

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592044

研究課題名(和文) 幹細胞由来大型心筋移植片の心筋再生効果の解析

研究課題名(英文) The evaluation of scaffold-free 3-D cardiac graft effect on heart failure model

研究代表者

野口 亮 (Noguchi, Ryo)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：70530187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット胎児心筋および、ヒト血管内皮細胞、線維芽細胞を組み合わせ、心筋組織型スフェロイドを作成し、スフェロイド同士が融合する性質を利用して最大径1cm程度の拍動する、血管網を持った心臓組織型3次元組織の作成に成功した。本組織を、正常心臓と急性心筋梗塞モデルラットに移植した。心筋スフェロイドの作成法や移植法の開発により、生着効率をアップさせることに成功した。非移植群との比較では、移植後3週間後、3カ月後の評価にて(FSの改善、LVDd)左心機能の改善を認めた。正常心筋移植群の組織評価で、新生血管を著明に認めた。心筋梗塞モデルではグラフトの残存は認めないが非薄化の予防効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed completely scaffold-free 3-dimensional contractile cardiac grafts using spheroids and its self-organize characteristic. We could succeeded in fabricate cardiac graft with maximum diameter 1cm. The cardiac graft were grafted on nude rat heart, we could confirm the graft were viable in histological analysis. Furthermore, in the animal implantation study on AMI model, effectiveness of these grafts for AMI was confirmed. We consider that applying our scaffold free three dimensional tissue engineering technology to cardiac regeneration therapy is feasible. We expect that this technology will become a promising tool to treat end-stage heart failure.

研究分野：外科系臨床医学

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：心筋再生 再生医療 組織工学

## 1. 研究開始当初の背景

1980年のES細胞(胚性幹細胞)、2007年京都大学山中らのiPS細胞(人工多能性幹細胞)の開発により再生医療、組織工学の研究は目覚ましく発展してきている。心筋再生においても、これまで、各種幹細胞からの分化誘導、培養方法、組織構築方法などが研究され日々新たな技術が発表されている。動物実験、臨床試験などにより心機能改善効果が報告され、その改善効果は細胞のparacrine効果などによるとされているが、心機能改善、心筋細胞再生効果のメカニズムは未だ解明されていないのが現状である。一方、我々は接着系の細胞がほとんど有する自己凝集能の現象に着目し、細胞だけで立体的な構造体を作成する事に成功した。この現象自体は1950年代に相次いで報告された現象であるが、この現象と我々の開発した組織工学技術を応用することにより、任意のXYZの位置に複数の細胞を、生体材料なしに配置することが可能となった。心筋細胞において細胞のみで構成された拍動する構造体の作成に成功した。細胞を大量かつ外来異物を全く含まず、肉眼で扱える任意の大きさに移植が可能であるため、現在の心筋再生医療において、細胞移植による心筋再生メカニズムを組織学的、分子生物学的に解明する良いモデルと考えている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞凝集現象であるスフェロイド形成現象とスフェロイド同士が融合しシンクロして拍動する心筋構造体を作成する技術および移植する技術開発を行い、適正化した3次元心筋構造体を用いて、心筋梗塞モデル、心不全モデル動物にたいする移植群の心筋機能改善効果の証明、およびそのメカニズムの解明を行うことである。

## 3. 研究の方法

細胞の調節

### マウスES細胞由来心筋細胞

市販されている、CorAT細胞を使用した。本細胞は、 $\alpha$ MHC領域にpuromycin耐性遺伝子が組み込まれており、培地にpuromycinを混入しておく、未分化ES細胞を含む非心筋細胞を除去し、心筋細胞のみ純化できる。

### 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)

正常ヒト皮膚繊維芽細胞(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に達するまで培養した。

### 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 surface)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)低接着性スフェロイド形成培養皿を使用する。細胞混合液を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。

ES細胞由来心筋細胞のみを用いて心筋組織型スフェロイドを作成する場合は、培地はCorAT専用培地を用いた。

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社)を使用した。

### 動物実験

本研究ではF344ヌードラットを使用した。ケタミンおよびキシラジンを腹腔内投与し鎮静・鎮痛を得た後に、気管内挿管を行った。左第6肋間開胸開胸後、心膜を開き心臓に到達する。7-0プロローリン針にてLADを結紮し心筋梗塞モデルを作成した。

心筋梗塞モデルラットおよび正常心機能モデルラットに直径1cm、厚み500 $\mu$ m程度の心筋組織型グラフトを左室前面、梗塞範囲に一致する程度に移植した。組織の脱落を防止する目的で5-0もしくは7-0プロローリン針にてパッチの外周に沿った形で枠を作り組織の脱落を防いだ。

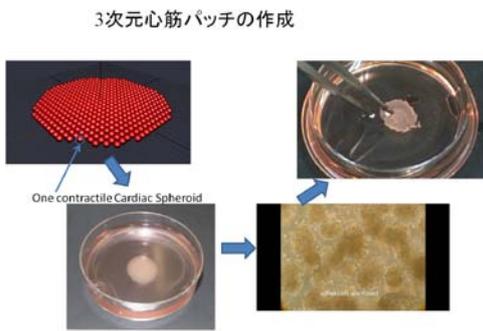
## 4. 研究成果

①心筋スフェロイドを3次元化して拍動する心筋組織型パッチの作成に成功した。

研究当初はマウスES細胞由来心筋細胞を用いて単独細胞からなる心筋構造体作製を試

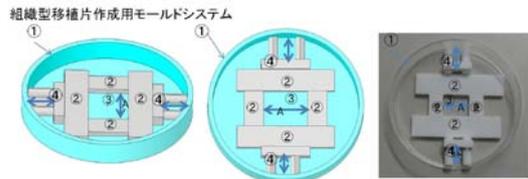
みたが、融合後組織が厚みを増すと徐々に内部壊死が生じて拍動を停止するようになった。また、開発中の3Dバイオプリンターでは直径400 $\mu$ m以下の小さなスフェロイドはハンドリングできず、システム上面積も3mm四方の構造体程度しか作成できないため、心筋の別手段により心筋構造体を作製した。

本手法は、心筋スフェロイドを100-200 $\mu$ m程度の生存率の高いサイズで構築し、重力を利用して低接着性の培養皿の底面で一定の形状で近接して配列する環境を提供することでスフェロイド同士の融合を促し、一つの心筋構造体を作成する手法である。(図1)



(図1) 心筋パッチ作製

さらに本研究期間内で、低接着性培養プレートに、PTFE等の低摩擦、低接着性、耐熱性のプラスチックで一時的な枠体を形成して、枠体内部に先述のスフェロイドに流し込むことにより任意の面積、任意の体積の構造体を作成できるシステムを開発した。(図2)



1. 裏面が細胞接着性を有した容器内(1)にて、直径2.5mmの範囲のPTFE等の低摩擦性、低吸水性、低弾性な素材からなるパーツを組み立て、図1に示すように成形する。  
この空間(2)は、細胞懸濁液(大きさ250-500 $\mu$ m)は透過できないがメチルセルムは透過可能な程度に相互にパーツが閉じPTFE等の親素材で形成される表面を露出する部分からなるアジャスターパーツによる最適な位置により接着して形成される。これらのパーツによって形成される空間(2)は、任意に細胞懸濁液が流動しなければならない形状でもよく、円形、あるいは三角形であっても構わない。  
さらに、この空間を形成するパーツは培養する容器の中で圧差を解放することでばらばらにすることができかつ、圧差前に矢印Aに示す方向にスライドさせることで自動的に任意の位置に移動する空間を作成することができる。  
なお、この容器は表面の低摩擦性で滑りやすく、形状も円形、方形どちらでもよいが、細胞懸濁液を配定する空間で培養する細胞・組織を十分に培養できる形状を有することが望ましい。  
3. この空間の位置や形状は任意だが、容器縁部(0)の長さ(2.5mm)程度がよく、それより短いCellwellと、細胞懸濁液が容器の移動などで空間外に飛び出し3次元構造体を作成できない、長さ(5.0mm)場合は容器内の増殖環境が悪くなり細胞の増殖や、融合不良を引き起こす。

(図2) 組織型移植片作製モールドシステム

### ②血管内皮細胞を含む細胞配合などで血管網を構築した3次元組織構築が可能となった。

心筋スフェロイド作成時に血管内皮細胞、線維芽細胞を一定量混合させると3次元化を促進し、内部に血管網を構築した拍動する心筋組織型スフェロイドを作成することを見出した。図3

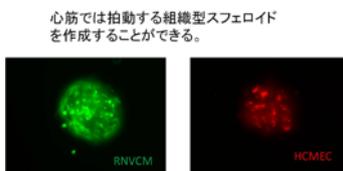


図3

本手法で作成した、心筋組織型スフェロイドを用いて、先述の手法で直径1CMの拍動心筋組織を作成し、48時間培養した。組織を、生死細胞判定染色キットを使用して組織中の生死判定を行った。図4に示すように、死細胞は殆ど認めず48時間程度までは細胞が高確率で生存した状態で移植できることが示された。本手法により、生存率の高い組織を移植可能とし、より心機能改善効果が期待できると考えられた。

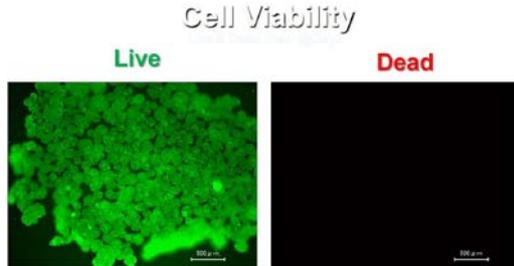


図4 (構造体の生死判定：緑=生細胞、赤=死細胞)

③心筋構造体をヌードラット正常心筋に移植すると血管構築を伴って生着する。心筋構造体を、ヌードラット正常心臓表面に移植すると少なくとも2日後以降には生着していることを確認した。ただし、本構造体は非常に構造的に弱く、部分的に崩れて心室前面にとどまらない構造体を認めた。そこで、7-0プロピレン糸等を用いて図5-Aにあるようにグラフト移植予定部位を囲むように糸を用いて垣根を作り、その中にグラフトを移植する手法を開発した。この手法で、グラフトは左室表面に大部分が生着することが確認できた。図5、図6

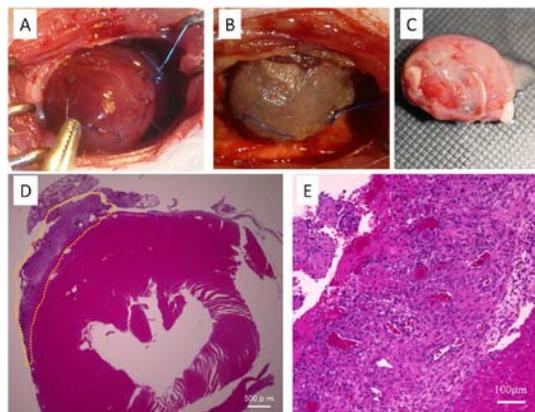


図5

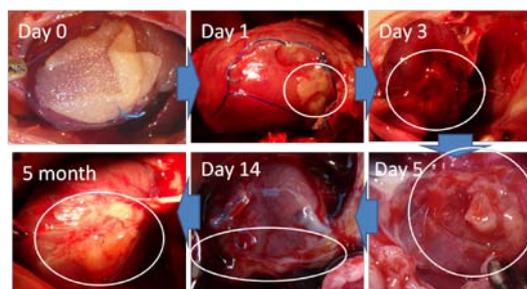


図6

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認めた。

①CF344 ノードラット 10 週齢

全身麻酔、気管内挿管下に LAD 根部を 5-0、もしくは 7-0 ポリプロピレン糸にて結紮して心筋梗塞を作成した (N=20)。うち 8 例に心筋梗塞作成直後にグラフトを移植した。n=3 で術翌日に死亡していたが、3 週間後 (N=5) と 3 カ月後 (n=2) で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が改善し、左室容積は小さくなる傾向を認めた。つまり、急性心筋梗塞もでる急性期の移植効果としては、心機能改善効果を認め、それは移植後 3 カ月後も認められていた。図 7-1、図 7-2

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 7-3

UCG analysis @3month

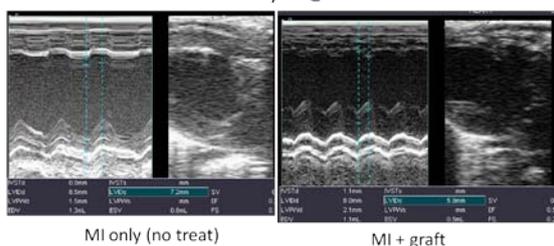


図 7-1

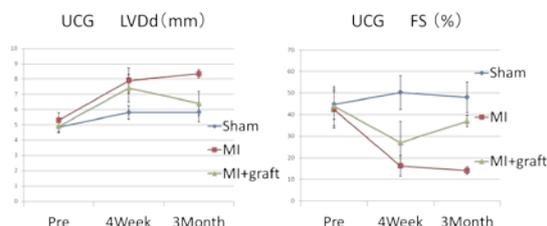


図 7-2

移植後3週間 シリウスレッド染色

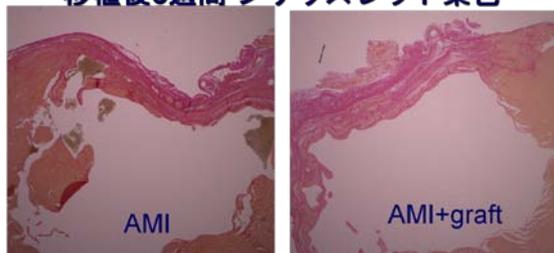


図 7-3

5. 結果

本研究では、ラット胎児心筋および、ヒト血管内皮細胞、ヒト線維芽細胞を組み合わせ、拍動する心筋組織型スフェロイドを作成した。スフェロイド同士が融合する性質を利用して最大径 1 CM 程度の拍動する、血管網を持った完全スキャホールドフリーな心臓組織型 3 次元組織の作成に成功した。

本組織を、正常心臓と急性心筋梗塞モデルラットに移植した。心筋スフェロイドの作成法や移植法の開発により、生着効率をアップさせることに成功した。

また、非移植群との比較では、移植後 3 週間後、3 カ月後の評価にて (FS の改善、LVDd) 左心機能の改善を認めた。

本心機能改善効果の分子生物学的機序の解析は本事業内では行えなかった。しかし、正常心筋移植群の組織評価で、新生血管を著明に認めていること、心筋梗塞モデルではグラフトの残存は認めず、非薄化の予防効果を認めていることから、その機序として、組織から放出される血管造生因子 (VEGF、HIF1) などの液性因子や細胞産生マトリックスによる物理的左室の補強などが考えられた。

本研究の知見を生かし、更なる解析が必要と考えられた。

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、中山功一、野出孝一、森田茂樹 : 演題名 : Spheroids Based Scaffold-free Tissue Engineering for Cardiovascular Regeneration、学会名 : 第 29 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会総会 (福岡県、九州大学百年講堂)、2012 年 10 月 26 日 27 日

② 野口亮、中山功一、野出孝一、森田茂樹 : 演題名 : 新規組織工学による心臓・血管再生医療、学会名 : 第 9 回 CTRC ( Cardiovascular Translational Research Conference) (福岡県、グランドハイアット)、2013 年 1 月 12 日

③ 野口亮、中山功一、野出孝一、森田茂樹 :

Title : Spheroid Based Cardiovascular  
Regeneration using Robotics  
Engineering、学会名 : 第 77 回日本循環器  
学会、(パシフィコ横浜) 2013 年 3 月 15  
日-17 日

④野口亮、中山功一、野出孝一、森田茂樹 :  
演題名 : Scaffold-free な機能的な心筋構造体  
および移植法の開発、学会名 : 第 12 回日  
本再生医療学会、(パシフィコ横浜)、  
2013 年 3 月 21 日-23 日

⑤野口亮、中山功一、野出孝一、森田茂樹  
演題名 : 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  
学会名 : 第 113 回日本外科学会定期学術集  
会 (福岡県国際会議場)、2013 年 4 月 11  
日-13 日

⑥野口亮、中山功一、野出孝一、森田茂樹  
演題名 : Development of 3-Dimensional  
Prevascularized Scaffold-free Contractile  
Cardiac Patch for Heart Regeneration  
学会名 : ISHLT (国際心肺移植学会)、カナ  
ダ、モントリオール、2013 年 4 月 24-27 日  
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

①

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

②

名称 : 組織体形成装置  
発明者 : 野口亮  
権利者 : 佐賀大学  
種類 : 特許  
番号 : 特願 2014-104726  
出願年月日 : 2014 年 5 月 20 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

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

研究分担者

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

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

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