

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350517

研究課題名(和文) ヒト3次元心筋組織モデルの作製

研究課題名(英文) In vitro fabrication of Human heart tissue model with perfusable blood vessels

研究代表者

関根 秀一 (Sekine, Hidekazu)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60541737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：現在、創薬研究や再生医療研究において培養細胞を用いたin vitroでの解析が行われているが、ヒトの生体内3次元環境とは大きくかけ離れており組織レベルでの解析は困難である。本研究では生体外において再生組織内へ血管網を付与する技術を利用し、生体同様に灌流可能な3次元組織モデルを構築した。これは血管系から薬剤を投与することが可能であり、種々の解析項目をシンプルかつ同時に測定できる新しい3次元心筋組織モデルである。本研究で示した組織モデルは生体外で時間かつ空間的に詳細な解析を行うことが可能であり、従来のモデルでは解析し得ない治療メカニズム解明のためのツールになるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Creation of 3-D tissue model similar to a biological tissue using tissue engineering method are expected as an alternative approach to 2-D culture or animal test in a research for developing a new medicine or regenerative medicine. We have already developed functional 3-D heart tissue with perfusable blood vessels in vitro using cell sheet based tissue engineering approach. Present study assessed the possibility as 3-D tissue model by performing drug evaluation in the engineered heart tissues. It is now possible to analyze the pharmacological effects such as metabolism and the blood pressure as well as action potential by using vascularized heart tissue model. We believe that our 3-D heart tissue model offers a new possibilities for evaluation of drug efficacy.

研究分野：組織工学

キーワード：組織モデル

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景：

近年、重症心不全に対する新たな治療法として注目されているのが、細胞を用いて欠損した組織を治療する再生医療であり、すでに骨髄由来細胞や筋芽細胞を不全心筋に移植し血管あるいは心筋を再生させることで心機能を改善させる治療法が臨床応用されている。また細胞浮遊液の注入に次ぐ次世代の治療法としてティッシュエンジニアリングによって再構築した心筋組織を移植する研究が始まっており、世界的には生分解性3次元スキャフォールドや脱細胞化組織に心筋細胞を播種し組織を再構築する方法や、心筋細胞とコラーゲンを混合して鋳型に播種し心筋組織に成型する技術が研究されている。一方、我々は細胞シート工学の技術を用い細胞シートを積層化することによりパッチ状の機能的な心筋組織を再生し、それを心筋梗塞部へ移植することで心機能が改善することを示してきた。また心機能改善効果のメカニズムとしては細胞シートから分泌される種々の血管新生因子の除放のみならず、移植された内皮細胞が直接血管新生に寄与し機能回復を加速させることを明らかとしてきた。さらに再生心筋組織のスケールアップによる高機能化も行ってきた。組織の高機能化の実現には再生心筋組織内に血管網を新生させ組織の厚みの増大を図る必要があるが、最初に移植した積層化心筋細胞シートにホスト側からの十分な血管新生を待って新たな積層化心筋細胞シートの反復移植を行う細胞シート段階的積層化法を考案した。この方法によって *in vivo* においてより厚く(約1mm)収縮力が増大した心筋組織を作製することが可能となった。また既存の吻合可能な血管上に反復移植を行うことで再構築した厚い血管付心筋組織を作製し異所性に移植できることも示した。次に、さらに高い目標となる生体外において厚みを持った高機能的な心筋組織を作製することを目的に再生心筋組織内へ血管網を付与するための技術開発を行った。再生組織へ血管網を付与するための血管新生の場となる血管床の構築、および組織灌流培養バイオリアクターを開発し血管床へ移植したラット積層化心筋細胞シートへの毛細血管網新生の評価を行い、さらに再生組織のスケールアップ技術としての有効性を検証した(図1)。バイオリアクターを用いた灌流組織培養により血管床と移植した再生組織内で再生した毛細血管の結合を認め、それらの血管を介した血液の還流を確認することができた。さらに積層化細胞シートを段階的に移植することにより、より厚みのある心筋組織の再生に成功した。これらの結果により *in vitro* で再生心筋組織内に機能的な毛細血管網を付与できることが実証され、また細胞シートの段階的積層化法により再生組織のスケールアップが可能であることを示した。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでに開発、そして成功させた生体外血管網付と技術を用いたヒト3次元心筋組織モデルを構築し、従来の枠を超える組織モデルとして科学的に有効であることを証明することを目的とした。今回提案するモデルでは生体外で時間かつ空間的に詳細な解析を行うことが可能となるため、従来のモデルでは解析し得ない治療メカニズム解明のためのツールになるものと考えられる。

3. 研究の方法

初めに生体外において心筋組織モデルを作製するために必要な生体由来の血管床を構築した。ラットの筋膜組織を外科的な成形処理を行い、その後生体内で一定期間留置することで毛細血管の動静脈短絡を誘導させ生体外での組織灌流において灌流液が動脈から組織、さらに静脈へ戻るような閉鎖回路を持つ組織、すなわち血管付き血管床を作製した。次に血管床へ心筋細胞シートの積層化とバイオリアクターによる灌流培養を行い細胞シートへ血管網が付与された段階で心筋組織モデルとした(図1)。

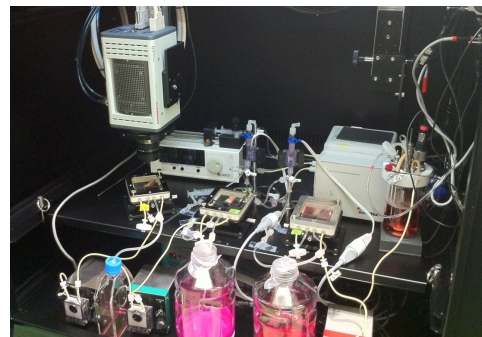


図1. バイオリアクターによる灌流培養

次に作製した心筋組織モデルに対し種々の薬理試験を行い、薬効発光イメージング解析、組織学的解析、力学的解析、表面電位測定によって組織モデルとしての評価を行った。

4. 研究成果

作製組織の薬物反応を代謝(ATP)の観点から解析するためにルシフェラーゼトランスジェニックラットの心筋細胞を用い、3層のラット血管内皮-心筋共培養細胞シートを血管床へ積層化し組織灌流を行うことで3日後には心筋組織内の毛細血管と血管床の毛細血管との間に血管を介した繋がりができるため、まず心筋シート3層3日の灌流培養において交感神経受容体作動薬であるイソプロテレノール(1 μ M、10 μ M、100 μ M)を動脈から導入したところどの濃度においてもATP活性が高まることが発光イメージングによって確認できた(図2)。

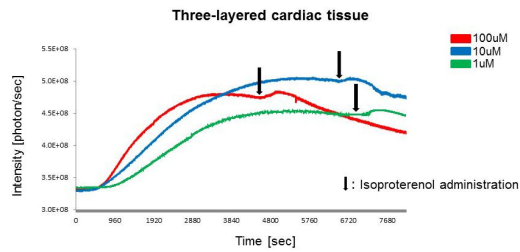


図 2. 心筋シート 3 層での 受容体作動薬投与における薬理試験

また、さらに 3 層の心筋細胞シートの積層化することで、6 層のより厚みのある心筋組織を再構築しイソプロテネロール(1 μ M、10 μ M、100 μ M)を動脈が導入したところ 3 層と同様に代謝が高まることを確認した。

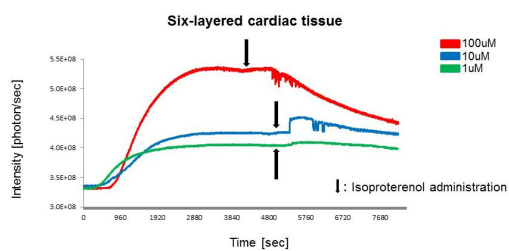


図 3. 心筋シート 6 層での 受容体作動薬投与における薬理試験

次にモデルとしての評価を行うため発光測定に加え、表面電位と動脈圧を測定したところ、イソプロテネロール投与後では ATP の上昇に伴う表面電位の振幅と脈拍数の増大、動脈圧の減少が認められた(図 4)。

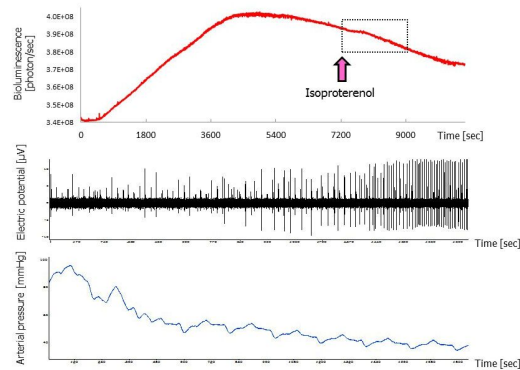


図 4. 受容体作動薬投与におけるモデル組織の薬理評価

また、受容体作動薬であるアドレナリンを投与し発光測定、表面電位、ならびに動脈圧を測定したところ、投与後において ATP の上昇・下降の振幅に伴う表面電位の振幅と脈拍数の増大・減少が確認された一方で、動脈圧は大きな変動が認められなかった(図 5)。

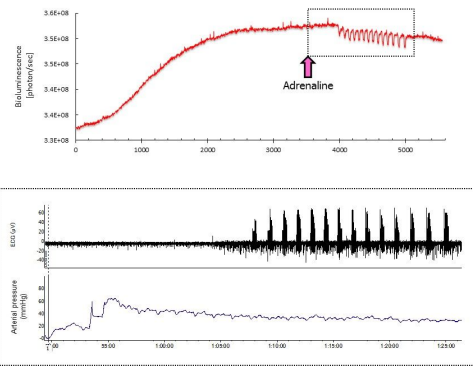


図 5. 受容体作動薬投与におけるモデル組織の薬理評価

さらにこの心筋組織モデルに心毒性を有するドキシソルピシンの 24 時間の持続投与を行ったところ心筋組織の ATP 活性の低下が認められた(図 6)。

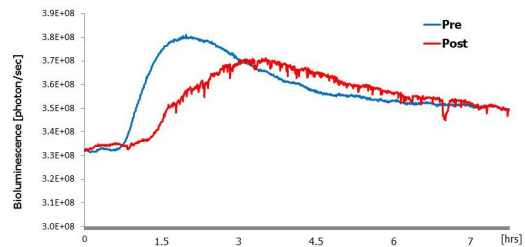


図 6. 抗がん剤投与によるモデル組織の薬理評価

またヒト iPS 細胞由来心筋細胞ヘルシフェラーゼ遺伝子を導入することで評価モデルとしてのヒト血管付き 3 次元心筋組織の構築に成功した(図 7)。

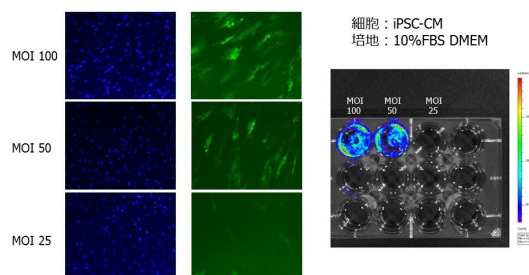


図 7. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞へのルシフェラーゼ遺伝子の導入

以上、本研究によって種々の解析項目をシンプルかつ同時に測定できる新しい生体外ヒト心筋組織モデルを開発した。このモデルはこれまでの培養皿上での in vitro やマウスやラットへの in vivo 実験研究において解析が困難であった 3 次元組織の代謝のリアルタイムモニタリング、空間的な解析や治療メカニズムの解明に大きく貢献できるツールとなると考える。

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)

[学会発表](計 5件)

(1) Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu.
Analysis of metabolic activity using the engineered heart tissue model. Keystone symposia Mitochondria Communication 2017. Taos(USA), Jan. 17th, 2017.

(2) Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu.
Ex vivo fabrication of heart tissue model with perfusable blood vessels using cell sheet. Basic Cardiovascular Science 2016 Scientific Sessions. Phoenix(USA), Jul. 20th, 2016

(3) Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu.
Ex vivo engineering of vascularized heart tissue model. European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2016. Uppsala(Sweden), Jul. 1st, 2016

(4) Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu.
Fabrication of vascularized 3-D heart tissue for drug evaluation. World Conference on Regenerative Medicine. Leipzig(Germany), Oct. 22th, 2015

(5) Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu.
The model of vascularized three dimensional heart tissue for drug evaluation. 2015 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress. Boston(USA), Sep. 9th, 2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

関根 秀一 (SEKINE, Hidekazu)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：60541737

(3)連携研究者

清水 達也 (SHIMIZU, Tatsuya)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：40318100

小林 英司 (KOBAYASHI, Eiji)
慶應義塾大学・医学部 プリヂストン臓器
再生医学寄附講座・特任教授
研究者番号：00245044