

また、細胞は組織内に散在しており、これまで、細胞は、針を用いた注射器で注入していたために、何か所も組織に損傷を与えていたのに対して、少ない傷で細胞を広範囲に注入できることがわかった。

#### D. 考察

本研究で開発された無針注射器を用いる新規細胞播種法は、既存の、スキャフォールドへの細胞播種や、組織への細胞注入法と比較して、スキャフォールドや組織への損傷を最小限に抑え、かつ細胞を三次元的に広範囲に播種することが可能であることがわかった。

生体由来組織を脱細胞化して移植用の組織として利用する試みは、世界的に研究が行われている。これらの研究では、組織からドナー由来の細胞を除去して、そのまま移植する方法と、細胞を除去後、レシピエントの細胞を播種して、培養後あるいは培養せずに移植する方法が検討されており、血管組織などではいずれの方法も研究が進んでいる。筋組織に関しては、主に骨格筋の再建を目指した研究が行われており、この場合も脱細胞組織を直接移植して、細胞が侵入し、筋組織再生をみた報告や、筋芽細胞などを播種して移植し、生体内で筋組織が再生した報告がある。しかし、細胞を播種して移植する検討では、内部にまで細胞を注入した例は認められない。しかし、われわれは、生体外にて細胞を培養し、分化・成熟させて筋組織を作製してから移植することを目指していることから、内部まで細胞化することは必要であると考えている。

われわれの研究で作製した脱細胞化筋組織に関して、特に心筋梗塞の治療を目指して作製した脱細胞化心筋組織は、骨格が密であるため、通常の方法で細胞を内部にまで注入することが困難であった。そこで、注射針のある注射器を用いてスキャフォールドに注射針

を差し込んでから細胞懸濁液を注入する方法を試みたが、これではスキャフォールドにかなりの損傷を与え、われわれの脱細胞化処理法により作製された生体由来スキャフォールドを用いる利点、すなわち生体組織と同等の力学特性を保持していることを損なう可能性が大きく、適切ではないと考えられた。さらに、スキャフォールド内で細胞懸濁液は分散されなかったことから、細胞は一ヶ所に細胞塊を形成してしまったため、スキャフォールド全体を細胞化するためには、何ヶ所かに針を刺さなくてはならないことも、不適切であると考えられた。また、細胞が大きな塊を形成すると、細胞塊中心部の細胞への栄養や酸素の供給が不十分となり、細胞死を招くこととなる。そのため、われわれは、細胞の播種直後から、大きな細胞塊を形成させることは、培養効率が低下するため、始めは細胞を散在させ、その後徐々に血管新生を誘導するなどして密な組織構築を目指している。本研究で開発された無針注射器による細胞播種法は、細胞を散在させられることや、針穴のような数百マイクロメートルオーダーの損傷も与えることがないなど、利用価値は高い。

組織への直接細胞注入に関しても、密なスキャフォールドへの細胞播種と同様に、既存の方法では組織への損傷などの問題が考えられた。また、患者への足などへの細胞注入は、何ヶ所も注射しなくてはならないという手間も問題とされており、これを改善するために Skuk らはいくつかの、あるいは一つの注射筒を自動ディスペンサーに取り付けて、自動的に細胞を注入できる装置を開発したものの、結論としては既存の方法の通り、一つの注射筒で術者自身が何ヶ所もの注入を行うのが適切であると報告している。

われわれが用いた無針注射器は、Skuk らの自動ディスペンサーのように細胞を播種し

たい場所に的確に播種できるものではない。現時点では、術者が手動で行う細胞注入よりも、細胞播種位置の制御が困難である状況である。しかし、今後の研究で、噴射圧力と組織密度や弾性などの関係を見出せるようになれば、より手動に近い注入位置（深さ）を決定できる条件設定ができるであろう。注射ノズルは皮膚に密着させて注射するため、ノズル部分を改良し、圧センサーなどを取り付けて、ここからの情報を噴射圧力設定にフィードバックできるようになれば、手動よりもはるかに迅速で効率よい細胞注入法となりうると期待される。

## E. 結論

本研究では、新規細胞播種・注入方法として、無針注射器を用いる方法を開発した。この方法は、われわれが作製した脱細胞化組織への細胞播種として適切な方法であっただけでなく、既存の合成スキャフォールドなどへの適用も可能であると考えられる。本方法は、これまでのスキャフォールドへの細胞播種法では困難であった、スキャフォールドの内部に散在した状態で細胞を播種することを可能にした。さらに、組織などへの細胞移植治療への応用の可能性も高く、今後、注射器の改良や、注射器を含めた細胞播種システムとして、適切噴射圧力などの計算、制御ができれば汎用な細胞注入装置となるであろう。

## 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 $\gamma$ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理.

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.

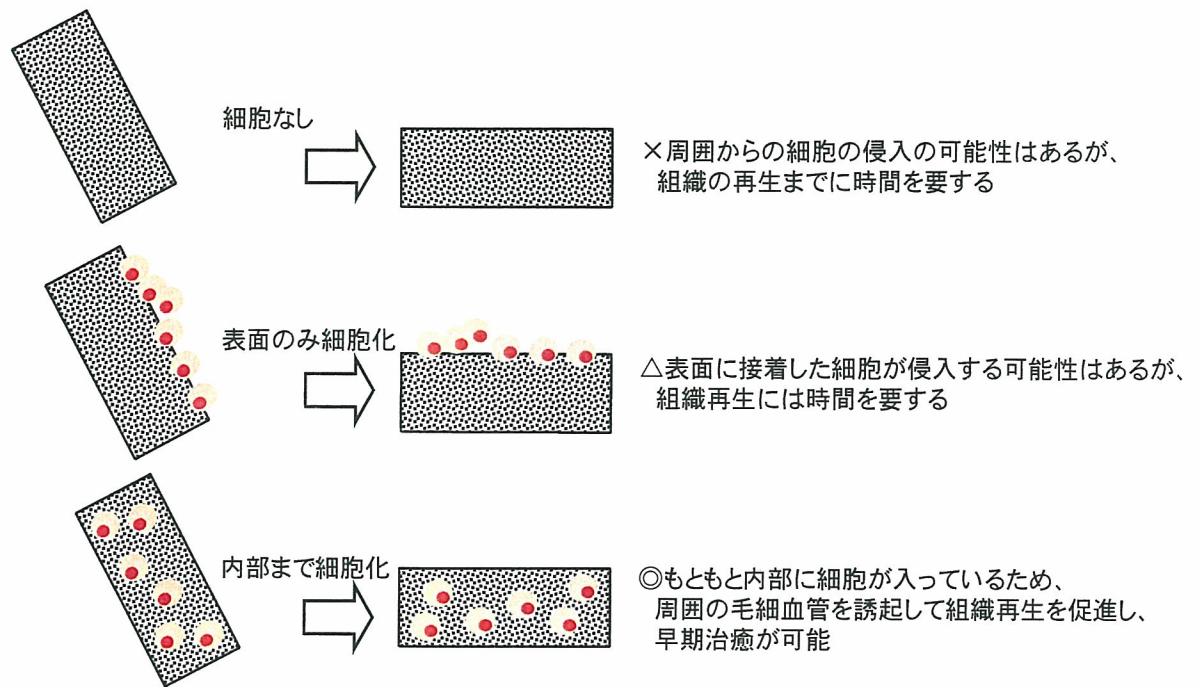


図11. スキャフォールドに細胞を接着させて移植することの利点  
 スキャフォールドの内部まで細胞を接着させて移植することにより、組織再生を促進できる。

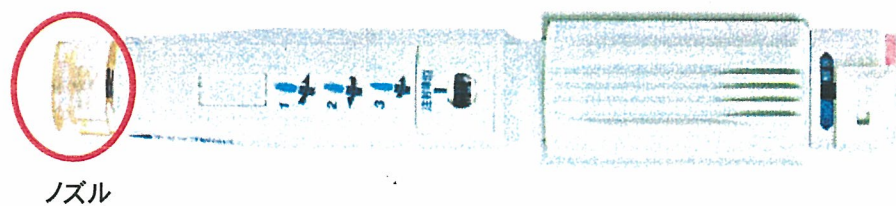


図12. 無針注射器 SHIMAJet®

ノズル内に吸引されたインスリンを本体に組み込まれたバネの圧力で皮下組織内に注入するための注射器で、噴射された薬液は、細かい霧状の液滴となり、放射状に拡散する

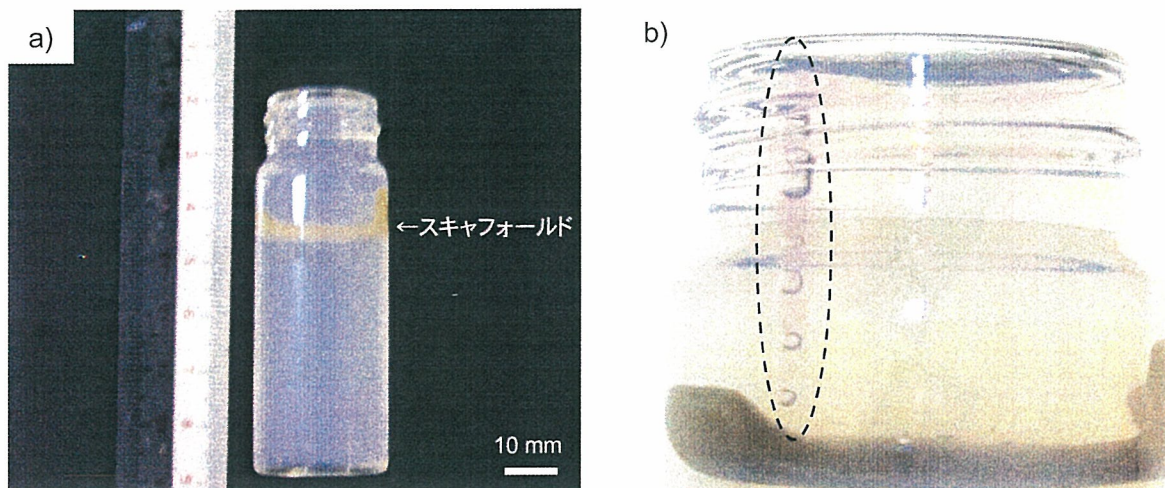


図13. 無針注射器 SHIMAJet の噴射圧力

市販の SHIMAJet では噴射圧力が高すぎるため、スキャフォールドを寒天内に包埋して(a)液体を噴射したところ、寒天の厚みが2 cm のときにスキャフォールドに到達した(b)。

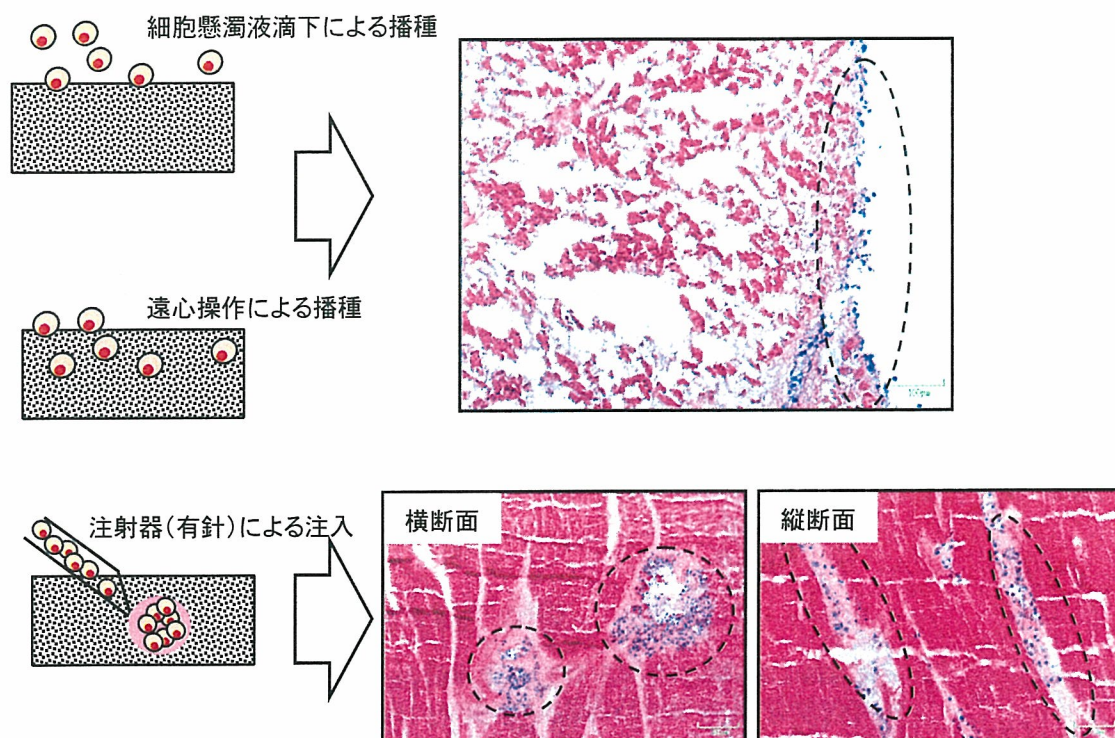


図14. スキャフォールドに細胞を接着させて移植することの利点

細胞懸濁液を滴下したり遠心操作による積極的に播種しても骨格が密なスキャフォールドでは内部まで細胞を接着させることは困難であった(右上)。また注射器を用いて細胞を注入するとスキャフォールド内で細胞塊が形成され、スキャフォールドへの損傷も大きかった(右下)。

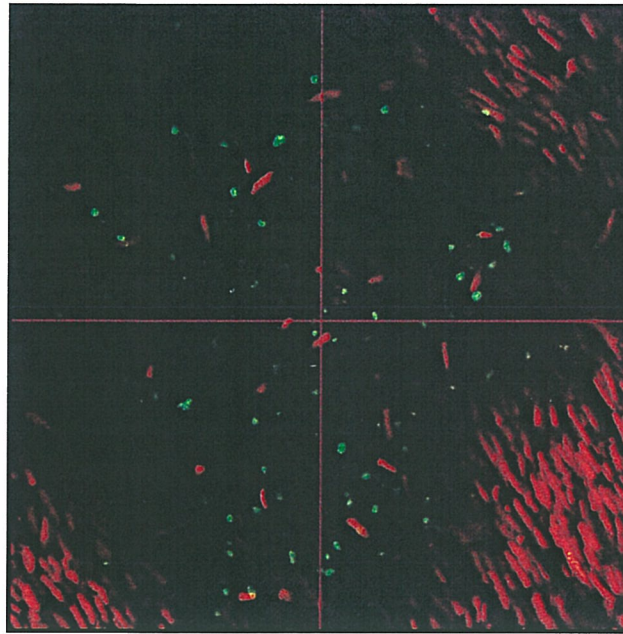


図15. 無針注射器を用いた細胞播種後のスキャフォールド内部観察  
細胞の生死染色を行い、スキャフォールド内部の細胞を観察したところ、緑色に染色された生細胞が多数観察された。また、無針注射器によりスキャフォールド内に細胞を散在させることができることが確認された。(赤く細長く染色された部分はスキャフォールド骨格)

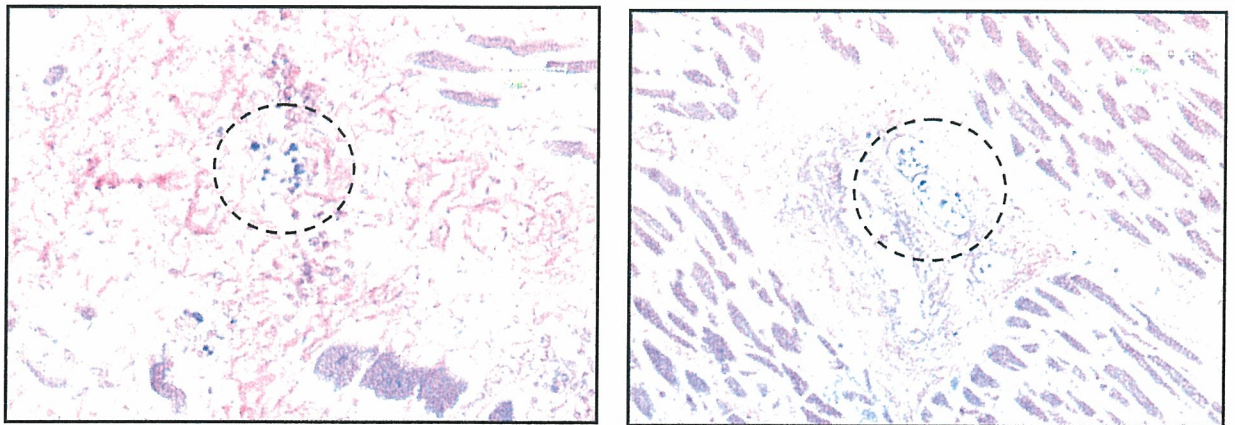


図16. 長期培養後のスキャフォールド内部細胞観察  
厚さ 3 mm のスキャフォールドに細胞を播種し、1 ヶ月培養した後、断続切片を作製して HE 染色を行ったところ、細胞はさまざまな深さに散在して生存していた(写真は深さ 350  $\mu\text{m}$ )。

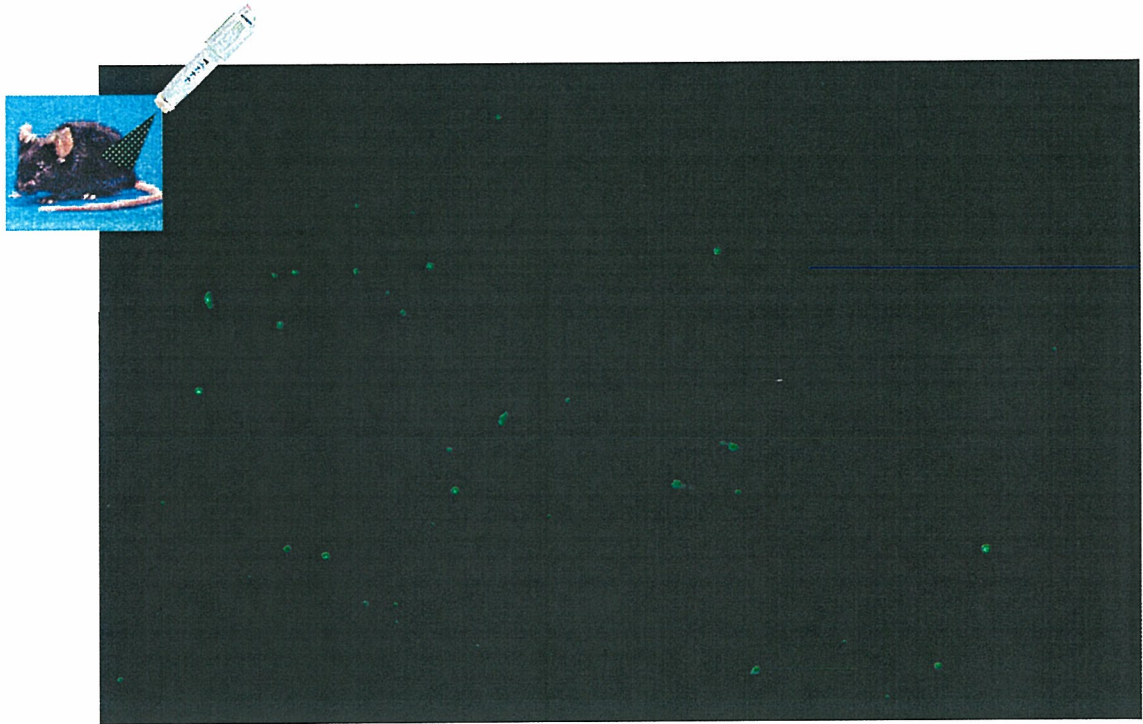


図17. 無針注射器を用いた組織への細胞注入

正常マウスに GFP 遺伝子導入細胞を注射し、24時間後に組織を観察したところ、組織内に緑色に発光する細胞が散在して定着しているのが確認された。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名  | 巻号              | ページ   | 出版年  |
|--|--|---|-----------------|-------|------|
| Ehashi T,<br>Kamata W,<br>Funamoto S,<br>Yoshida K,<br>Kishida A,<br>Nagaya N,<br>Fujisato T | Preparation of a<br>decellularized tissue as a<br>scaffold for<br>reconstructing skeletal<br>muscle in vitro | Tissue Engineering &<br>Regenerative Medicine<br>International Society<br>European Chapter<br>Meeting 2006<br>Abstract Book | —               | 206   | 2006 |
| 江橋 具、<br>鎌田和加子、<br>舩本誠一、<br>吉田謙一、<br>岸田晶夫、<br>中谷武嗣、<br>永谷憲歳、<br>藤里俊哉                         | 脱細胞化筋スキャフォ<br>ールドを用いる筋芽細<br>胞の伸長培養   | 日本人工臓器学会<br>第 44 回日本人工臓器<br>学会大会予稿集   | 第 35 巻<br>第 2 号 | S-131 | 2006 |
| 舩本誠一、<br>江橋 具、<br>菊池正博、<br>小林泰彦、<br>藤里俊哉、<br>山岡哲二、<br>岸田晶夫                                   | Co60 による $\gamma$ 線を用い<br>た生体由来組織の脱細<br>胞化处理   | 日本人工臓器学会<br>第 44 回日本人工臓器<br>学会大会予稿集   | 第 35 巻<br>第 2 号 | S-130 | 2006 |
| 戸川祐一、<br>江橋 具、<br>吉田謙一、<br>藤里俊哉、<br>大場謙吉、<br>中谷武嗣  | バイオリアクターを用<br>いた血管 scaffold への<br>細胞播種   | 第 17 回バイオフロン<br>ティア講演会講演論<br>文集   | No.06-46        | 93-94 | 2006 |
| 江橋 具、<br>鎌田和加子、<br>舩本誠一、<br>吉田謙一、<br>岸田晶夫、<br>中谷武嗣、<br>永谷憲歳、<br>藤里俊哉                         | 再生骨格筋作製を目的<br>とした間葉系幹細胞の<br>伸長培養   | 第 28 回日本バイオマ<br>テリアル学会大会<br>予稿集   | —               | 173   | 2006 |
| 江橋 具、<br>染川将太、<br>藤里俊哉   | 注射器を用いる新規細<br>胞播種法の開発  | ライフサポート学会<br>専門研究会<br>細胞制御工学研究会   | —               | —     | 2007 |

| 発表者氏名   | 論文タイトル名                                     | 発表誌名   | 巻号           | ページ        | 出版年  |
|---|---|--|--------------|------------|------|
| 江橋 具、<br>永谷憲歳、<br>橋本成広、<br>藤里俊哉                                     | 骨格筋再生を目指した<br>骨髄由来間葉系幹細胞<br>の静的伸長培養         | 日本再生医療学会雑<br>誌・再生医療<br>第 6 回日本再生医療<br>学会総会<br>プログラム・抄録 | 第 6 巻<br>増刊号 | 196<br>298 | 2007 |
| 染川将太、<br>江橋 具、<br>森反俊幸、<br>藤里俊哉                                     | スキャフォールドへの<br>新規細胞播種方法の検<br>討               | 日本再生医療学会雑<br>誌・再生医療<br>第 6 回日本再生医療<br>学会総会<br>プログラム・抄録 | 第 6 巻<br>増刊号 | 308        | 2007 |
| 戸川祐一、<br>江橋 具、<br>吉田謙一、<br>船本誠一、<br>西岡 宏、<br>大場謙吉、<br>藤里俊哉、<br>中谷武嗣 | バイオリアクターを用<br>いた脱細胞化 scaffold へ<br>の細胞播種と培養 | 日本再生医療学会雑<br>誌・再生医療<br>第 6 回日本再生医療<br>学会総会<br>プログラム・抄録 | 第 6 巻<br>増刊号 | 204<br>248 | 2007 |
| 高瀬 潤、<br>江橋 具、<br>藤里俊哉、<br>橋本成広                                     | 筋芽細胞に対する磁場<br>の影響                           | 日本再生医療学会雑<br>誌・再生医療<br>第 6 回日本再生医療<br>学会総会<br>プログラム・抄録 | 第 6 巻<br>増刊号 | 297        | 2007 |

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

**Preparation of a decellularized tissue as a scaffold for reconstructing skeletal muscle in vitro**

TE Ehashi<sup>1</sup>, W Kamata<sup>1</sup>, S Funamoto<sup>2</sup>, K Yoshida<sup>3</sup>, A Kishida<sup>2</sup>, N Nagaya<sup>1</sup>, T Fujisato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Cardiovascular Center, OSAKA, Japan

<sup>2</sup>Tokyo Medical & Dental Univ, TOKYO, Japan

<sup>3</sup>Found for Biomed Res & Innovation, KOBE, Japan

The reconstruction of the skeletal muscles has gain special interest recently. The loss of muscle tissue and function is caused of traumatic injuries, tumor resection or muscular dysfunction due to myopathies. These can be treated partly with genetic therapy or transplantation of the native cells or tissues, whereas these therapies have some limitations in restoring the normal function completely. To overcome these limitations, the tissue engineering techniques for reconstructing the skeletal muscle tissues have been studied recently. However, the engineering of skeletal muscle tissue is still challenging due to the complex relationship among muscle cells, micro-vessels and neurons. In this study, the decellularized porcine femoral skeletal muscle tissues were prepared as scaffolds and immature muscle cells were cultured to reconstruct the skeletal muscle tissue in vitro.

The scaffolds were prepared by isostatic ultra-high pressure of 980 MPa at 10°C followed by washing with PBS. Myoblasts were isolated from porcine femoral skeletal muscle tissue by trypsinization, and inoculated in the scaffolds. Cell inoculation was performed by either injecting with collagen gel with needle or centrifugation with medium. To stimulate the cell proliferation and differentiation into the muscle fiber, the scaffolds with cells were stretched up to 110% of original length and relaxed continuously at a frequency of a range from 10 to 100Hz.

The microscopic observation of the decellularized tissue stained with hematoxylin and eosin showed no nucleated cells in the tissue. Furthermore, the amount of DNA in the scaffold dramatically decreased. The mechanical properties of the scaffold were changed in part, but the elastic modulus calculated from the elastic region of its strain-stress curve was almost the same as the native skeletal muscle. The cells cultured both inside and on the surface of the scaffolds in the stretch-and-relax state showed more extended morphologies compared with the cells cultured in the static state.

In conclusion, the skeletal muscle cells that inoculated in and on the decellularized muscle tissue scaffold in the stretch-and-relax condition showed good expansive ability. This culture technique with the decellularized scaffold may have a possibility to reconstruct the skeletal muscle tissue in vitro.

**P85****Differentiation of normal human bronchial epithelial cells from explant-outgrowth culture in bilayer co-culture with human foetal lung fibroblasts**

MI Hermanns, S Fuchs, M Bock, C Pohl, CJ Kirkpatrick  
University of Mainz, MAINZ, Germany

Epithelium-fibroblast interactions have been suggested to play a crucial role in the course of lung epithelial repair and differentiation. To study interactions of lung epithelial cells and fibroblasts, we developed an in vitro co-culture model based on a high-throughput-screening (HTS) 24-well Transwell filter plate. This could be useful for tissue engineering (TE) of upper airways.

After an explant-outgrowth culture of epithelial cells from small bronchi (diameter < 5mm) pure populations of primary isolated normal human bronchial epithelial cells (NHBE) were used to study interactions with a normal human foetal lung fibroblast cell line (Wi-38). To constitute a differentiated phenotype, the epithelial cells were cultivated on an extracellular matrix (collagen type I) and maintained at an air-liquid interface (ALI). Therefore the cells were grown in contact with air by feeding basolaterally with medium. Normal human bronchial epithelial cells were cultured alone, on a permeable filter over fibroblasts, and in bilayer co-culture with fibroblasts. Barrier properties and morphological phenotype were compared for the different culture conditions.

On 24-well Transwell filter plates at the air-liquid interface the NHBE formed confluent layers, expressing the tight junction (TJ) proteins occludin and ZO-1 in continuous circumferential patterns suggestive of functional TJs. This interpretation was supported by the development of a corresponding transepithelial electrical resistance (TER). Maximum TER-values that averaged  $1000 \pm 223 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$  were found after 14 to 20 days and persisted for up to 28 days in bilayer co-culture with Wi-38. Furthermore, mucus production and cilia formation reappeared in NHBE dependent on the individual donors after 21 to 28 days at ALI in bilayer co-culture. In monoculture or exposed to fibroblast supernatants (growth on permeable filter over Wi-38) the NHBE were less differentiated. These results suggest that fibroblast-secreted factors and air-liquid interface culture promote epithelial growth and differentiation.

In summary, human bronchial epithelial cells from explant-outgrowth culture of small bronchi grown in co-culture with the foetal lung fibroblast cell line Wi-38 at the air-liquid interface mimic the structure of native polarized bronchiolar epithelium. This model could be useful to study cell interactions with suitable biomaterials for TE of the proximal airways.

再生医療・マトリックス

G-115 コバルト60による $\gamma$ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理

東京医科歯科大学生体材料工学研究所<sup>1)</sup>, 国立循環器病センター<sup>2)</sup>, 日本原子力研究開発機構<sup>3)</sup>

船本 誠一<sup>1)</sup>, 江橋 具<sup>2)</sup>, 菊池 正博<sup>3)</sup>, 小林 泰彦<sup>3)</sup>, 山岡 哲二<sup>2)</sup>, 岸田 晶夫<sup>1)</sup>, 藤里 俊哉<sup>2)</sup>, 中谷 武嗣<sup>2)</sup>

【緒言】我々は、ミニブタ心臓弁や血管、心膜、気管、軟骨等組織から細胞及びウイルス等のドナー由来成分を除去した脱細胞化組織の開発を行ってきた。脱細胞化組織は、臨床で不足している移植用組織や、テーラーメイド型医療において幹細胞等の患者由来細胞を組み込むための生体スキャフォールドとしての利用が考えられる。これまで、独自技術として超高圧印加処理を用いた脱細胞化方法について報告を行ってきた。超高圧処理技術が食品加工技術である一方、食品保存に使用されている $\gamma$ 線照射は、線量により組織破壊を伴わない滅菌やウイルスの破壊も行うことができる。そこで細胞への傷害も期待できるものとして、 $\gamma$ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理を検討した。【実験方法】脱細胞化処理方法は、脱細胞化組織として摘出してきた食用ブタあるいはミニブタ大動脈をPBSに浸漬し、10 Gyから1000 Gyの範囲で $\gamma$ 線を照射した。続けて、PBSをベースとする洗浄液にて2週間洗浄した。照射直後と洗浄後の処理組織をHE染色で観察するとともに、組織内残留DNA量の測定を行った。また、照射線量による組織の力学特性への影響を、力学試験機を用いて調べた。さらに、処理後の脱細胞化組織をラット皮下に移植し、2週間後に取り出してHE染色やCD68抗体を用いた免疫染色により組織学的に検討した。【結果・考察】HE染色の結果、 $\gamma$ 線未照射の組織では洗浄後も組織内に核の残存が見られたが、組織の $\gamma$ 線照射線量が増えるにつれて組織内の核の数が減少していた。組織内残留DNA量も、100 Gy以上では大幅に減少する傾向が見られた。また、 $\gamma$ 線を用いた脱細胞化組織の力学特性には変化は見られなかった。さらに、移植後2週間の組織のCD68染色の結果、未処理組織では組織内部にCD68陽性細胞が多く見られたのに対し、脱細胞化組織においてはCD68陽性細胞が減少しており特に300 Gyと1000 Gyのものでは組織内部の炎症が大幅に抑制されていた。これらのことからコバルト60による $\gamma$ 線を用いた脱細胞化処理方法は生体スキャフォールド作製に有効であると示唆された。

G-116 生体内に酷似したバイオリアクターシステムによる強度のある3層血管の創生

Laboratory for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School<sup>1)</sup>, 早稲田大学生命医療工学研究所<sup>2)</sup>, 早稲田大学大学院生命理工学専攻<sup>3)</sup>

岩崎 清隆<sup>1), 2)</sup>, 小島 宏司<sup>1)</sup>, 小玉 正太<sup>1)</sup>, Paz Christina<sup>1)</sup>, 梅津 光生<sup>3)</sup>, Vacanti Charles<sup>1)</sup>

【緒言】血管のTissue Engineeringについては世界的に多くの研究がなされているが、動脈系に長期耐えうる臨床用組織工学血管は開発されていない。我々は、生体内と酷似した血圧・血流及びpHや炭酸ガス濃度を調整可能な生理的拍動バイオリアクターシステムを開発し、細胞、分解吸収性高分子、及びバイオリアクターを駆使し、冠動脈バイパスやシャント用等に応用可能な血管の創生を目指している。【方法】ウシ動脈血管から内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞をそれぞれ採取・初代培養した。Non-wovenポリグリコール酸及びポリ $\epsilon$ カプロラクトンの平面状分解吸収性高分子に平滑筋細胞を播種して2日～1週間の平面培養後、外径6mmのチューブに巻き付けさらに2～4週間振盪培養した。その後、線維芽細胞を播種して2日間培養した平面状ポリグリコール酸を外側に巻き付けチューブからはずして血管マウントチャンバに取り付け、内腔に血管内皮細胞混濁培養液を注入し12時間インキュベータで静置した。そして、開発した拍動バイオリアクターシステムに組み込み、1週間～19日間、pH7.4、炭酸ガス濃度5%、拍動数70BPM、平均圧力20, 70, 100mmHgで脈圧が $\pm 20$ mmHg程度、流量0.4～0.6L/minのような生体代替環境で拍動培養を行った。【結果及び考察】創った血管を走査型電子顕微鏡で観察した結果、全内腔が内皮細胞で覆われていた。また、組織染色像から、平滑筋細胞層が観察され、3層血管が創生できていることが明らかとなった。また引張試験を行った結果、足場の分解性高分子のみでは血管とは異なる応力-ひずみ特性であったが、バイオリアクターを使って創ったEngineered血管はすべて本来の血管と同様の応力-ひずみ特性へ変化することが判明した。さらに、19日間動脈環境で拍動培養した血管の弾性率及び破断強度はウシの動脈血管とほぼ同程度の強度特性を有するまで上がることが明らかとなった。【結語】生理的圧力、流量、pH及び炭酸ガス濃度の環境下で拍動培養可能なバイオリアクターシステムを駆使し、動脈血管と同程度の機械的特性を有する3層血管をin vitroで創生することに成功した。今後、動物実験により、長期耐久性を検討していく。

G-117 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

国立循環器病センター研究所再生医療部<sup>1)</sup>, 東京医科歯科大学<sup>2)</sup>, 先端医療振興財団<sup>3)</sup>, 国立循環器病センター臓器移植部<sup>4)</sup>

江橋 具<sup>1)</sup>, 鎌田 和加子<sup>1)</sup>, 船本 誠一<sup>2)</sup>, 吉田 謙一<sup>3)</sup>, 岸田 晶夫<sup>2)</sup>, 中谷 武嗣<sup>4)</sup>, 永谷 憲歳<sup>1)</sup>, 藤里 俊哉<sup>1)</sup>

【緒言】腫瘍切除や事故による組織の損失や、筋ジストロフィー症などの筋疾患による、筋組織の退縮・機能低下に対する外科的治療として、患者自身の健常組織の移植や細胞移植などが行われている。しかし、これらの治療法を用いても筋組織機能の完全な回復は困難で、患者のQOLも著しく低下する。そこで本研究は、移植用の筋組織を生体外で再構築することを目的として、脱細胞化筋スキャフォールドを用いた再生型筋組織の作製の基礎的検討を行った。【実験方法】組織構築のための細胞の足場となる脱細胞化筋スキャフォールドは、食用ブタの骨格筋組織から、超高静水圧印加法を含む脱細胞化処理により作製した。細胞は、未成熟筋細胞である筋芽細胞あるいは骨髄由来間葉系幹細胞を用い、これらの細胞を、遠心操作や注射器を用いた方法で脱細胞化筋スキャフォールドに播種したのち、三次元培養を行った。このとき、通常の静置培養に加えて、細胞を播種したスキャフォールドを伸展培養装置に装着し、全体を20%まで伸長させる、あるいは伸長-弛緩を繰り返す培養を行い、三次元培養やスキャフォールドの伸長が、細胞の増殖や筋細胞への分化に及ぼす影響について検討した。【結果と考察】作製した脱細胞化筋スキャフォールドの組織学的観察とDNA量の計測から、スキャフォールド内の細胞核は完全に脱化されていることが確認された。脱細胞化筋スキャフォールドへの細胞の播種では、遠心操作や注射器を用いるいずれの方法でも、細胞をスキャフォールド内部にまで播種することができた。細胞播種後24時間静置して細胞を接着させたのち、スキャフォールドを伸長のみ、あるいは伸長-弛緩を一定周期で繰り返す培養を3日間行った結果、細胞の形態は通常の静置培養を行った場合よりも、伸長方向に細長く伸展していたことから、増殖や分化活性が高まる可能性が考えられた。以上の結果から、脱細胞化筋スキャフォールドを用いる筋芽細胞の伸長あるいは伸長-弛緩培養により未成熟な細胞を増殖・分化させて、生体外における再生型筋組織構築の可能性が示唆された。

G-118 組織再生用スキャフォールドのための生分解性薄膜からなる人工毛細血管デバイスの開発

名古屋大学大学院工学研究科

池内 真志, 生田 幸士

【目的】生体外で厚い組織を再生するには、スキャフォールド内部の微小循環が不可欠である。この問題に対し、我々は「人工毛細血管デバイス」を用いた新たなスキャフォールド構造を提案している。人工毛細血管デバイスとは、生分解性樹脂の薄膜で作製されたシート状の微小流路ネットワークである。流路壁の厚さは数 $\mu\text{m}$ で、表面には多数の $1\mu\text{m}$ オーダーの微細孔を有する。そのため、細胞は流路壁面に保持されるが、ガスや培地成分は流路内外を透過できる。この人工毛細血管デバイスと、細胞の層を交互に重ねることにより、スキャフォールド内部の微小循環系を構築し、従来、不可能であった厚い組織を再生することを目指している。本研究では、新たに開発した微細加工法を用いて、人工毛細血管デバイスを作製し、その機能を検証した。

【方法及び結果】人工毛細血管デバイスを作製するために、新原理の微細加工法MeME(Membrane Micro Embossing)を開発した。この手法では、薄膜からなる自由な立体構造を数 $\mu\text{m}$ の分解能で作製することができる。デバイスの材料として、直径 $1\mu\text{m}$ 程度の微細孔を有する多孔質ポリ乳酸薄膜(厚さ $5\mu\text{m}$ )を相分離法により作製した。MeME法を用いて、この多孔質ポリ乳酸薄膜からなる、内径 $50\mu\text{m}$ の微小流路のネットワークを作製することに成功した。流路壁の透過性を検証するため、直径 $0.1\sim 15\mu\text{m}$ のビーズの懸濁液を流路外側から滴下した。その結果、 $1\mu\text{m}$ 以下の粒子は流路壁を透過し、それ以上の直径を持つ粒子は、流路壁の表面で保持されることを確認した。これは、流路壁上に細胞が保持され、かつ、培地成分は流路壁を透過することを示している。さらに、この流路表面をコラーゲンで修飾した後、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を培養した結果、一般的な培養容器と同等の細胞密度と増殖率を得た。

【結論】本研究では、新原理のMeME法を用いて、人工毛細血管デバイスの作製が可能であることを示した。さらに、作製したデバイスが、スキャフォールド内の微小循環系に求められるサイズ選択的透過性と細胞培養適合性を有することを実証した。今後、この人工毛細血管デバイスを積層し、厚い組織の培養への有効性を検証する。

## A208 バイオリアクターを用いた血管 scaffold への細胞播種

### Cell seeding onto vessel scaffold using bioreactor

○学 戸川 祐一 (関西大), 江橋 具 (国立循環器病センター),  
吉田 謙一 (先端医療振興財団), 藤里 俊哉 (国立循環器病センター),  
正 大場 謙吉 (関西大), 中谷 武嗣 (国立循環器病センター)

Yuichi TOGAWA, Kansai University, 3-3-35, Yamate-cho, Suita-shi, Osaka

Tomo EHASHI, National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka

Ken'ichi YOSHIDA, Foundation for Biomedical Research and Innovation, 2-2, Minatojima Minamimachi  
Chuo-ku, Kobe, Hyogo

Toshia FUJISATO, National Cardiovascular Center, Kenkichi OBA, Kansai University,

Takeshi NAKATANI, National Cardiovascular Center

#### 1. 緒言

心停止者から提供された凍結保存心臓弁は、機械弁に比べ抗血栓性で、異種生体弁に比べ耐久性で、さらに両者に比べて抗感染性で長所を持っているとされる。しかしながら、特に若年者に用いた同種弁は、導管部分の狭窄や石灰化を特徴とする変化によって、比較的早く機能不全を起こすことも報告されている。そこで、我々は凍結保存同種弁から提供者由来の細胞成分や抗原性部位を除去し、コラーゲン線維や弾性繊維、基底膜などの構造マトリックスのみを用いた再生医療用心臓弁組織の開発を行っている。この心臓弁組織へレシピエントの自己細胞を組み込むことで、自己修復能や成長性を有する組織工学弁が創製できると期待できる。本報告では、弁組織に比べ、構造が単純である脱細胞化血管 scaffold への血管内皮細胞の播種について検討するとともに、循環型バイオリアクターによる培養についても検討した。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 脱細胞化 scaffold

クラウン系ミニニブタ (ジャパンファーム) から大動脈を摘出し、超高静水圧印加処理 (神戸製鋼) を行い、生理食塩水ベースの洗浄液処理にてドナー細胞を除去した組織を scaffold として用いた。

##### 2.2 細胞培養

本実験ではヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。培養には EBM (Endothelial Cell Basal Medium-2) に 2 % FBS および添加因子を加えた培養液を用いた。

##### 2.3 血管 scaffold への細胞播種・培養

アクリルで作製したモジュール内に細胞懸濁液と血管 scaffold を入れ密閉し、図 1 に示した回転型バイオリアクターを用いて、4 時間、縦回転と横回転を同時に行うことで HUVEC を血管 scaffold 表面に播種した。その後、細胞を播種した scaffold を、ガス交換能を有するカルチャーバッグに入れ、1 日間静置状態で培養し、さらに図 2 に示す閉鎖回路を用いた循環型バイオリアクターで培養を継続した。この時、scaffold を二つに切り、循環培養と静置培

養の 2 種類の培養方法の比較をおこなった。循環型バイオリアクターはローラーポンプを使用しており、流速は  $9.95 \times 10^{-3}$  [m/s]、培地量は 300 ml で実験を行った。

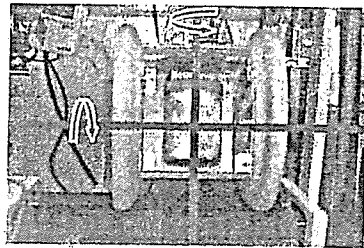


Figure 1. Image of Rotating bioreactor.

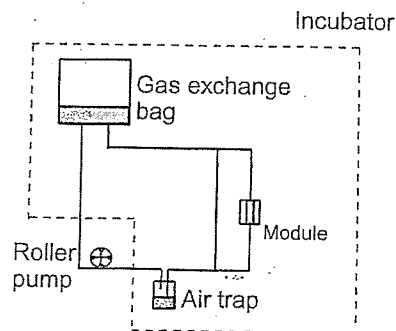


Figure 2. Schematic diagram of Circulation bioreactor.

##### 2.4 評価方法

血管 scaffold 表面の細胞をトルイジンブルー染色し、実体顕微鏡で観察した。

Calcein-AM と PI (Propidium Iodide) で生細胞と死細胞を同時に染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて血管 scaffold 表面の細胞が生存しているかの確認を行った。

### 3. 結果と考察

図3に1日間静置培養した後の血管 scaffold 内壁表面のトルイジンブルー染色画像を示す。HUVEC を播種した血管 scaffold を1日間静置培養することで、血管 scaffold 内壁に HUVEC を付着させることができた。

図4は静置培養1日間、循環培養2日間行ったトルイジンブルー染色画像で、図5は静置培養3日間行ったトルイジンブルー染色画像である。循環培養したもの、静置培養しか行わなかったもの、共に Scaffold 表面が HUVEC により、しっかりと覆われていることが分かる。また、図6、7は Calcein-AM と PI (Propidium Iodide) で生細胞と死細胞を同時に染色した画像で、図6は静置培養1日間、循環培養2日間行ったもの、図7は静置培養3日間行ったものである。図6と図7を比較すると、循環培養2日間行ったものは若干ではあるが、静置培養よりも HUVEC が伸展しているように見える。これは培地を循環させることにより生じた流れにより細胞に剪断応力がかかり、HUVEC が伸展したと考えられる。今後、長期間の培養を行い、剪断応力による内皮細胞の形態変化等についてさらに検討を進めていくことを考えている。

### 4 結論

超高静水圧印加処理と洗浄液による洗浄で脱細胞化した scaffold に HUVEC を播種・培養することができた。さらに循環型バイオリアクターを用いて、HUVEC に剪断応力を与えながら2日間培養すると、HUVEC に伸展が見られた。

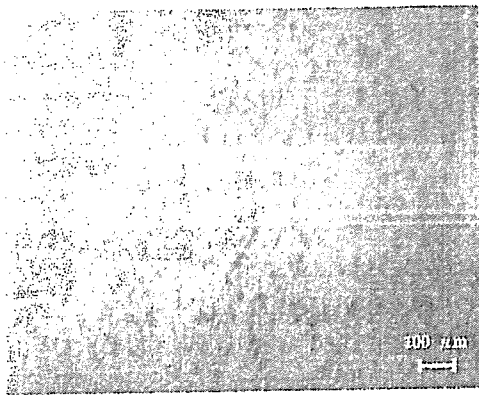


Figure 3. The inner surface of acellular aorta after static culture.

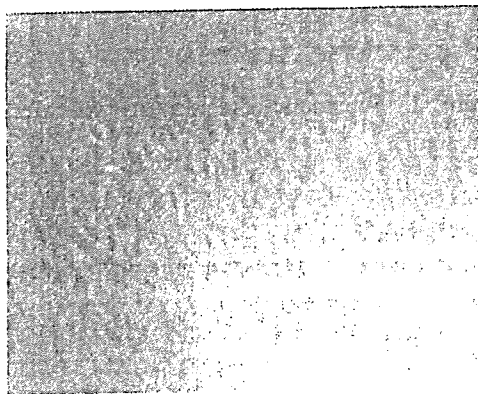


Figure 4. The inner surface of acellular aorta after 2days circulation culture.

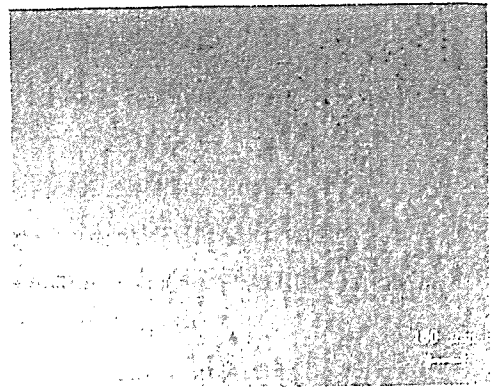


Figure 5. The inner surface of acellular aorta after 3days static culture.

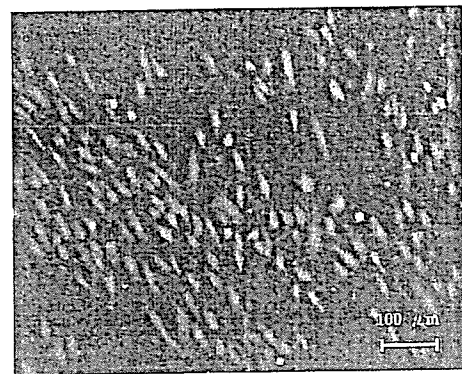


Figure 6. Confocal laser scanning microscopy of the inner surface of acellular aorta after 2days circulation culture.

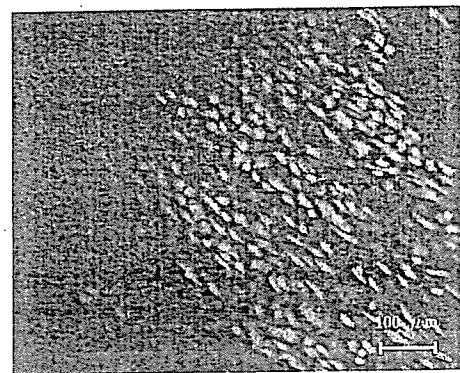


Figure 7. Confocal laser scanning microscopy of the inner surface of acellular aorta after 3days static culture.



## 再生骨格筋作製を目的とした間葉系幹細胞の伸長培養

○江橋 具<sup>1</sup>, 鎌田和加子<sup>1</sup>, 船本誠一<sup>2</sup>, 吉田謙一<sup>3</sup>,  
岸田晶夫<sup>2</sup>, 永谷憲歳<sup>1</sup>, 中谷武嗣<sup>4</sup>, 藤里俊哉<sup>1</sup>

1; 国立循環器病センター研究所 再生医療部

2; 東京医科歯科大学, 3; 先端医療振興財団

4; 国立循環器病センター 臓器移植部

## 1. 緒言

腫瘍切除や事故などによる筋組織の損失部分の補填、あるいは筋ジストロフィー症などの筋疾患を治療するために、自家筋組織の移植や細胞移植が行われている。しかし、これらの移植による治療法は、患者自身の筋組織から採取するために、患者の QOL の著しい低下が伴う。また、細胞移植では細胞の患者組織内への生着率が低いために効率が悪いことや、近年、心筋の治療などに盛ん研究されている細胞シートでも、大きく厚みのある筋組織を補填するには限界があると考えられる。

そこで本研究は筋組織治療用筋移植片を生体外にて作製することを目的として、骨髄由来間葉系幹細胞の、脱細胞化筋スキャフォールドを用いた三次元培養を行い、このとき細胞に伸長刺激を与えることによる、細胞の増殖や分化への影響について調べた。

## 2. 実験

三次元培養のための細胞の足場となるスキャフォールドは、ミニブタ大腿部骨格筋から作製した。骨格筋は 20 x 10 x 3 mm に薄切したのち、超高静水圧印加処理 (980 MPa, 10 min) と洗浄工程により脱細胞化して、スキャフォールドとした。細胞は、ラット骨髄から取得した間葉系幹細胞を単層培養して増幅させたものを剥離し、遠心操作 (100 x g, 1 min, 6 times) によりスキャフォールドに播種した。細胞播種後 3 日間の静置培養を行うことにより細胞をスキャフォールドに生着させてからスキャフォールドを伸長させた伸長培養と、対照として通常のディッシュによる単層培養、スキャフォールドによる三次元培養で伸長刺激を行わない静置培養を行った。培養 2 週間後の細胞の形態観察や筋細胞の分化マーカーの発現を調べることにより、三次元培養や伸長刺激が、間葉系幹細胞の増殖や分化に及ぼす影響について検討した。

## 3. 結果と考察

超高静水圧印加処理により作製した脱細胞化筋スキャフォールドは、HE 染色による形態学的観察や DNA 量の測定により、良好に脱核されているのが確認された。遠心操作による細胞の播種後 1 日の HE 染色から、細胞はスキャフォールド内の筋細胞であった部分よりも、結合組織などが存在していたと考えられる部分に侵入し、スキャフォールド表面から 100 μm 付近の深い部分にも存在していることがわかった。静置培養 3 日間の細胞生着期間後、伸長培養と、対照としての静置培養を行ったところ、そのまま静置培養を継続した場合は細胞がスキャフォールド骨格の中で丸い形状のまま存在していたものの、3 日間伸長培養をした後には伸長方向と平行な方向に細胞が伸展しているのが観察された。

これらの結果から、スキャフォールドを用いる三次元培養において伸長刺激が、間葉系幹細胞の分化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

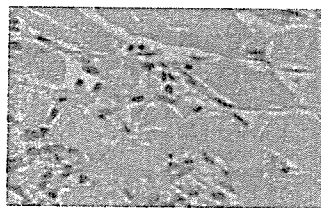


Fig. MSCs inoculated in decellularized muscle scaffold showed extended shapes after three days of elongation culture.

## Elongation culture of MSCs for skeletal muscle regeneration in vitro

Tomo EHASHI, Wakako KAMATA, Seiichi FUNAMOTO, Ken'ichi YOSHIDA, Akio KISHIDA,

Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, Toshia FUJISATO

Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering

National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka

Tel: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496, E-mail: ehashi@ri.ncvc.go.jp

# 注射器を用いる新規細胞播種法の開発

国立循環器病センター 研究所 再生医療部

○江橋 具、染川将太、藤里俊哉

## 【緒言】

近年、再生医療の技術を用いた治療法として、細胞を三次元的なスキャフォールドに播種して移植する、あるいは細胞を直接組織に注入する方法が検討されている。例えば、心筋梗塞による心筋傷害部位に、ゲルに細胞を懸濁してパッチ状に貼り付ける方法や、患者の細胞をカテーテルを用いることにより直接筋組織内部に移植する方法が報告されている。われわれはこれまでに、心筋梗塞などの心筋機能低下を治療するためのスキャフォールドとして、脱細胞化筋組織の利用について検討してきた。しかし、脱細胞化心筋組織は組織間隙が小さく密な構造を保持していたため、通常の方法で細胞を播種することが困難であった。

そこで本研究は、脱細胞化心筋組織や生体組織のように空隙率の低いスキャフォールド・組織へ細胞を分散させて播種することが可能で、担体や組織への損傷を最小限に抑えることが可能となる、新規細胞播種法の開発を目的とした。

## 【実験方法】

細胞を播種するスキャフォールドとして、超高静水圧印加処理により脱細胞化したブタ心筋組織を用いた。細胞播種には ShimaJET (U-100 インスリン自己注射用 針無圧力注射器; 島津製作所, 京都) を、また対照として通常の注射針を用いる注射器を使用した。

培養皿から剥離した線維芽細胞を培地に懸濁したのち、ShimaJET の通常的使用方法に従って針無注射器のノズルに充填し、スキャフォールドに細胞を注射した。細胞を播種したスキャフォールドは、培養皿に移して培地を添加し、1 日間培養した後、スキャフォールド内部の細胞の生死を共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。

## 【結果と考察】

通常の針を用いる注射器により細胞をスキャフォールドに播種したところ、スキャフォールド内部で細胞懸濁液が液溜まりを形成し、細胞をスキャフォールド内に分散させて播種することは困難であった。また、注射針が通過することによるスキャフォールドの損傷が確認された。一方、針無注射器を用いた場合は、注射器の圧力による細胞への傷害も少なく、播種してからもスキャフォールド内で良好に生存していることが確認された。また、針を使った場合とは異なり、スキャフォールドのさまざまな深さに、個々の細胞が分散して播種されたことがわかった。

以上の結果から、本研究で用いた針無注射器による細胞播種法は、細胞への傷害を引き起こすことなく、三次元的なスキャフォールドの内部に分散して細胞を播種することが可能となった。この手法は、生体組織への直接細胞注入にも応用できる可能性があり、今後、既存の細胞播種・注入法よりも簡便な手法として利用できることが期待できる。

O-10-2 ラット骨格筋筋芽細胞から収縮する筋繊維  
P-372 をつくる -電気刺激の分化促進効果-

河原 裕美<sup>1</sup>, 山岡 薫<sup>2</sup>, 梅田 知佳<sup>1</sup>, 吉元 玲子<sup>1</sup>,  
佐々木 輝<sup>1</sup>, 呉 樹亮<sup>1</sup>, 新田 純子<sup>1</sup>, 真鍋 朋誉<sup>1</sup>,  
岩田 全広<sup>1</sup>, 梶梅 輝之<sup>2</sup>, 弓削 類<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大学大学院保健学研究科, <sup>2</sup>広島大学大学院医歯薬学総合  
研究科

【目的】培養筋芽細胞に電気刺激を行い, 形態学的, 分子生物  
学的手法を使って筋芽細胞の分化に与える影響を検討した。

【方法】培養細胞は, ラット骨格筋由来の筋芽細胞 L6 株 (IFO  
50364) を用いた。実験群は, 電気刺激を行った電気刺激群と正  
常培養した対照群の 2 群に分けた。電気刺激の条件は, 矩形波,  
刺激頻度 0.5 pulse/sec, 持続時間 2.0msec, 電圧 50 V, 刺激  
時間 5 分/日とした。電気刺激群は, 培養開始日から 6, 8, 10,  
12 日後に電気刺激を行い, その後は刺激を施行せず培養を続けた。

【結果】電気刺激群では, 培養 10 日後と 12 日後の筋管細胞数  
が対照群と比べ有意に多く, 太い筋管細胞が出現した。さらに,  
培養 18 日後には横紋構造を持った筋線維が自動収縮を始めた。  
収縮中の培養筋線維の膜電位を計測すると, 静止電位の低下と  
活動電位に近い波形が観察された。筋の分化マーカーのタンパ  
ク質発現をみると, 電気刺激群では, 筋の分化・成熟に関与する m  
yogenin, Myf-6, M-cadherin の発現が強かった。また, 電気  
刺激群では, connexin43 の強い発現が持続した。【考察】本研  
究で使用した筋芽細胞 (L6) は, 通常の培養条件では筋管細胞  
までしか分化しない。電気刺激を加えることで筋管細胞が成熟  
するだけでなく, 横紋構造を持った筋線維が出現し, 自動収縮し  
たことは注目すべき点である。電気刺激という物理的的刺激のみで  
筋細胞の分化・成熟をコントロールできる可能性が示唆された。

O-11-1 リコンビナント細胞外マトリックスタンパ  
P-002 ク質を用いたカニクイザル ES 細胞の未分化  
維持培養

佐藤 秀樹<sup>1</sup>, 末盛 博文<sup>2</sup>, 戸口田 淳也<sup>3</sup>,  
岩田 博夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学再生医科学研究科組織修復材料学分野, <sup>2</sup>京都大学再  
生医科学研究科所長類胚性幹細胞研究領域, <sup>3</sup>京都大学再生医  
科学研究科組織再生応用分野

ヒト ES 細胞の樹立、未分化維持培養にはマウス胎児線維芽細胞  
がフィーダー細胞として使用されてきた。しかし、ヒト ES 細胞の  
臨床応用を考えると、マウス由来の病原体によりヒト ES 細胞が  
汚染される危険性のない培養法の確立が望まれている。そこで最  
近、フィーダー細胞フリーの条件下で完全合成培地を用いて、ヒ  
ト ES 細胞の樹立、培養が行われた。しかし、この培養方法では  
ヒト ES 細胞はヒト由来の細胞外マトリックスタンパク質でコート  
された培養基材上で培養されているため、ヒト ES 細胞がヒト由来  
の病原体に汚染される可能性は否定できない。そこで本研究では、  
大腸菌により発現されたリコンビナント細胞外マトリックスタン  
パク質と不死化ヒト間葉系幹細胞の順化培養液を用いて、ヒト ES  
細胞と共通点の多いカニクイザル ES 細胞の未分化維持培養を試  
みた。この培養条件下で 20 回以上の継代を行った ES 細胞につ  
いて幹細胞マーカーの発現を免疫染色と RT-PCR で解析したところ、  
SSEA4, Oct3/4, Nanog 陽性であった。また、この ES 細胞を  
ヌードマウスの皮下に移植し、8 週間後に形成されたテラトーマは  
三胚葉の組織を含んでいた。これらの結果はマウス由来のフィー  
ダー細胞やヒト由来の細胞外マトリックスタンパク質を使用せずに、  
カニクイザル ES 細胞を長期培養することができたことを示すもの  
であり、ES 細胞の臨床応用への期待を持たせる結果である。

O-10-3 骨格筋再生を目指した骨髄由来間葉系幹細  
P-374 胞の静的伸長培養

江橋 具<sup>1</sup>, 永谷 憲哉<sup>1</sup>, 橋本 成広<sup>2</sup>, 藤里 俊哉<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>国立循環器病センター研究所再生医療部, <sup>2</sup>大阪工業大学

【目的】腫瘍の摘出などによる組織欠損部位の補填のために、  
患者の別の部位から組織を移植する治療が行われている。しか  
しこの場合、健康組織を摘出することによる患者の QOL の低  
下は著しい。また、糖尿病などが原因の大規模な組織の壊死に  
対して、現在のところ切除以外の有力な治療法がない。そこで  
本研究では、これらの治療に用いるための移植用組織を作製す  
ることを目的とした、脱細胞化筋スキャフォールドを用いる骨  
髄由来間葉系幹細胞の培養を行った。間葉系幹細胞は、通常試  
薬により筋細胞へと分化誘導されることが知られているが、本  
研究では細胞に静的伸長刺激を与えることによる細胞の分化へ  
の影響を調べた。

【実験】ラット骨髄由来間葉系幹細胞を分離・培養し、超高静  
水圧印加処理を用いて作製した脱細胞化筋スキャフォールドに  
播種して、培養を行った。培養条件として、通常のディッシュ  
による培養と、スキャフォールドを用いる三次元培養を行い、  
三次元培養ではさらに伸長刺激を与える群と刺激を与えないコ  
ントロール群の三通りを設定した。これらの細胞の筋細胞分化  
マーカーとなる mRNA の発現量を経時的に測定するととも  
に、細胞の形態を観察した。

【結果と考察】スキャフォールドを用いた静的伸長刺激では、  
刺激開始から 3 日目においてほとんどの細胞が伸長方向に細長  
く伸びた形態を示したことから、伸長刺激により間葉系幹細胞  
が筋細胞へと分化している可能性が示唆された。

O-11-2 カニクイザル ES 細胞からの無フィーダー培  
P-010 養条件下における継代培養可能な血管内皮  
細胞への分化誘導

中村 直子, 過足 芳子, 佐伯 久美子, 中原 正子,  
佐伯 晃一, 松山 さと子, 湯尾 明

国立国際医療センター研究所血液疾患研究部

血管はほぼ全ての臓器に存在し、生体は血管を通して栄養や空  
気の交換を行うため不可欠な組織である。すなわち再生医療の  
場において、血管を構成する主要素である血管内皮細胞の作製  
は重要な課題となっている。我々は今回、無血清培養下カニク  
イザル ES 細胞から無フィーダー培養条件下で継代可能な血管  
内皮細胞を高効率に分化誘導する新しい系を確立した。カニク  
イザル ES 細胞から特定のサイトカイン存在下でハンギングド  
ロップ法により胚様体様細胞凝集塊を形成し、ゼラチンコート  
皿で接着培養した。接着した細胞から嚢状構造物が出現し、内  
部に cobblestone 様細胞が充満した。これらの細胞はコロニー  
アッセイ及び、特殊染色の結果から、骨髄芽球とマクロファ  
ージからなる血球集団と結論された。一方の嚢状構造物とその周  
辺に広がる接着細胞は western blot 法、免疫染色、FACS 解  
析により、VE-cadherin 発現が認められた。特に FACS 解析  
では、VE-cadherin と PECAM1 が同時に発現する細胞が 10-  
40% 存在しており、従来の報告 (<2%) より高効率であった。  
またこれらの細胞はコード形成陽性であり、Ac-LDL の取り込  
み、vWF, eNOS タンパクの発現はほぼ全ての細胞で認められ  
た。これらの性質は 8 回の継代培養、凍結融解後にも保持され  
ていた。現在、ES 由来内皮細胞の in vivo での機能につき解  
析中である。

P-371 ラット筋芽細胞の採取における週齢の及ぼす影響についての検討

才原 良子, 真家 未紀, 瓜田 泰久, 金子 節子, 金子 道夫, 小室 広昭  
筑波大学大学院人間総合科学研究科小児外科

【はじめに】筋芽細胞を用いた骨格筋の再生による再生医療は様々な筋疾患や心疾患への応用が可能である。その際、安定的な細胞の確保が必要であることから、筋芽細胞の採取条件の検討を行った。

【方法】生後1日目・2週目・4週目のラットの骨格筋から、プレプレイング法により筋芽細胞を分離した。培養7日目～10日目の細胞を固定しデスミン抗体を用いて免疫染色を行い、筋芽細胞数の比較をした。

【結果】生後1日目・2週目・4週目において、全細胞数に対する筋芽細胞の比率は、それぞれ45%・78%・22%であった。また、細胞増殖速度は筋芽細胞比と同じく生後2週目が一番早く、次に生後1日目、生後4週目の順であった。

【考察】筋芽細胞の増殖能は出生後よりラットの成長と共に次第に高くなり、その後低下することが示唆された。この結果より筋芽細胞を用いた骨格筋の再生療法は小児期の細胞を用いるのがより効率的と考えられた。

【今後の予定】現在、幼若 GFP ラットの骨格筋より筋芽細胞を採取、継代培養で増幅させたのち、非 GFP ラットへ移植しその生着を観察し、筋芽細胞を用いた筋再生の可能性について検討を行っている。

P-373 骨格筋の再生過程におけるマクロファージと GDF3 の役割

兼松 将矩, 瀬川 将司, 山本 有希子, 中島 麻里, 佐藤 雅紀, 森川 大亮, 深田 宗一郎, 辻川 和文, 山元 弘

大阪大学大学院薬学研究所細胞生理学分野

骨格筋は再生能を有する組織であり、その中心として働くのが筋組織特異的幹細胞—筋衛星細胞—である。更に、この筋再生過程には好中球・マクロファージなどの炎症性細胞の浸潤を伴うことが知られている。特にマクロファージは筋衛星細胞の活性化・増殖・融合に関わる分子を産生していると考えられており、その分子の同定は筋再生促進分子として筋疾患の予防、治療に期待されている。我々は M-CSF の受容体に対する抗体、AFS98 を用いてマクロファージを抑制し、筋再生におけるマクロファージの影響を観察した。その結果、筋障害一週後において顕著な筋管形成の減少が見られ、マクロファージが筋再生、特に融合過程に必須であることが分かった。次に我々は、マクロファージから分泌される筋融合促進因子を同定する目的で、thioglycolate で誘導した腹腔マクロファージと筋再生三日目のマクロファージ、更には筋衛星細胞の遺伝子発現解析を試み、筋再生マクロファージ特異的な分泌分子の探索を行った。その結果 BMP のアンタゴニストとして考えられる GDF3 (growth differentiation factor 3) を同定した。GDF3 は *in vitro* の培養系において BMP4 の筋管形成阻害作用を抑制した。これらの結果は、マクロファージが GDF3 を介して間接的に BMP を抑制し筋管形成を促進することを示唆している。

P-372 ラット骨格筋筋芽細胞から収縮する筋繊維 O-10-2 をつくる —電気刺激の分化促進効果—

河原 裕美<sup>1</sup>, 山岡 薫<sup>2</sup>, 梅田 知佳<sup>1</sup>, 吉元 玲子<sup>1</sup>, 佐々木 輝<sup>1</sup>, 呉 樹亮<sup>1</sup>, 新田 純子<sup>1</sup>, 真鍋 朋誉<sup>1</sup>, 岩田 全広<sup>1</sup>, 梶梅 輝之<sup>2</sup>, 弓削 類<sup>1</sup>

<sup>1</sup>広島大学大学院保健学研究科, <sup>2</sup>広島大学大学院医歯薬学総合研究科

【目的】培養筋芽細胞に電気刺激を行い、形態学的、分子生物学的手法を使って筋芽細胞の分化に与える影響を検討した。

【方法】培養細胞は、ラット骨格筋由来の筋芽細胞 L6 株 (IFO 50364) を用いた。実験群は、電気刺激を行った電気刺激群と正常培養した対照群の2群に分けた。電気刺激の条件は、矩形波、刺激頻度 0.5 pulse/sec, 持続時間 2.0 msec, 電圧 50 V, 刺激時間 5 分/日とした。電気刺激群は、培養開始日から 6, 8, 10, 12 日後に電気刺激を行い、その後は刺激を施行せず培養を続けた。

【結果】電気刺激群では、培養 10 日後と 12 日後の筋管細胞数が対照群と比べ有意に多く、太い筋管細胞が出現した。さらに、培養 18 日後には横紋構造を持った筋線維が自動収縮を始めた。収縮中の培養筋線維の膜電位を計測すると、静止電位の低下と活動電位に近い波形が観察された。筋の分化マーカーのタンパク質発現をみると、電気刺激群では、筋の分化・成熟に関与する myogenin, Myf-6, M-cadherin の発現が強かった。また、電気刺激群では、connexin43 の強い発現が持続した。【考察】本研究で使用した筋芽細胞 (L6) は、通常の培養条件では筋管細胞までしか分化しない。電気刺激を加えることで筋管細胞が成熟するだけでなく、横紋構造を持った筋線維が出現し、自動収縮したことは注目すべき点である。電気刺激という物理的的刺激のみで筋細胞の分化・成熟をコントロールできる可能性が示唆された。

P-374 骨格筋再生を目指した骨髄由来間葉系幹細胞 O-10-3 胞の静的伸長培養

江橋 具<sup>1</sup>, 永谷 憲歳<sup>1</sup>, 橋本 成広<sup>2</sup>, 藤里 俊哉<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>国立循環器病センター研究所再生医療部, <sup>2</sup>大阪工業大学

【目的】腫瘍の摘出などによる組織欠損部位の補填のために、患者の別の部位から組織を移植する治療が行われている。しかしこの場合、健常組織を摘出することによる患者の QOL の低下は著しい。また、糖尿病などが原因の大規模な組織の壊死に対して、現在のところ切除以外の有力な治療法がない。そこで本研究では、これらの治療に用いるための移植用組織を作製することを目的とした、脱細胞化筋スキューフォールドを用いる骨髄由来間葉系幹細胞の培養を行った。間葉系幹細胞は、通常試薬により筋細胞へと分化誘導されることが知られているが、本研究では細胞に静的伸長刺激を与えることによる細胞の分化への影響を調べた。

【実験】ラット骨髄由来間葉系幹細胞を分離・培養し、超高静水圧印加処理を用いて作製した脱細胞化筋スキューフォールドに播種して、培養を行った。培養条件として、通常のディッシュによる培養と、スキューフォールドを用いる、三次元培養を行い、三次元培養ではさらに伸長刺激を与える群と刺激を与えないコントロール群の三通りを設定した。これらの細胞の筋細胞分化マーカーとなる mRNA の発現量を経時的に測定するとともに、細胞の形態を観察した。

【結果と考察】スキューフォールドを用いた静的伸長刺激では、刺激開始から 3 日目においてほとんどの細胞が伸長方向に細長く伸びた形態を示したことから、伸長刺激により間葉系幹細胞が筋細胞へと分化している可能性が示唆された。