

る。

この培養基材は、通常のポリスチレン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、通常の培養温度である37°Cでは疎水性表面となり細胞接着性であるが、32°C以下に温度を降下させることにより親水性表面に変化し細胞非接着性となる。この培養皿の使用により、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脱着させることが可能である<sup>13)</sup>。さらに、細胞を密に培養し、細胞が互いに接着した状態では、温度を降下させることにより細胞がその下面の接着因子・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時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2A, 2B)。また、細胞シート下面の接着因子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、速やかな接着・積層化が可能である(図2C)。すでに種々の細胞シートの移動・積層化を可能としているほか、角膜に関しては臨床にも応用されている<sup>13)14)</sup>。

## 2. 細胞シート工学による心筋組織再構築

われわれはこの細胞シート工学により、新生仔ラット心筋細胞シートを重層化することで、細胞密度の高い心筋組織の再構築を目指している。2枚の心筋細胞シートは重層化後1時間以内に同期して拍動し、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<sup>15)</sup>。さらに、形態的にも2枚の心筋細胞シートは密に接着し、gap junction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、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。さらに、重層化心筋細胞シートをヌードラットの背部皮下組織に移植したところ、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が明らかとなった。移植片には十分な毛細血管網が発達しており、円柱状に伸びた心筋細胞が

gap junctionを介して密に接着している組織像が観察された<sup>16)</sup>。

## 3. 多段階移植による血管新生

このように、細胞シートの重層化により細胞密度の高い組織の再構築は可能となっているが、より多くの細胞シートを重層化するには虚血による厚みの限界を克服する必要がある。皮下組織における重層化心筋細胞シートに関しては、枚数にして3~4枚、組織厚にしておよそ80μmがその限界であり、それ以上重層化して一度に移植した場合は、初期の毛細血管網の新生が不十分なため一部が壊死を起こす。この限界を克服する方法として、前述したような血管新生因子などを用いる手法も有用であると考えられるが、われわれは*in vivo*における新たなアプローチとして、最初に移植した重層化心筋細胞シートに十分な血管が新生されるのを待って新たな重層化心筋細胞シートを繰り返し移植することにより、毛細血管網を伴ったより厚い心筋組織を構築することを試みた(図2D~2F)。温度応答性培養皿上から低温処理により脱着した細胞シート3枚を重層化し、ヌードラット背部皮下組織に移

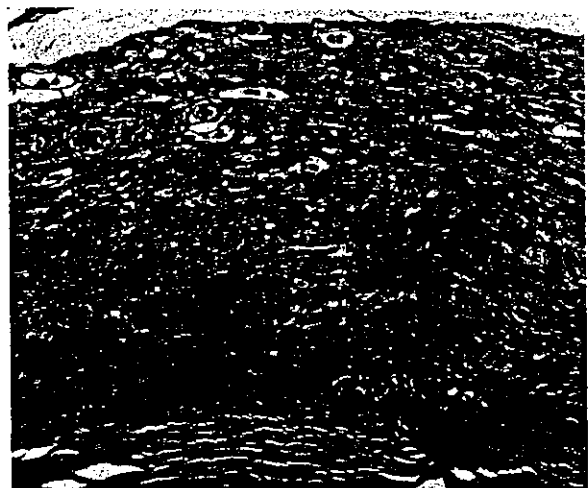


図3. 重層化心筋グラフトの組織切片像(Azan染色) 再生組織内には赤血球(橙色)を含む血管網が多数認められる(矢印)。



植した。その翌日、この心筋グラフトの上に次の3層の心筋グラフトを移植した。1週間後、2つの移植組織は完全に同期して自律拍動し、一方への移植グラフトへの電気刺激が他方の移植片に伝達されることが確認された。また、組織切片上、全層にわたって虚血による壊死は認めず、毛細血管網を伴ったより厚い心筋組織の構築が可能となった(図3)。さらにこの多段階移植を反復したところ、同期して拍動する厚さ約1 mmの心筋組織の再構築が可能となった。さらに既存血管上に移植を反復することにより、血管付きの心筋グラフトを作製し、異所性に移植することにも成功している。このように、細胞シートと細胞シート、そして移植グラフトと移植グラフトの直接的な接着が可能とする独自の組織工学的手法により、細胞が密で電氣的にも同期し、虚血の限界を超えた、より厚い心筋組織の再生が可能となっている。

## おわりに

以上のように、組織工学においては細胞密度の高い組織の再構築、それに伴う毛細血管網の新生が大きな課題となっており、種々のアプローチで研究開発が進んでいる。その中で細胞シート工学を基盤とした *in vivo* における既存血管上への多段階移植による異所性再生組織の作製は、再生医療における新たな可能性を示すものと考えられる。一方、*in vivo* において血管が周囲の細胞と相互作用しながら組織中にネットワークを形成することを鑑みると、*in vitro* での毛細血管網の新生に関しては、前述したような血管網を再構築したうえで、その後目的の細胞を播種する方法よりも、それぞれの細胞が共存した状態で組織の再構築を試みる方が機能的な血管網が新生するのではないかと考えられる。実際、皮膚の線維芽細胞と血管内皮細胞を3次元的に共培養することにより、毛細血管網が新生し得ることが示されている<sup>17)</sup>。最近、われわれも *in vitro* 心筋細胞シート内で内皮細胞が網目構造を形成し得るという新知見を得ており、今後、組織工学にお

いて *in vitro* 共培養系での毛細血管網新生のメカニズムの解明ならびにその制御に関する研究が重要になってくると考えられる。

## ◎文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260: 920-926, 1993
- 2) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331: 889-895, 1994
- 3) Kirsner RS, Falanga V, Eaglstein WH: The development of bioengineered skin. *Trends Biotechnol* 16: 246-249, 1998
- 4) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med* 344: 532-533, 2001
- 5) Petersen W, Tillmann B: Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat Embryol (Berl)* 200: 325-334, 1999
- 6) Hossler FE, Douglas JE: Vascular Corrosion Casting: Review of Advantages and Limitations in the Application of Some Simple Quantitative Methods. *Microsc Microanal* 7: 253-264, 2001
- 7) Schrezenmeier J, Kirchgessner J, Gero L, et al: Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islets organs. *Transplantation* 57: 1308-1314, 1994
- 8) Papadaki M, Bursac N, Langer R, et al: Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H168-H178, 2001
- 9) Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, et al: Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11: 683-694, 1997
- 10) Radisic M, Euloth M, Yang L, et al: High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Bioeng* 82: 403-414, 2003
- 11) Kaihara S, Borenstein J, Koka R, et al: Silicon micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng* 6: 105-117, 2000
- 12) Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y: 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, Yamato M, Kikuchi A, Okano T : Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 24 : 2309-2316, 2003
- 14) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al : Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 351 : 1187-1196, 2004
- 15) 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
- 16) 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
- 17) Hudon V, Berthod F, Black AF, et al : A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro. *Br J Dermatol* 148 : 1094-1104, 2003

厚生労働省科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業

**組織工学による血管増生心筋組織の構築並びにその移植による血管床の再生**

平成15～16年 総合研究報告所VOL.2

発行者：国立循環器病センター研究所心臓生理部 部長 盛英三

〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1

TEL:06-6833-5012 (内線 2530)、FAX:06-6835-5416

発行日：平成17年3月31日

印刷所：株式会社ジップ

© 国立循環器病センター研究所心臓生理部

無断複写・転載を禁ず