

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04453

研究課題名（和文）インビオプリバスキュラリゼーションによる血管付き高機能心筋組織の創製

研究課題名（英文）Creation of functional heart tissues with perfusable vasculature using in vivo prevascularization techniques

研究代表者

関根 秀一（Sekine, Hidekazu）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60541737

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：心筋組織工学における大きな課題は、人工的に作られた3次元心筋組織への酸素や栄養供給が不十分であることで、作製組織の厚さが100～200 $\mu\text{m}$ 程度に制限されてしまうことである。そのため、より厚く、より機能的な心筋組織を作製するためには、血管の成長と形成を制御する技術が必要である。そこで生体内で毛細血管を再構築させる in vivo pre-vascularization による血管網導入法を開発し、細胞シート多層化することで血液循環の補助を可能とする1mm厚のカフ型立体心筋組織を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の技術をさらに発展させることで、重症心不全患者のための細胞から作製する循環補助システムの構築が可能となる。これを臨床応用できた場合には、疾患の根治または大幅改善が期待できる。

研究成果の概要（英文）：A major challenge in myocardial tissue engineering is that inadequate oxygen and nutrients supply to engineered 3D myocardial tissue limits the thickness of the fabricated tissue to about 100-200 $\mu\text{m}$ . Therefore, techniques to control the growth and formation of blood vessels are needed to fabricate thicker and more functional myocardial tissue. To address this issue, we have developed a method of inserting a vascular network by in vivo pre-vascularization, in which capillaries are reconstructed in vivo. By using it to create multiple layers of cell sheets, a cuff-shaped three-dimensional cardiac tissue with a thickness of 1 mm that can assist blood circulation was then realized.

研究分野：再生医工学

キーワード：組織工学 心筋再生 血管新生 血管床 循環補助 細胞シート 心不全 再生医療

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心不全は、冠動脈疾患、高血圧、拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症など様々な原因によって生ずる。末期心不全の最も効果的な治療法は心臓移植であるが、毎年実施できる移植の数はドナー不足により制限されている。植え込み型補助人工心臓の開発により、重症心不全患者に対する代替治療の選択肢が増えたが、現在使用されている機械式デバイスは、一部の患者で予後不良につながる様々な副作用を伴う。再生医療分野の進歩により、将来的には生体工学的な組織がドナー心臓に代わる実行可能な代替品になるかもしれないという期待が高まっている。人工ポリマーや脱細胞化組織などのあらかじめ形成された足場に心筋細胞を播種することで、機能が限定された心臓様組織が作製されている。一方、ハイドロゲルを用いたアプローチで機能的な心筋組織が作製されている。我々は、細胞シートを利用して高い細胞機能性を持つ心臓組織を作製する、足場を使わない方法を開発している。温度応答性のあるインテリジェントな表面上で心筋細胞を培養するもので、温度を下げるだけで培養皿から細胞シートを獲得することができる。細胞シートを積み重ねて3次元構築物を作り、縫合することなく、生体内の宿主組織に直接移植することができる。我々は、ヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) から心筋細胞シートを作製することに成功した。細胞シートはラットへの移植後に宿主心臓とギャップ結合を形成し、心筋梗塞のラットモデルで心機能を改善することを示した。しかし、現在では、数層の細胞シートの効果は、主に移植細胞による成長因子の分泌によるパラクリン効果に由来すると考えられている。血液を全身に送り出すための収縮力に直接寄与する心臓移植片の作製には、より厚い組織を生成する技術の開発が必要となっている。

### 2. 研究の目的

本研究では、十分な毛細血管網を有する、薄い血管床を生体内で構築し、細胞シートの段階的積層法による組織厚の増大を図り、環状化することで循環補助を可能とするポンプ機能を有するカフ型ヒト心筋組織の作製を試みた。

### 3. 研究の方法

拍動する心筋組織をカフとして血管外周へラッピングできるように、薄くしなやかな血管床を構築するために、1mm厚の成長因子徐放性のゼラチンシートを利用した。それらが大腿動静脈とともに組織癒着防止膜でカプセル化し、ゼラチンゲル内へ未熟な血管を誘導し、さらに増殖因子によって脆弱な微小血管を強固な毛細血管へ成熟させた。2週間の *in vivo* incubation の後に、構築された毛細血管への灌流量を増やし成熟血管を安定させる目的で動脈の抹消側を結紮し、さらに1週間の *in vivo* incubation を加えることによって、動脈から毛細血管を介し静脈へ戻る、完全に独立した微小循環を持つ吻合移植あるいは異所への移動が可能な血管床の作製を行った。作製した血管床へ積層化心筋細胞シートを移植し、移植グラフトへ血管が導入された後にさらなる積層化心筋細胞シートの移植を行うことで厚いヒト心筋組織を構築した。最終的には構築した厚い心筋組織を血管外周へ巻き付けることで、血行動態に影響を与える補助ポンプの作製を試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 異なる条件で作製した血管床の比較

ゼラチンシート内に成長因子を含ませること、および7日間培養後に表大腿動脈 (SFA) を結紮することが、血管床の血管の発達を促進するかどうかを確認するための実験を実施した。ゼラチンゲルは、血管内皮増殖因子 (VEGF) および線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、コントロール) のいずれかと4で24時間インキュベートした。移植21日後のEVOH膜を *in vivo* でマクロ観察および組織観察したところ、ゼラチンシートに成長因子を添加することにより、血管床の血流が増加し、また毛細血管の数や血管の

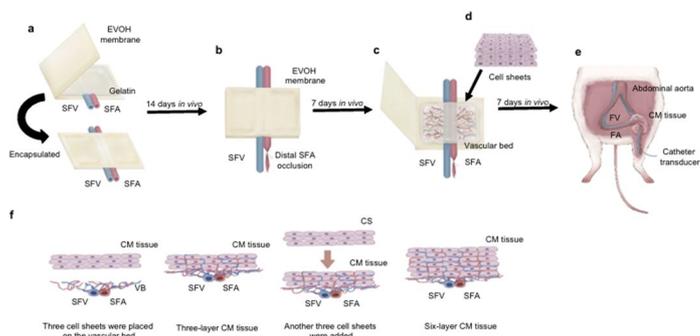


図1. 心筋組織構築のための血管床の作製

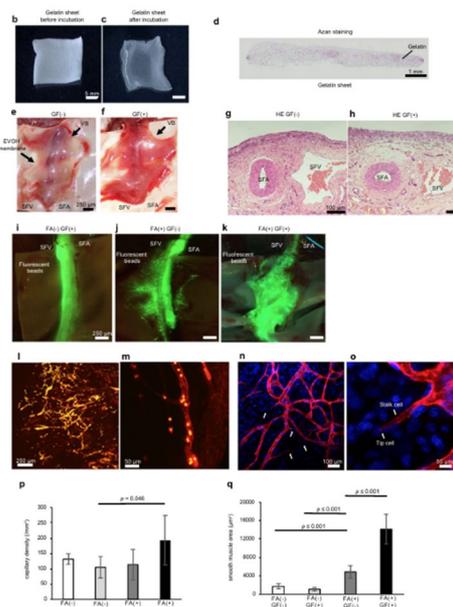


図2. 異なる条件で作製した血管床の比較

成熟度も向上した。また、大腿動脈に蛍光ビーズを投与すると、SFA 結紮によりゼラチンゲル内に全身循環につながる新生血管の形成が促進され、新生血管のネットワークは、ゼラチンシートにあらかじめ成長因子を担持させた場合の方がより広範囲であった。成長因子を担持したゼラチンシートと SFA 結紮で血管床を準備した場合、トマトレクチンと蛍光ビーズを投与すると、ゼラチンシートに内皮細胞のネットワークができ、蛍光ビーズが通過できる相互接続血管様構造を形成していた。定量的評価により、血管床の毛細血管密度は、FA (-) GF (-) 群 (すなわち、SFA を結紮せず、成長因子も含まない)  $132 \pm 17 / \text{mm}^2$ 、FA (-) GF (+) 群  $104 \pm 34 / \text{mm}^2$ 、FA (+) GF (-) 群  $113 \pm 50 / \text{mm}^2$ 、FA (+) GF (+) 群  $193 \pm 81 / \text{mm}^2$  であった。特に、毛細血管密度は FA (+) GF (+) 群で FA (-) GF (+) 群に比べ有意に高かった ( $p = 0.046$ )。また、抗  $\alpha$ -平滑筋アクチン抗体を用いた免疫組織化学で同定された血管平滑筋細胞の面積を算出することで血管の成熟度を評価した。FA (+) GF (-) 群の平滑筋面積 ( $4680 \pm 560 \mu\text{m}^2$ ) は、FA (-) GF (-) 群 ( $1715 \pm 547 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0.001$ ) および FA (-) GF (+) 群 ( $1079 \pm 367 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0.0005$ ) と比較して有意に大きくなりました。さらに、FA (+) GF (+) 群は、他の 3 群に比べて平滑筋面積が大幅に大きかった ( $14200 \pm 1360 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0.001$ )。以上のデータから、ゼラチンシートに成長因子を負荷し、14 日後に遠位 SFA を結紮することにより、血管床の質が改善されたと判断した。

### (1) 血管床に心筋細胞シートを段階プロセスで積層することでの血管を有する 3 次元心筋組織の開発

まず、ゼラチンシートを用いた人工血管上に心筋組織を作製できるかどうかを検討した。最初の実験では、3 層の心筋細胞シートを 3 つの異なる条件で *in vivo* に移植した: 1) 21 日間ブレインキュベーションしていないゼラチンシート上 [VB (-) 群] 2) 21 日間ブレインキュベーションして血管床を形成した成長因子フリーゼラチンシート上 [VB (+) GF (-) 群] 3) 21 日間ブレインキュベーションして血管床を形成した成長因子負荷ゼラチンシート上 [VB (+) GF (+) 群]。細胞シートの移植は、各ケースで 2 段階のプロトコルを用いた。まず 3 層の心筋細胞シートを移植し、24 時間後に別の 3 層の心筋細胞シートを移植し、その後構築物をさらに 7 日間生体内でインキュベートした。VB (-) 群では脈動組織は観察されず、心筋シートの生着もほとんど見られなかった。VB (+) GF (-) 群では拍動性組織が観察されたが、心筋細胞シートの生着は確認できなかった。しかし、VB (+) GF (+) 群の心筋組織は拍動性があり、血管床に生着し、毛細血管を含んでいた。また、VB (-) 群では Azan で染色した組織切片で心筋組織の移植を確認することができなかったが、VB (+) GF (+) 群では心筋シートの生着が確認された。さらに、心臓トロポニン T (cTnT) とラット内皮細胞抗原-1 (RECA1) の二重免疫染色により、新生血管が血管床からヒト心筋組織へ移動していることが確認できた。

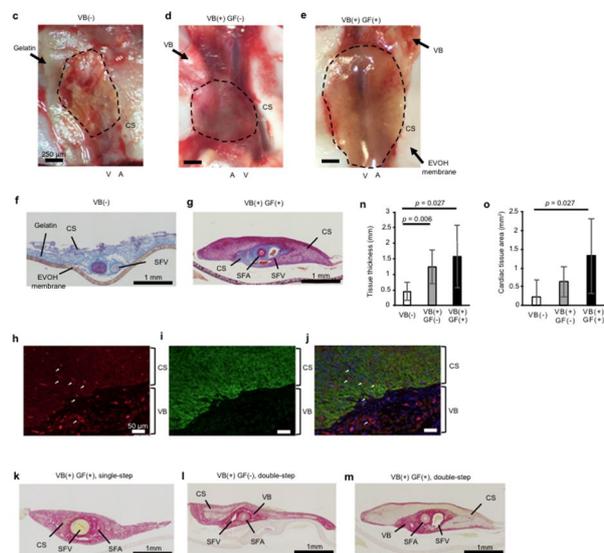


図 3. 段階積層による血管付立体組織の作製

### (2) 組織工学的に作製されたヒト心筋組織の循環補助装置としての可能性

2 段階移植法により成長因子を添加した血管床上に作製したヒト心筋組織が、循環補助装置としての機能を持つかどうかを評価した。心筋組織は血液を供給したまま移動させ、周囲組織から慎重に切り離した対側の総腸骨動脈にカフとしてしっかりと巻き付けた。心筋組織カフによって総腸骨動脈内に発生する圧力を測定するため、総腸骨動脈の遠位側からカテーテル変換器を挿入し、腹部大動脈をクランプして閉回路を形成した。また、移植組織の電位と宿主の心電図を記録した。移植片の各収縮によって発生した圧力は、 $0.24 \pm 0.20 \text{mmHg}$  であった ( $n = 4$ )。この結果は、本技術で作製した血管化ヒト心筋組織が、動脈に巻き付けることができる柔軟性と、補助循環ポンプとして機能する機能を有することを証明するものであった。

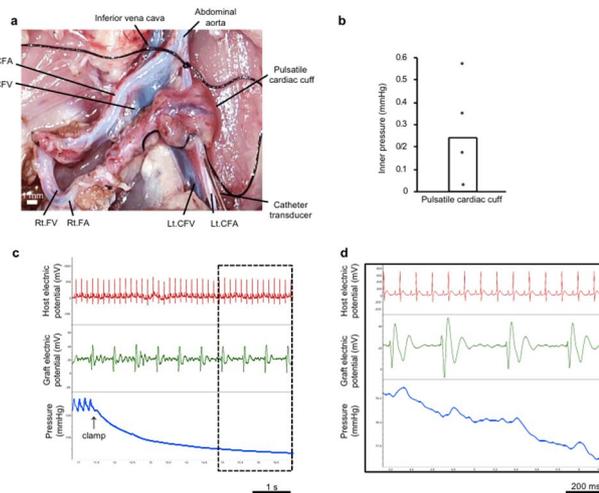


図 4. カフ型心筋組織の作製

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yuki Endo, Jun Homma, Hidekazu Sekine, Katsuhisa Matsuura, Tatsuya Shimizu, Hiroshi Niinami	4. 巻 7
2. 論文標題 Bioartificial pulsatile cuffs fabricated from human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes using a pre-vascularization technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41536-022-00218-7	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 Yusuke Tobe, Jun Homma, Katsuhisa Skaguchi, Hidekazu Sekine, Kiyotaka Iwasaki, Tatsuya Shimizu	4. 巻 141
2. 論文標題 Perfusable vascular tree like construction in 3D cell-dense tissues using artificial vascular bed	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microvascular research	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mvr.2022.104321	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 Hidekazu Sekine, Teruo Okano	4. 巻 22
2. 論文標題 Capillary Networks for Bio-Artificial Three-Dimensional Tissues Fabricated Using Cell Sheet Based Tissue Engineering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22010092	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 該当する
1. 著者名 Akitoshi Inui, Hidekazu Sekine, Kazunori Sano, Izumi Dobashi, Azumi Yoshida, Katsuhisa Matsuura, Eiji Kobayashi, Minoru Ono, Tatsuya Shimizu	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation of a large-scale vascular bed for the in vitro creation of three-dimensional cardiac tissue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 316-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2019.10.001	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 Noriyasu Masuda, Hidekazu sekine, Hiroshi Niinami, Tatsuya Shimizu	4. 巻 35
2. 論文標題 Engineering of functional cardiac tubes by stepwise transplantation of cardiac cell sheets onto intestinal mesentery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heart and Vessels	6. 最初と最後の頁 859-867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00380-019-01550-7	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 遠藤祐輝, 本間順, 関根秀一, 松浦勝久, 清水達也, 新浪博士
2. 発表標題 血液循環補助可能な人工のカフ型ヒト心筋組織の作製
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸部 友輔: 本間 順:, 坂口 勝久, 関根 秀一, 岩崎 清隆, 清水 達也
2. 発表標題 生体外における灌流可能な血管網の高細胞密度の立体組織への付与技術の開発
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidekazu Sekine
2. 発表標題 In vivo vascularization for tissue and organ fabrication
3. 学会等名 TERMIS-AP 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

## 〔図書〕 計2件

1. 著者名 Hidekazu Sekine, Jun Homma, Tatsuya Shimizu	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer International Publishing	5. 総ページ数 19
3. 書名 Cell Sheets for Cardiac Tissue Engineering	

1. 著者名 Hidekazu Sekine, Jun Homma, Tatsuya Shimizu	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 16
3. 書名 Tissue Engineering and Regeneration. Organ Tissue Engineering	

## 〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 人工血管床、人工三次元生体組織及び血管網を備えた人工三次元生体組織の作製方法	発明者 戸部友輔、本間順、 関根秀一、坂口勝 久、清水達也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-182725	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

## 〔取得〕 計0件

## 〔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	本間 順  (Homma Jun)  (50507366)	東京女子医科大学・医学部・助教   (32653)	

	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 協 力 者	遠藤 祐輝  (Endo Yuki)	東京女子医科大学・医学部・助教   (32653)	

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
---------	---------