

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08662

研究課題名（和文）新しい心筋補填材料の開発～iPS細胞由来心筋細胞を用いたバイオシートの検討

研究課題名（英文）Development of new myocardial replacement materials: Investigation of biosheets using iPS cell-derived cardiomyocytes

研究代表者

和田 有子（Wada, Yuko）

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：30419410

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：1，ラット異所性心移植モデルを改変し左室拍出モデルを作成した。このモデルではドナー肺静脈とレシピエント腹部大動脈を吻合することにより、左室内に順行性に酸素化された血液が流入しドナー大動脈弁から拍出されるモデルである。このモデルにおいては左室内に十分に生理的な充満圧がかかることを示した。

2，IBTA技術を用いて作成されたバイオシートにiPS細胞由来心筋細胞を播種し共培養することによって、拍動する心膜シートを得ることができた。心筋細胞はバイオシートに十分接着しており、心臓手術に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「収縮力を持ち、移植環境に適応し、個体の成長とともに成長する人工心筋シート」は我々心臓外科医にとっては夢の人工材料である。IBTA技術を用いて作られたバイオシートは、吻合に耐えうる強度と柔軟性 および左室充満圧に対抗できる十分な厚さと強度を持ち、左室環境に移植された場合、心腔面の完全な内皮化と栄養血管の侵入がみられることが示されており、このシートにiPS細胞由来心筋細胞を生着させることで得られた「拍動する心膜シート」は、広範囲心筋梗塞治療や小児心臓外科分野での心臓再建に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：1, A left ventricular output model was created by modifying a rat ectopic heart transplantation model. In this model, the donor pulmonary vein is anastomosed with the recipient abdominal aorta, and oxygenated blood flows into the left ventricle and is pumped out through the donor aortic valve. In this model, sufficient and physiologic filling pressure is applied in the left ventricle.

2, Pulsating pericardial sheets were obtained by co-culturing iPS cell-derived cardiomyocytes on biosheets created using IBTA technology. The cardiomyocytes sufficiently adhered to the biosheet, suggesting the possibility of application in cardiac surgery.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：IBTA バイオシート

1. 研究開始当初の背景

心臓は、個体における代替のない唯一無二の臓器であり、その機能不全を代替する最終的な手立ては現在、他人からの心臓移植のみである。近年重症心不全に対する治療は飛躍的な進歩を遂げているが、一方で心移植待機患者もまた増加の一途を辿っている。心筋梗塞後合併症である心室中隔穿孔や心室瘤の手術においては、梗塞部位の exclusion が行われるが、その際に用いられる心臓修復材料は ePTFE やウシ心膜シートであり、いずれも収縮性のない薄いシート状人工物である。当然切除された心筋の補填材とはなり得ず、補填材であるシートに機能を求めることはない。また、iPS 細胞由来心筋細胞や自己筋芽細胞を用いた細胞シートによる心筋再生の試みもなされているが、左室充満圧に打ち勝つほどの収縮力をもった十分な厚さのシートは未だ成功例がなく、心筋壁の補填材としては全く不十分であるのが現状である。

本研究で使用するバイオシートは、体内に異物が埋め込まれた際にその表面をコラーゲンで覆うことによりカプセル化し隔離しようとする、生体内組織形成術(in body tissue architecture, IBTA)によって作られ、新規心筋補填材材料としての可能性をもつ。IBTA 技術は人工血管の分野ですでにその有用性や安全性を示す基礎データがそろっており、特に「移植先の環境に適応した細胞によって再構築されるバイオマテリアル」という画期的な特徴は、成人において分化・再生がなされにくい心筋への応用にふさわしい利点である。

これまでに我々は、iBTA 技術を使用してつくられたバイオシートが健常心へ移植後3か月で周囲組織との癒着や拒絶・脱落なくホスト心筋と一体化すること、またホスト心筋に異常な炎症反応の発現がないことを確認している。さらに10か月後にはシート内に線維芽細胞の浸潤や血管形成を確認した。一方で心筋細胞のバイオシート内への浸潤は見られず、方針を iPS 由来心筋細胞でコーティングしたバイオシートの作成へ舵を切ることとした。

本研究のもうひとつの柱が、異所性心移植モデルへのバイオシート移植による強度等の検証である。この過程では十分な左室圧がかかった心臓での検証が必要であり、今回の研究計画での二つ目の目標とされた。

2. 研究の目的

本研究では、IBTA 技術によって作成されたバイオシートに iPS 細胞由来心筋細胞を付着させたうえで左室壁を置換し、このバイオシートが、吻合に耐えうる強度と柔軟性および左室充満圧に対抗できる十分な厚さと強度を持つことを示すことを主たる目的とした。

3. 研究の方法

(1) バイオシートの作製

SD ラットに対し、三種混合麻酔(塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノール)による全身麻酔のもと、背部皮下に鋳型を埋入する。一定期間後に鋳型を摘出、ステンレス製外筒とシリコン製内筒との隙間に形成された管状結合組織体を採取し、それを展開することでバイオシートを作製する。

(2) ヒト iPS 細胞を用いた心筋細胞・心筋球の作製

ヒト iPS 細胞より二次元培養法を用いて分化誘導を行い、培養期間 20 日目に回収、心筋細胞(iPSC-CM)を作製する。細胞回収時にはフローサイトメリーによる心筋細胞陽性率を確認する。回収後は -150 で凍結保存し、使用時は 37 で解凍し使用する。

を用いて心筋球を作製する。解凍した iPSC-CM を Elplasia 24 well plate へ 1×10^6 /well となるように播種、2 日ごとに培地の半量を交換する。培養 7 日目に回収した心筋球を用いて「iPS シート」を作製する。

(3) 「iPS シート」の作製

採取したバイオシートを一定の大きさに切り出し、細胞培養用のプレートに配置する。その上に上記で作製した心筋細胞もしくは心筋球を播種し、RPMI 由来心筋細胞維持用の培地で培養する。培地は 2-3 日に 1 度交換し、播種後 2 週~4 週間の共培養の後、評価する。

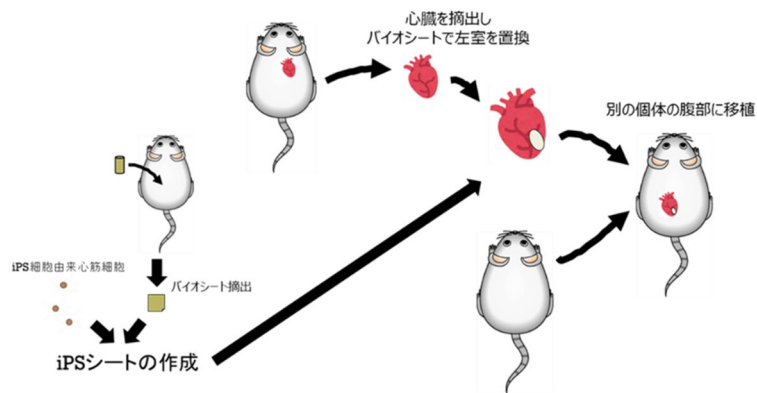
(4) 組織学的評価

異所性心移植後の心臓、バイオシート、iPS シートは、4% PFA 固定し、パラフィン包埋する。HE 染色、PSR (picosirius red) 染色による組織全体を評価後、必要に応じて各種免疫染色を実施する。

(5) 異所性心移植モデルの作製

移植用心臓の摘出とバイオシートによる左室壁置換

ドナー側のラットは、全身麻酔下に胸骨縦切開にて開胸、SVC・IVCを確保し遮断する。心筋保護液をIVCからサーフローで注入し心停止を得る。奇静脈結紮離断、左肺動静脈を末梢まで剥離して離断する。左肺を切除、右肺は肺門部で肺動静脈と気管をまとめて結紮し離断する。上行大動脈、腕頭動脈抹消まで剥離して離断。食道および気管を外して心臓を摘出する。



心摘出後に心形成を実施。上行大動脈に半周切開を加えて左肺静脈と10/0ナイロンを用いて連続で端側吻合し、左肺静脈はクランプする。摘出心の左室壁はデルマパンチ(3mm径)を用いて貫壁性に切除、同様にくり抜いたバイオシートを9/0ナイロン糸で連続縫合することで、バイオシートによる左室壁置換を実施する。(図1)

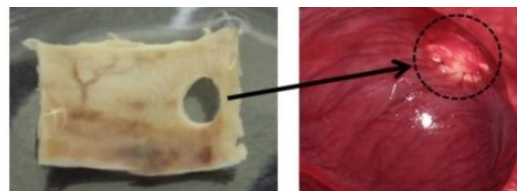


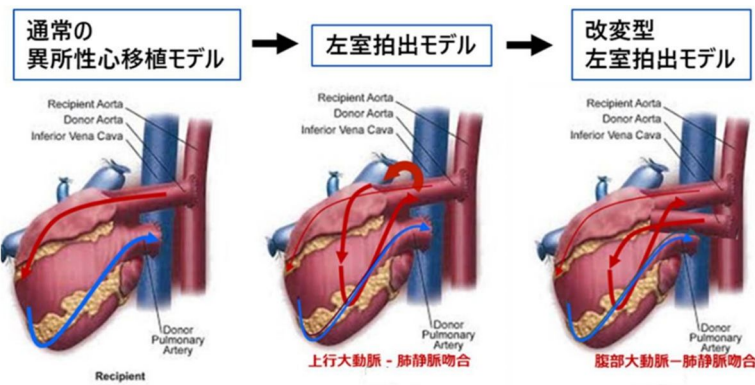
図1 バイオシートによる左室壁置換

異所性心移植

レシピエント側のラットは全身麻酔下に腹部正中切開にて開腹、後腹膜を切開し、腹部大動脈・静脈を剥離して確保する。腹部大動脈を遮断、血管を縦切開して移植心の腕頭動脈と10/0ナイロンを用いて連続で端側吻合する。次いで腹部大静脈を遮断し血管を縦切開し、移植心の左肺動脈と10/0ナイロンを用いて連続で端側吻合する。遮断を解除して移植心への血流を再開、止血を確認して閉腹する。

【改変型モデル】

心摘出後、上記大動脈-肺静脈吻合は行わず左室壁置換を実施。その後、異所性心移植を実施。続く心拍の再開が安定したことを確認後、最後に移植心左肺静脈を先程吻合した大動脈の末梢側に10/0ナイロンを用いて連続で端側吻合する。これにより心筋虚血時間が大幅に短縮し、また自己拍出安定後に心室充満圧をかけることになり、心拍出が安定した。(図2)



【改変型モデル】

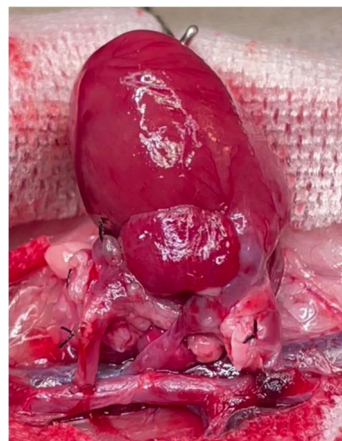


図2 異所性心移植心拍出モデル

左室圧測定

左室内に圧ラインを留置し左室圧およびAo内圧を測定する。

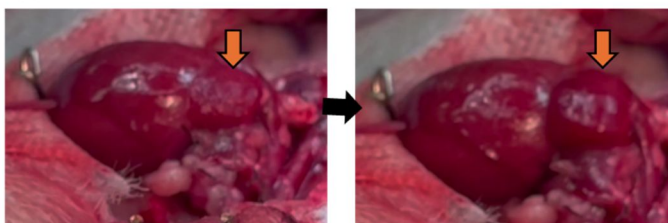
4. 研究成果

(1) ラット異所性心移植モデル作製および移植心の左室圧評価

左肺静脈を大動脈に吻合することにより左室内に順行性の血流が流入するモデルを作成することができた。自己心拍安定後に移植心の大動脈-肺静脈バイパスのクランプを解除すると左房が拡張することを確認した。(図3)

左室圧測定では肺静脈バイパスにより左室内圧が14/1/3より

図3 大動脈-左肺静脈バイパスによる左房の充満



111/3/17 (レシピエントの大動脈圧 124/61/75 時) に上昇し左室に十分な圧がかかり、かつ十分に大動脈にむかって順行性に拍出されることを確認した。

このモデルは移植後 1 4 か月にわたって拍動を維持することが確認され、長期観察モデルとして有用であることが示唆された。(図 4)

(2) バイオシートによる左室壁置換心を用いた長期の異所移植モデル

この移植後 1 年以上経過した移植心を摘出し cTnT 免疫染色を行ったがバイオシート内に心筋細胞の侵入は確認できなかった。そこで方針を iPS 由来心筋細胞を付着させた「iPS シート」作成へと変更した。

(3) iPS シート作製

作製期間 1 ヶ月のバイオシートへ iPSC-CMs を播種

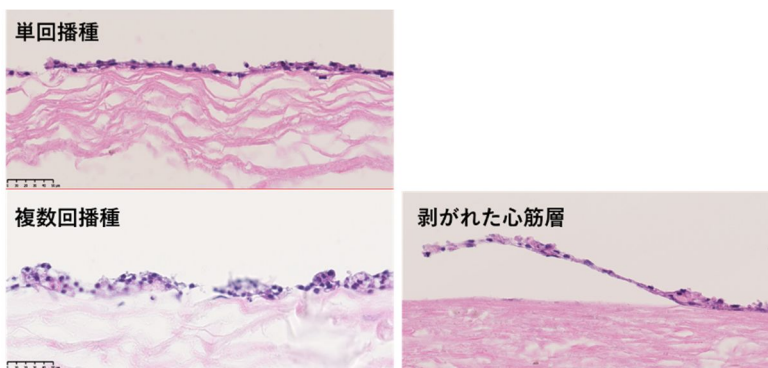


図 5 作製期間1ヶ月のバイオシートへ iPSC-CMs を播種

学的検証では、単回・複数回の播種条件いずれの場合も部分的にはあるが iPSC-CMs の生着が確認できた。しかし、iPSC-CMs による心筋層の範囲は限定され、厚さも薄く、さらにバイオシートとの接着も弱い場合心筋層ごと剥がれてしまう場所も見られた(図 5)。

心筋球を用いた検証

播種する iPSC-CMs 数を増やし心筋層の厚みを増すため、iPSC-CMs より心筋球を作製し、バイオシート上に播種することで iPS シートの作製法を検討した。Single cell 播種時には観察されなかった培養中の iPS シートの拍動が観察できるものが得られたことから組織学的に評価した。Single cell 播種時のものと比較し、iPS シートにおける心筋層の占める範囲の拡大および重層化したものが得られた。しかし、心筋層とバイオシートとの接着性は弱く、物理刺激(切片作成時の薄切等)により剥がれやすい状態は変わらなかった(図 6)。

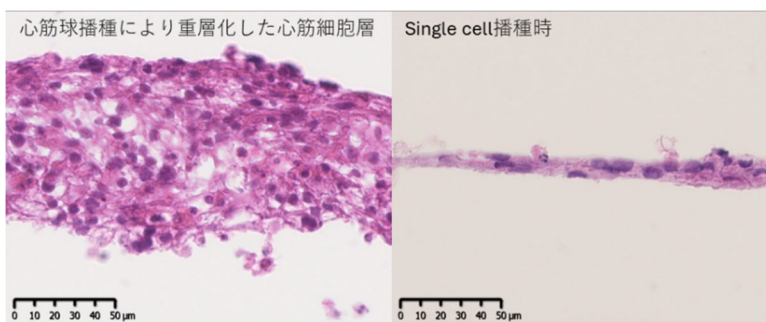


図 6 心筋球播種による心筋細胞層の重層化

バイオシートの再検討

の結果を受け iPSC-CMs の足場となるバイオシートの作製条件を再検討した。で使用したバイオシートは、埋入期間が 1 ヶ月程度のもので、その組織画像をみると、完全にコラーゲン化しており、表面(iPSC-CMs との接着面)構造も、滑らかで隙間がないことが問題と思われた(図 7)。

そこで基材の埋入期間を短くすることで、バイオシートが完全にコラーゲン組織になる前のものを検討することにした。埋入期間 1, 2, 3 週を比較した結果、2 週目時点でコラーゲンによる組織化が進行していた(図 8)。

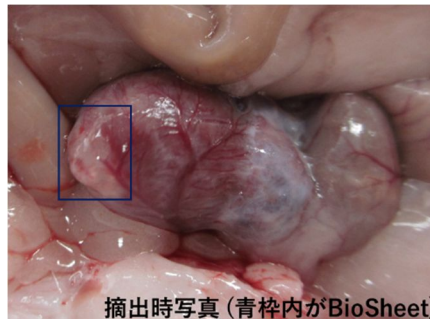


図 4 移植後 1 4 か月の異所性移植心

ラット異所性心移植モデルの左室壁置換の際に使用した、基材埋入期間 1 ヶ月のバイオシート上に iPSC-CMs を播種、共培養することで iPS シートの作製法を検証した。iPSC-CMs は Single cell で単回播種および複数回播種に分けて検討し、14 日間培養後に固定、iPSC-CMs の生着やバイオシートとの接着などを確認した。培養中の iPS シートにおける拍動は確認できなかったものの、組織

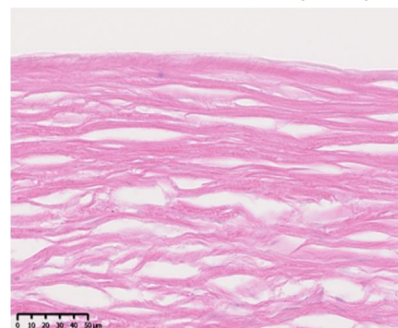


図 7 埋入期間4週のバイオシート

作製期間 1 週間のバイオシートへ iPSC-CMs を播種

そこで、埋入期間 1 週間のバイオシートを用いて、iPS シート作製を実施した。バイオシートへ Single cell で iPSC-CMs を播種し共培養した。iPSC-CMs の収縮により iPS シートのサイズは、培養開始時より縮小したものの、シート全体にわたって拍動が観察できた。組織をみると、バイオシート全面に心筋細胞が生着していることが確認できた(図 9)。さらに と比較して心筋層に厚みがあり、かつ心筋層がバイオシートに入り込んでいることから、これまでになかった層同士の接着も確認できた(図 10)。

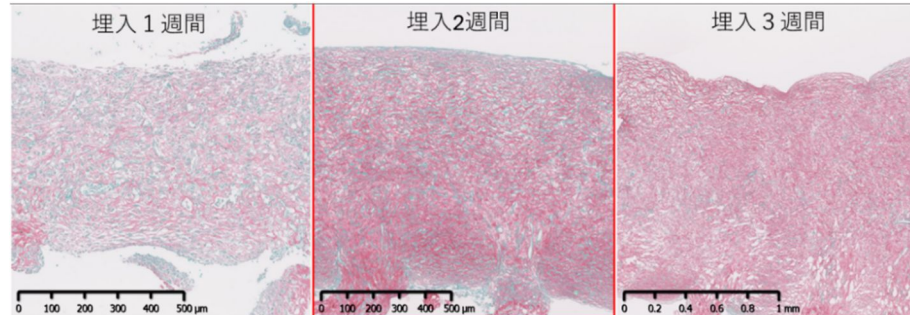


図 8 埋入期間短縮によるバイオシートの変化 (PSR染色)

(4) 考察

本研究の最終目標は左室欠損部を補填することのできる収縮機能を持った人工パッチの作成である。本研究においては、IBTA によって作られたバイオシートによる左室壁置換術が可能であること、置換された左室が 1 年以上経て瘤化や出血がなく、また周囲心筋における拒絶反応や異常な炎症反応、石灰化などなく経過しうることが示された。

一方で当初意図されたバイオシート内への心筋細胞の浸潤は起こらないことが示され、研究期間途中で iPSC-CMs 生着バイオシート作成へと方針変更を余儀なくされた。従来用いていたバイオシートは生体内で 4 週間を経て作成されており完全にコラーゲン化しているものであった。このため iPSC-CMs は表面に生着するもののバイオシートとの強固な接着はなく容易に剥離されてしまった。心筋球を用いることにより心筋細胞層の重層化には成功したが接着の強さとしては同様であった。

そこでバイオシートの成熟期間を 1 週間に縮めることで重層化した心筋細胞層とバイオシートが強固に接着したシートの作製に成功した。このシートはシート全体が拍動していることが確認され、本研究の目的である 自己組織からなる拍動するシートの作製、が達成できた。

本研究期間で上記シートの作製と並行して、最も難渋したのが適切な異所性心移植モデルの作製である。

人工心肺装置を使用した手術が困難な動物(特に小動物)のモデル系では、左室壁の置換実験そのものが困難であり、心筋再生研究において最も重要な「高圧系」における新材料の耐久性試験は難しい。特に移植先の環境に応じて作成される人工臓器という本マテリアルの利点を十分に示すためには、左室環境への移植が必須である。そこで本研究では異所性心移植モデルを改変した心拍出モデルを用いることにより「動脈圧のかかった拍動する左室」における新材料の有効性を示したいと考えた。通常行われている異所性心移植モデルでは動脈圧はドナーの上行大動脈と冠動脈のみにかかり、左室には血液の流入がなく前負荷は殆どかからない。そこで本研究では異所性心移植モデルを改良し左室に動脈血が流入するモデルの作成を行った。最終的通常の異所性心移植をおこないドナー心臓への還流を開始した後、移植部位よりも末梢のレシピエント腹部大動脈にあらためてドナー肺静脈を吻合する改変型モデルを作成した。このモデルにおいて十分に生理的な圧が左室にかかっていることを圧測定にて確認した。

残念ながら本報告時点で、最終的に iPS シートを用いた左室置換の結果確認まで至ってはいないが、今後移植後の結果確認を行う予定である。

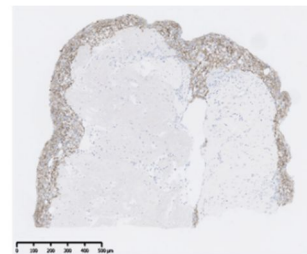


図 9 1 週間作成のバイオシートで作成した iPS シート (cTnT染色)

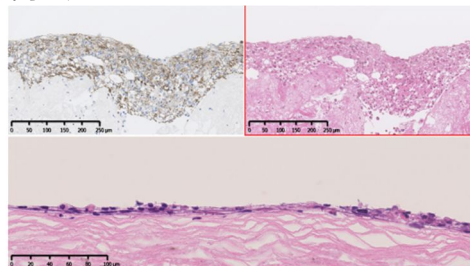


図 10 1 週間作成のバイオシート (上段) では厚みのある心筋層が得られた。下段: 4 週で作成したもの

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	中山 泰秀 (Nakayama Yasuhide) (50250262)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	
研究分担者	柴 祐司 (Shiba Yuji) (70613503)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	

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