

■受領No.1464

肺循環補助を目指した拍動心筋組織付き人工血管グラフト開発

代表研究者

松浦 勝久

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 准教授



Development of artificial blood vessel graft with pulsatile cardiac tissue for the pulmonary circulation support

Principal Researcher

Katsuhisa Matsuura,

Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, Associate Professor

循環を補助する心筋組織の作製には、心筋組織の収縮・弛緩機能の向上が不可欠である。そこで本研究では、拍動する管状心筋組織への応用を目指し、配向を制御した心筋組織の収縮・弛緩機能およびその機序について検討を行った。ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を逆 V 字型に微細加工したフィブリンゲル上に播種することで、配向の揃った心筋組織を作成することに成功した。配向した心筋組織は一方向性かつ同期的収縮性の向上により、収縮・弛緩機能が向上することが明らかとなった。

To create cardiac tissue for assisting circulation, it is essential to improve the contractile and relaxation functions of myocardial tissue. In this study, we investigated the contraction/relaxation function and mechanism of alignment-controlled cardiac tissue with the aim of applying it to tubular myocardial tissue fabrication. By seeding human iPS cell-derived cardiomyocytes on inverted V-shaped micro-processed fibrin gel, we succeeded in fabricating aligned cardiac tissue. The aligned cardiac tissue showed improved contractile and relaxation functions through unidirectional and synchronous contraction.

1. 研究内容

組織工学を用いたヒト多能性幹細胞由来心筋組織は、再生医療や疾患・創薬研究への応用が世界中で進められている。本研究は、拍動によって肺循環補助を可能とする移植用心筋組織の開発を目指すものであり、そのためには心筋組織の機能向上が不可欠である。心臓においては、収縮弛緩機能を担う心筋細胞の向きが揃ったレイヤー状の組織が少しずつ向きを変え層状に重なることで、効率的な拍出を生み出すことに寄与すると考えられている。そこで移植用心筋組織内の心筋細胞の配向制御による収縮弛緩機能への影響とその機序について検討を行った。

ヒト iPS 細胞より我々独自の 3 次元浮遊攪拌懸濁培養によって心筋細胞へ分化誘導し、心筋細胞の純化を行った。フローサイトメトリー法を用いた心筋細胞の純度解析は、分化および純化後の心筋トロポニン T 陽性細胞は約 89%であった。またこれまでの我々の検討より、純化後の非心筋細胞は、心臓由来線維芽細胞に特性が類似した線維芽細胞様細胞であることが明らかとなっている (Biomaterials. 166(2018)109-121)。また心臓線維芽細胞は、心筋細胞の増殖を促すなど、心筋組織の機能的向上に寄与することも報告しており (Biomaterials. 32(2011)7355-7362)、Regen Ther. 4(2016)92-102)、心筋細胞と線維芽細胞様細胞を

用いることで、より機能的な心筋組織の構築が可能と考えられる。

次に心筋細胞の配向を可能にする培養基材表面の開発を行った。心筋細胞を単に培養皿上で培養するだけでは配向せず、またプラスチック製の培養皿の接着し培養された状態では、心筋組織としての収縮・弛緩機能を評価することは困難である。我々はこれまでにフィブリングル上で心筋細胞を培養し、独自の張力測定システムを用いることで、心筋組織の収縮・弛緩機能評価を実現してきた。そこで本研究では、心筋細胞の配向制御を可能にするフィブリングルを作成することで、心筋細胞の配向と収縮・弛緩機能の関係性を評価することとした。微細加工したシリコンウェハを用いて熱プリントしたシクロオリフェンポリマーを鋳型としてストライプ上に V 字型の溝を有するポリジメチルシロキサンを作成し、その上にフィブリンを塗布することで逆 V 字型の隆起を有する微細加工フィブリングルを作成した (図 1)。またヒト iPS 細胞由来心筋細胞の直径は約 26 マイクロメートルであることから、微細加工フィブリングル上の逆 V 字型の隆起の高さは 10 マイクロメートル、隆起間距離は 30 マイクロメートルにデザインした。

微細加工したフィブリングル上にヒト iPS 細胞由来心筋細胞を播種したところ、加工処理なしのフィブリングル上へ播種した心筋細胞に比して有意に配向度が向上した (図 2)。フーリエ解析を用いて算出した配向度の指標である orientation index は、加工処理なしフィブリングル上で培養した心筋細胞で 1.15、微細加工したフィブリングル上で培養した心筋細胞で 1.5 であり、成体ラット心臓の配向度が 1.6 であることから、生体に近い配向度を有する心筋組織の作成が可能となったと考えられる。さらに配向心筋組織の収縮・弛緩機能を評価したところ、自律拍動下および電気刺激による 75ppm、120ppm での拍動状態においても、非配向心筋組織に比して有意に張力、最大収縮速

度および最大弛緩速度の向上が認められた (図 3)。さらに、 β 受容体刺激剤であるイソプロテレノールの添加によって、非配向心筋組織および配向心筋組織のいずれにおいて有意な自律拍動数、収縮機能、弛緩機能の向上が認められた一方、弛緩速度の変化率は、配向心筋組織において有意の大きいことも明らかとなった。

次に、配向心筋組織の収縮・弛緩機能向上の機序について検討した。MYL2、MYH6 などの収縮タンパクや RYR2 等の細胞内カルシウム制御遺伝子および GJA1 などのギャップジャンクション遺伝子の発現は、分化誘導直後に比して、非配向心筋組織および配向心筋組織で有意に上昇が認められたが、配向および非配向心筋組織間で大きな違いは認められず、個々の心筋細胞の成熟化の関与は少ないと考えられた。一方で、心筋組織内の心筋細胞の収縮の向きおよびタイミングを画像解析にて評価したところ、配向心筋組織内の心筋細胞は、非配向心筋組織に比して配向を制御した向きに一方向性の収縮を示すとともに、心筋組織内の心筋細胞の収縮のタイミングのずれが有意に小さいことが明らかとなった (図 4)。すなわち、心筋組織の機能向上には、個々の心筋細胞が一方向性に協調的に機能するための適切な環境が必要であることが示唆される。

最後に、非配向心筋組織と配向心筋組織のグルコース消費量および乳酸産生量を比較したところ、両群で差を認めなかった。したがって、配向心筋組織では非配向心筋組織に比して、同じグルコース消費量で 2 倍以上の張力を生み出すと考えられる。

以上より、心筋細胞の配向制御により、より機能的な心筋組織の構築が可能と考えられる。本知見を基盤として、現在配向心筋シートの積層化による力学的評価を進めており、肺静脈への循環補助を可能にする心筋組織開発が加速するものと考えられる。

Bioengineered human pluripotent stem cell-derived cardiac muscle tissue is being applied worldwide for regenerative medicine and disease and drug discovery research. This study aims to develop transplantable pulsatile cardiac tissue that can assist pulmonary circulation. In the heart, it is believed that layered tissues with aligned cardiac cells, which are responsible for the contraction-relaxation function, gradually change their orientation and overlap in layers, thereby contributing to the generation of efficient beating. Therefore, we investigated the effect on the contractile and relaxation function and its mechanism by controlling the alignment of cardiomyocytes in the cardiac tissue for transplantation.

We induced cardiomyocyte differentiation from human iPS cells into cardiomyocytes by our original 3D suspension culture system and purified the cardiomyocytes. The purity of cardiomyocytes analyzed by flow cytometry showed that the percentage of cardiac troponin T-positive cells after differentiation and purification was approximately 89%. Our previous studies have also shown that non-cardiac myocytes after that purification are fibroblast-like cells whose characteristics are similar to heart-derived fibroblasts (Biomaterials. 166(2018)109-121). Cardiac fibroblasts have also been reported to contribute to the functional enhancement of cardiac tissue, such as promoting cardiomyocyte proliferation (Biomaterials. 32(2011)7355-7362), Regen Ther. 4(2016)92-102), and the use of cardiomyocytes and fibroblast-like cells may enable the construction of more functional cardiac tissue.

Next, we developed a culture substrate surface that enables the alignment of cardiomyocytes.

Cardiomyocytes cannot be aligned simply by culturing them on a culture dish, and it is difficult to evaluate their contractile and relaxing functions as cardiac tissue when they are adhered to and cultured on a plastic culture dish. Recently we have developed the cardiac tissue contractile measurement system that enables to directly evaluate the contractile and relaxation function of cardiomyocytes cultured on fibrin gel. In this study, we evaluated the relationship between the alignment of cardiomyocytes and their contractile/relaxation functions by preparing fibrin gels that enable the alignment control of cardiomyocytes. We prepared polydimethylsiloxane with V-shaped grooves on the stripes using a thermos-printed cyclo-oleiphene polymer as a template on a micro-processed silicon wafer, and applied fibrin on it to create a micro-processed fibrin gel with inverted V-shaped ridges (Figure 1). Since the diameter of human iPS cell-derived cardiomyocytes is approximately 26 micrometers, the height of the inverted V-shaped ridges on the micro-processed fibrin gel was designed to be 10 micrometers and the distance between the ridges was 30 micrometers.

Seeding of human iPS cell-derived cardiomyocytes on micro-processed fibrin gel significantly improved the alignment of the cardiomyocytes compared to those seeded on non-micro-processed fibrin gel (Figure 2). The orientation index, an index of orientation calculated by Fourier analysis, was 1.15 for cardiomyocytes cultured on non-micro-processed fibrin gel and 1.5 for cardiomyocytes cultured on micro-processed fibrin gel. Since the orientation index of the adult rat heart was 1.6, it is now possible to create cardiac tissue with a degree of alignment similar to that of living tissue. When the contractile and relaxing functions of the aligned cardiac tissue were evaluated, significant increases

in contractile force, maximal contraction velocity, and maximal relaxation velocity were observed compared to the non-aligned cardiac tissue, both under spontaneous beating rate and at 75ppm and 120ppm on the electrical pacing (Figure 3). Furthermore, the treatment with isoproterenol, a β -receptor stimulator, significantly increased the spontaneous beating rate, contractile function, and relaxation function in both non-aligned and aligned cardiac tissue, while the rate of change in relaxation velocity was significantly greater in aligned cardiac tissue.

Next, we examined the mechanism of the improvement of contractile and relaxation functions in aligned cardiac tissues. mRNA expression levels of contractile proteins such as MYL2 and MYH6, intracellular calcium-regulated proteins such as RYR2, and gap junction proteins such as GJA1 were significantly increased in non-aligned and aligned cardiac tissues compared to cells immediately after differentiation induction. However, no significant differences were observed between non-aligned and aligned cardiac tissues, suggesting that the maturation of individual cardiomyocytes might be less involved. On the other hand, when the direction and timing of contraction of cardiomyocytes in the cardiac tissue were evaluated by the motion capture analysis, it was found that cardiomyocytes in aligned cardiac tissue exhibit unidirectional contraction in a controlled orientation relative to non-aligned cardiac tissue. The timing of contraction at five designated points varied in non-aligned cardiac tissue, but cells in aligned cardiac tissues showed synchronous contraction (Figure 4). Furthermore, the standard deviation of the time from the beginning of measurement to first peak contraction at these 5 points was significantly

smaller in aligned cardiac tissues than that in the nonaligned cardiac tissue, suggesting that the improvement of contractile force in aligned cardiac tissue might be in part mediated by synchronous cardiomyocyte contraction.

Finally, we evaluated the changes in glucose and lactate concentrations in the supernatant after incubation for 48 h. No significant differences were observed in glucose consumption and lactate production between the two groups. However, the aligned cardiac tissues had more than twice the impulse per glucose consumption that of the nonaligned cardiac tissue. This suggests that aligned cardiac tissues generated greater contractile force with similar glucose consumption.

Based on the above, it is considered possible to construct more functional myocardial tissue by controlling the orientation of cardiomyocytes. Based on these findings, we are currently evaluating the mechanical properties of layered aligned cardiac cell sheets, which will accelerate the development of myocardial tissue that can be used to assist circulation to the pulmonary vein.

研究成果概要図

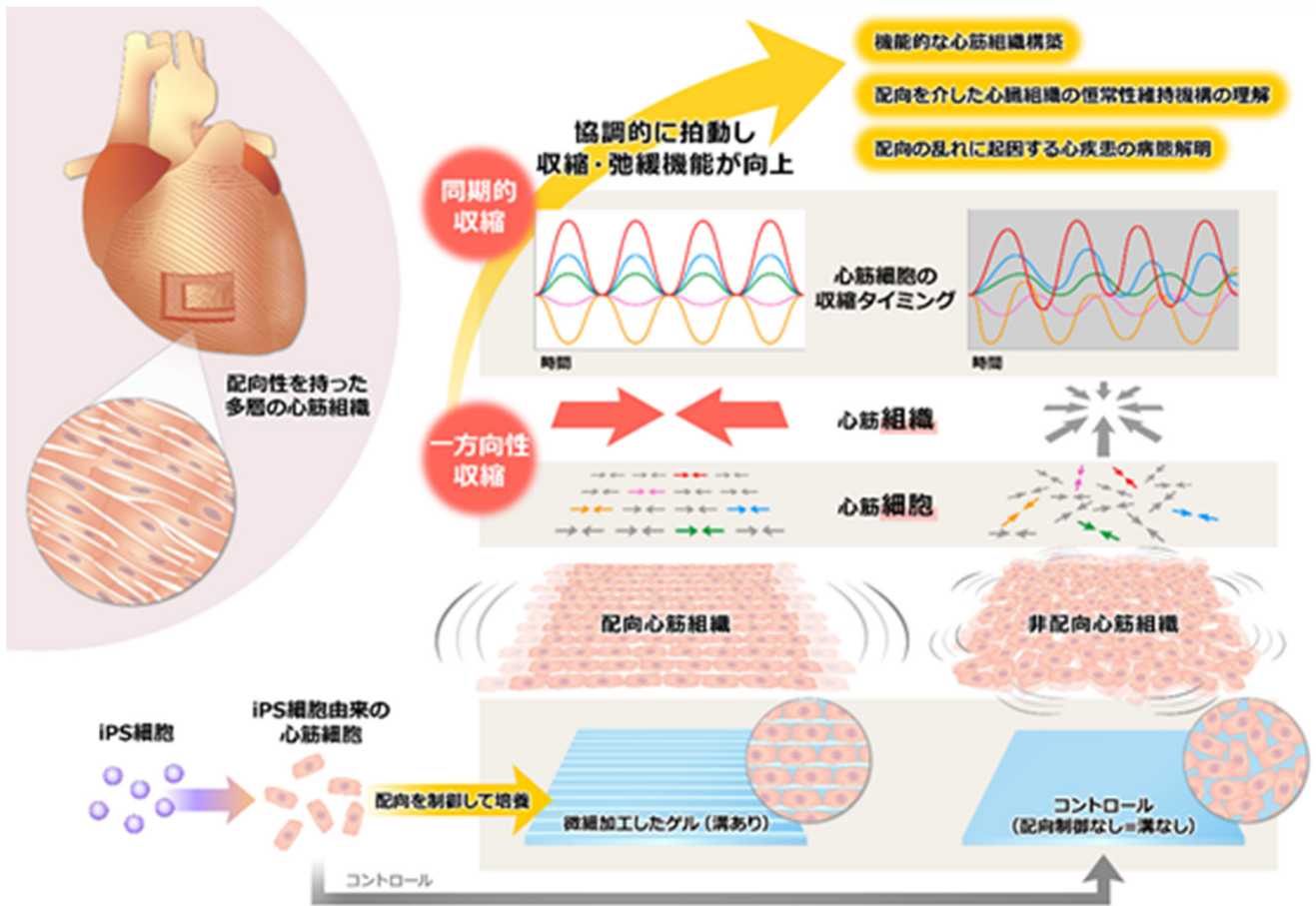
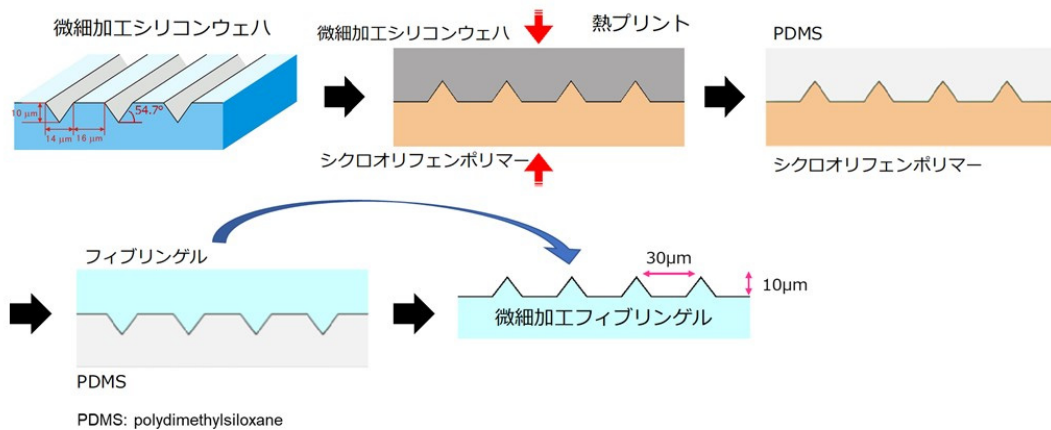


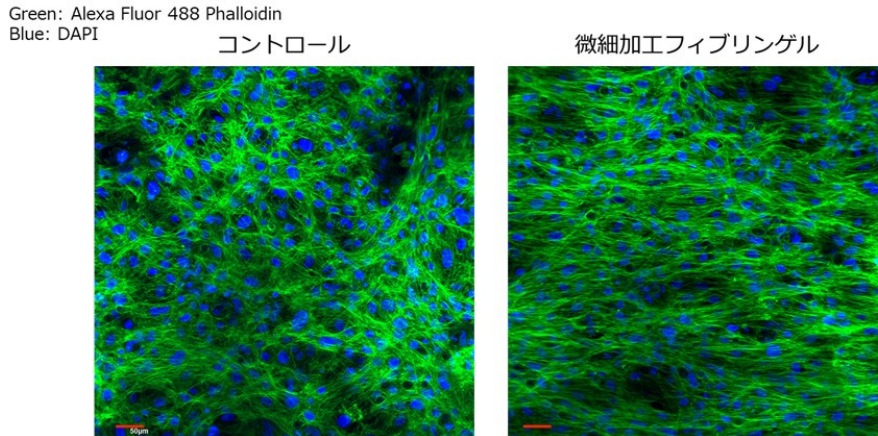
図1



微細加工フィブリンゲル作成方法

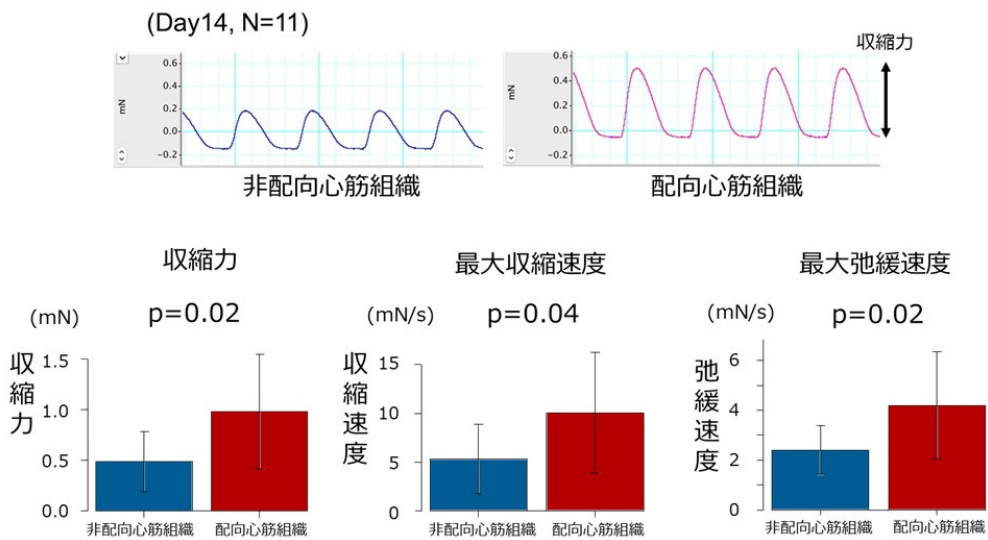
微細加工したシリコンウェハを用いて熱プリントしたシクロオリフェンポリマーを鋳型としてストライプ上にV字型の溝を有するPDMSを作成し、その上にフィブリンを塗布することで微細加工フィブリンゲルが作成される。

図2



心筋組織の配向度評価 (緑：アクチン、青：核)
 微細加工フィブリンゲルと非加工フィブリンゲル(コントロール)にヒトiPS細胞由来心筋細胞を播種後7日目の染色画像。微細加工フィブリンゲル上の心筋細胞は、コントロールに比して一方向性に配列していることが観察される。

図3

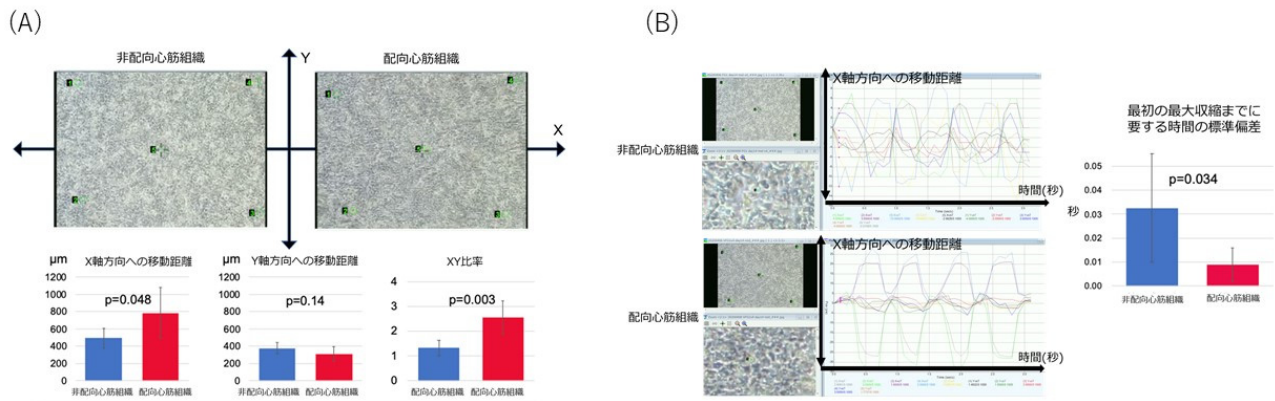


心筋組織の機能評価

(上段)配向心筋組織と非配向心筋組織の張力の代表的画像

(下段)配向心筋組織では、非配向心筋組織に比して収縮力、最大収縮速度および最大弛緩速度が有意に向上する。

図4



配向心筋組織の機能向上の機序

(A)心筋組織の端の4点における収縮の方向性の移動距離を用いて評価すると、配向心筋組織の心筋細胞はX軸方向に有意に移動している。

(B)心筋組織の端の4点および中心における収縮のタイミングを評価すると、配向心筋組織では心筋細胞の収縮タイミングのずれが有意に少ない。

2. 発表 (研究成果の発表)

1) Takada T, Sasaki D, Matsuura K, Miura K, Sakamoto S, Goto H, Ohya T, Iida T, Homma J, Shimizu T, Hagiwara N. Aligned human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue improves contractile properties through promoting unidirectional and synchronous cardiomyocyte contraction.

Biomaterials.30;281:121351, 2021

2) 松浦勝久 iPS 心筋組織を用いた肥大型心筋症の病態理解と新規治療法への期待 東京 HOCM フォーラム 2021 in 札幌 (教育講演、オンライン、2021年)

3) Takuma Takada, Katsuhisa Matsuura. Cardiomyocyte alignment control promotes the electrical integration and improves the contractile function of human cardiac tissue. American Heart Association Sessions 2021 (オンライン、2021年)

4) 松浦勝久 多能性幹細胞由来心筋組織の配向制御に挑む 第21回日本再生医療学会総会 (シンポジウム、オンライン、2022年)

5) Takuma Takada, Katsuhisa Matsuura. New insights on the pathophysiology of non-genetic heart disease. The 86th Annual Scientific Meeting

of the Japanese Circulation Society SS16. New developments of iPS cell research (特別セッション、オンライン、2022年)