

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26293188  
研究課題名(和文)「脱細胞化マトリックスを用いた心臓の再生」～立体臓器構築をめざした基盤技術の確立

研究課題名(英文) "Engineering of the heart tissues using decellularized extracellular matrix" -  
Development of basic technology to construct three-dimensional organ-like  
tissues

研究代表者  
李 鍾國 (LEE, JONG-KOOK)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授(常勤)

研究者番号：60303608  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：成獣ラット心臓を、界面活性剤を用いて脱細胞化処理し、心臓細胞外マトリックスを作成、新生仔ラット心臓由来単離心臓構成細胞を播種し、臓器様3次元心筋組織を構築、光学マッピング法等による方法で機能・形態解析を行なった。本成果は国際生体材料科学雑誌に報告した(Yasui et al. Biomaterials. 2014; IF 8.387)。さらに、組織透明化技術を応用し、マウス心臓における冠血管走行と交感神経の分布を3次元で解析することに成功し、臓器様3次元心筋組織における形態特性の評価に利用可能な技術の確立を行った(Yokoyama et al. AHA2016他で発表。論文投稿中)。

研究成果の概要(英文)：Adult rat hearts were decellularized with the perfusion of detergents, and then extracellular matrices were recellularized with cardiac cells from neonatal rats. We evaluated functional and morphological properties of organ-like three dimensional heart tissues using optical mapping and other methods. The results were published in an international journal of biomaterial sciences (Yasui et al. Biomaterials. 2014; IF 8.387). Furthermore, we succeeded in observing coronary vessels and sympathetic nerves of entire murine hearts using tissue-clearing techniques. The technique can be utilized to evaluate detailed morphological properties of organ-like three-dimensional heart tissues. (Yokoyama et al. Presented in AHA2016 etc. The manuscript is in review.)

研究分野：再生医学、組織工学、循環器内科学

キーワード：3次元組織構築 脱細胞化 細胞外マトリックス 心筋細胞 iPS細胞 光学マッピング 興奮伝播 組織透明化

## 1. 研究開始当初の背景

再生医学の進歩により、iPS 細胞をはじめとする種々の幹細胞から心筋細胞への効率的な分化誘導および純化が可能となった。これら幹細胞由来心筋細胞の中には、生体の成熟心筋細胞に匹敵する特性を示すものもあり、細胞移植により不全心の機能を補う心筋再生治療に関心が集まっている。従来、これらの細胞移植には単離した細胞を直接注入する方法が用いられていたが、移植細胞の生着率が低いことや機能の改善が限定的であることなどから、あらかじめ2次元あるいは3次元組織を構築し、心臓に移植する方法が採用されるようになった。特に本邦では、温度感受性培養皿を用いた手法により、角膜をはじめとする様々な臓器のシート状組織を培養することが可能となり、臨床治療において有効性を示している(Nishida et al. *N Engl J Med* 2004; Masuda et al. *Adv Drug Deliv Rev* 2008)。

しかしながら、肺・肝臓・心臓などの大型実質臓器の重篤な臓器不全、特に臓器全体がびまん性に障害を受け、機能不全に陥っている病態においては、部分的な細胞・組織の移植のみでは、著明に低下した臓器機能の十分な改善が得られないこともある。そのため、これらの重篤な臓器不全に対しては、臓器そのものの再生方法の開発が期待されてきた。これまで、様々な技術的理由で、大型実質臓器を再生することは不可能と考えられてきたが、最近米国や本邦から、脱細胞化マトリックスを用いて立体臓器そのものを、組織工学的手法を用いて再生する方法が開発された。

## 2. 研究の目的

本研究においては、摘出した臓器に界面活性物質を灌流してすべての細胞を溶解・除去し、脱細胞化細胞外マトリックスを作成、その後幹細胞由来心筋細胞を播種して、3次元心臓を構築する。生体内の心臓に匹敵する機能を有する立体臓器としての心臓を構築し、移植可能な臓器再生の基盤技術を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 脱細胞化心臓マトリックスの作成

野生型成獣 Wistar ラットから心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流下で界面活性剤(SDS および TritonX)を投与し、すべての細胞を除去した心臓脱細胞化マトリックスを作製した。

### (2) 心筋細胞播種による臓器様3次元心筋組織の構築

項目(1)で作成した脱細胞化細胞外マトリックスに、新生仔ラット心臓由来単離培養心臓構成細胞(細胞数  $1.0 \times 10^8$ )を、冠動脈経路で再播種し、インキュベータ内で培養液の灌流を継続した。再播種前にCa感受性蛍光蛋白GCaMP2の遺伝子導入をおこなった。

### (3) 再細胞化心臓の機能・形態評価

項目(2)で作成した臓器様3次元心筋組織について、オプティカルマッピング法、免疫染色等により *in vitro* にて心臓の機能・形態の解析を行った。

### (4) iPS細胞由来心筋細胞播種による再細胞化脱細胞化組織の一部を、スライス標本とし、

iPS細胞由来心筋細胞を脱細胞化組織に播種し、拍動の様子を観察した。

### (5) 3次元組織形態観察

理研グループが開発した組織透明化技術(CUBIC法, Tainaka et al. *Cell* 2014)を用いて、成獣心のマウス3次元組織の空間情報解析をおこない、再細胞化心臓の形態解析に利用可能な基盤技術の確立をおこなった。

## 4. 研究成果

上記脱細胞化手技によりほぼすべての細胞が除去された一方、得られたマトリックス標本ではcollagen (I, IV)、fibronectin、lamininなどのマトリックス構成蛋白が残存していることが免疫染色で確認された。また、Evan-Blue染色では、冠血管マトリックスの残存が見られた。

上記細胞外マトリックスに新生仔ラット心臓由来単離培養心臓構成細胞を、冠動脈経路で再播種すると、数日後より再細胞化組織は自己拍動を示した。

電子顕微鏡による超微細構造評価では、コラーゲンと考えられるマトリックス線維と横紋構造を有する心筋細胞が近接する様子が観察された。

光学マッピング法による評価を行ない、再細胞化心臓における自己拍動およびペーシングでの興奮伝播・収縮等の機能解析および免疫染色等により形態解析をおこなった。その結果、典型的なサンプルでは興奮は臓器様3次元組織全体に安定した伝播を示したが、一部の心臓では興奮は不均一であり、心室頻拍や心室細動様の所見が見られた。本成果は、国際生体材料科学誌(*Biomaterials IF: 8.387*)に報告した(Yasui et al. *Biomaterials*. 2014)。

上記再細胞化過程で、内皮細胞増殖因子の添加が再細胞化に寄与したと考えられる所見が得られたため、再播種した心臓構成細胞のマトリッ

クスへの接着に関連する因子を検索した。そのために、ラット心臓構成細胞、特に心筋細胞におけるintegrin-beta1, laminin-a2, VE-cadherin等の接着因子発現を促進するバラクライン因子の探索を行った。その結果、EGF, bFGF, vEGF, IGF1, Ascorbic acid, Heparin, Hydrocortisoneを含む培養液中で培養を行うと、培養3日目における心筋細胞のlaminin-a2, VE-cadherin, N-cadherinの遺伝子発現が有意に増大した。(現在、論文投稿準備中。)

iPS細胞(ラットおよびヒト)から心筋細胞への分化・誘導を行ない、活動電位・Ca<sup>2+</sup>トランジェントおよび興奮伝播特性をライブセルイメージング法により解析した。(本成果は、AHA2016で発表し、論文は現在投稿準備中。)

スライス状脱細胞化組織にヒトiPS細胞由来心筋細胞を播種し、拍動の様子を観察した。細胞外マトリックス構成蛋白等を添加することにより細胞播種組織の自己拍動が改善する様子が観察され、再播種細胞接着の改善の可能性が示唆された。

一方、生体に匹敵する立体心筋組織を構築する上では、解剖学的空間情報が極めて重要であるが、従来法では3次元組織のまま貫壁性に詳細な観察を行うことは困難であった。この点を解決するために、組織透明化技術を応用し、マウス成獣心を観察したところ、冠血管、交感神経の分布を3次元で詳細に観察することが可能となり、臓器様3次元心筋組織を構築・評価する上で重要な基盤技術となると考えられる。(本成果は、AHA2016およびISHR2016で発表し、論文は現在投稿中。)

## 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5件)

- (1) Yasui H, Lee JK, Yoshida A, Yokoyama T, Nakanishi H, Miwa K, Naito AT, Oka T, Akazawa H, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. *Biomaterials*. 2014;35(27):7839-50. (doi: 10.1016/j.biomaterials.)
- (2) Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Yoshida A, Kashiwama N, Kawamura A, Ito E, Saito A, Maeda A, Eguchi H, Toda K, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y. N-glycans: phenotypic homology and structural differences between myocardial cells and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS*

*One*. 2014 Oct 30;9(10):e111064. (doi:10.1371/journal.pone.0111064.)

- (3) Ikeuchi T, Espulgar W, Shimizu E, Saito M, Lee JK, Dou X, Yamaguchi Y, Tamiya E. Optical microscopy imaging for the diagnosis of the pharmacological reaction of mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes(mESC-CMs). *Analyst* 140(19):6500-7. 2015
- (4) Takanari H, Miwa K, Fu X, Nakai J, Ito A, Ino K, Honda H, Tonomura W, Konishi S, Opthof T, van der Heyden MA, Kodama I, Lee JK. A new in vitro co-culture model using magnetic force-based nanotechnology. *J Cell Physiol*. 231(10):2249-56. 2016
- (5) Iseoka H, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Masuda S, Yajima S, Ito E, Sougawa N, Takeda M, Harada A, Lee JK, Sawa Y. Pivotal role of non-cardiomyocytes in electromechanical and therapeutic potential of induced pluripotent stem cell-derived engineered cardiac tissue. *Tissue Eng Part A*. 2017 (doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0535.)

[学会発表] (計5件)

- (1) Lee JK, Yasui H, Yokoyama T, Nakanishi H, Yoshida A, Miwa K, Nakai J, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. Electrical properties of threedimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix. Gordon Research Conference. 2015.03.22., Lucca, Italy.
- (2) 李鍾國 Autonomic innervation to engineered cardiac tissues- Implication to Biological Pacemaker. 第79回日本循環器学会学術集会 大阪国際会議場 2015年4月
- (3) Lee JK Electrical properties of stem-cell derived cardiac tissues experimental platforms for research and development. 1st BioSensing Technology Workshop & Conference 2016.9.21., De La Salle University, Manila, Philippines.
- (4) Yokoyama T, Lee JK, Miwa K, Tomoyama S, Nakanishi H, Yoshida A, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y. Tissue Clearance Technique Enables to Investigate Three-Dimensional Distribution of Cardiac Sympathetic Nervous System. AHA2016 Scientific

Sessions. 2016.11.14., New Orleans, LA, USA

- (5) Yokoyama T, Lee JK, Miyagawa S, Sawa Y, Sakata Y, Komuro I. Three-dimensional Imaging of Transparent Hearts Revealed Abnormal Distribution of Cardiac Sympathetic Nerves in Mice with Myocardial Infarction. 国際心臓研究会 (ISHR)日本部会, 2016.12.16., Tokyo.

〔図書〕 (計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○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

李 鍾國 (LEE Jong-Kook)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号:60303608

### (2) 研究分担者

宮川 繁 (MIYAGAWA Shigeru)

大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号:70544237

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

なし

### (4) 研究協力者

三輪 佳子 (MIWA Keiko)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

横山 光樹 (YOKOYAMA Teruki)

大阪大学・医学系研究科・大学院生

巴山 里木 (TOMOYAMA Satoki)

大阪大学・医学系研究科・大学院生