

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-101015

(P2017-101015A)

(43) 公開日 平成29年6月8日(2017.6.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/34 (2015.01)	A 6 1 K 35/34	4 C 0 8 1
A 6 1 K 35/44 (2015.01)	A 6 1 K 35/44	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	4 C 0 9 7
A 6 1 K 35/50 (2015.01)	A 6 1 K 35/50	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-117855 (P2016-117855)	(71) 出願人	511155187 株式会社サイフューズ 東京都文京区本郷七丁目3番1号 東京大 学アントレプレナープラザ
(22) 出願日	平成28年6月14日 (2016.6.14)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(31) 優先権主張番号	特願2015-229348 (P2015-229348)	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(32) 優先日	平成27年11月25日 (2015.11.25)	(74) 代理人	100149010 弁理士 星川 亮
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト心臓様構造体およびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】心臓型スフェロイド及び心臓型構造体並びにこれらの製造方法の提供。

【解決手段】ヒト心筋細胞とヒト線維芽細胞とヒト血管内皮細胞とを混合し凝集させたヒト心臓型スフェロイド。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト心筋細胞とヒト心臓線維芽細胞とヒト血管内皮細胞とを混合し凝集させたヒト心臓型スフェロイド。

【請求項 2】

ヒト心筋細胞とヒト心臓線維芽細胞とヒト血管内皮細胞との混合比が12000～15000：15000～18000：3000～4500である請求項 1 に記載のスフェロイド。

【請求項 3】

ヒト心筋細胞がiPS細胞由来のものである請求項 1 又は 2 に記載のスフェロイド。

【請求項 4】

ヒト心臓線維芽細胞がヒトiPS細胞由来の心臓線維芽細胞である請求項 1～3のいずれか 1 項に記載のスフェロイド。

【請求項 5】

ヒト血管内皮細胞がヒト動脈血管内皮細胞である請求項 1～4のいずれか 1 項に記載のスフェロイド。

【請求項 6】

請求項 1～5のいずれか 1 項に記載のスフェロイドに、さらにヒト羊膜由来間葉系幹細胞を融合させたヒト心臓型融合体。

【請求項 7】

請求項 1～5のいずれか 1 項に記載のスフェロイド又は請求項6に記載の融合体を積層することを特徴とする心臓様三次元構造体の製造方法。

【請求項 8】

スフェロイド又は融合体の積層は、スフェロイド又は融合体を針状体に突き刺すことにより行われるものである請求項 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト心臓スフェロイドからヒト心臓様構造体を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

脊椎動物において、心臓は循環系の血管を通じて血液を循環させるポンプとして働く。心血管疾患による世界の死亡率は、2008年時点で全死亡率の30%を占める。心血管疾患の中で、心筋梗塞と虚血性心疾患は心筋壊死を引き起こし、心臓線維芽細胞の増殖とリモデリングを生じる。この結果、左室駆出力低下により血液ポンプとしての機能を低下し、最終的に心不全による死を引き起こす。重症心不全における治療法は根本的には心臓移植であるが、心臓移植はドナーが圧倒的に不足しており現実的な手段ではない。

従来、心臓移植までの待機期間の代替措置として補助人工心臓が開発・実用化されている。しかしながら、補助人工心臓はサイズが大きく、患者の日常生活が制限される。また、再生医療等製品としては、テルモの「ハートシート[ヒト(自己)骨格筋由来細胞シート]」が2015年9月18日に期限付き承認された。ハートシートはパラクライン効果により心機能の改善が期待できるが、減少した心筋細胞を直接的に補充することはできず、ポンプ機能を再生するには不十分であった。従って、心筋細胞を直接補充することで、心臓の機能を再生する細胞治療製品が求められていた。

心筋細胞を補充する方法として2つの考え方があり、一つは、間葉系幹細胞(MSC)等の未分化細胞を移植し体内で心筋細胞に分化させるやり方で、もう一つは、ヒトiPS細胞を心筋に分化させてから移植する方法である。ヒトiPS由来心筋細胞の移植はiPS細胞の実用化として期待されているが、ヒトへの臨床応用例はまだない。更に、300µm以上の厚みを持った心臓様組織を一度に作製する手段はなく、ポンプ機能を再建し得る大量の心筋細胞

10

20

30

40

50

胞を組織として効率よく移植し生着させる技術の開発が待たれていた。

他方、細胞の立体構造体の製造方法として、針状体又は糸状体にスフェロイドを積層する技術が知られており（特許文献1：WO2008/123614）、この技術を利用して心臓又は血管の構築が試みられている（特許文献2：WO 2014/141528）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】国際公開第2008/123614号

【特許文献2】国際公開第2014/141528号

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

前記細胞の立体構造体の製造技術を利用して心臓構造体を構築するに際し、実際の心臓の機能を模倣できるよう、さらなる改良が望まれている。そこで本発明は、ヒト心臓由来細胞を用いて、細胞同士の積極的な心臓組織化により、心筋細胞による拍動の伝搬や血管内皮細胞の血管網形成などを引き起こし、一度に300 μ m以上の厚みある構造体を構築する為の方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記課題を解決する為、本発明者は、心臓組織として機能する細胞組成を検討するとともに、「細胞の立体構造体の製造方法（特許文献1：WO2008/123614A）」に基づく細胞凝集体の積層方法をバイオ3Dプリンターを使用して鋭意研究した。その結果、ヒトiPS由来心筋細胞、ヒト心臓線維芽細胞及びヒト血管内皮細胞の混合物を用いることにより、生体内でのヒト心臓に類似した機能を持つ構造体の作製に成功し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は以下の通りである。

20

(1) ヒト心筋細胞とヒト心臓線維芽細胞とヒト血管内皮細胞とを混合し凝集させたヒト心臓型スフェロイド。

(2) ヒト心筋細胞とヒト心臓線維芽細胞とヒト血管内皮細胞との混合比が12000～15000：15000～18000：3000～4500である(1)に記載のスフェロイド。

(3) ヒト心筋細胞がiPS細胞由来のものである(1)又は(2)に記載のスフェロイド

30

(4) ヒト心臓線維芽細胞がヒトiPS細胞由来の心臓線維芽細胞である(1)～(3)のいずれか1項に記載のスフェロイド。

(5) ヒト血管内皮細胞がヒト動脈血管内皮細胞である(1)～(4)のいずれか1項に記載のスフェロイド。

(6) 前記(1)～(5)のいずれか1項に記載のスフェロイドに、さらにヒト羊膜由来間葉系幹細胞を融合させたヒト心臓型融合体。

(7) 前記(1)～(6)のいずれか1項に記載のスフェロイド又は(7)に記載の融合体を積層することを特徴とする心臓様三次元構造体の製造方法。

(8) スフェロイド又は融合体の積層は、スフェロイド又は融合体を針状体に突き刺すことにより行われるものである(7)に記載の方法。

40

【発明の効果】

【0006】

本発明により、ヒト心臓型スフェロイド及びヒト心臓構造体並びにその製造方法が提供される。本発明の方法により製造された組織及び構造体は、生体内の心機能に類似した拍動能および構造を有しており、心臓の機能を補い得る生物由来の人工心臓組織として使用することができる。用途として、直接心臓に移植する方法のほか、心臓から拍出される血液の流れを補う補助ポンプとして、血管周囲に構造体を留置し、その血流を促進させることもできる。従って、本発明は、再生医療の多様な用途に利用できる点で極めて有用であ

50

る。又、生体内の心機能に似た構造体として医薬品開発の評価系（有効性評価の探索、或いは心臓毒性の安全性評価）として利用できる点でも心筋細胞単独での評価系による技術以上に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】ヒト心臓型スフェロイドの写真である。

【図2】ヒト心臓型スフェロイドの融合体を作製する工程の概念図である。

【図3】ヒト心臓型スフェロイドにヒト羊膜由来間葉系幹細胞を混合して拍動する融合体を作製する工程の概念図である。

10

【図4A】ヒト心臓型スフェロイドを用いて、300又は400 μ mピッチの剣山で構造体を作製する工程の概念図である。

【図4B】ヒト心臓構造体の免疫組織染色の結果を示す図である。

【図4C】ヒト心臓構造体の免疫組織染色の結果を示す図である。

【図4D】ヒト心臓構造体の血管内皮細胞を、連続切片で免疫染色した結果を示す図である。

【図4E】ヒト心臓構造体のHematoxylin-Eosin(HE)染色の結果を示す図である。

【図5A】ヒト心臓型スフェロイドにヒト羊膜由来間葉系幹細胞を混合して、400 μ mピッチの剣山で構造体を作製する概念図である。

【図5B】羊膜由来間葉系幹細胞を含むヒト心臓構造体の免疫組織染色の結果を示す図である。

20

【図5C】羊膜由来間葉系幹細胞を含むヒト心臓構造体の免疫組織染色の結果を示す図である。

【図6】ヒト心臓構造体を作製後、長期間拍動率を観察した図である。

【図7】心臓様構造体を作製する工程の二例を示す図である。

【図8A】賽子状心臓様構造体の動きを測定した結果を示すグラフである。

【図8B】賽子状心臓様構造体の動きを測定した結果を示すグラフである（収縮速度と弛緩速度の動きを1区切りとして、波形を重ねたもの）。

【図8C】賽子状心臓様構造体にROIの領域を設定したことを示す模式図および写真である。

30

【図8D】賽子状心臓様構造体の33 ~ 41 での拍動率を評価した結果を示す図である。

【図8E】賽子状心臓様構造体の33 ~ 41 での収縮速度と弛緩速度を評価した結果を示す図である。

【図8F】blebbistatin添加群とcontrol群で賽子状心臓様構造体の拍動率を比較したグラフである。

【図9A】賽子状心臓様構造体と心臓様スフェロイドの拍動率を測定した結果を示すグラフである。

【図9B】賽子状心臓様構造体と心臓様スフェロイドについて90%の耐久時間（APD90）を測定した結果を示すグラフである。

【図9C】賽子状心臓様構造体の活動電位チャートである。

40

【図9D】賽子状心臓様構造体の活動電位チャートである。

【図9E】賽子状心臓様構造体の活動電位チャートである。

【図9F】賽子状心臓様スフェロイドの活動電位チャートである。

【図9G】賽子状心臓様スフェロイドの活動電位チャートである。

【図9H】賽子状心臓様スフェロイドの活動電位チャートである。

【図10A】スフェロイド（スフェロイド数 1）及びスフェロイド融合体（スフェロイド数 2~16）の光学顕微鏡写真及び蛍光顕微鏡写真である。

【図10B】パッチ状心臓様構造体（スフェロイド数 81）の光学顕微鏡写真及び蛍光顕微鏡写真である。

【図11】共焦点レーザー走査顕微鏡で観察したパッチ状心臓様構造体を2分割し、工学

50

顕微鏡と蛍光顕微鏡で観察した写真である。

【図12A】パッチ状心臓様構造体の共焦点レーザー走査顕微鏡写真である。

【図12B】パッチ状心臓様構造体の再構成した3次元画像である。

【発明を実施するための形態】

【0008】

以下、本発明について詳細に説明する。本発明の範囲はこれらの説明に拘束されることはなく、以下の例示以外についても、本発明の趣旨を損なわない範囲で適宜変更し実施し得る。なお、本明細書に記載した全ての文献及び刊行物は、その目的にかかわらず参照によりその全体を本明細書に組み込むものとする。また、本明細書は、本願の優先権主張の基礎となる日本国特許出願である特願2015-229348号(2015年11月25日出願)の特許請求の範囲、明細書、および図面の開示内容を包含する。

10

本発明は、ヒト心筋細胞とヒト線維芽細胞とヒト血管内皮細胞とを混合し凝集させたヒト心臓型スフェロイドである。また本発明は、このスフェロイドを積層することを特徴とする心臓様三次元構造体の製造方法である。

【0009】

1. ヒト心臓型スフェロイド

本発明においては、ヒト由来の心筋細胞と、ヒト由来の線維芽細胞と、ヒト由来の血管内皮細胞とを共培養することにより、これらの細胞が凝集したスフェロイドを作製する。作製されたスフェロイドには心筋細胞種が含まれているため、このスフェロイドを「ヒト心臓型スフェロイド」という。但し、本明細書では単に「心臓スフェロイド」又は「スフェロイド」ともいう。

20

本発明において使用する心筋細胞は、ヒト由来の細胞であり、生検された細胞、市販の凍結細胞、ES細胞、iPS細胞などを用いることができる。また、生体由来細胞から試薬、遺伝子、mRNA、microRNA等を用いて分化誘導させた心筋細胞などを用いることもできる。本発明においては、ヒトiPS細胞由来の心筋細胞であることが好ましい。

本発明において用いられる線維芽細胞は、ヒト由来の細胞であり、特に限定されるものではないが、ヒト由来の線維芽細胞であることが好ましい。例えば、ヒト由来の心臓線維芽細胞、ヒトiPS細胞由来心臓線維芽細胞などが挙げられる。

本発明において用いられる血管内皮細胞は、ヒト由来の血管内皮細胞であり、特に限定されるものではないが、ヒト由来の臍帯静脈内皮細胞、動脈血管内皮細胞(例えば冠状動脈血管内皮細胞)、心臓由来血管内皮細胞であることが好ましい。

30

【0010】

本発明において、心臓スフェロイドを作製するための細胞の混合比は、ヒト心筋細胞：ヒト線維芽細胞：ヒト血管内皮細胞が12000～15000：15000～18000：3000～4500、好ましくは15000：15000：3000である。すなわち、ヒト心筋細胞：ヒト線維芽細胞：ヒト血管内皮細胞＝8～10：10～12：2～3であり、5：5：1の細胞比とすることが好ましい。ここで、心筋細胞の培地中の濃度は、 1×10^6 個/ml～ 2×10^5 個/ml、好ましくは 7.5×10^4 個/mlとすることができ、この細胞数に対して、上記比率となるように線維芽細胞及び血管内皮細胞を調整し、混合する。

【0011】

40

ここで「混合」とは、心筋細胞、線維芽細胞及び血管内皮細胞が接触してスフェロイドを形成し得る状況になれば特に限定されるものではなく、例えば、(i)それぞれの細胞の細胞懸濁液を他の1つの容器に入れて混合する態様、(ii)心筋細胞、線維芽細胞及び血管内皮細胞のいずれかの培養培地中に他の細胞の細胞懸濁液を添加する態様などがある。本発明の方法では、心筋細胞様培養液と線維芽細胞培養液と血管内皮細胞との混合培養液を用いる場合や、一の細胞を培養容器に接着又は沈殿させておいて培地の全部又は一部を取り除き、他の細胞の細胞懸濁液をその培養液に添加する態様が含まれる。

【0012】

本発明において、線維芽細胞の培養培地は、一般に動物細胞の培養に使用される培地を採用することができる。そのような培地としては、例えば、DMEM、RPMI-1640、DMEM/F12

50

などが挙げられる。また、市販の線維芽細胞培養培地（LONZA社製、DSファーマバイオメディカル等）を使用することも可能であり、特に限定されるものではない。培地には、必要に応じて各種抗生物質、組み換えタンパク質およびウシ胎児血清などを添加することができる。

【0013】

本発明において、心筋細胞の培養培地は、一般に心筋細胞の培養に使用される培地を採用することができる。そのような培地としては、例えばDMEM、RPMI-1640、DMEM/F12、Williams' Medium Eなどが挙げられる。また、市販の心筋細胞培養培地（リプロセル社）などを用いることもできる。

本発明において、血管内皮細胞の培養培地は、コラーゲンコートされた培養容器及びある種の組み換えタンパク質添加と組み合わせることで一般に血管内皮細胞の培養に使用される培地を採用することができる。そのような培地としては、例えばDMEM、RPMI-1640などが挙げられる。

また、市販の血管内皮細胞培養培地（Lonza社）などを用いることもできる。

【0014】

非吸着のU底型マイクロウェルプレート内で上記の細胞を混合すると、細胞同士が集合して凝集する。この凝集体をスフェロイドという。スフェロイドを形成するまでの培養時間は、2日以上であり、2~7日、好ましくは2~4日である。培養は、4%~6%CO₂、33~41の条件、例えば5%CO₂、37の条件で行う。

作製されたスフェロイドが心臓型であることの確認は、スフェロイドの拍動、拍動率を指標とすることができる。拍動は、60秒あたり40回~120回、好ましくは60回~100回である。5%CO₂、37の培養条件を指標とするときは、40~120回/60秒、好ましくは60~100回/60秒である。

血管内皮細胞を冠状動脈血管内皮細胞にすると、実際のヒト心臓組織の組成により近づけることができる。

本発明においては、このようにして形成されたスフェロイドに、さらに羊膜由来間葉系幹細胞を配合することができる。両者を配合すると、スフェロイドと羊膜由来間葉系幹細胞とが融合し、融合体を形成する。

スフェロイドと羊膜由来間葉系幹細胞との混合比は、33:40から33:200、好ましくは33:40から33:120である。羊膜由来間葉系幹細胞を用いることにより、前記スフェロイドの形態及び機能よりもさらにヒトの実際の心臓の形態及び機能に近づけることが可能である。

【0015】

2. 心臓構造体の製造

前述の通り、細胞を任意の3次元空間に配置することにより、細胞の立体構造体を作製する方法が知られている（WO2008/123614号）。この方法は、基板に針状体を剣山状に配置させて、その針状体に細胞塊を突き刺すことにより配置させるというものである。

【0016】

本発明においては、上記方法を利用してスフェロイド、又はスフェロイドと羊膜由来間葉系幹細胞との融合体を積層させて立体構造体を作製する。既に上記方法を実現するための自動積層ロボットが知られているので（バイオ3Dプリンター「レジェノバ」（登録商標）、株式会社サイフューズ）、立体構造体は、このロボットなどを用いて作製することが好ましい。

ここで、心臓構造体を作製する方法の例を、図7を用いて簡単に説明する。心臓構造体は、例えば、図7に示すように4つの工程、すなわち、工程I~工程IVにより作製することができる。工程Iでは、前述のスフェロイド又は融合体を提供する。次に、工程IIは、剣山方式のBioprintingで構造体を作成するアプローチであり、スフェロイド又は融合体を所定ピッチの剣山を用いて積層する。工程IIIは、剣山にスフェロイド又は融合体を刺した状態での灌流培養プロセスであり、これにより糞子状やパッチ状などのBioprinting構造を形成する。工程IVでは、前記灌流培養後にスフェロイド同士又は融合体同士が融合し

10

20

30

40

50

ていることを確認してから剣山からBioprinting構造の構造体を引き抜き、引き抜いた構造体を静置培養する。これらの工程を経て、心臓構造体を作製することができる。

スフェロイド及び融合体の配置数及び配置形状は特に限定するものではなく、任意である。ここで、「積層」とは、スフェロイド又は融合体を一層以上の層により構造体を形成することを意味する。

スフェロイド又は融合体を所定形状及び所定数で配置させた後、針状体を抜去して所定期間培養すると、スフェロイド又は融合体同士がさらに融合して心臓様の構造体を形成する。

【0017】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0018】

ヒト心臓様スフェロイドの作製

リプロセル社より作製・販売されているヒトiPS由来心筋細胞（ReproCardio 2TM）、ヒト心臓線維芽細胞（NHCF、DSファーマバイオメディカル）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC、Lonza）を用いて、表1のように細胞組成を振り（Group 1～Group 10）、スフェロイドを作製した（表1、図1）。

【表1】

		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7	Group 8	Group 9	Group 10
ReproCardio 2 TM		15000	15000	15000	15000	7500	3000	0	15000	15000	15000
NHCF		0	18750	18750	0	9375	3750	18750	12000	9000	6000
HUVEC		0	3750	0	3750	1875	750	0	3000	3000	3000
直径 (μm)	Day 3	200	400 ~ 500	440 ~ 480	320 ~ 400	380 ~ 400	300	400 ~ 440	400 ~ 500	440 ~ 500	400 ~ 440
スフェロイド (単一)	Day 3	×	○	○	×	○	○	○	○	○	○
拍動	Day 5	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Day 6	○	×	×	×	×	×	×	×	×	×
	Day 7	○	×	×	△	×	×	×	×	×	×
	Day 8	○	×	×	×	×	×	×	△	△	○
	Day 9	○	×	×	○	○	×	×	△	△	○
	Day 13	○	△/◎	△/◎	○	○	△	×	△	△	○

○：全て（10秒間に1回以上）、△：一部、◎：動きが大きい、頻繁（10秒間に5回以上）に拍動する

【0019】

スフェロイド培養培地は、20%FBSを補った心筋細胞専用培地200 μL/wellの割合で培養した（5%CO₂、37℃）。NHCFはDSファーマバイオメディカル社から購入し、HUVECはLonza社より購入した。それぞれ推奨された専用培地で培養し、passage 2～8の割合まで拡大培養し、増殖・継代し、パンパンカー（日本ジェネティクス）で-80℃もしくは液体窒素に凍結保存した。スフェロイド作製時に、全ての細胞は37℃温浴にて融解し、20%FBS心筋細胞専用培地で混濁してスフェロイド作製に使用した。

【0020】

マイクロウェルプレートはSUMILON社より販売されているPrimeSurfaceTM 96U plate（U

10

20

30

40

50

底)を用いた。ReproCardio 2™は、Day 6以降には全て拍動を開始する事を確認した。

【0021】

又、Day 3におけるスフェロイドをバイオ3Dプリンター Regenova™ (株式会社サイフューズ)で積層することを前提としてスフェロイド直径を倒立顕微鏡で観察した。Day 3において 約400 μm直径のスフェロイドを形成し、かつDay 13 (2週間以内)までに拍動する条件としてGroup 2の条件を見出した。

同様の実験を再度繰り返して確認したところ、ReproCardio 2™ : NHCF : HUVEC = 1500 : 18750 : 3750の細胞組成比で単一スフェロイドを作り、かつ細胞を撒いて少なくともDay 14以降に拍動する条件を見出した (図1)。

10

【実施例2】

【0022】

心臓スフェロイド融合体の作製

実施例1において心臓スフェロイドを作製した実験条件を元に、よりヒト心臓組織の組成に近づける為に、HUVECをHCAECに切り替えてスフェロイドを作製した (図2)。ヒト iPS由来心筋細胞 (リプロセル社)、ヒト心臓線維芽細胞 (NHCF)、ヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC) より心臓構造体スフェロイドを作製 (15000 cells/15000 cells/3000 cells)した。この細胞混合比は、作製されたスフェロイド全体のうち、少なくとも半数のスフェロイドが拍動する条件である。次に、Day 3以降、先太チップを用いて、2 4

8スフェロイドと、1つのwellにスフェロイドを集めて融合させた。その結果、Day 10の時点で、28スフェロイド融合体 (3セットのうち1セット)の中で、融合体構造が全体に拍動するグループを確認した。

20

【実施例3】

【0023】

心臓スフェロイドと羊膜由来間葉系幹細胞 (AMSC) とを混合した融合体の作製 (図3)

ヒト iPS由来心筋細胞 (リプロセル社)、ヒト心臓線維芽細胞 (NHCF)、ヒト冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC) より心臓構造体スフェロイドを作製 (15000 cells/ 15000 cells/ 3000 cells)し、PrimeSurface™96Uプレートで3日間培養した (5%CO₂、37)。培地を100 μl/wellの割合で除去し、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞 (AMSC、コスモバイオ) を4 × 10⁴ cells/100 μlの割合で添加した (Day 3)。更に培養し、AMSCも含めて単一スフェロイドが形成されたことを確認し、スミロセルタイトプレート24F (以後、24 well plateと表記) にスフェロイドを移動した (n=4)。その後、更にAMSCを加えない群、8 × 10⁴個、1.6 × 10⁵個又は3.2 × 10⁵個を添加した群に分けて24 well plateで培養した (Day 7)。その後、

30

Day 31まで培養・維持し続けた。Day 31において、AMSCを加えない群と8 × 10⁴個添加群は、全例1秒/回以上の割合で拍動した。1.6 × 10⁵個添加群は一部のwellで拍動せず、3.2 × 10⁵個添加群は4wellともに拍動していなかった (表2)。

【0024】

【表 2】

Date		Group 13	Group 14	Group 15	Group 16
Day 0	ReproCardio 2™	15000	15000	15000	15000
Day 0	NHCF	15000	15000	15000	15000
Day 0	HCAEC	3000	3000	3000	3000
Day 3	AMSC	40000	40000	40000	40000
Day 7		24 well plate	24 well plate	24 well plate	24 well plate
Day 7	AMSC		80000	160000	320000
Day 8	拍動	◎	○	○	○
Day 11				○	
Day 21			◎◎◎		
Day 31		◎◎	◎◎◎	◎◎△	×

10

	×	∞/回	
拍動状態	○	5~10秒/回	◎◎ : <1秒/回
	◎	1~2秒/回程度	◎◎◎ : <0.5秒/回

20

【実施例 4】

【0025】

心臓構造体の作製

心臓スフェロイドを28個融合しても拍動する事を確認した為、これらのスフェロイドを300 μmピッチの剣山を用いて8×7×1のシート状に積層し、心臓構造体シートを作製した(図4A)。細胞を撒いて3日後にバイオ3Dプリンター Regenova™(以下、Regenova™と表記)でスフェロイドを積層し、循環培養容器内に20%FBS心筋専用培地 100mlを用いて灌流培養を7日間実施した。7日後に、剣山上でスフェロイド同士が融合していることを目視し、グリッドプレートと併せて構造体を抜去した。抜去した心臓構造体は、直径10cmシャーレ(底面を組織培養処理していない)に20%FBS心筋専用培地 10mlとともに培養・維持した。静置培養から4日後に心臓構造体は全体が同調して拍動していることを確認した(図4A上パネル)。

30

【0026】

Day 12に構造体直径を観察し、培地から4%パラフォルムアルデヒド(PFA)含有PBS溶液(ナカライテスク)に交換した。組織を固定後、免疫染色処理を実施した。

又、同様の心臓スフェロイド組成で図4A下パネルに示すようなリング状の3層構造体を作製した。リング状に積層した構造体をDay 8で抜去後、Day 9において内孔側でも規則的な収縮を示した(図4A下パネル)。血管周囲に留置し、血流を向上させる用途に応用できる。

40

【実施例 5】

【0027】

心臓構造体の免疫組織染色

実施例4で作製したシート状の心臓構造体(図4)と同様の方法で、1層48スフェロイドでほぼ3層からなる構造体を作製した。リング状に積層した構造体の穴は、Day 52の時点では塞がっており、Day 52の時点で次のように切片を作り免疫染色を行った。

具体的には、心臓の3次元構造体は、4%パラフォルムアルデヒド(PFA)含有PBS溶液(

50

ナカライテスク)で処理し、PBS溶液に交換後4 で維持した。その後、Xyleneに比べ低毒性有機溶媒のG-Nox (Genostaff Co., Ltd.)を使用してCT-Pro20 (Genostaff Co., Ltd.)で包埋し、5 μm間隔で切片化した。

免疫染色を実施する為に、これらの切片はxyleneで脱パラフィン化し、エタノールとPBSを通じて水飽和処理した。抗原賦活化は、クエン酸緩衝液 (pH6.0) で20分間マイクロ波熱処理によって実施した。内在性のperoxidaseは、0.3% H₂O₂含有メタノール溶液で30分間ブロックし、Protein Block (Genostaff) とavidin/biotin blocking kit (Vector)でインキュベーションした。

【0028】

組織切片は、抗CD31ウサギポリクローナル抗体 (abcam)、抗CD34マウスモノクローナル抗体 (abcam)、抗Connexin43ウサギポリクローナル抗体 (abcam)、抗 SMAウサギポリクローナル抗体、抗Cardiac troponin Tマウスモノクローナル抗体 (abcam) 及び抗MYOM1 (ミオメシン) ウサギポリクローナル抗体 (abcam) とともに、4 で一晩それぞれインキュベーションした。抗体処理した切片は、ビオチン結合型ヤギ抗ウサギIg (Dako) 又はビオチン結合型ウサギ抗マウスIg (Dako) で30分間、室温処理した。処理された切片を、ペルオキシダーゼ結合型ストレプトアビジンを添加して5分間反応させ、更にジアミノベンジンによって発色処理した。組織切片は、Mayer's Hematoxylin (MUTO)、マッソントリクロームおよびエラスチカマッソンでそれぞれ染色し、malinol (MUTO) でマウントした (図4B [解像度50倍]、図4C [解像度100倍]) 。

図4B及び図4Cにおいて観察されるとおり、心臓構造体には血管が自己組織化しており (IHC:CD31及びCD34)、本来の拍動するヒト心臓の形態を有していることが示された (IHC: Connexin 43、SMA、Cardiac TroponinT及びMYOM1)。また、血管が管腔構造を形成しており、構造体の中心部まで培地が供給されていることが示された。これは、任意の大きな厚みのある細胞構造体を壊死することなく作製できることを示しており、本発明の有利な点である。

図4B及び図4Cの血管内皮構造細胞の内部構造がどのように連続しているかを確認した (図4D)。5 μm間隔で連続した8枚の組織切片 (Slide No.45からSlide No.52の合計8枚) に対して、抗CD34マウスモノクローナル抗体 (abcam) で免疫染色している。心臓構造体内部にCD34で染色される細胞 (血管内皮細胞) は局在する領域を確認した。CD34抗体に結合する染色領域は切片ごとに少しずつ形状を変化しており、構造体内部に管状の血管構造が形成しつつある事が推察された。

心臓構造体 (解像度 ×100) の中にヒト心臓本来の構造が形成されているかを確認する為に、HE染色した構造体切片を光学顕微鏡で400倍の解像度で観察した。その結果、横縞模様の構造が散在して存在していることがわかった (図4E、輪で囲った部分)。横紋筋構造が断片的に形成されていることが推察された。

【実施例6】

【0029】

心臓スフェロイドに羊膜由来間葉系幹細胞 (AMSC) を混合した構造体の作製

ヒトiPS由来心筋細胞 (リプロセル社)、心臓線維芽細胞 (NHCF)、冠状動脈血管内皮細胞 (HCAEC) をPrimeSurface™ 96Uプレートに撒き、37 5%CO₂インキュベーターで3日間静置培養した。心臓構造体の凝集 (15000 cells/15000 cells/3000 cells) を確認後、羊膜由来間葉系幹細胞 (Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells、AMSCと略記、Cellula社) を40000 cells/wellの割合で追加添加し、更に3日間静置培養した (図5Aの図5-1もしくは上パネル) 。

心臓スフェロイド凝集体にAMSCが更に単一の球状に凝集されたことを確認した。この凝集体スフェロイドを400 μmピッチの剣山を用いて6×6×2のシート状にバイオ3Dプリンター Regenova™でスフェロイドを積層した (表3) 。

【0030】

循環培養容器内に20%FBS心筋専用培地 100mlを用いて灌流培養を4日間実施した。4日後

に、剣山上でスフェロイド同士が融合していることを目視し、グリッドプレートを併せて一辺が2mmのシート状構造体を抜去した。抜去した心臓構造体は、10cmシャーレ（底面を組織培養処理していない）に20%FBS心筋専用培地 10mlとともに培養・維持した。

【0031】

静置培養から3日後（Day 13）に心臓構造体が拍動していることを確認した。Day 14、Day 15にも構造体表面が継続的に拍動することを動画観察し（図5 A 上パネルの右写真）、培地から4%PFA入りPBS溶液に交換した。

又、ヒト iPS由来心筋細胞、NHCF、HCAEC、AMSCをPrimeSurface™ 96Uプレートに1 well 当たり7500 cells/7500 cells/3000 cells/40000 cellsの組成で撒いて、37 5% CO₂インキュベーターで4日間静置培養し、Day 5で8×8×1のシート構造で400μmピッチ剣山に積層して構造体を作製した（表3のGroup 17、図5Aの図5-2もしくは図5A下パネル）。

構造体の形状は脆く、Day 10で一部塊が崩れたものの、Day 17に拍動を確認した。図5 A 右下パネルはDay 19における心臓構造体の写真である。

AMSCがiPS由来心筋細胞の2.7倍もしくは5.3倍含まれていても、移植用の心臓様構造体として、利用できる可能性を示した。

【0032】

【表3】

心筋スフェロイドの拍動率

Date		Group 11	Group 12	Group 17
Day 0	ReproCardio 2™	15000	15000	7500
Day 0	NHCF	15000	15000	7500
Day 0	HCAEC	3000	3000	3000
Day 0	AMSC	0	0	40000
Day 3	AMSC	40000	0	0
Day 4			積層, 300μm, 8 ×7×1	培地交換半量
Day 5				積層, 400μm, 8 ×8×1
Day 6		積層, 400μm, 6×6×2		
Day 8			抜去	
Day 10		抜去		抜去 (大 1、小1 に割れる)
Day 11		×	◎	
Day 12		×	◎	
Day 13		○	4%PFA	
Day 15		○		
Day 16		4%PFA		△
Day 17				○
Day 19				◎

拍動状態	×	∞/回
	○	5~10秒/回
	◎	1~2秒/回程度

10

20

30

40

50

【実施例7】

【0033】

心臓スフェロイドに羊膜由来間葉系幹細胞 (AMSC) を混合した構造体の免疫組織染色

実施例6で作製した組織を固定後、免疫染色処理を実施した (図5B、図5C)。3次元構造体は、4%パラフォルムアルデヒド (PFA) 含有PBS溶液 (ナカライテスク) で処理し、PBS溶液に交換後4日 で維持した。その後、Xyleneに比べ低毒性有機溶媒のG-Nox (Genostaff Co., Ltd.) を使用してCT-Pro20 (Genostaff Co., Ltd.) で包埋し、5 μ m間隔で切片化した。

免疫染色を実施する為に、これらの切片をxyleneで脱パラフィン化し、エタノールとPBSを通じて水飽和処理した。抗原賦活化は、クエン酸緩衝液 (pH6.0) で20分間マイクロ波熱処理によって実施した。内在性のperoxidaseは、0.3% H₂O₂含有メタノール溶液で30分間ブロックし、Protein Block (Genostaff) とavidin/biotin blocking kit (Vector) でインキュベーションした。

【0034】

組織切片は、抗CD31ウサギポリクローナル抗体 (abcam)、抗CD34マウスモノクローナル抗体 (abcam)、抗Connexin43ウサギポリクローナル抗体 (abcam)、抗SMAウサギポリクローナル抗体、抗Cardiac troponin Tマウスモノクローナル抗体 (abcam) 及び抗MYOM1 (ミオメシン) ウサギポリクローナル抗体 (abcam) とともに、4日で一晩それぞれインキュベーションした。抗体処理した切片は、ビオチン結合型ヤギ抗ウサギIg (Dako)、又はビオチン結合型ウサギ抗マウスIg (Dako) で30分間、室温処理した。処理された切片を、ペルオキシダーゼ結合型ストレプトアビジンを添加して5分間反応させ、更にジアミノベンジンによって発色処理した。組織切片は、Mayer's Hematoxylin (MUTO)、マッソントリクロームおよびエラスチカマッソんでそれぞれ染色し、malinol (MUTO) でマウントした (図5B [解像度50倍]、図5C [解像度100倍]) 。

【0035】

図5B及び図5Cに観察されるとおり、抗Cardiac troponin Tマウスモノクローナル抗体 (abcam) 及び抗MYOM1 (ミオメシン) ウサギポリクローナル抗体 (abcam) は一部の領域に発現し、膜タンパク質のconnexin43はSMAを発現する細胞以外のほぼ全ての領域で発現していた。これは構造体の一部のヒト心筋細胞で引き起こされる自立拍動の電気的シグナルを、8/3倍~5倍以上含まれるAMSC (40/7.5倍含有する) も含めて構造体全体に伝えている事を示している (パネル図5A)。iPS由来心筋細胞に対して数倍量のAMSCを含む構造体は、図4の構造体とは細胞分布が異なっていた。Troponin T及びMYOM1の発現は構造体内部に散在し、血管内皮細胞のマーカーであるCD31とCD34の発現は構造体表面から内部に連続的な線状に分布した。一方、電気シグナルを伝える膜タンパク質のConnexin43は構造体のほぼ全域で発現していた。従って、図5Aの構造体がレシピエントに移植された場合、物理的な位置関係から血管内皮細胞は速やかに心臓の血管と相互作用し連結する事が期待される。又、Connexin43を発現する構造体は、レシピエントの心臓の拍動と効率よく速やかに同調して拍動することが期待される。これは、AMSC単体で心臓に移植するよりも「生着」と「同調」の面で有利である。

【実施例8】

【0036】

心臓の拍動率の経過観察

実施例4で作製したシート状の心臓構造体 (図4) と同様の方法で、1層48スフェロイドでほぼ3層からなる構造体を作製した。この構造体は、ヒトiPS由来心筋細胞、ヒト心臓線維芽細胞、ヒト冠状動脈血管内皮細胞をそれぞれ15:15:3の組成比として作成された。スフェロイド作製を開始してから、Day 11以降に拍動を確認した。以後、20%FBS心筋細胞培地で維持し、Day 30以降の拍動率を測定した。それぞれ15回/15秒 (Day 31)、21回/18秒 (Day 38)、13回/15秒 (Day 43)、18回/14秒 (Day 46) および16回/15秒 (Day 52) であった (図6)。1回/秒を基本に、それよりも早い時期と遅い時期が周期的に出現した。こ

の拍動率は構造体作製に使用したReproCardio 2™で保障されている拍動数と同程度であり、心臓線維芽細胞と動脈系内皮細胞を含んだ構造体においても同等の速度での拍動率を示していた。

【実施例 9】

【0037】

心臓様三次元構造体の動きのビデオ追跡（図8）

囊子状心臓様構造体を次のように作製した。心臓様スフェロイドを300 μmピッチもしくは400 μmピッチ、9×9の剣山を用いて、2（縦）×2（横）×2（高さ）の構造を同じ2層に8個作るデザインで積層した。表4で示すように各種細胞を撒き、3日後にバイオ3Dプリンター Regenova™（以下、Regenova™と表記）でスフェロイドを積層した。循環培養容器内に20%FBS心筋専用培地 100mlを用いて灌流培養を4日間実施した。4日後に、剣山上でスフェロイド同士が融合していることを目視し、グリッドプレートと併せて構造体を抜去した。抜去した心臓構造体は、非吸着のスミロンセルタイトプレート24F（MS-9024X、住友ベークライト）に囊子構造体1個当たり1 wellの割合で移し、培養を継続した。培地量は20%FBS心筋専用培地を0.9ml/well入れて、構造体分取時に100～200 μLを同時に培地分取して培養・維持した。抜去後、次の日より囊子状構造体は自立拍動する事を確認した。培地交換は、3日に一度0.5mLを除去して20%FBS（Group 21ではHyclone社の血清、Group 25ではGibco社の血清を使用）心筋専用培地0.5mLを添加して培養した。拍動解析は、抜去後7日以降14日以内に解析した。

10

20

【0038】

【表 4】

Date		Group 21	Group 25
Day 0	ReproCardio 2™	15000	15000
Day 0	NHCF	15000	15000
Day 0	HCAEC	3000	3000
Day 3		積層, 300µmピッチ, 31Gノズル使用、2×2×2層, 8か所	積層: 400µmピッチ、27Gノズル 2×2×2層, 8か所
Day 7		抜去して1塊 (8スフェロイド構造体)/wellの割合で 24well plateに移す。拍動確認	抜去して、8構造体回収。24 well plateへ移す (100µl吸って移す)。
Day 10			拍動している事を確認
Day 13		KSPに搬送 (37°C⇒室温⇒37°C)	
Day 14		KSPで温度感受性試験次に37°Cに戻し、DMSO群、とBlebbistatin 10µM群に分けて添加	500µl/wellずつ培地交換
Day 17			500µl/wellずつ培地交換
Day 19			500µl/wellずつ培地交換
Day 20			KSPに搬送 ⇒ 構造体は拍動を確認
Day 21			KSPで拍動解析、温度感受性試験 (33~41°C) と薬剤添加試験 (Blebbistatin)

KSP: 神奈川サイエンスパークの略

【0039】

心臓様構造体の動きを評価する非侵襲的なアプローチとして、セルモーションイメージングシステム SI-8000 (ソニー) が使用された。高速デジタルCMOSカメラ (KP-FM400WCL、日立国際電気エンジニアリング) が倒立顕微鏡 (Eclipse Ti ニコン) に装着された。1秒当たり150フレームの速度で2048×2048ピクセルの解像度および8ビットの深さ、対物レンズで10倍に拡大した画像を連続した位相差コントラストとして、糞子状心臓様構造体の動画イメージが記録された。拍動している心臓様構造体の動きベクトルは、ブロックマッチングアルゴリズムを使って得られた。糞子状心臓様構造体は8例実施され、そのうち代表的なサンプルの動きの波形を示した (図 8 A、図 8 B)。縦軸は動きの速度 (µm/sec) で、横軸は時間 (秒) を示している。8例トータルの収縮速度ピークの平均値は46.2 ± 0.135 (µm/sec)、弛緩速度ピークの平均は38.1 ± 0.157 (µm/sec) だった。作成された構造体の動きは図 8 C で示されるようなRegion of Interest (ROI、関心領域) を設定し、分析された。

【0040】

8個の構造体を33 から2 ずつ温度を上げて設定した時の拍動率を評価した (図 8 D)。図 8 D に示すように、拍動率は温度依存的に増加した。この時、それぞれの温度における収縮速度と弛緩速度を測定し平均化したところ (図 8 E)、温度の上昇に対して収縮速度と弛緩速度ともに増加する傾向が認められた。更に、8例を2群に分けて、0.1% DMSO添加群とDMSOで溶解した (-)-blebbistatin (SIGMA) を終濃度10 µMになるように添加したサンプルの拍動率を10分おきに測定した。測定温度は37 で実施した。その結果、横紋筋を

阻害するblebbistatin添加群では拍動率の減少が認められた(図8F)。又、この拍動率の減少は化合物を含まない培地に交換する事によって解消されることを確認している。心臓様構造体は、断片的ではあるものの横紋筋が形成され、ポンプとしての機能を有する可能性が示唆された。

【実施例10】

【0041】

心臓様三次元構造体の動きの測定(図9)

嚢子状心臓様構造体と心臓様スフェロイドを次のように作製した。心臓様スフェロイドを400 μ mピッチ、9 \times 9の剣山を用いて、2(縦) \times 2(横) \times 2(高さ)の近接構造を同じ2層に8個作るデザインで積層した。表5に示すように細胞を撒き、3日後にバイオ3Dプリンター RegenovaTM(以下、RegenovaTMと表記)でスフェロイドを積層し、循環培養容器内に20%FBS心筋専用培地 100mlを用いて灌流培養を4日間実施した。4日後に、剣山上でスフェロイド同士が融合していることを目視し、グリッドプレートと併せて構造体を抜去した。抜去した心臓構造体は、非吸着のスミロンセルタイトプレート24F(MS-9024X、住友ベークライト)に嚢子構造体1個当たり1 wellの割合で移し、培養を継続した。培地量は20%FBS心筋専用培地を0.9ml/well入れて、構造体分取時に100~200 μ Lを同時に培地分取して培養・維持した。抜去後、次の日より嚢子状構造体は自立拍動する事を確認した。培地交換は、3日に一度0.5mLを除去して20%FBS(Gibco社血清)心筋専用培地0.5mLを添加して培養した。拍動解析は、抜去後2週間以内に解析した。

10

20

【0042】

【表 5】

Date		Group 23	Group 26
Day 0	ReproCardio 2™	15000	15000
Day 0	NHCF	15000	15000
Day 0	HCAEC	3000	3000
Day 3		積層：400μピッチ、26G、2×2×2、7塊	積層：400μピッチ、26G、2×2×2、6塊
Day 7		抜去して1塊（8スフェロイド構造体）/well 24well plateに移す	抜去して、24 wellに移す（培地をそのまま利用）、融合体とスフェロイドも同時に24well plateに移す。
Day 10		拍動確認 0.1～0.2回/秒	培地交換（半量）
Day 11		7例全てで拍動を確認	
Day 12			培地交換（半量）
Day 13		24well plate 培地交換（7例全て拍動している。拍動速度は3～5秒に1回。）	
Day 14			LSIMの鹿島研究所へ37℃で搬送
Day 17		LSIMの鹿島研究所へ37℃で搬送	
Day 18		活動電位を測定：針を刺して電位が撮れた。測定時間は2時間が限界	活動電位を測定
Day 19		活動電位を測定	

LSIM：LSIメディエンスの略

【0043】

糞子状心臓様構造体（図9A、絵で表記）と心臓様スフェロイド（図9A、絵で表記）がスミロンセルタイトプレート24F（住友ベークライト）で1個/wellの割合で培養され、それぞれの拍動率を測定した（図9A）。糞子状構造体と心臓様スフェロイドは、20% FBS-1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含むReproCardio 2™ culture mediumで37 5%CO₂培養された。研究で使用されたGMsは機械で引っ張り作成された標準的なキャピラリー電極で、この中を3M KCl溶液で満たした。これらの微小電極は銀-塩化銀のワイヤーと共役し、高いインピーダンス比と可変容量を中和する機能を持った増幅器に連結された。30kHz（low pass）のフィルターをセットした、gain設定10の増幅器（CEZ-1250，NIHON KOHDEN）で、シグナル値は増強された。ハードウェア（PowerLab 4/30，AD INSTRUMENTS）とソフトウェア（Lab Chart，AD INSTRUMENTS）を使用して10kHzのサンプリング周波数で、2つのシグナルは獲得された。サンプルを浸した培地を37 で循環させながら維持し、それぞれのサンプルにキャピラリー電極を刺して活動電位を測定した。90%の耐久時間（APD90）が測定された（図9B）。糞子状構造体の活動電位チャートが図9C、図9D、図9Eで示され、又、スフェロイドの活動電位チャートが図9F、図9G、図9Hで示された。活動電位のチャートから心臓様構造体とスフェロイドは共に周期的な電気シグナルを発生している事が確認された。又、拍動率（図9A）とAPD90（図9B）は逆相関する傾向があった。これは、一回の拍動に伴い構造体およびスフェロイドの内部で一ピークの活動電位が引き起こされている事を示唆している。

【実施例 1 1】

【0044】

スフェロイド及び心臓様構造体における血管内皮細胞の分布(図10~12)

非生理的な組成で複数の細胞を共培養してスフェロイドを作成し、81個のスフェロイドで構成されるパッチ状構造体およびスフェロイド融合体の血管内皮細胞がどのように分布するかを調べた。不死化心筋細胞：心臓線維芽細胞：ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(GFP-hUVEC)を、 1.5×10^4 ： 1.5×10^4 ： 3×10^3 の割合で、それぞれの専用培地を1:1:1の割合で混合した培地でPrimeSurface™ 96Uプレートに撒いた。ここで、不死化心筋細胞(Immortalized Human Cardiomyocytes-SV40)、心臓線維芽細胞、及びヒト臍帯静脈血管内皮細胞(GFP-hUVECs)は、それぞれabm社、DSファーマバイオメディカル社、Angio-Proteomie社(フナコシ取り扱い)より入手した。細胞を撒いて3日後に、光学顕微鏡及び蛍光顕微鏡でスフェロイドを観察し写真撮影した(図10A、スフェロイド数1)。又、形成されたスフェロイドを先太チップで培地と共に吸引し、別のスフェロイドが存在するwellに2、4、8、16個の割合で混合した。4個以上のスフェロイドは2+2=4、4+4=8、8+8=16のように多段階のピペティングでスフェロイドを混合している。次の日(Day 4)に、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡で写真撮影した(図10A)。蛍光顕微鏡の写真から、スフェロイド同士が融合すると、GFP-hUVECはその融合面に集まる傾向があった。

10

【0045】

次に、バイオ3Dプリンター・Regenova™を用いて構造体を作成した(図10B)。不死化心筋細胞：心臓線維芽細胞(NHCF)：ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(GFP-hUVEC)を、 1.5×10^4 ： 1.5×10^4 ： 3×10^3 の割合で、それぞれの専用培地を1:1:1の割合で混合した培地でPrimeSurface™ 96Uプレートに撒いた。3日後、形成されたスフェロイドを用いてバイオ3Dプリンター・Regenova™で9×9剣山を使用し、9(縦)×9(横)×1層のシート状に整列・積層した。それぞれの専用培地を1:1:1の割合で混合した培地150mlを灌流培養容器に添加し、スフェロイドを積層した剣山を置いた。ペリスタポンプにPharMed™BPTチューブをセットし、流速3.4ml/minの割合で1週間循環培養した。

20

循環培養後、スフェロイド同士が融合した事を目視して確認し、クリーンベンチ内で融合した構造体をクリーンベンチから抜去した。抜去した構造体は、非吸着の10cmシャーレで1日、静置培養された。

【0046】

構造体内部の蛍光画像を得る為に、Focus Clear™kitで透明化処理された(図10B)。透明化処理2時間後と6時間後の光学顕微鏡および蛍光顕微鏡画像を示す。蛍光発現したhUVECは構造体の中で格子状に偏在しており、スフェロイド同士が融合した境界面に多く分布している事が示された。

30

【0047】

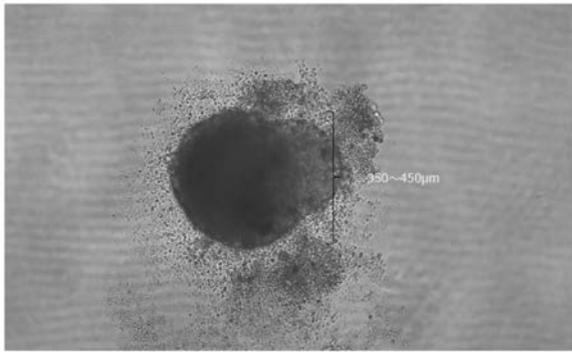
より明瞭なGFP発現hUVECの蛍光顕微鏡画像を得る為に、4%パラホルムアルデヒド入りPBS溶液(ナカライテスク)で構造体を固定化した後に、Focus Clear™ kitで透明化処理をした。図11に示すように、作成されたシート状構造体を2つに分割し、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡でGFP-hUVECの構造体内部での分布を確認した(図11)。次に、この分割した構造体の片方を共焦点レーザー走査顕微鏡(LSM 880 [好感度GaAsP検出器付]、電動倒立顕微鏡 Axio Observer Z.1)で立体構造を観察した。血管内皮細胞は太い細胞の帯となって、網目状に構造体の内外に分布している事が確認された(図12A)。血管内皮細胞の網目状構造は、3次元画像を再構成する事でも確認している(図12B)。

40

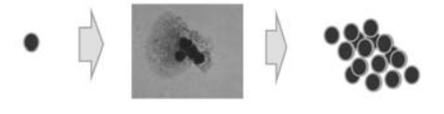
【0048】

図12での血管内皮細胞の分布は、図4Bおよび図4Cで示した生理的な組成(iPS心筋由来細胞、心臓線維芽細胞、冠状動脈血管内皮細胞[HCAEC])での心臓構造体中の血管内皮細胞の分布(構造体内部にのみ、未成熟な管腔状構造が見られる)とは異なっていた。相違点は、不死化心筋細胞は拍動していないこと、血管内皮細胞は臍帯由来のhUVECだったこと、及び培地組成が異なることである。

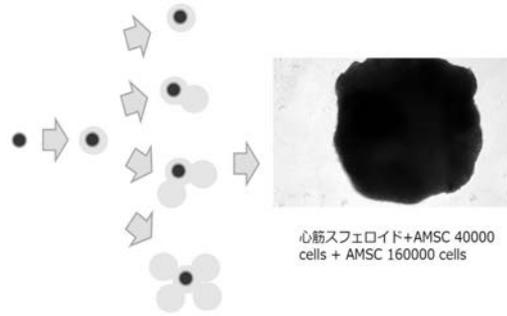
【 図 1 】



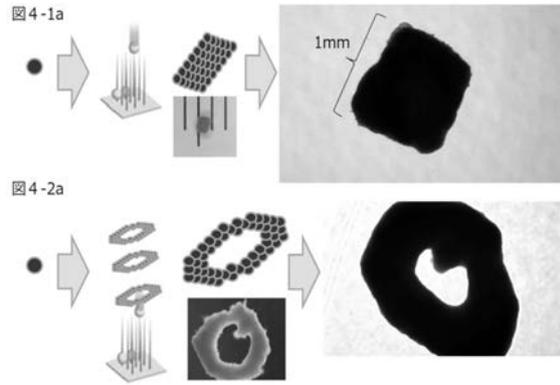
【 図 2 】



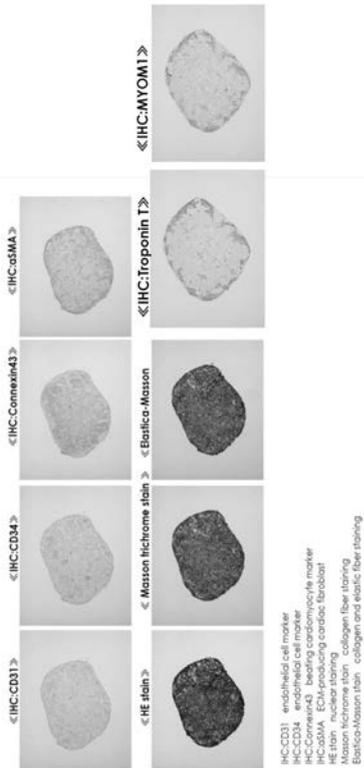
【 図 3 】



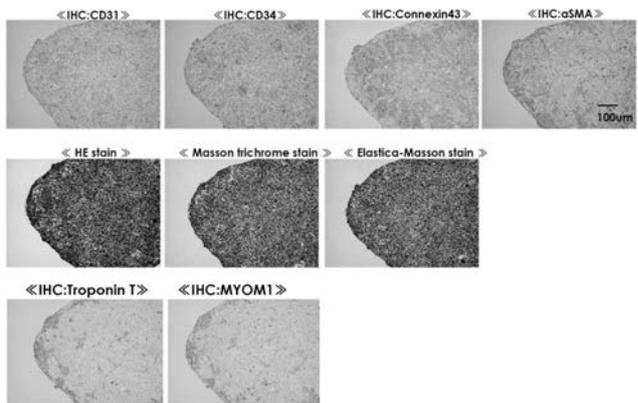
【 図 4 A 】



【 図 4 B 】

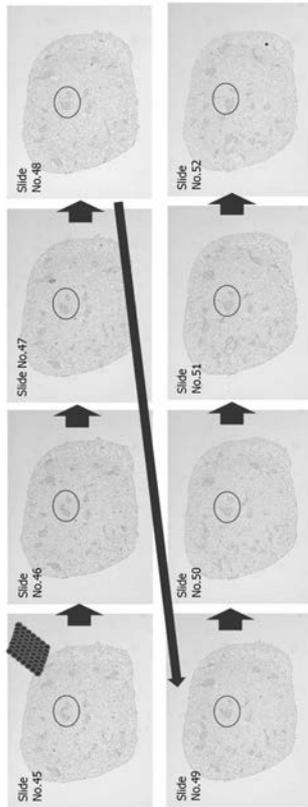


【 図 4 C 】



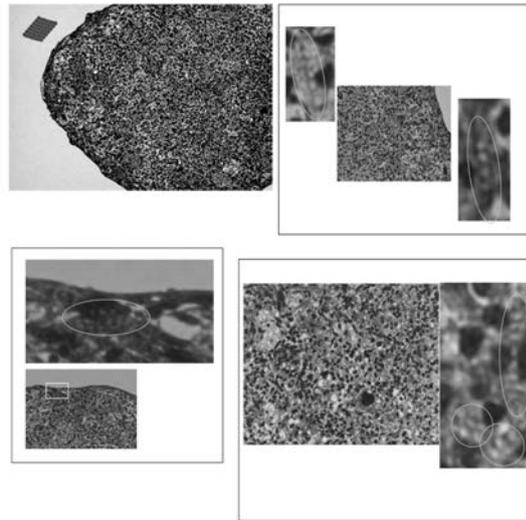
【 図 4 D 】

Sequential CD34 immunostaining

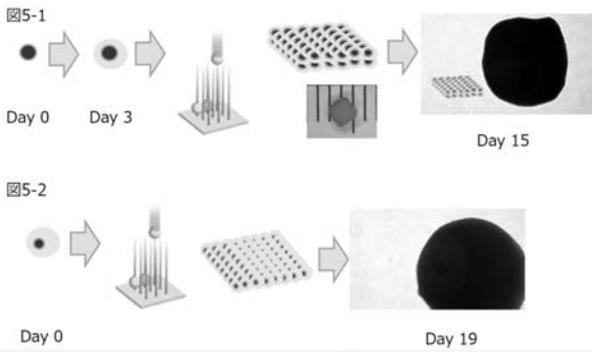


【 図 4 E 】

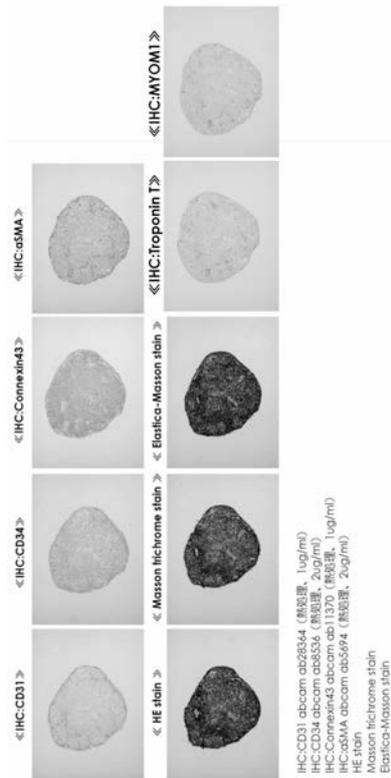
Scattered striated muscle structure



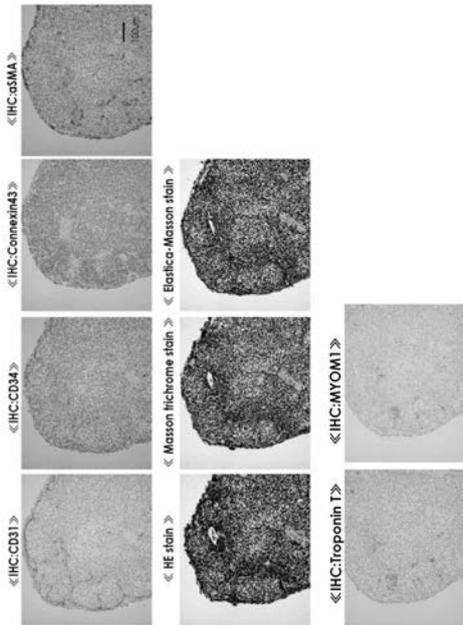
【 図 5 A 】



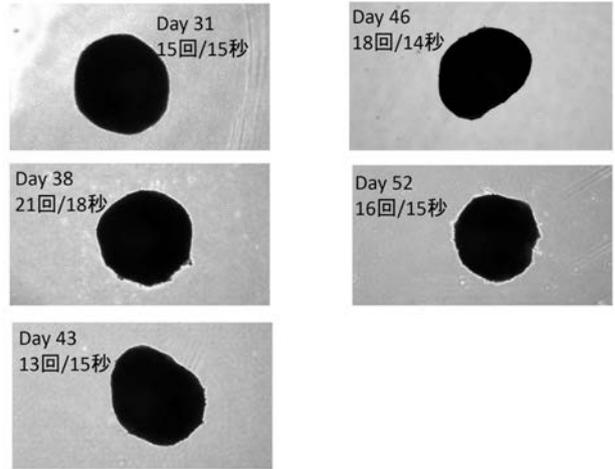
【 図 5 B 】



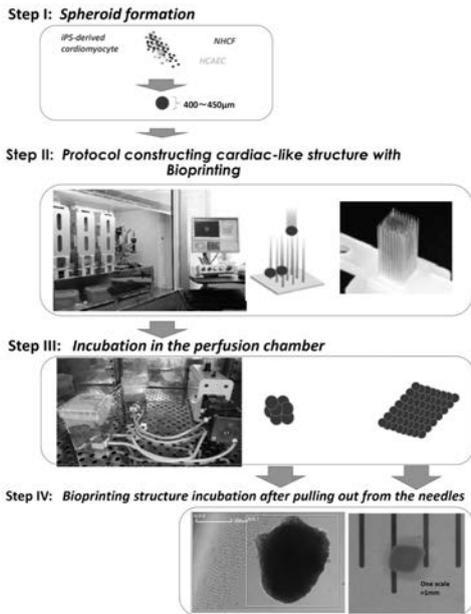
【 図 5 C 】



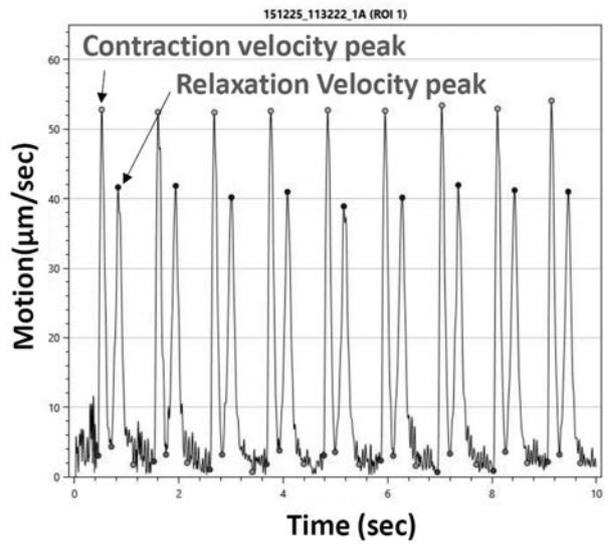
【 図 6 】



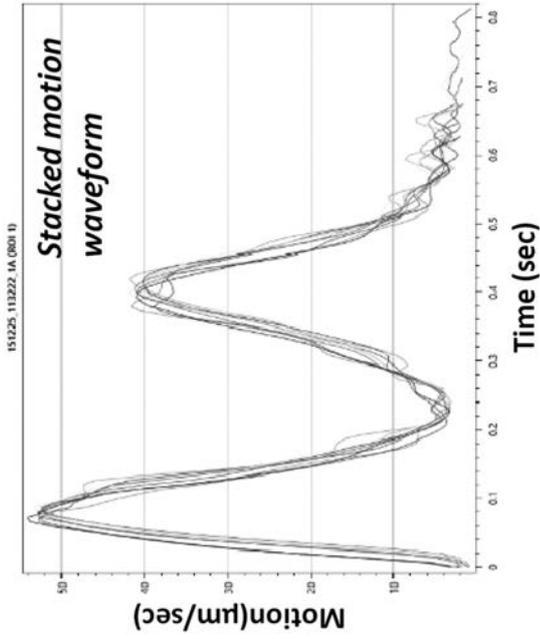
【 図 7 】



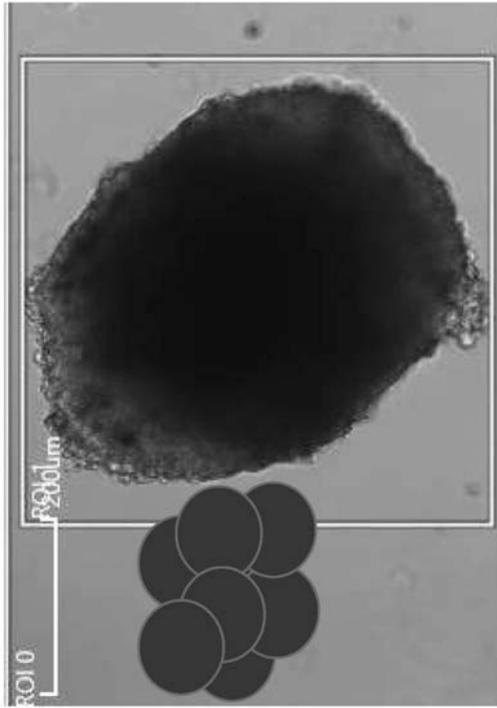
【 図 8 A 】



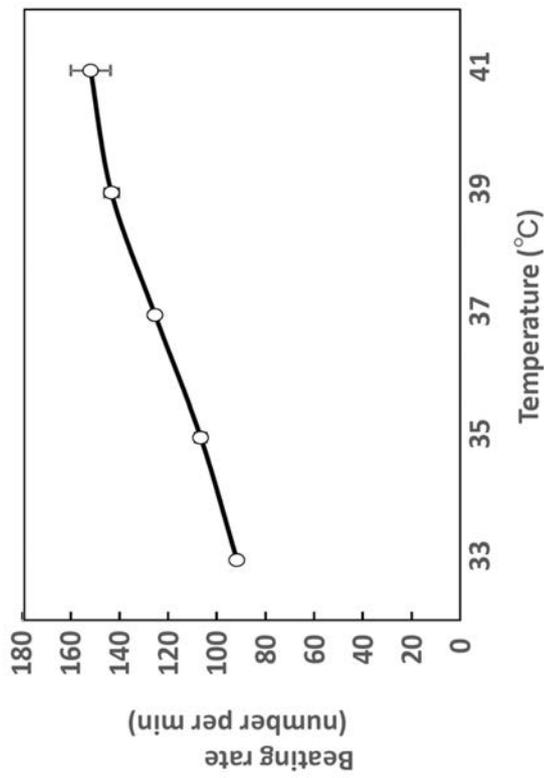
【 8 B 】



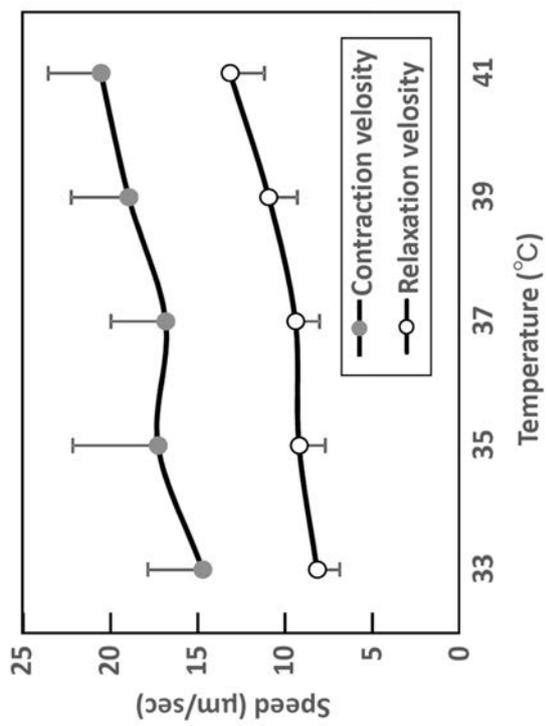
【 8 C 】



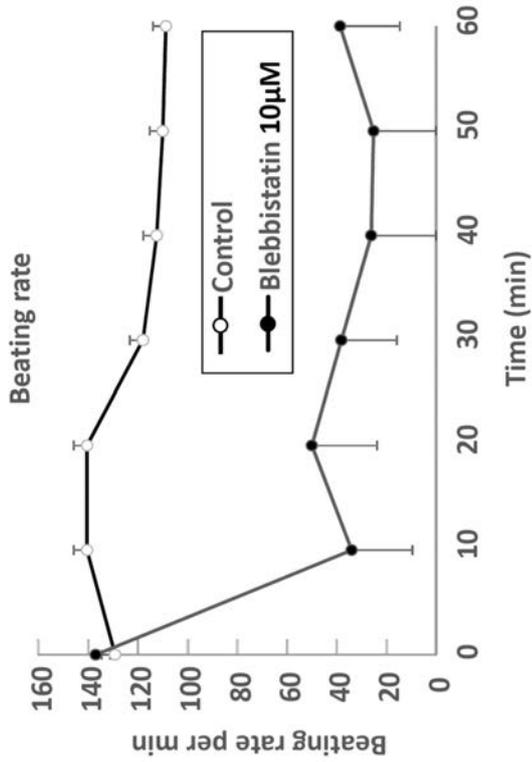
【 8 D 】



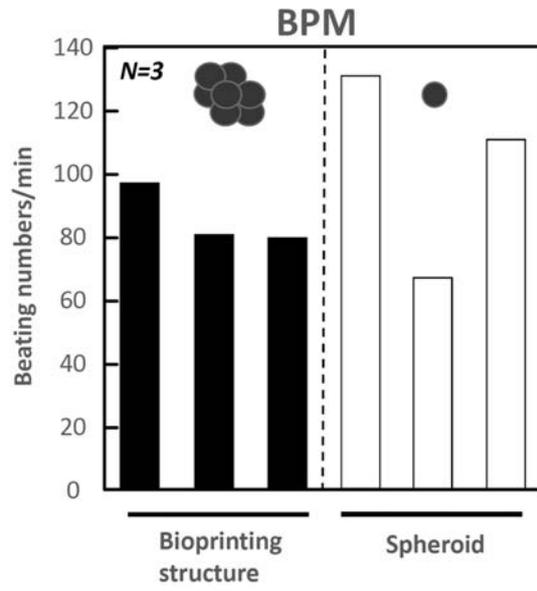
【 8 E 】



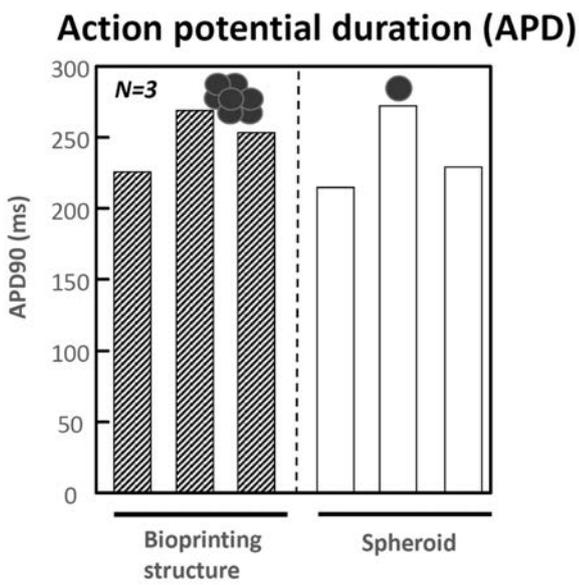
【 図 8 F 】



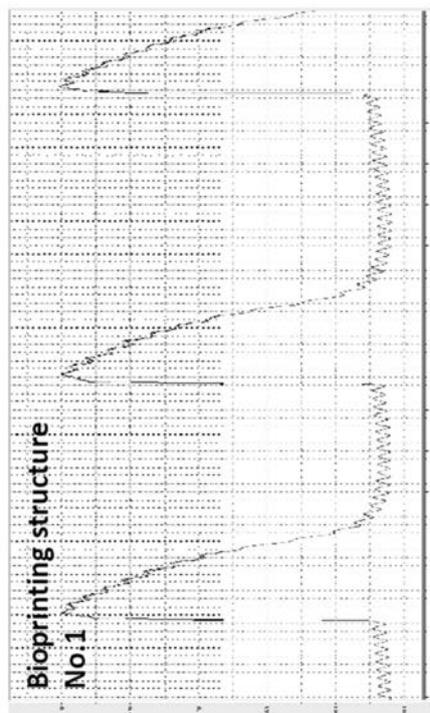
【 図 9 A 】



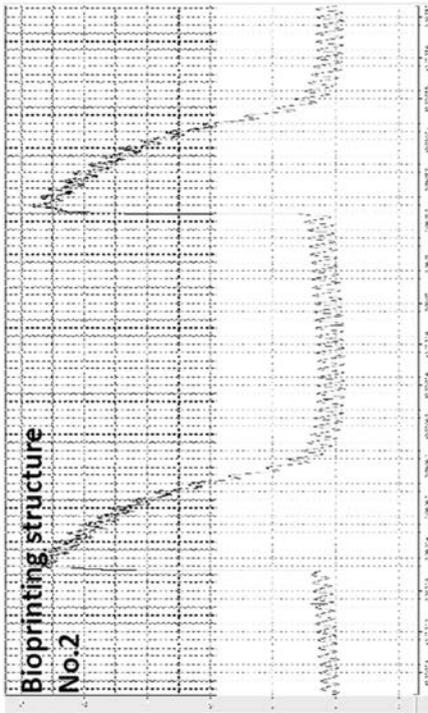
【 図 9 B 】



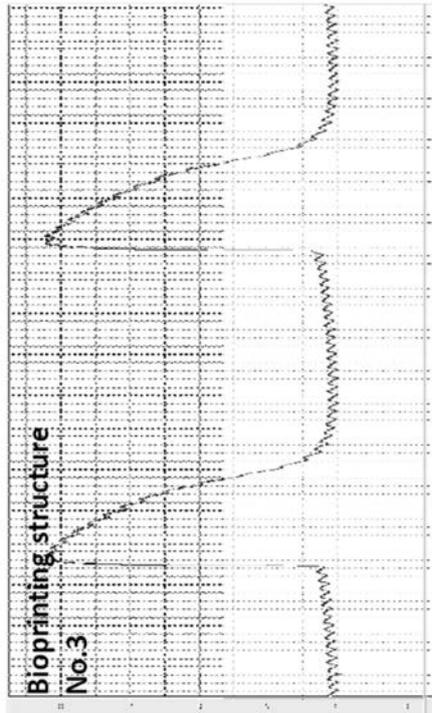
【 図 9 C 】



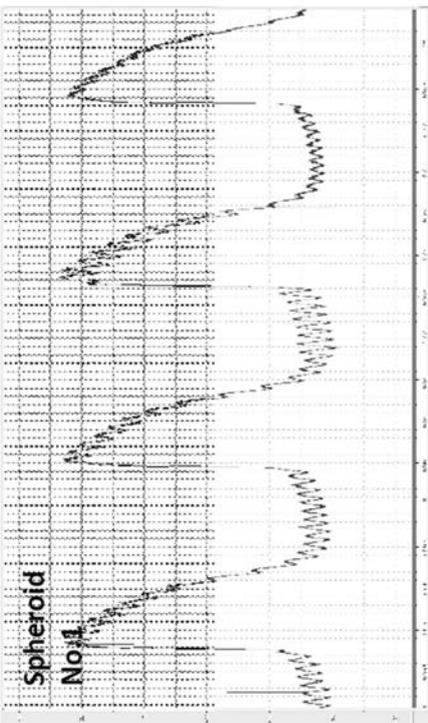
【 図 9 D 】



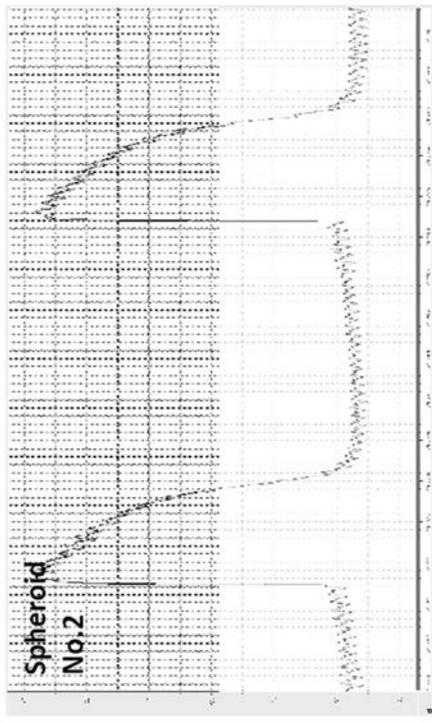
【 図 9 E 】



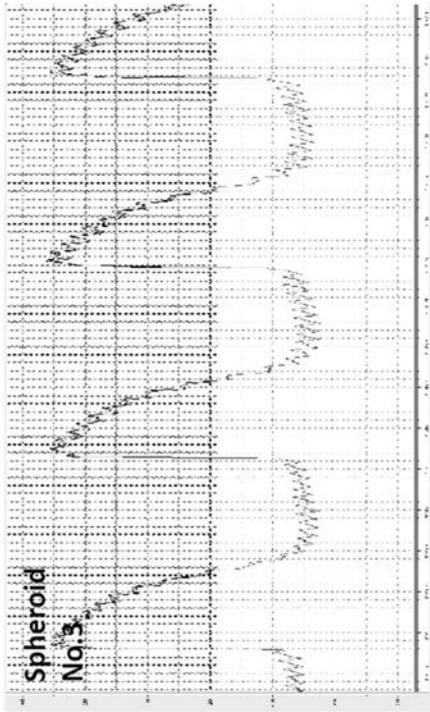
【 図 9 F 】



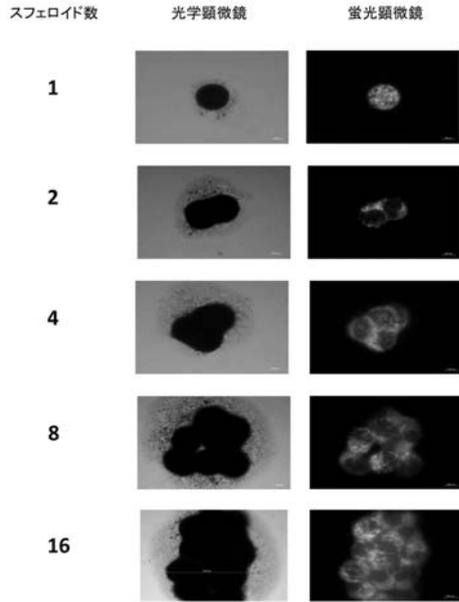
【 図 9 G 】



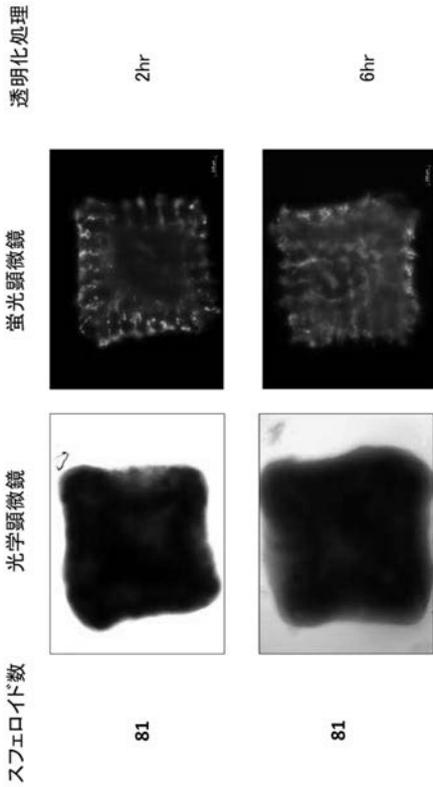
【 図 9 H 】



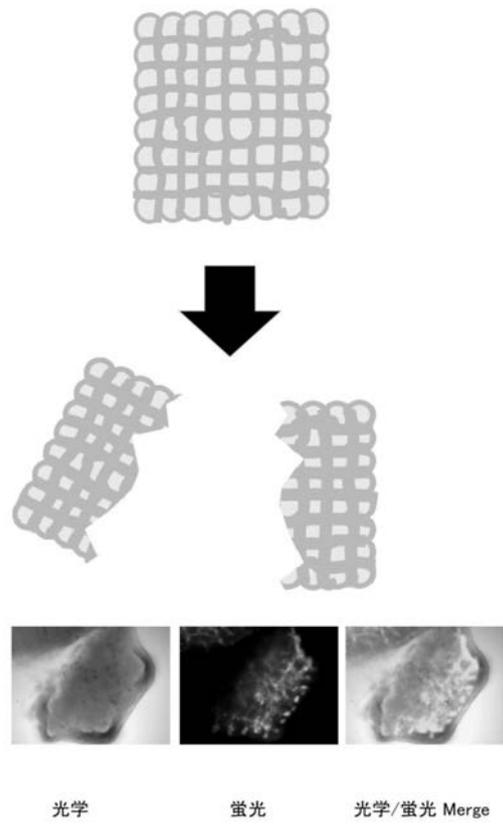
【 図 1 0 A 】



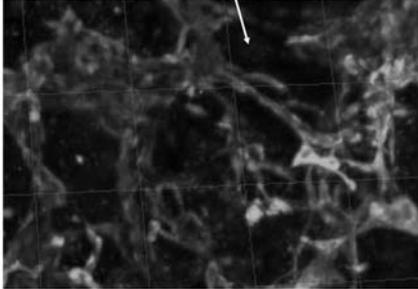
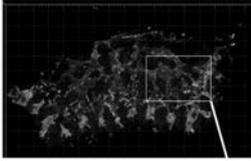
【 図 1 0 B 】



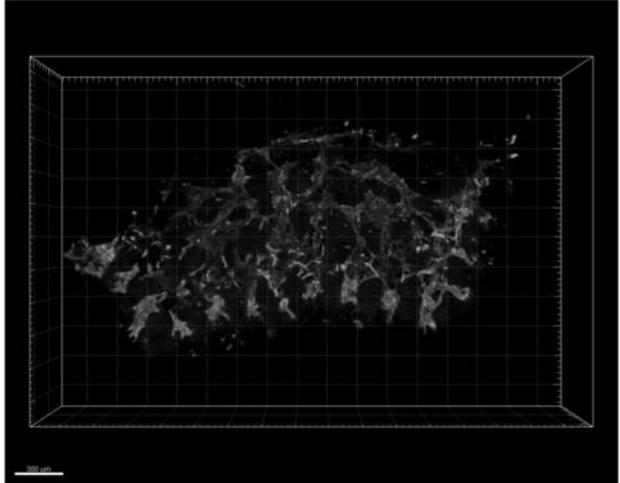
【 図 1 1 】



【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
A 6 1 L	27/00	(2006.01)	A 6 1 L	27/00	Z
A 6 1 F	2/08	(2006.01)	A 6 1 F	2/08	

(72)発明者 島村 満

東京都文京区本郷7 - 3 - 1 東京大学アントレプレナープラザ 株式会社サイフーズ内

Fターム(参考) 4C081 AB34 CD34 DA16 DC15

4C087 AA01 AA02 BB47 BB58 BB64 MA67 NA20 ZA36

4C097 AA26 BB01 DD15