

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670620

研究課題名(和文) ヒト幹細胞由来機能的3次元心筋組織構築法の開発

研究課題名(英文) development of 3-dimensional functional cardiac tissue from human stem cell derived cardiac cell

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) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、古典的細胞凝集現象であるスフェロイドを用いて、心筋再生を目指してきた。スフェロイドは心筋以外にも繊維芽細胞や血管内皮細胞など様々な細胞を任意の比率で配合することにより、より機能的なスフェロイドを作製することが可能であるため、本研究では最適化したヒトiPS細胞由来心筋組織型スフェロイドの条件検討、最適化を目指した。繊維芽細胞と人iPS細胞由来心筋細胞を混合したスフェロイドを作成し拍動効率を解析したが、最適化した条件を見つけるには至らなかった。今後、さらなる研究を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：In this present study, we focused on the basic characteristics of cell aggregation, called "spheroid formation". Utilizing this characteristics, cardiac cells was spontaneously aggregated to form contractile cardiac spheroid. We demonstrated the addition of human fibroblast, vascular endothelial cells develop further functional contractile cardiac tissue. We evaluate the relationship between cell ratio, and contractile activity in vitro. In this term, we couldn't determine optimized contractile cell aggregates. Further study was needed for this novel tissue engineering about cardiac cell aggregates.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：再生医療 心筋再生 組織工学 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

重症心不全は先進諸国において未だ増加傾向である。これまで、心移植、埋め込み型補助人工心臓などの開発が行われ一定の成果を認めているが、様々な解決すべき問題点は多い。

2006年にヒト iPS 細胞の樹立が報告されてから、これまで困難とされてきた真菌再生の可能性が見出されてきた。

幹細胞から得られる心筋を機能的に心臓に移植することで重症心不全が治癒できる新規治療法が求められている。

2. 研究の目的

我々は、元来細胞が有する自己凝集現象であるスフェロイド形成に着目、スフェロイド同士も機能を維持しながら融合し3次元化する性質を見出して機能的な細胞のみからなる組織工学技術を研究・開発してきた。

本研究での目的はヒト iPS 細胞ゆらい心筋細胞を我々の基盤技術を用いて3次元化した機能的な心筋組織を作り移植することを目的とする。

3. 研究の方法

我々は、古典的細胞凝集現象であるスフェロイドを用いて、心筋再生を目指してきた。スフェロイドは心筋以外にも線維芽細胞や血管内皮細胞などと様々な細胞を任意の比率で配合することにより、より機能的なスフェロイドを作製することが可能であり、前年度ではヒト皮下線維芽細胞および血管内皮細胞の比率を変更することにより、スフェロイド作製後の拍動開始までの日数や拍動維持日数が異なることを報告した。

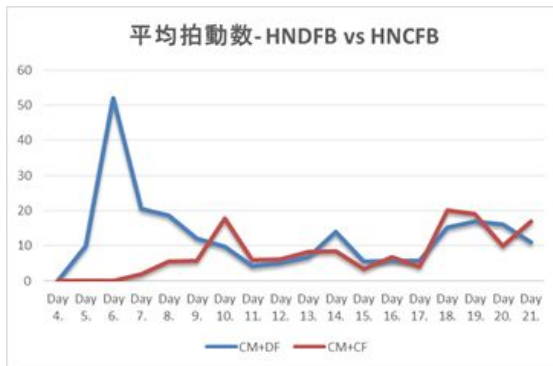
ただ、ヒト線維芽細胞も皮膚線維芽細胞

や心臓線維芽細胞など様々な線維芽細胞がある。皮膚線維芽細胞は採取が容易であり、低侵襲である、というメリットがある一方、心臓線維芽細胞が心筋再生に有用との報告もある。そういう背景も踏まえ、本年の上半期は、心筋細胞と配合する線維芽細胞の評価を行った。ヒト人工多能性幹細胞 (HiPS)由来の心筋細胞にヒト心室筋由来の心臓線維芽細胞 (NHCFB) とヒト皮下線維芽細胞 (NHDFB) をそれぞれ 40% の比率で配合し、拍動数と収縮率のスフェロイド形成 1 ヶ月後までの経時的評価を行った。そして、収縮率はスフェロイド周囲の任意の 6 点を選び、動画解析ソフトを用いて、その 6 点を追尾することにより評価した。

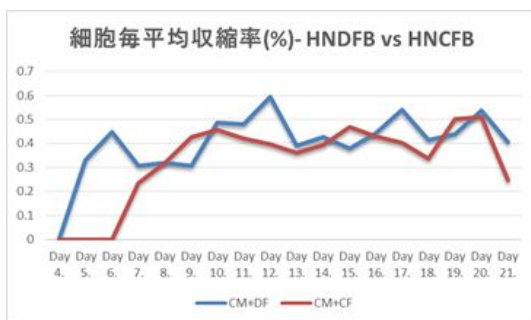
4. 研究成果

結果は両群が拍動を開始してから 3 週間目までの平均拍動数および収縮率はそれぞれ以下の通りであった (図 1、2)。少なくとも拍動数と収縮率に限れば、線維芽細胞によってスフェロイドの動態には大きな影響はしないものと思われた。従って、ヒト線維芽細胞の選択に関しては、パラクリン因子などの細胞より分泌されるサイトカインや成長因子などによる違いや細胞外マトリックス産生の違いによるグラフト形成能の相違により選択していく必要があることが示唆された。

また、理化学研究所から分与していただいた HiPS 細胞を前年度までに当研究室に



おける維持培養を行っていたが、本年度では既出の文献を参考に、心筋細胞への分化も再現し、それらを回収し、凝集させてできた心筋スフェロイドの拍動まで確認でき



た。今後はそれらスフェロイドを用いて、グラフト作成を行い、動物への移植を行う予定である。

図1：ヒト iPS 細胞に繊維芽細胞を混合させた際の種類と拍動数の比較。

図2：ヒト iPS 細胞に繊維芽細胞を混合させた際の種類と拍動効率の比較

実験計画では、HiPS 細胞を分化した心筋細胞にヒト皮下線維芽細胞や HiPS 細胞由来内皮細胞を配合してできたスフェロイドをグラフト化し、動物へ移植する予定であったが、スフェロイドの適正配合比率の検討に時間を要し、グラフト化まで至らなか

った。今後は更なる検討の上で、グラフト作製・動物移植まで到達したい。

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 2 件)

1 . Noguchi R, Nkayama K, et al: Development of a three-dimensional pre-vascularized scaffold-free contractile cardiac patch for treating heart disease. J heart Lung Trans. 2016 Jan; 35(1):137-45

2 . Itoh M, Nakayama K, **Noguchi R**, et al Scaffold-free tubular tissues created by a bio-3d printer undergo remodeling and endothelialization when implanted in rat aortae. PLoS One. Sep 1;10(9).(2015)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

名称：心臓または血管組織型スフェロイド
 発明者：野口亮
 権利者：佐賀大学
 種類：国際特許出願
 番号：PCT/JP2013/0979478
 出願年月日：2013年10月24日
 2015年から中国、欧州、米国などに出願中
 国内外の別：国外

名称：組織体形成装置・キット
発明者：野口亮
権利者：佐賀大学
種類：国内特許
番号：特願 2015-55254
基礎出願日：平成 27 年 3 月 18 日

取得状況（計 0 件）

〔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：50420609