The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on Fabrication of 3D-Engineered Cardiac Tissues with Living Tissue Like Structure Using Cell and Extracellular Environment Manipulation Technique
Author(s)	塚本, 佳也
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72627
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　塚本　　佳也　　）	
論文題名	Studies on Fabrication of 3D-Engineered Cardiac Tissues with Living Tissue Like Structure Using Cell and Extracellular Environment Manipulation Technique （生体外細胞操作と細胞外環境制御による生体組織類似構造を有する三次元心筋組織構築の研究）

論文内容の要旨

近年、再生医療や創薬分野では、単層培養細胞よりもより高い機能や生体組織に近い性質を発現することができる三次元組織の構築が大きく着目されている。この三次元組織を構築するために、細胞・足場・成長因子を三要素として、三次元組織構築を行う組織工学の分野が全世界で研究が進められている。細胞はヒトiPS細胞などの幹細胞、足場は細胞外マトリックス（ECM）や人工材料、成長因子はサイトカインといったものがそれぞれ利用されている。これらの要素を組み合わせることにより、単層培養の細胞よりも生体に類似した構造や機能を有する三次元組織の構築法が開発されている。

心臓の再生医療については、iPS由来心筋細胞や三次元化した組織体を用いた細胞移植の研究が進められているが、臓器特異的な構造や組織の大きさが不十分であることから、心臓の動きを補完するほどの治療効果は得られていない。また、創薬研究においては、心毒性評価が重要であるとされているが、従来までの単層培養細胞では生体内と環境が異なるため、in vitroで正確に心毒性を評価することが困難である。これらのことから、臓器特異的な構造を有する三次元心筋組織の構築が求められている。

本論文では、交互積層法（layer-by-layer：LbL法）を用いた細胞表面へのECM薄膜コーティング技術による三次元組織構築と三次元造形技術である3Dプリンターを用いて臓器特異的構造を有する三次元組織の構築及び組織外環境の制御を行うことによる高機能三次元心筋組織の構築を目的として研究を行った。

初めに、LbL法による三次元組織構築法で心臓組織特異的構造である配向構造という細胞の伸展方向が一方向にそろった構造を制御することが可能であるか取り組んだ。3Dプリンターを用いて感熱応答性高分子であるHydroxybutyl chitosan (HBC)による組織形状を制御するためのフレームを造形し、そのフレーム内部でLbL法による三次元組織の構築を行った。その結果、フレーム付近で細胞の方向性が制御され、組織の形状を細長いライン状に制御することによって、三次元組織全体で配向構造を有することが明らかとなった。

次に、iPS細胞由来心筋細胞を用いて配向構造を有する三次元心筋組織の構築に取り組んだ。上記のように、iPS由来心筋細胞による組織構築においても細長いライン状に組織の形状を制御することによって、配向構造を有する三次元組織を構築することが達成できた。さらに、粒子画像流速測定法（PIV法）を用いた動画解析による心筋組織の拍動について評価を行った結果、配向構造を有することによって三次元心筋組織の収縮能力が向上する結果が示された。また、ここに血管内皮細胞を共培養することによって、配向構造及び毛細血管網を有する生体組織に極めて類似した構造を有する三次元心筋組織の構築を達成した。

続いて、組織外環境の制御を行うことによる高機能三次元心筋組織の構築に取り組んだ。生体高分子であるコラーゲンを用いて、培養容器を作製し、その上でiPS細胞由来心筋細胞を用いてLbL法による三次元心筋組織の構築を行った。その結果、従来までのプラスチック基板上で構築した三次元心筋組織に比べ、数十倍もの拍動挙動の向上が見られ、肉眼で拍動が確認されるほど大きな収縮能力が得られていることが明らかとなった。また、薬剤評価を行うことによって、大きな拍動を有していることから、薬剤添加による拍動の変化の検出性が向上する結果が得られた。さらに、コラーゲン製の培養容器を利用した灌流培養を行うことによって、厚みのある組織への応用の可能性や三次元心筋組織をさらに成形することによって袋状の三次元心筋組織を構築することによってミニ心臓モデルの構築への可能性が示された。

以上、本研究では生体類似構造を有する三次元心筋組織の構築及び細胞外環境制御による高機能三次元心筋組織の構築について取り組み、その有用性及び発展性を示した。本研究は、in vitroでの組織構築による、細胞や組織の機能解明といった基礎研究だけでなく、再生医療及び創薬研究といった応用研究への幅広い領域に対しての新たな知見を与えるものであり、組織工学を活用した次世代医療、創薬研究開発に大きく寄与するものと期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　塚本　佳也　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
主 査	特任教授	明石　満
副 査	教授	石井　優
副 査	教授	石島　秋彦
副 査	特任教授	宮川　繁
副 査	教授	中村　真人

論文審査の結果の要旨

申請者は生体外細胞操作と細胞外環境制御による生体組織類似構造を有する3次元心筋組織の構築を行った。再生医療や創薬研究では、単層培養細胞よりも生体に類似した構造や機能を有する3次元組織が求められている。そこで本研究では、layer-by-layer (LbL)法による細胞コーティング法を基盤技術として、立体造形技術や生体材料を用いた組織構築法の開発を行った。その結果、立体造形技術を用いた3次元組織の形状制御を行うことにより、心筋組織特異的構造である配向構造及び血管網構造を有する3次元心筋組織の構築を達成した。また、生体材料であるコラーゲンゲルを用いた組織周囲の環境制御によって、収縮能力が向上した3次元心筋組織の構築が達成され、さらには、ミニ心臓モデルの構築への応用が示された。

以上の成果は、細胞や組織の機能解明をはじめ、再生医療及び創薬研究といった応用研究に大きく寄与するものと期待されるものであり、学位授与に値するものと認める。