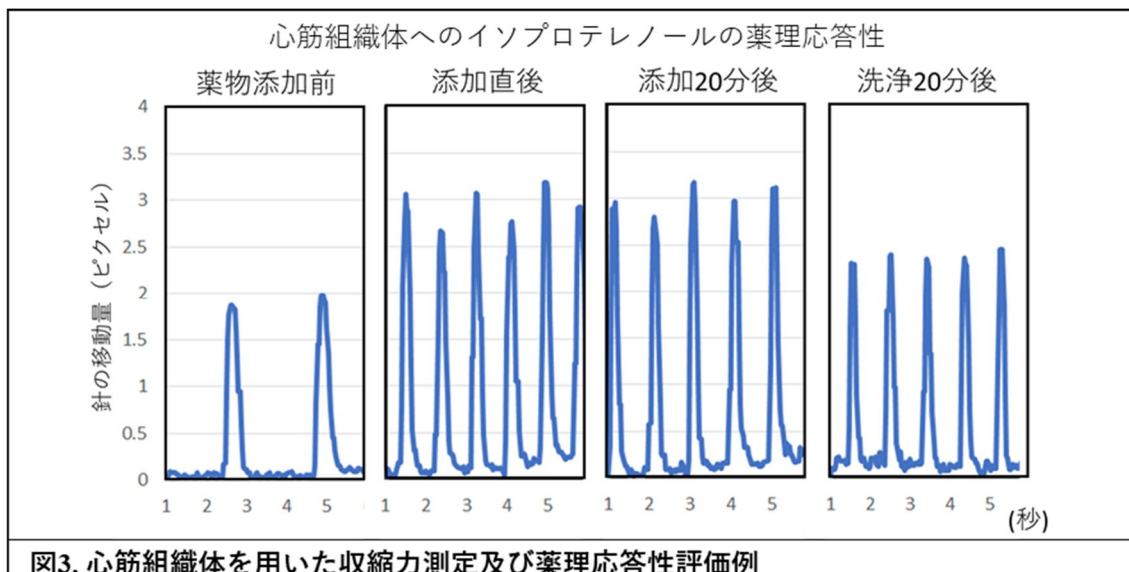
以上のことから、薬理応答性を評価する為には、心筋組織体は作製から培養 7 日目以降のものを使用することにした。

(2)心筋組織体の温度応答性、電気刺激応答性の検討

作製した心筋組織体が温度応答性、電気刺激応答性を有するか確認した。その結果、通常の培養条件(37)では、42 回/min の拍動回数なのに対して、心筋組織体は低温培養条件(27)では拍動回数が減少し(18 回/min)、高温培養条件(43)では拍動回数が増加した(54 回/min)。更に、電気刺激応答性に関しては、電気刺激装置を用いて 1Hz、2Hz を供した結果、心筋組織体の拍動回数を制御することが出来た。以上のことから、バイオ 3D プリンタを用いて作製した心筋組織体は心臓の生理学的特性を有していることが明らかになった。

(3)心筋組織体の薬理応答性評価

我々は、作製した心筋組織体に対して薬剤を添加し、正確に薬理応答性を測定出来るか検討した。薬理応答性を評価する為に、薬剤としてイソプロテレノール、プロプラノロール、プレピスタチン、E-4031 を選択した。心臓の収縮力と拍動回数を増加させることで知られているイソプロテレノールを心筋組織体に添加した結果、添加直後から収縮力と拍動回数が増加していた(図 3)。一方、心臓の収縮力と拍動回数を低下させることで知られているプロプラノロールを添加すると、心筋組織体の拍動は一時的に停止していた。両者ともに、薬剤を除去及び洗浄して暫く培養すると、収縮力、拍動回数は薬剤添加前に戻った。次に心筋細胞のミオシンを阻害することで収縮力を阻害することで知られているプレピスタチンを添加した結果、拍動回数は変化しなかったが、収縮力は減少した。次にカリウムチャネル阻害剤であり、抗不整脈薬として知られている E-4031 を心筋組織体に添加した。その結果、薬剤添加直後は、早期後脱分極と思われる拍動挙動が観察された。次に薬剤添加 10 分後には、心筋組織体の収縮の間隔が不均一になり、不整脈と思われる波形が観察された。以上のことから、我々の作製した心筋組織体とそれを用いたシステムは、心筋組織体の薬理応答性を正確に評価できることが実証された。



(4)心筋組織体の心毒性評価

次に心筋組織体に対する薬剤の毒性を評価する為に、抗がん剤として臨床応用されているドキソルビシン添加時の心筋組織体の拍動を評価した。心筋組織体にドキソルビシンを添加して、1 時間後、24 時間後、72 時間後に心筋組織体の収縮力、拍動回数を評価した。心筋組織体内の心筋細胞が薬剤の毒性により死細胞が増えているか確認する為に、組織学的に評価した。その結果、ドキソルビシン添加 24 時間後、心筋組織体の収縮力は著しく減少していた。72 時間後には心筋組織体の拍動が完全に停止していた。そこで、24 時間、72 時間の時の心筋組織体内の細胞の生存率、心筋細胞で発現するトロポニン T、血管内皮細胞陽性マーカーである CD31、線維芽細胞陽性マーカーであるビメンチンを染色することで、組織学的な評価をした。その結果、ドキソルビシン添加 24 時間、72 時間と心筋組織体の生存率は減少していた。それに伴って、ドキソルビシン添加 72 時間後にはトロポニン T の発現も急激に減少していた。一方で、CD31 やビメンチンの発現量は、ほとんど変化が見られなかった。以上のことから、ドキソルビシン添加時に組織体内の心筋細胞のみが毒性により生存率が低下し、血管内皮や線維芽細胞はほとんど影響を受けていないと我々は考えている。

(5)薬理応答性評価システムの改良

最後に、薬理応答性評価システムを改良することを目指した。本薬理応答性システムは、実体顕微鏡を用いて剣山の針の先端を観察しているが、剣山を設置した際に、微量のずれが生じて傾く為、全ての針の先端に焦点を合わせることが非常に困難であった。そこで、微量なずれを修正する為のジグを作製し、LED ライトで光を照射する場所を微調整し、実体顕微鏡で剣山の先端を観察した。その結果、全ての針の先端に焦点を合わせることができ、LED ライトの照射する場所を調整することで、針の先端に影が出来ることなく、観察することが出来た。今後は、改良したシステムで薬理応答性を評価することを想定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kitsuka T, Itoh M, Amamoto S, Arai KI, Oyama J, Node K, Toda S, Morita S, Nishida T, Nakayama K.	4. 巻 14
2. 論文標題 2-Cl-C.OXT-A stimulates contraction through the suppression of phosphodiesterase activity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiac organoids.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0213114.	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 -
1. 著者名 Arai K, Murata D, Verissimo AR, Mukae Y, Itoh M, Nakamura A, Morita S, Nakayama K	4. 巻 13
2. 論文標題 Fabrication of scaffold-free tubular cardiac constructs using a Bio-3D printer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0209162.	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 -
1. 著者名 Mukae Y, Itoh M, Noguchi R, Furukawa K, Arai KI, Oyama JI, Toda S, Nakayama K, Node K, Morita S	4. 巻 53
2. 論文標題 The addition of human iPS cell-derived neural progenitors changes the contraction of human iPS cell-derived cardiac spheroids.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tissue and Cell	6. 最初と最後の頁 61-67
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tice.2018.05.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arai Kenichi, Murata Daiki, Takao Shoko, Nakamura Anna, Itoh Manabu, Kitsuka Takahiro, Nakayama Koichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Drug response analysis for scaffold-free cardiac constructs fabricated using bio-3D printer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8972
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65681-y	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Arai K, Murata D, Nakayama K
2. 発表標題 Drug response of scaffold-free cardiac constructs fabricated using bio-3D printing
3. 学会等名 International Conference on Biofabrication (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒井健一、村田大紀、中山功一
2. 発表標題 バイオ3Dプリンタにより作製した心筋組織体を用いた薬理応答性の検討
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 荒井健一、村田大紀、中山功一
2. 発表標題 バイオ3Dプリンタを用いて作製した心筋組織体の薬理応答性の検討
3. 学会等名 第17回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenichi Arai, Daiki Murata, Koichi Nakayama
2. 発表標題 Drug response of scaffold-free cardiac constructs fabricated using bio-3D printing
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤大陸, 葛島航大, 下戸健, 荒井健一, 中山功一, 石川篤, 日垣秀彦
2. 発表標題 再生医療用細胞構造体の拍動カソフトウェアの開発
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimoto T, Arai K, Kuzushima K, Watanabe T, Nakayama K
2. 発表標題 Development of Software for Beat Force Analysis of the Cardiac Muscle Cell Constructs
3. 学会等名 The 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP Biomech 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 手嶋千尋, 下戸健, 荒井健一, 中山功一
2. 発表標題 心筋細胞構造体の非侵襲的評価のための拍動力解析ソフトウェアの開発
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Arai K, Nakayama K	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Kenzan Method for Scaffold-Free BioFabrication (Springer Nature)	5. 総ページ数 149-164
3. 書名 Bio-3D printed organs as drug testing tools	

〔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
研究分担者	下戸 健 (Shimoto Takeshi) (40412457)	福岡工業大学・情報工学部・准教授 (37112)	
研究分担者	中山 功一 (Nakayama Koichi) (50420609)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

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