

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390267

研究課題名（和文）立体心筋構造体による心機能の再生

研究課題名（英文）Cardiac Regeneration using 3-Dimensional Cardiac Tissue

研究代表者

森田 茂樹 (MORITA SHIGEKI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：70243938

研究成果の概要（和文）：

元来接着系細胞が有する自己凝集能（細胞の自己組織化）を利用して細胞のみで機能する3次元的心筋組織構造体の作成に成功した。心筋細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞を適切な細胞数、比率で混合して3次元培養（スフェロイド形成）し、スフェロイドを融合させることで最大径1cmのシンクロして拍動する構造体作成に成功した。構造体をラットモデルの健常心臓に移植した。急性心筋梗塞モデルに移植すると心機能の改善を認めた。

研究成果の概要（英文）：

We fabricated scaffold-free 3-Dimensional functional cardiac tissue using spheroid based technology. Proper cardiac tissue spheroids are fabricated with cardiomyocytes, dermal fibroblasts, and vascular endothelial cells. We also fabricated 3-D cardiac tissue with the diameter 1cm, and these constructs were implanted to nude rat heart. Furthermore, implantation for acute myocardial infarction nude rat model indicates improvement of left ventricular ejection fraction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心臓大血管外科学、再生医療、心筋再生、組織工学

1. 研究開始当初の背景

近年のiPS細胞を筆頭とした再生医療技術の開発は目覚ましいものがあり、近未来的な自己細胞による臓器再生医療を実現しうるものと考えられる。これらの細胞の臨床への利用方法として、古くは細胞を直接臓器へ注入したり、静脈・動脈注射による手法によりなされてきたが、生着効率の悪さなどが問題視されている。一方1993年頃か

ら Vacanti らにより組織工学（Tissue Engineering:TE）という概念が提唱され、コラーゲンやPLAなどの生体溶解性の足場を利用し組織を構築する技術が提唱されている。本手法は足場に外来異物を用いる為、生体溶解性素材に対するアレルギー、感染症など問題の解決という課題が残されている。細胞のみで機能的な組織作製する技術として、近年、温度感応性シートという手法を用いて細胞のみで構築されるシー

トを形成し心筋再生や角膜、食道の再生医療として臨床応用されている。これらの画期的な技術は、再生医療に向けた極めて有効なルールであるが、例えば、再生に形態学的特徴や力学的作用を有するような、心筋、血管、軟骨、弁などを細胞だけで構築するような技術はなく未だ開発途上であるといえる。臨床応用を見据えた細胞のみで形成される、副作用の少ない

3次元機能的な心筋組織作成技術の開発が期待される。

2. 研究の目的

我々は、3次元培養法であるスフェロイド形成に着目し、より生体に近い機能を持たせるため目的とする臓器特有の細胞を組み合わせより高機能化させる技術、および複数種類の細胞が混合したスフェロイドをさらに融合させより立体的、高機能な組織を形成する技術開発を目的とする。

3. 研究の方法

細胞の調節

初代心筋細胞 (ラット胎児心室心筋細胞)

生後1-3日目SD (kud:sd) ラット新生児を使用し酵素処理法にて心筋細胞を得た。preplating法を用いて60分後に上澄みのみをディッシュから回収すると、生存率85.6% - 94.7%で、90%前後に純化した心筋細胞が得られた。

血管内皮細胞 (EC)

Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells (HCMEC) : (Sciencell)。専用のECM (Endothelial Cell Medium) で培養P5-9の内皮細胞を使用した。目的の細胞数を得るまで10cmディッシュ (Type I Collagen Coated Dish) で培養した。

繊維芽細胞 (FB)

正常ヒト皮膚線維芽細胞 (成人) (NHDF-Ad) 販売元 CMW (LONZA) より購入。DMEM (Low Glucose) (和光純薬) +10%FBS (sigma) +P/S液で培養し P5-10の細胞を使用。Passageは0.05%トリプシンを使用。培養容器は10cmディッシュ、15cmディッシュ (NUNC、Corning社製等)、あるいは5層のBD Falconセルカルチャー マルチフラスコにて目的細胞数を得るまで培養した。

スフェロイド形成方法

上記の細胞を必要量培養し、トリプシン処理して適切な培養液を用いて細胞懸濁液を作成する。この際、2種類、あるいは複数

種類の細胞を一定の配分で混合して懸濁液を作成する。プレートは主に住友ベークライト社製96ウェルプレート (prime urface) に一定の細胞数で播種すると12-48時間でスフェロイドを形成する。

心筋組織作成方法

IWAKI社製 (EZsphere) を使用する。細胞を混合液を1ウェルあたり1000個の細胞数になるように調節し、1000cells/spheroidの拍動心筋組織型スフェロイドを作成する。スフェロイドをピペットにて回収して、低接着性培養皿に必要な数のスフェロイドを投入し円盤状に配列する。数時間後にはスフェロイド同士が融合して心筋組織構造体を形成する。

血管内皮細胞と混合してスフェロイドを形成する場合は培養液はECM (endothelial cell medium:Sciencell) を使用した。

4. 研究成果

(1) 心筋構造体形成時に、繊維芽細胞、血管内皮細胞を混合するとスフェロイド形成効率が向上する。

心筋細胞と血管内皮細胞および繊維芽細胞を以下の割合で混合したスフェロイドを形成し。形成後2時間、12時間、24時間、48時間で形態を観察し球形のスフェロイド形成する過程を観察した。

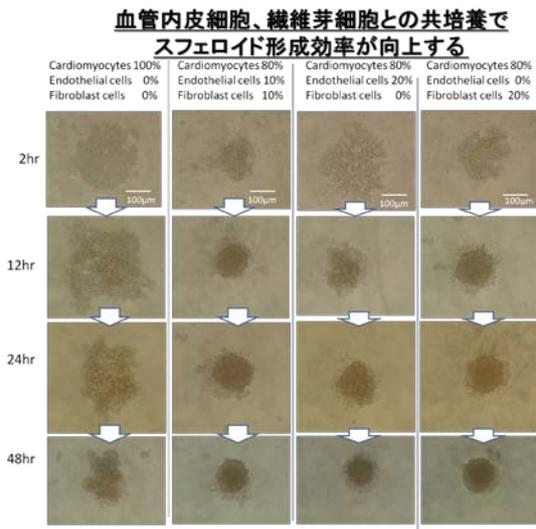
①心筋単独で融合するよりも、FB、EC混合のスフェロイドが形成効率が最もよく、より3次元的な血管網を形成できた。(図1-1と図1-2)

②ECの混合率は10-50%程度が望ましく、それ以上割合を増やしても、死細胞が増え最終的に形成されるスフェロイドが小さくなる傾向があった。(図1-3)

③FBは10%程度の比率でも混合すればスフェロイドの凝集効率がアップし、その割合を増やすとスフェロイドの形成効率は良くなった。しかし、非心筋細胞を40%以上の割合を増やすと拍動効率が低下する(図1-4)。

⑤そのため好ましい細胞配合は心筋細胞60-90%、血管内皮細胞10-50%、線維芽細胞10-50%範囲とした。(図1-4)

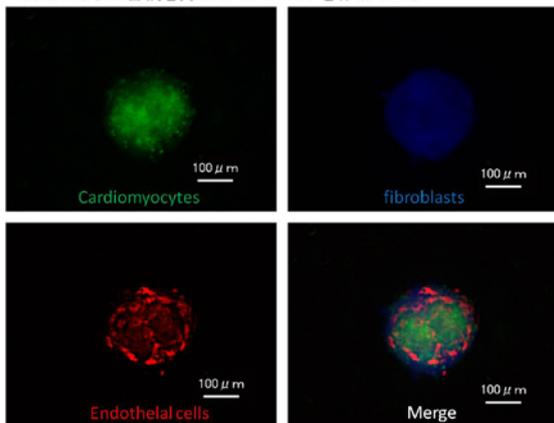
(図 1-1)



総細胞数は 1200 個/スフェロイド となるように、繊維芽細胞、血管内皮細胞を 10% ずつ添加したもの。細胞を播種してスフェロイド形成し 2 時間、12 時間、24 時間、48 時間後に観察。心筋単独群にくらべ明らかに混合スフェロイドのほうが凝集効率が低い。

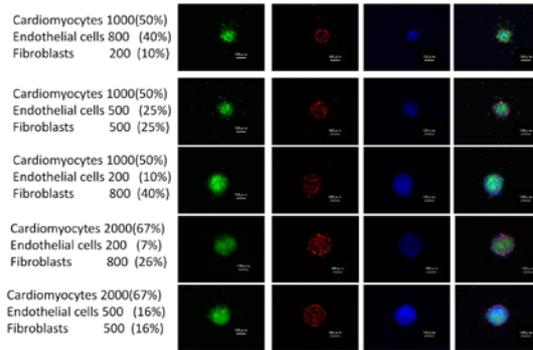
(図 1-2)

心筋細胞、血管内皮細胞、繊維芽細胞を適切な配合で混合すると 3 次元的な血管網を持ったスフェロイドを作成できる



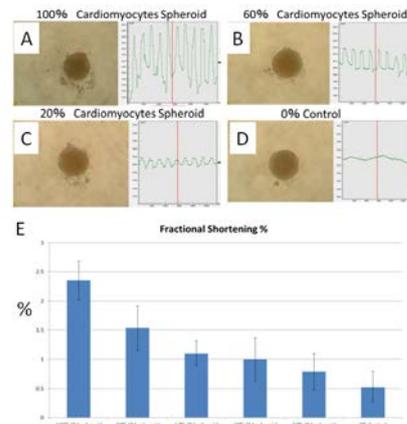
心筋細胞を緑色、繊維芽細胞を青色、血管内皮細胞を赤色の蛍光色素染色し心筋：繊維芽：内皮を 2000：800：200 で混合させスフェロイドを形成し 48 時間後に観察した。血管内皮細胞は 3 次元的に血管網を形成しかつ、管腔状に内皮細胞が配列しているところがある。

(図 1-3)



心筋細胞と血管内皮、繊維芽細胞を図左の配合で混合し蛍光色素染色で形態、大きさ、内皮細胞の状態を観察した。血管内皮細胞は 10% 程度の配合でも血管網構築できる。その際、繊維芽細胞の割合が血管内皮より多いほうがより、立体的、複雑な血管網を形成する傾向がある。

(図 1-4)

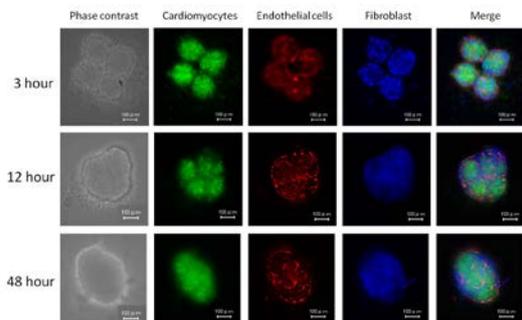


心筋細胞比率が 0-100% まで 6 段階に分けて配合したスフェロイド、非心筋細胞配合は繊維芽細胞と血管内皮細胞を 1：1 で配合し、拍動を動画で 10 秒間記録し、スフェロイドの 0, 3, 6, 9 時方向の表面の点を動態解析した。動点の速度の絶対値を平均したもの。(つまり、速度の平均が高いほうが、たくさん動いていた＝拍動していた) ことを示す。心筋比率が高いほうが拍動効率はよく、40% 以下では肉眼的な拍動は観察し難い。

(2) 3種類の配合で血管網を形成した拍動する心筋スフェロイドを作成できる。

①組織型スフェロイド同士を融合できる。融合後の心筋スフェロイドもシンクロして拍動できる。血管スフェロイドも同様に融合させることが出来る事を見出した。図2-1は心筋細胞を緑、血管内皮を赤、繊維芽細胞を青の蛍光色素で染色しスフェロイドを形成した。さらに4つのスフェロイドを融合させ、3時間後、12時間後、24時間後に観察した。

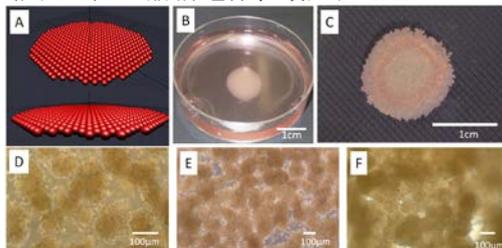
(図2-1)



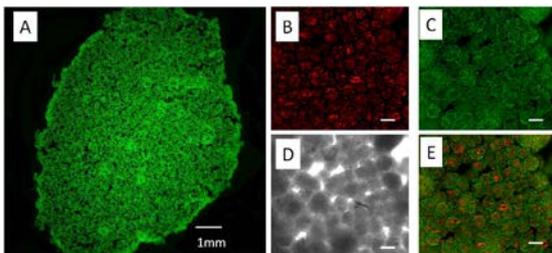
3種類の細胞が融合している。細胞はある程度再編成し、あらたな血管ネットワークも形成されている。

②大量の心筋組織型スフェロイドを図2-2のようにパッチ上に配置することでスフェロイド同士が融合し、gap junctionを形成しシンクロして拍動する心筋組織型構造体作成に成功した。(図2-2)

(図2-2) 心筋構造体、最大径1cm



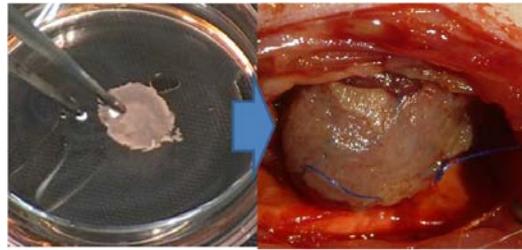
③構造体は、内部に3次元的な血管網および血管腔を有しており、シンクロして拍動する事を確認した。(図2-3)



(図2-3) 心筋細胞を緑色、血管内皮を赤色

の cell tracker で生細胞染色した細胞で心筋構造体を作成した。内部に血管内皮細胞によるネットワークおよび血管網構築が認められる。

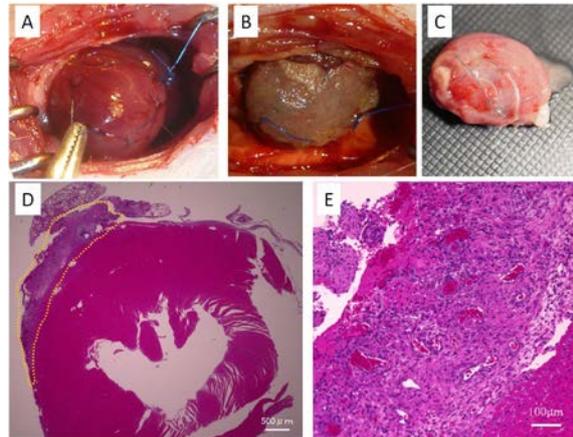
④心筋構造体は正常心臓に移植可能である。



(図2-4)

(3) 構造体は Host の心臓に新生血管を伴って生着する。

最大径1cmの心筋構造体を、F344ヌードラット正常心臓に移植した(n=6)。移植後5日目に摘出した。移植した構造体は最大0.5mmの厚さで内部に赤血球を有する成熟した血管を有していた。図2-5



(図2-5) 上段：移植前、移植後、および摘出心。下段：HE染色、グラフト部の拡大像。新生血管を伴った組織として生着していた。

(3) 急性心筋梗塞モデルに移植すると、移植群では未治療群に比べて心機能の改善効果を確認した。

①F344ヌードラット 10週齢 メスを用いた。

全身麻酔、気管内挿管下にLAD根部を8-0PPPにて結紮して心筋梗塞を作成した(N=16)。うち8例に心筋梗塞作成直後にグラフトを移植した。3週間後に心エコーによる心機能評価を行ったところ、移植群は非移植群に比較して心機能の改善し、左室容積は小さくなる傾向を認めた。図3-1、図3-2

また、提出後の心臓を特殊染色し、繊維化の程度を評価したところ、移植群のほうが

繊維化の程度が低かった。図 3-3

図 3-1
心エコー所見

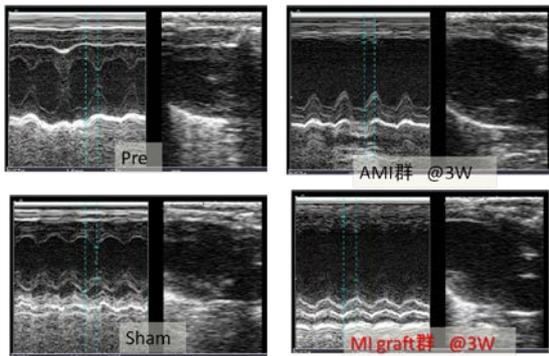
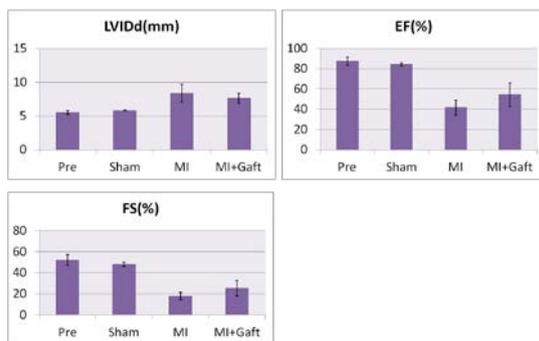


図 3-2
心エコー評価 (EF, FS, LVDd)



(4) 結語

細胞のみで、シンクロして拍動し、血管網を有し、心臓への生着および治療効果を示す技術を開発した。細胞だけで構築できるため、感染症や免疫応答が極めて少ない構造体作成法と考えられる。さらに本技術は iPS 細胞由来細胞でも応用が可能であると考えられる。近未来の幹細胞を利用した再生医療の臨床応用を補助する技術として有用だと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 森田茂樹、野口亮、野出孝一、中山功一：再生医療による人工臓器研究の最近の進歩：Scaffold free の心臓・血管組織の構築、人工器 査読なし 41.3.168-171.2012

[学会発表] (計 6 件)

- ① 野口亮、ISHLT 2013
Development of 3-Dimensional Prevascularized Scaffold-free Contractile Cardiac Patch for Heart Regeneration
2013.4.24~27 カナダ モントリオール 国際会議場
- ② 森田茂樹、野口亮
第 12 回日本再生医療学会 Scaffold-free な機能的な心筋構造体および移植法の開発
2013.3.21~23 パシフィコ横浜
- ③ 野口亮、第 113 回日本外科学会定期学術集会、新しい組織工学を用いた自己細胞のみで形成される 3 次元組織構築法の開発
2013.4.11~13、福岡国際会議場
- ④ Morita Shigeki、Ryo Noguchi¹
第 77 回日本循環器学会
Title : Spheroid Based Cardiovascular Regeneration using Robotics Engineering
2013.3.15~17 パシフィコ横浜
- ⑤ 野口亮、第 9 回 CTRC (Cardiovascular Translational Research Conference)
2013 年 1 月 12 日 新規組織工学による心臓・血管再生医療、福岡グラウンドハイアット
- ⑥ 野口亮、第 29 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会
2012 年 10 月 26 日 27 日 Title: Spheroids Based Scaffold-free Tissue Engineering for Cardiovascular Regeneration、九州大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：心臓又は血管組織型スフェロイド
発明者：森田茂樹、野口亮
権利者：佐賀大学
種類：特許
番号：特願 2013-053037
出願年月日：2013 年 3 月 15 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 茂樹 (MORITA SHIGEKI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：70243938

(2) 研究分担者

野出 孝一 (NODE KOUICHI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号：80359950

中山 功一 (NAKAYAMA KOUICHI)
佐賀大学・工学系研究科・教授
研究者番号：50420609

野口 亮 (NOGUCHI RYO)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：70530187

(3) 連携研究者

()

研究者番号：