

図1 Langer & Vacantiが提唱した tissue engineering
生体吸収性高分子からなる多孔性の支持体に細胞を播種、支持体は徐々に分解しECMに置換され組織が再構築される。

生体吸収性高分子を使い作製した支持体あるいは人工材料と生体吸収性高分子を組み合わせた支持体を足場として細胞を播種・培養する手法が用いられている²³⁾。

松田らは、ダクロンに平滑筋細胞を含んだコラーゲン溶液をゲル化しその内面に内皮細胞を播種することにより血管様組織を作製した。更に、生体血管に近似したコンプライアンスを実現するため、微細加工技術を駆使した多孔質ポリウレタンチューブを支持体として用いた。L'Heureuxらは平滑筋細胞および線維芽細胞をアスコルビン酸を含む培地で1カ月程度培養することで細胞自身が作り出すECMを増大させ、ハンドリングできる程度の厚さにした。更にそれをチューブに巻き付けて管状にした後、内面に血管内皮細胞を播種、組織培養装置(バイオリアクター)を用い管内を拍動還流することで2,000mmHgまで耐え得る血管組織を実現した。Niklasonらは生体吸収性高分子であるPGAを管状にした支持体に平滑筋細胞を播種培養後、血管内皮細胞を内面に播種、バイオリアクターを用い拍動流下で培養することにより血管組織を再構築した。支持体に関しては強度、分解速度の観点から polyglactin や polyhydroxyalkanoate と PGA との共重合体を用いた研究も行われている。新岡らはこの技術の小児先天性疾患の患者を対象に初めて臨床応用した²⁴⁾。彼らは、患者の下肢大腿伏在静脈を約3cm採取したものを細片化し explant culture を施行、3週間ほどたって増殖した細胞をトリプシン処理し

て再度培養フラスコに播種、4週間ほど増殖させたのち再度、トリプシン処理で細胞を脱着、生体吸収性高分子からなる支持体に播種、更に1週間培養後、欠損部に移植を行っている。その結果、手術後の血管の開存が確認されている。また、細胞ソースとして骨髓由来の細胞を用いた血管組織の移植も行われている。Mayerらは、無細胞化した4mm径の血管に血管内皮前駆細胞を播種して2週間培養、その後動物モデルに移植したところ4カ月にわたる開存が確認されたと報告している。別のアプローチとして、*in vitro*でなく腹腔内などに支持体を挿入し *in vivo*で血管組織を再生したのち患部に移植するという研究も行われている。

以上のように支持体を用いた3次元的な細胞培養により血管組織の再構築が可能になり一部臨床応用されている。しかしながら冠動脈のバイパスに使用可能な高圧に耐え長期的な開存を維持し得るような小口径の血管再構築に関しては更なる研究・技術開発が必要となっている。

3. 心筋組織の再構築

細胞移植による心筋組織再生に関しては既に動物モデルを用いた研究においてその有効性が示されており、現在細胞ソースの確立に焦点が置かれている²⁵⁾。また代替として筋芽細胞を使った虚血心筋への移植は臨床応用されその有効性が示されている²⁶⁾。一方、単離細胞の注入による移植に関しては、移植サイズ、位置の制御が困難であること、細胞の流出や壊死による損

失があることが指摘されており、新たな試みとして tissue engineering によりあらかじめ体外で心筋細胞を組織として培養・構築、その後、移植片を移植、心機能の改善を図ろうという研究が始まっている。

心筋組織再構築に関しても3次元生体吸収性の支持体を用いた研究が報告されている。EschénhagenらはECMの主成分であるコラーゲンの溶液と鶏胚あるいはラット培養心筋細胞を混和しシリコン製のモールド内で培養することにより、3次元の心筋組織を作成、その張力の測定を可能とし、反復伸展刺激により細胞が配向性を獲得し肥大することを報告している⁷⁾。BursacらはPGAからなる生体吸収性の支持体に心筋細胞を播種、回転式のバイオリアクターを用いることにより心筋様組織を構築、その電気的特性を解析している⁸⁾。また、Liらのグループはスポンジ状のゼラチンを使った心筋グラフト作製の研究を展開している。ゼラチンスポンジに培養心筋細胞を数回に分けて一様に播種し培養、心筋梗塞モデルに移植したところ心機能の改善を認めたと報告している⁹⁾。更に右心系心筋欠損部に移植したところ3カ月後ゼラチンが完全に分解された後も組織として残存し欠損部を補完した¹⁰⁾。更に生体吸収性高分子としてアルギン酸を用いた研究では心筋梗塞モデルへの移植により収縮能の改善は認めなかったものの心拡大が回避されたと報告されている¹¹⁾。

以上のように培養心筋細胞と生体吸収性材料を用いた心筋移植グラフトの構築の研究は成果をあげつつある。しかしながら、生体吸収性材料の微細構造や酸素・栄養透過不足が原因で表層部にのみ心筋細胞が分布、内部組織との不均衡が生じたり、分解時に炎症反応を惹起するなどの問題も生じている。心筋組織の場合、支持体となる材料には心拍動に耐える強度と柔軟性も要求される。したがって、細胞の足場として生体吸収性材料を用いるとすると素材、構造、分解速度などに関し心筋組織により適した材料の開発が必要となっている。

4. 細胞シート工学による心筋組織の構築

前記したように組織工学は細胞・細胞の足場・増殖因子の3つの条件を整えることにより組織を再生するというコンセプトで展開し、その足場として生体吸収性高分子を使う手法が主流である。一方、著者らは温度変化のみで細胞の接着・脱着を制御できる温度応答性の培養皿を開発、細胞をシート状に回収、細胞シートの積層化により3次元組織を再構築するという新たな手法‘細胞シート工学’で tissue engineering に取り組んでいる。

この温度応答性培養皿は通常の培養皿上に温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を電子線を用いてグラフトしたもので、培養温度である37℃では疎水性表面となり細胞接着性であるが、32℃以下の低温処理で親水性表面に可逆的に変化し細胞非接着性となる。この培養基材の使用により、接着した細胞をトリプシンなどの蛋白分解酵素を用いることなく温度変化のみで脱着させることが可能である(図2)¹²⁾。細胞を密に培養し細胞が互いに接着した状態では、低温処理により細胞と培養表面の接着が解離し細胞がその下面のECMとともに培養皿から脱着するものの、細胞間の結合は全く解離せず維持されるためトリプシンを用いたときのように細胞をばらばらにすることなく、シート状に回収できる(図3)。また細胞シート下面のECMが新たな培養基材や別の細胞シート上への移動時に糊の役目を果たすため、速やかな移動・積層化が可能である。既に肝細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、腎上皮細胞、心筋細胞、皮膚表皮細胞シートの移動を可能とし、細胞シート重層化による3次元組織構築の研究を行っている。

著者らはこの技術を心筋組織再構築に応用した¹³⁻¹⁵⁾。新生仔ラットから単離した心筋細胞を温度応答性培養皿上に培養すると、細胞間の電気的結合ができ同期して拍動するようになる。この電気的に結合した心筋細胞を低温処理を行いシート状に脱着、この心筋細胞シートを重層化した。重層化後数日で2枚の心筋細胞シート

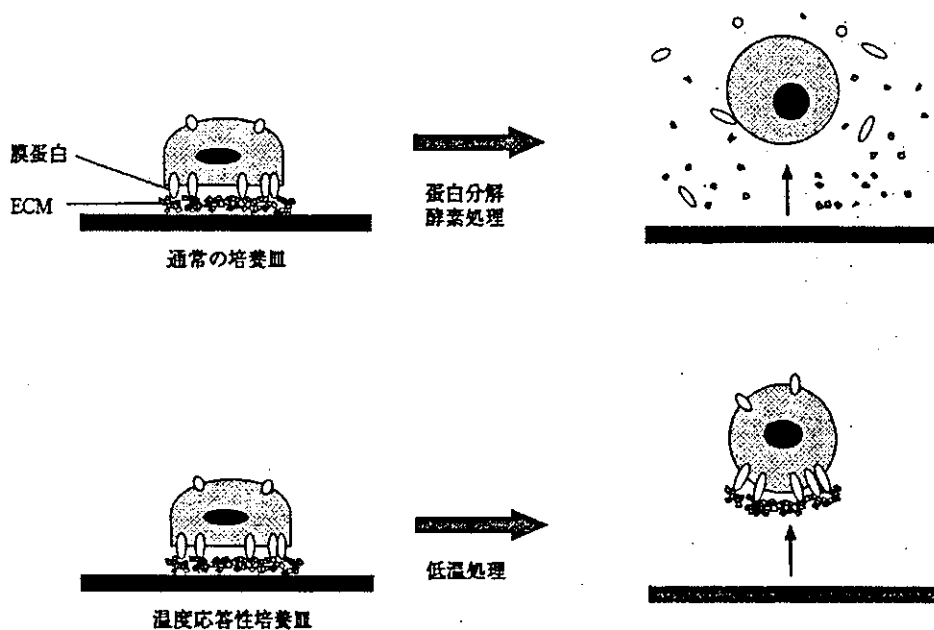


図2 温度応答性培養皿からの細胞脱着のメカニズム

細胞は培養皿表面とECMおよびそのレセプターである膜蛋白を介して接着している。トリプシンなどの蛋白分解酵素を使用したときはこれらの蛋白が分解されることにより細胞が脱着する(上段)。一方、温度応答性培養皿上では低温処理により培養表面の疎水から親水への変化が起こり、ECMと表面の結合が解離することで細胞が脱着する(下段)。

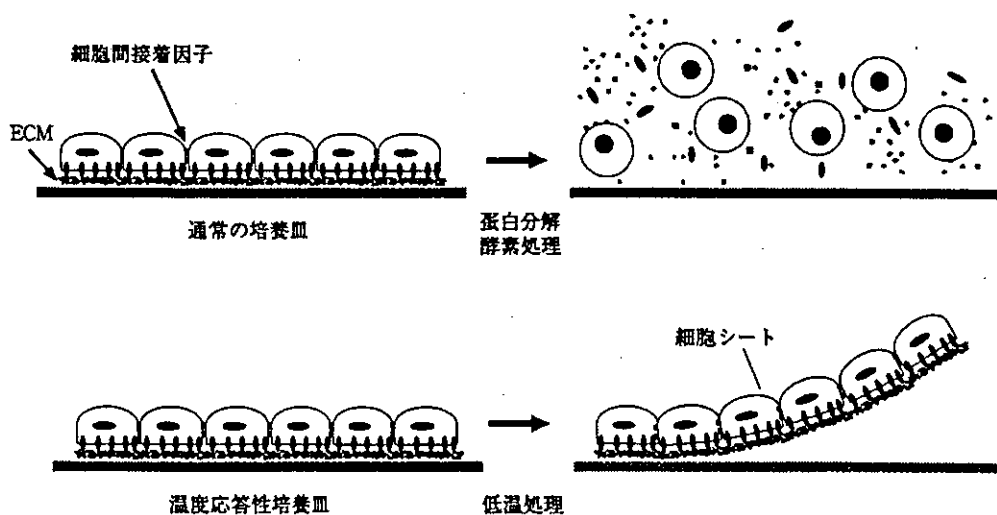


図3 細胞シートの脱着

細胞が密に培養された場合は細胞同士が細胞間接着因子により結合する。トリプシンなどの蛋白分解酵素使用時はこれらの蛋白も破壊されるため細胞がばらばらに解離する(上段)が、温度応答性培養皿の場合は、細胞下面のECMと培養表面との間のみで解離が生じ、細胞間の接着は維持される。この結果、細胞シートの回収が可能となる(下段)。

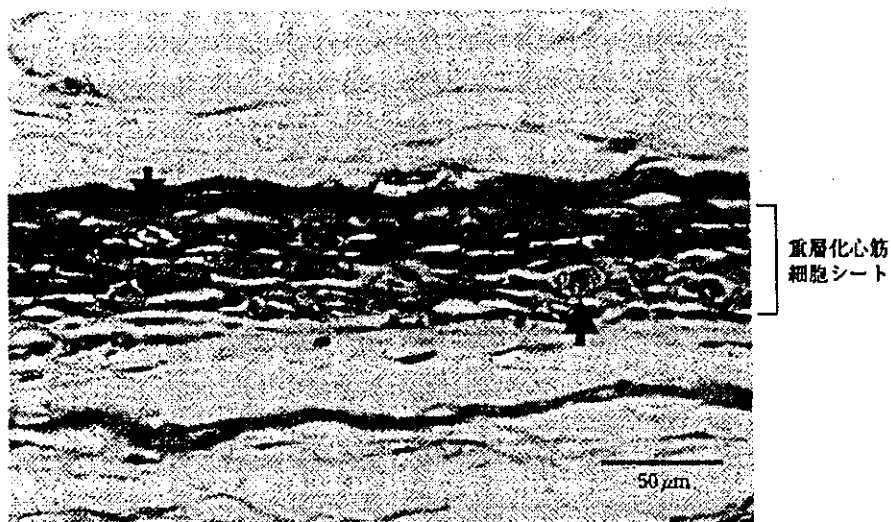


図4 重層化心筋細胞シートの組織切片像

2枚の心筋細胞シートを移植後3週間の時点での組織切片像 (Azan 染色) を示す。皮下組織内の層状の心筋組織内には円柱状に伸展した心筋細胞および多数の毛細血管(矢印)を認める。

は同期して拍動し、一方の心筋細胞シートへの電気刺激が他方のシートへ伝達することが確認された。更に形態的にも2枚の心筋細胞シート間に密な接着が形成されることが示された。心筋細胞シートを4層まで積層化したところ、全体が同期して拍動、肉眼レベルでその動きが確認された。次に重層化心筋細胞シートを移植組織に対し免疫拒絶を起こさないヌードラットの背部皮下組織に移植したところ、ホスト心臓の心電図とは異なる心筋移植グラフトに固有の電位が測定された。更に移植部を切開したところ、移植した心筋グラフトが肉眼レベルで周期的に拍動するのが確認された。移植組織には周囲からの毛細血管網が新生していた。組織切片上、円柱状に伸びた心筋細胞や心筋組織特異的な細胞間結合であるギャップジャンクションやデスマゾームの形成が確認され、生体心筋組織類似の組織像を示した(図4)。移植期間に関して12

カ月後まで、枚数に関しては4層まで、心筋グラフトが拍動を維持したまま生着することが明らかとなっている。

このように、温度応答性培養皿を用いた細胞シート工学は既存の技術では不可能であったことを可能としており、生体分解性材料を含まない、細胞とECMからなる均一で機能的な心筋組織の構築に貢献するものと考えられる。

5. 将来展望

冠動脈疾患に対する治療法として tissue engineering への期待は高まっており、小口径の血管、機能的な心筋グラフト再構築の研究は加速している。しかしながら、細胞ソース、3次元組織構築法、血管新生法、移植法と多分野にまたがって解決すべき課題も多く、今後既存のコンセプトにこだわらないフィールドを越えた研究者・臨床医の連携、技術開発が必須である。

■ 文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. Science 260: 920-926, 1993.
- 2) Mann BK, West JL: Tissue engineering in the cardiovascular system: progress toward a tissue engineered heart. Anat Rec 263: 367-371, 2001.

- 3) Fuchs JR, et al: Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 72: 577-591, 2001.
- 4) Shin'oka T, et al: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 344: 532-533, 2001.
- 5) Reinlib L, Field L: Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease?: A workshop of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation* 101: E182-187, 2000.
- 6) Menasche P, et al: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357: 279-280, 2001.
- 7) Eschenhagen T, et al: Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11: 683-694, 1997.
- 8) Bursac N, et al: Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. *Am J Physiol* 277: H433-444, 1999.
- 9) Li RK, et al: Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119: 368-375, 2000.
- 10) Sakai T, et al: The fate of a tissue-engineered cardiac graft in the right ventricular outflow tract of the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121: 932-942, 2001.
- 11) Leor J, et al: Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 102: III56-61, 2000.
- 12) Okano T, et al: A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 27: 1243-1251, 1993.
- 13) Shimizu T, et al: Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Eng* 7: 141-151, 2001.
- 14) Shimizu T, et al: Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 60: 110-117, 2002.
- 15) Shimizu T, et al: Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90: e40-e48, 2002.

Tissue engineeringによる心筋組織の再生

Tissue engineering for myocardial reconstruction

Keywords

心筋再生
組織工学
細胞シート
細胞シート工学→用語解説92頁

清水 達也 岡野 光夫

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

Summary

重症心不全に対する新たな治療法として細胞を使った再生医療が注目を集め、自己の筋芽細胞や骨髄由来の細胞を用いた細胞注入療法が臨床応用されるに至っている。一方、細胞浮遊液としてばらばらの細胞を不全心筋組織内に注入する移植法に関しては、位置の制御や壊死、流出による移植効率の面での問題が指摘されている。また、欠損組織に対する治療も困難である。そこで近年、Tissue engineering (組織工学) の技術を用いて三次元的な心筋組織を再構築し移植グラフトを作製する研究が始まっている。世界的には、生体吸収性支持体を細胞の足場として用いる手法で心筋組織の再生が行われている。一方、我々の研究室ではシート状の細胞を積層化することで三次元組織を再生するという新規手法、Cell sheet engineering (細胞シート工学) により心筋組織再生の研究を行い、肉眼レベルで同期して自律拍動する心筋組織の再構築を可能とした。

はじめに

虚血性心疾患や心筋症による重症心不全に対する細胞を使った治療は、1990年代前半より研究され、自己の筋芽細胞や骨髄由来の細胞を用いた細胞注入療法が臨床応用されるに至っている^{1,2)}。さらに幹細胞生物学の発展により、近い将来、ヒトに移植可能な心筋細胞を大量に分化誘導する技術が開発され、それらの細胞を使った再生医療が心不全治療の一つの選択肢となることが予測されている。現時点では、細胞浮遊液として互いに解離した状態の細胞を、不全心筋組織内に直接、あるいは冠動脈内にカテーテルを挿入して注入する移植法が研究・臨床応用され成果をあげているが、移植位置の制御が困難なことや流出・壊死により細胞が損失することが新たな課題となっている^{3,4)}。また、単離した細胞の移

植では先天性の心疾患など欠損組織に対する治療は困難である。そこで近年、急速に進歩してきたTissue engineering (組織工学) の技術を用いて、体外で心筋組織を再構築し移植用のグラフトを作製する研究が始まっている。

本稿では、機能的な三次元心筋組織の再構築を目指した研究の現状を概説するとともに、当研究所が開発した新規手法、Cell sheet engineering (細胞シート工学) による心筋組織構築の研究成果を紹介する。

Tissue engineering と 心筋組織再生

Tissue engineering は1993年、米国の工学者であるLangerおよび外科医であるVacantiらにより提唱された⁵⁾。彼らは生体組織の再構築には細胞、細胞の足場となる細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM)、細胞の

分化・増殖のためのサイトカインが必要であるとし、その足場のECMの代わりにポリグリコール酸 (polyglycolic acid : PGA) とポリL乳酸 (polylactic acid : PLLA) の共重合体から作製した生体吸収性で多孔性の支持体を用いた。この支持体に細胞を播種、しばらく培養した後、生体内に移植することにより支持体が徐々に分解し、生体がつくり出すECMと置換され生体と同様の組織が再構築されるというコンセプトである。実際、この手法で軟骨組織が再生され臨床応用されている。

現在、この手法に基づいてあらゆる組織の再生研究が行われており、心筋組織に関してもいくつかの研究が報告されている。当初、培養心筋細胞から

三次元心筋組織を構築する研究は心筋組織モデルの作製を目的としたものであったが、マウス骨髄間質細胞からの心筋細胞分化誘導法が報告されたのをはじめ¹⁾、心筋への移植が可能な細胞ソースに関する研究が飛躍的に進歩したのに伴い、モデルとしてだけではなく不全心筋の機能回復を目的とした心筋グラフトを作製しようという研究が始まっている。具体的には、生体吸収性高分子を用いて多孔性の支持体を作製したのちに、それを足場として細胞を播種する手法(図1 A)と、溶液状の支持材料と細胞を混合したのち重合・ゲル化する手法がある(図1 B)。前者の手法としては、PGA²⁾、ゼラチン³⁾、アルギン酸⁴⁾を用いた研究が報告され

ている。Brusacら⁵⁾はPGAを用いて多孔性の支持体を作製、これに心筋細胞を播種した。回転式培養装置(バイオリアクター)を用いることにより接着心筋細胞を増大させた。この手法により、表層部に構築された心筋組織が生体心筋組織と同様の形態ならびに電気伝達速度を有することを示している。Liら⁶⁾はゼラチンを使った心筋移植グラフト作製の研究を展開している。メッシュ状のゼラチンに心筋細胞を一様に播種して培養することで、移植グラフトを作製し、心筋梗塞モデルへの生着を確認するとともに、右心系心筋欠損部への移植により、ゼラチンが完全に分解した後でも組織として残存し欠損部を補完することを示した。また、多孔性のアルギン酸を用いたLeorらの研究⁷⁾では、心筋梗塞モデルへの移植により心拡大が抑制され、心機能が維持されることが報告されている。一方、Zimmermannら⁸⁾は、後者の手法として足場となる材料と心筋細胞を混合して培養する研究を行っている。彼らは支持体の材料として、生体内ECMの主成分であるコラーゲンを用い、その溶液と培養心筋細胞を混合しシリコン製のモールド内で培養することにより、三次元心筋組織を構築した。組織モデルとして*in vitro*での張力測定を可能とし、種々の薬剤に対し生体心筋組織と同様の張力変化を示すことを報告している。

以上のように、心筋組織再生の研究はECMの代わりとなる生体吸収性高分子を用いるのが世界的な主流であ

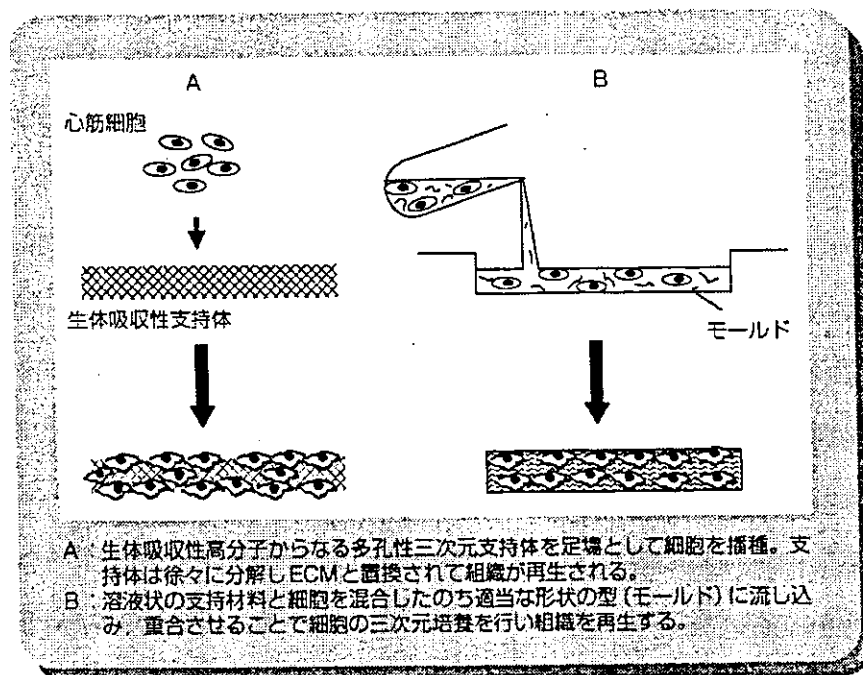


図1 Tissue engineeringによる心筋組織再生法

る。しかしながら、これらの研究においては支持体内へ十分な細胞を播種することが困難なため、生体内のような細胞の密な心筋組織の再構築が困難であることが問題となっている。すなわち、初期にECMの代替として三次元生体吸収性材料を用いる以上、それらが分解・吸収された後を生体あるいは細胞由来のECMが置換するため、結果として細胞が疎で結合組織の多い組織となる。また移植後、支持体の分解に伴い炎症反応が惹起されることも問題点として指摘されている。我々は、これら生体吸収性支持体そのものに起因する問題点を克服する手法として、支持体を用いずにシート状の細胞を積層化することで三次元組織を再構築する新規手法、Cell sheet engineeringにより心筋組織再生の研究を行っている。

Cell sheet engineering

細胞は培養基材表面とインテグリンなどの膜蛋白およびフィブロネクチンなどのECMを介して接着するが、通常細胞の脱着にはトリプシンなどの蛋白分解酵素が用いられ、膜蛋白やECMを破壊することにより細胞の培養基材表面からの解離を起こす(図2 A)。これに対し、我々は、低温処理のみで細胞をその膜蛋白およびECMとともに損傷を与えることなく脱着させることのできる温度応答性培養皿を開発した^{12) 13)}。この培養皿は、温度応答性高分子ポリN-イソプロピルアク

リルアミド(PIPAAm)を電子線を用いてポリスチレン培養皿表面に共有結合させたものである。PIPAAmは温度に依存して親水・疎水の可逆的な変化を起こす。ECMを介した細胞の接着は培養基材表面の親水・疎水度に依存しており、通常の培養温度である37℃では軽度疎水性となるため、細胞が接着するのにに対し、32℃以下の低温では高度に親水化するため培養皿表面のPIPAAm分子とECMの結合が解離、細胞が培養皿表面から膜蛋白やECMとともに損傷を受けることなく脱着する(図2 A)。次に、細胞を密な状態(confluent)に培養した場合は、細胞と細胞が細胞間接着因子を介して直接

あるいはECMにより互いに接着する。蛋白分解酵素を使用した場合は、細胞と培養皿の接着が解離するとともに、細胞同士の接着も破壊されるため、細胞は解離して浮遊することになる(図3 A)。これに対し、温度応答性培養皿を使った場合は、低温処理によりこれらの細胞間接着は全く影響を受けずに、シート下面のECMと培養皿表面の接着のみ解離するためシート状に細胞が脱着する(図3 B)。また、細胞シート下面に維持されているECMは、他の培養基材への移動時や細胞シート積層時に「糊」として働き再接着を促進する。この細胞シートを用い、単層シート移植(皮膚・角膜)、同一

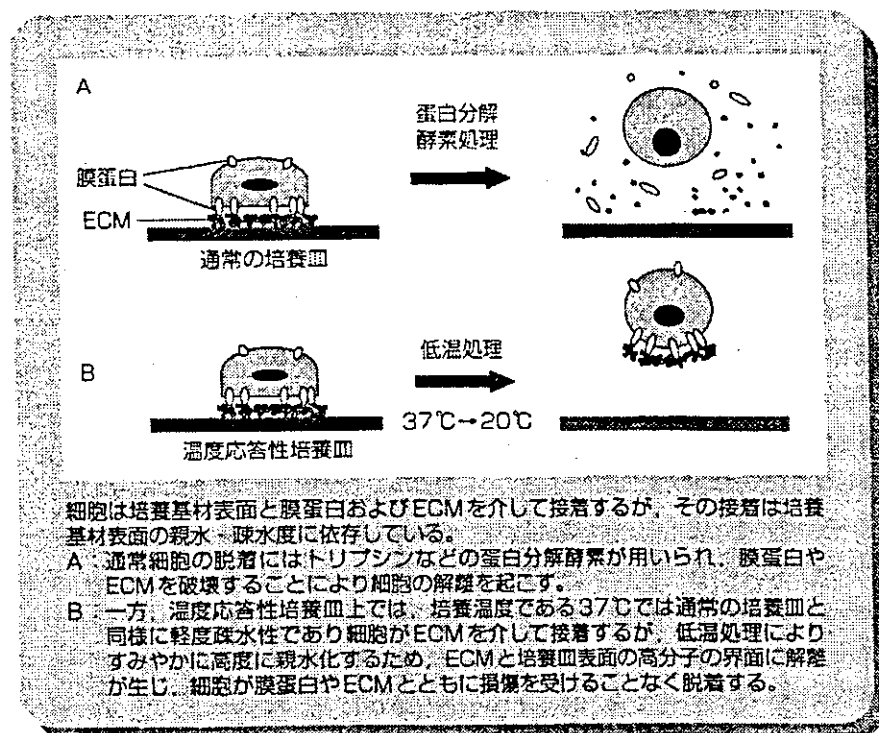


図2 温度応答性培養皿からの単離細胞の脱着

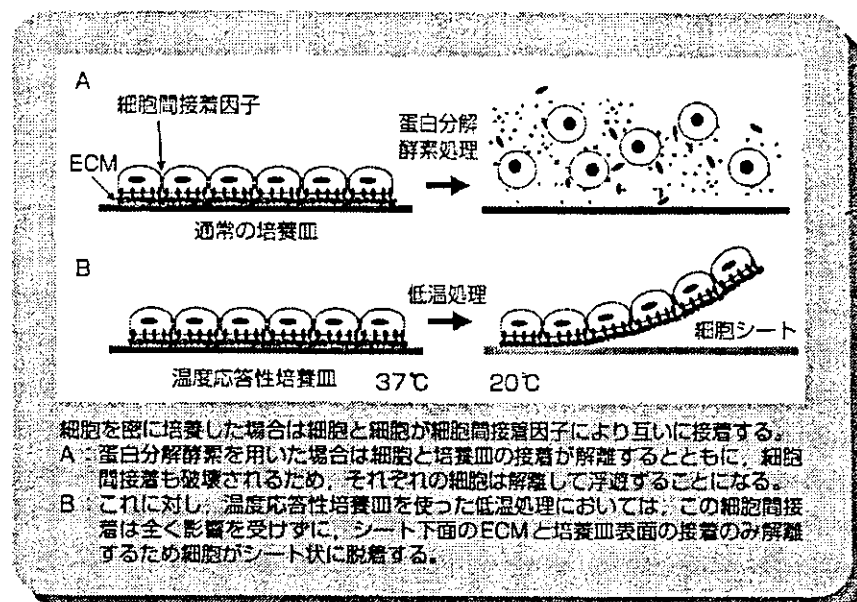


図3 温度応答性培養皿からの細胞シートの脱着

細胞シートの積層化による均一な組織構築(心筋)、数種の細胞シートの積層化による層状構造の組織構築(肝臓・腎臓・血管)の研究が行われている^{14)~16)}。

Cell sheet engineering による心筋組織の再生^{17)~19)}

温度応答性培養皿を使った心筋組織再生の基本的な手法を図4に模式的に示した。新生仔ラットから単離した心室筋細胞を温度応答性培養皿上で培養すると、通常の培養皿上と同様に2、3日で細胞間の電気的結合(ギャップジャンクション)ができ、全体が同期して拍動するようになる。この電気的に同期した心筋細胞を低温処理によりシート状に脱着・重層化した。数日中に重層化した2枚の心筋細胞シートは

同期して拍動するようになり、形態的にも心筋細胞シート間にギャップジャンクションを含む密な接着が形成されることが示された。これらの結果は、更なる重層化により同期して拍動する三次元心筋組織を構築し得ることを示唆するものであった。実際に、心筋細胞シートを*in vitro*で4層まで積層化したところ、肉眼レベルで全体が同期して拍動することが確認された。次に、重層化した心筋細胞シートを免疫拒絶を起こさないヌードラットの背部皮下組織に移植したところ、移植後数週のうちにホスト心臓の心電図とは独立した心筋移植グラフトに固有の電位が測定された。移植部を切開したところ、移植グラフトが自律的に同期して拍動することが確認された。移植組織には周囲の皮下組織から血管が侵入、毛細血

管網が発達していた(図5A)。また組織切片上、円柱状に伸びた細胞、細胞内の横紋、細胞間のギャップジャンクションと心筋様組織の再構築が確認された(図5B)。経時的な変化として、ホストラットの成長に合わせてグラフトのサイズ、厚さ、張力、電気伝達速度が増大することが明らかとなっている。すでに移植後1年まで、心筋グラフトが拍動を維持したまま生着し得ることを確認している。

課題と展望

このように、Tissue engineeringにより三次元的な心筋組織を再生し、移植グラフトとして不全心筋組織に移植するという治療が現実的なものとなっている。しかしながら、実際の臨床応用に至るまでには克服すべき課題も多く残されている。まず、細胞注入療法に関してもいえることとして、心筋細胞ソースの確立が必須であろう。すでに代替として筋芽細胞や骨髄由来の細胞を使用した臨床例が報告されているが、ヒトに移植可能な心筋細胞の分化・誘導、さらに大量培養を可能とする技術が開発されれば、より心機能を向上させ得る治療法が確立することが予測される。近年の幹細胞生物学の発達が、近い将来これを可能にすることを期待したい。次に、より厚く大きな心筋組織を作製するためには、酸素・栄養の供給が最大の課題となってくる。これに対しては、移植グラフトへの血管新生因子の遺伝子導入や、血管

内皮細胞との共培養といった手法との併用も検討されているが、更なる技術革新が必要であろう。また、より機能的な心筋組織を再生するためには、心筋細胞に配向性を付与したり、肥大させることが重要となってくる。これに関しては、すでに回転式の組織培養装置や反復伸展刺激装置などのバイオリアクターが開発されている。これらのデバイスを使用することで、より生体に近い心筋組織が作製されることが報告されており、今後更なる創意工夫が期待される。我々の研究室でも、細胞シート重層化により構築された心筋組織に伸展負荷を加えるとともにその張力測定を行うことのできるデバイスを開発し、構築された心筋組織の形態と機能をモデルとして解析し、より高機能な移植グラフトを作製することを追究している(早稲田大学機械工学科梅津研究室との共同研究による)。最後に、注入による細胞移植に関しては、NOGAシステムなどのカテーテルを用いた治療デバイスの開発が進んでいるが、Tissue engineeringにより再生された心筋組織の移植を目的としたデバイスの開発はまだ行われておらず、今後できるだけ低侵襲で再生組織を移植できるような医療器械の開発も必要となるであろう。

このように、再生心筋組織の臨床応用には、細胞ソース、大量培養装置、三次元組織構築、血管新生、バイオリアクター、保存、心臓への移植・移植デバイスと、多分野にまたがる技術の

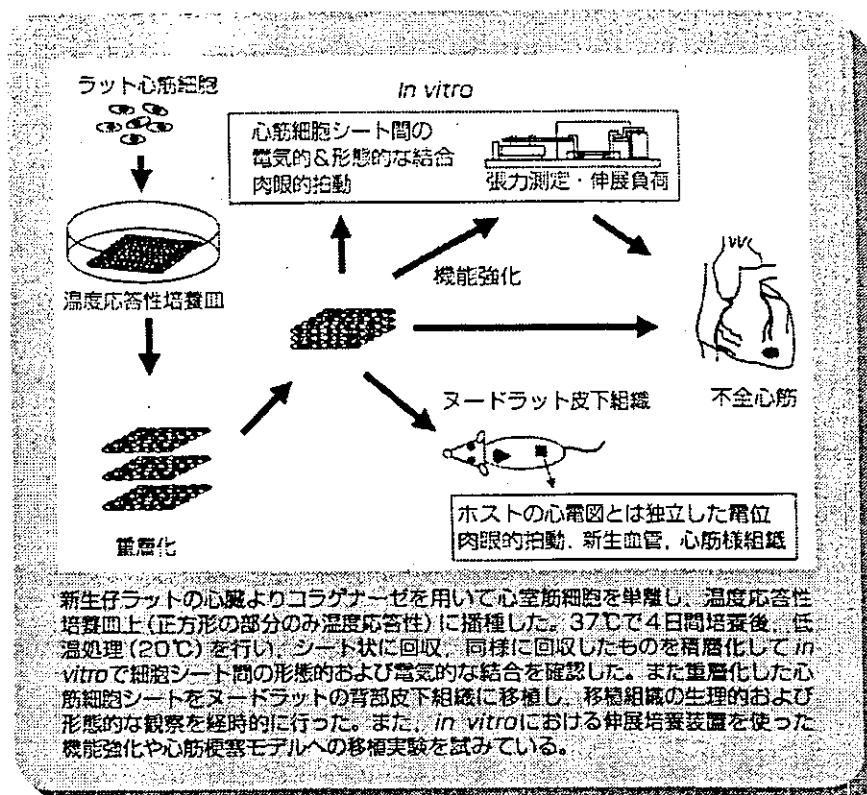


図4 Cell sheet engineeringによる心筋組織再生

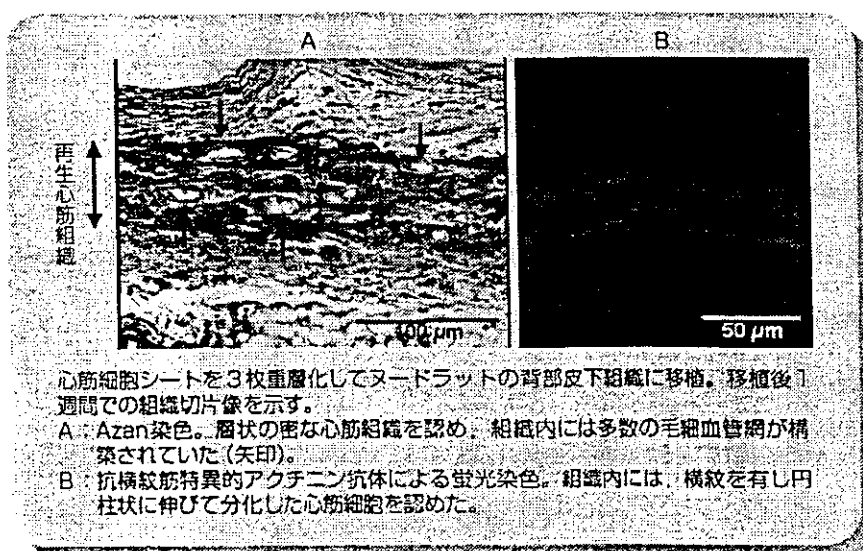


図5 皮下移植した重層化心筋細胞シートの組織切片像

開発が必須である。その中で、Cell sheet engineeringは既存の技術では不可能であったことを可能としており、生体吸収性材料を用いない新たな手法として、心筋組織の再生における一つの要素技術として大きく貢献するものとする。

●文 献

- 1) Reinlib L, Field L : Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease? ; A workshop of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation* 101 : E182-187, 2000
- 2) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al : Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357 : 279-280, 2001
- 3) Zhang M, Methot D, Poppa V, et al : Cardiomyocyte grafting for cardiac repair ; graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 33 : 907-921, 2001
- 4) Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, et al : Rebuilding damaged heart ; Long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation* 105 : 1720-1726, 2002
- 5) Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP : Tissue engineering ; a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 72 : 577-591, 2001
- 6) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. *Science* 260 : 920-926, 1993
- 7) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest* 103 : 697-705, 1999
- 8) Bursac N, Papadaki M, Cohen RJ, et al : Cardiac muscle tissue engineering ; toward an *in vitro* model for electrophysiological studies. *Am J Physiol* 277 : H433-444, 1999
- 9) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al : Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 100 : II 63-69, 1999
- 10) Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, et al : Bioengineered cardiac grafts ; A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 102 : III 56-61, 2000
- 11) Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, et al : Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90 : 223-230, 2002
- 12) Yamada N, Okano T, Sakai H, et al : Thermo-responsive polymeric surfaces ; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem* 11 : 571-576, 1990
- 13) Okano T, Yamada N, Sakai H, et al : A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 27 : 1243-1251, 1993
- 14) Kushida A, Yamato M, Kikuchi A, et al : Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets ; The noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces. *J Biomed Mater Res* 54 : 37-46, 2001
- 15) Yamato M, Utsumi M, Kushida A, et al : Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without dispass by reducing temperature. *Tissue Eng* 7 : 473-480, 2001
- 16) Harimoto M, Yamato M, Hirose M, et al : Novel approach for achieving double layered cell sheets co-culture ; overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J Biomed Mater Res* 62 : 464-470, 2002
- 17) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al : Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Eng* 7 : 141-151, 2001
- 18) Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al : Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 60 : 110-117, 2002
- 19) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al : Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90 : e40-e48, 2002

心 筋

清水 達也*



JJSB

Myocardial tissue engineering

心筋組織に対する再生医療としては、単離細胞を心筋組織内に直接注入する細胞移植療法がすでに臨床応用されている。また、組織工学的手法により体外で心筋組織を再構築し移植する方法が次世代の治療法として注目され、細胞の足場として生体吸収性高分子を用いた研究が行われている。筆者らは温度応答性培養皿を用いたシート状の心筋細胞を回収、その積層化により支持体を用いずに3次元心筋組織を再構築することを可能とした。

Tatsuya Shimizu*

Key words : 心筋再生, 細胞シート, 温度応答性培養皿

心筋組織に対する再生医療

これまで、虚血性心疾患や拡張型心筋症に伴う重症心不全に対しては脳死患者からの心臓移植が最終的な治療法と考えられてきたが、近年の幹細胞生物学や組織工学の発達により細胞を使った再生医療が新たな治療法として注目を集めている。治療法としては、① 単離細胞を心筋組織内に注入することにより血管新生あるいは心筋組織を再生させる方法、② 骨髄内の幹細胞を体外からのサイトカイン投与により不全心筋組織に動員し組織を再生させる方法、③ 組織工学の技術を用いた3次元的な心筋組織を再構築して移植グラフトを作製し移植する方法がある。すでに自己の筋芽細胞や骨髄由来細胞の注入による治療は臨床応用され、サイトカインであるG-CSFの皮下注射も臨床応用が近い。一方、組織工学的な手法による3次元的な移植心筋グラフトの作製はより有効な次世代型の移植療法として期待されているが、その研究開発にはバイオマテリアルが必要不可欠である。

組織工学的手法による心筋組織の再構築¹⁾

単離細胞の移植に関しては、開胸下に注射針を用いて心外膜側から注入する方法、電位と位置情報を同時に取得できるカテーテルを用いた心腔内側からの注入法、冠

動脈からの注入法がある。しかしながら、細胞浮遊液としてたがいに解離した状態の細胞を不全心筋組織内に注入するため、移植場所の制御が困難なことや流出・壊死により細胞が損失することが課題となっている。また、これらの細胞移植では先天性心疾患など欠損組織に対する治療は困難である。そこで心筋に対しても組織工学的手法による組織再構築の研究が加速している。他の組織と同様、細胞外マトリクス(ECM)の代わりに生体吸収性の支持体を用いた心筋組織の再構築が報告されている。

方法としては、① 生体吸収性高分子からなる支持体を作製し、それを足場として細胞を播種する手法(図1A)、② 溶液状の支持材料と細胞を混合したのち重合する手法(図1B)、③ 生体由来の脱細胞化組織を支持体として細胞を播種する方法がある(図1C)。①の手法としては、生体吸収性高分子としてポリグリコール酸、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸を用いた研究が報告されている。これらの研究ではメッシュあるいはスポンジ状の多孔性のバイオマテリアルが用いられている。ゼラチンあるいはアルギン酸を使った心筋移植グラフトに関しては不全心筋モデルへの移植実験が行われ、その生着と心機能の改善が報告されている。②の手法としてコラーゲン溶液と心筋細胞を混和し、シリコンモールド内で培養することにより3次元心筋組織の構築が試みられている。この研究では *in vitro* での張力測定ならびに伸展負荷により、組織に配向性を付与することに成功している。また③としては膀胱組織を脱細胞化したものに心筋細胞を播種し、グラフト化するという研究が行われている。

細胞シート工学による心筋組織の再構築

以上のように、心筋組織の再構築にはECMの代わりとなる生体吸収性のバイオマテリアルを用いる手法が世界的な主流である。しかしながら、支持体内へ充分な細胞を播種することが困難なため、生体内のような細胞の密な心筋組織の再構築が困難であることが課題となっている。また、移植後支持体の分解に伴い炎症反応が生じることも問題となっている。そこで筆者らは、支持体を用いずにシート状の細胞を回収し積層化することで3次

* Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University 東京女子医科大学先端生命医科学研究科
【略歴】 1992年 東京大学医学部医学科卒業。内科研修後循環器内科医として臨床に従事。1995～1999年 東京大学大学院医学系研究科博士課程。1999年 東京女子医科大学先端生命医科学研究科(旧医用工学研究施設)助手。専門：組織工学、循環器内科。趣味：旅行

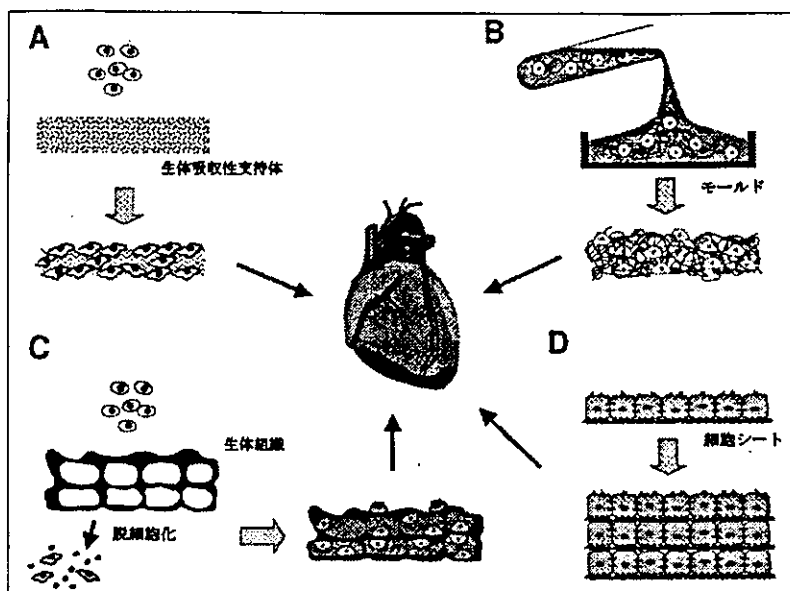


図1 組織工学的手法による心筋組織の再構築

A: 生体吸収性高分子からなる多孔性の3次元支持体を作製、それを足場として細胞を播種する。支持体は徐々に分解し細胞あるいは生体が産生するECMと置換されて組織が再生される。

B: 溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合したのちモールドに流し込み、重合させることで細胞を3次元化する。

C: 生体組織を脱細胞化した結合組織を支持体として細胞を播種し培養する。

D: 温度応答性培養皿から低温処理のみで脱着した細胞シートを積層化することにより生体吸収性支持体を用いず3次元的な組織を再構築する。

元組織を再構築する新規手法“細胞シート工学”により心筋組織再生の研究を行っている(図1D)。

細胞シートの回収には温度応答性培養皿を用いる。これは温度応答性高分子ポリN-イソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)を電子線を用い培養皿表面に共有結合させたものである。PIPAAmは温度に反応して親水・疎水の可逆的な変化を起こす。通常の培養温度である37℃では軽度疎水性となるため、細胞が接着するのに対し、32℃以下の低温では高度に親水化するため培養皿表面とECMの結合が解離、細胞が培養皿から脱着する。細胞を密な状態に培養した場合は細胞と細胞が細胞接着因子を介して、直接あるいはECMにより接着する。蛋白分解酵素を使用した場合、細胞同士の接着が破壊されるため細胞は解離して浮遊するが、温度応答性培養皿の場合は、低温処理により細胞間接着はまったく影響を受けず、シート底面のECMと培養皿の接着のみ解離するためシート状に細胞が脱着する。また細胞シートの底面に維持されているECMは細胞シート積層時に“糊”として働き再接着を促進する。

この温度応答性培養皿を用い、新生仔ラット心筋細胞シートを回収・重層化した。数日中に重層化した2枚の心筋細胞シートは同期して拍動するようになり、形態的にも心筋細胞シート間に密な接着が形成されることが示された²⁾。さらに心筋細胞シートを積層化したところ、*in vitro* および *in vivo* において肉眼レベルで同期して拍動する心筋組織の作製が可能となった³⁾。皮下での移植組織には周囲から血管が侵入、毛細血管網が発達し、生体心筋と同様の組織再構築が確認された。すでに移植後1年まで、心筋グラフトが拍動を維持したまま生着していることを確認している。また、ラット心筋梗塞モデルへ

の移植実験による心機能の改善も確認している(大阪大学大学院医学系研究科機能制御外科学教室との共同研究による)⁴⁾。

心筋再生医療におけるバイオマテリアル

以上のように、次世代の心筋再生医療として期待されている組織工学的手法による移植心筋組織の再構築に関しては、さまざまなバイオマテリアルを用いた研究が行われている。しかしながら、細胞同士が電気的・形態的に密着し、組織全体が同期して拍動し生体と同様の機能を発揮する心筋組織を再構築するには、既存の手法にとられない心筋組織に最適なバイオマテリアルの開発や技術革新が必要となっている。そのなかで細胞シート工学は、シート状の細胞の回収という既存の技術では不可能であったことを可能としており、生体吸収性材料を用いない新たな組織工学的手法として心筋組織の再生に貢献するものと考えられる。

文 献

- 1) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T: Tissue engineering for myocardial regeneration. *J Artif Org* 2002, 5: 216-222.
- 2) Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, Shibata T, Isoi Y et al.: Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 2002, 60: 110-117.
- 3) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T et al.: Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002, 90: e40-48.
- 4) Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, Shimizu T, Okano T et al.: A tissue engineered contractile cardiac graft improves the cardiac performance in infarct rat heart. *Heart Surg Forum* 2002, 6: 3.

特集
重症心不全
における
治療の進歩

トピックス

心不全に対する心筋再生療法

東京女子医科大学先端生命医科学研究所講師

清水 達也

Shimizu, Tatsuya

Myocardial tissue regeneration for heart failure

KEY WORDS

心筋再生／細胞移植／組織工学／
細胞シート

はじめに

近年、幹細胞生物学や組織工学の発達により重症心不全に対する新たな治療法として、細胞を用いた再生医療が注目を集めている。特に骨髓由来の細胞が心筋細胞に分化しうること¹⁾や成人においてこれまで分裂しないとされてきた心筋細胞が分裂しうること²⁾、さらに心臓に心筋細胞に分化しうる前駆細胞が存在すること³⁾など、細胞ソースに関する新しい知見が続々と報告されており、心筋組織再生の研究開発が加速している。アプローチとしては細胞を不全心筋組織内に注入することにより血管新生あるいは心筋組織を再生させる方法、生体内の幹細胞をサイトカインを用いて不全心筋組織に動員し、組織を再生させる方法、組織

工学的手法を用いて三次元的な心筋組織を再構築し、心筋移植グラフトを作製して移植する方法が追究されている(図1)。本稿では、それぞれのアプローチに関して概説するとともに、当研究室が独自に開発した新規組織工学的手法(細胞シート工学)による三次元心筋組織再構築の研究成果を紹介する。

心筋組織に対する 細胞移植治療

心筋組織に対する細胞移植の基礎的な研究は1990年代前半から行われている⁴⁾。Soonpaaらはマウスから単離した心筋細胞の心臓への移植により、移植された心筋細胞がホストの心筋組織に生着し、ホストの心筋細胞との間にギャップジャンクションを形成することを示した⁵⁾。さらに心筋虚血モデルへの心筋細胞移植により心機能が回復

主な略語

ECM :
extra cellular matrix

ES :
embryonic stem

CARDIAC PRACTICE
VOL.14 NO.3

CARDIAC PRACTICE 69 (277)

特集 ■ 重症心不全 における 治療の進歩

- 重症心不全に対する新たな治療法として、細胞を使った再生医療が注目を集めている。
- 虚血性心疾患に対する筋芽細胞や骨髄由来の細胞を用いた細胞移植療法がすでに臨床応用されている。

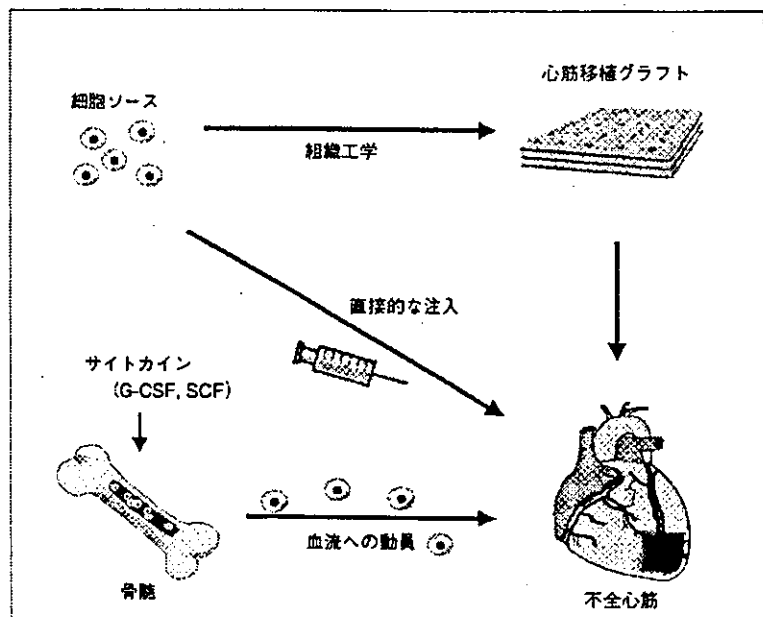


図1 心不全に対する心筋再生療法

不全心筋に対する再生医療のアプローチとしては、単離した細胞を不全心筋組織内に注入することにより血管新生あるいは心筋組織を再生させる方法、骨髄など生体内の幹細胞をサイトカインを用いて不全心筋組織に動員する方法、組織工学的手法を用いて三次元的な心筋組織を再構築し、心筋移植グラフトとして移植する方法がある。

しうことが報告された。これらの研究により不全心筋に対する細胞移植治療の有効性が示されたことから、心筋組織再生のために臨床応用可能な細胞をいかに確保するかが、次なる課題として世界中で研究されている。心筋組織再生の細胞ソースとして倫理的問題や免疫拒絶の観点から最も注目されているのは自己骨髄由来の幹細胞である。Makinoらは、DNAメチル化阻害薬である5-azacytidineを使用してマウス骨髄間質細胞から心筋細胞の分化誘導が可能であることを示した¹⁾。一方、

Orlicらは骨髄中で多能性を有すると考えられる細胞のみを細胞表面マーカー(Lin⁻c-kit⁺)によりラベル後、セルソーターを使用して選別し、その細胞を心筋梗塞部に注入した。その結果、移植された細胞が心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞に分化し、周囲の環境に応じて心筋組織が再生されることが示された²⁾。また、浅原らが末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在し、生体内の血管新生に寄与していることを証明して以来³⁾、虚血心筋部位の血管新生促進を目的とした骨髄単

核球細胞や血管内皮前駆細胞を使用した治療法も追究されている。すでに腸骨から採取した骨髄単核球細胞を不全心筋へ移植する治療は臨床応用されており、今後の成果が期待されている。

一方、心筋細胞の代替として分裂・増殖可能な筋芽細胞を自己の筋肉組織から採取し、不全心筋に移植する研究も行われ、その有効性が示されてきた。その結果、フランスにおいて初めて臨床応用され、下肢外側広筋から採取した自己筋芽細胞の不全心筋部への移植と冠動脈バイパス術との併用により心機能が回復したことが報告された⁴⁾。現在、米国、ドイツ、ポーランドなどで治験が進行中である。自己筋芽細胞移植による心機能の改善効果は不全心筋の菲薄化、およびそれに続くリモデリングによる心拡大の阻止、サイトカイン分泌による血管新生に起因するものと考えられている。しかしながら、臨床では不整脈誘発が問題となっており、抗不整脈薬や植え込み型除細動器の併用によりコントロール可能とされているが、不整脈発生の機序やその抑制法に関するさらなる研究が必須となっている。

また、移植可能な心筋細胞を大量に確保するための細胞ソースとしては胚性幹細胞(ES細胞)を使用した研究が行われている。ES細胞の使用に関しては、倫理的問題、免疫拒絶、奇形腫の形成など解決すべき問題があり、臨床応用に至るまでには十分な基礎研究

- サイトカインを用いて骨髓の幹細胞を血流中へ動員し、心筋組織の再生を促進させる治療法も追究されている。
- 組織工学の技術を用い、体外で心筋組織を再構築し、移植用のグラフトを作製する研究が始まっている。
- 組織工学においては細胞の足場として生体吸収性の支持体を用いるのが主流である。

と社会的なコンセンサスが必要であるが、多くの研究者がES細胞の心筋細胞への分化誘導を試みており、将来的に不全心筋に対する細胞移植治療に用いられる日が来るかもしれない。

細胞注入法に関しては開胸下に注射針を用いて心外膜側から注入するニードルインジェクション法に加え、電位と位置情報を同時に取得できるNOGAシステムを用いたカテーテルによる心腔内側からの注入や冠動脈を介した注入による治療がある。これら異なる細胞のデリバリー法に関してはその有効性を内科・外科の枠組みを超えて比較・検討する必要がある。

骨髓細胞の動員による 心筋組織再生

前述したように、骨髓には心筋細胞をはじめ血管内皮細胞、平滑筋細胞など種々の細胞に分化しうる多能性の幹細胞が存在し、必要に応じて血流中に動員され、心筋組織の再生に貢献することが明らかにされてきた。そこで、近年、これらの幹細胞を単離して心筋組織に移植する代わりにサイトカインを用いて血流中への動員を増大し、心筋組織の再生を促進させるという非侵襲的で簡便な治療法が追究されている。Orlicらはstem cell factor (SCF) と granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) の2種のサイトカインをマウス心筋梗塞モデルへ投与することによ

り心機能が改善することを報告している⁹⁾。また、G-CSF皮下単独投与による心機能改善効果も報告されている¹⁰⁾。メカニズムに関しては骨髓からの幹細胞の動員に加え、梗塞局所での炎症・治療過程の修飾も一因と考えられており、今後、臨床における治療効果の評価に加えて基礎的なメカニズム解明も必須である。

組織工学的手法による 心筋組織の再構築

細胞移植療法では、細胞が互いに解離した浮遊液として組織内に注入されるために移植場所の制御が困難なことや、流出・壊死により細胞が損失することが新たな課題となっている。また、単離した細胞の移植では先天性心疾患など欠損組織に対する治療は不可能である。そこで近年、組織工学(tissue engineering)の技術を用いて体外で心筋組織を再構築し、移植グラフトを作製する研究が始まっている¹¹⁾。組織工学においては主として細胞の足場となる細胞外マトリックス(extracellular matrix: ECM)の代わりに生体吸収性の支持体を用い、これに細胞を播種・培養するという手法が用いられている。この方法では生体内に移植後、支持体が徐々に分解し、生体が作り出すECMと置換されることにより生体と同様の組織が再構築されることが期待される。心筋組織に関してもこの手法による組

織再構築の研究が加速している。具体的な方法としては①生体吸収性高分子からなる支持体を作製し、それを足場として細胞を播種する手法(図2A)、②溶液状の生体吸収性の支持材料と細胞を混合した後、重合する手法(図2B)、③生体由来の脱細胞化組織を支持体として細胞を播種する手法(図2C)がある。①の手法としては、生体吸収性高分子としてポリグリコール酸、コラーゲン、ゼラチン、アルギン酸を用いた研究が報告されている。これらの研究ではメッシュあるいはスポンジ状の多孔性の三次元支持体を用いられている。ゼラチンあるいはアルギン酸を用いた心筋移植グラフトに関しては不全心筋モデルへの移植実験が行われ、その生着と心機能の改善が報告されている。②の手法としてコラーゲン溶液と心筋細胞を混和し、シリコンモールド内で培養することにより三次元心筋組織の再構築が試みられている。この研究ではin vitroでの伸展負荷により組織に配向性を付与することに成功している。また③としては膀胱組織を脱細胞化したものに心筋細胞を播種し、グラフト化するという研究が行われている¹²⁾。

細胞シート工学による 心筋組織の再構築

以上のように、心筋組織の再構築にはECMの代わりとなる生体吸収性の支持体を用いるのが世界的な主流であ

特集 ■ 重症心不全 における 治療の進歩

- 新たな手法として支持体を用いずにシート状の細胞を積層し、三次元化する細胞シート工学が提唱されている。
- シート状の心筋細胞を積層化することで自律拍動する三次元心筋組織を再構築することが可能となっている。

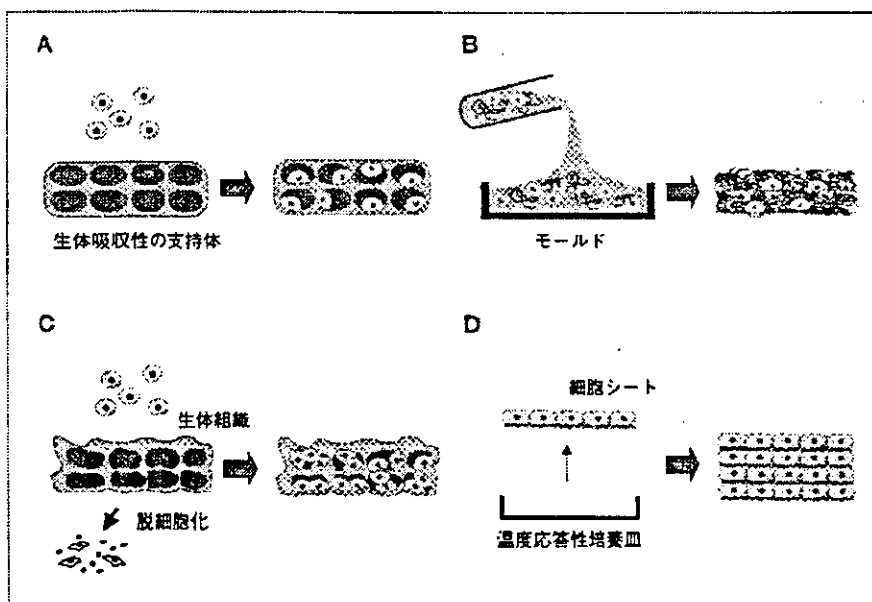


図2 組織工学的手法による心筋組織の再構築

- A: 生体吸収性高分子からなる多孔性の三次元支持体を作製、それを足場として細胞を播種する。支持体は徐々に分解し、細胞あるいは生体が産生するECMと置換されて組織が再構築される。
- B: 溶液状の生体吸収性の支持材料と細胞を混合した後、モールドに流し込み、重合させることで細胞を三次元化する。
- C: 生体組織を脱細胞化した結合組織を支持体として細胞を播種し、培養する。
- D: 温度応答性培養皿から低温処理のみで脱着した細胞シートを積層化することにより生体吸収性の支持体を用いずに三次元的な組織を再構築する。

る。しかしながら、支持体内へ十分な細胞を播種することが困難なことや移植後の支持体の分解に伴い、炎症反応が生じることが問題となっている。そこでわれわれは、支持体を用いずにシート状の細胞を回収し、積層化することで三次元組織を再構築する新規組織工学的手法「細胞シート工学」により心筋組織再生の研究を行っている(図2D)。細胞シートの回収には温度応答性培養皿を用いる。この培養皿は温度応答性高分子であるポリN-イソブ

ロピルアクリルアミド(PIPAAM)を電子線を用いて表面に共有結合させたものである。PIPAAMは温度に答して親水性・疎水性の可逆的な変化を起こす。通常の培養温度である37℃では軽度疎水性となるために細胞が接着するのに対し、32℃以下の低温では高度に親水化するために培養皿表面とECMの結合が解離、細胞が培養皿から脱着する。細胞を密な状態に培養した場合は細胞と細胞が細胞接着因子を介して直接あるいはECMにより接着する。

トリプシンなどの蛋白分解酵素を使用した場合、細胞同士の接着が破壊されるため、細胞は解離して浮遊するが、温度応答性培養皿の場合は、低温処理により細胞間接着は全く影響を受けずに、シート底面のECMと培養皿の接着のみ解離するため、シート状に細胞が脱着する。また、細胞シートの底面に維持されているECMは細胞シート積層時に「糊」として働き、再接着を促進する。この温度応答性培養皿を用い、新生仔ラット心筋細胞シートを脱着・重層化した。重層化した2枚の心筋細胞シートは数日中に同期して拍動するようになり、形態的にも心筋細胞シート間に密な接着が形成されることが示された¹³⁾。さらに、心筋細胞シートを積層化したところ、*in vitro*および*in vivo*皮下組織において肉眼レベルで同期して拍動する心筋組織の作製が可能となった¹⁴⁾。皮下での移植組織には周囲から血管が侵入して毛細血管網が発達し、生体心筋組織と同様の組織再構築が確認された。すでに移植後1年まで、心筋移植グラフトが拍動を維持したまま生着しうることを確認している。また、ラット心筋梗塞モデルへの移植実験による心機能の改善も確認している(大阪大学機能制御外科との共同研究による)¹⁵⁾。このように細胞シート工学はシート状の細胞の回収という既存の技術では不可能であったことを可能としており、生体吸収性の支持体を用いない、新たな組織工学的手法とし

■ 心筋再生療法は、多面的なアプローチにより飛躍的に進んでおり、重症心不全の治療に大きく貢献することが期待される。

て心筋組織の再生に大いに貢献するものとする。

おわりに

以上のように、心筋再生療法は、多面的なアプローチによりその研究開発が飛躍的に進んでおり、近い将来、重症心不全に対する治療の選択肢として主要なものとなり、現段階では治療として心臓移植しか残されていない多くの患者を救うことが期待される。しかしながら、急速に進歩してきたために新たな知見やその有効性に関してコントラバーシャルな結果も報告されており、また、メカニズムに関して未解明な点も多いことから、今後のさらなる基礎研究ならびに臨床での治療効果の適正な判断が必須であろう。

●文 献

- 1) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. J Clin Invest 103 : 697-705, 1999
- 2) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al : Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. N Engl J Med 344 :

1750-1757, 2001

- 3) Chimenti S, Barlucchi L, Limana F, et al : Local mobilization of resident cardiac primitive cells by growth factors repairs the infarcted heart. Circulation 106 (Suppl II) : II-14, 2002
- 4) Reinlib L, Field L : Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease? : a workshop of the National Heart, Lung, and Blood Institute. Circulation 101 : E182-187, 2000
- 5) Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, et al : Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. Science 264 : 98-101, 1994
- 6) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 410 : 701-705, 2001
- 7) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275 : 964-967, 1997
- 8) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al : Myoblast transplantation for heart failure. Lancet 357 : 279-280, 2001
- 9) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al : Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. Proc Natl Acad Sci U S A 98 : 10344-10349,

2001

- 10) Minatogushi S, Takemura G, Chen X, et al : Myocardial infarction itself induces cardiomyocyte regeneration from bone marrow cells and post-ischemic G-CSF treatment improves cardiac dysfunction via acceleration of the process. Circulation 106 (Suppl II) : II-132, 2002
- 11) Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP : Tissue engineering : a 21st century solution to surgical reconstruction. Ann Thorac Surg 72 : 577-591, 2001
- 12) Robinson KA, Matheny RC : Myocardial tissue replacement with extracellular matrix scaffolds. Heart Surg Forum 6 : 8, 2002
- 13) Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al : Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. J Biomed Mater Res 60 : 110-117, 2002
- 14) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al : Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. Circ Res 90 : e40-e48, 2002
- 15) Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, et al : A tissue engineered contractile cardiac graft improves the cardiac performance in infarct rat heart. Heart Surg Forum 6 : 3, 2002

心筋組織に対する再生医療

清水達也

○これまで、虚血性心疾患や拡張型心筋症に伴う重症心不全に対しては脳死患者からの心臓移植が最終的な治療法と考えられてきたが、近年の幹細胞生物学や組織工学の発達により細胞を使った再生医療があらたな治療法として注目を集め、多くの研究開発が盛んに行われている。手法としては、①細胞を心筋組織内に注入することにより血管新生あるいは心筋組織を再生させる方法、②生体内の幹細胞をサイトカインを用いて不全心筋組織に動員する方法、③組織工学の技術を用い三次元的な心筋組織を再構築し、移植グラフトとして移植する方法がある。すでに筋芽細胞や骨髄由来の細胞の注入による治療は臨床応用され、その有効性が示されつつある。サイトカインによる誘導療法は非侵襲的な治療法としてその効果が検討されている。また、組織工学的な手法による三次元的な心筋組織の再生は次世代の治療法として期待され、世界的には生体吸収性の支持体に細胞を播種する方法が主流となっている。一方、著者らの研究室では、シート状の細胞を積層化することで三次元組織を再生するという新規手法(細胞シート工学)により心筋組織の再構築を可能としている。このように、重症心不全に対する細胞を利用した再生医療はいくつかの異なる手法に基づいて研究が行われており、内科・外科の枠組みを超えたあらたな治療法としてその成果が期待されている。



Key word : 心筋再生, 細胞移植, 組織工学, 細胞シート

これまで欠損、あるいは不全に陥った組織に対しては他の個体からの臓器移植が最終的な治療法と考えられてきたが、近年の幹細胞生物学や組織工学の発達により細胞を使った再生医療が注目を集めている。心臓に関しても骨髄由来の細胞が心筋細胞に分化しうること¹⁾や、成人においてこれまで分裂しないとされてきた心筋細胞が分裂しうる²⁾ことなど、新しい知見が続々と報告されており、数多くの研究開発が行われている。治療法としては、①細胞を心筋組織内に注入することにより血管新生あるいは心筋組織を再生させる方法、②生体内の幹細胞をサイトカインを用いて不全心筋組織に動員し組織を再生させる方法、③組織工学の技術を用い三次元的な心筋組織を再構築して移植グラフトを作製し、移植する方法が追究されている(図1)。

本稿ではそれぞれの手法に関して概説すると

もに、シート状の細胞を積層化することで三次元組織を再生するという当研究所独自の新規手法(細胞シート工学;「サイドメモ」参照)による心筋組織の再構築について紹介する。

細胞移植療法

培養心筋細胞を注射針を用いて不全心筋に移植すると、心筋細胞がホストの心臓に生着し心機能を回復しうることは、動物モデルを使った基礎研究により1990年代前半にすでに報告され、細胞移植療法の可能性が示されていた³⁾。その後、幹細胞生物学の発展により骨髄細胞や胚性幹(ES)細胞から心筋細胞の分化誘導が可能であることが明らかとなり、不全心筋に対する細胞移植療法を現実的なものとした。移植のための細胞ソースとしては再生力の観点からES細胞を用いるのがもっとも有効かもしれない。しかし、ES細胞の使用に関しては倫理的問題、免疫拒絶、奇形種の形成といった解決すべき課題があり、臨床応用に至るには十分な基礎研究を行うとともに社会的なコンセンサ

Regenerative medicine for myocardial tissue

Tatsuya SHIMIZU

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

スを得る必要がある。そこで、これらの問題をクリアーするものとして注目されているのが、自己骨髄由来の幹細胞である。

Makino らは DNA メチル化阻害薬である 5-azacytidine を使い、マウス骨髄間質細胞から心筋細胞の分化誘導が可能であることを示した¹⁾。同様の方法で分化誘導したラット心筋細胞の心筋虚血モデ

ルへの移植により心機能が改善することが報告されている⁴⁾。さらに、Orlic らは骨髄中で多能性を有すると考えられる細胞のみを細胞表面マーカー (Lin⁻c-kit^{pos}) によりラベル後、セルソーターを使って選別し、その細胞を心筋梗塞部に注入した。その結果、移植した骨髄由来の細胞が心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞に分化、周囲の環境に応じて心筋組織が再生されることが示された⁵⁾。また、Asahara らが末梢血中に骨髄由来の血管内皮前駆細胞が存在し生体内の血管新生に寄与していることを証明して以来、虚血心筋部位の血管新生促進を目的とした骨髄単核球細胞や血管内皮前駆細胞を使った治療法が追究されている⁶⁾。

すでに腸骨から採取した骨髄単核球細胞を不全心筋へ移植する治療は臨床応用されている。このように、自己骨髄細胞を使った心筋組織の再生は倫理的問題や免疫拒絶の問題がなく、今後の成果が期待されている。

一方、筋芽細胞は骨格筋損傷時に分裂・増殖し筋組織を修復する能力をもち、自己からの採取が可能であることから、心筋細胞の代替としての可能性が追求されてきた。基礎研究においてその有効性は示されていたが、フランスにおいてはじめて臨床応用され、不全心筋部への下肢外側広筋から採取した自己筋芽細胞の移植と冠動脈バイパス術との併用により心機能が回復したことが報告された⁷⁾。現在、アメリカ、ドイツ、ポーランドなどで治療が進行中である。筋芽細胞移植に関しては一時不整脈が問題となり、治療法に関し否定的な意見も出されたが、抗不整脈薬や植込み型除細動装置の併用によりコントロール可能であるとされている。

細胞注入法に関しては、開胸下に 27~30G の注射針を用いて心外膜側から注入するニードルインジェクション法に加え、電位と位置情報を同時に取得できる NOGA システム (Biosense Webster 社) を用いたカテーテルによる心腔内側からの注入や冠動脈を介した注入による治療があり、内科および外科的手法の両者が行われている。

● 骨髄由来細胞の動員

前記したように、骨髄には心筋細胞をはじめ血

サイド メモ

細胞シート工学

細胞は培養皿とインテグリンなどの膜蛋白およびフィブロネクチンなどの ECM を介して接着するが、通常、細胞の脱着にはトリプシンなどの蛋白分解酵素が用いられ、膜蛋白や ECM を破壊することにより培養皿からの解離を起こす。これに対し著者は、低温処理のみで細胞を膜蛋白および ECM とともに損傷を与えずに脱着させることのできる温度応答性培養皿を開発した。

この培養皿は、温度応答性高分子ポリ N-イソプロピルアクリルアミド (PIPAAm) を電子線を用いてポリスチレン培養皿表面に共有結合させたものである。PIPAAm は温度に responding して、親水・疎水の可逆的な変化を起こす。ECM を介した細胞の接着は培養皿表面の親水・疎水性に依存しており、通常の培養温度である 37℃ では軽度疎水性となるため、細胞が接着するのに対し、32℃ 以下の低温では高度に親水化するため、培養皿表面の PIPAAm 分子と ECM の結合が解離し、細胞が培養皿表面から膜蛋白や ECM とともに損傷を受けることなく脱着する。細胞を密な状態に培養した場合は、細胞と細胞が細胞接着分子を介して直接あるいは ECM により接着する。蛋白分解酵素を使用した場合は、細胞と培養皿の接着が解離するとともに細胞どうしの接着も破壊されるため、細胞は解離して浮遊する。これに対し、温度応答性培養皿を使った場合は低温処理により細胞間接着はまったく影響を受けずに、シート下面の ECM と培養皿の接着のみ解離するため、シート状に細胞が脱着する。また、細胞シート下面に維持されている ECM は他の培養皿への移動時や細胞シート積層時に“糊”として働き、再接着を促進する。

この細胞シートを用いた組織工学的手法を細胞シート工学とよび、単層シート移植(皮膚・角膜)、同一細胞シートの積層化による均一な組織構築(心筋)、数種の細胞シートの積層化による層状構造の組織構築(肝・腎・血管)の研究が行われている。