

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670410

研究課題名(和文)3Dバイオフィンターを用いた血管構築を伴った心筋組織の作製

研究課題名(英文)Fabrication of a human iPSC-derived cardiac tissue using 3D bioprinter

研究代表者

遠山 周吾 (Tohyama, Shugo)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90528192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞は再生医療における最も魅力的な細胞源の1つである。臨床応用に向けて多くの課題が克服されつつあるが、最適な細胞移植法の開発は未だ解決されていない課題である。本研究では、配向するヒトiPS細胞由来心筋組織を構築することを目的として研究を行った。我々はまず3Dバイオフィンターを用いて格子状細胞接着性ゲルScaffoldを作製した。その後、心筋細胞を播種したところ心筋細胞が配向しかつ拍動する網目状構造物が得られた。この配向する心筋細胞のゲル構造体は、さらに大きな心筋組織を構築するためのパーツあるいは薬剤スクリーニングのためのツールとして利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Human iPSCs are one of the most attractive cell sources for regenerative medicine. Although many challenges have been overcome for clinical application, establishment of optimal method for transplantation is an unsolved problem. In this study, we aimed to fabricate a human iPSC-derived aligned cardiac tissue with . At first, we have built a grid-like gel scaffold using the 3D bioprinter. Thereafter, we seeded cardiomyocytes and fabricated a mesh-like aligned cardiac tissue. This mesh-like aligned cardiac tissue is expected to be utilized for part of large cardiac tissue or for a tool of drug screening.

研究分野：心臓再生医療

キーワード：ヒトiPS細胞 心筋細胞 血管内皮細胞 3Dプリンター スキャフォールド

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全の予後は悪性腫瘍と同等に悪く、重症心不全の根治療法には心臓移植以外の方法が存在しない。しかし、移植心臓のドナー不足は深刻な問題であり心臓移植の数は全世界で 4000 例にも満たない。心臓移植にかわる治療として再生医療が注目され、iPS 細胞の登場により、再生心筋細胞の移植治療が理論上は可能となった。しかし、再生心筋細胞を用いた細胞移植療法には、克服すべき課題が多い。**iPS 細胞は移植後に腫瘍化する危険性が指摘されているが、心筋細胞に関しては我々の開発した無糖乳酸培地により効率よく大量の心筋細胞が純化精製できることを既に報告している** (Tohyama, et al. *Cell Stem Cell* 2013)。また、 $1 \times 10^{9-10}$ 個の心筋細胞で構成されている成人の心機能を回復するために必要な量の心筋細胞を獲得するためには iPS 細胞由来の心筋細胞を大量培養する必要があるが、バイオリアクターを用いた大量培養システムにより既にこの問題を解決している (Hemmi, Tohyama, et al. *Stem Cells Transl Med* 2014)。**最後に残された隘路は、移植細胞の生着率を高め、効率良く心機能を回復するための再生心筋細胞の移植法の確立である。**心筋細胞の直接移植は生着率が低く数%と報告されていたが、心筋球にして塊状で移植することにより移植後 8 週間での移植細胞の生着率は向上した。しかし、細胞塊となった心筋組織の内部は栄養が枯渇するため、移植後半年、一年といった長期での移植成績はあきらかではない。この問題を解決するため、毛細血管網を持った心筋組織を *in vitro* で構築してレシピエントの心臓へ移植することが可能になれば、生着効率を高めることが可能となる。また、細胞単独ではなく組織構築された心筋組織を移植することで機能回復にも有用であると考えられる。

分担研究者の中村はバイオブリンター(バイオファブリケーション)を用いることで、3

次元の生体組織を構築することに成功した。

3D バイオブリンターによりヒト iPS 細胞由来の心筋細胞と血管細胞を用いて微細血管構造を持った三次元の心筋組織を *in vitro* で再構築し、*in vivo* で有効性を評価することを目的とする。また、同時に心筋組織の三次元培養系を確立する。ヒト iPS 細胞は胎児の表現形をもつ細胞であることが知られているが、三次元培養することにより移植に適した成人型の心筋細胞へと成長させる。三次元再生心筋組織を構築することで重症慢性心不全への iPS 細胞を用いた再生医療を促進させることが可能となる。

2. 研究の目的

慢性心不全の予後は悪性腫瘍と同等に悪く、重症慢性心不全の根治療法は心臓移植のみである。心臓移植にかわる治療として再生医療が注目されているが、克服すべき課題も多い。iPS 細胞の出現により再生心筋細胞の細胞源は確保され、現在残されている最も大きな課題は、**最適な細胞移植法の開発**である。

慢性心不全への細胞移植法としては、直接移植、スカフォールドを用いて構築した 3 次元組織の移植、細胞シート移植が行なわれているが、いずれも完璧な移植法とはなり得ていないものではない。

一般的に細胞を直接移植すると細胞の種類に関わらず生着率が低く、これまで基礎実験で報告されてきた心機能改善効果は移植された細胞やレシピエントの組織からのサイトカイン効果によるものと考えられてきた。また、小動物での研究では有意な心機能の改善効果を認めるものの、臨床研究においてはいずれの研究でも心機能の改善効果は低いことが明らかとなった。そのため、より効果的に心機能を改善するために iPS 細胞由来の再生心筋細胞を移植して長期的に生着させる方法を開発する必要があると考えられている。心筋細胞を単一細胞でなく球状塊として移植することで生着率が向上することを我々の研究室では明らかにした(*Nature Methods* 2010)が、長期に生着してかつホストの心筋組織と連動で拍動することにより心

機能を改善するためには、*in vitro* で血管構造を伴い、配向性を持った心筋組織を構築した上で移植する必要がある。**しかし、心臓や肝臓等の3次元に立体構築された大きな組織をiPS細胞由来の分化細胞で置換するためには、複雑な組織を再構築する革新的な技術が必要となる。**

Tissue engineering の技術として、これまでフィブリンやコラーゲン等のスカフォールドを用いた組織の構築や細胞シートが一般的に用いられてきた。スカフォールドは、大きな組織を構築するには適しているが、細胞をランダムな方向に注入することしかできず、心臓のように配向性がしっかりとした組織を再構築するのは技術的に困難である。細胞シートは細胞を培養皿でシート上に培養するもので、網膜等の単層から三層程度の組織までの構築には非常に有用な方法であることが知られている。しかし、三層以上に重ねると中心組織に栄養が届かず壊死することが明らかとなっており、成人で1 cm以上の厚みを持つ心筋組織を構築するには適さない。**配向性を持ちながら、かつ厚みを持った組織を構築することが心筋組織の再生には重要であり、これからの再生医療においては必須の技術であると考えられている。**

3D バイオプリンターは、分担研究者の富山大学の中村研究室で開発され、Tissue engineering において現在特に注目を集めている最新の技術である。**インクジェットプリンターの技術を応用した3D バイオプリンターによって、ゼラチンに包埋した心筋細胞と血管細胞を三次元的に構築することが可能になれば、再生心筋細胞の心臓への移植により長期の生着と心機能の改善が期待できる。**さらに現在手作業で行なわれている細胞培養、組織構築を自動化するバイオファブリケーションの技術を構築することで、再生心筋組織の大量培養に向けて大きく前進できると考えられる。**この新技術による再生心筋組織の移植療法が完成すれば、年間1000人、潜在的予備軍を入れると数万人と言われる心臓移植の待機患者さんへの大きな福音となることは明らかである。**この3D バイオプ

リターによりヒトiPS細胞由来の心筋細胞と血管内皮細胞を用いて心筋組織を再構築し、微小血管構造を持った再生心筋組織を作製することで重症慢性心不全へのiPS細胞を用いた再生医療を促進させることを目的とする。

3. 研究の方法

三次元微小心筋組織を作製するためには、大量の純化精製心筋細胞が必要である。そこで、まず平成26年度は無糖乳酸添加培地を用いた心筋細胞の大量純化精製法の確立を目指した。

また同時に、ラット初代培養心筋細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を**富山大学で開発されたバイオプリンター**でプロットすることにより**微小血管網を有する心筋球および配向性を持った微小心筋組織を構築**することが可能か否かを検証した。

さらに、平成27年度に微小心筋組織の移植も検討しているため、ラット心筋梗塞モデルの作製法の確立を行った。

3D バイオプリンターによる細胞の打ち出しが困難であったため、平成27年度は3D バイオプリンターを用いてチラミン修飾アルギン酸ナトリウム(Alg-Ph)チサンミン修飾ゼラチン(Ge-Ph)のゲル構造物(細胞接着性のscaffold)を作製し、そこに心筋細胞の播種を行い、細胞のscaffoldへの接着と拍動の確認を行った。

4. 研究成果

【平成26年度】

(1) スピナーフラスコによる大量培養システムを用いた心筋分化誘導

3D バイオプリンターによる心筋組織の構築には大量の純化心筋細胞を必要とするため、**スピナーフラスコ(150ml)による回転浮遊大量培養システムを用いて心筋分化誘導法の調整を行い、大量の分化細胞を得ることに成功した。**分化誘導法に関しては、BMP4、

ActivinA, IWR1 といったリコンビナント蛋白を適切なタイミングで使用する事で心筋細胞の分化誘導条件を最適化した。

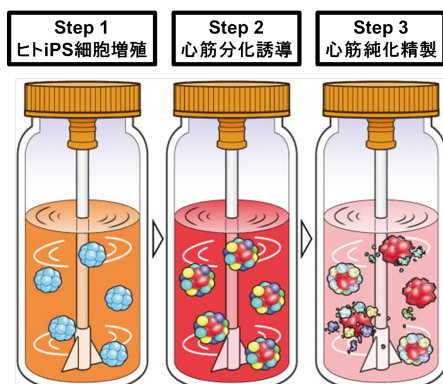


図 1 : スピナーフラスコを用いた心筋分化誘導および純化精製

また、分化誘導した心筋細胞を含む細胞群を無糖乳酸添加培地にて培養し、2日おきにピペティングおよび 40 μ m のフィルターを用いた培地交換を行ったところ、心筋以外の細胞を除去し、純化心筋細胞を回収することに成功した。

(2) **ヌードラット心筋梗塞モデルの作製**

8 週齢の無胸腺ヌードラットの心臓を露出させ、液体窒素によって十分に冷却されたアルミプローブを 30 秒間心臓に押し当てることにより、左室前壁に心筋梗塞を作製した(クライオインジャリー法)。心臓超音波とカテーテルにより心機能を評価、移植実験を行う基盤を整えた。

(3) **微小血管網を有する心筋組織の作製**

ラット初代培養心筋細胞を 3D プリンターにて打ち出すことが可能かを検討したところ、3D プリンターによって細胞を直接的に立体構築するよりも足場となるスカフォールドを構築することが将来的に臨床応用可能な心筋組織の作製に有用であることが明らかとなった。そこで、平成 26 年度はヒトの心筋細胞と血管細胞による立体組織構築を確認するために PDMS モールドの鋳型にヒト iPS 細胞由来心筋細胞および HUVEC を播種し、微小心筋組織の作製を行った。

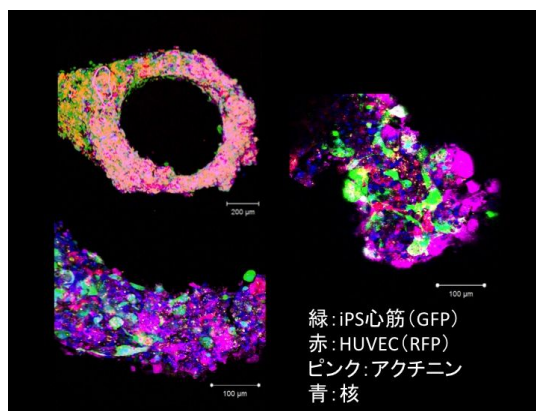


図 2 : PDMS モールドを用いたヒト iPS 細胞由来純化心筋細胞および HUVEC による微小心筋組織の構築

【平成 27 年度】

(4) 3D バイオプリンターを用いた Alg-Ph Ge-Ph 格子状ゲルシートを作製

1.5%Alg-Ph 0.5%G-Ph 50U/mL の溶液を下地 (2%CaCl₂、5mM H₂O₂ をしみ込ませた 5% アガロースゲル) に 3D バイオプリンターを用いて吐出することによって格子状のゲル構造物を作製した。

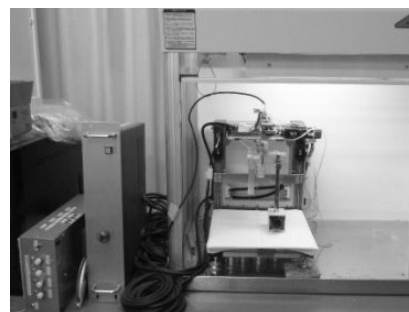


図 3 : 3D Bioprinter

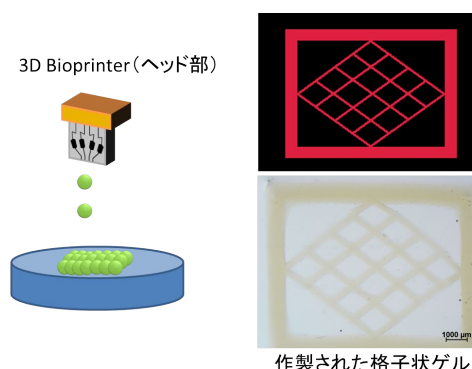


図 4 : 3D プリンターによる Scaffold 作製

(5) 格子状心筋微小組織の作製

3D Bioprinter を用いて作製した Alg-Ph Ge-Ph 格子状ゲル構造物に初代培養ラット心筋細胞を播種したところ、播種後1日目からシートの時よりも大きく拍動している様子が確認された。また、播種後2日目では1日目よりも拍動が大きくなっていることが確認された。播種後1日目のサンプルを固定し、F-actin 染色を行ったところ、細胞が接着している様子が確認できた。

ひし形の交差点部分では伸展方向は統一されていなかったが、網目の直線部分においては直線と平行な方向に細胞が伸展している様子が確認された。直線部分では細胞の配向性が確認できた理由は、細く伸びた足場の形状を細胞が認識して配向したものと考えられる。一方、交差点部分で配向性が見られなかった原因として、交差点部分の面積が大きいことと格子で交わる2本の直線に接着できることから、細いファイバー構造として足場が認識されなかった可能性が考えられる。したがって、この太さのファイバー構造の足場が、**配向する心筋組織作製には有効**で、このようなファイバー構造を有する構造をデザインする有効性が示唆された。

培養を続けるとゲルシートよりも大きく折れ曲がる現象が見られた。さらに**アドレナリンを添加すると、それに反応してゲル構造物の拍動周期が早まる**ことが観察された。

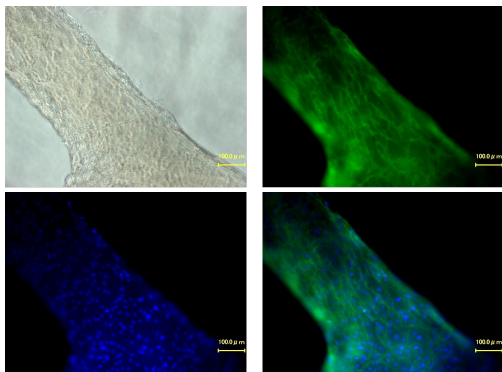


図5：Scaffold に心筋細胞充填後の配向性を有する微小心筋組織

【成果と今後の展開】

配向する心筋組織構築を目指して、3D バイオプリンターを用いて格子状細胞接着性ゲル Scaffold を作製した。心筋細胞が配向しかつ拍動する網目状構造物が得られ、ファイバー形状を有する構造の有効性が示唆された。この配向する心筋細胞のゲル構造体は、さらに大きな心筋組織を構築するためのパーツとして利用されることが期待される。また、アドレナリン負荷に反応して明らかな拍動の変化が見られたことから、薬物応答性による薬効スクリーニングへの応用も大きく期待される。**本研究課題のようにヒト由来の完全に純化精製された心筋細胞を用いた微小心筋組織の報告例はなく**、国際的にも非常にインパクトの高い仕事と考えられる。今後はヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いてより立体的なヒト心筋微小組織の構築を目指し、動物モデルへの移植を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) 藤田 淳
心筋再生医療の現状と展望 BIO Clinica 北
隆館 2015年5月号 2015年4月10日 発
刊 査読無

(2) 藤田 淳、福田 恵一
iPS 細胞を用いた心臓再生医療の現状と課題
医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 Vol251
No.3 2014年10月18日発刊 査読無

〔学会発表〕(計15件)

(1) 遠山 周吾 他、
代謝制御によるヒト iPS 細胞由来純化心筋細胞を用いた心筋球作製法の開発と再生医療への応用
第55回日本生体医工学会
2016年4月26日~28日
富山国際会議場(富山県富山市)

(2) 遠山 周吾 他、Metabolic Regulation of Pluripotent Stem Cells and Cardiac Regenerative Medicine
第80回日本循環器学会
2016年3月18日~20日
仙台国際会議場(宮城県仙台市)

(3) 藤田 淳 他、
心臓再生への挑戦
慶應義塾大学医工薬コモンズ
第 10 回インキュベーションラウンジ
2015 年 12 月 16 日
慶應義塾大学理工学部 (神奈川県横浜市)

(4) 塚本 佳也、中村 真人 他、
3D プリンターを応用した配向する心筋組織
の作製
平成 27 年日本生体医工学会北陸支部
2015 年 12 月 12 日
富山駅前 CiC ビル (富山県富山市)

(5) 遠山 周吾 他、
代謝制御を基盤とした心臓再生医療
第 19 回日本心血管内分泌代謝学会
2015 年 12 月 10 日 ~ 12 日
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

(6) 藤田 淳 他、
心臓再生医療への挑戦
第 2 回 新・CPC 運用支援セミナー
2015 年 10 月 28 日
メルパルク大阪 (大阪府大阪市)

(7) 藤田 淳 他、
iPS 細胞を用いた心筋再生医療
第 2 回 富山大学臓器再生カンファレンス
2015 年 7 月 21 日
富山大学工学部 (富山県富山市)

(8) 遠山 周吾 他、
多能性幹細胞の代謝と心臓再生医療
第 79 回日本循環器学会
2015 年 4 月 24 日 ~ 26 日
大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

(9) 遠山 周吾 他、
代謝的アプローチによるヒト ES/iPS 細胞由
来心筋細胞を用いた心臓再生医療
第 14 回日本再生医療学会
2015 年 3 月 19 日 ~ 21 日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(10) 藤田 淳 他、
iPS 細胞を用いた心臓再生医療における課題
の克服に向けて
第 14 回日本再生医療学会
2015 年 3 月 19 日 ~ 21 日
パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(11) 藤田 淳 他、
iPS 細胞を用いた心不全治療の現状と展望
第 3 回実験動物科学 シンポジウム
2014 年 12 月 12 日
山形テルサ・アプローズ (山形県山形市)

(12) 遠山 周吾 他、
多能性幹細胞の代謝と心臓再生医療

第 18 回日本心血管内分泌代謝学会
2014 年 11 月 21 日 ~ 22 日
横浜市開港記念会館 (神奈川県横浜市)

(13) Jun Fujita, et al.
Clinical Application of Induced Pluripotent Stem
Cells for Heart Failure Treatment: Potentials,
Progress, and Obstacles
American Heart Association 2014
2014 年 11 月 15 日 ~ 19 日
Chicago (USA)

(14) 藤田 淳 他、
Current Perspectives on Cardiac Regenerative
Therapy with Human Induced Pluripotent Stem
Cells
第 18 回日本心不全学会
2014 年 10 月 10 日 ~ 12 日
大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

(15) 藤田 淳 他、
iPS 細胞を用いた心筋再生医療の現状と展望
2014 年 6 月 24 日
2014 年度 富山大学 生命融合科学教育部
大学院特別講義 富山大学 (富山県富山市)

〔図書〕(計 0 件)
特記すべきことなし

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 0 件)

特記すべきことなし

○取得状況 (計 0 件)

特記すべきことなし

〔その他〕
ホームページ等

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
遠山 周吾 (Shugo Tohyama)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号: 90529192

(2) 研究分担者
藤田 淳 (Jun Fujita)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・特任講師
研究者番号: 10306706
中村 真人 (Makoto Nakamura)
富山大学・大学院理工学研究部 (工学)・教授
研究者番号: 90301803