

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03014

研究課題名（和文）補助人工心臓となりうる外科的に移植可能な三次元心筋細胞構造体の開発

研究課題名（英文）Development of a surgically implantable three-dimensional cardiomyocyte structure that could serve as an artificial heart.

研究代表者

中山 功一（Nakayama, Koichi）

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：50420609

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）：我々は細胞だけで外科的に移植可能な立体構造体を作る技術を開発しており、10年前から心筋細胞を用いた立体構造体の作製に取り組んでいる。本提案ではすでに確立したバイオ3Dプリンタによって立体化したiPS細胞由来心筋細胞構造体の移植方法を最適化し、一定の拍出量を生体内で持つ補助人工心臓としての実用化をめざした。本研究では主に外科的に移植ができる細胞だけの構造体の作成に取り組んだ。その結果、小動物への移植に成功した。しかし、通常の外科的な操作を行うほどには構造体の強度が不足しており、繊細な手術手技が必要であることが今後の課題であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な治療法が開発されているにも関わらず、他人の心臓を移植するしか助からない重症心不全の患者数は未だに増加の一途であり、慢性的なドナー不足も相まって、再生医療による新しい治療手段の開発は急務であり、再生医療研究の究極のゴールともいえる細胞による心機能の再生には数多くの研究者が取り組んでいる。我々は細胞だけで外科的に移植可能な立体構造体を作る技術を開発しており、我々の技術は製造工程も含め、生体にとって毒性や易感染性のリスクとなるバイオマテリアルを混和することなく、細胞だけで立体的な構造体を作成することができるため、安全性と有効性において国際的に競争力のある医療技術になると期待されている。

研究成果の概要（英文）：We have been developing a technology to create surgically implantable three-dimensional structures using only cells, and have been working on the creation of three-dimensional structures using cardiomyocytes for the past 10 years. In this proposal, we optimized the implantation method of iPS cell-derived cardiomyocyte structures that were three-dimensionally created by a bio 3D printer, which we have already established, and aimed at practical application as an artificial heart with a constant beating volume in vivo. In this study, we mainly worked on the creation of cell-only structures that can be surgically transplanted. As a result, we succeeded in transplantation into small animals. However, the structure was not strong enough to be used in normal surgical operations, and delicate surgical techniques were required, which was a future issue.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 心臓 iPS細胞 バイオ3Dプリンタ

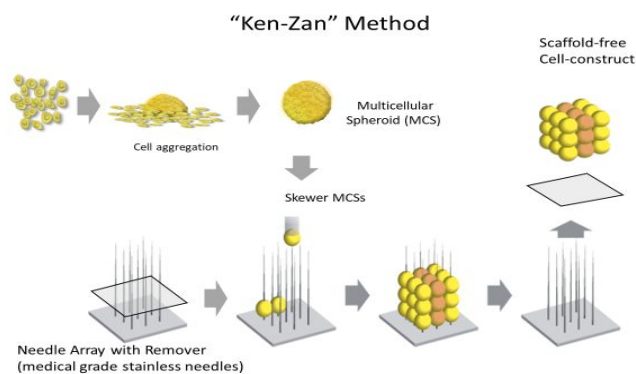
1. 研究開始当初の背景

近年、心疾患に対する新薬やステントなどデバイスによる治療法の新規開発は目覚ましい発展を遂げており、従来では社会復帰が困難とされていた心疾患患者が早期に治癒し社会復帰できた症例の増加が目覚ましい。しかし一方で、**臓器提供による心移植でしか救命できない末期重症心不全の患者数も着実に増加している**。わが国では1999年に臓器移植法に基づく心臓移植が開始され、国内での移植数は増加している。それでも移植を必要としている患者数は増加の一途であり、**需給ギャップの拡大は明らかであり、移植医療以外の治療法の確立が急務とされている**。**人工心臓**の開発・進歩も着実にすすんでおり、永久埋め込みを目指した機種も登場している。しかし、**装置の不具合のリスクや細菌感染のリスク**などを鑑みて、まだまだ改善の余地が多々あると思われる。

90年代後半から培養した細胞を用いて失われた臓器の再生を目指す再生医学・再生医療の研究が世界中で活発に行われるようになった。特に、iPS細胞出現によって従来入手困難であった拍動する**ヒト心筋細胞**を人工的に誘導・培養できるようになり、**培養ヒト心筋細胞**を用いて、**心機能の再生**を目指す研究も各国で盛んに行われるようになった。

これらの研究は当初は幹細胞懸濁液を心筋に多数筋肉内注射し心機能の再生を計っていたが、細胞の生着率に問題があった。その後、ティッシュエンジニアリングのコンセプトに基づいて様々なスキャフォールド、例えばコラーゲンゲルやフィブリン糊などと心筋細胞を混和し、体外で拍動する細胞構造体を作成し、移植するというアプローチが取られた。

我々は従来のティッシュエンジニアリングでは必須とされていた**3要素(1 細胞, 2 足場材料(バイオマテリアル), 3 生理活性物質)**のうち、足場材料となるバイオマテリアルを用いることなく**細胞だけで立体構造体を作成する技術の開発に成功し“剣山メソッド”**と国内外で呼ばれるようになった。



(Moldovan NI, et al. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017) (図1) この方法は数百個の細胞を自然凝集させて形成させた直径500 μ 程度の細胞凝集体を極細の針に目的の形状にそって刺入し、細胞凝集体同士の融合により立体化する方法である。(図1) 微細な凝集体を大量にハンドリングするためにコンピューターとロボットによって細胞構造体を作成するバイオ3Dプリンタの開発にもあわせて成功した。(図2)

この技術を用いて、軟骨(Murata, Nakayama, et al. *J Orthopaedic Surgery and Research* 2015)、肝臓(Yanagi, Nakayama, et al. *Scientific Reports* 2017)、神経 (Yurie, Nakayama, et al, *Plos One* 2017)、横隔膜 (Xiu, Nakayama, et al. *Biomaterials* 2018) 食道(Takeoka, Nakayama, *Plos One* 2019)、血管(Itoh, Nakayama, et al. *Nature Commun.* 2019)、心筋(Yeung, et al. *J Tissue engineering and regenerative medicine* 2019) など様々な細胞を立体化し動物への移植を行い、バイオマテリアルを混和せずに3Dプリントされた細胞構造体の生着および、それぞれの臓器再生や機能発現を確認している。心臓の分野ではすでにiPS細胞から分化誘導した

図1 剣山メソッドの概要:細胞凝集体を剣山と呼ぶ特殊なデバイスに刺すことで立体構造体を細胞だけで作製できる。



図2 バイオ3Dプリンタの外観

ヒト心筋細胞を原材料としてバイオ3Dプリンタによってチューブ状の立体的な細胞構造体をプリントすることに我々は成功している。(Arai, Nakayama, et al. *Plos One* 2018) この方法で作られた心筋細胞構造体は自発的に拍動することが確認できているが、外科的に移植するには強度が不足し、かつ液体を拍出する能力も低いため、当研究室では主に薬剤応答性の解析ツールとして用いられている。(Arai, Nakayama, et al. *Scientific Reports* 2020) (図3)

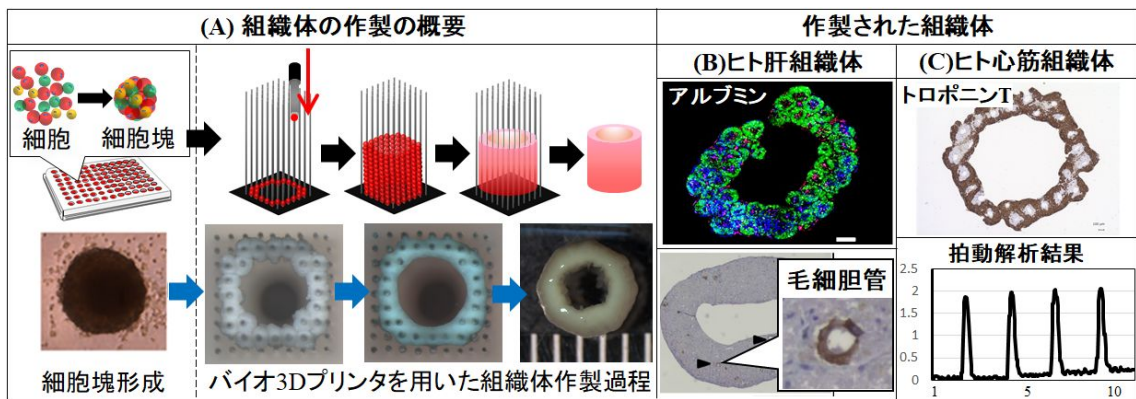


図3 バイオ3Dプリンタによって作製した心筋細胞構造体と肝臓細胞構造体: 薬理活性の解析にも応用できる

2. 研究の目的

これらの技術を背景に研究代表者は「他人の心臓を必要とせずに、細胞だけで構成される細胞製人工心臓の作成および移植技術の確立」を究極のゴールと設定し、本研究では

1. 液体を拍出する機能をもった心筋細胞構造体の体外での作製方法の確立
2. 小動物の大動脈へ移植し血液拍出能力および生着の可否を当初の目標と設定する。

3. 研究の方法

iPS 細胞由来ヒト心筋細胞をバイオ 3D プリンタで立体化し、拍動能力を中心に評価した。線維芽細胞や血管内皮細胞の混合比率、培養液の組成などを様々な組み合わせを検証し、一定の強度に達した段階で小動物への移植を試みた。

移植方法および生体内でのどの部位に移植するか各種検討した。

4. 研究成果

ラットの血管にラッピングするように心筋細胞構造体を移植することに成功した。移植された心筋細胞は移植後 1 か月目に生着し、拍動していることが観察された。(図 4)

しかし、循環動態に影響を及ぼすほどの拍出は得られておらず、また、構造体の強度が脆弱であるため、かなり繊細な外科的操作が移植時には必要とされ、まだまだ改善の余地があることが明確となった。

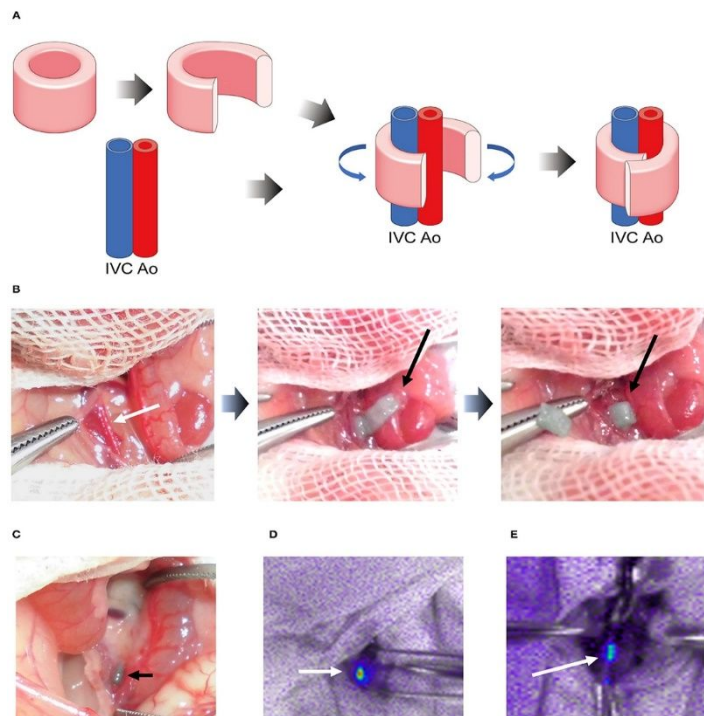


図4 iPS 細胞由来心筋細胞構造体の移植(NOG マウス)
術後一か月に生着を確認(D,E)

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 2件）

1. 著者名 Nagaishi Yukiko, Murata Daiki, Yoshizato Hiromu, Nonaka Toshihiro, Itoh Manabu, Hara Hideo, Nakayama Koichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Scaffold-free human vascular calcification model using a bio-three-dimensional printer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biofabrication	6. 最初と最後の頁 044101 ~ 044101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1758-5090/ace000	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 Amamoto S., Itoh M., Takahashi B., Kitsuka T., Uchihashi K., Murata D., Node K., Nakayama K., Kamohara K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Involvement of the PI3K/AKT Pathway in the Formation and Fusion of Spheroids Derived from Human Dermal Fibroblast for Tissue Engineering Technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 312 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1134/S1990519X22040022	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 Kawai Yujiro, Tohyama Shugo, Arai Kenichi, Tamura Tadashi, Soma Yusuke, Fukuda Keiichi, Shimizu Hideyuki, Nakayama Koichi, Kobayashi Eiji	4. 巻 8
2. 論文標題 Scaffold-Free Tubular Engineered Heart Tissue From Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Bio-3D Printing Technology in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	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) 10.3389/fcvm.2021.806215	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 Kenichi, Kitsuka Takahiro, Nakayama Koichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Scaffold-based and scaffold-free cardiac constructs for drug testing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biofabrication	6. 最初と最後の頁 042001 ~ 042001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1758-5090/ac1257	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0件

〔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
研究分担者	伊藤 学 (ITOH MANABU) (50555084)	佐賀大学・医学部・講師 (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
---------	---------