

引張刺激に対する iPS 由来 3 次元心筋組織の拍動特性

Pulsatile Properties of Three Dimensional iPS Cardiac Tissues Loaded Tensile Stimulation

○正 上杉 薫 (阪大) 塚本 佳也 (阪大) 日浦 綾美 (阪大)
赤木 隆美 (阪大) 宮川 繁 (阪大) 澤 芳樹 (阪大)
明石 満 (阪大) 正 森島 圭祐 (阪大)

Kaoru UESUGI, Osaka University, uesugi@live.mech.eng.osaka-u.ac.jp
Yoshinari TSUKAMOTO, Osaka University Ayami HIURA, Osaka University
Takami AKAGI, Osaka University Shigeru MIYAGAWA, Osaka University
Yoshiki SAWA, Osaka University Mitsuru AKASHI, Osaka University
Keisuke MORISHIMA, Osaka University

In this report, we measured pulsatile properties of three dimensional (3D) iPS-cardiac tissues by using micro vacuum chuck (MVC). The 3D iPS-cardiac tissue was connected to force transducer by MVC in little change of initial length and minimally stress concentration. By using MVC, we successfully applied tensile stimulation to 3D iPS cardiac tissue and measured pulsation force. It was observed that the pulsation force became larger with the increase of strain. Additionally, the pulsation force did not decrease with incubation time. This indicates that the 3D iPS cardiac tissue was not deterioration with time. The pulsation frequency of partially tissues also became large with the increase of strain and this property was increased when incubation time became over 14 days. It means that 3D iPS cardiac tissues kept maturation after 14 days.

Key Words: Mechanical properties, Tensile stimulation, iPS cardiac tissue, Three dimensional (3D) tissue, Micro vacuum chuck (MVC)

1. 緒言

単一細胞を *in vitro* にて 3 次元組織に再構築し, *in vivo* に移植することで組織の失われた機能を再獲得する再生医療技術が注目されている. 作製した 3 次元組織を医療の現場で実際に利用するためには安全性や有効性の評価が必要である. そこで従来, 免疫染色の様な生化学的な評価法や顕微鏡観察等の形態学的な評価方法が提案され, その技術も確立されてきた. しかしながら, 機械的特性を用いた評価方法は少なく, 未だ確立されていない. そこで, 本研究では, *in vitro* で再構築した 3 次元組織の機械的特性評価法の確立を目指す.

機械的特性を評価することで, 作製した 3 次元組織が *in vivo* の組織と同等の機械的特性を持っているか, そして体内への移植に耐えうる性能を示すか評価することが可能となる. 例えば, 心臓や血管系において, その硬さは筋細胞の成熟度や融合度だけでなく, 血液輸送能力や心筋梗塞, 動脈硬化の様な病理にも大きく関係している. また, 組織内での管腔構造の発達も機械的特性に影響する. さらに, 組織の機械的強度から細胞外マトリックスの含有量の評価も期待できる. 更

には, 外科的療法の自動化に際して 3 次元組織にダメージを与えることなくハンドリングするために, 硬さや柔らかさの情報が必要となる.

これまで我々は, 専用の引張試験システムと把持具 (Micro vacuum chuck: MVC) を用いることで 3 次元組織の機械的特性測定を行ってきた [1]. また, システムの改良に伴い, 吸引機構にフィードバック機能を付与することにより, 安定した吸引圧の発生を実現した. 更に専用のソフトウェアを開発し, 操作性の向上を行ってきた [2, 3].

本研究では, これら開発したシステムを用いて iPS 由来 3 次元心筋組織 (iPS-CM) に引張刺激を加え, この時の拍動特性を評価したので報告する.

2. iPS 由来 3 次元心筋組織の拍動特性評価

2.1 Micro vacuum chuck (MVC) の改良

3 次元積層細胞は一般的な材料に比べて機械的, 化学的に弱く, クランプや接着剤による把持は難しい. そこで, マイクロバキュームチャックを用いて積層細胞の両端を吸引固定することにより把持に成功した [1-3].

しかしながら, これまでの MVC は測定に際して先ず組織を培養表面から剥離する必要がある. 剥離した組織は初期張力により収縮し, 初期長さがサンプルごとに変化してしまうという問題があった. そこで, 我々は MVC に改良を施し, 培養表面に組織が接着している状態で組織を把持し, 確実に組織を把持した後に培養表面を除去することで初期長さを一定に保つことに成功した (図 1).

2.2 評価システム

測定システムは, 微小な張力を測定するための張力センサ, 組織を把持・固定するための把持具 (MVC), MVC に吸引圧を与えるための圧力制御器, 組織に引張刺激を与えるための自動ステージ, 及びこれらの機器を統合的に制御する専用ソフトウェアから成る.

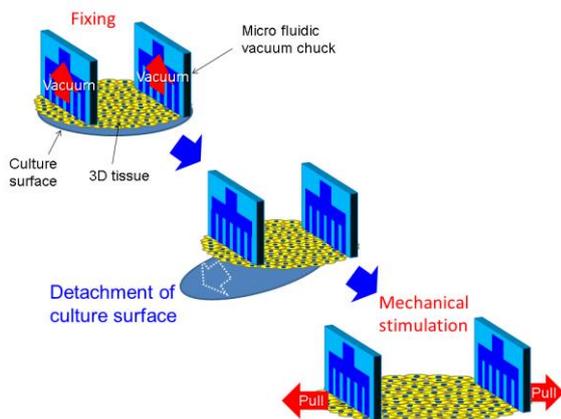


Fig. 1 Procedure for fixing of 3D tissue by MVC.

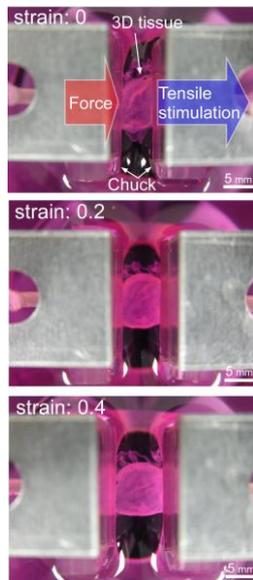


Fig. 2 Photo of tensile test of 3D cardiac muscle tissue.

1.3 iPS 由来 3 次元心筋組織の拍動力測定

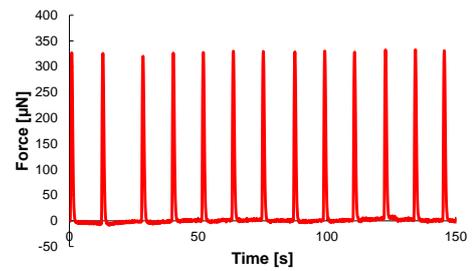
iPS 細胞由来心筋細胞 (iPS-CM) を 75% (7.5×10^5 個), 血管内皮細胞 (HMVEC-C) を 10% (1×10^5 個), 心筋線維芽 (NHCF-V) を 25% (2.5×10^5 個) 混合し, 12well インサート内で培養した. それぞれの細胞の表面は Layer by Layer 法によりフィブロネクチン, ゼラチンが 9 層コートされている[4, 5]. 培養期間は 10~16 日間とし, それぞれの培養日数に対してサンプルを用意した. MVC を用いて組織を測定システムに固定し, ステップ状のひずみを与え, 各ひずみにおける拍動力を測定した.

3. 結果と考察

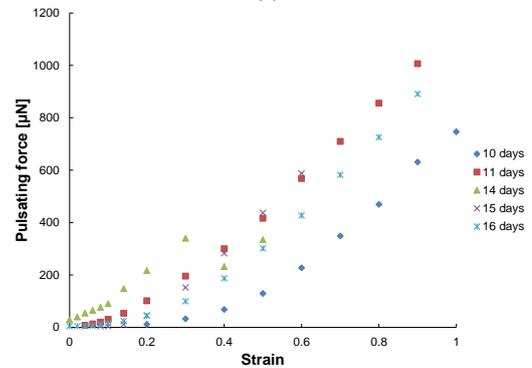
図 2 に iPS-CM に引張刺激を加えている様子を示す. 改良した MVC により組織の初期長さが変化することなく, 把持, 引張刺激の負荷が確認できた. 図 3-(a) に測定した拍動の一例を示す (Strain: 3.0). 等間隔で力も一定な拍動が観察されたが, ひずみ量が増加すると拍動は安定した. 図 3-(b) に培養期間に対する拍動力の変化を表す. どの培養日数においても, ひずみ量の増加に合わせて拍動力が増加することが確認でき, その拍動力は最大時で 1 mN を超えていた. 拍動力は培養日数が 10 日以上経っても低下することが無かった. このことから, 培養期間が 10 日を過ぎても, 組織の性能は落ちない可能性が考えられる. 図 3-(c) に培養期間に対する周波数特性の変化を示す. 培養日数 14, 15, 16 日目のサンプルにおいてひずみ量の増加に対する周波数の増加が確認された. これは 14 日目以降も組織の成熟が更に進んでいる可能性を示している.

4. 結言

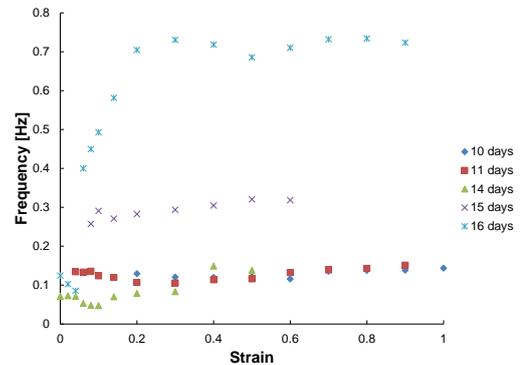
本研究にて我々は, これまで報告してきた 3 次元組織機械的特性測定システムに改良を加え, 培養日数に対する iPS-CM の拍動特性評価を行った. その結果, 培養期間が 10 日経っても引張力が低下することなく, ひずみ量の増加に伴い引張力は増加した. また, 14 日目以降, ひずみ量の増加と共に拍動周波数が急激に増加することから, 14 日目以降も組織の成熟が進んでいることが示唆された. 今回は, 培養日数によってサンプルが異なるが, 今後は組織を把持したまま長期培養し, 同一の組織で培養日数に対する拍動特性の変化を観察したい.



(a)



(b)



(c)

Fig. 3 Pulsating properties of iPS-CM.

参考文献

- [1] K. Uesugi, A. Nishiguchi, M. Matsusaki, M. Akashi, K. Morishima, "Evaluation System for Mechanobiology of Three-Dimensional Tissue Multilayered In Vitro", Proceedings of Micro-NanoMechatronics and Human Science 2015, pp. 336-338, 2015.
- [2] 上杉薫, 日浦綾美, 塚本佳也, 島史明, 明石満, 森島圭祐 "3次元組織の機械的特性評価を目的とした試験システムの統合, およびその操作性の向上", 第34回ロボット学会学術講演会, 山形, 1U2-06 (2016.9)
- [3] K. Uesugi, K. Fukumoto, F. Shima, S. Miyagawa, Y. Sawa, M. Akashi, and K. Morishima "Micro fluidic vacuum chuck system for handling of regenerative three dimensional tissue" Proceedings of the 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS 2016), pp.671-672 (Oct 2016)
- [4] A. Nishiguchi, H. Yoshida, M. Matsusaki, M. Akashi, "Rapid Construction of Three-Dimensional Layered Tissues with Endothelial Tube Networks by the Cell-Accumulation Technique," Adv Mater, 23, 31, 3506-3510, 2011.
- [5] Y. Amano, A. Nishiguchi, M. Matsusaki, H. Iseoka, S. Miyagawa, Y. Sawa, M. Seo, T. Yamaguchi, M. Akashi, "Development of vascularized iPSC derived 3D-cardiomyocyte tissues by filtration Layer-by-Layer technique and their application for pharmaceutical assays," Acta Biomater, 33, 110-121, 2016.