

ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた自己拍動能を有する組織体の作製と動的力学挙動の評価

栗田, 寛子

<https://hdl.handle.net/2324/6787649>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

令和4年度
博士学位論文

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた
自己拍動能を有する組織体の作製と
動的力学挙動の評価

九州大学大学院総合理工学府物質理工学専攻
東藤研究室

氏名 栗田 寛子
指導教員 東藤 貢

目次

第1章 序論	1
1.1 研究背景	2
1.1.1 心疾患の治療のための再生医療	2
1.1.2 iPS細胞由来心筋細胞	8
1.1.3 心筋の拍動メカニズム	12
1.1.4 心筋の理論モデル	16
1.2 本研究の目標	19
第2章 hiPS-CMシートの作製と変形挙動の評価	22
2.1 はじめに	23
2.2 実験方法	23
2.2.1 細胞培養方法	23
2.2.2 hiPS-CMシートの作製方法	27
2.2.3 拍動挙動の計測方法	29
2.2.4 Ca^{2+} 変動の評価方法	30
2.2.5 免疫染色法	32
2.2.6 デジタル画像相関法	34
2.2.7 ひずみ変動の計測方法	38
2.3 ひずみ変動理論モデル	40
2.3.1 サルコメア能動的応力	40
2.3.2 粘弾性理論モデル	42
2.4 結果と考察	44

2.4.1	構造と拍動挙動および Ca^{2+} 変動	44
2.4.2	拍動に伴うひずみの時間変動	54
2.4.3	応力-ひずみ挙動	57
2.5	小括	62
第3章 hiPS-CM チューブの作製と内部流動特性の評価		64
3.1	はじめに	65
3.2	実験方法	65
3.2.1	PDMS チューブ作製方法	65
3.2.2	hiPS-CM チューブ作製方法	68
3.2.3	拍動挙動の計測方法	70
3.2.4	流動の計測方法	70
3.3	流動予測モデル	73
3.4	結果と考察	75
3.4.1	拍動挙動と流動特性	75
3.4.2	理論モデルと実験結果の比較	82
3.5	小括	89
第4章 hiPS-CM チューブの変形挙動評価と理論モデルの構築		91
4.1	はじめに	92
4.2	ひずみ変動の計測方法	93
4.3	ひずみ変動理論モデル	93
4.3.1	粘弾性 Maxwell モデルを用いた理論モデル	93
4.3.2	粘弾性 Voigt モデルを用いた理論モデル	94

4.4	結果と考察	96
4.4.1	拍動に伴うひずみの時間変動	96
4.4.2	Maxwell モデルと実験結果の比較	98
4.4.3	Voight モデルと実験結果の比較	101
4.4.4	能動的応力-最小主ひずみ関係の導出	105
4.4.5	hiPS-CM シートと hiPS-CM チューブの比較	108
4.5	小括	113
第 5 章 PME A 類似体上で培養した hiPS-CM の細胞機能評価		115
5.1	はじめに	116
5.2	実験方法	117
5.2.1	PMEA 類似体のコーティング法	117
5.2.2	水滴接触角の測定法	120
5.2.3	hiPS-CM の播種方法	121
5.2.4	細胞接着形態の評価法	122
5.2.5	細胞数の測定法	122
5.2.6	拍動コロニー面積の評価法	123
5.2.7	収縮挙動の測定法	124
5.3	結果と考察	124
5.3.1	PMEA 類似体コーティング基板の評価	124
5.3.2	細胞接着面積	126
5.3.3	hiPS-CM 拍動コロニーの評価	129

5.4 小括.....	138
第 6 章 総括.....	140
参考文献.....	147
謝辞.....	162

第 1 章 序 論

1.1 研究背景

1.1.1 心疾患の治療のための再生医療

虚血性心疾患は国内外含め主要な死亡原因であり，その治療技術の開発と向上が求められている．虚血性心疾患の代表的な治療法として，薬物療法やカテーテル治療法が挙げられるが，それらの治療法においても症状の改善が見込めない場合においては，ドナー臓器移植や補助人工心臓を用いた治療が行われる．一方，これらの治療法はドナー不足，合併症の発症，拒絶反応，移植後の生活の不自由さ，経済的負担などの様々な問題を抱えている[1-5]．

そこで近年，これらの問題を解決するために，事前に培養した健康な細胞を体内に移植することで生体機能を改善する再生医療による治療法の確立が期待されている(Fig.1.1)．過去の研究例として，心筋細胞や血管内皮細胞に分化可能な間葉系幹細胞が含まれている骨髄単核球細胞を冠動脈投与することで左心室機能の改善が検討された[6-8]．その結果，いくつかの研究においてプラセボ群と比較し改善が確認できたが，その細胞接着率の低さから臨床応用への有効性が不十分であると指摘された．続いて，心臓への直接の細胞移植が検討されたが，外科的手術との併用によって改善効果が見込まれたものの，心機能の保持の面

において問題点が指摘された[9]。また、心筋細胞は成熟に伴い増殖・分裂能を喪失することから、胎児期の心筋細胞[10]や筋芽細胞[11,12]、心筋前駆細胞[13]、内皮前駆細胞[14]、幹細胞[15,16]の細胞移植研究が実施された。しかし、細胞を直接注入する手法では、移植された細胞の形態制御は困難であり、臨床応用には十分でないと考えられた。そこで、細胞注入法ではない新たな再生治療法として、組織工学を応用し、細胞と足場材を組み合わせて作製された三次元組織体を移植する手法を用いて臨床応用に向けた研究が行われた[17]。過去の多くの研究で、生体適合性と柔軟性をもつ『細胞外基質』を構成する材料を細胞の足場として用いることで、細胞の機能を維持した状態での三次元組織体の作製を試みた。例えば、Zimmermannらは新生児ラット心筋細胞とコラーゲンを組み合わせた心筋組織を作製し、それをラット心筋梗塞モデルに移植し、心臓の拍動機能の改善を確認した[18]。また、細胞の注入法とは異なり足場を用いた構造体は成形が可能な点から、Jockenhoevelらはフィブリンゲルと筋線維芽細胞を組み合わせた心血管構造体を作製した[19]。これらの研究例のように細胞外基質を足場とすることで、細胞接着性は向上し心疾患の有効な治療法として期待された。しかしその一方で、天然成分は生体内で炎症を引き起こす危険性がある点が臨

床応用における欠点だと指摘され、その問題を解決するために足場を用いない三次元細胞組織の作製方法の確立に向けた研究が行われた[20].

足場を用いない細胞組織の作製に向けた研究として、組織シート工学技術の発展に伴い、細胞のみで構築する心筋シートの作製が可能となった。細胞支持体のない状態で、細胞-細胞間接着と細胞-細胞外マトリックスの接着のみで形状を維持した細胞シート状組織体の作製手法は、東京女子医科大学の岡野らの研究チームによって確立された[21]。ディッシュ表面に温度応答性ポリマー(PIPAAm) (Poly-N-isopropylacrylamide)を共有結合で固定化しており、特定の温度範囲でディッシュ表面の親水性-疎水性を変化させることが可能である。例えば、32°C以上での細胞培養環境下ではPIPAAmは疎水性を持ち、ポリマー鎖が凝集することで細胞接着状態を維持しているが、32°C以下では表面が親水性となり、細胞非接着表面となる(Fig.1.2)。この性質を応用し、ディッシュ内でコソフルエントに達するまで細胞を培養したのちに、ディッシュを低温状態にすることで、無傷の細胞シート状組織体をディッシュから回収することが可能である[22,23]。清水らは、新生児ラット心筋細胞を用いた心筋シートを積層化することで厚みのある三次元組織体を作製し、ラットの皮下組織に移植すること

で血管組織の構築と拍動性心筋組織体の作製に成功した[24]. さらに、積層化するシートの積層枚数を増やすことでより大規模な組織体の移植を可能にするため、複数段階で心筋シートを移植することで、各心筋シート層に血管新生を起こすことが可能となり、細胞組織体が壊死することなく厚みのある心筋組織の移植に成功した[25]. また、細胞シートを用いた心疾患の治療法の有効性は、骨格筋由来細胞シートを移植することで動物の心不全モデルで心筋症の改善したことで確認された[26,27]. これらの研究を踏まえ、虚血性心筋症や拡張型心筋症患者に自家骨格筋由来細胞シートを移植する臨床研究が実施された. その結果、左心室の駆出力の向上が確認されたうえに腫瘍性病変も確認されず、細胞シートの移植が心機能障害への安全かつ有効な治療法であることが明らかとなった[28,29].

その他の細胞を用いた治療法としては、マウス胚性幹細胞由来心筋細胞[30]や間葉系幹細胞[31]においても、心疾患の治療に向けた細胞シートの作製が検討された. 最近では、iPS細胞を用いた心疾患の再生医療研究も進んでおり、次節でその詳細について述べる.

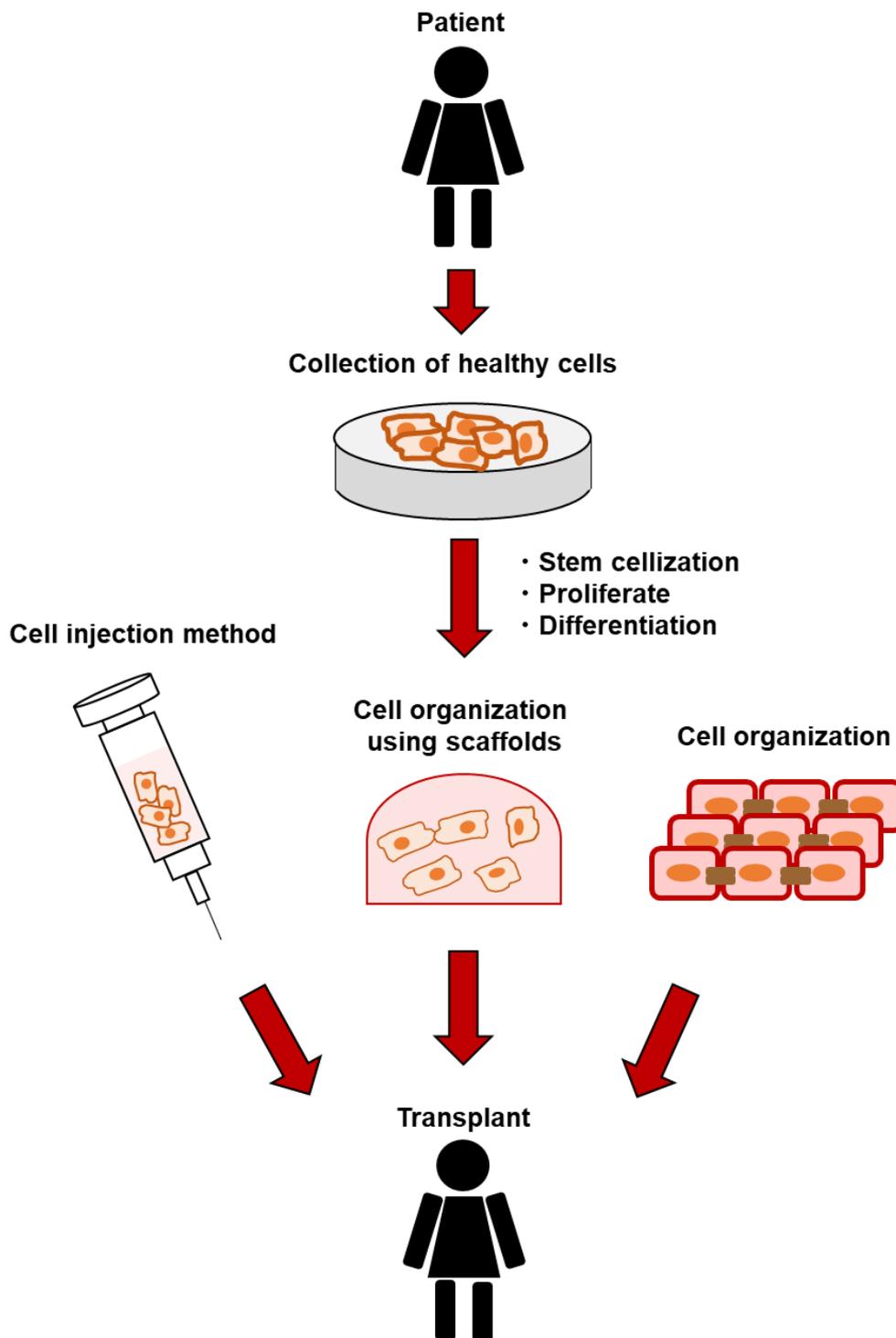


Fig.1.1 Regenerative medicine-based treatments

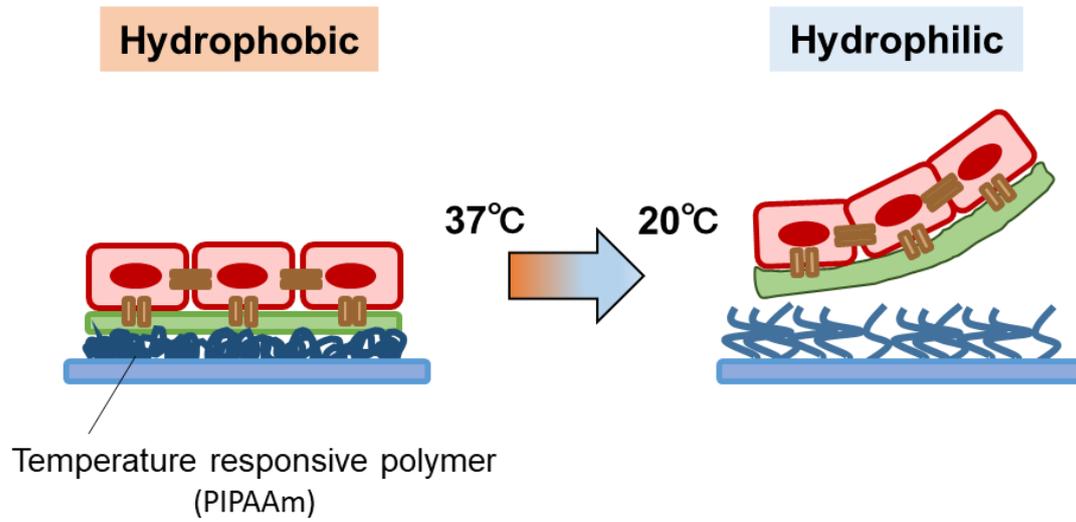


Fig.1.2 Mechanism of temperature-responsive polymer-coated dish

1.1.2 iPS 細胞由来心筋細胞

iPS 細胞は、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell)と呼ばれる幹細胞の一種であり、体細胞に誘導因子を導入することで、神経細胞や心筋細胞など様々な組織の細胞に分化可能な細胞である(Fig1.3)。また、理論上無限に増殖するという特徴も持ち合わせている[32]。京都大学の山中らにより、2006年にマウス胚性線維芽細胞を用いて iPS 細胞の樹立に成功したことが発表された[33]。さらに、2007年にはヒト皮膚線維芽細胞から iPS 細胞の作製に成功し、医療用途の応用への期待が高まった[34]。また、iPS 細胞から心筋細胞へと分化する技術が確立したことで、心疾患への新たな治療法として研究が進められた[35,36]。

遠山らは乳酸を用いることで心筋細胞を生存状態で選別することを可能にし、未分化の iPS 細胞を含まない高純度の心筋細胞の作製に貢献した[37]。さらに、アクティブガス循環システムを搭載した多層培養プレートにより、ヒト iPS 心筋細胞の効率的な大量生産を可能にした[38]。このような心筋細胞への分化率、均一性の向上や大量培養技術の発展に伴い、基礎研究用の iPS 細胞が市販されるようになり、ますます iPS 細胞の基礎的知見を得るための研究が様々な分野で盛んに進められることとなった。

iPS 細胞樹立前には、再生医療分野では ES 細胞(胚性幹細胞)に関する研究が多く行われてきた。ES 細胞は着床前の胚から分離された細胞であり、様々な細胞へと分化可能な幹細胞の一種である [39,40]。一方、ES 細胞は動物の胚を破壊して作製される点から再生医療への応用において倫理的問題を抱えている。さらに、移植の際には他者の胚を用いて作製された ES 細胞を移植するため、移植後に拒絶反応を引き起こす危険性がある。以上のことから、自身の体細胞から作製可能な iPS 細胞は臨床応用により適していると考えられる [41,42]。さらに iPS 細胞から分化した心筋細胞は生体内の心筋細胞に似た性質を持つことも明らかとなっている [43]。

iPS 細胞を用いた臨床応用に向けた過去の研究として、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞をラット心筋梗塞モデルに移植することで心機能の回復が確認でき、移植後 1 カ月の心臓にも移植した iPS 心筋細胞が確認できた [44]。また、細胞注入法だけでなく、前章で記述した細胞シート構築技術を用いた研究も行われた。例えば、2012 年の川村らの研究では、ブタ虚血性心疾患モデルにヒト iPS 細胞由来心筋シートを移植することで心機能の回復を確認した [45]。さらに、ヒト iPS 細胞を心筋細胞と血管細胞へ分化させ、そこから作製した心筋シートをラット

の心筋梗塞モデルに移植することで、心機能の回復と新たな血管が構築されていることが明らかとなった[46]。また、動物モデルでの研究に限らず、2020年には大阪大学心臓血管外科においてヒト iPS 細胞由来心筋シートを重症心不全の患者へ移植し、ヒトへの移植の有効性が明らかとなった[47]。

今後の再生治療法ではシート組織体の移植だけでなく、生体内の臓器に替わる三次元組織体を *in vitro* で作製し、移植する臓器再生医療が期待されている[48,49]。細胞から臓器レベルの大規模な三次元組織体の作製は技術的に困難であると言われているが、2021年に慶応義塾大学でヒトにも応用可能なサイズのバイオ人工肝臓の作製に成功した。人工肝臓にはブタ細胞が使われたが、今後はiPS細胞を用いることで臨床応用への実現を目指している[50]。一方、心臓については未だに人工臓器のような組織体は実現されていないが、iPS心筋を用いた三次元組織体に関する研究が実施されている[51,52]。

上述のとおりヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた再生医療および組織工学的研究は進展しているものの、その一方で力学的観点からの研究は少ない状況である。次節では、心筋の基本的力学挙動である拍動について、そのメカニズムを解説する。

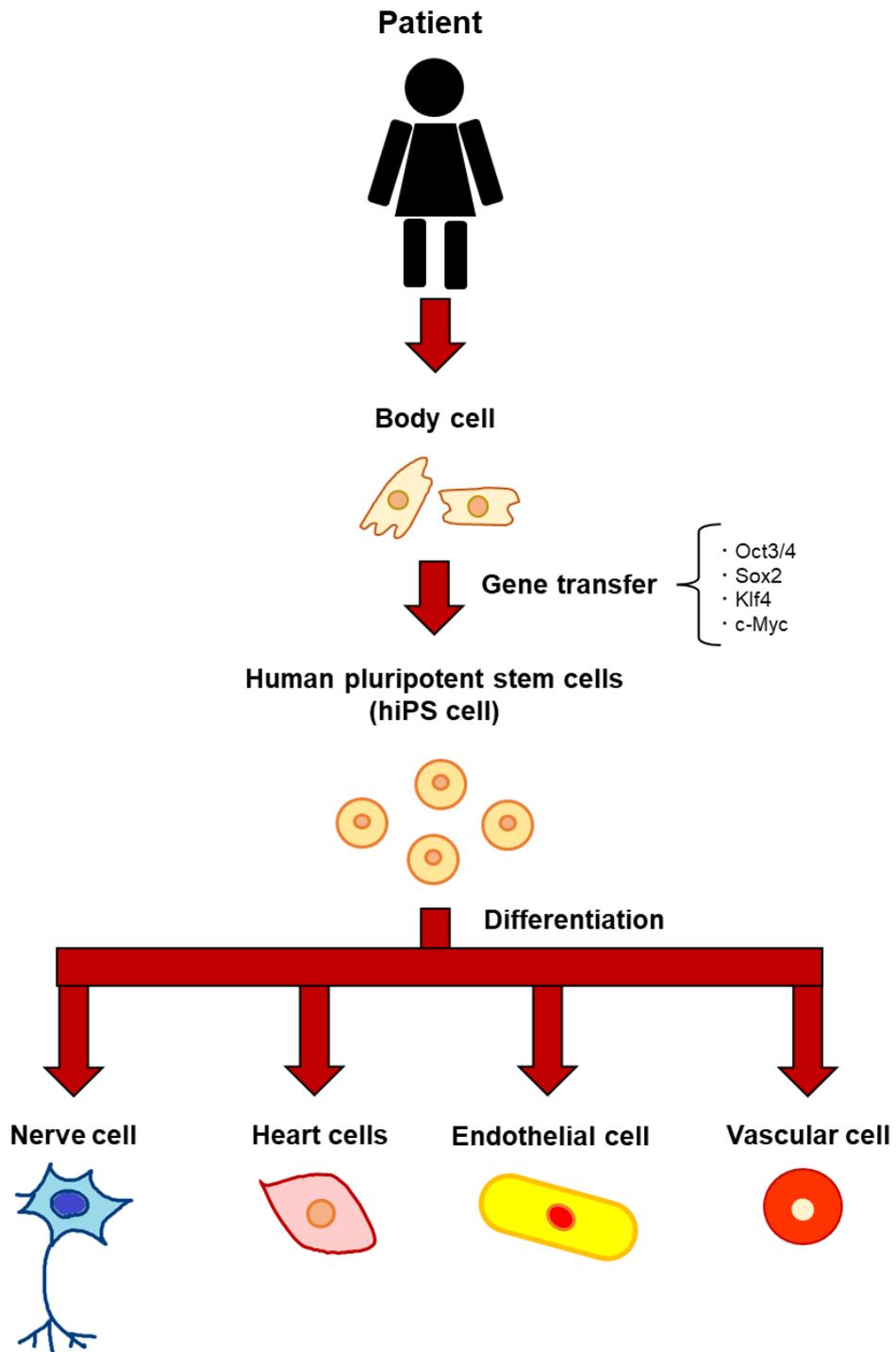


Fig.1.3 Applications of iPS cell technology

1.1.3 心筋の拍動メカニズム

心臓は、心筋細胞が接着細胞間で同期した自己収縮と弛緩を繰り返すことで自発的に全身に血液を循環させるポンプとして機能している。一般的に、安静状態の健康な成人で、1分間に60~100回程度の規則正しい拍動を繰り返している。心臓は心筋細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞等などのさまざまな細胞から構築されているが、なかでも心筋細胞は心臓全体の25~30%を占めており、心臓を拍動させるうえで必要な筋肉を構成する筋細胞の一種である[53,54].

心筋細胞の自己収縮は、刺激伝導系の働きによって発生しており、心臓では、右心房付近に存在する洞房結節から発生した電気信号が隣接している分極状態の心筋細胞のギャップ結合を介して伝導することで、生理的ペースメーカーとしての役割を担っている。洞房結節のなかにあるペースメーカー細胞は、自律神経の影響を大きく受け、交感神経刺激にアドレナリン β 1 受容体が応答することで、ペースメーカー細胞が電気的信号を生み出している[55,56].

洞房結節から伝導した電気信号が心筋細胞に到達したことをきっかけに、分極状態にあった心筋細胞の細胞内に Na^+ が流入する。 Na^+ の流入により、細胞内

の電位が上昇し脱分極状態となる。その後、閉じたナトリウムチャンネルについてカルシウムチャンネルが開くことで、細胞外から Ca^{2+} が流入することで脱分極状態が維持され、この脱分極時に心筋細胞の自己収縮が発生する。その後、 Ca^{2+} は筋小胞体に吸収され、細胞内 K^+ の流出によって電位は下降し、再度分極状態(弛緩状態)となる。以上のようなメカニズムで心筋細胞が分極状態と脱分極状態を繰り返すことで心臓の周期的な拍動が生じる [57,58].

心筋細胞内では、自己的に筋繊維の収縮運動を引き起こすことで、組織レベルの拍動が発生する。筋原線維を構成する筋節(サルコメア)は、ミオシンと呼ばれる太いフィラメントとアクチンと呼ばれる細いフィラメントが重なるように交互に並んだ構造をしており、ミオシンとアクチンの滑り運動により収縮運動が発生する。心筋細胞の収縮の模式図を Fig.1.4 に示す。脱分極時の細胞内に流入した Ca^{2+} と筋小胞体に貯蔵されていた Ca^{2+} がアクチンフィラメント上のトロポニンと結合することで、ミオシンとアクチンの相互作用が可能となる。ミオシン分子は、細胞内ミトコンドリアから産出された ATP(アデノシン三リン酸)を ADP と無水リン酸に加水分解する機能を持っており、その際に発生する化学エネルギーが運動エネルギーに変換されることで、アクチンはミオシン方向(中

心方向)に滑り運動を引き起こし、筋節の収縮が発生する。ミオシン分子は運動を引き起こす分子として、モータータンパク質とも呼ばれている[59,60]。心筋細胞内の拍動に関連した生化学的な反応の概要を Fig.1.5 に示す。次節では、心筋運動の理論的モデルについて概説する。

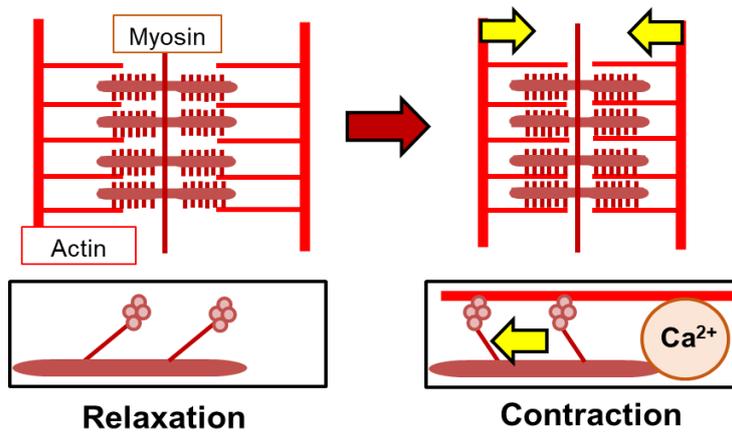


Fig.1.4 Schematic of cardiomyocyte contraction

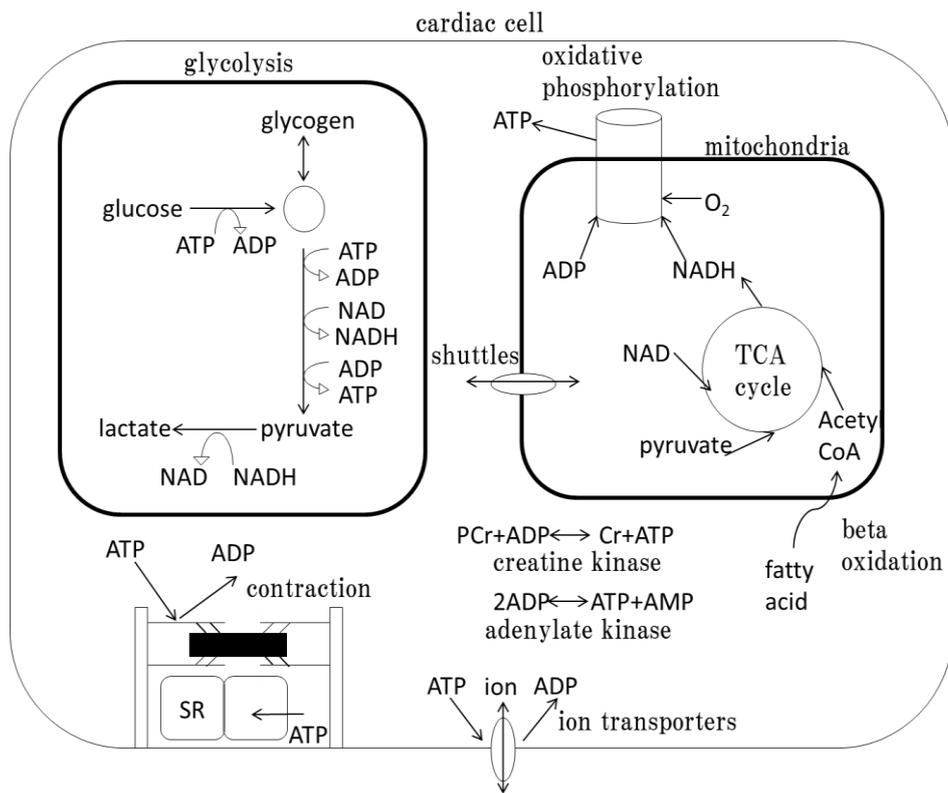


Fig.1.5 Biochemical mechanism of cardiomyocyte contraction

1.1.4 心筋の理論モデル

心臓の自己拍動は、固体力学・流体力学・電気・生化学などの様々な原理が関連して発生する複雑な現象であることから、理論モデルを確立し、シミュレーションモデルとしてモデリングすることの有用性が古くから認識されている。これまで、1960年に Noble らは心臓の電気生理学的特性の数値シミュレーションを実施し、それに続き Yoram らによって細胞膜でのイオンチャンネルのモデル化が行われた[61,62]。一方、心臓の機械的特性に関して理論モデルを用いて再現する研究は、1914年に E. H. Starling らによってはじめられ、心室の動きを表すモデルを提案した[63]。さらに、計算科学とコンピューターの性能の向上に伴い、様々な物理現象を組み込んだモデルの構築が可能となり、Negroni らは細胞内の生化学的な現象と機械的な現象を組み合わせたモデルを提案した[64]。

心臓自己収縮に関する物理現象を再現するシミュレーションモデルは、生体組織のもつ特性への理解だけでなく、医療分野において実用可能なモデルの構築が期待された。そのため、分子レベル・細胞レベルでの理論モデルだけでなく、臓器レベルでの現象まで再現することが可能なマルチスケール性とマルチフィジックス性を兼ね備えた理論モデルの構築が必要となった(Fig.1.6)。そこで、東

京大学では、分子レベルの細胞膜電位特性から臓器レベルの心臓壁運動の条件や血流特性を組み込んだ UT-Heart という心臓シミュレーションモデルが開発された[65-67]。本モデルは、CT で撮影した患者の心臓からモデリングすることが可能であることから医療用シミュレーターとして応用が可能である。さらに、医療機器の開発・インフォームドコンセント・術前のシミュレートに用いることで、医療の発展にも大きく貢献できる心臓シミュレーションモデルである。

一方、今後再生医療分野での活躍が期待されている iPS 心筋においても、患者固有のモデリングは期待されており、そのために iPS 心筋自己拍動挙動の基礎的知見を集めることが重要である。これまで iPS 心筋の機械工学的特性を明らかにするための過去の研究はいくつか行われている。例えば、Abulaiti らはハートオンチップマイクロデバイスを確立し、ヒト iPS 心筋の自己収縮機能の評価を試みた[68]。また、Uesugi らはヒト iPS 心筋から構築した三次元組織体の引張試験システムを構築し、その力学評価が実施した[69]。さらに、細胞を損傷することなく測定する手法として、画像解析によってその拍動挙動の評価が行われた[70]。しかし、ヒト iPS 心筋の自己収縮力の力学特性を明らかにする研究は未だに少なく、理論モデルを用いた実験結果との比較などはほとんど行われ

ていない。

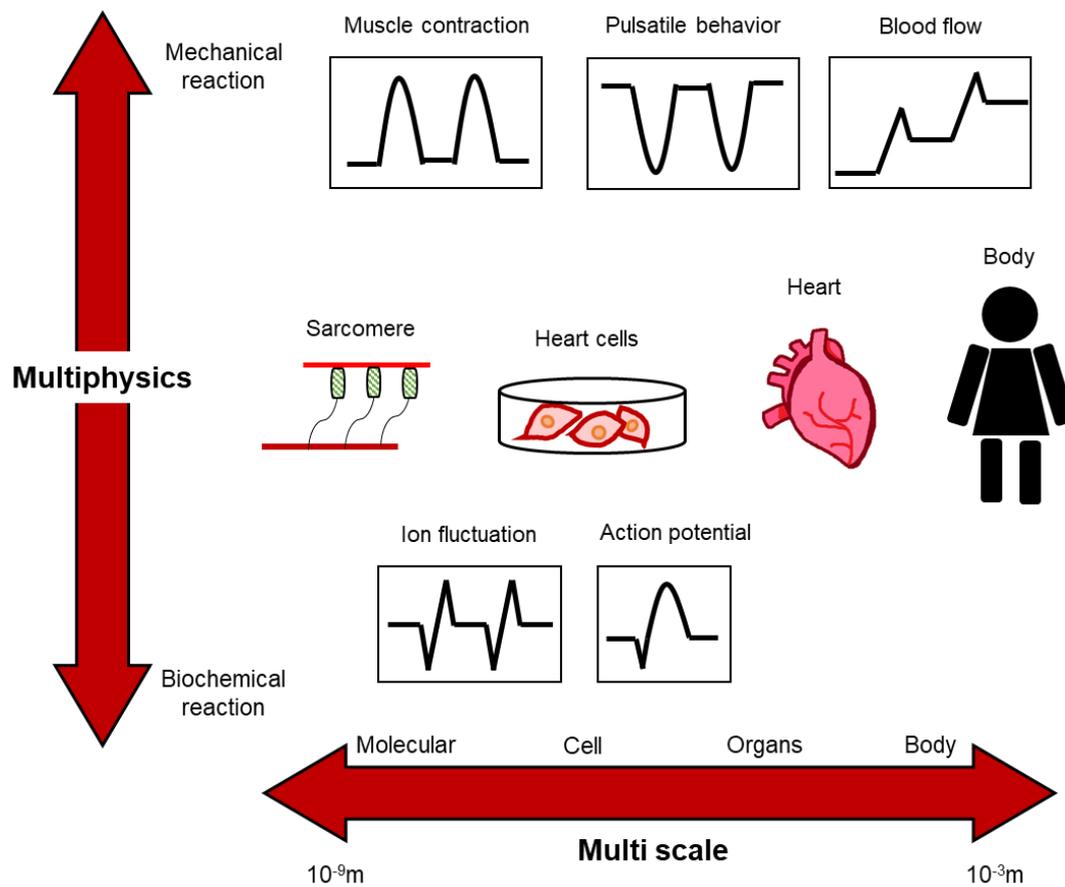


Fig.1.6 Multiscale and multiphysics phenomena in cardiomyocytes

1.2 本研究の目標

ここで前章までの背景をまとめる。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞(以下, hiPS-CM)は再生医療分野での臨床応用の本格化が期待されている一方で, 臓器に代替するレベルの三次元組織体の作製には様々な課題が残されている。さらに, hiPS-CM から作製する組織体について定量的な動力的評価を実施した研究は未だに少ない。一方で, 心筋細胞の持つ複雑な収縮メカニズムは化学的・電氣的・機械的エネルギーの変換機構を組み込んだ数理モデルに基づくコンピュータシミュレーション解析により定量的な評価が可能である。しかし, hiPS-CM においてその拍動挙動を再現する理論モデルと実験モデルの比較は行われていない。

以上の現況を踏まえ, 本論文の最終目標は hiPS-CM と足場材を組み合わせることで心臓の基本的なポンプ機能を兼ね備えた組織体を作製することである。本論文はそのための基礎的研究として, 以下に示す 3 つの研究目的から構成している。第 1 の目的は, hiPS-CM を用いた細胞組織体を構築し, その自己拍動挙動やそれに伴う駆動性能に関する動力的評価を行うことである。第 2 の目的は, その拍動挙動を再現する理論モデルを確立し, 作製した hiPS-CM 組織体の実験結果との比較を行うことである。最後に第 3 の目的は, 細胞を播種する足

場材料が hiPS-CM に与える影響を検討し、hiPS-CM の拍動力を十分に活かす組織体の作製を目指して、その自己収縮挙動に関する基礎的知見を得ることである。

以下に本論文の論文構成を記す。

第 2 章では、細胞シート工学技術を応用し hiPS-CM シートを作製し、その自己拍動挙動を定量的に評価した。さらに、粘弾性 Maxwell モデルと心筋の能動的応力モデルを組み合わせた理論モデルを構築し、実験モデルの拍動挙動の再現を試みた。

第 3 章では、hiPS-CM シートと PDMS チューブを組み合わせることで hiPS-CM チューブ状 3 次元組織体を作製した。自己拍動挙動や駆動性評価を行い、hiPS-CM チューブのもつポンピング機能を定量的に評価した。さらに、拍動に伴う hiPS-CM チューブの変形から駆動性の予測を行い、実験結果との比較を行った。

第 4 章では、第 3 章で作製した hiPS-CM チューブの自己拍動の再現に適した理論モデルの確立のため、粘弾性 Maxwell モデル・粘弾性 Voigt モデルの 2 つの理論モデルを構築した。それぞれの理論モデルと実験結果を比較することで

理論モデルの最適化を試みた。さらに、シートとチューブの 2 種類の組織体における自己拍動特性の比較を行った。

第 5 章では、成人の心筋細胞と比較して未成熟である hiPS-CM の自己拍動力の向上を目指して、結合水量の異なる 3 種類の PMEAA 類事体ポリマー上に hiPS-CM を播種しその細胞特性評価を行った。

第 6 章では、各章で得られた結論についてまとめ総括した。

第 2 章
hiPS-CM シートの作製と
変形挙動の評価

2.1 はじめに

本研究では、温度応答性培養ディッシュを用いて hiPS-CM シート状組織体を作製し、高速光計測システムを用いた hiPS-CM シートの自己拍動挙動の評価とデジタル画像相関法を用いた収縮変形挙動解析により hiPS-CM シートの機械的特性評価を行った。さらに、実験モデルの結果から明らかになった hiPS-CM の自己拍動に伴う変形挙動を再現する理論モデルの確立を目指し、Guccione らが提案した心筋細胞のサルコメアの能動的張力理論モデルと粘弾性 Maxwell モデルを組み合わせた理論モデルを構築した。

2.2 実験方法

2.2.1 細胞培養方法

本研究では、すでにプロテインフリー分化誘導法によって心筋細胞へと分化済みのヒト iPS 細胞由来心筋細胞 CarmyA(H-011106, マイオリッジ(株))を用いた。この細胞は、心筋細胞分化誘導時に 3 次元培養を行っていることから 2 次元での培養に比べ筋線維が成熟した細胞であり、過去の研究では心筋細胞の自己拍動による工学的評価や生化学的評価のための研究に用いられている

[71,72]. また、薬剤の応答性・ミトコンドリア活性・電氣的生理学的機能に優れていることから、疾患モデリングや薬剤スクリーニングへの応用にも有効であることが明らかになっている。さらに、心筋細胞への分化において、動物由来血清、サイトカイン、タンパク質を用いない培養方法である事から、低コストでロット均一性に優れている臨床グレードの心臓細胞である[73,74]。細胞は、凍結状態で心筋シングル細胞の均一接着保証された細胞(1.0×10^6 cells/vial)を購入し、液体窒素タンク内で凍結保存を行った。

下記に細胞の播種・培養方法を示す。hiPS-CM は心筋シートを作製する前に予め前培養を行った。凍結細胞は、37°Cのウォーターバスで3分間温め解凍処理を行った。Rock inhibitor(CultureSure® Y-27632, 和光純薬(株))を添加したCarmyA用の細胞播種用培地(ME-02, マイオリッジ(株))(以下、播種用培地)を細胞懸濁液に添加し、卓上小型遠心分離機(model 2420, 久保田商事(株))(Fig.2.1)を用いて細胞と上清液を分離させた($300 \times g$, 5分間)。上清液を抜き取り、分離させた細胞を細胞播種用培地で懸濁した後、細胞培養用24well平底プレート(Falcon®353047, Falcon®Corning Inc.)に播種した。播種後、細胞の接着性向上のため、カイコの繭から抽出した細胞培養基質ラミニン(iMatrix-511silk,

Matrixome Inc.)を 0.25 μ l 添加し、バイオクリーンベンチ内で 15 分間静置した (Fig.2.2). ラミニン-511 はヒト iPS 細胞培養に用いることで、非常に細胞接着性を向上させ、細胞間の結合の促進や生存性を向上させる特性を持つことが明らかとなっている [75]. クリーンベンチ内での静置の後、インキュベーター内で 7 日間培養を行った (Fig.2.3). 培養期間中は 1 日に 1 度 CarmyA 用維持培地 (ME-01, マイオリッジ(株))(以下、維持用培地)を用いて培地交換を行った.

細胞関連の実験は、細菌やウイルスなどの汚染から守るため、無菌操作を行う必要がある。あらゆる実験操作はすべてバイオクリーンベンチ内で行われており、使用前にはバイオクリーンベンチ内と器具を 70%エタノールで除菌した後、1 時間 UV 滅菌処理を施した。さらに、白衣の着衣・ゴム手袋を装着した状態で 70%エタノールを用いて消毒をした。また、インキュベーター内は 37°C, 5%CO₂ で満たされた環境になっている。細胞を長期間培養するインキュベーター内で庫内汚染を発生させないため、庫内を 70%エタノールで除菌処理した。

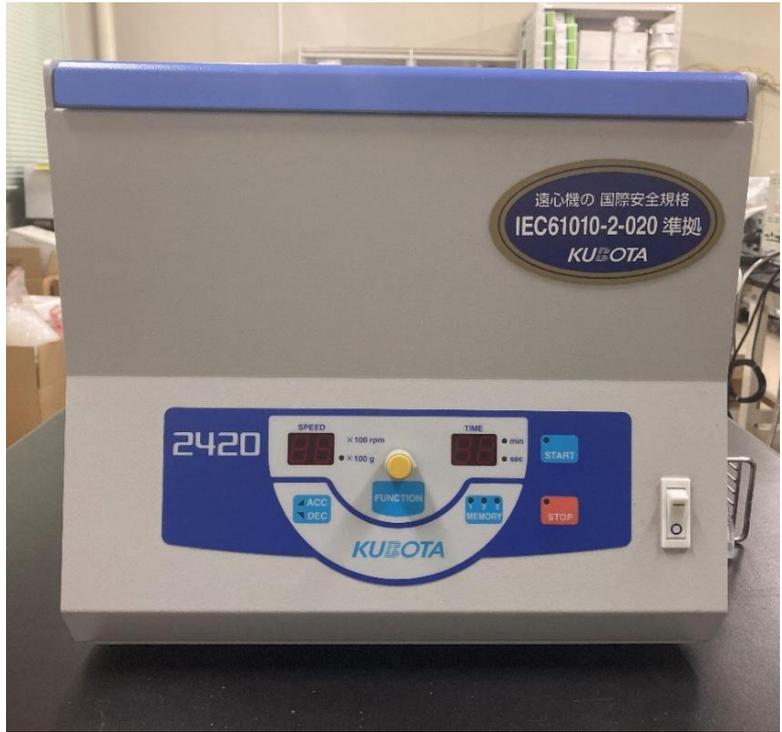


Fig.2.1 Small cell centrifuge



Fig.2.2 Bio Clean Bench



Fig.2.3 CO₂ incubator

2.2.2 hiPS-CM シートの作製方法

1.1.1 節で足場を用いることなく細胞のみで構成された細胞組織体の作製方法として記載した、温度応答性培養ポリマーがコーティングされたディッシュを用いて hiPS-CM シートを作製した[21]. 予め, 2.2.1 節で記載した手順で 7 日間の前培養を施した hiPS-CM は, タンパク質分解活性, およびコラーゲン分解活性をもつ酵素で処理することでディッシュから剥離した. 酵素処理の手順を下記に示す. まず 1000 μ l の PBS 溶液(PBS pH7.4, Thermo Fisher Scientific

Inc.)で2度接着細胞を洗浄した後,細胞剥離用酵素(Accutase™, Merck Millipore Co.)を250 μ l/well 添加し, インキュベーター内で2分間静置した. その後, ディッシュに Rock inhibitor を添加した播種用培地を1000 μ l 添加し剥離活性を停止させた. 細胞懸濁液を遠心分離機(300 \times g, 5分間)で分離させ, 上清液を取り除いた. ディッシュから剥離した細胞は Rock inhibitor 含有播種用培地で懸濁し, 24well 温度応答性ディッシュ (UpCell®, 24 Multi-well plate, CS3002, セルシード(株))へ播種した. 播種後, ラミニンを0.5 μ l 添加しクリーンベンチ内で15分間静置し, インキュベーター内で7日間の培養を行った. その後, 2日に1度の頻度で維持用培地を用いて培地交換を行った. 7日間の培養後, 下記の手順で心筋シートをディッシュから回収した. ディッシュに4°Cに冷却した維持培地を添加し, クリーンベンチ内(20°C)で15分静置することでディッシュ表面は親水性となり, 細胞非接着面となることから, 細胞間結合を維持した状態でシート状 hiPS-CM 組織体をディッシュから剥離した.

2.2.3 拍動挙動の計測方法

高速光計測システム (MiCAM03, ブレインビジョン(株)) を用いて hiPS-CM シートの拍動挙動を計測した。このシステムは、倒立顕微鏡と光学測定システムから構成されており、倒立顕微鏡 (CKX41, オリンパス(株)) に CMOS イメージセンサーを搭載したカメラを接続することで、高画質で高速の撮影が可能である。光軸が心筋シート表面に対して垂直になるように設定し、拍動挙動を 2 次元で観測した。撮影条件は 200fps-20 秒とし、撮影した連続画像データは画像解析ソフトウェア (BV Workbench, ブレインビジョン(株)) を用いて解析を行った。この解析ソフトでは、測定点の輝度値の経時変化を計測することが可能である。hiPS-CM シート部分は細胞が組織化していることから、ディッシュに対して光の透過率が低く、輝度値の低い状態となる。そこで、測定点をディッシュと心筋組織の境界に設定することで、hiPS-CM の動的な変形に伴い輝度値の変化が確認できる。つまり、測定点での輝度値の挙動は心筋組織の収縮挙動と一致していると考えられる。計測方法の概略図を Fig.2.4 に示す。本研究では、任意の複数点で測定を行った。

また、本研究で用いた高速撮影装置による拍動挙動の評価方法は、細胞を無染

色かつ非侵襲的に測定可能であることから、過去の多くの研究で細胞などの軟組織体を力学的に評価するうえで用いられている測定方法である[76,77].

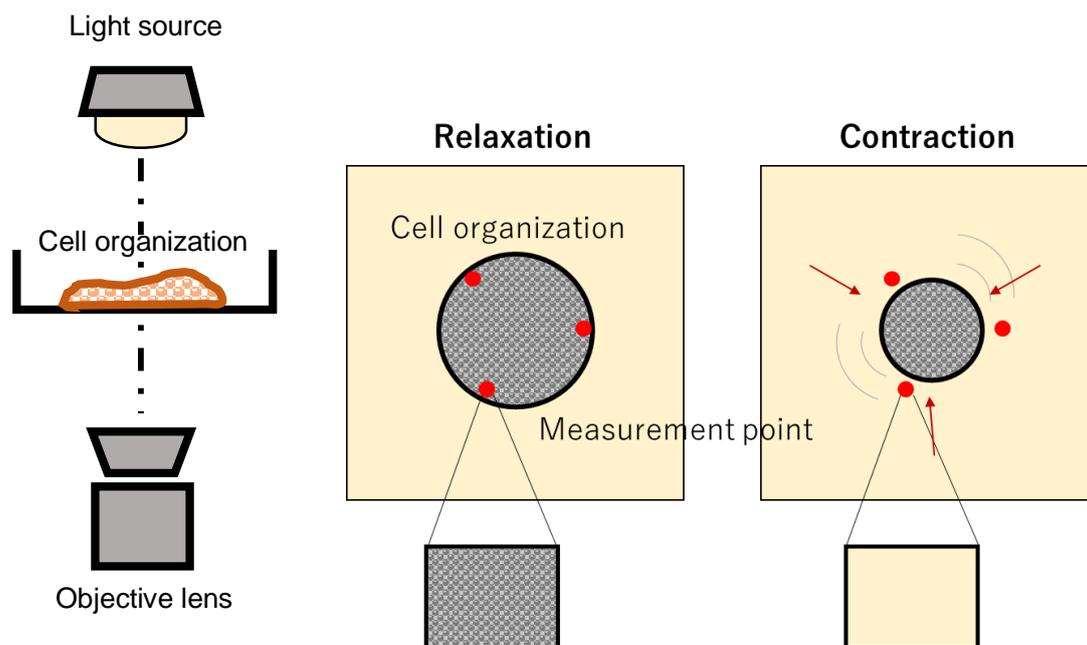


Fig.2.4 Method for measuring beating behavior using a high-speed optical measurement system

2.2.4 Ca^{2+} 変動の評価方法

Ca^{2+} は細胞内の情報伝達物質として働き、筋収縮などの生物活性に影響を及ぼす。蛍光指示薬等を用いて細胞内の Ca^{2+} 濃度を計測することで神経細胞や筋肉細胞の分子生理学的評価が可能である[78,79]. 本研究では、予め細胞内に Ca^{2+}

感受性蛍光プローブである G-Camp が導入されている hiPS-CM を用いて細胞内 Ca^{2+} 変動の評価を行った。G-Camp とは、2001 年に中井らの研究グループによって発明された Ca^{2+} センサータンパク質であり、オワンクラゲから発見された緑色蛍光タンパク質 (GFP : Green Fluorescent Protein) が組み込んであることから、非侵襲的に細胞内のカルシウムイオン挙動を観察することが可能である [80,81]。G-Camp の構造を Fig.2.5 に示す。GFP に Ca^{2+} 結合タンパク質カルモジュリンとミオシン軽鎖キナーゼの M13 断片がつながった構造をしており、 Ca^{2+} が結合すると、カモジュリンの形態が変化することで蛍光強度が変化する。 Ca^{2+} との反応時には、反応前に比べ蛍光が最大で 4.5 倍ほど増加することが明らかとなっている [82,83]。本研究では、予め細胞内に Ca^{2+} プローブ G-Camp が導入されたヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (G-011106, マイオリッジ(株)) を培養し、温度応答性ディッシュを用いて hiPS-CM シートを作製した。hiPS-CM シートは 2.2.2 節に示した条件と同様の手順で作製した。ディッシュから剥離した後、高速光計測システムに中心波長 465nm の高輝度 LED チップを搭載した光源 (LEX2-LZ4-G, ブレインビジョン(株)) を装着し、 Ca^{2+} と反応した G-Camp の蛍光強度の経時変化を測定した。測定した連続画像データは、前章で記した拍動

挙動の解析方法と同様、画像解析ソフトウェア BV Workbench を用いて計測点での蛍光強度の変化の測定を行った。

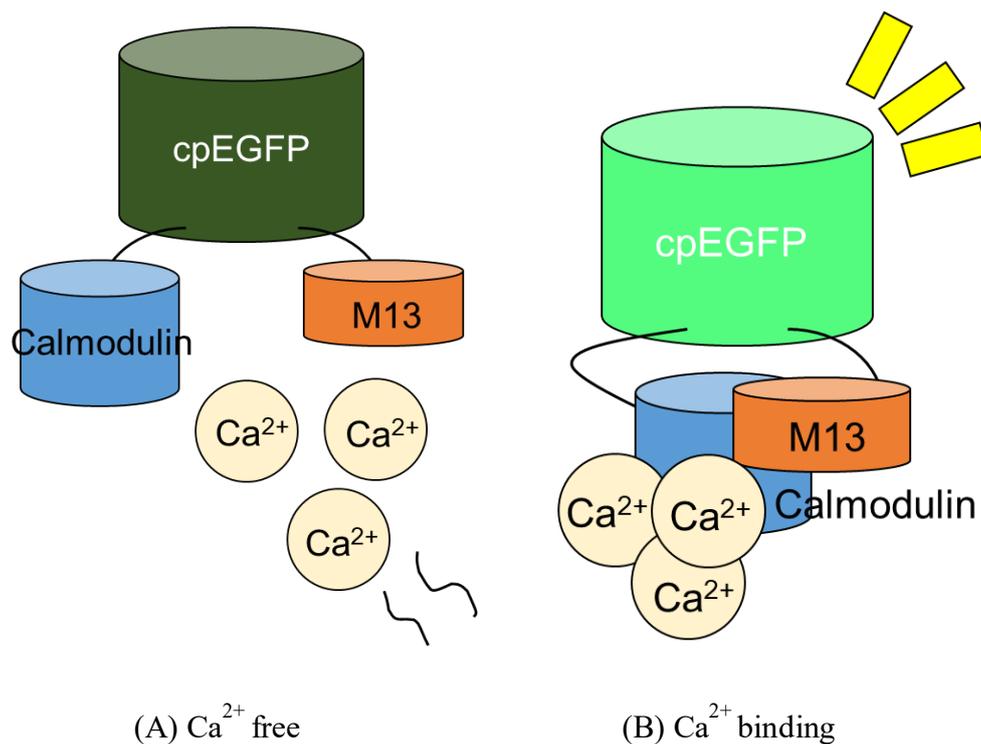


Fig.2.5 Emission mechanism of Ca²⁺ sensor protein Gcamp

2.2.5 免疫染色法

hiPS-CM シートの筋線維の配向性の評価のため、培養 7 日目の hiPS-CM 細胞内のサルコメア α -actinin の免疫細胞化学的分析を行った。 α -actinin はアクチン結合タンパク質であり、筋繊維を構築するサルコメアを区切る Z 膜に付着

することから、細胞内のサルコメア構造の形態を観察するうえで有効なタンパク質である[84,85]。染色方法の手順を以下に示す。

ディッシュ内の維持用培地を除去し、hiPS-CM シートを PBS で 2 度洗浄した。その後、4%パラホルムアルデヒド(PFA)(ナカライテスク(株))を添加後、室温(20°C)で 20 分静置し固定した。0.02% Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate 溶液(Tween20, ナカライテスク(株))(以下, PBST)で一度洗浄し、0.3%Polyethylene Glycol Mono-p-isoctylphenyl Ether 溶液 (TritonX, ナカライテスク(株))を添加して室温で 20 分インキュベートし、膜透過処理を行った。その後、PBST で 1 度洗浄し、Fetal Bovine Serum(FBS, Thermo Fisher Scientific Inc.)を加えた 6%FBS-0.1%TritonX 溶液(ブロッキング液)を添加し、室温で 1 時間インキュベートを行いブロッキングした。

次に、1 次抗体としてマウス由来のモノクローナル抗 α -アクチニン (Sigma-Aldrich Inc.) を 1/200 の濃度でブロッキング液に加え、12 時間 4°C でインキュベートした。12 時間後、PBST で 2 度洗浄し、1/1000 濃度でブロッキング液に調整したヤギ抗マウス IgG クロス吸着二次抗体(Alexa Flour 488, Thermo Fisher Scientific Inc.)を加え、室温で 30 分間インキュベートした。PBST で 1 度洗浄

した後、封入処理を行った。スライドガラス上に hiPS-CM を設置し、ソフトマウント（和光純薬(株)）で封入した。また、カバーガラス(C018241, 厚さ 0.13 ~0.17mm, Matsunami Glass Ind., Ltd.)はマニキュアを用いてシーリングを行った。

続いて、共焦点レーザー顕微鏡（Leica DMI4000B, Leica microsystems Inc.）を使用し 488nm レーザーを照射することにより微細構造を観察した。

シート化していない hiPS-CM 単細胞のサルコメア構造の測定のため、予め 7 日間同条件で前培養を行った hiPS-CM をカバーガラス上に播種し、上記の方法で染色を行った。撮影した画像データは画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて筋線維の配向性を測定した。画像に対して横軸方向(X軸)を固定軸とし、固定軸からの筋線維方向角度を測定した。

2.2.6 デジタル画像相関法

材料の変形挙動を定量的に明らかにすることは、固体力学の分野で必要不可欠である。その一つの評価方法として、過去の多くの研究でデジタル画像相関法 (Digital Image Correlation : DIC)が用いられてきた[86-88]。デジタル画像相関

法とは、変形前後の画像データから物体表面の変形を計測する手法であり、非接触状態で面や立体の変形やひずみの解析が可能である。このことから、高温・低温環境下[89,90]、腐食性材料[91]など、それぞれの材料と測定条件に合わせた環境での評価が可能である点が大きな特徴である。デジタル画像相関法の解析原理を次に概説する。

1 台の CCD カメラを用いて撮影した光学画像データにより、2次元平面上変形解析が可能である。撮影した変形前の材料表面上にサブセットと呼ばれる相関を取る微小領域($N \times N$ 画素)を設定し、サブセット内のランダムパターンを追跡することで材料の変形方向と変位を求めることが可能である。デジタル画像相関解析の概略図を Fig.2.6 に示す。また、同一の解析法を用いて2台以上のカメラで撮影した画像データを解析することで、3次元での変形挙動の解析が可能である。サブセットの正確な追跡には、材料表面のランダムパターンが必要不可欠である。その為に、金属材料などの解析の際には表面にスプレーを塗布しランダム模様を描くことで正確な解析が行われるが、本研究では細胞に直接スプレーを塗布することが困難なことから、細胞組織体とディッシュの境界を計測している。

また、前述のとおりデジタル画像相関法は非侵襲での測定が可能である点から、金属材料だけでなく生体材料への応用も可能である[92,93]。これまでの研究例としては、生体内のヒト軟組織の材料特性の評価のためにシリコーンゲルで作製した軟組織体をピストンで圧縮し、その変形挙動から力学特性評価を行う研究が実施された[94]。さらに、単一のヒト iPS 細胞由来心筋細胞を撮影した動画をデジタル画像相関法で解析することで、心筋の自己拍動特性を評価する研究が行われた[95]。デジタル画像相関法の正確な測定技術の向上に伴い、今後とも生体力学において *in vitro* と *in vivo* の両方の評価でデジタル画像相関法を用いた解析が有効であると考えられている。

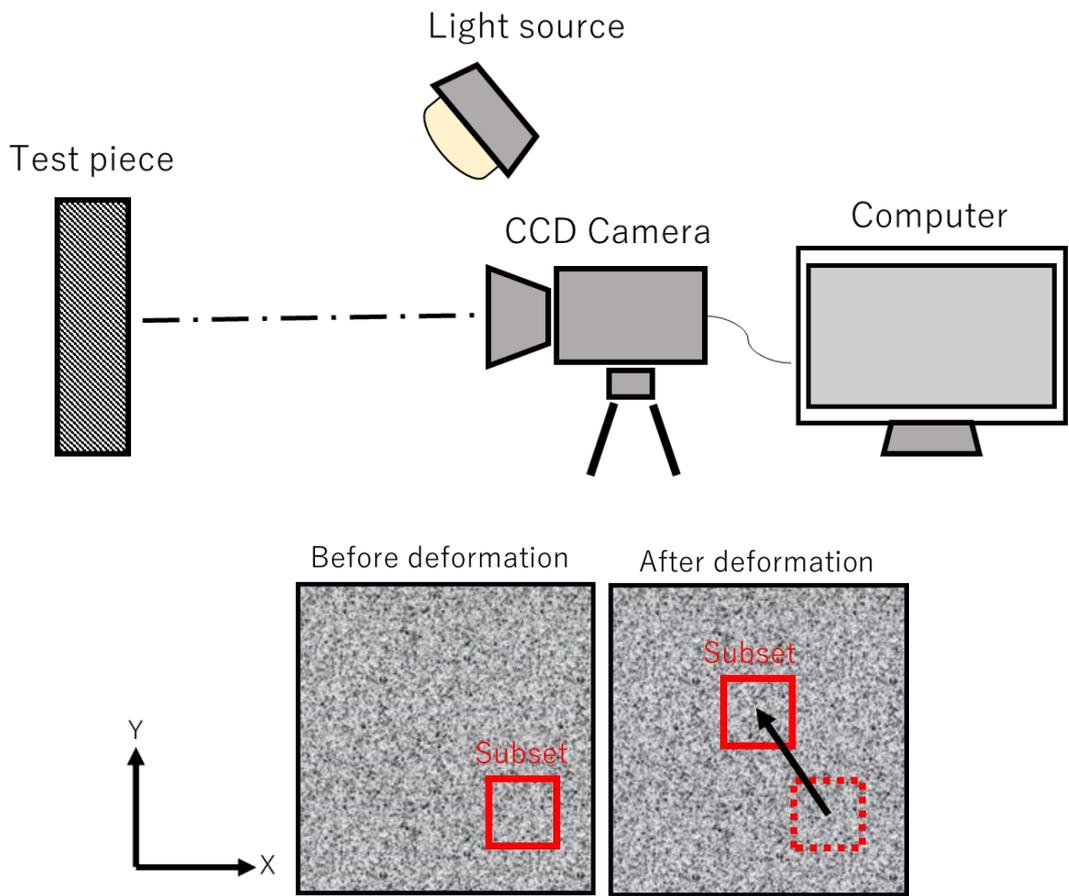


Fig.2.6 Analysis procedure using digital image correlation method

2.2.7 ひずみ変動の計測方法

本研究では、デジタル画像相関法評価ソフトウェア GOM Correlate2019 (Carl Zeiss GOM Metrology GmbH) を用いて解析を行った。2つのサブセットを1組とし、その2点の領域から変形前後の画素類似性を判断することが可能である。本研究では、高速光計測システムを用いて撮影した連続画像データを画像相関ソフトに組み込み解析を行った。読み込む画像データサイズは、 256×256 pixels であり、サブセットサイズは 9pixels、2つのサブセット間の距離を 6pixels に設定し、2次元平面上での hiPS-CM シートの変形解析を行った。続いて、収縮に伴う最小主ひずみ挙動の算出方法を下記に示す。心筋細胞の収縮は筋線維方向の収縮に依存しており、本研究では圧縮方向のひずみ挙動として最小主ひずみを求めた。

まず、デジタル画像相関法を用いて、固定点(A)から X 軸 Y 軸方向にそれぞれ $55 \mu\text{m}$ となるように測定点(B)を定めた。続いて、拍動に伴う測定点の X 軸 Y 軸の 2 軸方向の変位挙動を明らかにした。その結果を用いて、式(2.1)を用いて X 軸方向のひずみ ε_{xx} ・Y 軸方向のひずみ ε_{yy} ・せん断ひずみ γ_{xy} を算出し、それらの結果から、式(2.2)を用いて最小主ひずみを算出した(Fig.2.7)。

$$\varepsilon_{xx} = \frac{\gamma_{xx}}{2} \quad \varepsilon_{yy} = \frac{\gamma_{yy}}{2} \quad \gamma_{xy} = \theta + \lambda = \frac{\partial u_x}{\partial y} + \frac{\partial u_y}{\partial x} \quad (2.1)$$

$$\varepsilon = \frac{1}{2}(\varepsilon_{xx} + \varepsilon_{yy}) - \frac{1}{2}\sqrt{(\varepsilon_{xx} - \varepsilon_{yy})^2 + \gamma_{xy}^2} \quad (2.2)$$

本研究では任意の複数のポイントにおいて、収縮に伴う最小主ひずみ挙動を算出した。

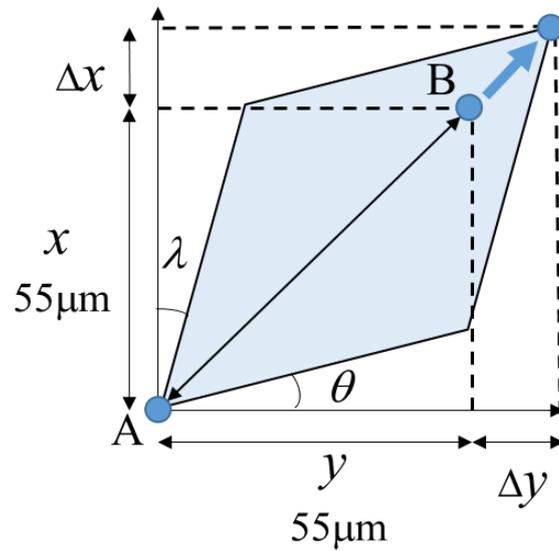


Fig.2.7 Two-dimensional region for principal strain evaluation using image correlation method

2.3 ひずみ変動理論モデル

2.3.1 サルコメア能動的応力

心筋の能動的変形挙動を表す数理モデルの構築のために、筋繊維の圧縮方向に発生する能動的応力モデルとして、Guccione らにより提案された時間依存等尺性張力(式(2.3))を用いた[96-99]。本理論モデルは、心筋細胞の筋線維方向に発生する収縮力に依存する筋節内のタンパク質フィラメントの Ca^{2+} 感受性やサルコメア長の条件を組み込んだ理論モデルであり、式(2.5)に示す細胞内ピーク関数 C_t から経時的な応力挙動を算出することができる。

$$\sigma_{act} = \sigma_{max} \frac{(Ca_0)^2}{(Ca_0)^2 + ECa_{50}^2} C_t \quad (2.3)$$

$$ECa_{50} = \frac{(Ca_0)_{max}}{\sqrt{\exp[B(l - l_0)] - 1}} \quad (2.4)$$

$$C_t = \frac{1}{2}(1 - \cos\omega) \quad (2.5)$$

ここで、 Ca_0 は細胞内カルシウムピーク濃度、 $(Ca_0)_{max}$ は細胞内カルシウムピーク濃度の最大値、 σ_{max} は最大の能動的等尺性張力、式(2.4)で表される ECa_{50} はサルコメア長に依存するカルシウムイオンの感度を表しており、これらの定数は、Walker らの左心室モデルの研究で用いられた数値を採用した[98]。また、式(2.4)の l は、収縮前($t=0$)の時のサルコメア長であり、 l_0 は能動的張力がピーク

に達する際でのサルコメア長を意味している。それぞれのサルコメア長は、下記の式(2.6)を用いて算出した[99].

$$l_x = l_R \sqrt{2E_{ff} + 1} \quad (2.6)$$

ここで、 E_{ff} は筋線維方向のひずみを表しており、本研究ではデジタル画像相関法を用いて算出した hiPS-CM シートの最小主ひずみを組み込むことで、hiPS-CM のサルコメア長を算出した。能動的応力が発生していない時点でのサルコメア長 l_R は、未成熟なヒト iPS 細胞由来心筋細胞のサルコメア長を採用した [100]. さらに、本理論モデルは時間関数 C_t により収縮挙動にあわせた2つの時間軸で構成されている。まず、収縮開始($t = 0s$)から収縮ピーク状態($t = t_0$)までの時間軸は式(2.7)で表しており、式(2.8)は収縮ピーク時間から収縮が緩和し、筋線維が弛緩する($t = t_0 + t_r$)までの挙動を示している。

$$\omega = \pi \frac{t}{t_0} \quad (0 \leq t < t_0) \quad (2.7)$$

$$\omega = \pi \frac{t - t_0 + t_r}{t_r} \quad (t_0 \leq t < t_0 + t_r) \quad (2.8)$$

応力挙動の算出にあたり、収縮ピークまでに要する時間(t_0)として、実験モデルの最小主ひずみ挙動の経時変化を用いた。実際に細胞内に Ca^{2+} が流入した後に筋フィラメントタンパク質と結合し、心筋組織が収縮変形を起こすまでの間

におよそ数 100ms の時間を要する [101,102]. そこで, 本研究では収縮ピークまでに要する時間において, 最小主ひずみがピークに達するまでに要する時間から 100ms 差し引くことで, 細胞内の Ca^{2+} 挙動と心筋の変形挙動の位相差を考慮した. 一方, 収縮状態から弛緩状態になるまでに要する時間(t_r)として, 最小主ひずみ挙動がピーク値から初期値に戻るまでの時間を組み込んだ. それぞれの材料特性値を Table.2.1 に示す.

Table.2.1 Material constants for the Guccione stress theory model [98,100]

Material constant	Value
T_{\max} (kPa)	135.7
Ca_0 ($\mu\text{mol/l}$)	4.35
$(\text{Ca}_0)_{\max}$ ($\mu\text{mol/l}$)	4.35
B (μm^{-1})	4.75
l_R (μm)	1.65

2.3.2 粘弾性理論モデル

本研究では, hiPS-CM シートの収縮挙動に伴う構成則を表すため, 自己収縮に伴うひずみ挙動を表すモデルとして, 粘弾性 Maxwell モデルを採用した. ばね要素とダッシュポット要素が直列に接続された粘弾性 Maxwell モデルの構成

微分方程式 (式(2.9)) に Guccione の能動的サルコメア張力理論式を組み込むことで、構成則を導出した。

$$\frac{d\varepsilon_{pr}}{dt} = \frac{1}{E} \frac{d\sigma_{act}}{dt} + \frac{1}{\eta} \sigma_{act} \quad (2.9)$$

ここで、 σ_{act} は心筋サルコメアの能動的応力を表しており、 ε_{pr} は収縮に伴う最小主ひずみを表している。また、 E はバネ要素のヤング率、 η はダッシュポット要素の粘性係数を表している。式(2.9)の粘弾性 Maxwell モデルの微分方程式を $t=t_1 \sim t_2$ の範囲で積分すると下記の式が導出できる。

$$\varepsilon_{pr}(t_2) - \varepsilon_{pr}(t_1) = \frac{1}{E} [\sigma_{act}(t_2) - \sigma_{act}(t_1)] + \frac{1}{\eta} \int_{t_1}^{t_2} \sigma_{act} dt \quad (2.10)$$

式(2.10)の σ_{act} に式(2.3)で表した Guccione の応力理論式を組み込み、式(2.7～8)で表された細胞状態の2つの時間軸でひずみ挙動を導出した(式(2.11))。

$$\varepsilon_{pr}(t) =$$

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{\alpha}{E} \left[1 - \cos\left(\frac{\pi}{t_0} t\right) \right] + \frac{\alpha}{\eta} \left[t - \frac{t_0}{\pi} \sin\left(\frac{\pi}{t_0} t\right) \right] & (0 \leq t < t_0) \\ \frac{\alpha}{E} \left[1 - \cos\left(\frac{\pi}{t_r} (t - t_0 + t_r)\right) \right] + \frac{\alpha}{\eta} \left[t - \frac{t_r}{\pi} \sin\left(\frac{\pi}{t_r} (t - t_0 + t_r)\right) \right] & (t_0 \leq t < t_0 + t_r) \end{array} \right. \quad (2.11)$$

ここで、 α は式(2.12)で表される。

$$\alpha = \frac{\sigma_{max}(Ca_0)^2}{2(Ca_0^2 + E C a_0^2)} \quad (2.12)$$

2.4 結果と考察

2.4.1 構造と拍動挙動および Ca^{2+} 変動

hiPS-CM シートをディッシュから剥離した直後の hiPS-CM シートの形態を Fig.2.8 に示す. hiPS-CM シートはディッシュから剥離した後に, 維持用培地を用いて培地交換を継続し, 倒立顕微鏡で hiPS-CM シートの形態を観察した. hiPS-CM の形態写真を Fig.2.9 に示す. hiPS-CM シートを垂直方向から観察した際の面積の経時変化を Fig.2.10 に示す. その結果, ディッシュから剥離した翌日の day1 から, 培養に伴いシート面積は減少する傾向を示した. シート化 7 日後には初期時点(day1)と比べ面積は 68.8%に凝集している事が明らかになった. シートを剥離する前は基板と細胞間の接着により心筋シートは凝集しないが, ディッシュから剥離することにより, 細胞の自己拍動力と細胞間接着力により凝集したと考えられる.

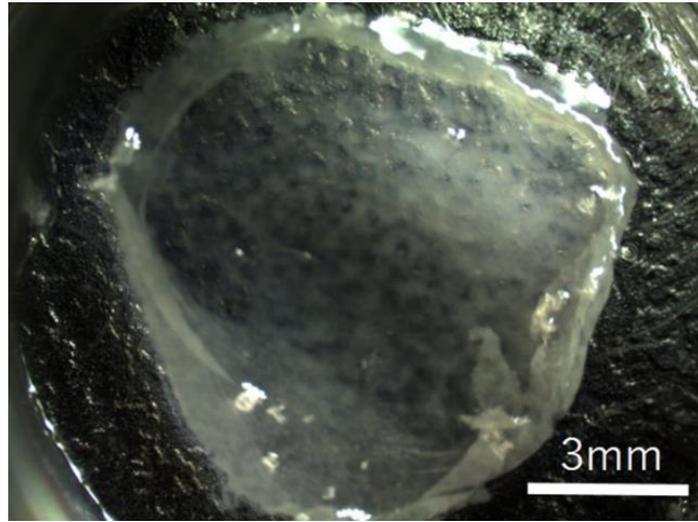


Fig.2.8 Overall view of hiPS-CM sheet

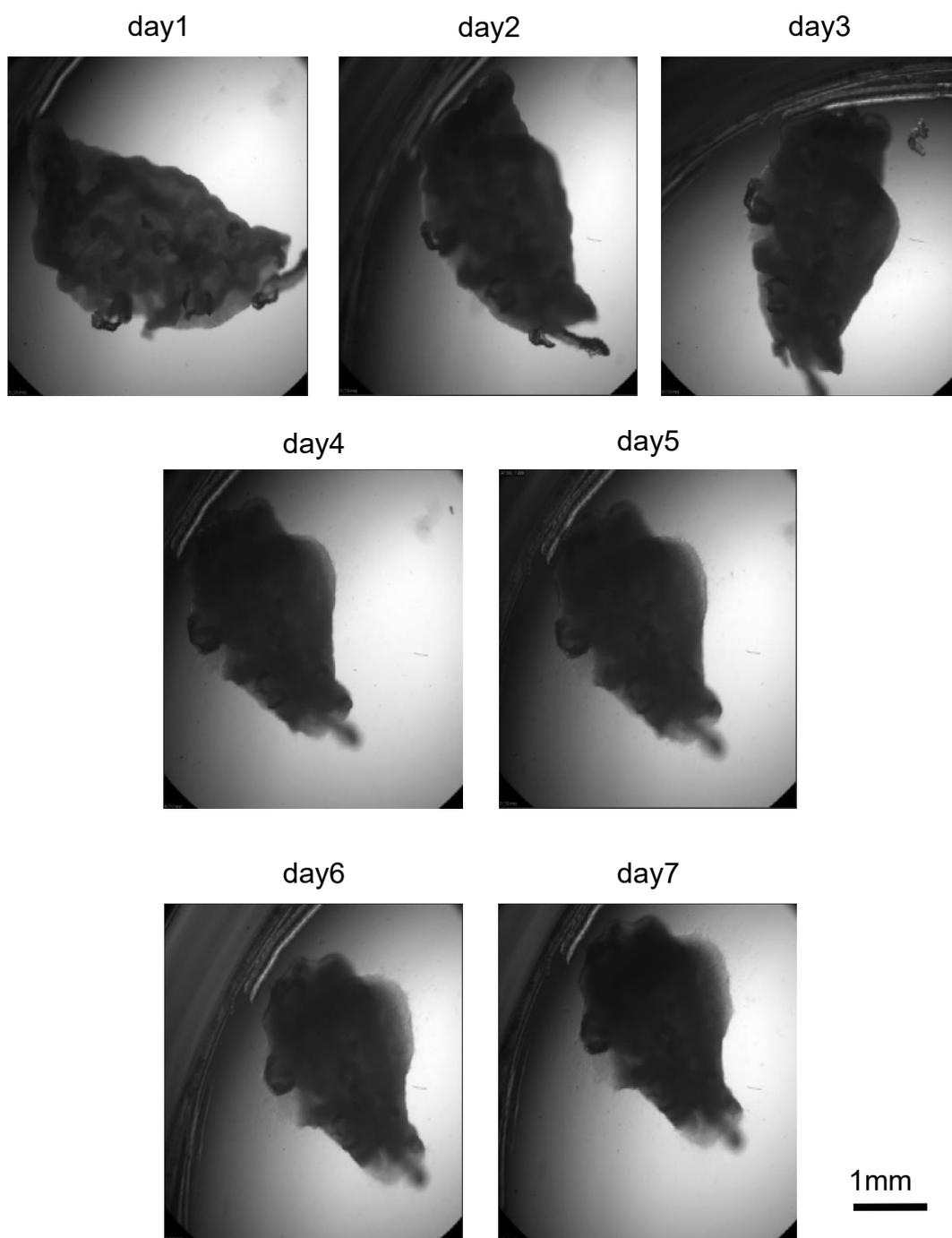


Fig.2.9 Change of Morphology of hiPS-CM sheet

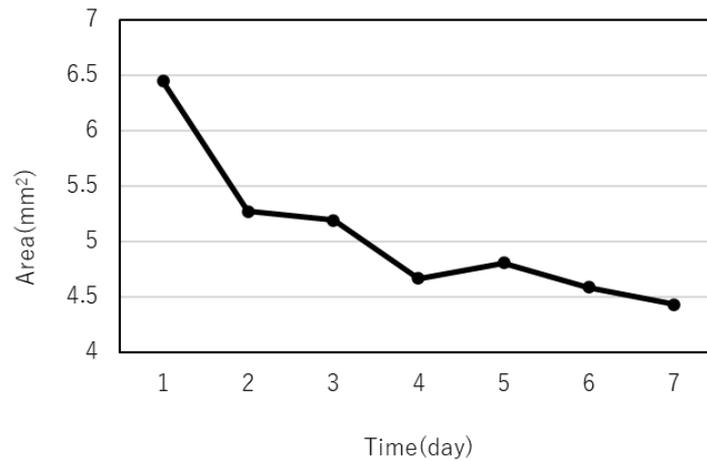


Fig.2.10 Variation of sheet size during incubation

続いて、高速光計測システムを用いて hiPS-CM シートの自己拍動挙動を任意の 3 点で計測した(Fig.2.11)(day3). 3 か所の測定点での輝度値の時間変化を Fig.2.12 に示す. hiPS-CM シートとディッシュの境界点を測定することで、拍動に伴う心筋シートの変形に伴う透過光の輝度値の変化として測定を行い、ここの輝度値の変化は、計測ポイントでの拍動挙動に対応している. その結果、複数のどの計測点においても同一の拍動周期を示していることから、本研究で作製した hiPS-CM シートが細胞間で結合し、組織化していることが確認できた.

細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化に伴う蛍光強度が変化する様子を Fig.2.13 に示す. そして、高速光計測システムを用いて測定した蛍光強度の経時変化と、自己拍動挙動を Fig.2.14 に示す (day0). その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度の周期は 5.982s(周波数:

167mHz)であり、拍動挙動(周期:5.51s 周波数:181mHz)と近い周期での経時変化が確認できたことから、本研究で作製した hiPS-CM シートは、細胞内の Ca^{2+} の流入に伴い心筋の自己拍動が発生していることが確認できた。本研究はそれぞれの結果において、最大値が1、最小値が0になるよう正規化処理を施した。

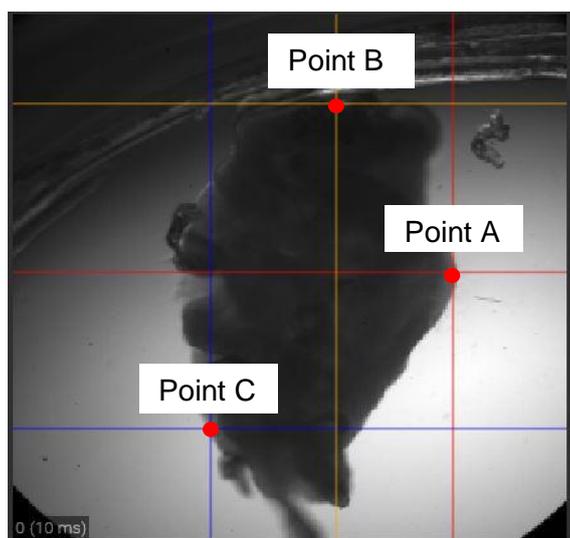


Fig.2.11 Three different points for brightness measurement

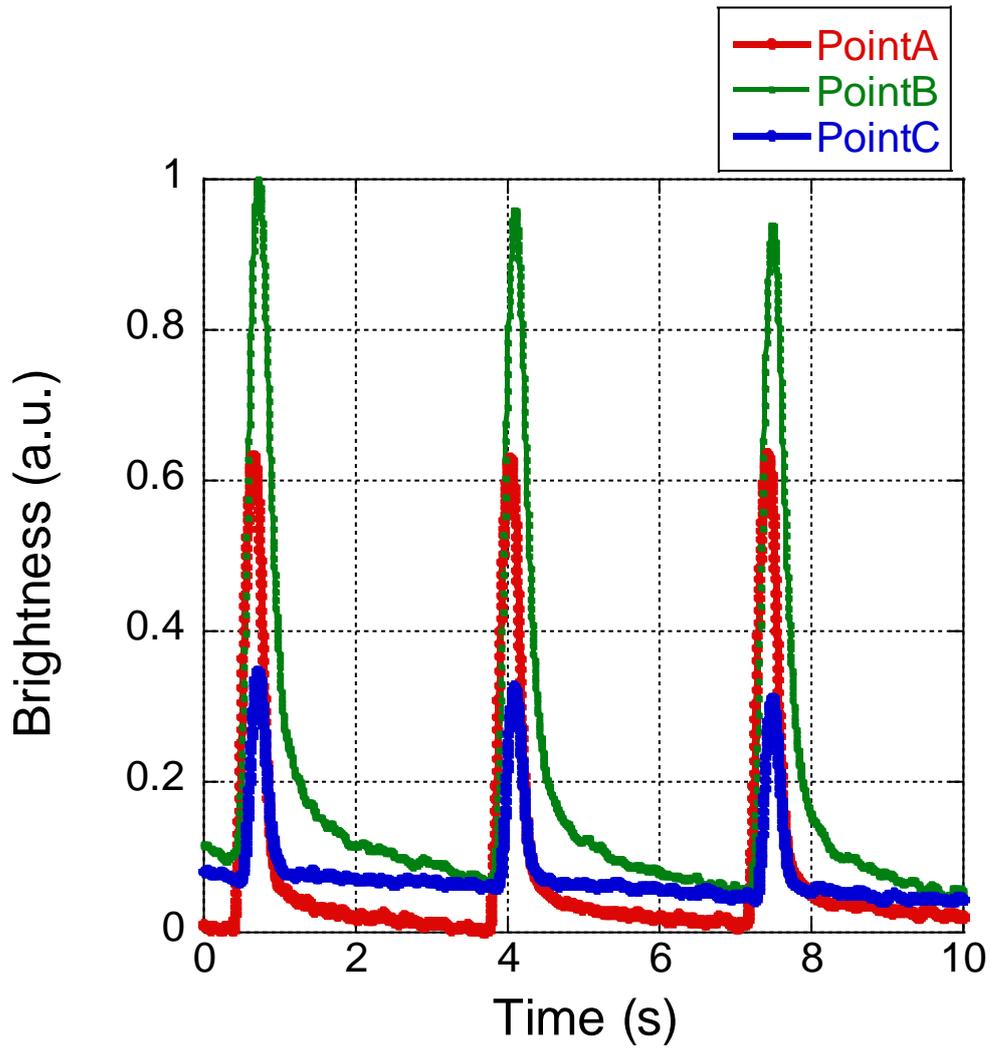
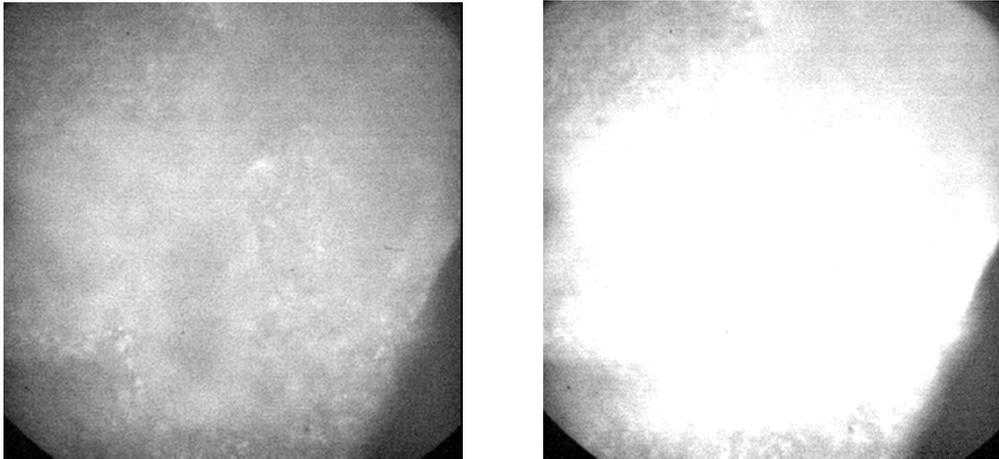


Fig.2.12 Time-variation of brightness at three different points.



(A) Relaxation

(B) Contraction

Fig.2.13 Change in fluorescence intensity with change in intracellular Ca^{2+} concentration

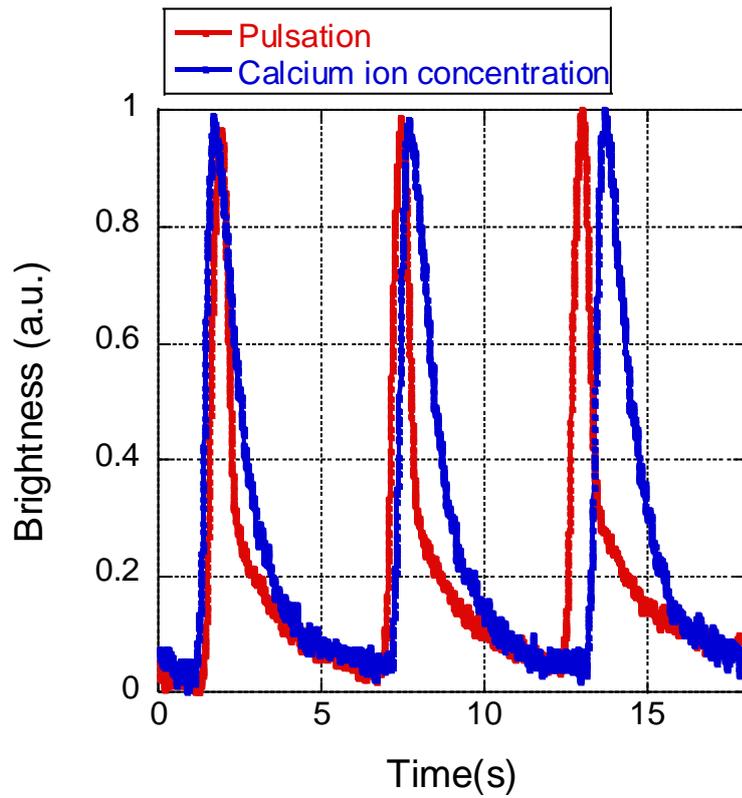
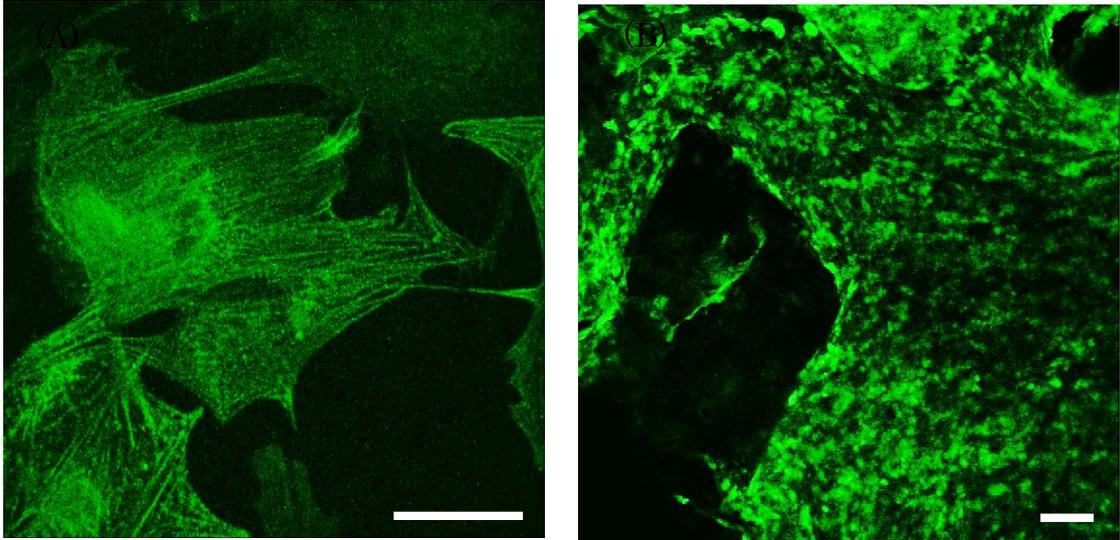


Fig.2.14 Time-variations of pulsation and calcium ion concentration.

また、心筋細胞や筋細胞の収縮挙動は筋線維方向に発生する収縮力に依存することから細胞配列や力学的刺激で筋線維の配向性を向上することは、筋収縮挙動に影響を与える[103,104]。そこで、本研究で作製した hiPS-CM シートの筋線維の配向性評価を行った。心筋細胞の筋節マーカーであるアクチン結合タンパク質 α -アクチニンを染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した画像を Fig.2.15 に示す。さらに、筋線維画像から X 軸方向を 0° として筋線維の分布する角度を測定した (Fig.2.16)。その結果、ディッシュ上で二次元培養を行った基板に接着した状態の hiPS-CM 単細胞では比較的筋線維の配向性が確認できた。一方、シート状に組織化された hiPS-CM の筋線維は単細胞と比較し、配向性が確認できなかった。本研究では、細胞配列などを行うことなく近隣の細胞同士が結合し組織化したことから、特定の方向に筋線維の配向性があられず、ランダムな方向で細胞接着したことを表している。



(A) Single cell (50µm)

(B) Cell Sheet (100µm)

Fig.2.15 Optical micrographs of intracellular alpha-actinin staining

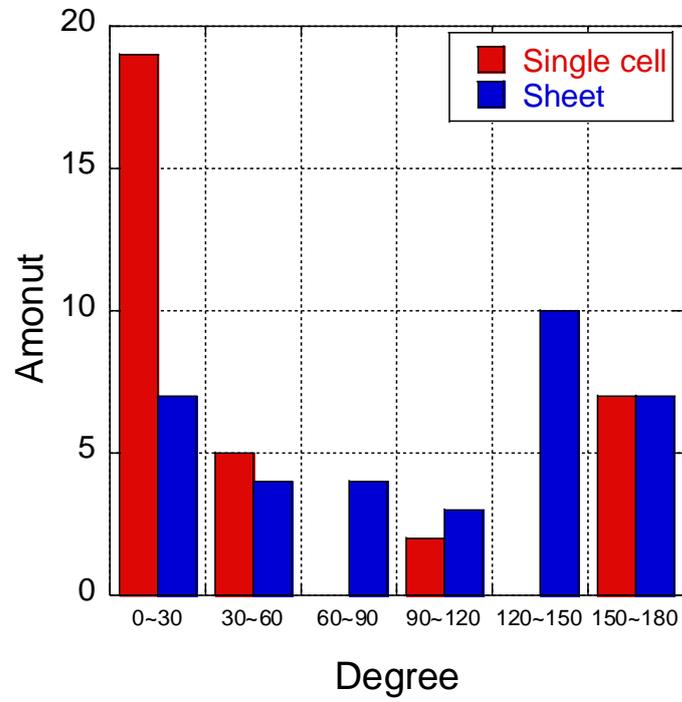


Fig.2.16 Distribution of amount of muscle fibers at different angles

2.4.2 拍動に伴うひずみの時間変動

デジタル画像相関法を用いて解析した hiPS-CM シートの自己収縮に伴う変位分布を Fig.2.17 に示す。変位分布画像からよく変形が確認できる 3 点において最小主ひずみ挙動を評価した。算出した最小主ひずみ挙動を Fig.2.18 に示す。本研究では、圧縮方向のひずみを正の値として算出した。Fig.2.18 に示した最小主ひずみの周期はおよそ 3.423s(周波数：292mHz)であり、一方、Fig.2.12 に示した hiPS-CM の拍動挙動の周期は 3.558s(周波数：295mHz)と近い周期を示していることから、画像相関法を用いて算出した最小主ひずみ挙動は、自己拍動に伴う変形によるひずみを表している。また、3 点の測定点での拍動に伴う最小主ひずみの経時変化を Fig.2.19 に示す。その結果、ひずみの挙動やピーク値は計測点によって異なる事が明らかとなった。本研究で作製した hiPS-CM シートは固定しておらず、培養日数に伴い細胞間結合により凝集したことから、計測箇所によって異なる細胞間結合挙動を示し、細胞特性が異なっていることが原因であると考えられる。また、心筋の収縮の際に電気信号を発生させ、司令塔の役割をもつペースメーカー細胞が、ひとつの組織体の中で不均一に分布している可能性が示唆された。

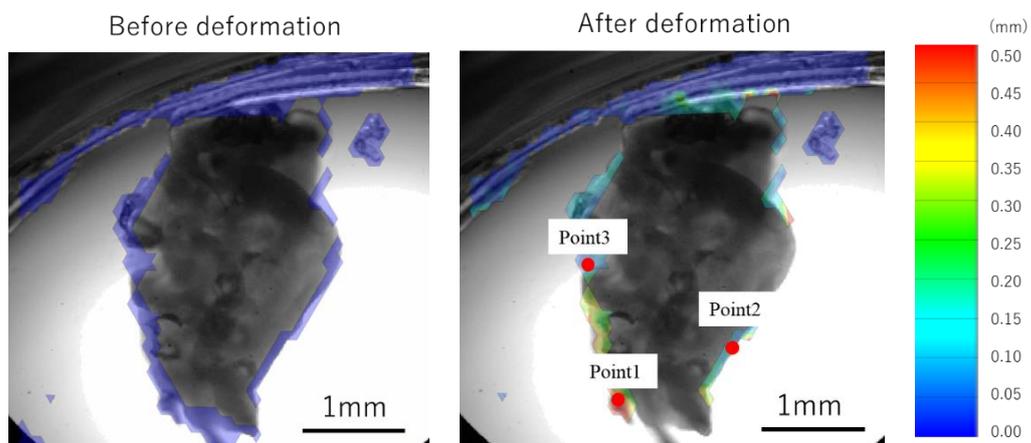


Fig.2.17 Measurement points of displacement distribution and deformation behavior of hiPS-CM sheet with pulsation by digital image correlation method

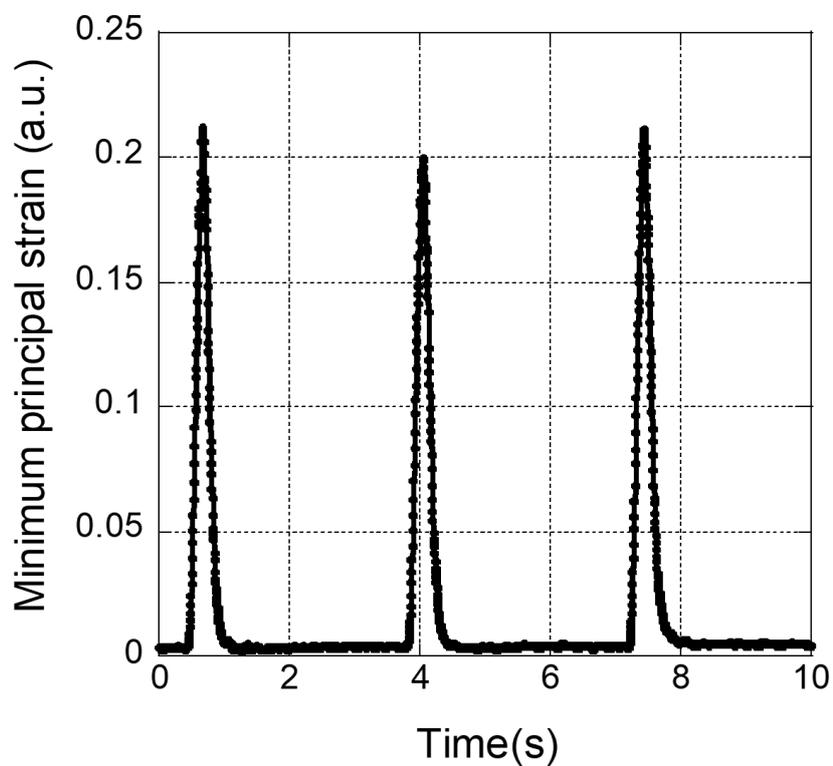


Fig.2.18 Time-variation of the minimum principal strain of hiPS-CM sheet with pulsation

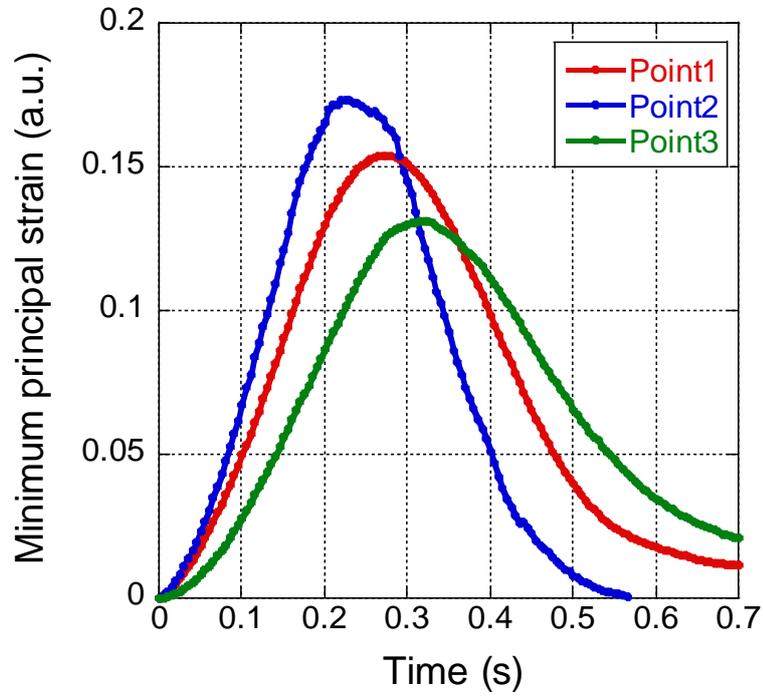


Fig.2.19 Time-variations of the minimum principal strain at three different points

2.4.3 応力-ひずみ挙動

理論モデルを用いて hiPS-CM の自己収縮に伴い発生する能動的な心筋細胞の応力の経時変化を算出した。筋細胞に発生する能動的な収縮力は、両端を固定した筋組織に荷重変換機を取り付けることで定量的に評価することが可能である[105]。しかし、本研究で作製した hiPS-CM シートは拘束されていない状態での変形挙動を計測していることから、式(2.3)に示す Guccione らの理論モデルを用いて hiPS-CM の能動的応力挙動を予測した。まず、能動的応力理論式に組み込むサルコメア長の長さを実験結果のひずみ挙動と式(2.6)から算出した。それぞれの計測点におけるサルコメア長の経時変化を Fig.2.20 に示す。その結果を Guccione らの理論モデルに組み込むことで、各測定点における応力挙動を予測した結果を Fig.2.21 に示す。続いて、Guccione の理論モデルと粘弾性 Maxwell モデルを組み合わせることで導出した理論式を用いて、ひずみ挙動を予測し実験モデルの最小主ひずみ挙動と比較を行った(Fig.2.22)。また、理論モデルの粘弾性材料に関する係数を Table.2.2 に示す。その結果、粘弾性的特性を組み込んだ理論モデルを用いて予測したひずみ挙動が、軟組織体である実験モデルのひずみ挙動をよく再現していることが明らかとなった。続いて、Guccione

らの応力理論モデルと実験モデルのひずみ挙動を組み合わせた応力-ひずみ線図を Fig.2.23 に示す. hiPS-CM シートの自己拍動に伴う応力-ひずみ応答には大きなヒステリシスループが発現し, hiPS-CM シートの粘弾性的特性が確認できた. 応力-ひずみ挙動で表されるヒステリシスループは, 一般的に貯蔵エネルギーと散逸エネルギーのエネルギー差を表している [106]. ここでは, 心筋の収縮時から弛緩時にかけてエネルギー差が発生していることを示しており, 収縮期に ATP を加水分解する際の化学エネルギーが機械エネルギーに変換される際に, サルコメアの滑り運動の摩擦などにより一部のエネルギーが損失することにより, エネルギー差が発生したと考えられる [107].

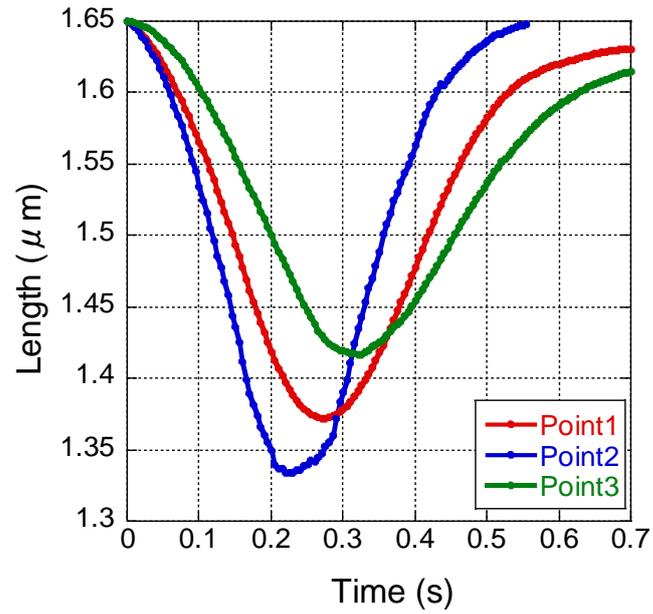


Fig.2.20 Time-varying sarcomere length of hiPS-CM sheet predicted from minimum principal strain behavior

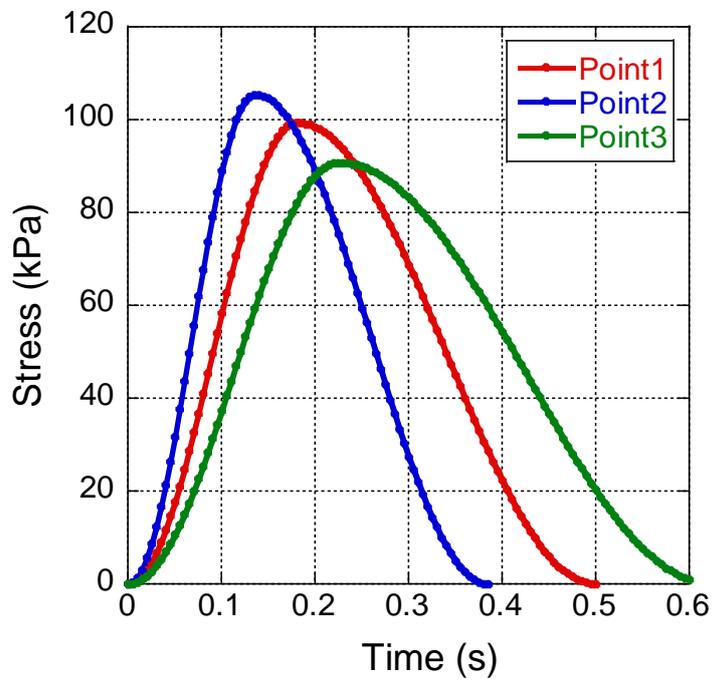


Fig.2.21 Time-variation of theoretical active stress

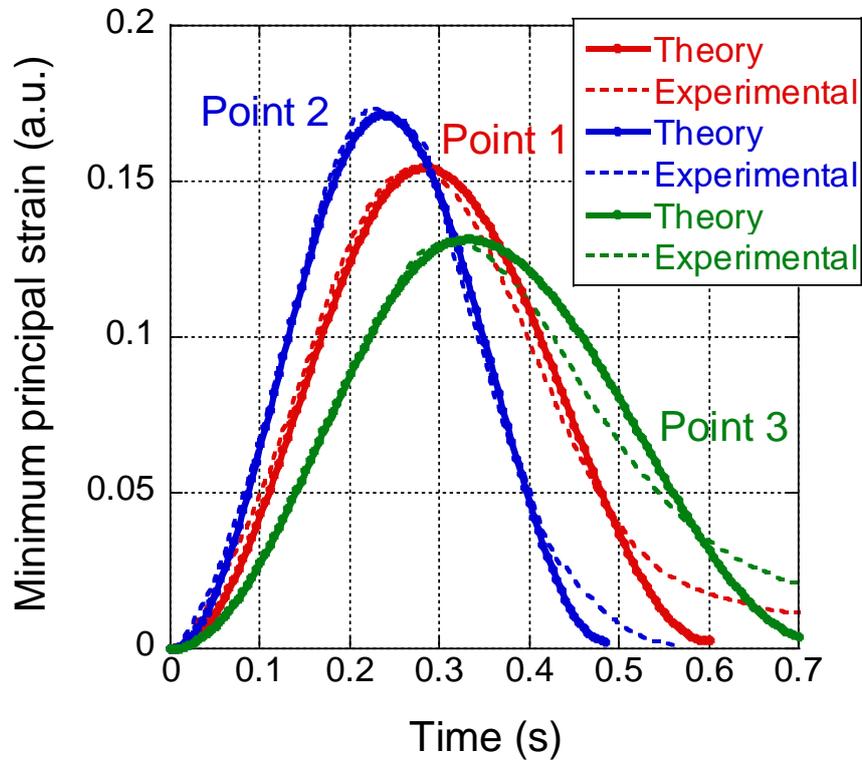


Fig.2.22 Comparison of experimental and theoretical minimum principal strain

Table 2.2 Elastic modulus and viscosity used for the viscoelastic analysis

	E (kPa)	η (kPa · s)
Point 1	650	5000
Point 2	620	10000
Point 3	700	10000

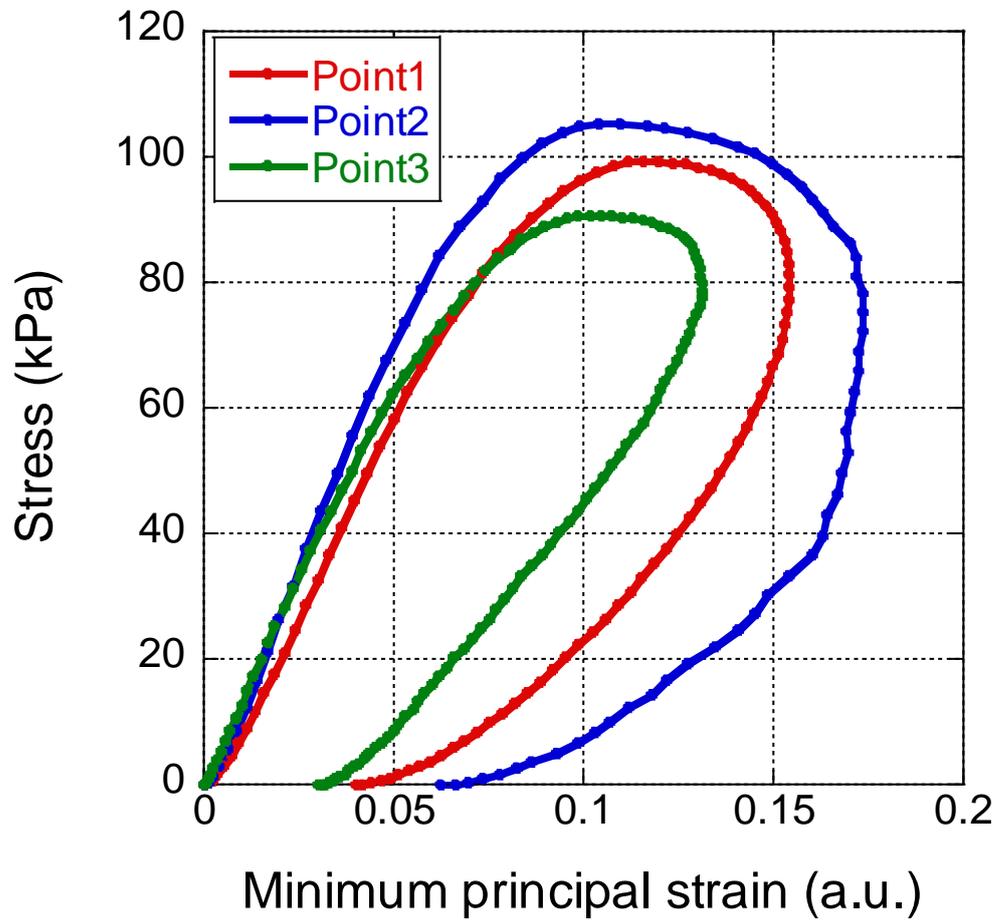


Fig.2.23 Nonlinear active stress - minimum principal strain relationship at three different points

2.5 小括

本章では、組織工学技術を用いて hiPS-CM シート状組織体を作製し、その自己拍動に伴う機械工学的評価を行った。まず、高速光計測システムを用いた心筋シートの収縮に伴う変形挙動解析により、hiPS-CM シートは外部刺激を用いることのない周期的な自己拍動の発現が確認できた。また、任意の複数の点において同期した収縮挙動が確認できたことから、作製した心筋シートが組織化していることが明らかとなった。さらに、高速光計測システムを用いて撮影した連続画像データをデジタル画像相関法で解析を行うことで、自己収縮に伴うひずみ挙動を求めた。その結果、ひずみは各計測ポイントで異なるピーク値を示した。この原因として、培養に伴い心筋シートが凝集することでシート組織体の計測する点によって異なる細胞特性をもつことや、ペースメーカー細胞が作製した組織体のなかで不均一に分布している可能性が示唆された。

一方、Guccione らが提案した心筋サルコメアの能動的張力と粘弾性 Maxwell モデルを組み合わせ、hiPS-CM の自己拍動挙動を再現する理論モデルを構築した。その結果、理論モデルと実験モデルは類似した最小主ひずみ挙動を示すことが確認できた。さらに、hiPS-CM シートの自己拍動に伴う応力-ひずみ応答を示

した。能動的応力として Guccione らの理論モデルを採用し、実験から得られた最小主ひずみと組み合わせることで応力-ひずみ挙動を再現した。その結果、収縮-弛緩過程におけるエネルギー散逸に対応する粘弾性特有のヒステリシスループが確認できた。

第 3 章
hiPS-CM チューブの作製と
内部流動特性の評価

3.1 はじめに

本章では、細胞シート工学を応用し、hiPS-CMの自己拍動力を生かしたポンプ機能を持つhiPS-CMチューブを作製し、まず、高速光計測システムを用いてhiPS-CMの自己拍動挙動の評価を行った。続いて、チューブ内に分散させた微小な粒子の動きを追跡することで、hiPS-CMチューブの拍動に伴うチューブ内の駆動力評価を行った。さらに、拍動に伴うチューブの変形挙動からチューブ内の流体の変位挙動と流速挙動を予測した。高速光計測システムで撮影した連続画像データをデジタル画像相関法で解析することで、変形に伴うPDMSチューブのひずみを測定した。本研究では、シンプルな円筒形理論モデルを仮定し、チューブの変形結果を組み込むことでチューブ内の流動を予測し、実験結果との比較・検討を行った。

3.2 実験方法

3.2.1 PDMSチューブ作製方法

本研究では、PDMSチューブにhiPS-CMシートを巻き付けることで、hiPS-CMチューブ状組織体を作製した。hiPS-CMシートの足場となるPDMSは、シ

リコーンゴムの一種であり、酸素透過性の高さ・滅菌が容易・非毒性などの特性を持った生体適合性材料のひとつである[108]。また、生体に近い弾性率をもつことから、医療分野においてカテーテルや人工臓器などの医療器具へ広く使われている[109,110]。さらに、加工の容易性から、生体工学分野においても細胞とのハイブリッド組織体の基材として広く用いられている[111,112]。本研究では、PDMS が優れた透過性を持ち、倒立顕微鏡での観察が容易である点や、硬化剤の混合率を変えることで容易に弾性率の制御が可能であり心筋の自己拍動を制御しない足場の作製が可能な点からも、心筋チューブの足場に適切な材料であると考えた。PDMS チューブの作製手順は以下の通りである。

PDMS エラストマー (SYLGARD™ 184 Silicone Elastomer Kit, Dow Corning Corp.) の主剤と硬化剤を 10 : 1v/v の割合で混合し、30 分間の脱気することで PDMS 混合液を作製した。Fig.3.1 に示すようにホットプレート (Thermo Fisher Scientific, Inc.) の表面から約 2cm の高さにフッ素樹脂製チューブ (EXLON, PFA マイクロフッ素樹脂チューブ, IWASE(株), 内径 Φ 0.2mm, 外径 Φ 0.4mm) を固定した。チューブの片端にモーター(6 速ギアボックス, タミヤ(株)) を取り付け、もう一端はフッ素樹脂チューブが緩むことのないよう固定した。モーター

を取り付けたチューブを約 20rpm で回転させ、ホットプレートは 250°C に設定した。PDMS 混合溶液を定速で回転しているフッ素樹脂製チューブに塗布し、ホットプレートで加熱することで PDMS を硬化した。PDMS 硬化後にフッ素樹脂製チューブを抜き取り、長さ 4~5mm、外径約 $\Phi 0.7\sim 1\text{mm}$ 、内径 $\Phi 0.35\text{mm}$ のチューブ状に加工した。作製した PDMS チューブの外観を Fig.3.2 に示す。

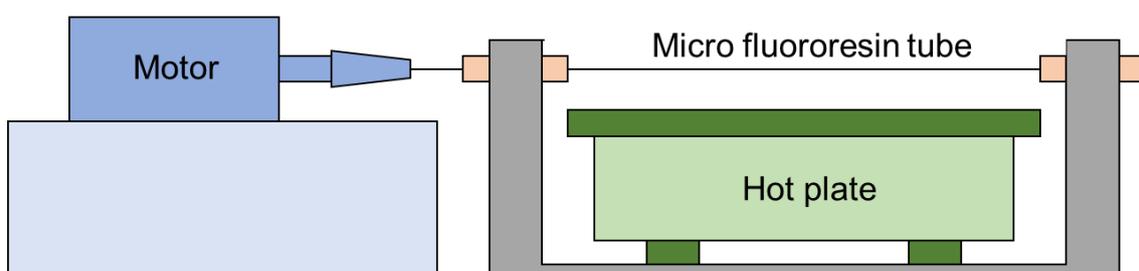


Fig.3.1 Schematic of fabrication device for PDMS tube.

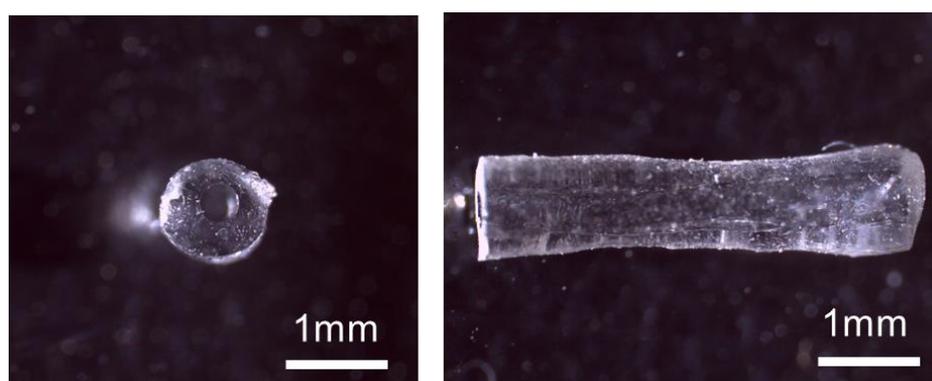


Fig.3.2 PDMS tube forms

3.2.2 hiPS-CM チューブ作製方法

PDMS チューブに巻き付ける hiPS-CM シートの作製方法を以下に示す. 2.2.2 節で記述した心筋シートの作製方法と同様に, 温度応答性ディッシュを用いることで, 足場を用いない hiPS-CM のみで構成された細胞組織体として hiPS-CM シートを作製した. 温度応答性ディッシュで培養を行う前に, 予め 7 日間の前培養を行った. 前培養の手順や条件は 2.2.1 節に示した内容と同様である.

前培養を行った後, 培地を PBS で洗浄し, Accutase を用いた酵素処理により単一細胞となるようにディッシュから剥離した. その後, $10 \mu\text{M}$ Rock inhibitor を含む播種用培地とともに, 温度応答性ディッシュ上へ細胞を移した. この時, $\Phi 35\text{mm}$ 温度応答性ディッシュ (UpCell®, 3.5cm dish, CS3007, セルシード(株)) 上に 10mm 四方のシリコンモールドを設置し, Fig.3.3 に示すように細胞培養領域を制限した. 細胞密度はおよそ $1.0 \times 10^6 \text{cells/cm}^2$ とし, hiPS-CM シートと同様に 2 日に 1 回維持用培地を用いて培地交換を行い, 7 日間培養を継続した (37°C - $5\% \text{CO}_2$). 7 日後, ディッシュを低温状態にすることで hiPS-CM シートの形状を維持した状態でディッシュから剥離した.

一方, 作製した PDMS チューブは細胞接着性の向上のため, チューブ表面に

フィブロネクチンコートをした。フィブロネクチン（ヒト血漿由来，和光純薬（株））は濃度 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう PBS で希釈し， 37°C で 2 時間インキュベートした後，PBS で 2 回ほど PDMS チューブの洗浄を行った。ディッシュから剥離した hiPS-CM シートを PDMS チューブに巻き付けた後，より接着性を向上させるため，無培地状態で 15 分間インキュベート (37°C - $5\%\text{CO}_2$) を行い，hiPS-CM シートと PDMS チューブの完全な複合化を試みた。なお，細胞を巻き付けるまえの PDMS チューブやディッシュ上に設置したシリコンモールドは細菌汚染等を防ぐため，予め 70% エタノールと紫外線殺菌により滅菌処理を施した。

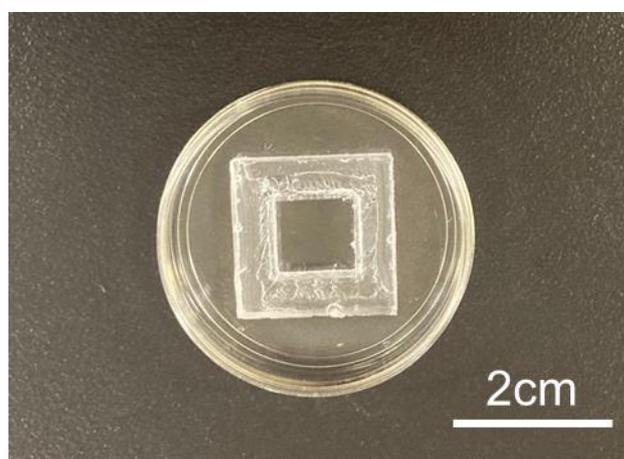


Fig.3.3 Cell seeding area limited by silicone mold

3.2.3 拍動挙動の計測方法

hiPS-CM チューブの自己拍動挙動を評価するため、hiPS-CM シートの解析と同様、高速光計測システムを用いて非侵襲的測定を行った。詳細な撮影条件は 2.2.3 節に示した条件と同様である。撮影した連続画像データを解析ソフト BV Workbench を用いて拍動に伴う輝度値の変化を測定し、hiPS-CM チューブの自己拍動挙動を計測した。

3.2.4 流動の計測方法

hiPS-CM の自己拍動に伴う hiPS-CM チューブの流体駆動性評価を行った。評価方法は下記の通りである。直径 3~8 μm の α -TCP 粒子 (α -TCP-B, 太平洋化学産業(株)) を 1mg/mL の濃度で維持用培地に懸濁した。粒子を懸濁した維持用培地は孔径 40 μm のフィルターでろ過処理を施し、PDMS チューブに対して大きな粒子の塊を予め取り除いた。粒子混合液をディッシュに注入し、チューブ付近で複数回ピペッティングを行うことで、粒子はチューブ内に分散した。そして、チューブ内の粒子の動きを倒立顕微鏡 (CKX53, オリンパス(株)) にマイクロスコプカメラ (Visualix Pro2Lite, Visualix Co., Ltd.) を装着し、40fps で

連続画像撮影を行った。撮影した動画データは、約 75ms ごとの画像データとして出力し、画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて撮影した粒子の位置を追跡した。チューブに対して平行一軸方向を X 軸と仮定し、時間 $t=0$ 秒のときの粒子の位置を初期地点 ($x=0 \mu\text{m}$) として粒子の変位 x を測定した。また、PDMS チューブ内の粒子の移動を追跡する実験系を Fig.3.4 に示す。

得られた粒子の変位挙動と PDMS チューブの形態条件より心筋チューブの駆動性として流量を算出した。まず、式(3.1)を用いて実験結果の最大変位 x_{max} から心筋チューブ内の体積変化量 ΔV を算出した。続いて、粒子の変位ピークの周波数 f 用いて式(3.2)からチューブ内の流量 Q を算出した[113]。

$$\Delta V = \frac{1}{2} x_{max} \pi r^2 \quad (3.1)$$

$$Q = f \Delta V \quad (3.2)$$

ここでの r はチューブの半径を表しており、 $r=0.175\text{mm}$ である。

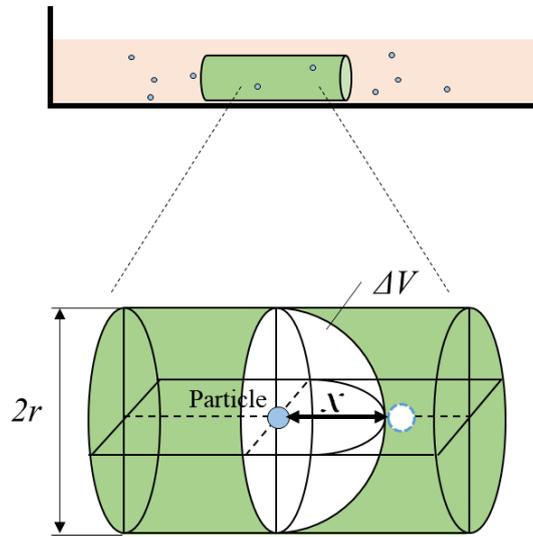


Fig.3.4 Experimental system to measure fluid flow in hiPS-CM tube

3.3 流動予測モデル

チューブの変形挙動からチューブ内の流動を予測する理論モデルを構築し、実験結果との比較を行った。まず、デジタル画像相関法を用いた hiPS-CM チューブの自己収縮に伴う変形解析の手順を下記に示す。3.2.3 節において高速光計測システムで撮影した連続画像データをデジタル画像相関法評価ソフトウェア GOM Correlate2019 を用いて解析を行った。サブセットサイズは 7 ピクセル、ポイント間の距離は 3 ピクセルに設定した。その他の解析条件は 2.2.3 章に示した条件と同様である。計測点は hiPS-CM チューブの直径幅に設定した 2 点のポイントにおける 2 点間の距離 l の経時変化を測定した。その結果から、式(3.3)を用いて hiPS-CM の収縮に伴う心筋チューブ幅のひずみ e を算出した。

$$e = \frac{l - 2r}{2r} \quad (3.3)$$

ここで、 r はチューブの半径を示す。式(3.3)で算出したひずみの経時変化の結果を用いて、式(2.3)で示した Guccione の能動的サルコメア張力理論式を用いてチューブの変形の際に発生する応力を算出した。PDMS は弾性的特性を持つ材料であることから、一般的な線形弾性体の応力-ひずみ関係式を用いて、チューブのひずみ挙動 ε を算出した(式(3.4))。

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{E} \quad (3.4)$$

ここで、弾性係数 E には主剤と硬化剤を 10:1 の体積比で混合した PDMS 材料の弾性係数 $E = 1.6\text{MPa}$ を採用した [114,115].

上記の方法で算出した拍動に伴うチューブのひずみ挙動から、理論モデルを用いてチューブ内の流動を予測した。チューブ内の流動を予測する理論モデルとして、本研究では、シンプルな円柱形モデルを仮定し、下記の手順で理論式を導出した。チューブ内の流動モデルの概略図を Fig.3.5 に示す。変形前のチューブ内の流体の体積 V_1 は式(3.5)で表される。また、圧縮変形後の流体の体積 $V_{2A} + V_{2B}$ は式(3.6)で表される収縮変形前後において流体の体積は不変($V_1 = V_{2A} + V_{2B}$)であると仮定し、チューブ内の流体の変位挙動 u を算出した (式(3.7))。さらに変位挙動 u の両辺を時間微分することでチューブ内の流速 v を導出した (式(3.8))。

$$V_1 = \pi R^2 L \quad (3.5)$$

$$V_{2A} + V_{2B} = \pi R^2 (1 + e)^2 (L + 0.5u) \quad (3.6)$$

$$u = \frac{-2(2\varepsilon + \varepsilon^2)}{(1 + \varepsilon)^2} L \quad (3.7)$$

$$v = \frac{-4L}{(1 + 2\varepsilon)^2} \frac{d\varepsilon}{dt} \quad (3.8)$$

ここで、チューブの直径幅のひずみ ε については、式(3.4)で算出したチューブの

ひずみを使用した。また、圧縮変形前のチューブ内の流体の高さ L は、チューブ変形測定点から心筋組織間の距離を採用した。

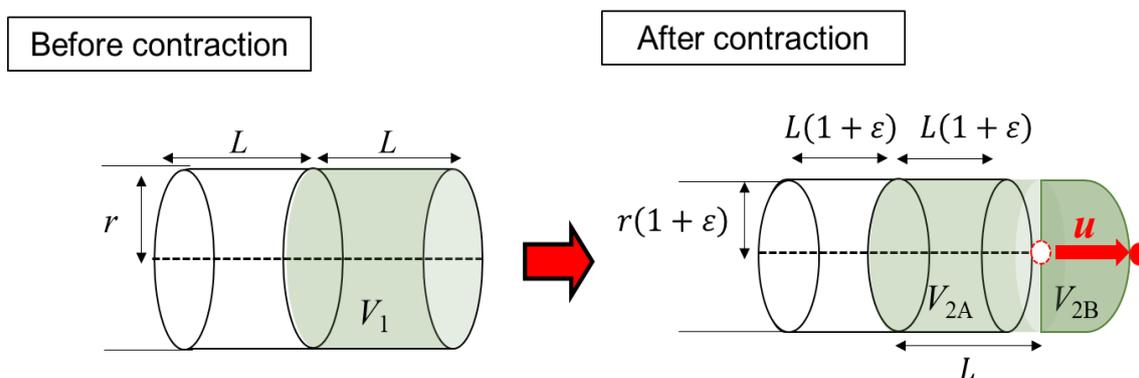


Fig.3.5 Simple cylindrical theoretical model to predict flow behavior in tube

3.4 結果と考察

3.4.1 拍動挙動と流動特性

hiPS-CM シートを PDMS チューブに巻き付け、無培地状態でインキュベーターを行った直後の hiPS-CM チューブの外観を Fig.3.6 に示す。hiPS-CM シートが PDMS チューブに接着した後に、維持培地を用いてクリーンベンチ内で培養を続けた結果、およそ 1~2 日後に心筋チューブの拍動が確認できた。高速光計測システムを用いて、心筋チューブとディッシュ底面の境界を計測することで、拍動に伴う透過光の輝度値の変化を計測した。輝度値は Fig.3.7 に示す任意の複数点において測定を行い、各計測点での拍動挙動に対応する輝度値の経時変化

を正規化した結果を Fig.3.8 に示す. 任意の 3 点で計測を行った結果, どの点においても同一の拍動周期を示していることから, 本研究で作製した hiPS-CM チューブの組織化が確認できる.

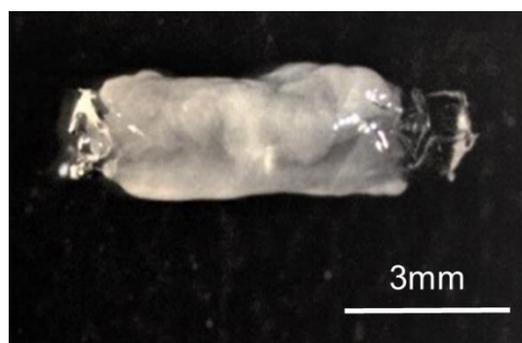


Fig.3.6 Overall view of hiPS-CM tube

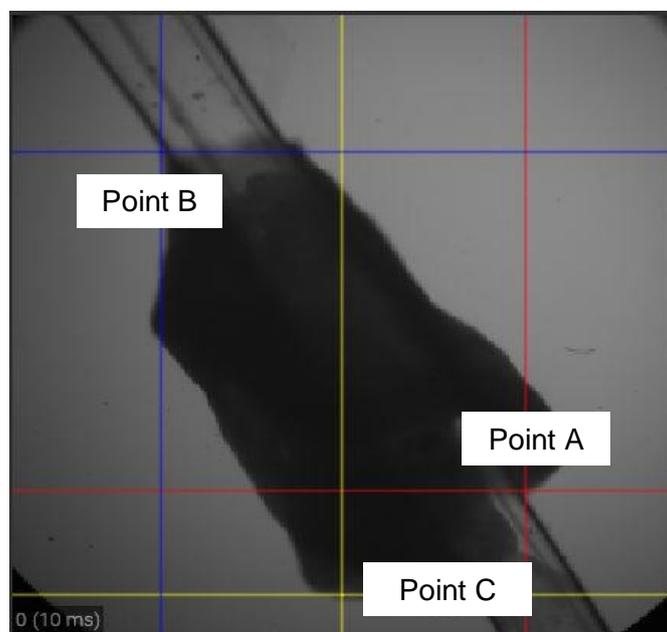


Fig.3.7 Measurement points of pulsatile behavior by high-speed optical measurement method

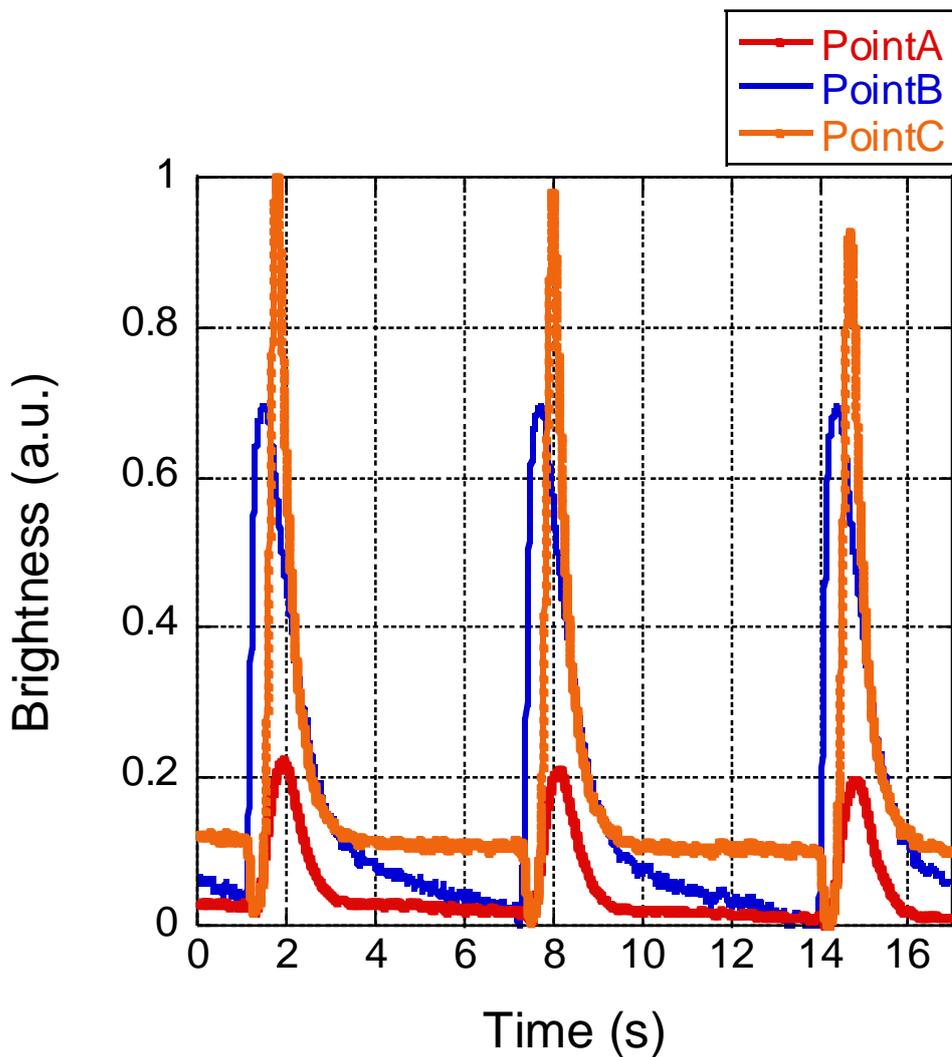


Fig.3.8 Pulsatile behaviors measured at three different points shown in Fig.3.7

続いて、hiPS-CM チューブ内の拍動に伴う駆動性能評価の結果について下記に示す。チューブ内の TCP 粒子の動きを追跡した結果、粒子が経時的に移動していることが明らかとなった。粒子が拍動に伴い移動している様子を Fig.3.9 に示す。さらに、その画像データから粒子の位置を追跡することで、チューブに対

して平行一軸方向の粒子の変位挙動を計測した結果を Fig.3.10 に示す. その結果, 粒子の変位は周期的なピークを伴い経時的変化を示した. 粒子の変位周期はおよそ 6.91s(周波数: 145mHz)であり, 一方, hiPS-CM チューブの拍動挙動 (Fig.3.8)はおよそ 6.47s(周波数: 155mHz)の周期でピークが発現した. このことから, 粒子の変位は hiPS-CM チューブの拍動挙動と近い周期を示しており, チューブ内の粒子は hiPS-CM の自己拍動に伴って移動していることが明らかとなった. さらに, 計測を開始してから約 21 秒後には粒子は初期位置($t=0s$)から $15.51\mu m$ 移動していることから, 粒子は前進と後退を繰り返しながらもチューブ内で順流が発生していることが確認できた. なお, 本研究で作製した hiPS-CM チューブは単純なチューブ形態であり, 逆流防止弁を備え付けていない. 実際の心臓弁を元にした形態の構造体を作製し, 組み合わせることで, 粒子の後退を抑制することが可能であると考えられる [116].

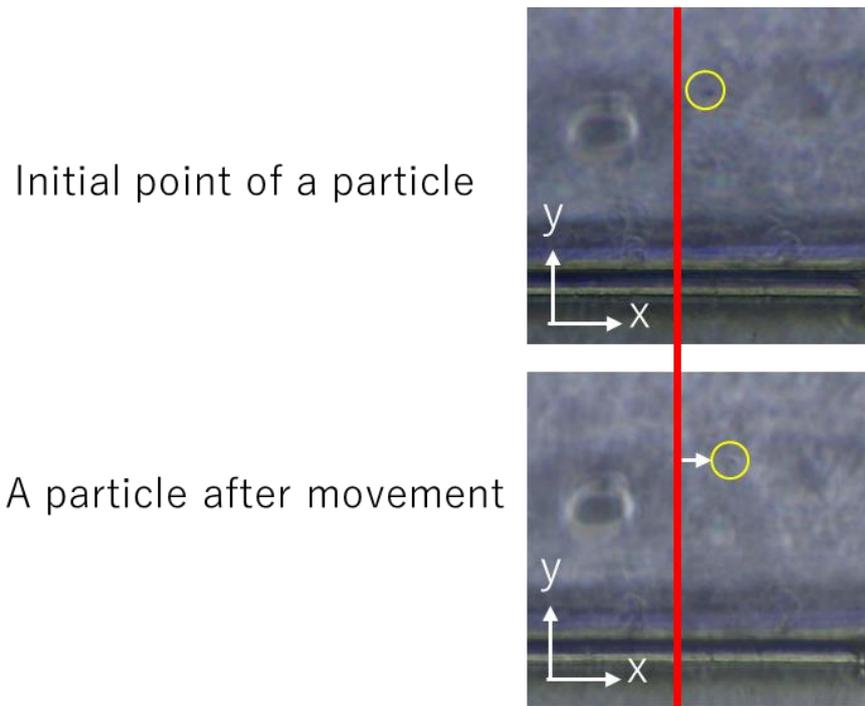


Fig.3.9 Particle movement in the uniaxial direction of the tube due to the self-pulsation of hiPS-CM

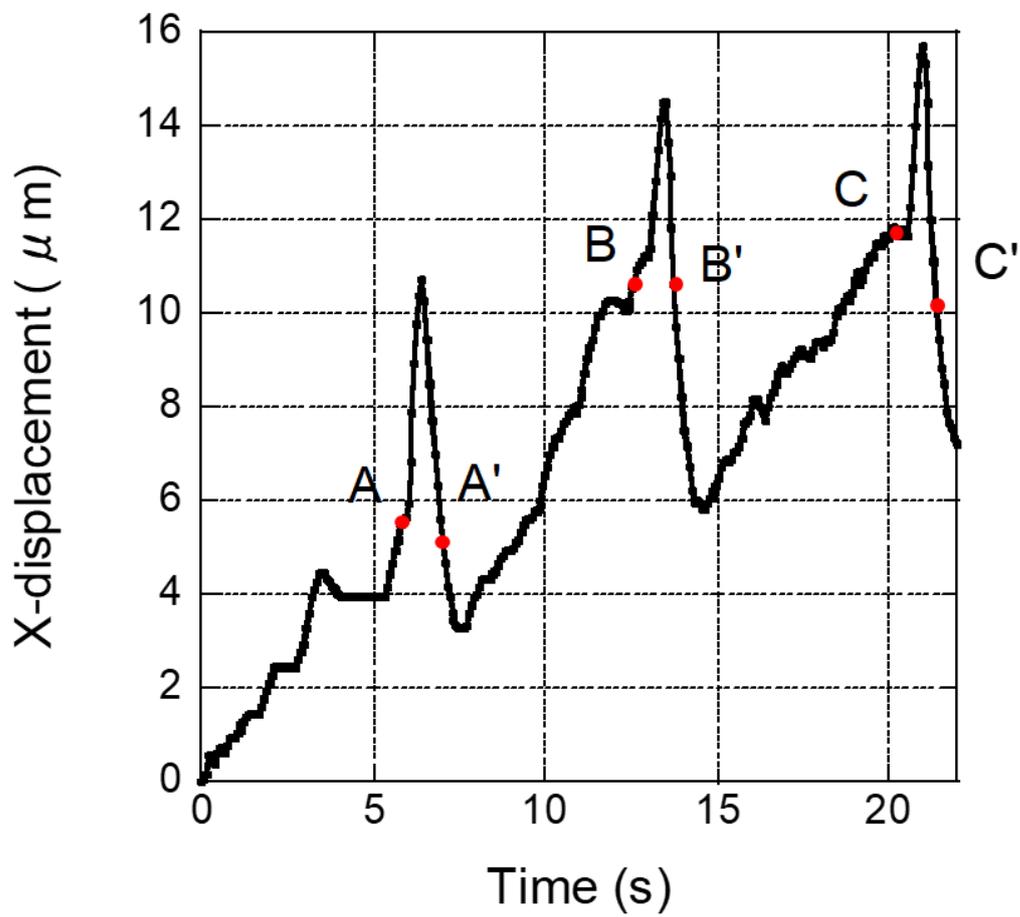


Fig.3.10 Displacement behavior of particle in hiPS-CM tube

続いて、粒子の変位挙動から、本研究で作製した hiPS-CM チューブの駆動性を定量的に算出した。式(3.2)に Fig.3.10 に示すチューブ内の粒子の変位挙動を組み込むことで、チューブ内の単位時間あたりの流体体積変化量を算出した。最大変位 x_{max} には、hiPS-CM チューブの拍動に合わせて粒子の変位が急激に変化する 1 ピーク (X~X') の範囲内における、初期点(X)からピークまでの変位を当てはめた。さらに、3つのピークにおいて算出した体積変化量の平均値を算出した。その結果、チューブ内に $0.00348 \mu\text{L}/\text{min}$ の体積変化を発生させる駆動力を持つことが明らかとなった。本結果は、過去の田中らの研究で初代新生児ラットの心筋細胞を用いたポンプの単位時間当たりの駆動力 $0.047 \mu\text{L}/\text{min}$ と比べ、かなり小さな駆動力であることが明らかとなった[113]。その原因として、田中らの初代新生児ラット心筋細胞のポンプは、直径が 5.3mm ほどの球体構造に対し、本研究で作製した hiPS-CM 三次元組織体は直径 0.7mm ほどのチューブ状構造であり、形状やサイズが大きく異なることや使用している細胞が異なることが考えられる。

3.4.2 理論モデルと実験結果の比較

チューブの直径方向に設定した2点のポイント間の距離の経時変化を Fig.3.11 に示す。2点間の距離の経時変化の周期はおよそ 6.185s (周波数: 162mHz) であり, Fig.3.8 で示した hiPS-CM の収縮挙動と近い変形周期を示した。このことから, チューブは hiPS-CM の収縮に伴って変形していることが明らかとなった。式(3.3)を用いて心筋チューブのひずみ挙動を算出した結果を Fig.3.12 に示す。さらに, そのひずみ挙動から Guccione らの応力理論式を用いて PDMS チューブにかかる応力挙動を予測した。PDMS チューブの応力挙動を Fig.3.13 に示す。その結果を用いてシンプルな線形弾性体として PDMS チューブのひずみを算出した結果を Fig.3.14 に示す。

チューブの変形からチューブ内の流動を予測する理論モデルとチューブ内の粒子の変位挙動(Fig.3.10)の結果を比較した。チューブの変形とチューブ内の粒子の変位挙動のどちらも hiPS-CM の収縮に伴う経時変化を示すことから, 本研究では, チューブの変形結果からチューブ内の流動の予測が妥当であると考えた。変位を表す理論式(式(3.5))と流速を表す理論式(式(3.6))のそれぞれに Fig.3.14 で示したチューブのひずみ挙動 ε を組み込み, チューブ内流体の変位挙

動と流速を算出した。それぞれ、チューブ内の粒子の位置を追跡した結果から求めた変位挙動と流速挙動を比較した。変位挙動の比較を Fig.3.15 に示し、流速挙動を比較した結果を Fig.3.16 に示す。チューブ内の粒子の変位挙動が示した3つのピークの実験結果と理論モデルから予測する結果を比較した。実験結果の3つのピークは、収縮挙動に合わせて変位が加速する点と仮定し、本研究では、Fig.3.10 に示した $X \sim X'$ までの変位を1ピークと定めた。チューブ内の粒子が示す実験結果と理論モデルから予測した結果を比較したところ、定性的にはチューブの変形からチューブ内の流動を再現することができた。しかし、定量的には実験結果と理論モデルは異なる挙動を示している。その原因として、本研究で構築した理論モデルは円柱形モデルにチューブ幅の変形に伴うひずみを組み込むことでチューブ内部の流動の予測を試みており、実際にチューブ内に発生する圧力損失などを考慮していないことから、実験値と理論値に差異が発生したことが予測できる。チューブ内側の材料表面特性や流速挙動の結果から圧力損失を予測し、理論式に組み込むことで実験モデルの定量的な再現の可能性が考えられる。また、実験モデルは特定の粒子の実測値を理論値と比較したが、チューブ内の流動は計測する箇所によって異なる可能性があるため、より粒径の小さ

いトレーサー粒子を用いた粒子画像の流速計測や、より高倍率での撮影が可能な顕微鏡を用いて複数の粒子の挙動から議論する必要があると考えられる。

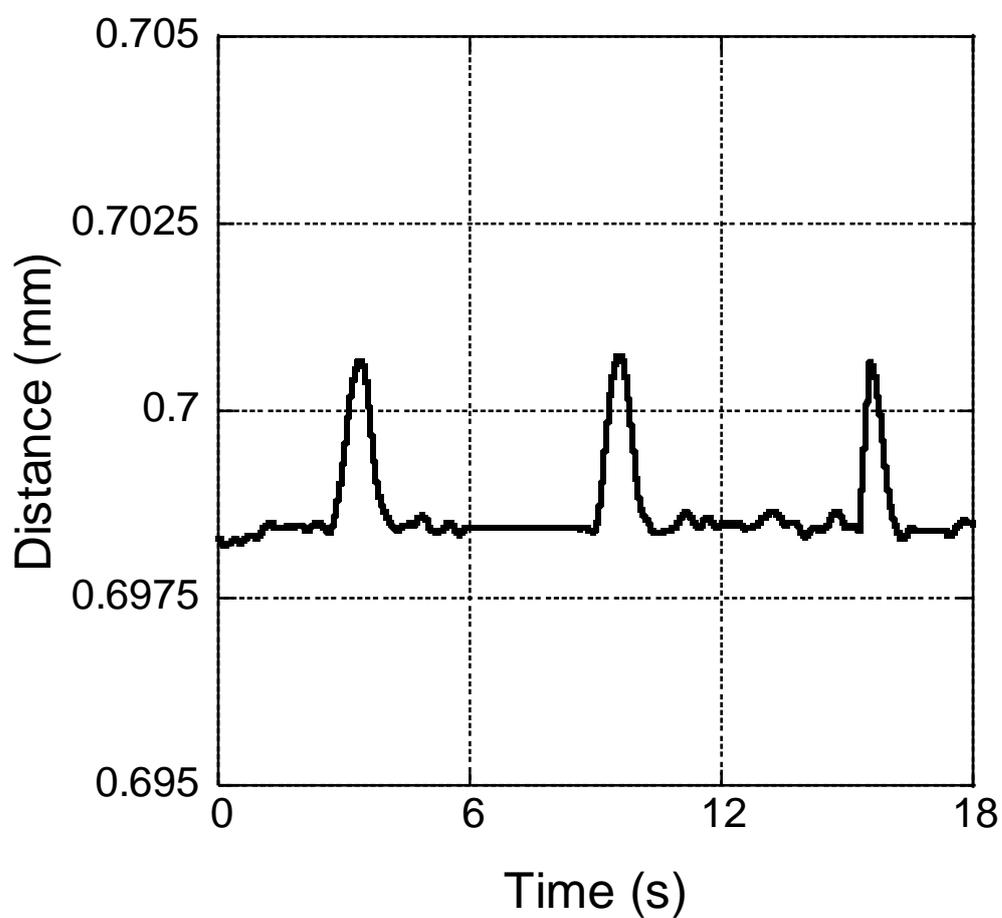


Fig.3.11 Time-variation of distance between two points set along the width of the hiPS-CM tube

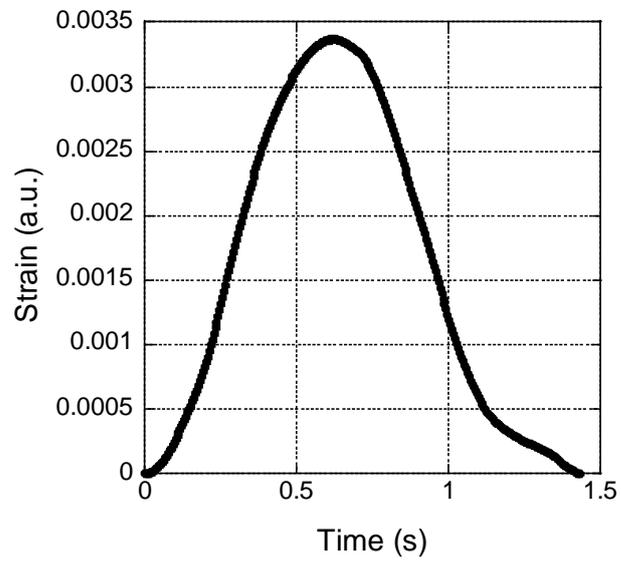


Fig.3.12 Time-variation of strain in hiPS-CM tube due to self-pulsation

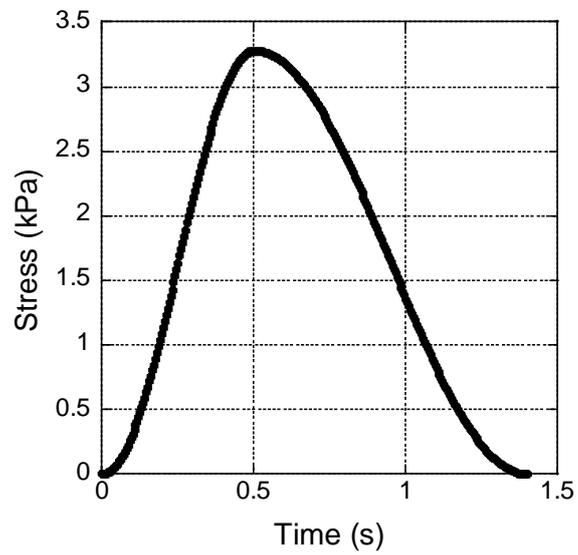


Fig.3.13 Time-variation of stress in PDMS tube predicted from the strain behavior of hiPS-CM tube

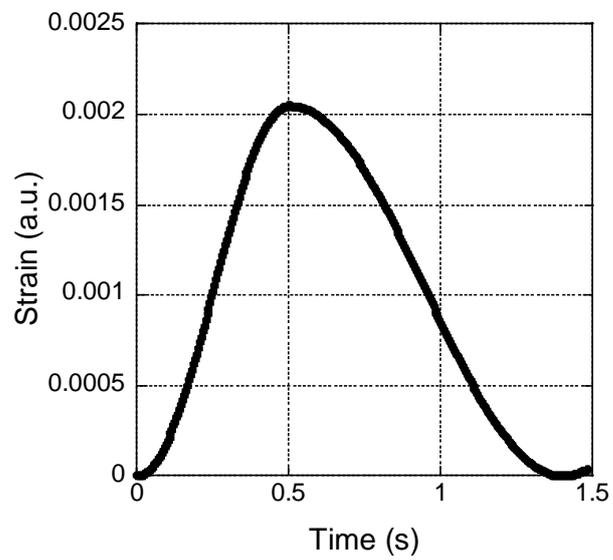


Fig.3.14 Time-variation of strain predicted from stress history shown in Fig.3.13

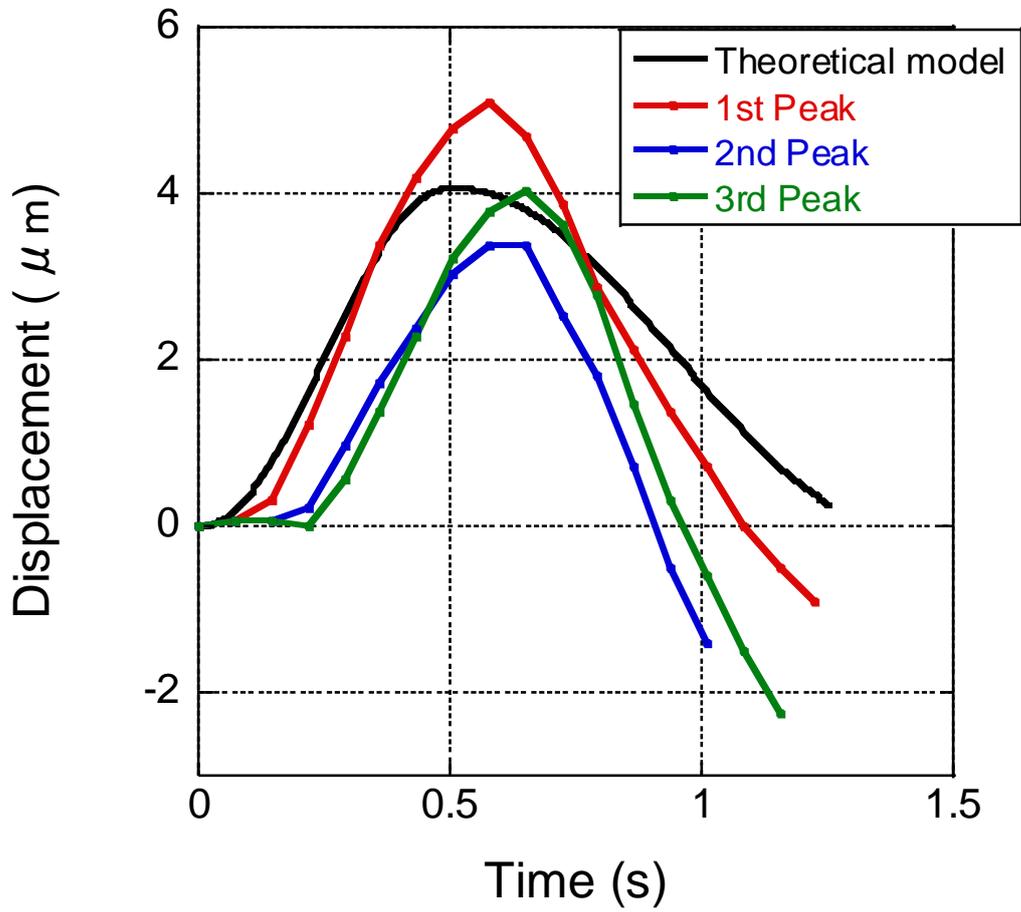


Fig.3.15 Comparison of particle displacement and fluid displacement in the tube predicted by the theoretical model

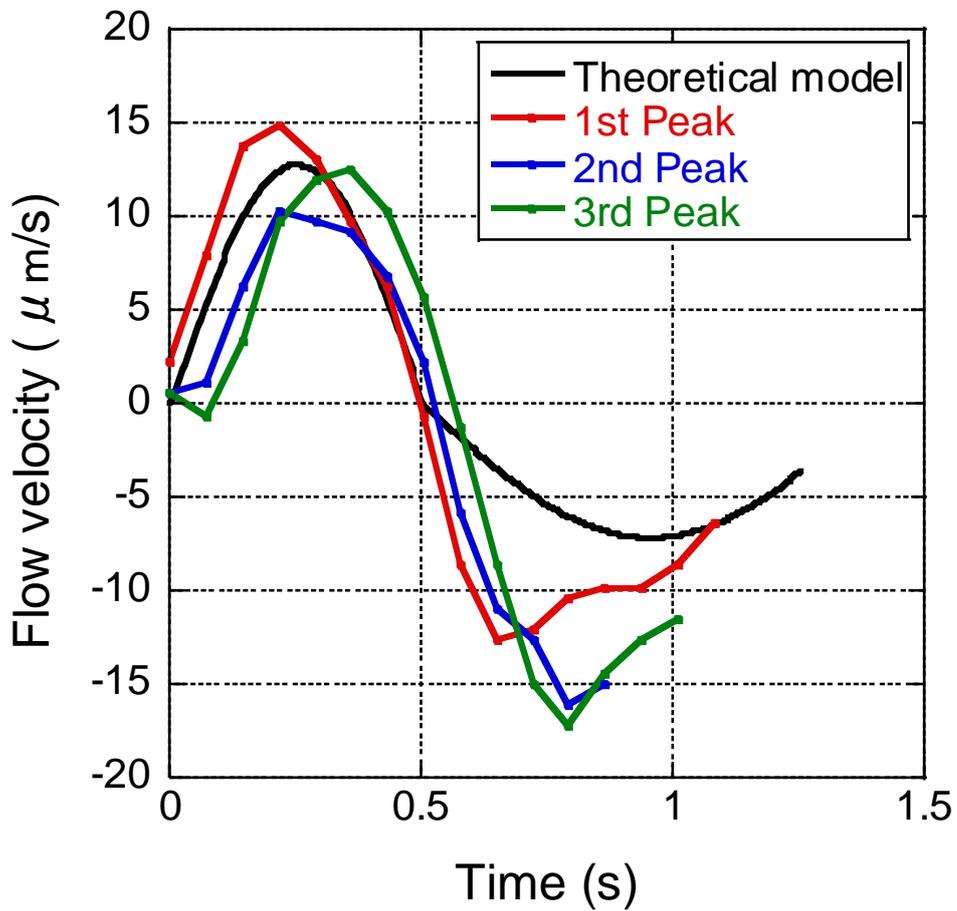


Fig.3.16 Comparison of the particle velocity and the flow velocity in the tube predicted by the theoretical model

3.5 小括

本章では、前章で作製した hiPS-CM シートを利用し、外部電力や刺激を不要とする疑似心臓ポンプの開発を目指してチューブ状組織体を作製し、その基本的力学特性を評価した研究について説明した。

本研究では、簡易的な PDMS チューブを作製し、そこに hiPS-CM シートを巻き付けることで、hiPS-CM チューブ状組織体の作製に成功した。作製した hiPS-CM チューブは培養を継続することで、心筋細胞の自己拍動が発生し、高速光計測システムを用いて自己拍動挙動の定量的評価を行った。さらに、チューブ内に微小な粒子を分散させ、その粒子の動きを追跡することで、hiPS-CM チューブの駆動性能を評価した。チューブに対して平行軸方向の粒子の変位を測定した結果、チューブ内の粒子は前進と後退を繰り返しながらも 1 軸方向への順流が確認でき、作製した hiPS-CM チューブがポンプ的機能を持つことが明らかとなった。

続いて、hiPS-CM チューブの変形挙動を解析し、その結果から理論モデルを用いて予測されるチューブ内の流動を実験結果と比較した。高速光計測システムで撮影した連続画像データをデジタル画像相関法で hiPS-CM の拍動にとも

なう変形挙動を解析し、その結果から PDMS チューブの変形によるひずみを算出した。一方、チューブの変形挙動から流動を予測する理論モデルには、シンプルな円筒形モデルを採用した。理論モデルから予測したチューブ内の流体の変位挙動と流速挙動は、チューブ内の粒子の変位挙動とそこから算出された速度と比較を行った。その結果、変位挙動と流速挙動のどちらも、定量的には差異を生じていたが定性的には類似した結果を示すことが明らかとなった。

第 4 章

hiPS-CM チューブの変形挙動評価と 理論モデルの構築

4.1 はじめに

本章では、前章で作製した hiPS-CM チューブにおいて、その自己収縮挙動による変形挙動として最小主ひずみの時間変動を実験的に評価し、さらに最小主ひずみの時間変動を再現する理論モデルの確立を試みた研究について説明する。まず第 1 段階としては、第 2 章で説明したデジタル画像相関法を応用した最小主ひずみ計測を実施し、hiPS-CM チューブの変形挙動の評価を行った。次に第 2 段階として最小主ひずみの時間変動を予測する理論モデルの構築を試みた。まず、第 2 章で提案した Guccione らのサルコメア能動的応力モデルと粘弾性 Maxwell モデルを組み合わせた理論モデルが hiPS-CM チューブにおいても適用可能か検討を行った。続いて、バネ要素とダッシュポット要素を並列に接続した粘弾性 Voigt モデルを用いた理論モデルを構築し、実験結果との比較を行った。また、hiPS-CM シートと hiPS-CM チューブの自己拍動に伴う変形挙動を比較し、hiPS-CM 組織体の収縮特性を評価した。

4.2 ひずみ変動の計測方法

hiPS-CM チューブの自己拍動に伴う変形解析として、hiPS-CM シートと同様、デジタル画像相関法を用いて最小主ひずみ挙動を算出した。高速光測定システムで撮影した連続画像データを、デジタル画像相関法評価ソフトウェア GOM Correlate2019 を用いて解析を行った。解析条件は、サブセットサイズを 7 ピクセル、ポイント間の距離を 3 ピクセルと設定した。hiPS-CM チューブの細胞部分において、2.2.7 節で述べた方法と同様、変位分布画像からよく収縮が確認できる箇所に 2 点のポイントを設定し、2 点のポイント間の X 軸 Y 軸方向における 2 点間距離の変位を計測した。その結果から、式(2.1)式(2.2)を用いて最小主ひずみを算出した。

4.3 ひずみ変動理論モデル

4.3.1 粘弾性 Maxwell モデルを用いた理論モデル

第 2 章で説明した hiPS-CM シートの収縮挙動に伴う応力-ひずみ応答を再現する理論モデルを用いて、hiPS-CM チューブの収縮挙動における応力-ひずみ応答を再現することが可能か検討した。心筋細胞の持つ能動的応力は、Guccione

らが過去に提案した時間依存等尺性張力 σ_{act} (式(2.3))を用いて、粘弾性 Maxwell モデル構成則と組み合わせて最小主ひずみの変動挙動を表す理論式(式(2.11))を導出した (2.3.2 節参照).

4.3.2 粘弾性 Voigt モデルを用いた理論モデル

粘弾性モデルとして最も基本的なものは、バネ要素とダッシュポット要素を直列に連結した Maxwell モデルと、バネ要素とダッシュポット要素を並列に連結した Voigt モデルである. 本節では、Voigt モデルを用いた構成方程式の導出について説明する. バネ要素とダッシュポット要素を組み合わせた 2 種類の粘弾性モデルの概略図を Fig.4.1 に示す. まず、Voigt モデルの構成方程式は次式のように与えられる.

$$\dot{\varepsilon}_{pr} + \frac{E}{\eta} \varepsilon_{pr} = \frac{1}{\eta} \sigma_{act} \quad (4.1)$$

σ_{act} に式(2.3)で示した Guccione らのサルコメア能動的応力を代入し、定数変化法を用いて式(4.1)を解くことで、最小主ひずみの時間変動を表す理論式が下記の通り得られる.

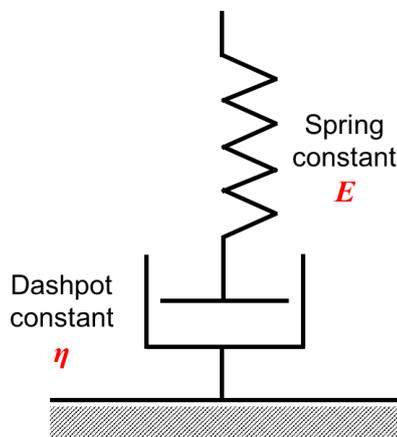
i) $0 \leq t < t_0$ のとき

$$\varepsilon_{pr}(t) = \frac{\alpha}{E^2 t_0^2 + \pi^2 \eta^2} \left[E t_0^2 - E t_0^2 \cos\left(\frac{\pi}{t_0} t\right) - \pi \eta t_0 \sin\left(\frac{\pi}{t_0} t\right) \right] \quad (4.2)$$

ii) $t_0 \leq t < t_0 + t_r$ のとき

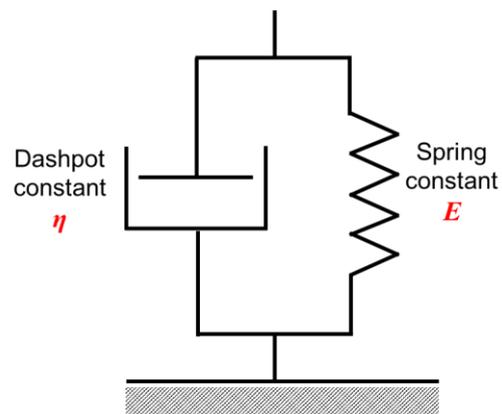
$$\varepsilon_{pr}(t) = \frac{\alpha}{E} \left(\frac{E^2 t_0^2 - \pi^2 \eta^2}{E^2 t_0^2 + \pi^2 \eta^2} \right) + \frac{\alpha}{E^2 t_r^2 + \pi^2 \eta^2} \left[\frac{\pi^2 \eta^2}{E} - E t_r^2 \cos\left(\frac{\pi}{t_r} (t - t_0 + t_r)\right) - \pi \eta t_r \sin\left(\frac{\pi}{t_r} (t - t_0 + t_r)\right) \right] \quad (4.3)$$

Maxwell model



(a) Maxwell model

Voigt model



(b) Voigt model

Fig.4.1 Schematics of fundamental viscoelastic models

4.4 結果と考察

4.4.1 拍動に伴うひずみの時間変動

hiPS-CM チューブをデジタル画像相関法で解析し、収縮に伴う変位の分布を Fig.4.2 に示す。その変位分布図から変形が比較的活発な 3 点を計測ポイントと定めた。デジタル画像相関法で求めた 2 軸方向変位挙動から式(2.2)を用いて算出した拍動に伴う最小主ひずみ挙動を Fig.4.3 に示す。最小主ひずみ挙動は周期的な経時変化を示し、周波数と周期はそれぞれ 154mHz と 6.50s であった。本結果は 3.4.1 節で示した高速光計測システムを用いて測定した収縮挙動の経時変化(周波数：155mHz, 周期：6.47s)と近い値を示していることから、解析結果から算出した最小主ひずみは、hiPS-CM の自己拍動に伴い心筋組織が変形した際のひずみ挙動であることが明らかとなった。

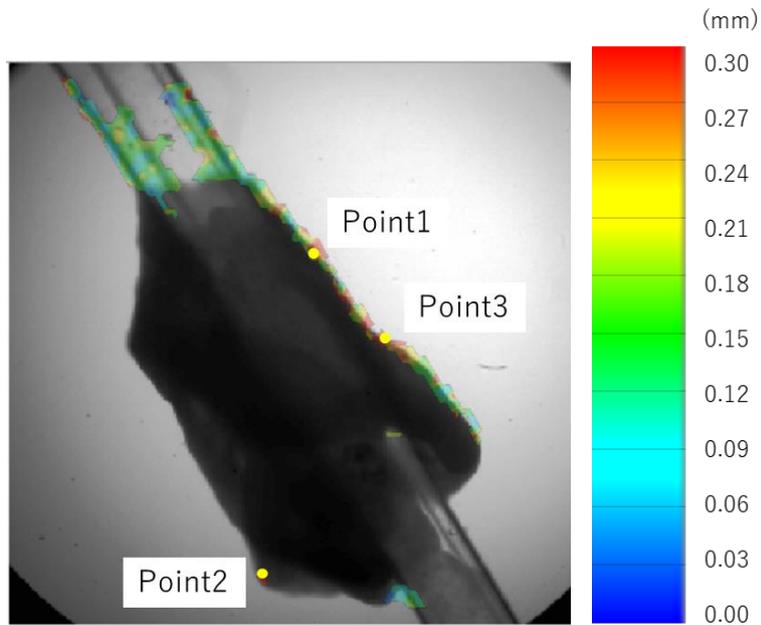


Fig.4.2 Displacement distribution map at peak contraction obtained from the image correlation analysis and three measurement points

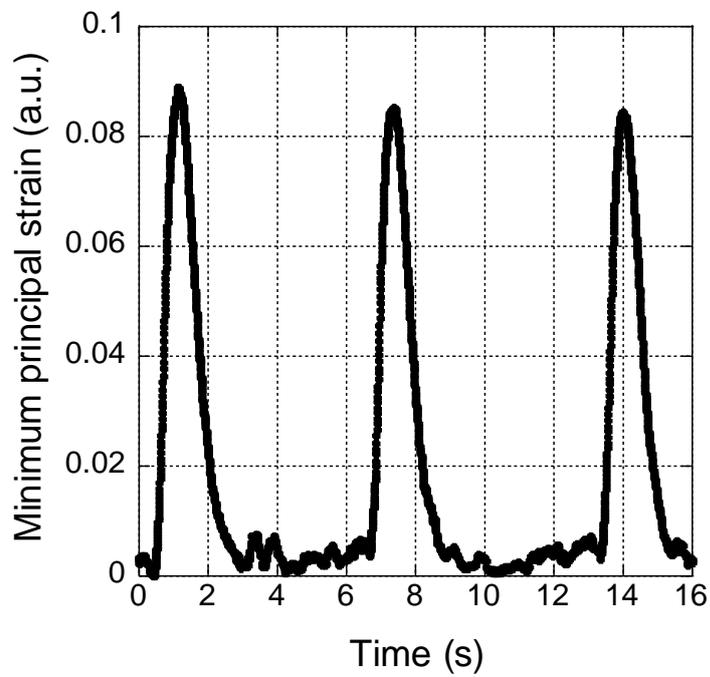


Fig.4.3 Time-variation of minimum principal strain of hiPS-CM tube

4.4.2 Maxwell モデルと実験結果の比較

式(2.6)を用いて最小主ひずみ挙動の結果から算出したサルコメア長の経時変化を Fig.4.4 に示す。応力理論式(式 2.3)に組み込まれる定数の一つであるサルコメア長 l_0 に、Fig.4.4 で示したサルコメア長が最も収縮した時の長さを組み込んだ。続いて、Fig.4.2 に示す 3 つの計測ポイントにおいて計測した最小主ひずみ挙動と、理論式を用いて予測した最小主ひずみ挙動を比較した結果を Fig.4.5 に示す。また、粘弾性材料に関する係数を Table.4.1 に示す。Fig.4.5 より、3 点のどの計測ポイントにおいても、理論モデルは実験結果と近い挙動を示すことが確認できた。一方、3 点のひずみ挙動はそれぞれの測定点で異なる挙動を示し、これは PDMS チューブに巻き付けている hiPS-CM シートの細胞特性やペースメーカー細胞の分布が局所的に異なることが原因であると考えられる。

Table.4.1 Material constants used with Maxwell model

	E (kPa)	η (kPa · s)
Point 1	825	20000
Point 2	700	20000
Point 3	880	20000

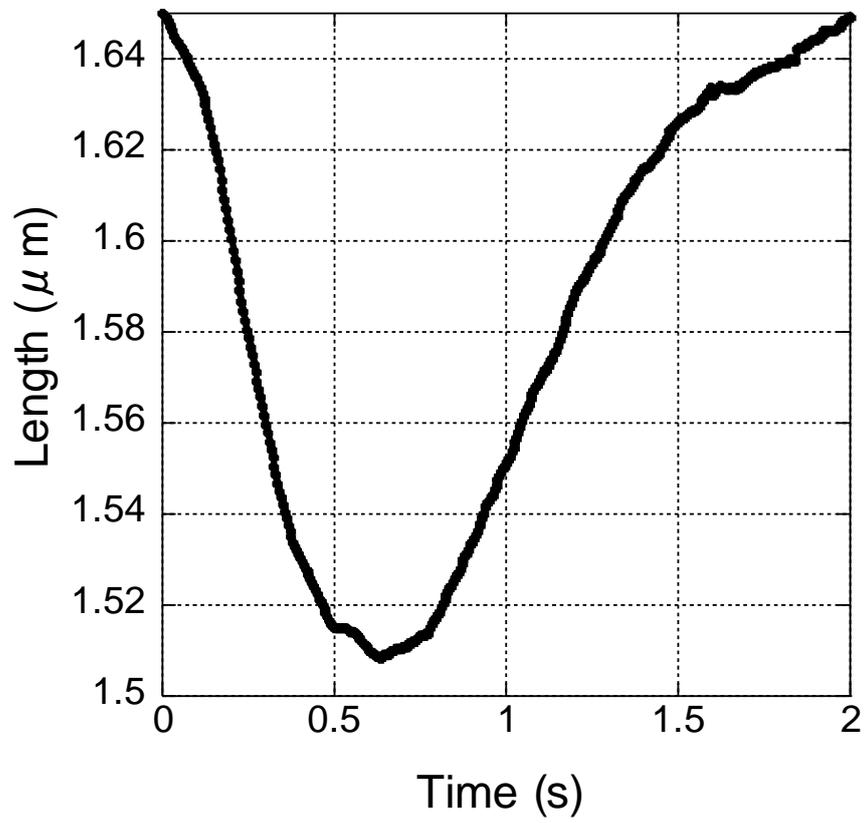


Fig.4.4 Time-variation of sarcomere length predicted from minimum principal strain behavior with pulsation

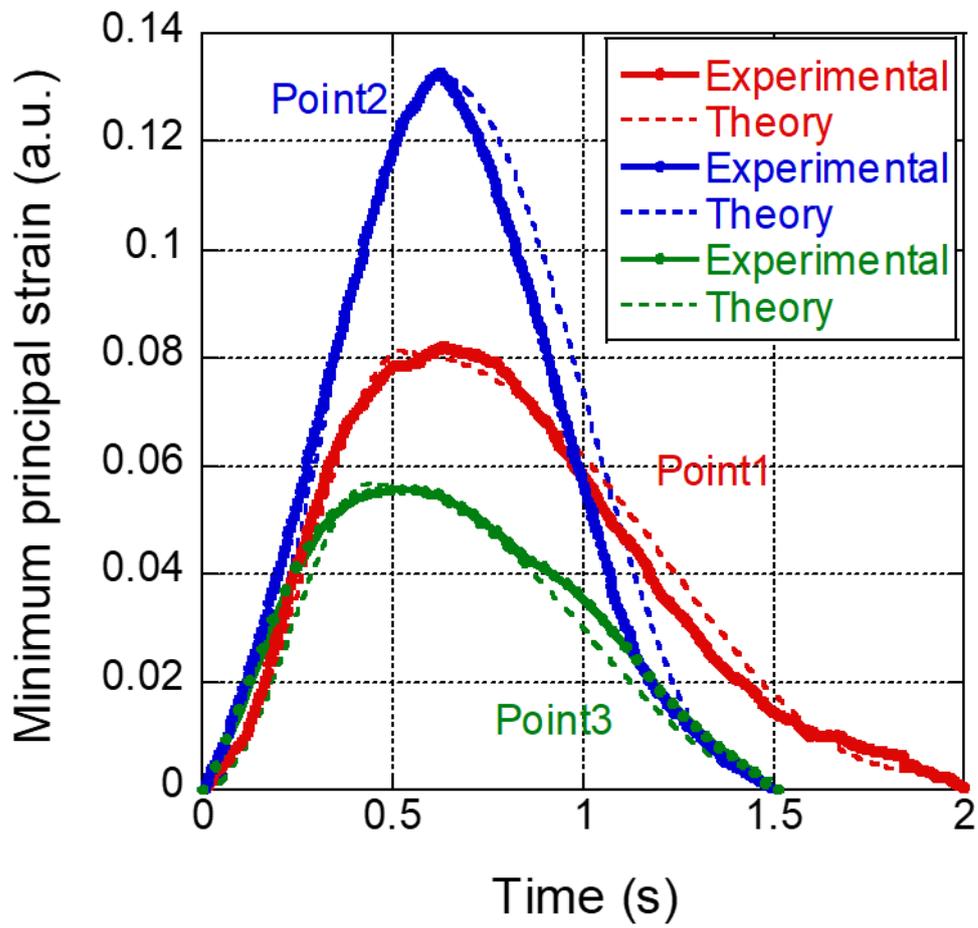


Fig.4.5 Comparison of strain variation predicted from viscoelastic Maxwell model and experimental results

4.4.3 Voigt モデルと実験結果の比較

粘弾性モデルのバネ要素とダッシュポット要素を並列に接続した粘弾性 Voigt モデルを用いた理論モデルを構築し、hiPS-CM チューブの変形挙動の再現が可能であるか検討した。Guccione らのサルコメア能動的応力理論式と粘弾性 Voigt モデルを組み合わせることで導出したひずみ理論式(式(4.2)(4.3))を用いて最小主ひずみ挙動を予測し、実験結果と比較した結果を Fig.4.6 に示す。その結果、どの計測ポイントの最小主ひずみ挙動においても、粘弾性 Voigt モデルを用いた理論モデルが実験結果とよく一致したひずみ挙動を示すことが確認できた。

本研究で確立した Guccione らの能動的応力理論式と粘弾性モデルを組み合わせた 2 種類の理論モデル(Maxwell モデル・Voigt モデル)の有効性を検証するために、線形弾性モデルとの比較検討を行った。能動的応力と最小主ひずみの間に線形弾性関係を仮定すると次式が得られる。

$$\varepsilon_{pr} = \sigma_{act}/E \quad (4.4)$$

粘弾性モデルと線形弾性モデルで予測したひずみの時間変動挙動を Fig.4.7 に示す。線形弾性モデルによるひずみ挙動は、粘弾性モデルに比べ弛緩末期における

hiPS-CM 実験モデルの緩やかなひずみ挙動が十分に再現できないことが明らかとなった。

過去の研究においても、心筋細胞に直接材料特性評価を行った結果、粘弾性的挙動を示すことが明らかとなっており、その他にも平滑筋組織の構成モデルにおいても粘弾性挙動を組み込んだモデルが実験結果を再現したことが明らかとなった[117,118]. このことから、hiPS-CM の拍動に伴うひずみ挙動を再現するモデルに粘弾性モデルが適していると考えられる。

Table.4.2 Material constants for the viscoelastic Voigt model

	E (kPa)	η (kPa · s)
Point 1	825	10
Point 2	700	1
Point 3	880	10

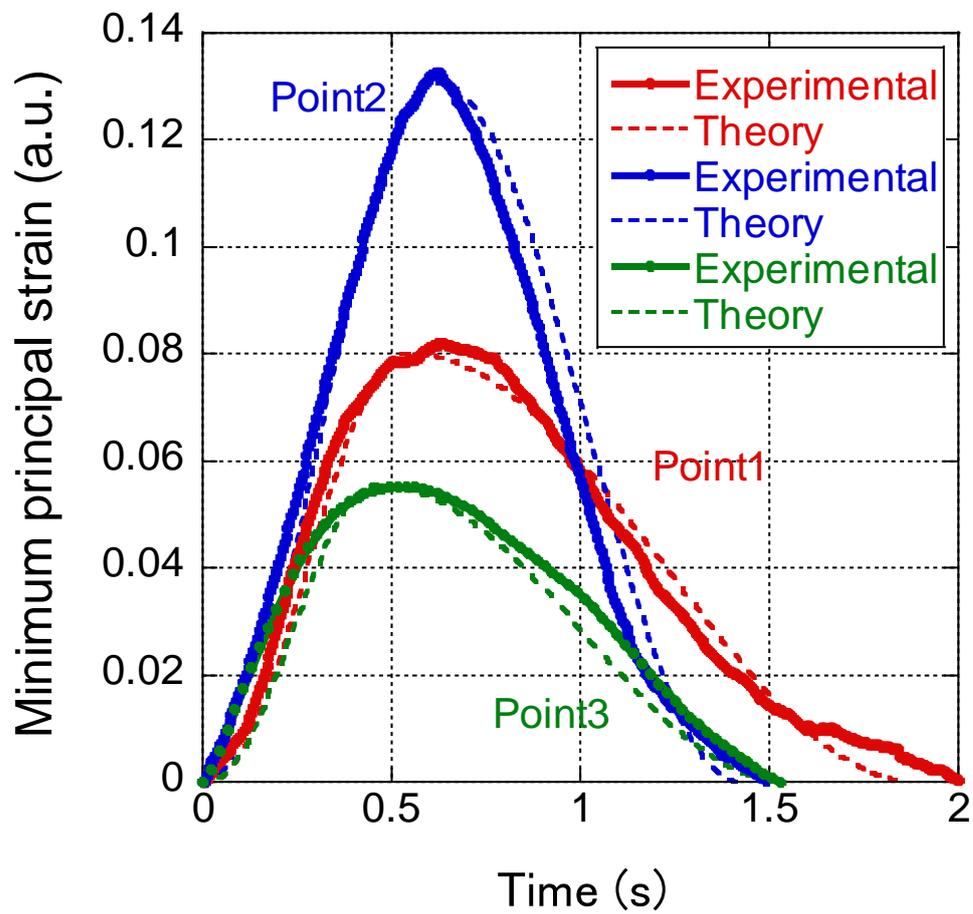


Fig.4.6 Comparison of strain behavior of hiPS-CM predicted from viscoelastic Voigt model and experimental results

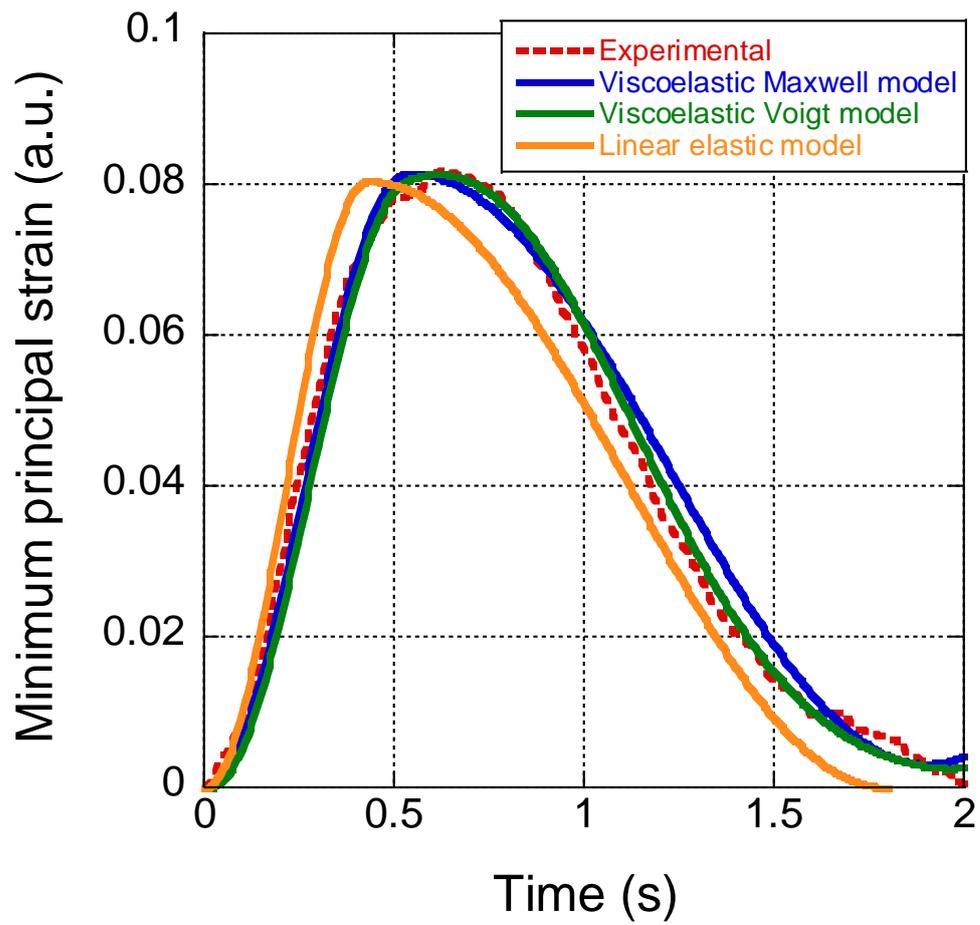


Fig.4.7 Comparison of strain variations obtained from viscoelastic and linear elastic models along with experimental result

4.4.4 能動的応力-最小主ひずみ関係の導出

Fig.4.5 および Fig.4.6 の結果は、能動的応力の理論モデルと 2 種類の基本的粘弾性モデルを組み合わせることで導出した最小主ひずみの理論モデルが、最小主ひずみの実測値とよく一致することを示していた。このことは、能動的応力の理論モデルが実際の応力に近い値を示していることを示唆している。そこで、能動的応力と最小主ひずみの実測値を組み合わせることで能動的応力-最小主ひずみ関係を導出した。3 か所の計測点での能動的応力の時間変動を Fig.4.8 に示す。これらの応力変動と各計測点で計測された最小主ひずみの時間変動を組み合わせた結果を Fig.4.9 に示す。Fig.4.9 より、応力-ひずみ挙動には粘弾性的なヒステリシスループが確認でき、hiPS-CM チューブの収縮から弛緩においてエネルギー損失が発生していることが明らかになった。また、ヒステリシスループは各計測点によって異なる大きさを示しており、これは、hiPS-CM 組織体の細胞特性が局所的に異なることで、異なるエネルギー収支を発現した可能性が考えられる。

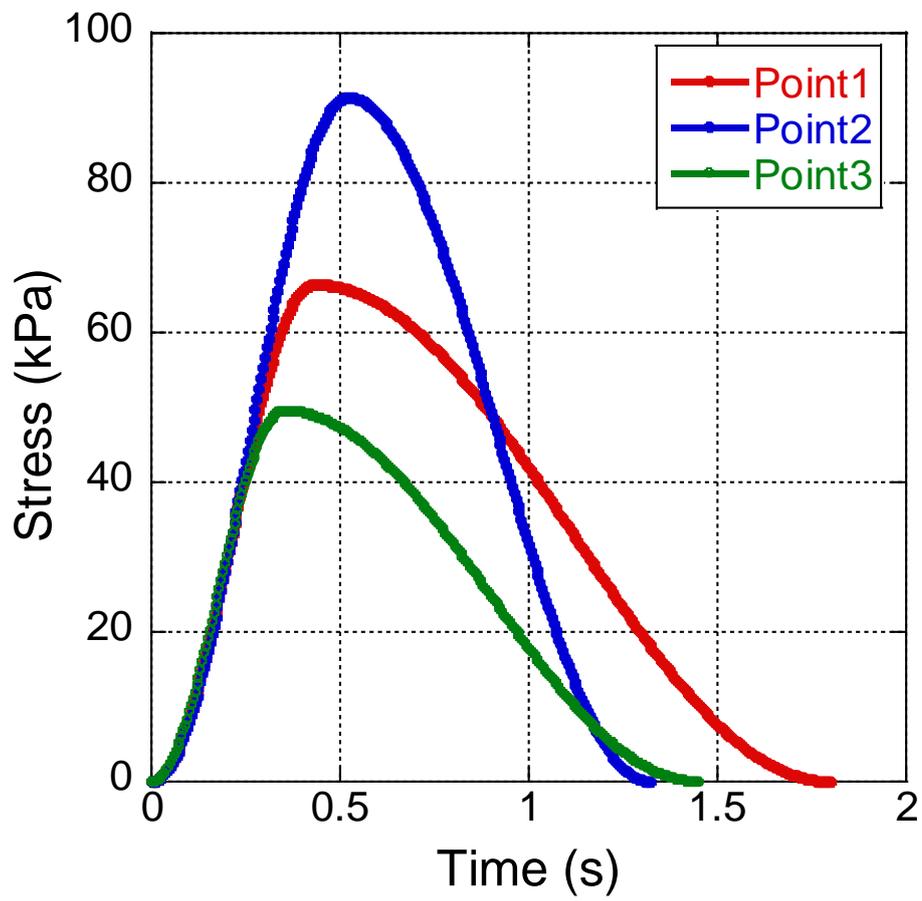


Fig.4.8 Time-variation of active stress predicted from Guccione's model

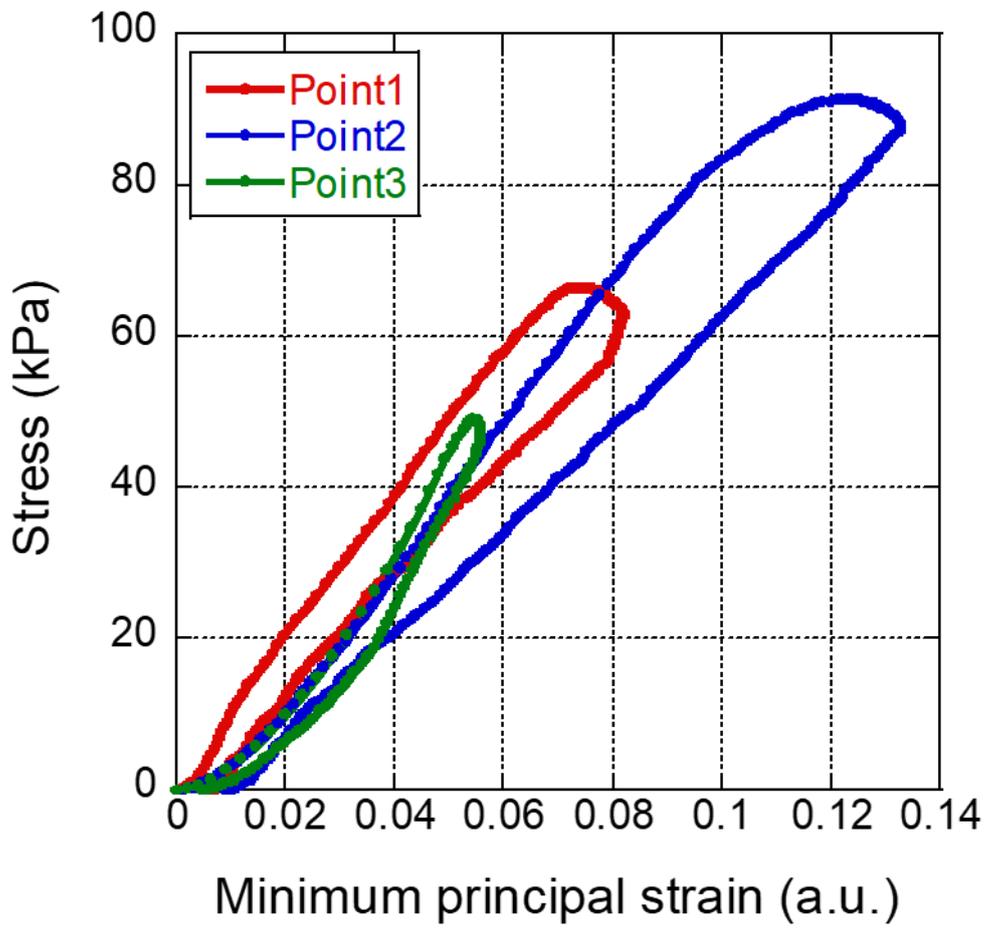


Fig.4.9 Relationship between active stress and minimum principal strain associated with self-pulsation of hiPS-CM tube

4.4.5 hiPS-CM シートと hiPS-CM チューブの比較

シート状組織体とチューブ状組織体の変形に伴う最小主ひずみの時間変動挙動の比較を行った(Fig.4.10). その結果, hiPS-CM シートのひずみ挙動は hiPS-CM チューブのひずみ挙動に比べ, 比較的大きなひずみ挙動を示し, 収縮から弛緩までに要する時間が短い傾向にあった. 実験モデルのひずみ挙動から応力理論モデルを用いて予測したそれぞれの応力経時変化を Fig.4.11 に示す. 本研究では, 拍動に伴う圧縮方向のひずみを示す最小主ひずみは, hiPS-CM の収縮方向の最大のひずみ挙動であると仮定している. Fig.4.11 に示す応力挙動もひずみ挙動と同様に収縮方向に発生する応力を示しているが, hiPS-CM チューブは hiPS-CM シートに比べ小さな応力挙動を示した. この結果は, hiPS-CM チューブの足場となる PDMS チューブが細胞シートに比べはるかに剛性が高く, hiPS-CM の変形を制限していることを示唆している [114,115].

続いて, 上記に示した最小主ひずみ挙動(Fig.4.10)と応力挙動(Fig.4.11)を組み合わせた能動的応力-最小主ひずみ挙動を比較した結果を Fig.4.12 に示す. hiPS-CM チューブはシートに比べ小さいヒステリシスループを示している. これは, 収縮から弛緩にあたりエネルギー損失が小さいことを表しており, この点につ

いても、hiPS-CM チューブの足場となる PDMS チューブにより変形が抑制されたことが原因であると考えられる。今後、hiPS-CM の収縮力に対して適切な剛性の足場材を用いることで、細胞内の化学エネルギーを効率よく機械エネルギーに変換することができる hiPS-CM 3次元組織体の構築が可能であると考えられる。

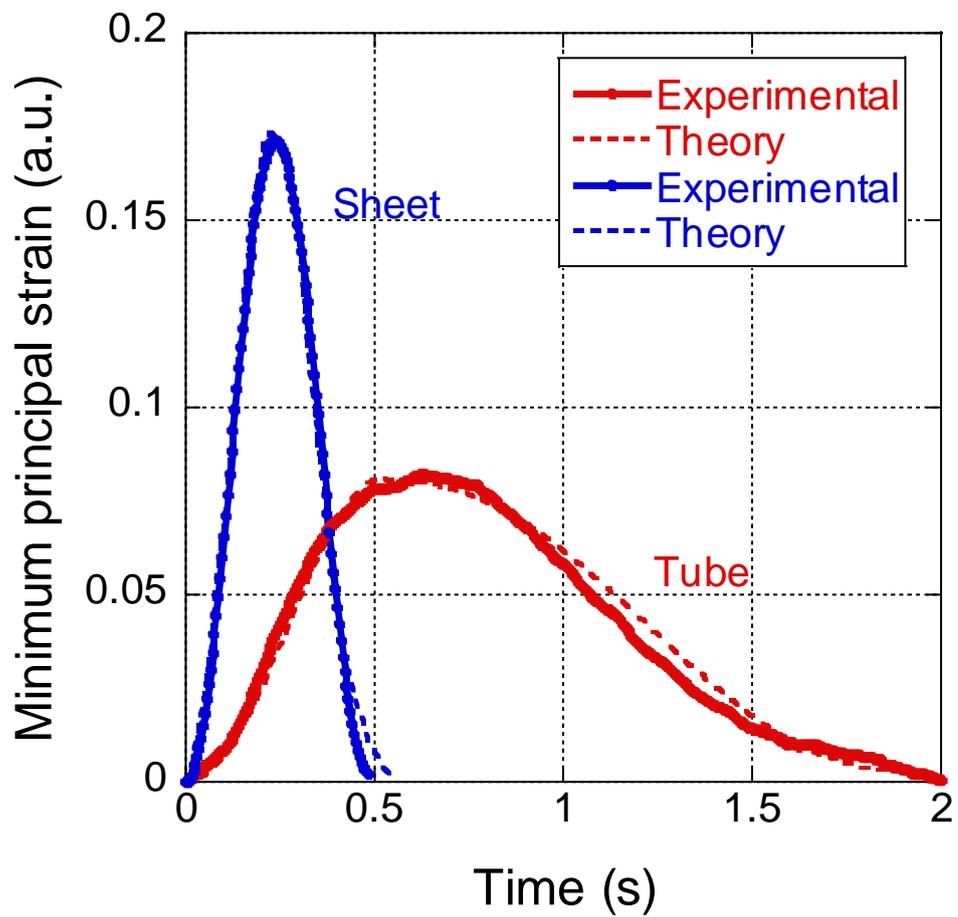


Fig.4.10 Comparison of the minimum principal strain variations of hiPS-CM sheet and hiPS-CM tube

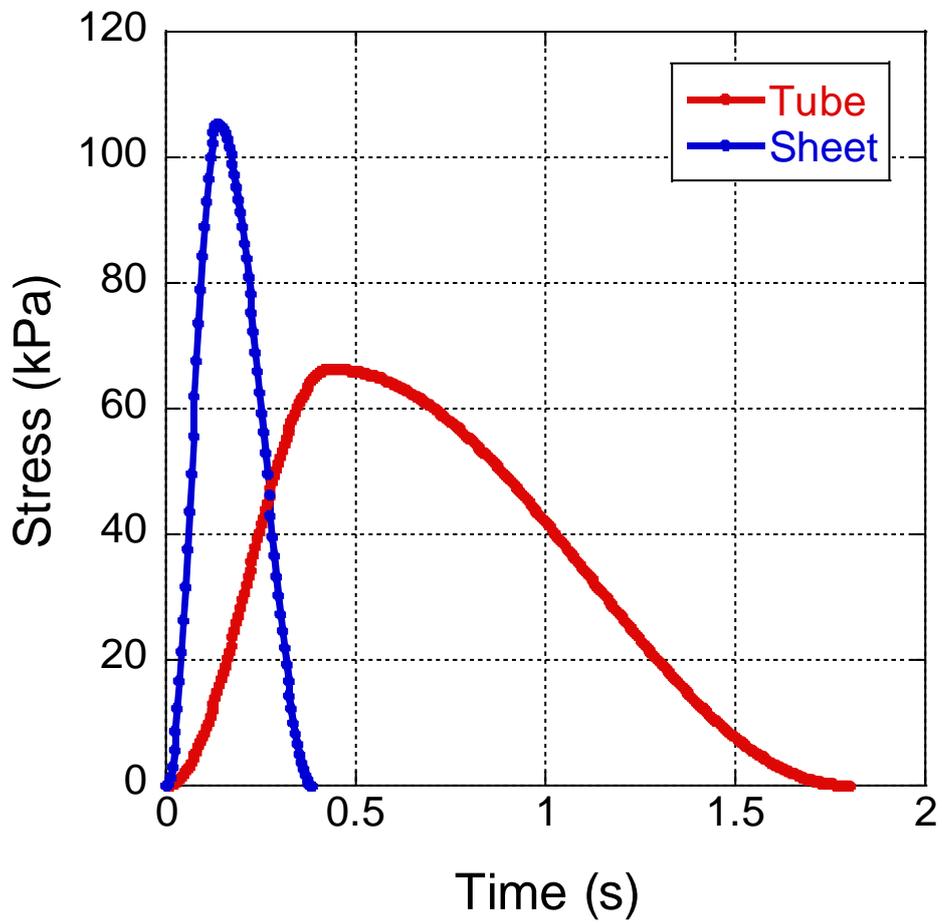


Fig.4.11 Time-variation of active stress obtained from the Guccione's theoretical model in hiPS-CM sheet and tube.

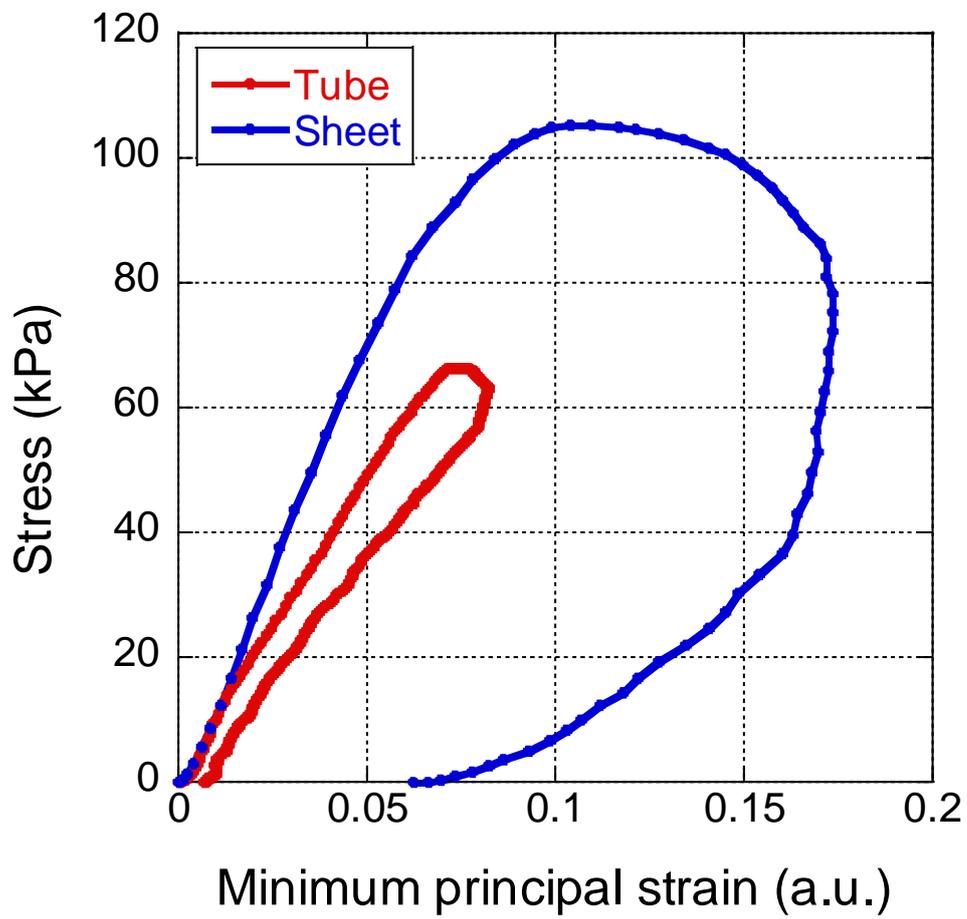


Fig.4.12 Relationship between active stress and minimum principal strain in hiPS-CM sheet and tube.

4.5. 小括

本章では、第3章で説明した hiPS-CM チューブの自己収縮挙動にともなう最小主ひずみの時間変動を再現する粘弾性理論モデルを構築し、実験結果との比較と検討を行った。実験結果と比較する理論モデルとして、2つの理論モデルを構築した。

第1のモデルは、第2章において説明した hiPS-CM シートの収縮に伴う変形挙動を再現した Guccione のサルコメア能動的応力理論式と粘弾性 Maxwell モデルを組み合わせた理論モデルである。その結果、シート状組織体だけでなく hiPS-CM チューブにおいても収縮に伴うひずみ挙動をよく再現していることが明らかとなった。

第2のモデルは、粘弾性 Voigt モデルと Guccione のサルコメア能動的応力理論式を組み合わせた理論モデルである。本理論モデルにおいても、Maxwell モデルと同様、hiPS-CM チューブの収縮に伴うひずみ挙動を再現していることが確認できた。また、線形弾性モデルを用いて導出したひずみの時間変動では、hiPS-CM チューブ穏やかな弛緩挙動の再現ができない点から、粘弾性モデルの有効性が示された。

実験から得られた最小主ひずみの時間変動と Guccione 能動的応力を組み合わせることで能動的応力-最小主ひずみ関係を導出した結果、各計測点で粘弾性材料特有の非線形ヒステリシスループを発現することが明らかとなった。このようなヒステリシスループは、心筋組織内におけるエネルギー散逸メカニズムと関係していることが示唆される。

最後に、hiPS-CM シートと hiPS-CM チューブ状組織体の変形挙動について比較した。その結果、シートはチューブに比べ大きいピーク値を示し、収縮時間が短い傾向を示した。さらに、それぞれの実験モデルにおいて応力-ひずみ応答を示した結果、hiPS-CM チューブはシートに比べヒステリシスループは小さいことからエネルギー収支が小さいことが示唆された。この原因として、hiPS-CM シートを巻き付けている PDMS チューブが細胞シートに比べ剛性が大きいことから心筋の拍動力を制限している可能性が考えられる。今後、hiPS-CM チューブの足場に適切な材料を用いることで改善することが予測される。

第 5 章
PMEA 類似体上で培養した
hiPS-CM の細胞機能評価

5.1 はじめに

通常、血液は高分子材料と接触した際に血液凝固や血栓の形成を引き起こすことが明らかとなっている[119]。一方で、PMEA は生体適合性高分子であり、タンパク質の吸着や変性が抑制される性質を持っていることから血液成分との相互作用が弱く、血栓の形成を防ぐことが可能である。このことから、PMEA は血液適合性の高い材料として人工心肺などの医療用機器へのコーティング材料として用いられている[120]。過去の研究において、PMEA 類似体には表面に吸着する水分子の層において『中間水』を持つことが明らかとなっており、その中間水の量がタンパク質吸着性に大きな影響を与えることが示された[121]。また、その性質を応用し、PMEA 類似体ポリマー上で細胞を接着させた際に細胞特性に与える影響を調査した研究が行われ、足場材の水和構造が細胞接着強度や増殖能、形態などの様々な細胞機能に影響を及ぼすことが明らかとなり、材料表面の水分子の層における不凍水と中間水を合わせた『結合水』の量が細胞接着性に影響を及ぼすことが明らかとなった[122-124]。

一方、これまで細胞足場材が hiPS-CM へ与える影響について検討した過去の研究例としては、ハイドロゲル、脱細胞化された ECM 由来の足場、植物由来の

足場上での細胞への影響を検討する研究などが行われてきた[125-127]. しかし, PMEА 類似体を用いて hiPS-CM への影響を検討した過去の研究は未だにない。

そこで, 本研究では, 結合含水量の違いから異なる細胞接着性を示す PMEА 類似体ポリマーをコーティングした基板を hiPS-CM の足場材として用いることで, hiPS-CM の自己収縮挙動に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした. 異なる結合水量をもつ PMEА 類似体ポリマーをコーティングした基板に hiPS-CM を播種し, 初期の細胞接着面積や, 培養を継続した際に発現する細胞コロニーの面積・収縮力などから細胞特性評価を行った.

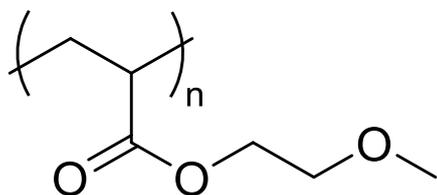
5.2 実験方法

5.2.1 PMEА 類似体のコーティング法

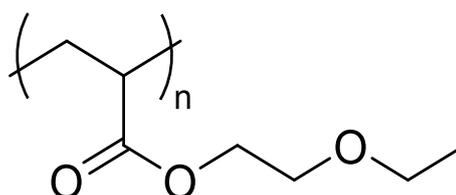
易接着処理を施した二軸延伸 poly(ethylene terephthalate) (PET) シート (DIAFOIL®T100E, 三菱樹脂(株), 厚さ 120 μ m) 上に PMEА 類似体溶液をコーティングした. まず, レーザーカッターを用いて PET シートを 24well 培養プレートの底面と同様のサイズ (直径 14mm) に切り取り, 基板を作製した. 本研究では, Poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEА), Poly(2-ethoxyethyl acrylate)

(PEEA), Poly(2-methoxyethyl methacrylate) (PMEMA)の全3種類のPMEA類似体ポリマーについて検討を行った。本研究で使用したPMEA類似体の構造式をFig.5.1に示す。本研究で用いたポリマーは過去の論文と同様の方法で合成されたものを用いた[128]。各ポリマーの相対分子量と結合水分量をTable.5.1に示す[124]。それぞれのポリマーは脱水トルエンを用いて0.5 wt/vol%の濃度で溶解し、すべて孔径0.20 μ mのフィルターでろ過処理を施した。PMEA類似体溶液を1枚のPET基板に対して40 μ l滴下し、スピンコーター (MS-A100, ミカサ(株))を用いて3000rpmで40秒間の条件でコーティング処理を施した。その後、25 $^{\circ}$ Cの環境下で24時間減圧乾燥を行った。

PMEA



PEEA



PMEMA

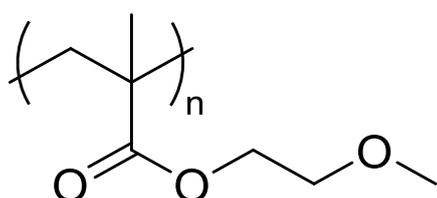


Fig.5.1 Chemical structures of PMEA, PEEA, PMEMA

Table.5.1 Characteristics of PMEA analogue polymers [124]

	Mn [g mol ⁻¹]	Mw/Mn	Bound water [wt %]
PMEMA	91,113	2.090	2.3
PEEA	20,737	2.699	4.5
PMEA	28,617	2.82	6.2

5.2.2 水滴接触角の測定法

細胞は細胞外マトリックスと呼ばれる吸着タンパク質を介して基板に接着しており、基板とタンパク質間の接着性は基板の性質に大きく依存している。そして、材料表面の濡れ性（親水性・疎水性）はタンパク質吸着性に影響を及ぼすことが明らかとなっており、一般的に細胞の接着性は接触角 $60\sim 70^\circ$ の比較的疎水性の基板で最大を示し、その範囲内で親水性と疎水性のバランスが保たれている状態が細胞培養に好ましいとされている[129]。また、過去の多くの研究で材料表面の親水性が細胞移動・形態・増殖・分化に大きく影響を与えることが明らかとなっている[130,131]。本研究で用いたPMEA類似体についても、過去の研究からそれぞれ異なる親水性を持つことが明らかとなっており、本研究ではPET基板上に高分子をコーティングできていることの確認のため、基板表面の親水性測定を行った[128]。本研究で作製した基板表面の親水性評価方法を下記に示す。接触角計（DropMaster, DMO-501SA, Kyowa Interface Science Co.）を使用して液滴法と水中気泡法での静的な水接触角の評価を行った。液滴法は、コーティング基板に $2\mu\text{L}$ の水滴を滴下し、30秒後の接触角を測定した。一方、水中気泡法はあらかじめ室温で24時間PBS中に浸漬した後、表面に $2\mu\text{L}$ の気泡

を付着させ 30 秒後の接触角を測定した。各基板 3 つの基板に対して 2~3 点の接触角を測定し、その平均値を算出した。

5.2.3 hiPS-CM の播種方法

各基板は、コンタミネーションを防ぐため細胞播種前に 1 時間の UV 滅菌処理を施した。予め前培養を施した hiPS-CM を各基板上へ播種した。前培養は 2.2.1 節に記した手順と同様の方法で実施した。前培養を施した hiPS-CM は PBS での洗浄後に酵素処理でディッシュから剥離させ、各基板上に 2.5×10^5 cells/well の密度で細胞を播種した。予め、PMEA 類似体ポリマーをコーティングした PET 基板は 24well 細胞超非接着性マルチウェルプレート (Costar® 24 Well Ultra Low Attachment Surface Flat Bottom Lid, Corning Inc.) に設置した。その後、2 日に 1 度の維持用培地での培地交換を続け、インキュベーター内で培養を行った。

5.2.4 細胞接着形態の評価法

基板の上に播種した hiPS-CM の細胞接着形態評価を行った。hiPS-CM 単細胞の形態観察のため、各基板の上に hiPS-CM を 1.0×10^4 cells/well の低密度条件で播種を行った。播種後 24 時間の hiPS-CM を 4%PFA で固定し、細胞面積の測定のため、細胞骨格タンパク質である α アクチニンと細胞核を染色した [132]。免疫染色の手順は、2.2.5 節で示した内容と同様の手順であるが、2 次抗体とともに 1/1000 の濃度の 4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride n-Hydrate(DAPI)(ナカライテスク(株))を添加し細胞核の染色を行った。その後、共焦点レーザー顕微鏡(FV3000, オリンパス(株))を用いて、それぞれ、波長 405nm・488nm のレーザーで 10 倍の α アクチニンと細胞核の観察を行った。撮影した画像データは画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて細胞面積を測定した。

5.2.5 細胞数の測定法

各基板上で培養 5 日目の hiPS-CM の細胞数を測定した。細胞を一度 PBS で洗浄した後、各 well に細胞数測定用キット (Cell Counting Kit, 同仁化学研究所

(株)) を添加し 2 時間 37°C の条件でインキュベートした。呈色反応を起こした溶液は、細胞の脱水素酵素によりホルマザンを生じることで、生細胞数に比例して溶液の吸光度が変化する [133]。2 時間の呈色反応を起こした試料は吸光度測定用フィルター 450nm のプレートリーダー (2030 ARVO X2, パーキンエルマー (株)) を用いて吸光度を測定した。また、ブランクとして細胞を含まない PBS を同条件で測定した。

5.2.6 拍動コロニー面積の評価法

各基板上で自己収縮する hiPS-CM 凝集体を、倒立顕微鏡 (CKX53, オリンパス (株)) を用いて撮影した。撮影は培養 5 日後、室温で 40fps-20 秒の条件で撮影を行い、1well につき 10 か所ずつ撮影を行った。撮影した連続画像データをデジタル画像相関法評価ソフトウェア GOM Correlate2019 で解析を行い、変位分布の評価を行った (サブセットサイズ: 9 ピクセル, ポイント間の距離: 4 ピクセル)。画像全体の変位分布図から局所的に拍動が確認できる箇所において、画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて面積を計測した。

5.2.7 収縮挙動の測定法

倒立顕微鏡（CKX53, オリンパス(株)）を用いて撮影した hiPS-CM の自己収縮動画を, ImageJ の反復粒子画像速度測定(PIV)プラグインを用いて収縮挙動を解析した[134]. 連続画像データから収縮前の画像と収縮ピーク期の画像を選択し, そのペア画像間の相互相関から収縮に伴う変位とその方向を測定した. 変位挙動は X 軸と Y 軸の 2 軸方向での変位挙動として出力される. 非侵襲での測定が可能である事から, 過去の研究においても hiPS-CM の収縮運動や牽引力の測定に用いられている解析法である [70,135].

5.3 結果と考察

5.3.1 PMEА 類似体コーティング基板の評価

PMEA 類似体コーティング基板表面に水を滴下し, その後 30 秒後の水滴の形態を Fig.5.2 に示す. また, 空気中における水接触角と水中での気泡の接触角を計測し基板の親水性評価を行った結果を Table.5.2 に示す. その結果, 空気中における 30 秒後の水接触角は PET>PMEMA>PEEA>PMEA の順で減少した. 一方, PBS 中に 24 時間浸漬した基板の 30 秒後の気泡接触角はどのポリマ

ー基板においても概ね 130° 付近で近い値を示している。この結果は、ポリマーが水和に伴い構造変化が変化している可能性が予測され、それぞれの接触角の結果についても各 PMEA 類似体の特性を評価した過去の研究と近い値を示した[124]。このことから、PET 基板上に十分にポリマーがコーティングできていることが明らかとなった。

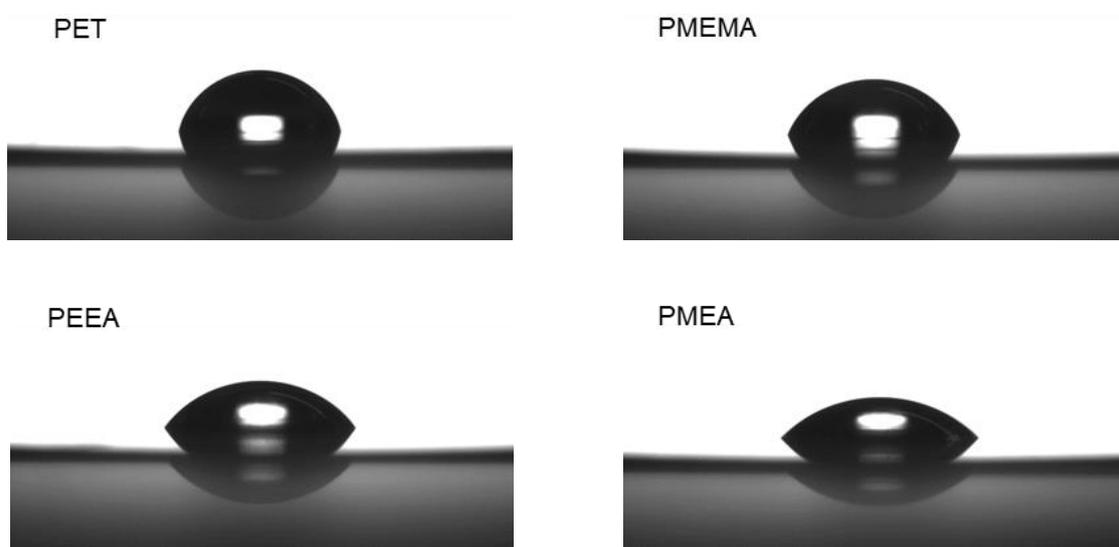


Fig.5.2 Morphology of water droplet on each substrate after 30 seconds

Table.5.2 Measurement results of contact angles of water droplets in air and air bubbles in water (n=9)

	Contact angle [$^\circ$]	
	Sessile drop	Captive air
PET	75.8	130.5
PMEMA	67.4	125.7
PEEA	53.6	124.5
PMEA	46.7	136.1

5.3.2 細胞接着面積

異なる結合水量をもつ各基板上での細胞接着形態を評価した。ここでは、PMEA 類似体基板上の hiPS-CM 単細胞の接着面積を評価した。基板に接着している hiPS-CM の骨格タンパク質 α アクチニンと細胞核の染色画像を Fig.5.3 に示す。その結果、比較的結合水量の多い PMEA や PEEA は、PET や PMEMA 上の細胞に比べ、細胞形態が丸みを帯びる傾向を示した。さらに、 α アクチニンの形態から細胞接着面積を測定した結果を Fig.5.4 に示す。その結果、PMEA や PEEA 上での細胞接着面積は他の基板と比べ小さい接着面積を示した。これらの結果は、過去の研究で PMEA 類似体上に播種した細胞への影響を評価した結果と類似しており、中間水量の多いポリマーはタンパク質と弱い接着性を示すことから、タンパク質を介して接着する細胞の形態に影響を与える事が予測される [136,137].

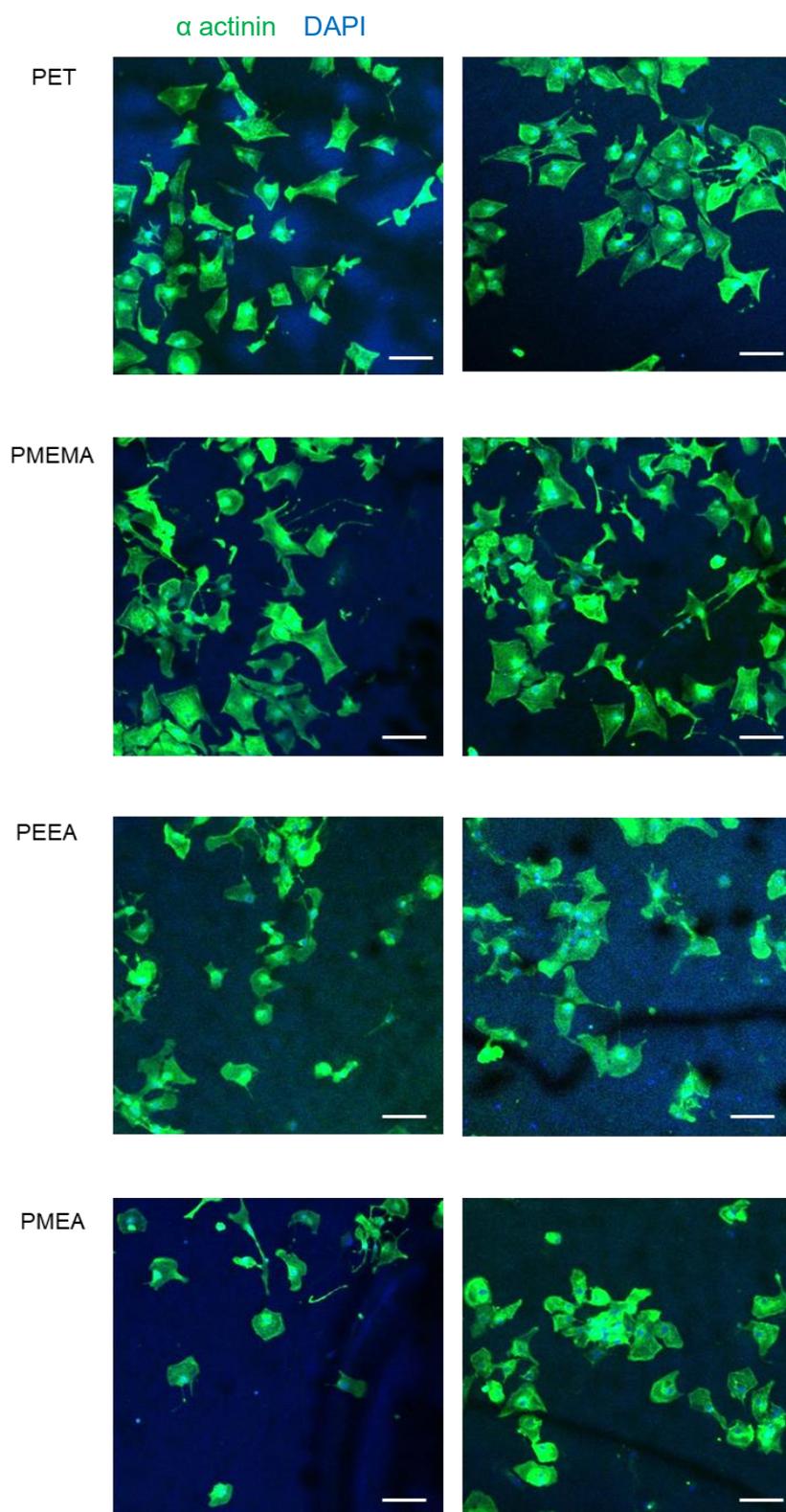


Fig.5.3 Cell adhesion morphology of single cells after 24 hours (scale : 100μm)

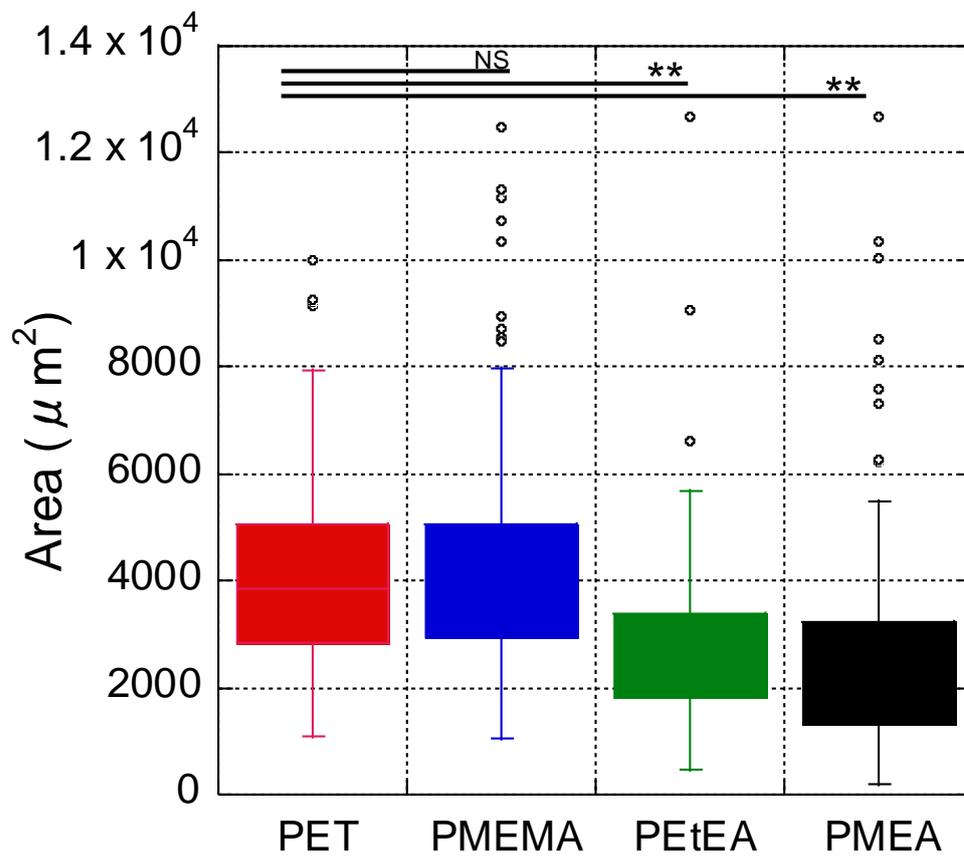


Fig.5.4 Average cell adhesion area of single cells (** $P \leq 0.001$)

5.3.3 hiPS-CM 拍動コロニーの評価

基板上的 hiPS-CM は培養を継続することで、外部刺激等を与えることなく、自己拍動する様子が確認できた。hiPS-CM の自己拍動を撮影した連続画像データをデジタル画像相関法を用いて解析し、拍動に伴う hiPS-CM の変位の分布を示した画像を Fig.5.5 に示す。その結果、基板上で局所的に収縮が発生していることが明らかとなった。さらに、その収縮は細胞が基板上で凝集し、コロニー化している箇所とよく一致していることが確認できた。

各基板上での拍動する細胞コロニー面積を比較した結果を Fig.5.6 に示す。その結果、比較的結合水量の多い基板である PMEA と PEEA は PET や PMEMA に比べ、小さい細胞凝集面積を示し、PET 基板上での結果と比較し有意な差を示した。この結果は、細胞接着強度が低い特性をもつ結合含水量の多い基板上では、細胞-基板間の接着力に対し細胞間結合力が上回り、移動した細胞同士が凝集したことが原因であると考えられる [138,139]。

培養 5 日目の PMEA 類似体ポリマー上 hiPS-CM の細胞数を評価した結果を Fig.5.7 に示す。その結果、hiPS-CM は各基板上において細胞数に有意差は確認できず、どの基板上においても細胞が接着状態を維持していることが明らかと

なった. このことから, 拍動する hiPS-CM コロニーの面積の差は接着生存細胞数に依存していないことが明らかとなった.

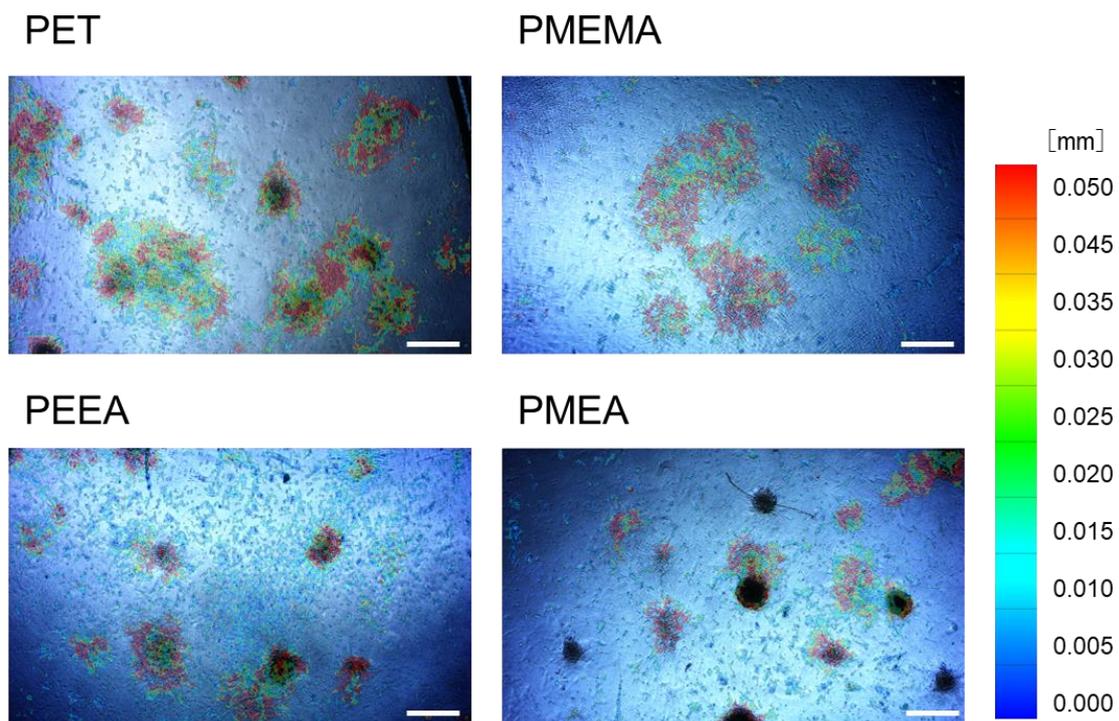


Fig.5.5 Displacement distribution associated with contraction of hiPS-CM aggregates analyzed by digital image correlation method (scale:400 μ m)

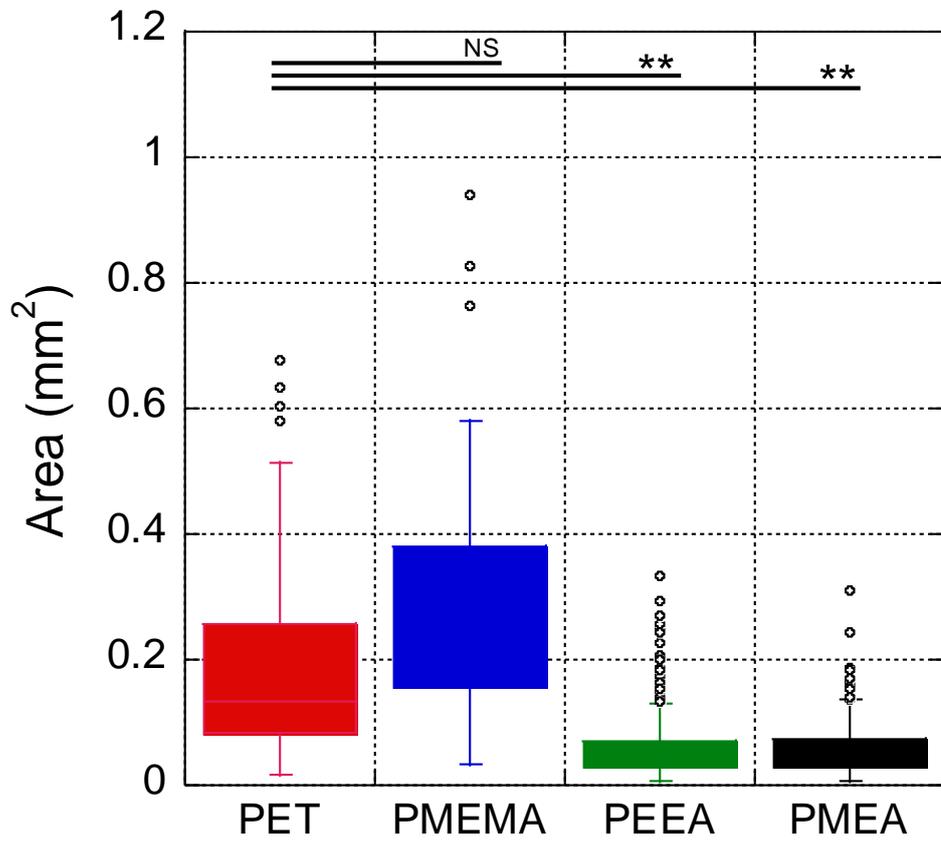


Fig.5.6 Area of self-beating hiPS-CM aggregates (** $P \leq 0.001$) (n=3)

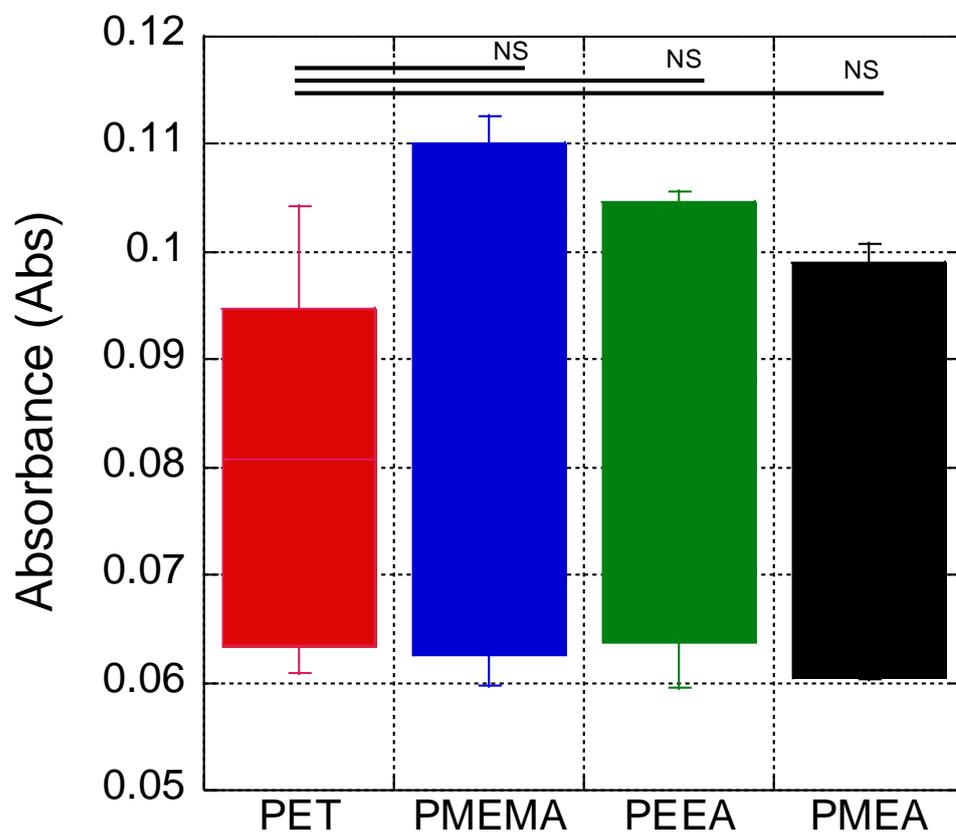


Fig.5.7 Absorbance intensity associated with the number of adherent cells of hiPS-CM cultured on the substrate for 5 days (n=3)

さらに、PMEA 類似体ポリマー上の拍動コロニーの自己拍動力を評価した。拍動前と拍動期の 2 枚の画像データから ImageJ の PIV プラグインを用いて収縮挙動を解析し、拍動に伴う変位量と変位方向の分布を Fig.5.8 に示す。さらに、それぞれの計測ポイントにおいて、収縮前を $X=0\mu\text{m}$, $Y=0\mu\text{m}$ と仮定した収縮期の変位挙動を Fig.5.9 に示す。その結果、特に PMEA 上での hiPS-CM が他の基板に比べ大きな変位挙動を示すことが明らかとなった。さらに、それぞれの基板上で hiPS-CM の収縮挙動において $5\mu\text{m}$ 以上の変位が確認できる計測ポイントの割合を算出した結果を Table.5.3 に示す。その結果、 $\text{PET} < \text{PMEMA} < \text{PEEA} < \text{PMEA}$ の順で $5\mu\text{m}$ 以上の変位割合の増加が確認できた。さらに、拍動に伴う変位の大きさの平均値を Fig.5.10 に示す。PMEA 基板上では他の基板に比べ hiPS-CM の自己収縮に伴う変位は大きく、有意な差を示した。心筋細胞は隣接する細胞同士が結合し、それらの凝集体がうまくオルガノイド化した際には、自己収縮能力や優れた細胞間結合が発現する[140]。このことから、結合水量が多い基板上では基板-細胞間の細胞接着性は低く、移動した細胞同士が三次元的に密集したことによって、強い細胞間結合をもつ細胞凝集体がより優れた拍動挙動を示した可能性が示唆される[141,142]。

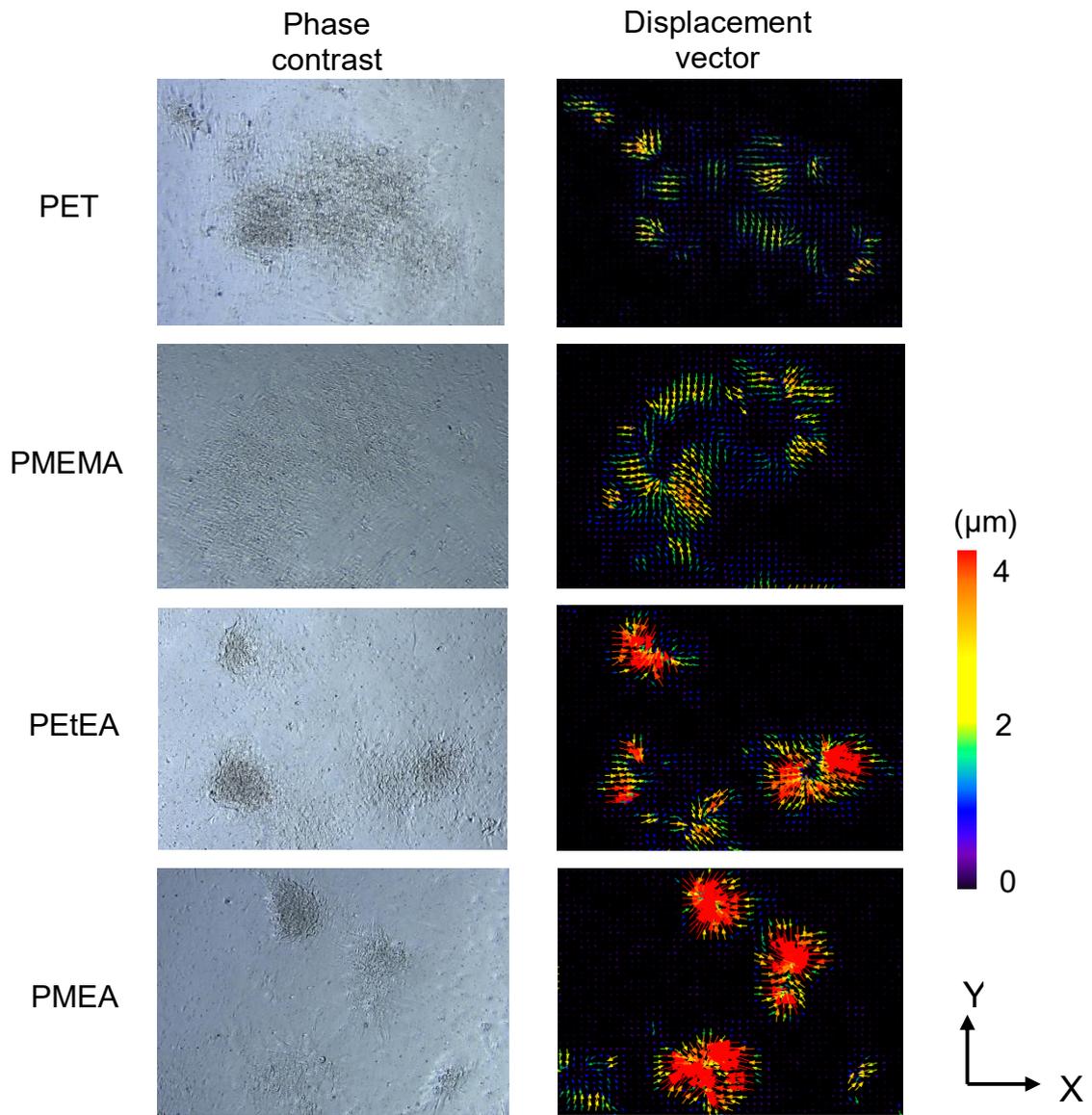


Fig.5.8 Morphology of hiPS-CM aggregates and displacement map analyzed from two photographs before and after beating

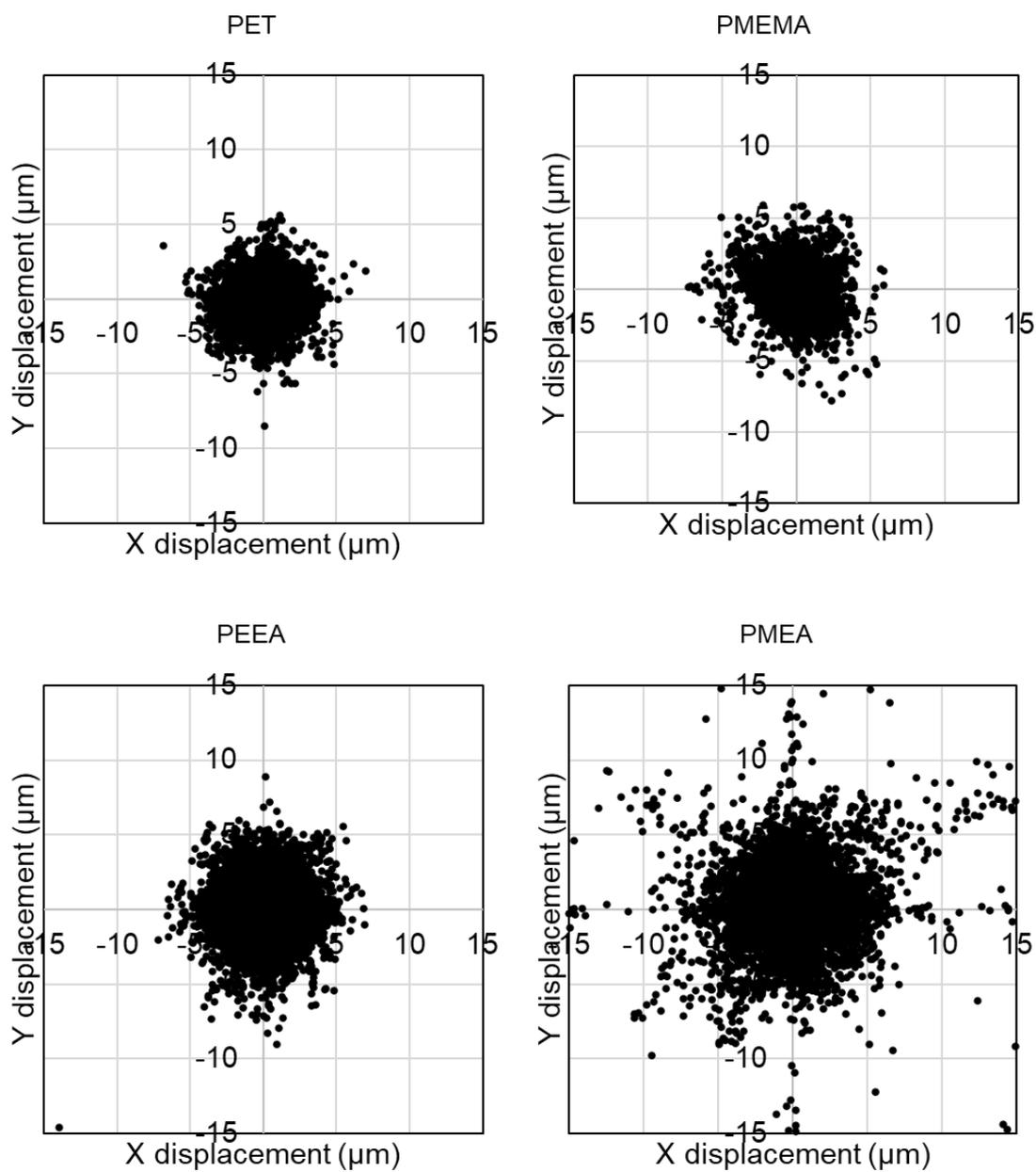


Fig.5.9 Displacement behavior associated with contraction of hiPS-CM on substrate

Table.5.3 Percentage of movement of 5 μm or more due to contraction displacement (n=3)

	Percentage of displacement behavior (5 μm ~) (%)
PET	0.05
PMEMA	0.08
PEEA	0.21
PMEA	0.98

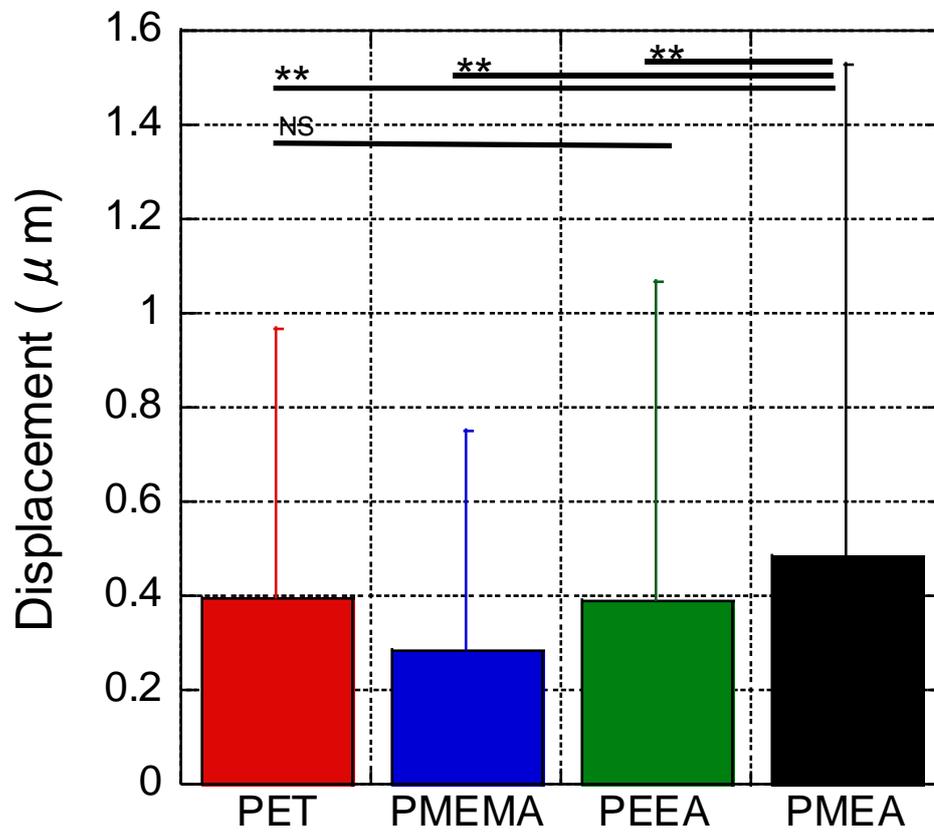


Fig.5.10 Displacement of hiPS-CM aggregates on the substrate (n=3)

5.4 小括

本章では、足場材表面の PMEА 類似体ポリマーが hiPS-CM に与える影響について検討を行った。生体適合性材料である PMEА 類似体を PET 基板上にコーティングすることで足場材を作製した。各基板は、水接触角を測定することでその親水性評価を行い、各ポリマーが十分に基板にコーティングできていることを確認した。さらに、その基板上に予め前培養を施した hiPS-CM を播種し、播種から 24 時間後の hiPS-CM 単細胞の細胞接着面積を評価した。その結果、細胞は結合含水量の多い基板において細胞形態が丸く、接着面積は小さくなる傾向を示した。さらに培養を継続し、培養から 5 日目の自己拍動する hiPS-CM 凝集体について評価を行った。その結果、結合含水量の多い基板では hiPS-CM 凝集体面積が小さい傾向にあった。さらに、その凝集体の自己拍動挙動は、結合含水量の多い基板上の細胞が比較的大きい収縮挙動を示す傾向があることが明らかとなった。なかでも PMEА 上で培養した hiPS-CM 凝集体は他の基板の結果と比べ、大きな収縮挙動が確認でき、有意な差を示した。この結果は、結合含水量の多い基板では細胞接着性が低く、そのことにより細胞間結合が細胞-基板間での結合に比べ進んだことから、強い細胞間結合により凝集体のオルガノイド

化が進み、優れた自己拍動性が発現したと考えられる。本研究により、PMEA 類似体上で hiPS-CM を培養することで細胞特性に影響を及ぼすことが明らかとなり、今後、結合水量を制御した PMEA 類似体において hiPS-CM の収縮力を最大限に生かした組織体の作製や収縮力の制御への応用が期待できる。

第 6 章 総 括

本論文では、hiPS-CM を用いてシート形状とチューブ形状の 2 種類の組織体を作製し、その動力学的挙動を評価した。さらに、hiPS-CM の自己収縮に伴う変形挙動として最小主ひずみの時間変動を再現する理論モデルの確立を目指し、実験結果と理論モデルの比較と検討を行った。また、hiPS-CM の自己収縮力を最大限に生かす組織体の作製を目指し、足場が細胞へ与える影響に注目し、PMEA 類似体を用いて hiPS-CM の収縮挙動を評価した。

以下に本研究で得られた結果を総括する。

第 2 章では、組織工学技術を用いて hiPS-CM シート状組織体を作製し、その自己拍動に伴う力学的評価を行った。hiPS-CM シートは培養に伴い周期的な自己拍動を発現することが確認できた。さらに、高速光計測システムを用いて撮影した連続画像データをデジタル画像相関法で解析を行うことで、収縮に伴う最小主ひずみの時間変動を算出した。一方、Guccione らが提案した心筋サルコメアの能動的サルコメア張力を表す理論モデルと粘弾性 Maxwell モデルを組み合わせ、hiPS-CM の最小主ひずみの時間変動を再現する理論モデルを構築した。その結果、最小主ひずみの実測値と理論モデルが予測する最小主ひずみの時間

変動が良い一致を示すことが明らかになった。さらに、最小主ひずみの実測値を、Guccione の能動的応力理論式から算出した応力変動と組み合わせることで、能動的応力-最小主ひずみ関係を構築した結果、粘弾性特有のヒステリシスループの発現が確認できた。

第3章では、hiPS-CM チューブ状3次元組織体を作製し、内部の流動特性の計測を行うとともに、流動特性を予測する理論モデルを提案した。PDMS チューブに hiPS-CM シートを巻き付けることで、hiPS-CM チューブの作製に成功した。作製した hiPS-CM チューブは培養を継続することで、自己拍動が確認できた。さらに、チューブ内に微小な TCP 粒子を分散させ、その粒子の動きを追跡することで、hiPS-CM チューブの駆動性能の評価を行った。その結果、チューブ内の粒子は前進と後退を繰り返しながらも一軸方向への順流が確認でき、本研究で作製した hiPS-CM チューブのポンプ的機能が確認できた。また、hiPS-CM チューブの変形挙動を解析し、その結果から理論モデルを用いてチューブ内の流動を予測し、実験結果と比較した。その結果、定量的には実験値と差異を生じていたが、定性的には類似した挙動が確認できた。

第4章では、hiPS-CM チューブにおける最小主ひずみの時間変動を再現する理論モデルの確立を目指し、粘弾性を導入した2つの理論モデルにおいて実験結果との比較と検討を行った。第1のモデルは、第2章で提案した粘弾性 Maxwell モデルと Guccione の能動的応力を組み合わせた理論モデルであり、hiPS-CM チューブにおいても収縮に伴う最小主ひずみの時間変動をよく再現することが明らかとなった。第2のモデルは、粘弾性 Voigt モデルと Guccione の能動的応力理論式を組み合わせた理論モデルであり、Maxwell モデルと同様に hiPS-CM チューブの拍動に伴う最小主ひずみの時間変動を再現することが確認できた。また、線形弾性モデルを用いて再現した最小主ひずみの時間変動と比較した結果、線形弾性モデルでは収縮挙動を十分に再現できず、粘弾性を考慮した2種類の理論モデルの有効性が確認できた。さらに、最小主ひずみの時間変動と Guccione 能動的応力を組み合わせることで応力-ひずみ応答を導出した結果、粘弾性的ヒステリシスループを発現することが明らかとなった。最後に、hiPS-CM シートと hiPS-CM チューブの変形挙動について比較した結果、シートはチューブに比べ大きいピーク値を示し、収縮時間が短い傾向を示した。さらに、それぞれの実験モデルにおいて応力-ひずみ応答を示した結果、hiPS-CM チューブ

はシートに比べヒステリシスループは小さいことからエネルギー収支が小さいことが示唆された。この原因として、hiPS-CMシートを巻き付けているPDMSチューブが細胞シートに比べ剛性が大きいことから心筋の拍動力を制限している可能性が考えられる。

第5章では、hiPS-CMの拍動力の向上を目指し、結合水量の異なる足場材がhiPS-CMに与える影響について検討を行った。本研究では、生体適合性材料であるPMEA類似体ポリマー（PMEA・PEEA・PMEMA）をPET基板上にコーティングした基板を用いて比較を行った。その結果、hiPS-CMは結合含水量の多い基板上において細胞形態は丸く、接着面積は小さくなる傾向を示した。さらに培養を継続し、培養から5日目の自己拍動するhiPS-CM凝集体について評価を行った。その結果、結合水量の多い基板では自己拍動を起こす凝集体の面積が小さい傾向にあった。さらに、それらの自己拍動挙動は結合水量の少ない基板上での細胞に比べ大きい収縮挙動を示す傾向があることが明らかとなった。特に、PMEA上で培養したhiPS-CMは他の基板に比べ大きな収縮挙動が確認できた。これは、中間水量の多い基板上ではタンパク質の接着力が弱くなる特性から、細

胞-基板間の吸着力より細胞-細胞間の結合力が強くなったことで、強い細胞間結合により hiPS-CM 凝集体のオルガノイド化が進んだことにより、優れた自己収縮性が発現したと予測できる。本研究により、PMEA 類似体が hiPS-CM の細胞特性に影響を与えることが明らかとなった。

第 2 章～第 4 章で実施した hiPS-CM シートとチューブという基本構造の動力学的挙動の定量的評価は、再生医療分野での有効性が期待されている hiPS-CM 組織体の開発と臨床応用において基礎的知見となる事が期待される。さらに、本研究で構築した理論モデルは、hiPS-CM 組織体の収縮挙動をよく再現することが確認できた。hiPS-CM 組織体の力学的特性を定量的に評価することが可能な理論モデルとして、3次元有限要素解析や流体構造連成解析のための基礎的な構成則となる事が考えられる。今後、hiPS-CM の細胞特性を明らかにするための技術の確立に伴い、細胞組織体個別の条件を理論モデルに組み込むことが可能となり、医療応用を目的としたシミュレーションモデルへの応用も期待される。

第5章において実施した異なる足場上での hiPS-CM 収縮力の評価は、結合水分量の多い基板において hiPS-CM の収縮力が向上する傾向を示した。過去の多くの研究では細胞配列により筋細胞の収縮力の向上を目指したが、今後、hiPS-CM 組織体の足場となるポリマーの結合水分量が収縮挙動に与える影響を考慮し、hiPS-CM のもつ収縮力を最大限に活かす組織体の作製のための基礎的研究となる可能性が考えられる。

参考文献

- [1] Sandrigo, M., Bárbara, R. A., Odilson, M. S., Philippe, V. P., Lucas, J. T. P., Milena, N. C. C., Fernando, B., : Heart transplantation: review, Thematic review: Transplantation, 13(2), 310-318, 2015.
- [2] Miniati, D. N., Robbins, R. C., : Heart transplantation: A thirty-year perspective, Annual Review of Medicine, 53(1), 189-205, 2002.
- [3] Yuan, N., Arnaoutakis, G.J., George, T.J., Allen, J. G., Ju, D. G., Schaffer, J. M., Russell, S. D., Shah, Ashish, S., Conte, J. V., : The Spectrum of Complications Following Left Ventricular Assist Device Placement, Journal of Cardiac Surgery, 27(5), 630-638, 2012.
- [4] Lala, A., Joyce, E., Groarke, J. D., Mehra, M. R., : Challenges in Long-Term Mechanical Circulatory Support and Biological Replacement of the Failing Heart, Circulation Journal, 78(2), 288-299, 2014.
- [5] Toyoda, Y., Guy, T. S., Kashem, A., : Present Status and Future Perspectives of Heart Transplantation, Circulation Journal, 77(5), 1097-1110, 2013.
- [6] Traverse, J.H., Henry, T.D., Ellis S.G., Pepine, C. J., Willerson, J. T., Zhao, D. X. M., Forder, J. R., Byrne, B. J., Hatzopoulos, A. K., Penn, M. S., Perin, E. C., Baran, K. W., Chambers, J., Lambert, C., Raveendran, G., Simon, D. I., Vaughan, D. E., Simpson, L. M., Gee, A. P., Taylor, D. A., Cogle, C. R., Thomas, J. D., Silva, G. V., Jorgenson, B. C., Olson, R. E., Bowman, S., Francescon, J., Geither, C., Handberg, E., Smith, D. X., Baraniuk, S., Piller, L. B., Loghin, C., Aguilar, D., Richman, S., Zierold, C., Bettencourt, J., Sayre, S. L., Vojvodic, R. W., Skarlatos, S. I., Gordon, D. J., Ebert, R. F., Kwak, M., Moyé, L. A., Simari, R. D., : Effect of Intracoronary Delivery of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells 2 to 3 Weeks Following Acute Myocardial Infarction on Left Ventricular Function. The Late TIME Randomized Trial, Journal of American Medical Association, 306(19), 2110-2119, 2011.
- [7] Assmus, B., Honold, J., Schächinger, V., Britten, M. B., Fischer, R. U., Lehmann, R., Teupe, C., Pistorius, K., Martin, H., Abolmaali, N. D., Tonn, T., Dimmeler, S., Zeiher, A. M., : Transcoronary Transplantation of Progenitor Cells after Myocardial Infarction, New England Journal of Medicine, 355(12), 1222-1232, 2006.
- [8] Wöhrle, J., Merkle, N., Mailänder, V., Nusser, T., Schauwecker, P., Scheidt, F., Schwarz, K., Bommer, M., Wiesneth, M., Schrezenmeier, H., Hombach V., : Results of Intracoronary Stem Cell Therapy After Acute Myocardial Infarction, The American Journal of Cardiology, 105(6), 804-812, 2010.
- [9] Stamm, C., Kleine, H. D., Choi, Y. H., Dunkelmann, S., Lauffs, J. A., Lorenzen, B., David, A., Liebold, A., Nienaber, C., Zurakowski, D., Freund, M., Steinhoff, G., : Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: Safety and efficacy studies, The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 133(3), 717-725, 2007.

- [10] Li, R. K., Jia, Z. Q., Weisel, R. D., Mickle, D. A. G., Zhang, J., Mohabeer, M. K., Rao, V., Ivanov, J., : Cardiomyocyte Transplantation Improves Heart Function, *The Annals of Thoracic Surgery*, 62(3), 654-661, 1996.
- [11] Suzuki, K., Murtuza, B., Smolenski, R. T., Sammut, I. A., Suzuki, N., Kaneda, Y., Yacoub, M. H., : Cell Transplantation for the Treatment of Acute Myocardial Infarction Using Vascular Endothelial Growth Factor-Expressing Skeletal Myoblasts, *Circulation*, 104(1), I-207-I-212, 2001.
- [12] Menasché, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J. T., Marolleau, J. P., Seymour, B., Larghero, J., Lake, S., Chatellier, G., Solomon, S., Desnos, M., Hagège, A. A., : The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial, *Circulation*, 117(9), 1189-1200, 2008.
- [13] Tang, X. L., Rokosh, G., Sanganalmath, S. K., Yuan, F., Sato, H., Mu, J., Dai, S., Li, C., Chen, N., Peng, Y., Dawn, B., Hunt, G., Leri, A., Kajstura, J., Tiwari, S., Shirk, G., Anversa, P., Bolli, R., : Intracoronary Administration of Cardiac Progenitor Cells Alleviates Left Ventricular Dysfunction in Rats With a 30-Day-Old Infarction, *Circulation*, 121(2), 293-305, 2010.
- [14] Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Moll, W. M. K., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J. M., Asahara, T., : Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3422-3427, 2000.
- [15] Tang, Y. L., Zhao, Q., Zhang, Y. C., Cheng, L., Liu, M., Shi, J., Yang, Y. Z., Pan, C., Ge, J., Phillips, M. I., : Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium, *Regulatory Peptides*, 117(1), 3-10, 2004.
- [16] Patel, A. N., Geffner, L., Vina, R. F., Saslavsky, J., Urschel, H. C., Kormos, R., Benetti, F., : Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: A prospective randomized study, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 130(6), 1631-1638, 2005.
- [17] Akins, R. E., : Can Tissue Engineering Mend Broken Hearts?, *Circulation Research*, 90(2), 120-122, 2002.
- [18] Zimmermann, W. H., Melnychenko, I., Wasmeier, G., Didié, M., Naito, H., Nixdorff, U., Hess, A., Budinsky, L., Brune, K., Michaelis, B., Dhein, S., Schworer, A., Ehmke, H., Eschenhagen, T., : Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts, *Nature Medicine*, 12(4), 452-458, 2006.
- [19] Jockenhoevel, S., Zund, G., Hoerstrup, S. P., Chalabi, K., Sachweh, J. S., Demircan, L., Messmer, B. J., Turina, M., : Fibrin gel – advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*,

19(4), 424–430, 2001.

- [20] Curtis, M. W., Russell, B., : Cardiac tissue engineering, *Journal of Cardiovascular Nursing*, 24(2), 87-92, 2009.
- [21] Shimizu T., Yamato M., Kikuchi, A., Okano T., : Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction, *Biomaterials*, 24(13), 2309-2316, 2003.
- [22] Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, H., Sakurai, Y., : Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces, *Biomaterials*, 16(4), 297-303, 1995.
- [23] Yamada, N., Okano, T., Sakai, H., Karikusa, F., Sawasaki, Y., Sakurai, Y., : Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells, *Macromolecular Rapid Communications*, 11(11), 571-576, 1990.
- [24] Shimizu, T., Yamato, M., Isoi, Y., Akutsu, T., Setomaru, T., Abe, K., Kikuchi, A., Umezu, M., Okano, T., : Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces, *Circulation Research*, 90(3), e40-e48, 2002.
- [25] Shimizu, T., Sekine, H., Yang, J., Isoi, Y., Yamato, M., Kikuchi, A., Kobayashi, E., Okano, T., : Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues, *The FASEB Journal*, 20(6), 708-710, 2006.
- [26] Hata, H., Matsumiya, G., Miyagawa, S., Kondoh, H., Kawaguchi, N., Matsuura, N., Shimizu, T., Okano, T., Matsuda, H., Sawa, Y., : Grafted skeletal myoblast sheets attenuate myocardial remodeling in pacing-induced canine heart failure model, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 132(4), 918-924, 2006.
- [27] Miyagawa, S., Saito, A., Sakaguchi, T., Yoshikawa, Y., Yamauchi, T., Imanishi, Y., Kawaguchi, N., Teramoto, N., Matsuura, N., Iida, H., Shimizu, T., Okano, T., Sawa, Y., : Impaired Myocardium Regeneration With Skeletal Cell Sheets—A Preclinical Trial for Tissue-Engineered Regeneration Therapy, *Transplantation*, 90(4), 364-372, 2010.
- [28] Yoshikawa, Y., Miyagawa, S., Toda, K., Saito, A., Sakata, Y., Sawa, Y., : Myocardial regenerative therapy using a scaffold-free skeletal-muscle-derived cell sheet in patients with dilated cardiomyopathy even under a left ventricular assist device: a safety and feasibility study. *Surg Today*, 48, 200-210, 2018.
- [29] Sawa, Y., Yoshikawa, Y., Toda, K., Fukushima, S., Yamazaki, K., Ono, M., Sakata, Y., Hagiwara, N., Kinugawa, K., Miyagawa, S., : Safety and Efficacy of Autologous Skeletal Myoblast Sheets (TCD-51073) for the Treatment of Severe Chronic Heart Failure Due to Ischemic Heart Disease, *Circulation Journal*, 79(5), 991-999, 2015.
- [30] Matsuura, K., Masuda, S., Haraguchi, Y., Yasuda, N., Shimizu, T., Hagiwara, N.,

Zandstra, P. W., Okano, T., : Creation of mouse embryonic stem cell-derived cardiac cell sheets, *Biomaterials*, 32(30), 7355-7362, 2011.

- [31] Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S., Mori, H., : Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction, *Nature Medicine*, 12, 459-465, 2006.
- [32] Okita, K., Yamanaka, S., : Induction of pluripotency by defined factors, *Experimental Cell Research*, 316(16), 2565-2570, 2010.
- [33] Takahashi, K., Yamanaka, S., : Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663-676, 2006.
- [34] Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., : Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors, *Cell*, 131(5), 861-872, 2007.
- [35] Fujiwara, M., Yan, P., Otsuji, T. G., Narazaki, G., Uosaki, H., Fukushima, H., Kuwahara, K., Harada, M., Matsuda, H., Matsuoka, S., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., Ikeda, T., Sakata, R., Mummery, C. L., Nakatsuji, N., Shinya Yamanaka, S., Nakao, K., Yamashita, J. K., : Induction and Enhancement of Cardiac Cell Differentiation from Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells with Cyclosporin-A, *PLoS ONE*, 6(2), e16734, 2011.
- [36] Funakoshi, S., Miki, K., Takaki, T., Okubo, C., Hatani, T., Chonabayashi, K., Nishikawa, M., Takei, I., Oishi, A., Narita, M., Hoshijima, M., Kimura, T., Yamanaka, S., Yoshida, Y., : Enhanced engraftment, proliferation and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes, *Scientific Reports*, 6, 19111, 2016.
- [37] Tohyama, S., Fujita, J., Hishiki, T., Matsuura, T., Hattori, F., Ohno, R., Kanazawa, H., Seki, T., Nakajima, K., Kishino, Y., Okada, M., Hirano, A., Kuroda, T., Yasuda, S., Sato, Y., Yuasa, S., Sano, M., Suematsu, M., Fukuda, K., : Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells, *Cell Metabolism*, 23(4), 663-674, 2016.
- [38] Tohyama, S., Fujita, J., Fujita, C., Yamaguchi, M., Kanaami, S., Ohno, R., Sakamoto, K., Kodama, M., Kurokawa, J., Kanazawa, H., Seki, T., Kishino, Y., Okada, M., Nakajima, K., Tanosaki, S., Someya, S., Hirano, A., Kawaguchi, S., Kobayashi, E., Fukuda, K., : Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes, *Stem Cell Reports*, 9(5), 1406-1414, 2016.
- [39] Evans, M. J., Kaufman, M. H., : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, 292, 154-156, 1981.

- [40] Thomson, J. A., Joseph, I. E., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M., : Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts, *Science*, 232(5391), 1145-1147, 1998.
- [41] Diecke, S., Jung, S.M., Lee, J., Ju, J. H., : Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells, *Korean J Intern Med*, 29(5), 547-557, 2014.
- [42] Singh, V. K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A., Chandra, R., : Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3(2), 2015.
- [43] Yu, T., Miyagawa, S., Miki, K., Saito, A., Fukushima, S., Higuchi, T., Kawamura, M., Kawamura, T., Ito, E., Kawaguchi, N., Sawa, Y., Matsuura, N., : In Vivo Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes, *Circulation Journal*, 77(5), 1297-1306, 2013.
- [44] Xumin, G., Wanzi, X., He, Z., Qian, W., Jiuyang, Y., Ruyi, Z., Yamin, C., Yunlong, X., Jiaxian, W., Dongjin, W., : Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial function and reverses ventricular remodeling in infarcted rat hearts, *Stem Cell Research & Therapy*, 11(73), 2020.
- [45] Kawamura, M., Miyagawa, S., Miki, K., Saito, A., Fukushima, S., Higuchi, T., Kawamura, T., Kuratani, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., Sawa, Y., : Feasibility, Safety, and Therapeutic Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Sheets in a Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model, *Circulation*, 126(11-1), S29-S37, 2012.
- [46] Masumoto, H., Ikuno, T., Takeda, M., Fukushima, H., Marui, A., Katayama, S., Shimizu, T., Ikeda, T., Okano, T., Sakata, R., Yamashita, J. K., : Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration, *Scientific Reports*, 4(6716), 2014.
- [47] 高橋宏信 : 細胞シート工学が実現する再生医療, *生物工学会誌*, 100(1), 38-42, 2022.
- [48] Ratheesh, G., Venugopal, J. R., Chinappan, A., Ezhilarasu, H., Sadiq, A., Ramakrishna, S., : 3D Fabrication of Polymeric Scaffolds for Regenerative Therapy, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(7), 1175-1194, 2017.
- [49] Sacchetto, C., Vitiello, L., Windt, L. J., Rampazzo, A., Calore, M., : Modeling Cardiovascular Diseases with hiPSC-Derived Cardiomyocytes in 2D and 3D Cultures, *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3404, 2020.
- [50] Higashi, H., Yagi, H., Kuroda, K., Tajima, K., Kojima, H., Nishi, K., Morisaku, T.,

- Hirukawa, K., Fukuda, K., Matsubara, K., Kitago, M., Shinoda, M., Obara, H., Adachi, S., Nishimura, K., Natsume, T., Tomi, M., Soto, G. A., Kitagawa, Y., : Transplantation of bioengineered liver capable of extended function in a preclinical liver failure model, *American Journal of Transplantation*, 22(3), 731-744, 2022.
- [51] Chikae, S., Kubota, A., Nakamura, H., Oda, A., Yamanaka, A., Akagi, T., Akashi, M., : Three-dimensional bioprinting human cardiac tissue chips of using a painting needle method, *Biotechnology and Bioengineering*, 116(11), 3136-3142, 2019.
- [52] Sasano, Y., Fukumoto, K., Tsukamoto, Y., Akagi, T., Akashi, M., : Construction of 3D cardiac tissue with synchronous powerful beating using human cardiomyocytes from human iPS cells prepared by a convenient differentiation method, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(6), 749-755, 2020.
- [53] Litviňuková, M., Talavera, L. C., Maatz, H., Reichart, D., Worth, C. L., Lindberg, E. L., Kanda, M., Polanski, K., Heinig, M., Lee, Mi., Nadelmann, E. R., Roberts, K., Tuck, L., Fasouli, E. S., DeLaughter, D. M., McDonough, B., Wakimoto, H., Gorham, J. M., Samari, S., Mahbubani, K. T., Parsy, S. K., Patone, G., Boyle, J. J., Zhang, H., Zhang, H., Viveiros, A., Oudit, G. Y., Bayraktar, O. A., Seidman, J. G., Seidman, C. E., Nosedá, M., Hubner, N., Teichmann, S. A., : Cells of the adult human heart, *Nature*, 588, 466-472, 2020.
- [54] Pinto, A. R., Ilinykh, A., Ivey, M. J., Kuwabara, J. T., Antoni, M. L. D., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N. A., Tallquist, M. D., : Revisiting Cardiac Cellular Composition, *Circulation Research*, 118, 400-409, 2016.
- [55] Mazière, A.M.G.L., Ginneken, A.C.G., Wilders, R., Jongsma, H.J., Bouman, L.N., : Spatial and functional relationship between myocytes and fibroblasts in the rabbit sinoatrial node, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 24(6), 567-578, 1992.
- [56] Monfredi, O., Dobrzynski, H., Mondal, T., Boyett, M.R., Morris, G.M., : The Anatomy and Physiology of the Sinoatrial Node-A Contemporary Review, *Pacing and Clinical Electrophysiology*, 33, 1392-1406, 2010.
- [57] Wolfgang, T., Donald, G. K., : On The Mechanism of Spontaneous Impulse Generation in the Pacemaker of the Heart, *Journal of General Physiology*, 45(2), 317-330, 1961.
- [58] Elizabeth, A. W., Scot, J. M., : Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(9), 1746-1751, 2005.
- [59] Sweeney, H. L., David, W. H., : *Muscle Contraction*, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 10, a023200, 2018.

- [60] Sweeney, H. L., Holzbaur, E. L. F., : Motor Proteins, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 10, a021931, 2018.
- [61] Noble, D., : Cardiac Action and Pacemaker Potentials based on the Hodgkin-Huxley Equations, Nature, 188(4749), 495-497, 1960.
- [62] Ching, H. L., Yoram, R., : A model of the ventricular cardiac action potential. Depolarization, repolarization, and their interaction, Circulation Research, 68(6), 1501-1526, 1991.
- [63] Patterson, S. W., Piper, H., Starling, E. H., : The regulation of the heart beat, The Journal of Physiology, 48(6), 465-513, 1914.
- [64] Negroni, J. A., Lascano, E. C., : A Cardiac Muscle Model Relating Sarcomere Dynamics to Calcium Kinetics, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 28(5), 915-929, 1996.
- [65] Sugiura, S., Washio, T., Hatano, A., Okada, J., Watanabe, H., Hisada, T., : Multi-scale simulations of cardiac electrophysiology and mechanics using the University of Tokyo heart simulator, Progress in Biophysics and Molecular Biology, 110(2-3), 380-389, 2012.
- [66] Okada, J., Washio, T., Maehara, A., Momomura, S., Sugiura, S., Hisada, T., : Transmural and apicobasal gradients in repolarization contribute to T-wave genesis in human surface ECG, American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 301(1), H200-H208, 2011.
- [67] Washio, T., Okada, J., Takahashi, A., Yoneda, K., Kadooka, Y., Sugiura, S., Hisada, T., : Multiscale Heart Simulation with Cooperative Stochastic Cross-Bridge Dynamics and Cellular Structures, Multiscale Modeling & Simulation, 11(4), 965-999, 2013.
- [68] Abulaiti, M., Yalikun, Y., Murata, K., Sato, A., Sami, M. M., Sasaki, Y., Fujiwara, Y., Minatoya, K., Shiba, Y., Tanaka, Y., Masumoto, H., : Establishment of a heart-on-a-chip microdevice based on human iPS cells for the evaluation of human heart tissue function, Scientific Reports, 10(1), 19201, 2020.
- [69] Uesugi, K., Shima, F., Fukumoto, K., Hiura, A., Tsukamoto, Y., Miyagawa, S., Sawa, Y., Akagi, T., Akashi, M., Morishima, K., : Micro Vacuum Chuck and Tensile Test System for Bio-Mechanical Evaluation of 3D Tissue Constructed of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes (hiPS-CM), Micromachines, 10(7), 487, 2019.
- [70] Hayakawa, T., Kunihiro, T., Ando, T., Kobayashi, S., Matsui, E., Hiroaki Yada, H., Kanda, Y., Kurokawa, J., Furukawa, T., : Image-based evaluation of contraction–

relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Correlation and complementarity with extracellular electrophysiology, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 77, 178-191, 2014.

- [71] Ishii, Y., Tsukagoshi, T., Nguyen, T. V., Shoji, H. K., Takahata, T., Shimoyama, I., : The Measurement of the Vibration of Human iPS Cell-Derived Cardiomyocytes' Contraction, *Proceedings of 2019 IEEE 32nd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, 723-726, 2019.
- [72] Harada, K., Chihara, T., Hayasaka, Y. Mita, M., Takizawa, M., Ishida, K., Arai, M., Tsuno, S., Matsumoto, M., Ishihara, T., Ueda, H., Kitaguchi, T., Tsuboi, T., : Green fluorescent protein-based lactate and pyruvate indicators suitable for biochemical assays and live cell imaging, *Scientific Reports*, 10(19562), 1-11, 2020.
- [73] Kadota, S., Minami, I., Morone, N., Heuser, J. E., Agladze, K., Nakatsuji, N., : Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets, *European Heart Journal*, 34(15), 1147-1156, 2013.
- [74] Minami, I., Yamada, K., Otsuji, T.G., Yamamoto, T., Shen, Y., Otsuka, S., Kadota, S., Morone, N., Barve, M., Asai, Y., Heuser, T. T., Heuser, J. E., Uesugi, M., Aiba, K., Nakatsuji, N., : A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions, *Cell Reports*, 2(5), 1448-1460, 2012.
- [75] Nakashima, Y., Tsukahara, M. : Laminin-511 Activates the Human Induced Pluripotent Stem Cell Survival via $\alpha 6\beta 1$ Integrin-Fyn-RhoA-ROCK Signaling. *Stem Cells and Development*, 31(21-22), 706-719, 2022.
- [76] Arslanova, A., Shafaattalab, S., Lin, E., Barszczewski, T., Madsen, H. L., Tibbits, G. F., : Investigating inherited arrhythmias using hiPSC-derived cardiomyocytes, *Methods*, 203, 542-557, 2022.
- [77] Fu, F., Pietropaolo, M., Cui, L., Pandit, S., Li, W., Tarnavski, O., Shetty, S. S., Liu, J., Lussier, J. M., Murakami, Y., Grewal, P. K., Deyneko, G., Turner, G. M., Taggart, A. K. P., Waters, M. G., Coughlin, S., Adachi Y., : Lack of authentic atrial fibrillation in commonly used murine atrial fibrillation models, *PLOS ONE* 17(1): e0256512, 2022.
- [78] Jaimes, R., Walton, R. D., Pasdois, P., Bernus, O., Efimov, I. R., Kay, M. W., : A technical review of optical mapping of intracellular calcium within myocardial tissue, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 310(11), H1388-H1401, 2016.
- [79] Stosiek, C., Garaschuk, O., Holthoff, K., Konnerth, A., : In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7319-7324, 2003.

- [80] Shimomura, O., Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein, FEBS Letters, 104(2), 220-222, 1979.
- [81] Nakai, J., Ohkura, M., Imoto, K. : A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein, Nature Biotechnology, 19(2), 137-141, 2001.
- [82] Wang, Q., Shui, B., Kotlikoff, M. I., Sondermann, H., : Structural Basis for Calcium Sensing by GCaMP2, Structure, 16(12), 1817-1827, 2008.
- [83] Akerboom, J., Rivera, J. D. V., Guilbe, M. M. R., Malavé, E. C. A., Hernandez, H. H., Tian, L., Hires, S. A., Marvin, J. S., Looger, L. L., Schreiter, E. R., : Crystal Structures of the GCaMP Calcium Sensor Reveal the Mechanism of Fluorescence Signal Change and Aid Rational Design, Journal of Biological Chemistry, 284(10), 6455-6464, 2009.
- [84] Bird, S.D., Doevendans, P.A., Rooijen, M.A., Riviere, B. A., Hassink, R.J., Passier, R., Mummery, C. L., : The human adult cardiomyocyte phenotype, Cardiovascular Research, 58(2), 423-434, 2003.
- [85] Dabiri, G. A., Turnacioglu, K. K., Sanger, J. M., Sanger, J. W., : Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes, Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(17), 9493-9498, 1997.
- [86] Chu, T.C., Ranson, W.F., Sutton, M.A. : Applications of digital-image-correlation techniques to experimental mechanics, Experimental Mechanics, 25(3), 232-244, 1985.
- [87] Pan, B. : Digital image correlation for surface deformation measurement: historical developments, recent advances and future goals, Measurement Science and Technology, 29, 082001, 2018.
- [88] Canal, L. P., González, C., Molina-Aldareguía, J. M., Segurado, J., LLorca, J., : Application of digital image correlation at the microscale in fiber-reinforced composites, Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, 43(10), 1630-1638, 2012.
- [89] Lyons, J.S., Liu, J., Sutton, M.A. : High-temperature deformation measurements using digital-image correlation, Experimental Mechanics, 36, 64-70, 1996.
- [90] Lee, M. S., Ji, M. K., Hyun, Y. T., Kim, E. Y., Jun, T. S., : Effect of texture and temperature gradient on anisotropic plastic deformation of commercially pure titanium at room and low temperatures, Materials Characterization, 172, 110834, 2021.
- [91] Bolivar, J., Frégonèse, M., Réthoré, J., Thual, D. C., Combrade, P., : Evaluation of multiple stress corrosion crack interactions by in-situ Digital Image Correlation,

Corrosion Science, 128, 120-129, 2017.

- [92] Zhang, D. S., Arola, D. D. : Applications of digital image correlation to biological tissues, *Journal of Biomedical Optics*, 9(4), 691-699, 2004
- [93] Palanca, M., Tozzi, G., Cristofolini, L. : The use of digital image correlation in the biomechanical area: a review, *International Biomechanics*, 3(1),1-21, 2016.
- [94] Moerman, K. M., Holt, C. A., Evans, S. L., Simms, C. K., : Digital image correlation and finite element modelling as a method to determine mechanical properties of human soft tissue in vivo, *Journal of Biomechanics*, 42(8), 1150-1153, 2009.
- [95] Ahola, A., Kiviahho, A. L., Larsson, K., et al., : Video image-based analysis of single human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocyte beating dynamics using digital image correlation, *BioMedical Engineering OnLine*, 13(1), 39, 2014.
- [96] Guccione, J. M., McCulloch, A. D., Waldman, L. K. : Passive Material Properties of Intact Ventricular Myocardium Determined From a Cylindrical Model, *ASME. Journal of Biomechanical Engineering*, 113(1), 42-55, 1991.
- [97] Guccione, J. M., McCulloch, A. D. : Mechanics of Active Contraction in Cardiac Muscle: Part I—Constitutive Relations for Fiber Stress That Describe Deactivation, *ASME. Journal of Biomechanical Engineering*, 115(1), 72-81, 1993.
- [98] Walker, J. C., Ratcliffe, M. B., Zhang, P., Wallace, A. W., Fata, B., Hsu, E. W., Saloner, D., Guccione, J.M., : MRI-based finite-element analysis of left ventricular aneurysm, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289 (2), H692-H700, 2005.
- [99] Guccione, J. M., Waldman, L. K., McCulloch, A. D. : Mechanics of active contraction in cardiac muscle: Part II - cylindrical models of the systolic left ventricle, *Journal of Biomechanical Engineering*, 115 (1), 82-90, 1993.
- [100] Yang, X., Pabon, L., Murry, C. E. : Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *Circulation research*, 114(3), 511-523, 2014.
- [101] Christoph, J., Chebbok, M., Richter, C., Schröder-Schetelig, J., Bittihn, P., Stein, S., Uzelac, I., Fenton, F. H., Hasenfuß, G., Gilmour Jr., R. F., Luther, S., : Electromechanical vortex filaments during cardiac fibrillation, *Nature*, 555, 667-672, 2018.
- [102] Bers, D. M., : Cardiac excitation–contraction coupling, *Nature*, 415, 198-205, 2002.
- [103] Bian, W., Bursac, N. : Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture, *Biomaterials*, 30(7), 1401-1412, 2009.

- [104] Homma, J., Shimizu, S., Sekine, H., Matsuura, K., Shimizu, T., : A novel method to align cells in a cardiac tissue-like construct fabricated by cell sheet-based tissue engineering, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14(7), 944-954, 2020.
- [105] Kolodney, M. S., Wysolmerski, R. B. ; Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study, *Journal of Cell Biology*, 17(1), 73-82, 1992.
- [106] Armijo, N. C., Paola, M. D., Pinnola, F. P. : Fractional characteristic times and dissipated energy in fractional linear viscoelasticity, *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, 37, 14-30, 2016.
- [107] Katsnelson, L. B., Sulman, T., Solovyova, O., Markhasin, V. S., : Role of myocardial viscoelasticity in disturbances of electrical and mechanical activity in calcium overloaded cardiomyocytes: Mathematical modeling, *Journal of Theoretical Biology*, 272(1), 83-95, 2011.
- [108] Mata, A., Fleischman, A. J., Roy, S. : Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro / Nano systems, *Biomedical Microdevices*, 7(4), 281-293, 2005.
- [109] Armugam, A., Teong, S. P., Lim, D. S. W., Chan, S. P., Yi, G., Yew, D. S., Beh Cyrus, W., Zhang, Y., : Broad spectrum antimicrobial PDMS-based biomaterial for catheter fabrication, *Biomaterials Research*, 25(33), 2021.
- [110] Xiujuan, Z., Bangyao, D., Yan, D., Wenji, Z., Xuehua, R., Gaohong, H., : Hemocompatible polydimethylsiloxane/polysulfone ultrathin composite membrane for extracorporeal membrane oxygenation, *Separation and Purification Technology*, 302, 122028, 2022.
- [111] Oyunbaatar, N. E., Lee, D. H., Patil, S. J., Kim, E. S., Lee, D. W., : Biomechanical Characterization of Cardiomyocyte Using PDMS Pillar with Microgrooves, *Sensors*, 16(8), 2016.
- [112] Akiyama, Y., Furukawa, Y., Morishima, K. : Controllable Bio-Microactuator Powered by Muscle Cells, *Proceedings of 2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 6565-6568, 2006.
- [113] Tanaka, Y., Sato, K., Shimizu, T., Yamato, M., Okano, T., Kitamori, T., : A microspherical heart pump powered by cultured cardiomyocytes, *Lab Chip*, 7(2), 207-212, 2007.
- [114] Sharfeddin, A., Volinsky, A. A., Mohan, G., Gallant, N. D., : Comparison of the macroscale and microscale tests for measuring elastic properties of polydimethylsiloxane, *Journal of Applied Polymer Science*, 132(42), 2015.

- [115] Christopher, L. J., Alison, C. D. : Wear mode control of polydimethylsiloxane (PDMS) by load and composition, *Wear*, 203066, 438-439, 2019.
- [116] Sodian, R., Hoerstrup, S. P., Sperling, J. S., Martin, D. P., Daebritz, S., Mayer, J. E. Jr., Vacanti, J. P., : Evaluation of Biodegradable, Three-Dimensional Matrices for Tissue Engineering of Heart Valves, *ASAIO Journal*, 46(1), 107-110, 2000
- [117] Borin, D., Pecorari, I., Pena, B., Sbaizero, O., : Novel insights into cardiomyocytes provided by atomic force microscopy, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 73, 4-12, 2018.
- [118] Kroon, M., : A constitutive model for smooth muscle including active tone and passive viscoelastic behaviour, *Mathematical Medicine and Biology*, 27(2), 129-155, 2010.
- [119] Liu, X., Yuan, L., Li, D., Tang, Z., Wang, Y., Chen, G., Chen, H., Brash, J. L., : Blood compatible materials: state of the art, *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 5718-5738, 2014.
- [120] Zimmermann, A. K., Aebert, H., Reiz, A., Freitag, M., Hussein, M., Ziemer, G., Wendel, H. P., : Hemocompatibility of PMEA Coated Oxygenators Used for Extracorporeal Circulation Procedures, *ASAIO Journal*, 50(3), 193-199, 2004.
- [121] Sato, K., Kobayashi, S., Kusakari, M., Watahiki, S., Oikawa, M., Hoshiya, T., Tanaka, M., : The Relationship Between Water Structure and Blood Compatibility in Poly(2-methoxyethyl Acrylate) (PMEA) Analogues, *Macromolecular Bioscience*, 15, 1296-1303, 2015.
- [122] Hoshiya, T., Otaki, T., Nemoto, E., Maruyama, H., Tanaka, M., : Blood-Compatible Polymer for Hepatocyte Culture with High Hepatocyte-Specific Functions toward Bioartificial Liver Development, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(32), 18096-18103, 2015.
- [123] Haque, M. A., Murakami, D., Anada, T., Tanaka, M., : Poly(2-Methoxyethyl Acrylate) (PMEA)-Coated Anti-Platelet Adhesive Surfaces to Mimic Native Blood Vessels through HUVECs Attachment, Migration, and Monolayer Formation, *Coatings*, 12(6), 869, 2022.
- [124] Nishida, K., Anada, T., Kobayashi, S., Ueda, T., Tanaka, M., : Effect of bound water content on cell adhesion strength to water-insoluble polymers, *Acta Biomaterialia*, 134, 313-324, 2021.
- [125] Majidi, S. S., Adamsen, P. S., Hanif, M., Zhang, Z., Wang, Z., Chen, M., : Wet electrospun alginate/gelatin hydrogel nanofibers for 3D cell culture, *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, Part B, 1648-1654, 2018.
- [126] Efraim, Y., Schoen, B., Zahran, S., Davidov, T., Vasilyev, G., Baruch, L.,

- Zussman, E., Machluf, M., : 3D Structure and Processing Methods Direct the Biological Attributes of ECM-Based Cardiac Scaffolds, *Scientific reports*, 9(1), 2019.
- [127] Robbins, E.R., Pins, G.D., Laflamme, M.A., Gaudette, G.R., : Creation of a Contractile Biomaterial From a Decellularized Spinach Leaf Without ECM Protein Coating: An in vitro study, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(10), 2123-2132, 2020.
- [128] Tanaka, M., Mochizuki, A. : Effect of water structure on blood compatibility—thermal analysis of water in poly(meth)acrylate, *Journal of Biomedical Materials Research*, 68A, 684-695, 2004.
- [129] Tamada, Y., Ikada, Y. : Cell adhesion to plasma-treated polymer surfaces, *Polymer*, 34(10), 2208-2212, 1993.
- [130] Wang, W., Caetano, G., Ambler, W.S., Blaker, J.J., Frade, M.A., Mandal, P., Diver, C., Bártolo, P., : Enhancing the Hydrophilicity and Cell Attachment of 3D Printed PCL/Graphene Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Materials*, 9(12), 992, 2016.
- [131] Ayala, R., Zhang, C., Yang, D., Yongsung Hwang, Y., Aung, A., Shroff, S. S., Arce, F. T., Lal, R., Arya, G., Varghese, S., : Engineering the cell–material interface for controlling stem cell adhesion, migration, and differentiation. *Biomaterials*, 32(15), 3700-3711, 2011.
- [132] Ribeiro, M. C., Tertoolen, L. G., Guadix, J. A., Bellin, M., Kosmidis, G., D'Aniello, C., Kloots, J. M., Goumans, M. J., Wang, Y. L., Feinberg, A. W., Mummery, C. L., Passier, R., : Functional maturation of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in vitro – Correlation between contraction force and electrophysiology, *Biomaterials*, 51, 138-150, 2015.
- [133] Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., Ueno, K., : A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability, *Talanta*, 44(7), 1299-1305, 1997.
- [134] Tseng, Q., Pelletier, E. D., Deshiere, A., Balland, M., Guillou, H., Filhol, O., Théry, M., : Spatial organization of the extracellular matrix regulates cell–cell junction positioning, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1506-1511, 2012.
- [135] Matsuda, Y., Takahashi, K., Kamioka, H., Naruse, K., : Human gingival fibroblast feeder cells promote maturation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(3), 1798-1804, 2018.
- [136] Sato, C., Aoki, M., Tanaka, M. : Blood-compatible poly(2-methoxyethyl acrylate) for the adhesion and proliferation of endothelial and smooth muscle cells,

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 145, 586-596, 2016.

- [137] Hoshiba, T., Nemoto, E., Sato, K., Orui, T., Otaki, T., Yoshihiro, A., Tanaka, M., : Regulation of the Contribution of Integrin to Cell Attachment on Poly (2-Methoxyethyl Acrylate) (PMEA) Analogous Polymers for Attachment-Based Cell Enrichment, PLOS ONE 10(8): e0136066, 2015.
- [138] Tsai, M. Y., Aratsu, F., Sekida, S., Kobayashi, S., Tanaka, M., : Blood-Compatible Poly(2-methoxyethyl acrylate) Induces Blebbing-like Phenomenon and Promotes Viability of Tumor Cells in Serum-Free Medium, American Chemical Society, 3(4), 1858-1864, 2020.
- [139] Nishida, K., Sekida, S., Anada, T., Tanaka, M., : Modulation of Biological Responses of Tumor Cells Adhered to Poly(2-methoxyethyl acrylate) with Increasing Cell Viability under Serum-Free Conditions, ACS Biomaterials Science & Engineering, 8(2), 672-681, 2022.
- [140] Iyer, R.K., Chiu, L.L.Y., Radisic, M. : Microfabricated poly(ethylene glycol) templates enable rapid screening of triculture conditions for cardiac tissue engineering, Journal of Biomedical Materials Research, 89A: 616-631, 2009.
- [141] Daily, N. J., Yin, Y., Kemanli, P., Ip, B, Wakatsuki, T., : Improving Cardiac Action Potential Measurements: 2D and 3D Cell Culture, Journal of Bioengineering and Biomedical Science, 5(3), 168, 2015.
- [142] Serpooshan, V., Chen, P., Wu, H., Lee, S., Sharma, A., Hu, A. D., Venkatraman, S., Ganesan, V. A., Usta, O. B., Yarmush, M., Yang, F., Wu, C. J., Demirci, U., Wu, M. S., : Bioacoustic-enabled patterning of human iPSC-derived cardiomyocytes into 3D cardiac tissue, Biomaterials, 131, 47-57, 2017.

謝辞

本研究は、九州大学大学院総合理工学府物質理工学専攻 博士後期課程において実施したものです。本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、日頃より御指導ならびに御鞭撻を賜りました指導教官である九州大学応用力学研究所准教授 東藤 貢 先生に心から感謝申し上げます。東藤先生の熱心なご指導と激励がなければ本研究は遂行できなかつたと思います。重ねて感謝申し上げます。また、九州大学グローバルイノベーションセンター教授 藤野 茂 先生、九州大学中央分析センター准教授 稲田 幹 先生には、御多忙のなか副査を引き受けて戴き、本論文の完成にあたり多くの貴重なご意見と懇切なご校閲を賜りました。心よりお礼申し上げます。

本論文の第五章の遂行にあたり、九州大学先導物質化学研究所教授 田中 賢 先生には、共同研究の希望を快く引き受けて戴き、研究の計画から実施まで懇切丁寧にご指導戴きました。田中先生には研究を通して社会に貢献することの大切さを教えて戴き、私の卒業後の進路についても日頃から気にかけて戴きましたことを心より感謝申し上げます。

博士後期課程で研究を遂行する過程で行き詰っていたときに、新たな研究分野から自身の研究を見つめ直す機会を戴き、バイオマテリアルの基礎から丁寧なご指導とご助言を戴きました九州大学先導物質化学研究所准教授 穴田 貴久 先生、同研究所特任准教授 小林 慎吾 先生に心より感謝申し上げます。

そして、日頃から快適な研究生生活を進めるうえで多岐にわたる事務手続きをして戴きました事務補佐員の吉津雅子さんに、心より感謝申し上げます。

荒平 高章さん，中牟田 侑昌さんをはじめとする先輩方には日々の研究に関するご指導のみならず，身近な研究者の先輩として研究に向き合う姿勢を学ばせて戴きました．ここに心からの尊敬の念と感謝を申し上げます．また，研究生生活において大変お世話になりました博士の先輩である John James Duckworth さん，Fatin Hazwani さん，Shahrul Hisyam Marwan さん，Wu Shun さん，Zaw Linn Htun さんに感謝申し上げます．

博士後期課程の 3 年間における有意義な学生生活にあたり，ともに研究に励んだ小山 稿くん，小野 真里那さん，Bendkolbot Bou くん，Luo Kikyo くん，Nor Izmin Nor Aiman くん，梶 弘樹くん，加藤 大雅くん，松藤 亮太くん，Zhao Ziqi くん，椎屋 青波くん，白澤 廉くん，竹内 良くん，内藤 大裕くん，福井 喬太くん，Meng Xiangxiang くん，長崎 快くん，宮原 大祐くん，寄岡 康太郎くんに感謝申し上げます．また，いつも暖かく研究室に迎え入れてくださった九州大学先導物質化学研究所 田中賢 研究室の皆様に感謝申し上げます．

最後に，これまで何不自由なく学生生活を謳歌させてもらい，応援し支え続けてくれた父 栗田 耕一，母 栗田 智子，姉 栗田 裕子に深く感謝いたします．

2023 年 2 月

栗田 寛子