

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

脱細胞化スキャフォールドを用いる
新規再生筋組織作製の基礎研究

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 江橋 具

平成 19 (2007) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業
脱細胞化スキャフォールドを用いる新規再生筋組織作製の基礎研究
平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江橋 具
平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
脱細胞化スキャフォールドを用いる新規再生筋組織作製の基礎研究	1
江橋 具	
(資料) 挿入図	
II. 分担研究報告	
無針注射器を用いる密なスキャフォールドへの均一な細胞播種	14
藤里俊哉	
(資料) 挿入図	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 25
IV. 研究成果の刊行物・別刷 28

I. 総括研究報告

脱細胞化スキャフォールドを用いる新規再生筋組織作製の基礎研究

主任研究者

江橋 具 国立循環器病センター研究所 再生医療部機能再生研究室 流動研究員

研究要旨 われわれの研究室で開発された脱細胞化処理法により、骨格筋や心筋を脱細胞化し、これをスキャフォールドとして用いた細胞培養を行った。スキャフォールドを用いて培養した骨髄由来間葉系幹細胞は、伸長刺激を与えることにより、細胞が筋管細胞様の形態を示し、これまででない新規な分化誘導法である、物理的な刺激で細胞を筋細胞に分化できる可能性が示唆された。

分担研究者 藤里 俊哉

国立循環器病センター 研究所
再生医療部 機能再生研究室室長

A. 研究目的

筋ジストロフィー症候群などの骨格筋疾患や心筋梗塞など心疾患は、筋細胞の死による筋力低下を招き、進行すると呼吸困難や心停止、そして死をももたらす疾患である。近年、これらの疾患に対して、再生医療技術を生かした治療法である細胞移植が検討され、実際に臨床応用から良好な結果も得られている。しかし、これらの治療に用いる細胞は、これまでは患者の骨格筋組織を摘出して単離した筋芽細胞が主に利用されるため、患者の健常筋組織を摘出することによる Quality of Life の低下は免れない。最近筋芽細胞のほかにも、患者への侵襲が少ない骨髄細胞や脂肪細胞などの利用の可能性が広がってきたものの、これらには未分化細胞が多く含まれており、移植後長期的にみて、適切な細胞へ分化するかなどの細胞自身の挙動に関しては検討され

ておらず、その利用には危険性も伴う。

細胞移植方法として、一般的には細胞を注射器により組織損傷部位へ注入していく方法が行われているが、この場合、細胞の注入部位からの流出により、注入効率が問題とされてきた。国内では細胞シート作製の培養皿が広く利用されるようになり、特に心筋の治療では筋芽細胞シートを患部に接着させることで、心機能に回復が認められたことが報告されている。細胞シートを用いる場合、シートを積層化してより大きくて強度があるシートとして付着させる方法も検討されているが、シートの厚みが増すと中心部の細胞への酸素や栄養素の供給が困難となるため細胞死を引き起こすことが問題である。細胞は 100 μm 以上の厚みになると生存が困難となるとも言われているため、生体外で積層シートの中に毛細血管を誘導する試みや、シートの移植を何度かに分けて行い、生体内で徐々に血管を形成させる試みがなされている。

細胞シートのほかには、ポリ乳酸などの合成スキャフォールドやフィブロネクチンゲル

などを用いる方法も検討されているが、これらは細胞を一ヶ所にとどめることは可能でも、筋肉の収縮力に即した動きはできないため、心臓などの不随意運動をする器官には適さない。

そこで本研究では、われわれの研究室で開発された超高静水圧印加処理を用いた、生体組織の脱細胞化を行い、これをスキャフォールドとして用い、より大きく厚みのある筋組織を再構築することを目的とする。われわれの用いる脱細胞化処理法は、血管などでは処理前後で力学特性が変化しないことが既に分かっているため、筋組織でも同様の結果が得られる可能性があり、筋組織のような大きく運動する組織を構築するためのスキャフォールドとして適している。また、厚い組織の中に毛細血管を構築するための、細胞ソースや培養条件を検討し、生体内により近い筋組織構造を構築することを目指す。初年度は、細胞ソースの検討と、用いた細胞の筋細胞への分化誘導条件を検討した。

B. 研究方法

B-1. 脱細胞化スキャフォールドの作製

Crown 系ミニブタ（株）ジャパンファーム；鹿児島）大腿部骨格筋と、食用ブタ（株）ジャパンファーム）の心筋を採取した。これらを厚さ 3 mm にスライスしたのち、筋線維の方向が長軸となるように約 20 mm x 10 mm の長方形に細切した。細切した筋肉は PBS (-) に浸漬したのち密閉し、冷間等方圧加圧装置（Dr SHEF；神戸製鋼所；神戸）を用いて低温下における超高静水圧印加処理（980 MPa, 10 min, 10℃）を行った。その後の洗浄工程を経たものを、脱細胞化スキャフォールドとした。

B-2. スキャフォールド特性評価

作製したスキャフォールドは、脱細胞化の

評価として、ヘマトキシリン・エオシン染色やエラスチカ・ワンギーソン染色による組織学的検討とスキャフォールドの残留 DNA 量の計測を行った。

筋は激しく運動する組織であるため、筋の伸縮にしたがって移植用組織も追従していく必要がある。そこで、作製したスキャフォールドの力学特性を調べるために、全自動引張試験機（テンシロン；株式会社オリエンテック；東京）による引張試験を行い、脱細胞化処理による弾性率の変化を調べた。このとき、試料となる組織は、筋線維が長軸方向に並ぶ、幅 5 mm、長さ 20 mm 程度の短冊状に切り、この長軸側両端を保持したまま引張試験を行った。

B-3. 細胞の取得

B-3-1. ブタ筋芽細胞の取得

筋組織再構築のための細胞は、筋芽細胞と骨髄由来間葉系幹細胞を用いることとした。筋芽細胞取得のために、crown 系ミニブタ大腿部骨格筋を 2 cm 角程度採取して、PBS (-) 中にて細切した。遠心操作後に PBS (-) を除去し、0.1% トリプシン溶液(Gibco BRL; CA, USA) を添加、37℃ 環境下においてスターラーで 15 min 攪拌した。上清を遠心管に集め氷上にて保存した。また、残った組織に新たなトリプシン溶液を添加し、再び攪拌した。すべての上清を回収し、余分な組織を取り除いたのち培地にて洗浄し、培養皿に播種した。播種から 1 時間後、培養皿に接着しなかった細胞をコラーゲンコートディッシュに播種して、筋芽細胞とした。筋芽細胞であることを分化誘導後の細胞の形態観察および免疫染色や RT-PCR にて確認した。

B-3-2. 骨髄由来幹細胞の取得

SD ラット大腿骨を摘出して大腿骨頭から

膝の関節の部分を分離した。骨中心にシリンジを用いて PBS (-) を注入することにより骨髓を摘出し、ピペッティングすることで、細胞を分離した。細胞懸濁液をフィルター通過することで余分な細胞塊を除去し、洗浄後に培地を加えてコラーゲンコートディッシュに播種した。播種後 3 日目に培養上清を除去して非接着性細胞を除き、接着した細胞を骨髓由来幹細胞とした。培養した骨髓細胞に 5-azacytidine (Sigma; MO, USA) を添加することにより、筋管細胞や筋細胞への分化能を確認した。

B-4. 細胞培養実験

培養筋芽細胞または培養骨髓細胞は、トリプシン処理により培養皿から剥離し、 1×10^6 個の細胞を 2 mL に懸濁した。

培地で洗浄した脱細胞化骨格筋スキャフォールドと細胞懸濁液を遠心管に入れ、遠心操作 ($100 \times g$, 1 min., 6 回) にて細胞を播種した。細胞を播種したスキャフォールドを遠心管からディッシュに移し、培地を添加して 3 日間静置培養した (図 1)。

静置培養 3 日目にスキャフォールドを伸展培養装置 (図 1) の培養チャンバーに移し、スキャフォールドの長軸方向の両端をクリップで挟んで固定した。このときのスキャフォールドの長さを 100% とし、スキャフォールド長が 110% になるまで伸長する培養を行った。筋芽細胞を播種した場合には、伸長と収縮を繰り返す付加を与え、骨髓細胞を播種した場合には伸長してそのままの長さで静置培養する伸長培養を行った。また、対照としてコラーゲンコートディッシュによる単層培養を行った。

B-5. 培養細胞の評価

細胞播種から 3 日後と、伸展培養あるいは

伸長培養を開始して 3 日後の細胞の形態を観察するために、各々の時点でスキャフォールドごと細胞を固定したのち HE 染色を行い、観察した。

C. 実験結果

C-1. 脱細胞化スキャフォールドの評価

作製した脱細胞化スキャフォールドの HE 染色から、筋組織から細胞核が除去されていることが確認された (図 2)。また、エラスチカ・ワンギーソン染色の結果から、スキャフォールド内部にはコラーゲンやエラスチンと考えられる結合組織が全体に網目状に残留していることがわかった (図 3)。

スキャフォールドの力学特性を調べるために、引張試験を行い、応力-ひずみ曲線を作成した。作成した曲線から、弾性領域の弾性率を求めると、脱細胞化処理の前後において弾性率はほとんど変化がなかったことから、脱細胞化処理による力学特性への影響はほとんどないことが確認でき、筋組織作製のための生体由来スキャフォールドとして適切であると考えられた (図 4)。

C-2. 取得細胞の分化確認

ブタ骨格筋より取得した筋芽細胞は、培養皿にて培養し、培地を通常の培地から分化誘導培地に変更することで筋細胞への分化を誘導した。培地の変更からおおよそ 1 週間ほどで細胞の形態が変化し始め、2 週間もすると細胞融合して、多核の細長い繊維状の筋管細胞様の形態を示した (図 5)。また、培養細胞から RNA を抽出して RT-PCR を行い、筋細胞特異的タンパクの mRNA が発現していることがわかった (図 6-a)。さらに、分化細胞を用いて、骨格筋特異的なタンパクであるデスミンの免疫染色を行ったところ、デスミン陽性であったことから、筋芽細胞であることが確認

できた (図 6-b)。

また骨髄細胞は、分化誘導試薬にて 24 時間刺激し、その後通常の培地で培養を続けると刺激後 1 週間ほどで細胞の形態が細長くなり始め、約 3 週間で筋管細胞様の形態となった (図 7)。

C-3. 筋芽細胞の伸縮培養

筋芽細胞を播種したスキャフォールドの伸展培養は、スキャフォールドを装置に装着したときの長さから 10% 伸ばし、元の長さに戻す、という伸縮刺激を 0.5 Hz の頻度で行った。また、一度伸長させてそのままの長さを保ったまま培養を継続する、伸長培養も行った。刺激開始から 2 週間後のスキャフォールドのヘマトキシリン・エオシン染色切片を観察したところ、伸縮培養群および対照群ともに細胞は丸い形状を示したままで、伸縮培養による影響は認められなかった (図 8)。特に伸縮培養に関しては細胞数自体も減少しているようであった。このことは、伸縮の際の伸縮幅や頻度が大きかったことが原因と考えられたため、今後の課題としてこれらを小さくして細胞の剥離を回避すべきと考えられた。

C-4. 骨髄細胞の伸長培養

骨髄細胞をスキャフォールドに播種して培養すると、伸長刺激を開始する前の静置培養の時点で、スキャフォールドが収縮した (図 9)。これは、細胞の増殖能が高いことが原因と考えられ、増殖した細胞が足場であるスキャフォールドを細胞がつかんで手繰り寄せるような力によりスキャフォールドが縮んだと考えられた。静置培養 3 日目にスキャフォールドを伸展培養装置に装着して、スキャフォールドの長さを 10% 伸長したまま固定し、培養を続けた伸長培養では、伸長刺激開始から 3 日後にスキャフォールドの伸長方向と

同じ方向に細胞が細長く伸長し、一部では細胞融合が起こって多核の筋管細胞様の形態を示していることが確認された。伸長刺激を行わなかった場合には、細胞は丸い形状を保ったままであったことから、伸長刺激により細胞融合・細胞の筋細胞への分化が誘導される可能性が示唆された。培養皿による培養で、分化誘導試薬を添加しても、筋管細胞様の形態を示すまでにはおよそ 3 週間もかかったことを考慮すると、スキャフォールドを用いた場合にははるかに早期に細胞分化が起こっていると考えられた。

D. 考察

われわれは、組織工学的手法を用いた筋組織の再生を目指している。細胞の足場となるスキャフォールドは、これまでにわれわれの研究室で独自に開発した脱細胞化処理法により作製した。脱細胞化筋組織をスキャフォールドとした筋組織再生の試みは、海外の研究グループでも行われているが、これらの脱細胞化組織は、主に界面活性剤を用いて作製されているため、生体組織の力学特性に大きな影響を及ぼすことから、筋組織のように移植後に大きな力を受ける組織には適切な処理方法とはいいがたい。本研究で用いた脱細胞化処理法は界面活性剤による処理とは異なり、組織の力学特性には変化を与えなかったことから、筋組織再生のためのスキャフォールド作製法として適していると考えられる。また、移植することを考慮すると、動物由来の組織には未知の感染症も潜んでいる可能性があるが、われわれの脱細胞化処理法により、動物由来のウイルスなども除去できることを確認しているため、安全性も確保できているといえる。さらに、脱細胞化筋スキャフォールドは、生体内の神経や血管路が空間的に保存されていることから、スキャフォールドを移植

後に、残留路を通じて周辺組織から新たな毛細血管や神経の侵入が誘起される可能性もある。このような生体組織微小環境構造の残留は、組織再生に関わる細胞の挙動に影響を与え、合成スキャフォールドよりも再生能力を向上できる可能性がある。したがって、われわれが作製したスキャフォールドは、移植用筋組織を生体外構築するための足場として、優れた素材であると考えられた。

筋細胞への分化・成熟能を持つ細胞ソースとして、筋芽細胞と骨髄細胞が挙げられる。筋芽細胞は成熟筋細胞の周囲に存在している細胞で、筋損傷時必要に応じて増殖・融合し、筋管細胞を形成する。筋芽細胞の培養系において、機械的刺激が細胞に及ぼす影響についての研究は数多く報告されている。例えば、Vandenburghらは培養筋芽細胞に周期的な伸縮刺激を与えることにより、細胞融合、細胞の筋細胞への分化誘導できることを報告しているし、Kawaharaらは株化筋芽細胞に電気刺激を与えることで分化誘導できることを報告している。

一方、骨髄由来間葉系幹細胞が筋細胞へ分化することを確認した報告が近年増加してきた。これらは、細胞を筋損傷モデル動物へ移植後、移植部位での分化を認めたこと、培養皿による培養で試薬を用いて分化誘導できたことを細胞の形態や遺伝子の発現量などから確認している。

本研究では、作製したスキャフォールドを用いて、ラット骨髄由来間葉系幹細胞の培養を行い、機械的刺激による筋細胞への分化の影響について検討した。骨髄由来間葉系幹細胞の物理的刺激のうち、筋肉の細胞への分化誘導についてはほとんど報告がなく、伸縮刺激により平滑筋細胞様の細胞へと形態変化した、というもののみで、ほとんどは軟骨細胞

や骨細胞への分化の影響を試みた研究である。したがって、本研究により、伸長刺激という物理的刺激により筋管細胞様の形態へと変化した、すなわち骨格筋細胞への分化誘導できた可能性は、世界的にみても新規な分化方法であるといえる。今年度検討した方法は、一度スキャフォールドを伸長させてそのまま培養を継続するというものであったが、この刺激は一過性に細胞へ影響を与えるものと考えられることから、今後は細胞が筋管細胞様の形態を示した、刺激開始後3日以降に、生体内の筋肉と同様に伸縮や電氣的刺激を付与させて、より分化程度の進行した、筋細胞へと成熟させることを目標とする必要がある。

E. 結論

われわれの研究室で開発された超高静水圧印加処理を用いて脱細胞化筋スキャフォールドを作製した。スキャフォールドは、筋組織再生のために必要と思われる細胞外マトリクスを保持し、力学特性も保っていること、さらに血管が通っていた部分と考えられる構造も残っていたことから、適切な処理方法であると確認された。

動物から取得した筋芽細胞や骨髄由来間葉系幹細胞は、筋細胞への分化能を確認でき、これをスキャフォールドに播種したところ、播種方法によっては良好に細胞が接着し、スキャフォールドの内部（表面からの深さ 250 μm 以上）でも生存できることが確認された。このことは、厚みのある筋組織を作製する上で非常に重要なポイントとなり、これまでに、スキャフォールドや組織の厚みが 100 μm を超えると細胞が生存できなくなる、という説を覆す結果となった。これは、スキャフォールドの構造が深く関与していると考えられ、本研究で作製したスキャフォールドを用いることによる利点であるともいえる。

このスキャフォールドを用いて骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、物理的刺激である伸長刺激を与えたことで、スキャフォールド内の細胞が伸長方向に並行に細長く伸び、一部では細胞融合して筋管細胞様の形態を示したことから、細胞を筋細胞へと分化誘導できた可能性が考えられる。この分化誘導法は世界的にもまだ報告されていない方法で、さらに、組織片が完成した後に生体内に移植しても、試薬による分化誘導ではないことから、生体への悪影響もないといえるため、非常に有効な手段であるといえる。したがって、本研究の成果から、今後さらに成熟した筋細胞へと誘導すること、また血管や神経、腱なども供えた筋組織を構築することで、より臨床応用の可能性を高めるための検討を目指したいと考えている。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

Ehashi T, Fujisato T., Elongation of bone marrow cells stimulates differentiation into skeletal muscle cells cultured in the decellularized tissue. (on contribution)

F-2. 学会発表

Ehashi T, Kamata W, Funamoto S, Yoshida K, Kishida A, Nagaya N, Fujisato T. Preparation of a decellularized tissue as a scaffold for reconstructing skeletal muscle in vitro.

TERMIS-EU 2006, 2006年10月8-11日, ロッテルダム (オランダ) .

江橋 具、鎌田和加子、船本誠一、吉田謙一、岸田晶夫、中谷武嗣、永谷憲歳、藤里俊哉. 脱細胞化筋スキャフォールドを用いる筋芽細胞の伸長培養.

第 44 回日本人工臓器学会大会
2006年10月31日-11月2日, 横浜.

船本誠一、江橋 具、菊池正博、小林泰彦、藤里俊哉、山岡哲二、岸田晶夫.
Co60 による γ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化处理.

第 44 回日本人工臓器学会大会
2006年10月31日-11月2日, 横浜.

戸川祐一、江橋 具、吉田謙一、藤里俊哉、大場謙吉、中谷武嗣.

バイオリアクターを用いた血管 scaffold への細胞播種.

第 17 回バイオフィロンティア講演会
2006年11月11-12日, 上田 (長野) .

江橋 具、鎌田和加子、船本誠一、吉田謙一、岸田晶夫、中谷武嗣、永谷憲歳、藤里俊哉.
再生骨格筋作製を目的とした間葉系幹細胞の伸長培養.

第 28 回日本バイオマテリアル学会
2006年11月27-28日, 東京.

江橋 具、染川将太、藤里俊哉.

注射器を用いる新規細胞播種法の開発.

ライフサポート学会専門研究会 第 2 回細胞制御工学研究会

2007年2月28日, 東京.

江橋 具、永谷憲歳、橋本成広、藤里俊哉.
骨格筋再生を目指した骨髄由来間葉系幹細胞の静的伸長培養.

第 6 回日本再生医療学会総会
2007年3月13-14日, 横浜.

染川将太、江橋 具、森反俊幸、藤里俊哉.
スキャフォールドへの新規細胞播種方法の検

討.

第 6 回日本再生医療学会総会

2007 年 3 月 13-14 日, 横浜.

戸川祐一、江橋 具、吉田謙一、船本誠一、

西岡宏、大場謙吉、藤里俊哉、中谷武嗣.

バイオリアクターを用いた脱細胞化 scaffold
への細胞播種と培養.

第 6 回日本再生医療学会総会

2007 年 3 月 13-14 日, 横浜.

高瀬 潤、江橋 具、藤里俊哉、橋本成広.

筋芽細胞に対する磁場の影響.

第 6 回日本再生医療学会総会

2007 年 3 月 13-14 日, 横浜.

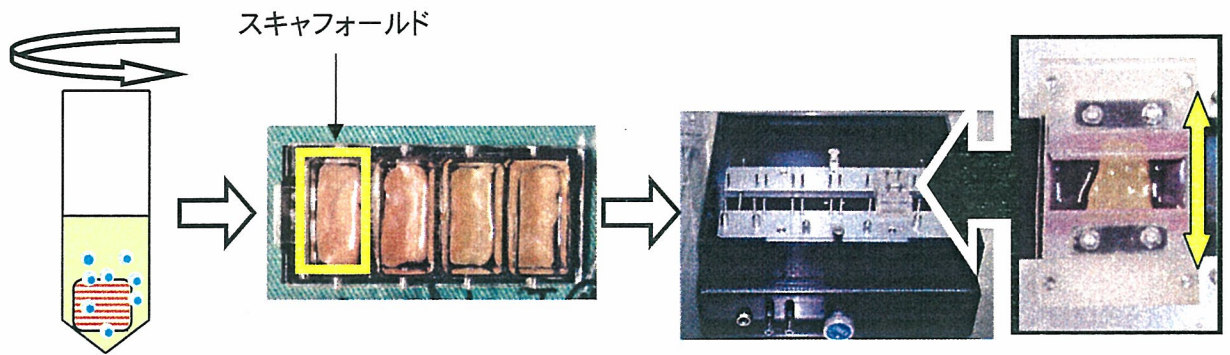
G. 知的財産権の出願・登録状況

藤里俊哉、染川将太、江橋 具、戸川祐一、

中谷武嗣、宇田川春英.

無針注射器を用いた細胞播種法.

特願 2007-47829、2007 年 2 月 27 日.



- 1) 遠心操作による細胞播種 2) スキャフォールド接着細胞の 3) 伸展培養装置の培養チャンバーにて培養実験
静置培養

図1. スキャフォールドへの細胞播種から培養実験までの流れ

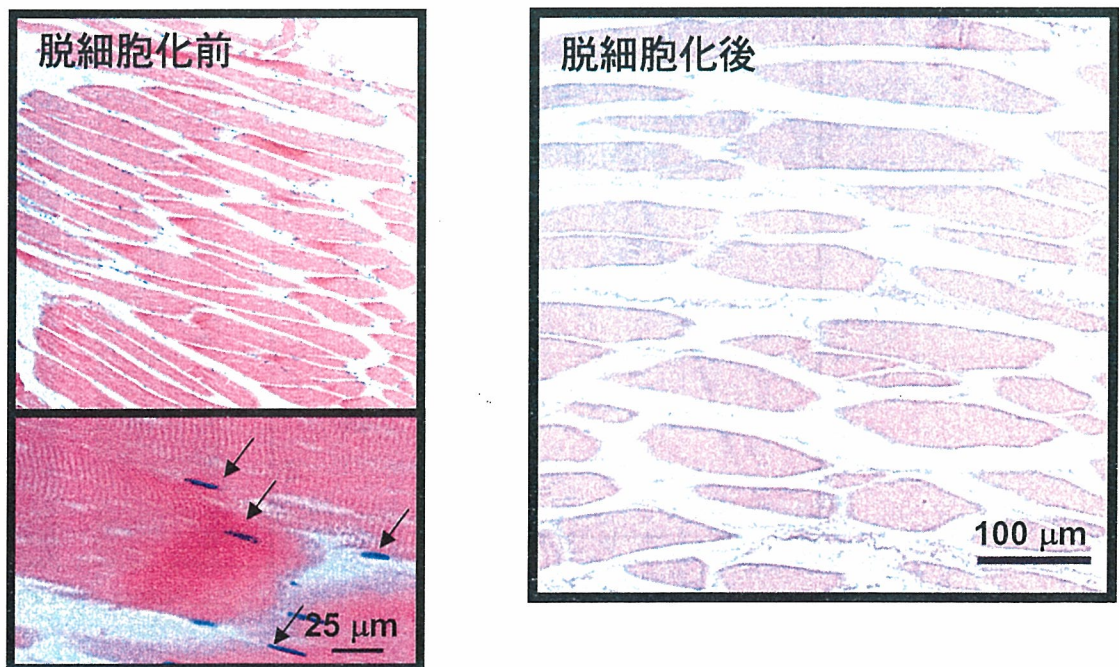


図2. 作製したスキャフォールドの HE 染色

脱細胞化前は濃青色に染色された細胞核が観察されたのに対し(左)、脱細胞化後は脱核されているのが確認された(右)。

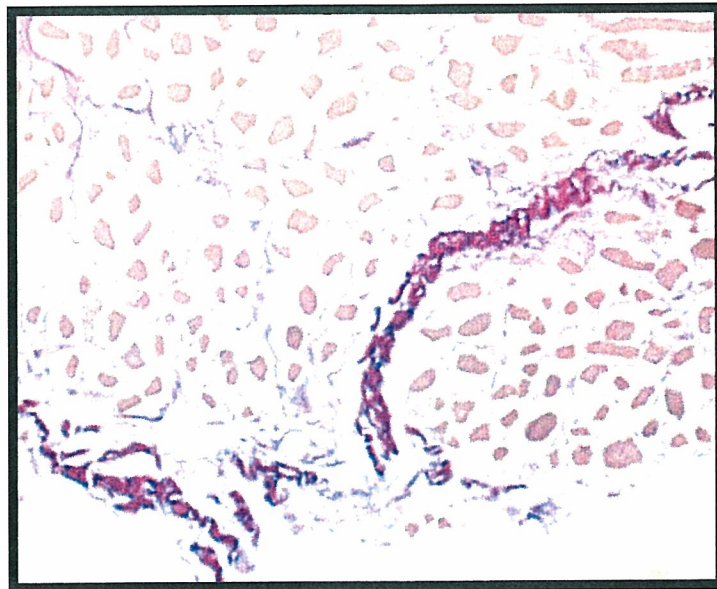


図3. 作製したスキャフォールドの EVG 染色
 脱細胞化骨格筋スキャフォールドの内部には、主にコラーゲンと考えられる細胞外マトリクスが網目状に残留していた(紫色部分)。

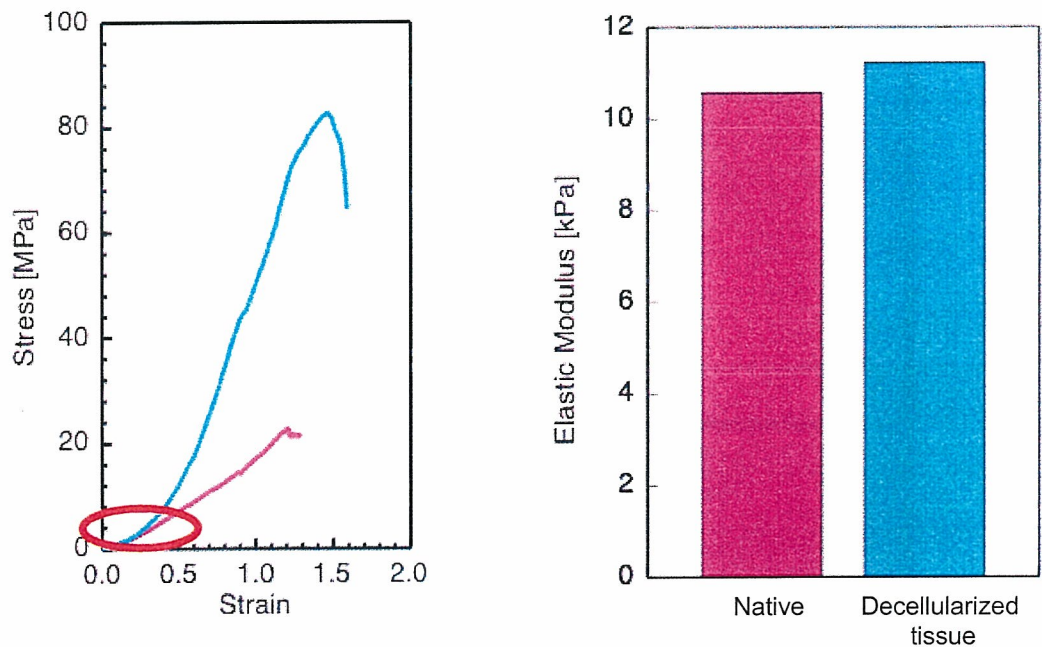


図4. 脱細胞化筋スキャフォールドの力学特性評価
 a) 応力-ひずみ曲線; b) 弾性率。脱細胞化処理の前後で応力-ひずみ曲線の弾性領域 (a図赤枠) から算出した骨格筋の弾性率には、大きな変化は認められなかった。

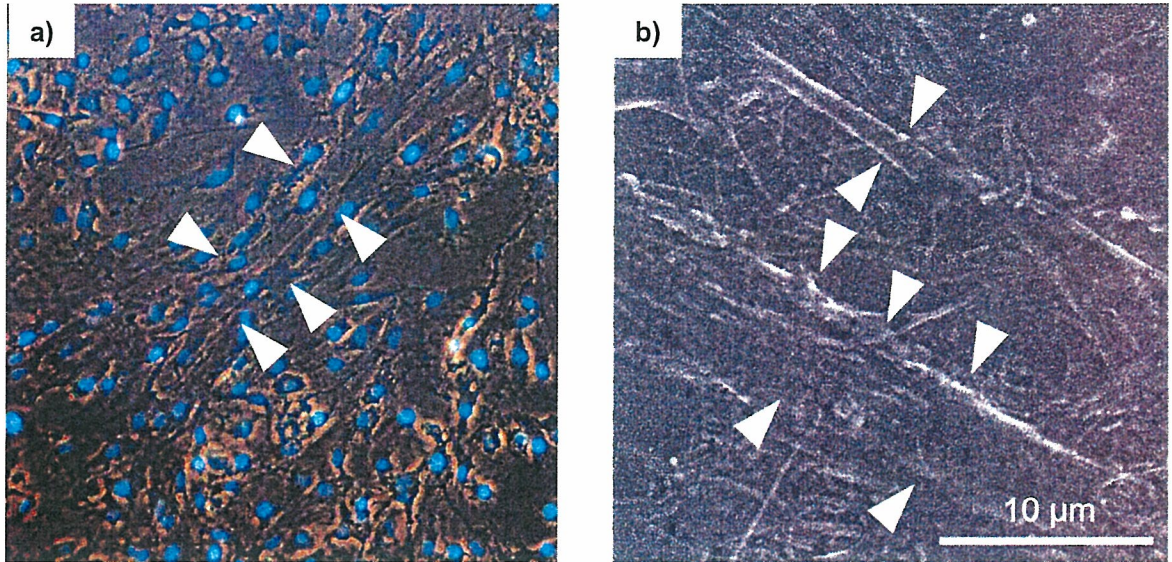
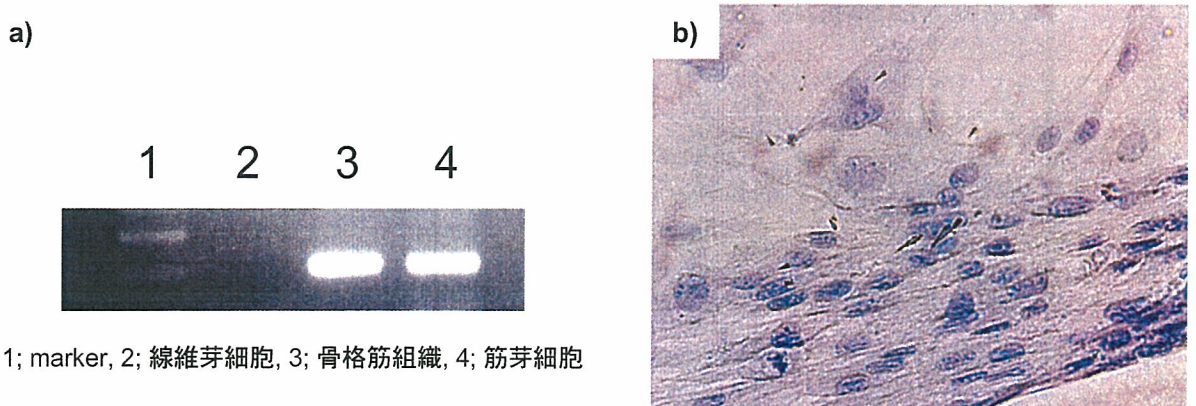


図5. ブタ骨格筋由来筋芽細胞の形態変化による分化能の確認

a) 筋芽細胞の核染色像; b) 筋芽細胞の走査型電子顕微鏡像。筋芽細胞に分化誘導培地を添加して2週間後、細胞融合をおこして筋管細胞様の形態を示した(矢印)。



1; marker, 2; 線維芽細胞, 3; 骨格筋組織, 4; 筋芽細胞

図6. ブタ骨格筋由来筋芽細胞の分化能の確認

a) RT-PCR による筋芽細胞の デスミン mRNA の発現確認; b) 分化筋芽細胞のデスミン免疫染色像。取得した細胞は mRNA レベル、タンパクレベルでデスミン陽性であったことから、筋細胞へ分化能を持つ筋芽細胞であることが確認された。

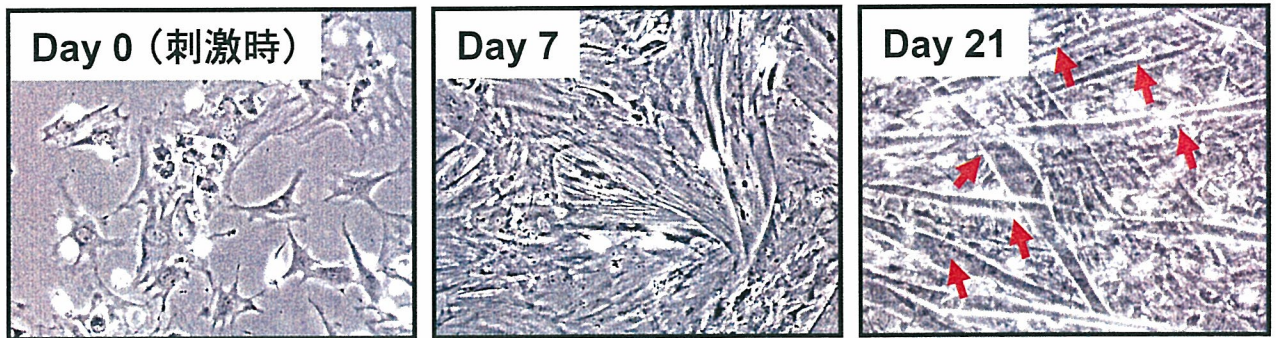


図7. ラット骨髄細胞の筋細胞への分化能の形態学的確認

培養骨髄細胞に 5-azacytidine 添加培地による分化誘導を 24 時間行い、培養を継続すると、3 週間後には筋管細胞様の細胞形態(矢印)を示した。

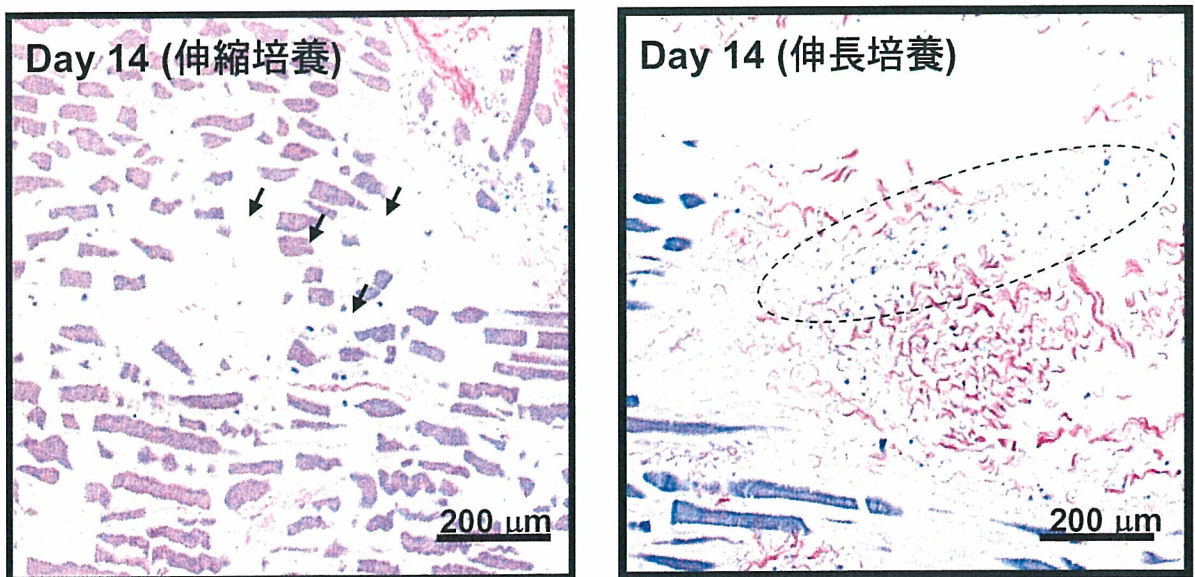


図8. 筋芽細胞の伸縮培養および伸長培養

筋芽細胞をスキャフォールドに播種して 2 週間の伸縮培養あるいは伸長培養を行っても、いずれの条件でも細胞は丸い形状を保持したままで(矢印あるいは枠内)、これらの物理的刺激による筋細胞への分化への影響は認められなかった。

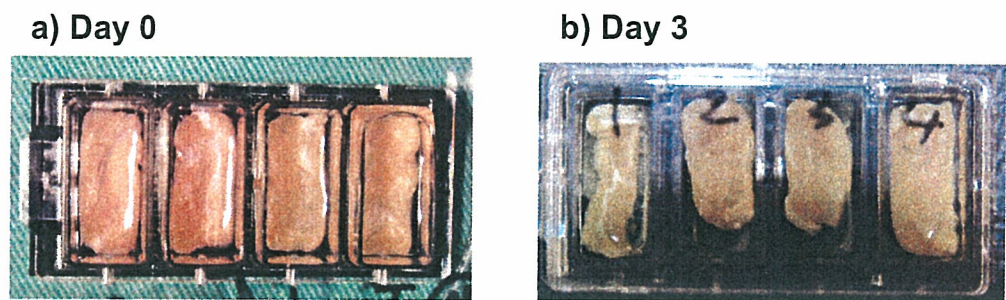


図9. ラット骨髄細胞のスキヤフォールドを用いた静置培養

スキヤフォールドに骨髄細胞を播種して3日間培養すると、細胞は良好に増殖し、スキヤフォールドを牽引したため、スキヤフォールドが収縮した。

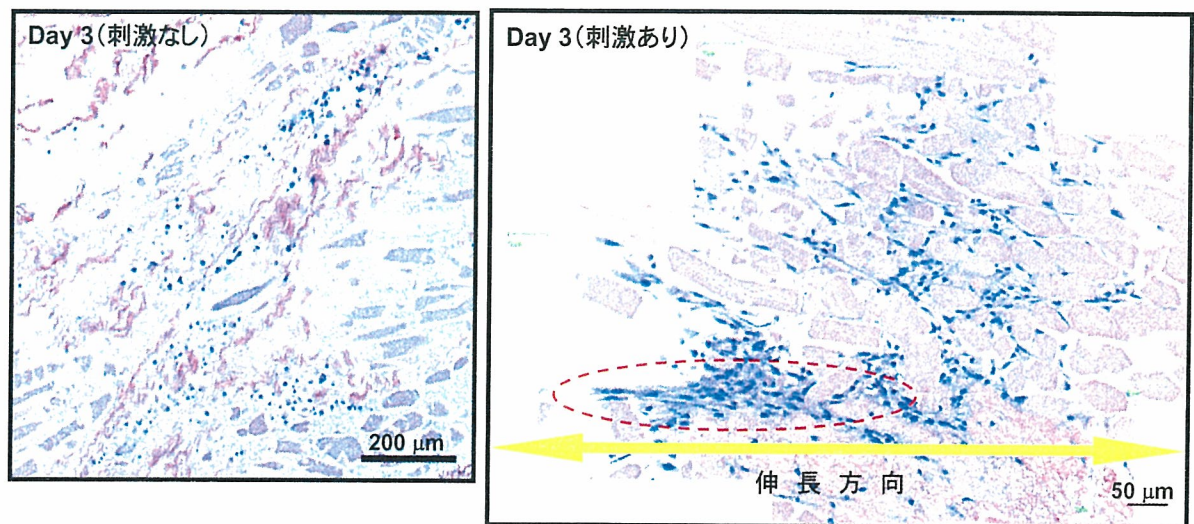


図10. ラット骨髄細胞のスキヤフォールドを用いた伸長培養

スキヤフォールドに骨髄細胞を播種して3日間静置培養し、その後伸長培養による物理的的刺激を与えると、3日後には細胞がスキヤフォールドの伸長方向と並行して、一部では細胞融合した筋管細胞様の形態が認められた(枠内)。

II. 分担研究報告

無針注射器を用いる新規細胞播種法の検討

分担研究者 藤里 俊哉 国立循環器病センター研究所 再生医療部機能再生研究室
室長

研究要旨 われわれの研究室で開発された脱細胞化処理法により、作製したスキャフォールドは密な構造で、細胞を内部にまで播種することは困難であった。スキャフォールドの内部にまで細胞を播種する研究はこれまでもいくつか検討されているが、本研究では、スキャフォールドへの損傷を最低限に抑え、さらに細胞を散在させることが可能である新規細胞播種法を開発した。

A. 研究目的

近年、細胞をスキャフォールドに接着させて培養あるいは移植する、組織工学的手法を用いた治療法が注目を集めている。スキャフォールドを用いる利点として、細胞を三次元的に培養することにより、より生体内の環境に近づけることが可能であること、そして培養皿のような二次元の培養よりも高密度に細胞を培養できることが挙げられる（図 11）。細胞を高密度に培養するためには、細胞をスキャフォールドの内部にまで播種することが必要であるが、スキャフォールドの素材、空隙率、孔径、大きさなどにより播種効率が異なるため、これまでに細胞播種方法に関して多くの研究者らが工夫をこらしてきた。本研究で用いたスキャフォールドは、心筋や骨格筋などの生体由来組織に超高静水圧処理を行って作製したものである。完成したスキャフォールドは、骨格部分の密度が高く、特に心筋から作製したスキャフォールドは細胞外マトリクス部分が細かく分布しているような形状であった。しかし、力学特性としてスキ

ャフォールドの弾性率を計測したところ、生体組織とほぼ同等の値を保持していたことから、このスキャフォールドを生体内に移植しても、筋の運動に伴う収縮に耐えうると考えられた。したがって、このスキャフォールドに細胞を播種して、筋損傷部に移植することは、患部の筋力の改善や維持、そして再生にも有効であるといえる。

一方、スキャフォールドを用いずに細胞を直接患部に注入して、組織再生を目指す治療が最近、活発に行われている。細胞を注入する場所が広範囲であるときは、何箇所も注入しなくてはならず、時間と手間のかかる作業となる。また、この場合は細胞注入用の針が組織に損傷を与える恐れもある。

そこで本研究では、作製した筋スキャフォールドのように細胞を内部にまで播種することが困難である、密な構造を持つスキャフォールドにも細胞播種が可能となる手段を、新たに開発することを目的とした。このとき、糖尿病患者がインスリンを経皮的に注射するための、無針注射器を利用し、既存の細胞播

種法と比較することで、新規細胞播種法の優位点を検討した。さらに、無針注射器を用いて動物組織に直接細胞を注入できるかについても調べ、組織への細胞移植への応用の可能性についても検討した。

B. 研究方法

B-1. スキャフォールドの作製

食用ブタの心臓を厚さ 3 mm の板状あるいは 10 mm 角のブロック状に形成し、PBS (-) とともにパックして超高静水圧印加処理を施した。

施圧条件は、温度 10 °C のもとで、980 MPa の圧力を 10 分間とした。その後、PBS (-) を基本とする洗浄液により洗浄工程を経たものをスキャフォールドとした。出来上がったスキャフォールドは、HE 染色や DNA 量を計測することにより、脱細胞されているか否かを判定した。

B-2. 播種細胞

細胞播種実験に用いた細胞は、以下の二種類を用いた。まず、スキャフォールドに細胞を播種して培養するものには、株化線維芽細胞である L929 細胞を培養し、培養皿から剥離・回収したものをを用いた。また、動物組織への細胞の注入には、GFP 遺伝子導入マウスから取得した線維芽細胞を培養して用いた。

B-3. 播種条件

新規細胞播種法には、インスリン自己注射用の無針注射器 (SHIMAJet®; 島津製作所、京都) を用いた (図 12)。この注射器は、内蔵されたばね力により、あらかじめ注射器ノズルに充填した薬液を噴出し、皮膚に密着させたノズル先端から経皮的に投与するためのものである。既成の注射器ノズルは先端に孔径 170 μm の孔があいており、注射針よりも

痛みを感じにくく、恐怖心も取り除くことが可能であることが特徴である。

培養した L929 細胞をトリプシン処理にて回収し、 1×10^6 細胞/mL となるように調整した。懸濁するための溶液は、PBS (-) あるいは細胞培養用コラーゲンゲルを用いた。コラーゲンゲルは、PBS (-) と比較すると粘度が高いため、細胞の周囲にまとわりつき、細胞がスキャフォールド骨格に衝突したときのクッションとなり、細胞死を予防できうるかを検討した。

対照として、既存のスキャフォールドへの細胞播種法である、細胞懸濁液のスキャフォールド上からの滴下、細胞懸濁液を通常の注射針のついた注射器により注射、細胞を医用フィブロネクチンに懸濁し、スキャフォールド上から圧縮空気によるスプレー、細胞懸濁液とスキャフォールドを遠沈管に入れて遠心操作を行う播種法を行い、それぞれの細胞播種後の HE 染色結果から、細胞の播種効率について視覚的に確認した。

B-4. 動物組織への細胞注入

本研究の最大の目的は、あらゆるスキャフォールドに細胞を内部にまで播種できる方法を開発することであるが、近年の細胞注入移植も考慮し、マウス大腿部への細胞播種を試みた。この場合は、GFP 遺伝子導入マウスから取得した細胞を用い、回収した細胞を PBS (-) またはコラーゲンゲルに懸濁した。動物は、C57BL/6 マウスを用いた。麻酔下のマウスの細胞注入部位である大腿部を除毛して皮膚を露出し、細胞懸濁液を充填した SHIMAJet® を注入部位に密着させ、細胞を筋組織内に注入した。対照として、細胞を含まない PBS (-) を注入した動物も作製し、24 時間後に各々のマウス大腿部組織を摘出して、細胞の有無や分布を共焦点レーザー顕微鏡に

て観察した。

C. 結果

新規細胞播種法に用いた SHIMAJet[®] は、もともとヒトの皮下に薬液を投与するための注射器であるため、噴射直後の圧力が約 150 気圧にも至る。皮膚よりも軟らかい脱細胞化心筋スキャフォールドに直接液体を注射すると、厚さ 10 mm のスキャフォールドでも液体は貫通してしまうことがわかったため、噴出力を弱めるために、アガロースゲルにスキャフォールドを包埋してアガロース表面からの溶液噴射を試みた。その結果、噴射した液体は、ゲル表面から 2 cm 位置に包埋したスキャフォールドに到達したことから、空気中ではスキャフォールドとの距離をより長くして噴射させる必要があることがわかった (図 13)。そこで、スキャフォールドから注射器ノズル先端部までの距離を何通りか検討し、以後の実験は播種するときのスキャフォールドとの距離を 15 cm として実験を行った。

スキャフォールドへの細胞播種法として、既存のいくつかの方法を試みた結果を図 14 に示す。HE 染色により細胞を染色したところ、既存の方法のうち、細胞懸濁液の滴下や細胞懸濁液との遠心操作による播種では、細胞をスキャフォールド内部にまで播種することはできず、すべての細胞がスキャフォールド表面に接着したのみであった。それに対して、通常の針を用いる注射器で、細胞懸濁液をスキャフォールド内部に注入した場合には、スキャフォールドが密であることもあって、細胞懸濁液は注入した場所に留まり、細胞塊を形成してしまうことが確認された。また、注射針が通過することにより、スキャフォールド骨格が断裂されてしまうため、細胞をスキャフォールド内部のあちこちに散在させるためには不適切であることがわかった。

次に、無針注射器を用いて細胞を播種し、スキャフォールド内部の細胞を観察した結果を図 15 に示す。この場合、細胞が噴射圧力やスキャフォールドへの衝突により生存率が低下する可能性を考慮して、スキャフォールドごと染色液に浸漬して、死細胞を PI 染色液で赤色に、生細胞を calcein-AM 染色液で緑色に染色したのち、共焦点レーザー顕微鏡を用いてスキャフォールド内部の細胞の生死も確認した。その結果、細胞はスキャフォールドのさまざまな深さに散在しており、死細胞よりも生細胞の方が割合は多いことがわかった (図 15)。

また、細胞を PBS (-) に懸濁した場合とコラーゲンゲルに懸濁した場合では、コラーゲンゲルに懸濁した方が、細胞死を抑制できることも確認された。

そこで、コラーゲンゲルに細胞を懸濁し、3 mm 厚さのスキャフォールドに細胞を播種して、そのまま培養皿にてスキャフォールドごと細胞を 4 週間培養した。培養終了時にスキャフォールドの断続切片を作製し、HE 染色にて細胞の存在を確認した結果を図 16 に示す。この結果から、およそ 1 ヶ月の培養でも、細胞がスキャフォールド内部にて良好に生存していることが確認され、これまで三次元的に細胞を培養するための厚さの上限であるといわれてきた 100 μm 以上でも、良好に生存しているという、新たな知見が得られ、本研究に用いたスキャフォールドは、骨格が比較的密であるものの、培地や酸素などの栄養素の供給が良好に行われている可能性が示唆された。

動物組織への直接の細胞注入を試みるため、マウス大腿部に GFP 遺伝子導入した細胞を注入し、24 時間後の細胞の生存を確認した。その結果、細胞注入の翌日でも細胞が組織内に生存していることが確認された (図 17)。