

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：

(日本語) 未来医療を実現する医療機器・システム研究開発事業

(英語) Development of Medical Devices and Systems for Advanced Medical Services

研究開発課題名：

(日本語) 立体造形による機能的な生体組織製造技術の開発／細胞を用いた機能的な立体臓器作製技術の研究開発／細胞シート工学を基盤とした革新的立体臓器製造技術の開発

(英語) Development of innovative manufacturing technology for three-dimensional cardiac constructs based on cell sheet engineering

研究開発担当者

所属 役職 氏名：

(日本語) 学校法人東京女子医科大学 教授 清水達也

(英語) Tokyo Women's Medical University, Professor, Tatsuya Shimizu

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(和文)

本研究開発では、日本発世界初の細胞シート工学を基盤とした立体組織構築技術を発展させ、臨床応用可能な血管網付き立体心臓の製造技術を世界に先駆けて確立することを目指す。立体心臓は、移植吻合可能な動静脈血管網を有したブタ小腸を脱細胞化して、ヒト血管内皮細胞を再播種したものを平面状あるいは管状の血管床とし、その上あるいは内面にヒト iPS 細胞由来心筋シートを血管網を付与しながら段階的に積層化、これを生体環境を模したバイオリアクターを用いて灌流培養することで作製する。本年度は、①～⑥の項目について、以下の研究開発を遂行した。

①臨床応用可能な血管床の開発：ラット小腸の脱細胞化および血管内皮細胞の再播種の条件を踏まえ、ブタ小腸の脱細胞化、血管内皮細胞の播種条件を検討した。その結果、ブタ小腸に関しても、脱細胞化後 DNA 残存量を目標値である 50 ng/mg 以下とすることを達成した。さらに、臓器灌流バイオリアクターを用いて、ヒト血管内皮細胞を血管腔内に播種・培養することにより、灌流可能な血管網を有するヒト血管床の作成方法を確立した。

②臓器灌流バイオリアクターの開発：脱細胞化、ヒト血管内皮細胞再播種、心筋シート積層化、灌流培養の一連の工程を実施できる臓器灌流バイオリアクターを開発した。また、電氣的・力学的特性を測定

する機構を培養チャンバーに組み込むことで、立体臓器の電位、収縮力、内圧の測定を可能とした。脱細胞化しないラット小腸を血管床とした灌流実験では、3層のヒト心筋シートを2段階積層化し、6日間を超えて長期に灌流培養することを達成した。また、脱細胞化しないブタ小腸を平面状血管床とした灌流実験では、自律拍動し収縮力(0.5mN)を測定可能な平面状心臓の作製に成功した。

③臓器灌流液の最適化：大気開放条件下の灌流培養に適した、Leibovitz's-15(L-15)を基礎培地とすることにより、小動物管状心臓を6日間以上、大動物平面状心臓を約15日間以上、連続灌流培養可能な基礎灌流液を確立した。また、灌流液成分として、血管網新生に適したサイトカインや、エネルギー代謝の向上が期待できる脂肪酸を選定した。

④細胞シート段階的積層化法の確立：立体臓器作製に必要な細胞シート作製の種々のサイズ、形状の温度応答性培養容器を作製した。管状心臓の作製に関しては、円形断面の膨張・折り返し式貼付け機構を持つ、ヒト心筋シートの貼付デバイスの基本設計、試作機での動作確認を行い、管腔構造内面からシート状構造物の貼り付けが可能であることを示した。

⑤組織臓器の機能評価システムの構築：ディスプレイブルグルコース・乳酸センサーを使った連続自動測定装置を開発し、極めて少ない灌流液での立体臓器の代謝を測定することを可能にした。また、光干渉断層撮影装置OCTを開発し、血管床上への心筋シート積層化状態ならびに作製臓器の拍動のリアルタイム観察を可能にした。

⑥作製臓器の移植と有効性評価：ヒト心筋細胞と内皮細胞を共培養し、内皮細胞のネットワーク構造が構築された心筋シートを脱細胞しない血管床上へ積層化し、灌流バイオリクターを用いて灌流培養を行うことで、平面状心臓を作製したところ、心筋組織内と血管床との間に毛細血管の結合が認められた。さらに平面状心臓をブタ心臓へ血管吻合して移植したところ、血流再開通にともない平面状心臓の拍動が再開されることを確認し、生体外で作製した動静脈付き立体臓器が、生体内でも機能し得ることを示した。

今後、これら技術の統合による連続した臓器作製工程の確立、更なる心筋シート積層化・灌流条件最適化による高機能な臓器の作製、そして作製臓器の移植による心機能改善効果を示すことで物理的な拍動による心機能・循環動態の改善というこれまでにない心疾患に対する再生医療の実現を目指す。

要約 (英文)

Our project's aim is to develop technology for structuring three-dimensional (3D) tissues and organs based on cell sheet engineering, that is the first technology in the world from Japan, and to establish a manufacturing technology of clinically applicable 3D cardiac constructs with vascular networks.

3D "planar or tubular" cardiac constructs have been constructed by the method of stepwise laminating of human iPS cells-derived myocardial cell sheets "on or in" vascular beds, and performed perfusion culture using by a bioreactor which would imitate biological environment. The pig small intestine vascular beds, that would be capable to implant and anastomose arteriovenous vascular network, have been produced by decellularization and reseeded of human vascular endothelial cells.

This year's annual achievements of the project are summarized below.

① The development of clinically applicable vascular beds

We have considered conditions of "pig intestine decellularization" and "human vascular

endothelial cells reseeding”, in reference to our research evidence of rat small intestine conditions. We have succeeded that the residual DNA amount is under 50 ng/mg, which is the target value, in pig small intestine after decellularization. Moreover, using tissue perfusion bioreactors, by seeding and culture of human vascular endothelial cells in blood vessel, we have established the production method of human vascular beds with vascular networks that would be possible perfusion.

② The development of tissue perfusion bioreactors

We have established tissue perfusion bioreactors that would be able to perform series of steps, namely, decellularization, deplating of human vascular endothelial cells, laminating of human iPS cells-derived myocardial cell sheets, and perfusion culture. To develop the culture chamber with the mechanism of electrical and mechanics measurement technology, we have been able to measure potential, contractile force, and internal pressure in the 3D cardiac constructs.

And we have achieved stable long-term perfusion culture of two-step laminating of 3-layer human myocardial cell sheets for over six days by using the non-decellularized rat intestine vascular beds.

By using non-decellularized pig intestine planar vascular beds, we have succeeded in producing planar cardiac constructs, which could have independence beating and could measure 0.5mN of contractile force.

③ The optimization of media for organ perfusion

We have selected the Leibovitz's-15 (L-15) as basic media for perfusion culture under open air condition, and established basic perfusion media that enable stable long-term perfusion culture of the tubular tissues of small animals for over six days, and the planer cardiac constructs of large animals for over 15 days. And we have screened components of perfusion media, such as cytokines that would be suited to angiogenesis, and fatty acids that could be expected improvement of energy metabolism.

④ The establishment of the methods for stepwise laminating of cell sheets

We have developed and produced temperature-responsive culture dishes for production of many kinds of size and shape of cell sheets that would be necessary for manufacture of 3D cardiac constructs. We have performed the basic design for a circular cross-section device for attachment of human myocardial cell sheets with expansion and fold-back scheme.

⑤ The establishment of the function evaluation system for 3D cardiac constructs

We have developed the continuous automatic measuring device with disposable glucose and lactate sensors to enable us to evaluate metabolism in 3D cardiac constructs by using very small amount of perfusion media. We have also developed the Optical Coherence Tomography (OCT), which enables us to perform real-time observation of laminated state of myocardial cell sheets and beating of 3D cardiac constructs.

⑥ The establishment of the methods of transplantation and for 3D cardiac constructs

We have produced 3D planar cardiac constructs to perform perfusion culture of laminated co-culture of human myocardial and endothelial cell sheets with endothelial network structure on non-decellularized vascular beds using perfusion bioreactor. We have observed the binding of capillaries between the 3D planar cardiac constructs and the vascular beds. Moreover, we have transplanted 3D planar cardiac constructs to pig heart by vascular anastomosis, and verified resumption of the beating of the cardiac constructs after blood flow recanalization. It would prove

that in vitro 3D cardiac constructs with artery and vein could be functional in vivo.

In future, we would aim at realization of regenerative medicine for heart diseases using improvement of cardiac function and hemodynamics by measurement physically beating as index, ever before, to perform (1) establishment of continuous organ manufacturing process, (2) production of high-performance 3D cardiac constructs by further technology of laminating of cell sheets and optimization of perfusion conditions, and (3) improvement of cardiac function by further technology of transplantation of 3D cardiac constructs.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌1件）

1. Hiroyoshi Seta, Katsuhisa Matsuura, Hidekazu Sekine, Kenji Yamazaki, Tatsuya Shimizu, Tubular cardiac tissues derived from human induced pluripotent stem cells generate pulse pressure in vivo, *Scientific Reports*, 45499 (2017)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表（国内10件、国際5件）

1. 細胞シート貼付けのための円形断面バルーン機構，口頭，多田隈建二郎，高根英里，田中信行，原口裕次，長谷川明之，清水達也，大和雅之，岡野光夫，第55回日本生体医工学会，2016/4/27，国内.
2. 細胞シート技術を用いたヒト立体心筋組織構築のための灌流可能な血管網導入デバイスの開発，口頭，坂口勝久，第55回日本生体医工学会，2016/4/27，国内.
3. 循環補助を目指したチューブ状心筋組織の開発，口頭，関根秀一，第39回未来医学研究会2016/5/21，国内.
4. 3D組織への機能的血管網付与，口頭，清水達也，第37回日本炎症・再生医学会，2016/6/16，国内.
5. 臓器作製のための外部パルス加圧式バイオリアクターの開発，口頭，佐野和紀，関根秀一，小林英司，清水達也，第37回日本炎症・再生医学会，2016/6/17，国内.
6. 再生医療に向けた臓器創生，口頭，清水達也，第65回日本アレルギー学会学術大会，2016/6/19，国内.
7. *In vitro* fabrication of human cardiac tissues with porcine perfusable blood vessels，ポスター，Akitoshi Inui，Hidekazu Sekine，Kazunori Sano，Izumi Dobashi，Azumi Yoshida，Katsuhisa Matsuura，Eiji Kobayashi，Minoru Ono，Tatsuya Shimizu，Basic Cardiovascular Sciences Scientific Sessions 2016 (BCVS 2016)，2016/7/18～2016/7/21，海外
8. Development of novel bioreactor system with pulsatile pressurization for organ fabrication，ポスター，Kazunori Sano，Hidekazu Sekine，Kenji Izumi，Eiji Kobayashi，Tatsuya Shimizu，2016 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society- Asia Pacific Meeting (TERMIS-AP 2016)，2016/9/3～2016/9/6，海外
9. Pulsatile Myocardial Tube Fabrication Using Cell Sheet Technology，口頭，Tatsuya Shimizu，2016 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society- Asia Pacific Meeting (TERMIS-AP 2016)，2016/9/3～2016/9/6，海外
10. Development of Three-dimensional Cardiac Tissue Construct Using Decellularized Gastrointestine and Cell Sheet Technology，ポスター，Yusuke Tobe，Katsuhisa Sakaguchi，

Kazunori Sano, Hidekazu Sekine, Tatsuya Shimizu, Eiji Kobayashi, Mitsuo Umezu, Teruo Okano, 2016 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society- Asia Pacific Meeting (TERMIS-AP 2016) , 2016/9/3～2016/9/6, 海外

11. ブタ小腸血管床を用いた立体的ヒト心筋組織作製の試み, 口頭, 乾明敏, 関根秀一, 小野稔, 清水達也, 第 69 回日本胸部外科学会, 2016/9/30, 国内
12. Enhancement of blood vessel formation in prevascularized cell-dense tissues by growth factors administration, ポスター, Qin Zhang, Hidekazu Sekine, Izumi Dobashi, Azumi Yoshida and Tatsuya Shimizu, International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (ICBS2016) , 2016/11/28～2016/11/30, 国内
13. 動静脈付きヒト管状心筋組織の構築, 口頭, 佐野和紀, 関根秀一, 泉賢二, 松浦勝久, 小林英司, 清水達也, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2016/3/7, 国内
14. コラーゲン血管床を用いた立体心筋組織の構築, 口頭, 坂口勝久, 清水達也, 松浦勝久, 大和雅之, 梅津光生, 岡野光夫, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2016/3/8, 国内
15. *In vitro* における動静脈付きヒト心筋組織の構築, 口頭, 関根秀一, 乾明敏, 佐野和紀, 松浦勝久, 小野稔, 小林英司, 清水達也, 第 16 回日本再生医療学会総会, 2016/3/9, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. ティッシュエンジニアリングによる心筋再生医療の現状と展望, 清水達也, 東京女子医科大学先端生命医科学研究所：高田高等学校（三重県津市）来所時, 2016/7/26, 国内.
2. ティッシュエンジニアリングによる心筋再生医療の現状と展望, 清水達也, 東京女子医科大学先端生命医科学研究所：テルモサイエンスカフェ開催時, 2016/8/5,6, 国内.
3. ティッシュエンジニアリングによる心筋再生医療の現状と展望, 清水達也, 東京女子医科大学先端生命医科学研究所：JST さくらサイエンスプラン訪日団（ベトナム、インドネシア）来所時, 2016/11/28, 国内.
4. ティッシュエンジニアリングによる心筋再生医療の現状と展望, 清水達也, 東京女子医科大学先端生命医科学研究所：JST さくらサイエンスプラン訪日団（中国）来所時, 2016/12/7, 国内.
5. ティッシュエンジニアリングによる心筋再生医療の現状と展望, 清水達也, 東京女子医科大学先端生命医科学研究所：京都市立西京高等学校附属中学校来所時, 2017/1/25, 国内.

(4) 特許出願

該当無し