

厚生労働科学研究費補助金

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 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 江橋 具

平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

生体外における骨格筋組織構築のための細胞培養に関する研究	-----	1
江橋 具		
(資料) 図表		

II. 分担研究報告

脱細胞化心筋スキャフォールドの心筋再生誘導能に関する研究	-----	16
藤里 俊哉		
(資料) 図表		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	31
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	37
-----------------	-------	----

厚生労働科学研究費補助金（再生医療等研究事業）

総括研究報告書

生体外における骨格筋組織構築のための細胞培養に関する研究

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 流動研究員

研究要旨

本研究は、組織を脱細胞化することにより作製したスキャフォールドを用いて、間葉系幹細胞や筋芽細胞などの未分化・未成熟細胞を三次元培養し、力学的刺激による培養細胞の筋細胞への分化に及ぼす影響を調べた。ブタ骨格筋由来の脱細胞化スキャフォールドは超高静水圧印加処理を用いて作製し、これにラット骨髄由来間葉系幹細胞や株化筋芽細胞を培養し、伸長刺激や伸縮刺激などの刺激を与えた。その結果、間葉系幹細胞の、力学的刺激による骨格筋細胞への分化を示唆する結果が得られた。

分担研究者：藤里 俊哉

大阪工業大学大学院生体医工学科 教授
国立循環器病センター研究所 客員研究員

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の心筋の損傷は、筋細胞が壊死することで、心臓や呼吸器など生命を維持するための器官の機能停止を招くことから、致死に至る重篤な疾患である。また、事故や腫瘍の摘出などにより筋組織に損傷を受けた場合、患者自身の健常組織を移植する治療が行なわれる。しかし、この方法は、移植片取得のための第二の傷害や、二重手術による患者への負担が大きく、患者のQOL（quality of life）の低下は免れない。がんや心疾患は日本国の疾病の死亡率のなかでも極めて高い位置にあることから、早急な対策・治療法の

開発が必要である。

近年、再生医療の研究の活発化に伴い、さまざまな組織の再生技術が検討されている。筋組織に関しては、患者自身の筋芽細胞や間葉系幹細胞を含む骨髄細胞を採取し、患部に注入する方法や、取得した細胞を特殊な培養皿にて培養し、細胞シートを作製したのちに患部に貼り付けるといった細胞移植による治療が数多く研究されている。しかしながら、筋芽細胞を利用する場合には、患者の骨格筋を採取する必要があることや、心筋の治療に適用した場合には心臓細動を招くことが報告された例もある。また、細胞移植の場合、細胞懸濁液を直接患部に注射器などで注入するが、通常の細胞懸濁液では組織外へ流出し、組織再生に寄与できる細胞の割合が少ない、すなわち、大量の移植細胞が必要となることも問題となっている。細胞シートを利用する

と、細胞の生着率は劇的に向上するものの三次元的に大きな組織を治療するためにはシートの厚みが必要となることから、シートの積層化が試みられている。しかし積層化することで、中心部の細胞への酸素などの供給が損なわれるため、これを回避するための手法も報告されているが、いまだ最適な治療法とはいえない。

細胞の移植効率を増加することと、細胞移植ではなし得ない、筋組織の強度やポリウレムの補充のために、細胞をスキヤフォールドに播種して移植する方法も検討されている。これには、ポリ乳酸などの合成材料やフィブロネクチンゲルなどを利用した例が報告されているものの、これらの材料では、心臓の拍動に代表される不随意運動に追従できるような力学特性が得られないことが問題である。

われわれの研究室では、世界的に類をみない、超高静水圧印加処理を用いた脱細胞化処理法を開発し、これまでに心臓弁や血管にこの技術を適用して移植用組織を作製してきた。ブタを用いた移植実験では、移植した脱細胞化組織の表面を血管内皮細胞が覆い、血管壁には線維芽細胞や平滑筋細胞が浸潤して、正常な血管とほぼ同等の組織を構築することがわかった。そこで、本研究でも、超高静水圧印加処理によりブタ骨格筋を脱細胞化し、細胞の足場として用いた間葉系幹細胞や筋芽細胞の培養を行い、骨格筋の再建のための基礎的検討を行なった。用いる細胞として、未分化あるいは未成熟な骨格筋細胞を利用し、こ

の細胞を分化・成熟させるための手段として、通常の試薬による分化誘導でなく、力学的刺激を試み、細胞の分化への影響を調べることを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 細胞化スキヤフォールドの作製

細胞を培養するための足場としてのスキヤフォールドは、クラウン系ミニブタ（株式会社 ジャパンファーム、鹿児島）の骨格筋から作製した。ブタ臀部の骨格筋を採取し、3 mm の厚さとなるよう、筋線維方向に沿ってスライスし、繊維方向が長軸となる長方形（幅 10 mm、長さ 約 20 mm）に細切した。その後、PBS (-)と共にパックして、冷間等方圧加圧装置（Dr CHEF; 神戸製鋼所、神戸）を用いて高圧処理（980 MPa、10 分間、10 °C）した。処理後の組織は、PBS(-)ですすいでサンプル瓶に移し、PBS をベースとした洗浄液にて 14 日間洗浄した。洗浄液は二日に一度交換した。洗浄開始から 14 日目に、洗浄液を 80% エタノールに変更し、3 日間浸漬したのち、PBS (-) にて 3 日間洗浄し、脱細胞化組織とした。洗浄は、いずれの工程も、37°C 下で振騰して行った。

完成した脱細胞化スキヤフォールドは、ペニシリン・ストレプトマイシンを含む PBS (-) に浸漬し 4°C 下にて保存した。

B-2. 細胞

培養には、マウスの株化筋芽細胞である

C2C12 細胞または、ラット骨髄由来間葉系幹細胞を用いた。

筋芽細胞は、凍結状態から融解して、コラーゲンコート皿を用いて培養を開始し、培養中に細胞がコンフルエントにならないように継代したものを利用した。培地には、DMEM (dulbecco modified essential medium) に FBS (fetal bovine serum) が 10% (v/v) となるように混合した培地を用いた。

間葉系幹細胞は、SD ラット (150 g 前後、オス) の大腿骨の骨頭を切除し、PBS (-) を注入して骨髄を出しし、雑多物などをフィルターで除去した後、コラーゲンコート培養皿で培養を開始、接着した細胞を間葉系幹細胞とした。細胞は、2-3 継代して増幅させ、必要細胞数に達したのものを用いた。培地には、DMEM に FBS を 10% (v/v) と、HS (horse serum) を 15% (v/v) を混合した培地を用いた。間葉系幹細胞が、通常の方法で筋細胞分化誘導されるか確認するために、細胞が培養皿の 70% 程度の細胞数に増殖した時点で、5-azacytidine を培地に混合して 24 時間培養したのち、培地を除去し、新鮮培地を添加して培養を継続した。

B-3. 細胞播種

脱細胞化スキャフォールドに細胞を播種し、培養を開始した。スキャフォールドは多孔質体であるため、細胞の播種効率は通常の培養皿と比較すると低い。しかし、細胞はある程度の細胞密度に達してから分化すると考えら

れたため、細胞の播種密度と効率が高いことが望ましい。三次元的なスキャフォールドに細胞を播種する方法として、通常は細胞懸濁液の滴下が行なわれるが、この方法では、スキャフォールドから脱落する細胞が多く、播種効率は低いことが前実験からわかった。そこで、本研究では、スキャフォールドとほぼ同じ大きさのチャンバーにスキャフォールドを静置して、高密度の細胞懸濁液 (1×10^6 cells/50 μ L/scaffold) を滴下して、スキャフォールドに細胞懸濁液を含ませて、外部に漏出しないように細胞播種を行なった。

B-4. 細胞の伸長培養

細胞への力学的刺激として、伸長刺激を行った。伸長刺激とは、細胞を播種したスキャフォールドを引き伸ばしたまま培養することにより、一過性の引張り刺激が細胞に与える影響を調べた。

細胞を播種したスキャフォールドは、3 日間静置して、細胞を接着・増殖させたのち、伸長刺激を与えた。スキャフォールドの長軸方向の両端をクリップで挟み、シリコーン製のチャンバーに設置した。このときのクリップ間の長さは 12 mm とした。その後、クリップ間が 13.2 mm となるまでスキャフォールドを引き伸ばし (歪み 10%)、その後 3 日間、静置培養を継続した (図 1)。

B-5. 細胞の伸縮培養

細胞への力学的刺激は、伸長刺激のほかに、

伸縮刺激も行った。伸長刺激と同様に、スキヤフォールドに細胞を播種したのち、3日間静置培養を行い、刺激を開始した。

昨年度、間葉系幹細胞への伸縮刺激を行ったが、伸縮頻度を1 Hzとし、持続的に伸縮刺激を与えると細胞がスキヤフォールドから脱落してしまうことがわかった。そこで本年度は、伸縮頻度を減少させるとともに、断続的な刺激に変更して、細胞のスキヤフォールドからの脱落を抑制できると考え、歪み10%の刺激を、頻度0.5 Hzで10分間与え、その後50分間、歪み10%のまま静止状態を保つ、という一連の動作を5回繰り返した後、72時間後まで、歪み10%を維持したまま静置培養を行った。

伸縮培養では、間葉系幹細胞に加えて筋芽細胞であるC2C12細胞も用いて、それぞれの細胞における伸縮刺激の影響を調べた。

B-6. 評価方法

細胞を播種した日を day 0 とし、その後3日間の静置培養を行ったことから、刺激開始日は day 3 である。刺激開始直前を day 3 の0時間(0h)として刺激開始から1時間、3時間、6時間のRNAを細胞から抽出した(図2)。抽出したRNAを元にcDNAを合成して、real time PCRにて筋分化マーカーの発現量を経時的に計測した。筋分化マーカーとして一般的によく利用されている転写因子のMyoDと、より筋細胞に分化している場合に発現してくるタンパク質である

desmin の mRNA 量について調べた。また、培養終了時にスキヤフォールドに接着している細胞をホルマリンにより固定化し、細胞形態観察のために組織切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。

B-7. 倫理面への配慮

本研究において、ブタやラットなどの動物実験を取り扱った際は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和55年3月27日総理府告示第6号)、また、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年6月1日文部科学省告示第71号)に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤および鎮痛剤を用いて、動物の苦痛の軽減に努めるとともに、綿密な実験計画を練ることで、不要な動物実験を避けて必要最低限の利用量とした。

C. 研究結果

脱細胞化スキヤフォールドを足場として利用した間葉系幹細胞または筋芽細胞の培養において、伸長刺激や伸縮刺激を与え、細胞の筋細胞への分化や成熟に及ぼす影響を、細胞の形態変化と筋分化マーカーの発現量により調べた。

C-1. スキャフォールドの評価

作製したスキャフォールドは、昨年度、ヘマトキシリン・エオジン染色とスキャフォールドの DNA 含有量計測により、良好に脱核されていることを確認してあった。今年度はこれに加え、走査型電子顕微鏡を用いて、スキャフォールドの詳細な骨格を観察した(図 3)。その結果、スキャフォールドはおおよそ 1-数 μm の細い繊維が絡み合った構造体であることがわかった。繊維間にできる空隙はかなり小さく、10 μm 以下であったが、ところどころに 50 μm 以上の空隙が空いており、昨年度の培養実験の結果でスキャフォールド内部に細胞が侵入していたものに関しては、このような結合組織が疎な部分に細胞が侵入していたものと考えられた。

C-2. 細胞への伸長刺激

伸長培養は、株化マウス筋芽細胞、または、コラーゲンコートディッシュを用いて数回継代し、増幅させたラット間葉系幹細胞の両方を試みた。

筋芽細胞を用いた場合、刺激を与えてから 3 日目に、スキャフォールドごと細胞をホルマリン固定し、組織切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。すると、刺激を与えたものと与えなかったものの両者において、スキャフォールドの内部で、筋芽細胞が太い筋細胞様の形態を示しているのが確認された(図 4)。細胞は、スキャフォールド骨格の間隙に入り込んで、スキャフォール

ド繊維に対して垂直方向に伸びた形態を示していた。通常の筋組織において、筋細胞が横断面となるように切片を作製すると、筋細胞の細胞質が大きく、細胞膜に沿って核が存在している、筋細胞の特徴的な形態が観察される。スキャフォールド内の筋細胞様の細胞も、通常の筋細胞の特徴に類似した形態を示していたことから、筋芽細胞から成熟した可能性が考えられた。

間葉系幹細胞を培養した場合にも、刺激開始から 3 日後に細胞の形態に変化がおこった。すなわち、刺激を行わずにスキャフォールドを用いて静置培養した細胞は、丸い形状を保ったままであったのに対して、伸長刺激を行ったものは、細胞が伸長方向に細長く伸びて一部の細胞は細胞融合をおこし、筋管細胞とよく似た多核の細長い細胞へと変化していることがわかった(図 5)。スキャフォールドの骨格の間に入り込んだ細胞も伸長方向に伸展して細長い形状を示していた。したがって、間葉系幹細胞は伸長刺激により筋細胞へと分化する可能性が考えられた。

C-3. 細胞への伸縮刺激

筋芽細胞の伸縮刺激を行い、刺激開始から 3 日後の細胞の形態をヘマトキシリン・エオジン染色による観察と、走査型電子顕微鏡観察を行なった。ヘマトキシリン・エオジン染色では、刺激を与えた群と与えなかった群で比較しても細胞の形態に変化は認められず、いずれも丸い形態を示した(図 6)。一方、

走査型電子顕微鏡でスキャフォールド表面の細胞を観察したところ、細胞の形態にはほとんど変化は認められなかったものの、伸縮刺激群では繊維状の細胞外マトリクスが分泌されているのが確認できた（図 7）。このマトリクスは細胞とスキャフォールドあるいは細胞と細胞の間を仲介するように存在していた。

間葉系幹細胞の伸縮刺激を行い、刺激開始から 3 日後の細胞の形態をヘマトキシリン・エオジン染色により観察した。伸縮刺激を行った場合、スキャフォールド内部の細胞の形態は、伸縮刺激を行わなかったものと同様の、丸い形のままであった。

そこで次に、伸縮刺激を与えた細胞から RNA を抽出して、筋細胞分化マーカーである MyoD の発現量の経時的変化を調べた。その結果、コントロール群、刺激群の両方とも、MyoD 発現量は時間と共に増加したものの、伸縮刺激を与えたものは、コントロール群よりも増加率が高かったことがわかった（図 8）。また、刺激を開始してから 6 時間以内の短期間の間に、伸縮刺激を与えた細胞の発現量が急激に増加していることもわかった。今後、実験数を増やすことでコントロール群と比較して有意差があるかを確認する必要がある。

D. 考察

本研究では、脱細胞化骨格筋スキャフォールドを用いて、未成熟な筋細胞である筋芽細胞や、未分化細胞の間葉系幹細胞の三次元的

培養を行い、これらの培養細胞における力学的刺激が筋細胞への分化・成熟に及ぼす影響を調べた。

筋芽細胞を利用した場合には、短期間培養では細胞形態の変化を観察したのみだが、細胞へ伸長刺激や伸縮刺激を与えたことによる大きな変化は認められなかった。しかし、スキャフォールド内部で培養した筋芽細胞は、細胞播種から 6 日後に観察したところ、筋細胞とよく類似した形態を示していた。筋芽細胞は、培養皿による二次元培養で細胞がコンフルエントになると自然に分化・成熟し、筋管細胞を形成する。この細胞は電氣的刺激に応答して収縮することができるほど成熟したものに成長する。したがって、本研究で筋芽細胞をスキャフォールドにて培養したときに細胞が筋細胞様の形態を示したことは、スキャフォールド内部での局所的な細胞密度が高かったためではないかと考えられる。伸長刺激を与えた場合には、細胞の接着点と足場のスキャフォールドに歪ができるため、何割かの細胞はスキャフォールドから脱落する可能性がある。これに対して刺激を与えなかったコントロール群では、細胞を播種してから外力が加わらなかったため、細胞の増殖能が高い部分ができ、筋管細胞や筋細胞への成熟が起こったと考えられる。さらに、スキャフォールドには筋細胞の骨格が残留しており、間隙が少ないために、増殖した細胞は、周囲へ拡散できず、細胞密度が高まることも、筋細胞への成熟を促進する要因のひとつとなる

と考えられる。本研究では、脱細胞化スキャフォールドとして、一種類しか用いなかったが、今後、空隙率が高く、孔径の大きなスキャフォールドを利用や、シリコンチャンバーによる二次元的培養を行うなど、増殖した細胞の密度が分散する工夫をして、本研究で用いたスキャフォールドにおける筋芽細胞の成熟度と比較する必要がある。また、本研究では細胞の播種方法として細胞懸濁液の滴下のみ行なったが、昨年度新たに開発した、無針注射器による播種を利用すれば、細胞をスキャフォールド全体に点在させることが可能となる。そのため、スキャフォールド全体の筋芽細胞が均一に成熟し、スキャフォールドを均一な筋組織に置換できる可能性が考えられた。

間葉系幹細胞に伸縮刺激を与えたところ、細胞の筋分化マーカーの発現量は、刺激を与えなかったものよりも増加することがわかった。すなわち、伸縮という力学的刺激により、間葉系幹細胞は筋分化を誘導される可能性があるといえる。しかしながら、刺激開始後 3 日という短い期間では、細胞の形態に変化は認められなかった。したがって、今後は、刺激後に細胞の形態を長期観察する必要がある。また、これまでに、筋分化マーカーとして MyoD と呼ばれる転写因子の発現量しか計測していないことから、より分化の下流にあるタンパク質の RNA (例えば desmin など) についても、経時的に定量していく必要がある。さらには、筋細胞だけでなく、間葉系幹

細胞が源となる、骨・軟骨などの細胞の分化マーカーについても検討し、力学的刺激や本研究で用いたスキャフォールドによる、細胞の筋分化に及ぼす影響と効果について調べることも重要な課題として残った。

間葉系幹細胞の伸長培養では、刺激開始から 3 日後に細胞の形態が細長い筋管細胞様に変化していた。しかし、伸縮培養では、刺激を行わなかったものと同様の形態のままであり、刺激効果は認められなかった。このことは、本研究で、細胞の播種効率を向上させる工夫をしたが、細胞の接着効率を上げる工夫を行なわなかったことが問題であったと考えられる。すなわち、細胞播種から刺激開始までの期間を延長するなどして、細胞が十分な細胞外マトリクスを分泌し、細胞の接着を強化させるなどの改善が必要であるといえる。また、伸長培養で筋管細胞様の形態へと変化した細胞の伸縮刺激は行っていない。生体内での筋組織の挙動を考慮すると、伸長刺激のようなある程度運動量の少ない刺激により細胞を分化させてから、伸縮刺激のような動的刺激を与えた方が、効果が高い可能性がある。すなわち、間葉系幹細胞から筋芽細胞、筋管細胞への分化は伸長刺激で行い、その後、伸縮刺激を与えることで、発生学的に起こりうる筋組織への分化・成熟に関する力学的刺激の影響をそのまま模倣し、培養すべきである。このためには、より詳細な刺激条件、例えば、刺激強度、刺激期間と刺激の変更時期について検討する必要がある。今後、筋組織を作製

するために必要な課題である。

最後に、本研究の最終目標は、血管や神経も含む移植用筋組織を作製することである。研究期間中には、血管や神経を構築させることはできなかった。骨髄には血管を形成する血管内皮細胞や神経細胞の幹細胞が含まれていることが知られている。したがって、間葉系幹細胞を用いた培養では、培養条件によっては筋細胞だけでなく血管、神経も同時に発生させることができるといえる。しかし、本研究で行なった力学的刺激では、これら全ての細胞へ分化させることは困難だといえる。したがって、時期特異的に各細胞への分化刺激を3段階に分けておこなうことにより、秩序だった組織を作製できる可能性がある。すなわち、血管網の構築、筋細胞の導入、筋細胞への神経の接続が可能となれば、生体模倣型筋組織が構築できるであろう。

E. 結論

本研究では、脱細胞化スキャフォールドを用いた筋芽細胞や間葉系幹細胞の培養における、伸長刺激や伸縮刺激といった力学的刺激が細胞の分化や成熟に及ぼす影響を調べた。その結果、力学的刺激のうち、伸長刺激に関しては、間葉系幹細胞の筋管細胞への分化を誘導できる可能性が示唆された。細胞の分化刺激は、通常、薬品や成長因子などの生化学的因子により行なわれることが多く、これらの因子は、組織を移植用として利用する場合に、患者の正常な組織に影響を与える可能性

が懸念される。これに対して、力学的刺激はこのような危険因子を伴わないことから、完成した筋組織を移植用に利用する際のリスクが大幅に減少するといえ、有効な手段であるといえる。

F. 健康危険情報

本研究は、動物細胞と動物組織レベルによる基礎研究であるため、該当する情報は特にない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ehashi T, Fujisato T., Elongation of bone marrow cells stimulates differentiation into skeletal muscle cells cultured in the acellular scaffold. (in preparation)

2. 学会発表

1) 江橋 具、永谷憲歳、橋本成広、藤里俊哉

脱細胞化筋スキャフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導。

第46回日本生体医工学学。2007年5月15-17日。宮城（仙台市）

2) 寺田堂彦、澤田和也、江橋具、平工香織、鎌田和加子、永谷憲歳、藤里俊哉、中谷武嗣、吉田謙一、船本誠一、岸田晶夫。

生体内で再細胞化する無細胞バイオ人工血

管の開発.

第 56 回高分子学会年次大会. 2007 年 5 月
29-31 日. 京都 (京都市)

3) Ehashi T, Nagaya N, Hashimoto S, Fujisato T
Effect of stretch culture of mesenchymal stem
cells on their differentiation into skeletal muscle
cells.

TERMIS-NA. 2007 年 6 月 13-16 日. カナダ
(トロント)

4) Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato
T

Novel Cell Seeding Method for the Tissue-
derived Acellular Scaffolds.

TERMIS-EU. 2007 年 9 月 4-7 日. イギリ
ス (ロンドン)

5) Miskon A, Terada D, Ehashi T, Fujisato T,
Mahara A, Uyama H, Yamaoka T

Preliminary study of in vitro niche effect on
differentiation of rat bone marrow stem cells to
cardiomyocytes-like cells.

TERMIS-EU. 2007 年 9 月 4-7 日. イギリ
ス (ロンドン)

6) Terada D., Sawada K., Ogata H., Ehashi T.,
Hiraku K., Kamata W., Yoshida K., Funamoto
S., Nagaya N., Kishida A., Fujisato T., Nakatani
T.

Development of the Regenerative Vascular

Graft Having an In Vivo Repopulationality.

TERMIS-EU. 2007 年 9 月 4-7 日. イギリ
ス (ロンドン)

7) 林宏行, 山崎健一, 小林裕之, 宇戸禎仁,
江橋具, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉
電気パルスによる骨格筋細胞収縮の制御

第 5 回生活支援工学系学会連合大会. 2007
年 10 月 1-3 日. 茨城県つくば市

8) Ehashi T, Somekawa S, Udagawa H, Fujisato
T

Novel Method for Interspersed Cell Inoculation
into the Tissue-derived Scaffold.

第 45 回日本人工臓器学会大会・第 2 回国際
人工臓器学術大会. 2007 年 10 月 28-31 日.
大阪 (大阪市)

9) Yamasaki K, Hayashi H, Uto S, Ehashi T,
Hashimoto S, Tsutui H, Mochizuki S, Kondo H,
Yoshiura M, Fujisato T

Control of skeletal muscle cell contraction by
electrical pulse.

第 45 回日本人工臓器学会大会・第 2 回国際
人工臓器学術大会 2007 年 10 月 28-31 日.
大阪 (大阪市)

10) 西垣戸麻美、江橋 具、山岡哲二、藤
里俊哉

超高静水圧印加処理による脱細胞神経グラ
フトの作製

第 29 回日本バイオマテリアル学会. 2007
年 11 月 27-28 日. 大阪 (豊中市)

11) Ehashi T, Hashimoto S, Fujisato T
Acellular Skeletal Muscle Scaffold as an
Inducer of Muscular Differentiation.

第 1 回アジアバイオマテリアル学会. 2007
年 12 月 6-8 日. 茨城県つくば市

12) 林宏行、山崎健一、宇戸禎仁、小林裕
之、江橋具、近藤英雄、橋本成広、藤里俊
哉

培養筋管細胞の収縮動態の定量評価

第 20 回バイオエンジニアリング講演会.
2008 年 1 月 25-26 日. 東京 (江東区)

13) 西垣戸麻美、江橋 具、山岡哲二、藤
里俊哉、森反俊幸

超高圧印加処理により作製した脱細胞化神
経の移植

第 6 回日本再生医療学会総会. 2008 年 3 月
13-14 日. 愛知 (名古屋市)

14) 江橋 具、馬原 淳、寺田堂彦、藤里
俊哉、山岡哲二

毛細血管の再構築を誘導できる新規スキャ
フォールドの開発

第 6 回日本再生医療学会総会. 2008 年 3 月
13-14 日. 愛知 (名古屋市)

15) 佐々木 愛、柿木佐知朗、江橋 具、

森反俊幸、山岡哲二

含水性を有するポリ乳酸系材料の抗血栓と
組織浸潤性

第 6 回日本再生医療学会総会. 2008 年 3 月
13-14 日. 愛知 (名古屋市)

H. 知的財産権の出願状況

1. 特許取得

1) 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

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

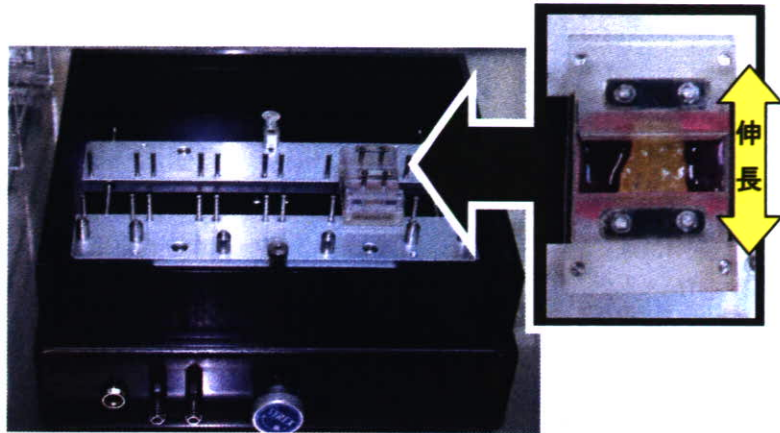


図 1. 伸長あるいは伸縮刺激用装置外観. 細胞を播種し, 静置培養したスキャフォールドの両端をクリップで挟んで伸長刺激あるいは伸縮刺激を与えた.

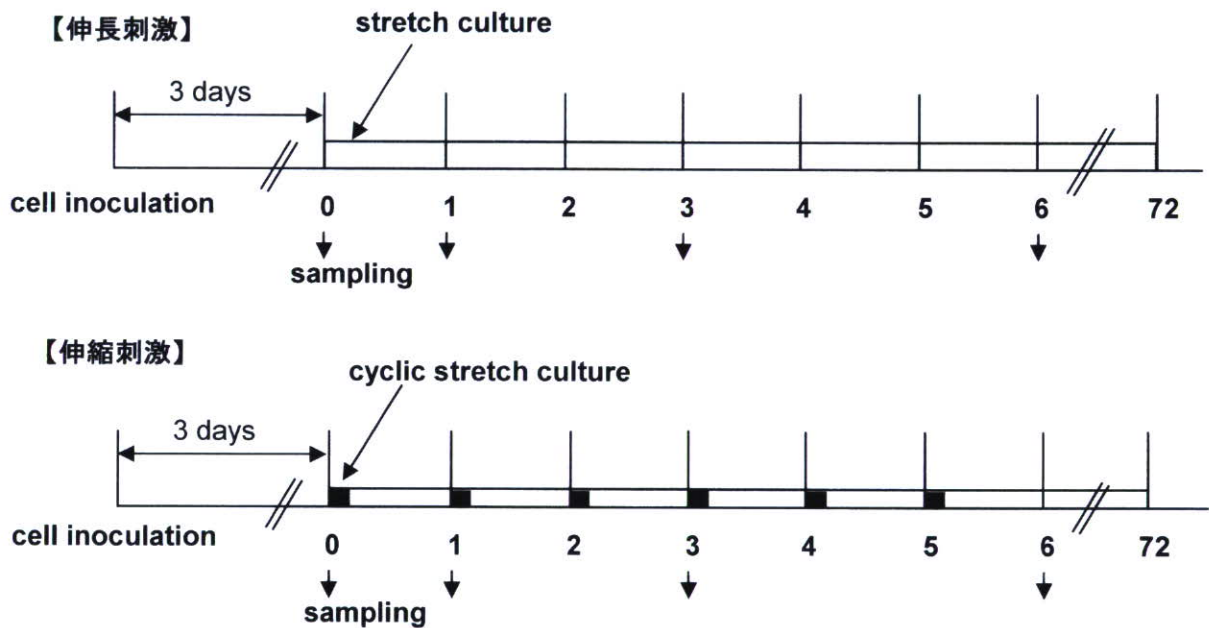


図 2. 伸長刺激と伸縮刺激における刺激付与とサンプル獲得の図式. 細胞播種後、3日間静置培養して、伸長刺激あるいは伸縮刺激を与えた. サンプルは、刺激開始直前を0時間とし、1, 3, 6時間後に取得した.

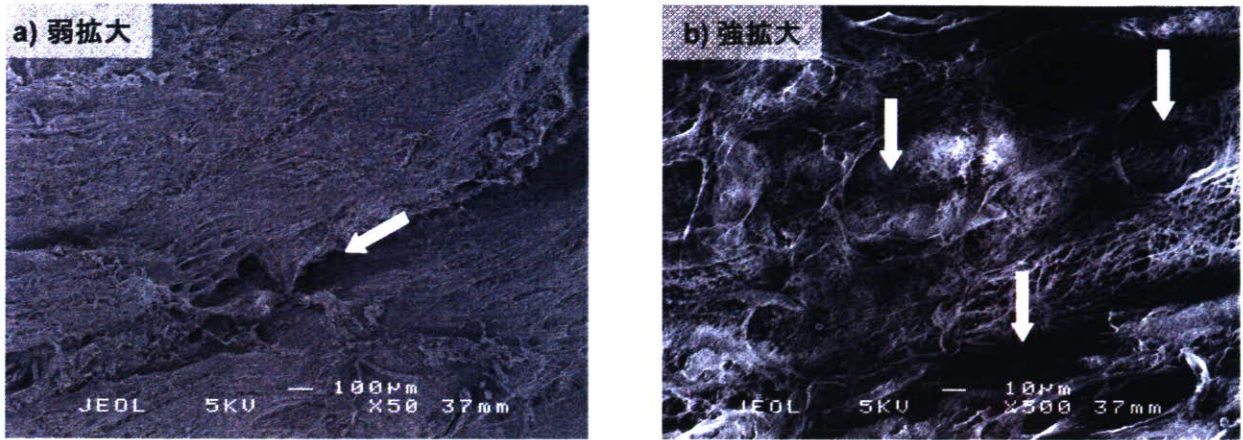


図 3. 脱細胞化スキャフォールドの走査型電子顕微鏡による観察. スキャフォールドの骨格間隙はかなり小さかったものの、ところどころ $50\ \mu\text{m}$ 以上の間隙があった.

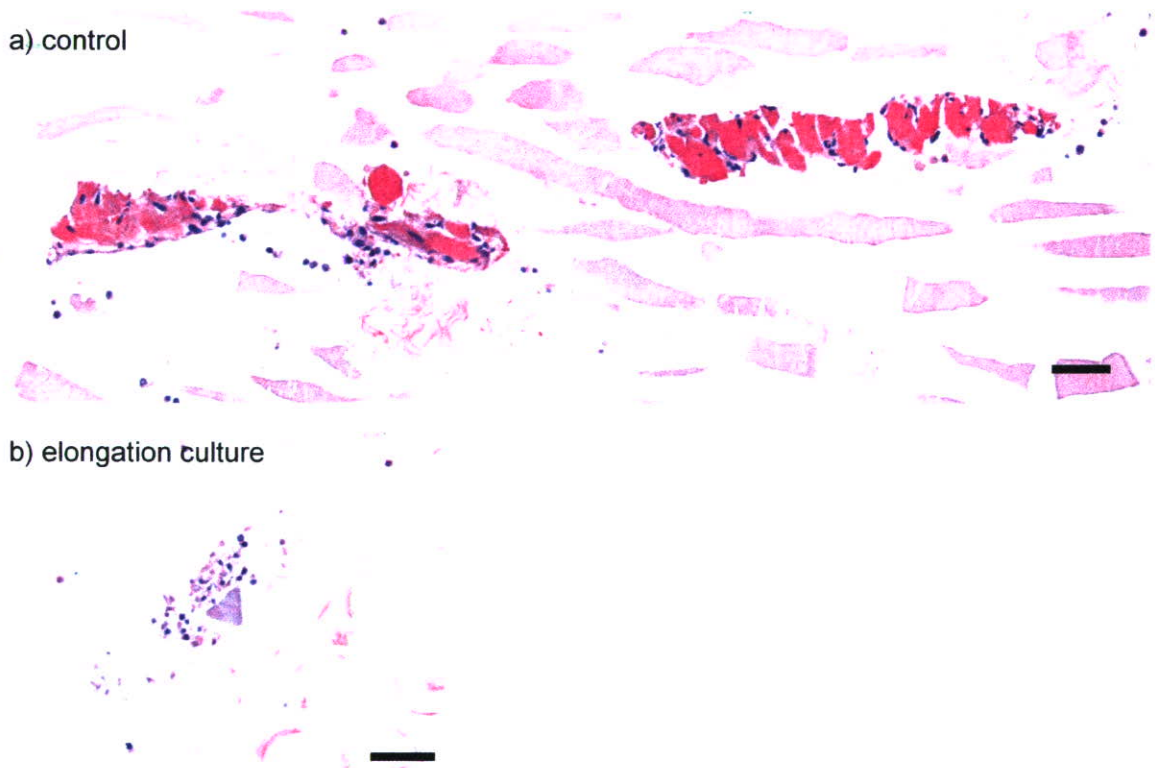


図 4. 筋芽細胞への伸長刺激 (刺激後 3 日目のヘマトキシリン・エオジン染色像). a) 刺激なし. b) 伸長刺激. 刺激の有無にかかわらず, 筋芽細胞はスキャフォールドの伸長方向に水平な向きが横断面となるような向きに筋細胞様の形態を示した. したがって, 刺激が細胞に与える効果は認められなかった. Bars; $50\ \mu\text{m}$.

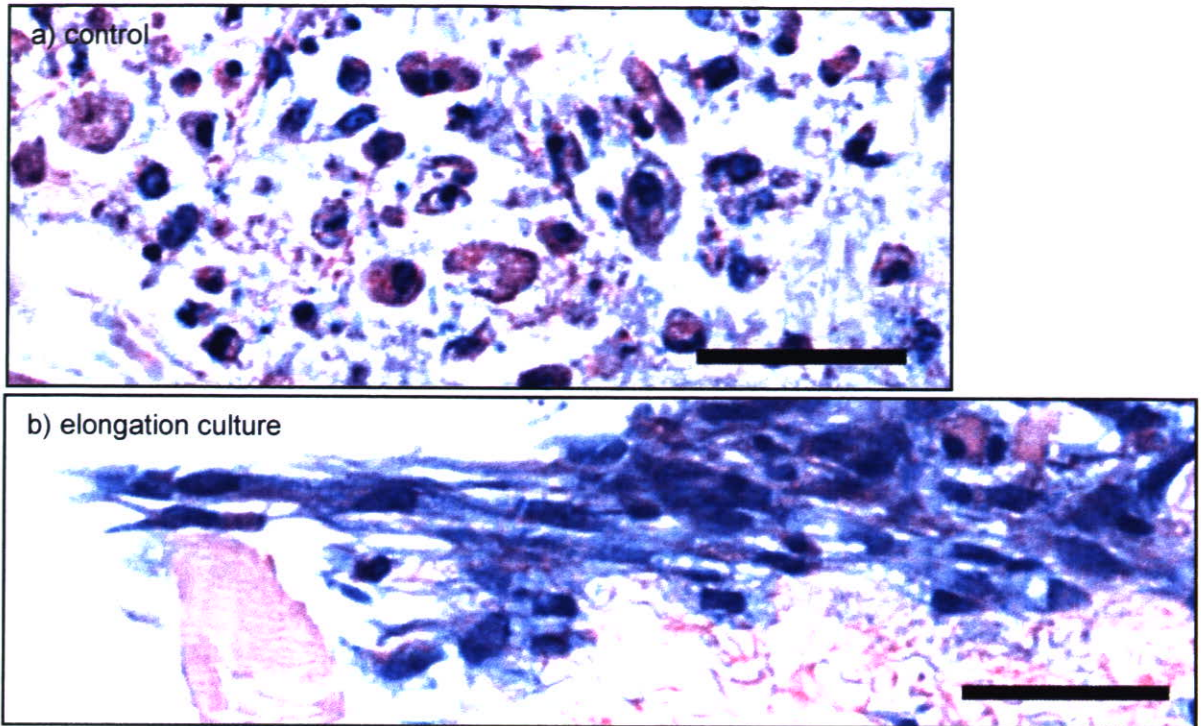


図 5. 間葉系幹細胞への伸長刺激 (刺激開始後 3 日目のヘマトキシリン・エオジン染色像). 間葉系幹細胞に伸長刺激を与えると, 細胞の形態が変化し, 一部の細胞は融合して筋管細胞様の形態を示した. Bars; 200 μ m

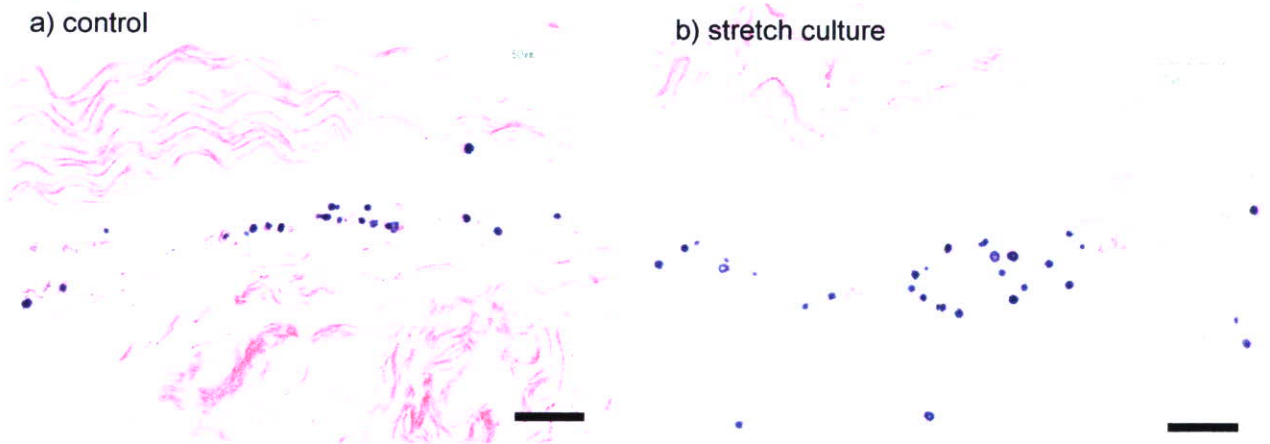


図 6. 筋芽細胞への伸縮刺激. 筋芽細胞に伸縮刺激を与えても, 短期培養では細胞の形態に変化は認められず, 丸いままであった. Bars; 50 μ m.

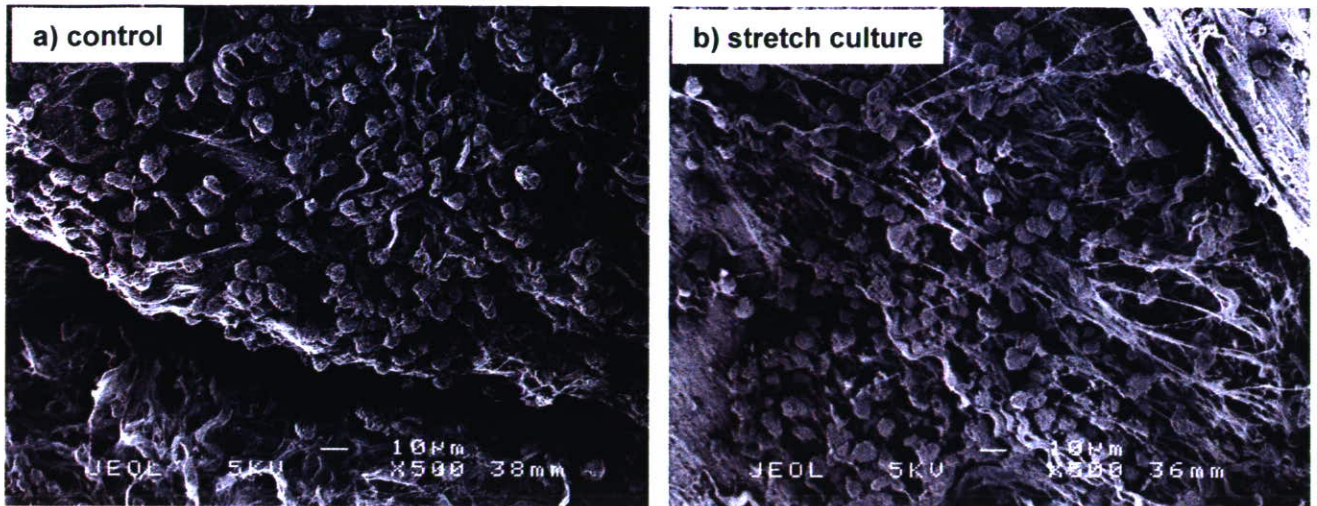


図 7. 筋芽細胞への伸縮刺激 (刺激開始から 8 日後の走査型電子顕微鏡像). a) control. b) 伸縮刺激群. 刺激することにより, 細胞外マトリクスの分泌量が増加する傾向が見られたものの, 細胞の形態に変化はなかった.

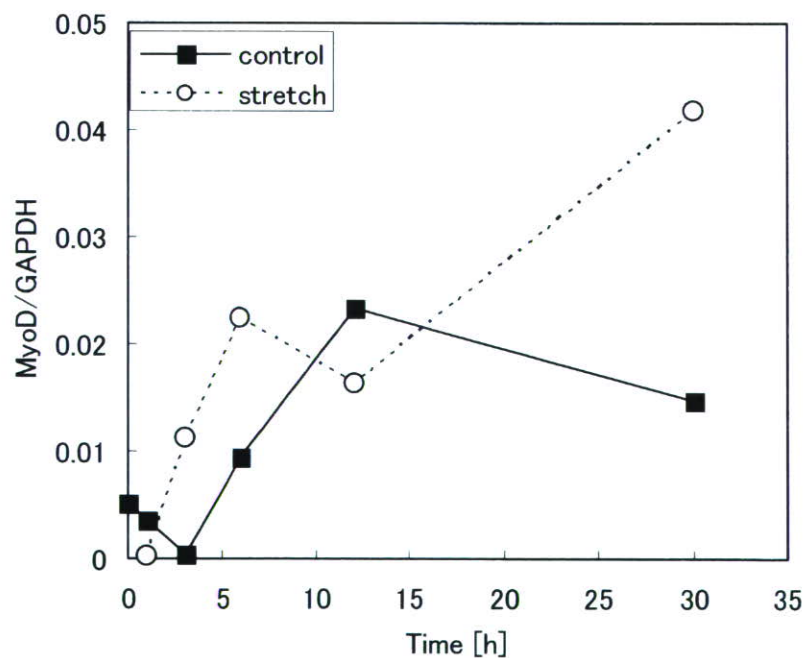


図 8. 間葉系幹細胞の伸縮刺激による筋分化マーカー発現量の変化. いずれの場合にも, 発現量は経時的に増加したものの, 伸縮刺激を与えると, コントロール群よりも発現量が高い傾向が見られた.

脱細胞化心筋スキヤフォールドの心筋再生誘導能に関する研究

分担研究者 藤里 俊哉

大阪工業大学大学院生体医工学科 教授

国立循環器病センター研究所 客員研究員

研究要旨

心筋梗塞などの重篤な心疾患の治療として、最近の細胞移植による治療法をより効率化することを目的に、脱細胞化スキヤフォールドの移植による心機能補助と組織再生に及ぼす効果について調べた。ラットを用いた移植実験では、ラットの脱細胞化心筋スキヤフォールドを心臓表面に貼り付けて固定し、スキヤフォールド内部への血管新生や細胞の浸潤と組織の構築を、組織学的に観察し、スキヤフォールドが心筋再生に貢献できるかを考察した。

A. 目的

心筋梗塞などの重篤な心疾患の治療として、最近では骨髄由来間葉系幹細胞などの細胞の心筋内部への移植や、細胞シートとして心臓壁に移植する方法が検討されている。しかし、心臓のように、運動が激しく、大量の酸素を必要とする器官では、移植した細胞の定着性が悪いことや、栄養供給が困難であるなどの問題も残されている。

細胞をばらばらのまま組織に注入すると、その場に定着する確率が低く、注入場所から早急に移動してしまうことが知られている。この場合、治療したい組織に移植細胞を留まらせることができないために、治療効率は劇的に低下してしまうことが問題である。注入細胞の早期流出を予防するために、インジェクタブルスキヤフォールドと呼ばれる高分

子ゲルを用いるなどの方法も検討されつつある。

一方、細胞シートの場合には、心機能を良好に回復させることが可能であるが、患部が大きく、厚みがある場合には、シートの積層とそれに伴う血管新生が必要となる。血管新生を誘導しつつ、単層シートから厚みのある細胞シートを作製する技術も検討されており、良好な結果が報告されている。しかし、現段階ではある程度の厚みと血管を持つ細胞シートを作製するには、動物レベルの基礎的検討であって、実用化するためには多重手術が必要であるなど、克服すべき課題も大きい。

これまでにわれわれの研究グループで用いてきた脱細胞化処理法で、骨格筋や心筋を脱細胞化処理すると、細胞核や細胞質成分は

除去できるにもかかわらず、細胞骨格は残留することがわかっていた。したがって、血管に比べるとコラーゲンなどのマトリクス成分が少ない筋組織でも力学的強さをある程度保持していることと、生体に移植したときに、若干の異物応答が現れる可能性が考えられた。そこで、このスキャフォールドを移植することにより、ホストの免疫細胞が異物反応を引き起こし、炎症を誘発、これによりスキャフォールド部分に集合した血流内の幹細胞が、早期組織再生を誘導できると考えられる。そこで本研究では、脱細胞化心筋スキャフォールドの心筋表面への移植による、スキャフォールド内部への血管新生や細胞浸潤の様子を長期間観察し、スキャフォールドの筋組織再生能について検討した。

B. 実験方法

B-1. 脱細胞化心筋スキャフォールド作製

これまでの手法と同様に、超高静水圧印加処理を利用した脱細胞化心筋スキャフォールドを作製した。心筋は、F344系ラット(350g、オス)心臓を摘出し、左心室および右心室の外壁の心筋を分離してPBS(-)に浸漬後、施圧(980MPa, 10min, 10°C)した。施圧後の組織は所定の洗浄液にて洗浄し、最後にPBS(-)にて4°C保存した。完成したスキャフォールドはヘマトキシリン・エオジン染色にて組織学的観察を行なった。なお、力学特性に関しては、ラット筋組織が小さく、測定が困難であったことと、過去にブタ心筋

組織が、われわれの脱細胞化処理法でほとんど変化しなかったことがわかっているため、ラット心筋における評価は行なわなかった。また前実験段階で、処理後の右心室と左心室の外壁を比較した結果、左心室よりも右心室の方が薄く、心機能を妨害しないと考えられたため、後の実験は全て右心室壁を用いて行なった。

B-2. 移植実験

ラットを利用した心筋への移植実験を行なった。動物は、ドナーにF344ラットを利用し、これに対して同種異系統動物であるLewisラット(7-8週齢、オス)をレシピエントとした。これは、ヒトにおける他者移植を想定したためである。

ラットは、ネブタール麻酔下で気管挿管し、人工呼吸器にて呼吸を確保した。左胸部を切開して、胸腔外壁までの筋層を剥離した。その後、肋間筋を切断して胸腔を開き、肺を左右に寄せ、心臓を体外から棒で押し出すことにより、胸部の切開部分から外に露出した。露出した心臓は左心室壁の心嚢膜を破り、そこに脱細胞化心筋スキャフォールドを貼り付け、スキャフォールドの頂点を手術糸で心筋に固定した(図1)。固定後、切開した肋間部と皮膚切開部を縫って閉胸した。閉胸後は動物の自発呼吸が回復するまで人工呼吸を継続した。

B-3. 移植組織の評価

脱細胞化スキャフォールドを移植した動物は、術後 2 週間から 6 ヶ月の期間で再び開胸して心臓を摘出し、スキャフォールド外観と組織学的観察により、再生誘導能の可能性を検討した。組織学的観察では、摘出した心臓を中性緩衝ホルマリンにて固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソントリクローム染色を行なった。

B-4. 倫理面への配慮

本研究において、ブタやラットなどの動物実験を取り扱った際は、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号)及びこの法律を受けた「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(昭和 55 年 3 月 27 日総理府告示第 6 号)、また、厚生労働省による「厚生労働省の所管する実施機関動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省施行)に基づき、当該施設の動物委員会で承認された方法で行った。具体的には、国立循環器病センター実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤および鎮痛剤を用いて、動物の苦痛の軽減に努めるとともに、綿密な実験計画を練ることで、不要な動物実験を避けて必要最低限の利用量とした。

C. 研究結果

作製した脱細胞化心筋スキャフォールドをヘマトキシリン・エオジン染色とマッソントリクローム染色を行なったところ、心室の

内壁にはコラーゲンなどのマトリクスが少ないのに対し、外壁にはコラーゲンと考えられる膜状組織が残っているのがわかった(図 2)。そこで、このスキャフォールドの内壁を心筋外表に接着するように移植した場合と、スキャフォールドの外壁を密着した場合の二通りの移植を行なった。すると、移植後 4 週間後、内壁を密着させた場合には、スキャフォールドは良好に心筋に沿って固定されていたのに対し、外壁を密着させた場合には、心臓から離れ、スキャフォールドと宿主心筋の間を大量の結合組織が補填している状態であった(図 3)。したがって、スキャフォールドを移植するときには、もともと心臓内腔側を宿主心筋の表面と密着する方向で移植することとした。

脱細胞化スキャフォールドを移植したラットは、術後 2 週間、4 週間、3 ヶ月後に犠牲死させ、心臓を摘出した。心臓摘出時、移植部分と胸腔内壁との癒着がひどい例も若干みられたものの、大部分は通常の手術時に見られる程度の癒着であった(図 4)。移植手術に伴う癒着や、スキャフォールド自身による心機能の妨害や低下は、いずれの摘出時にも認められなかった。

心壁に固定されたスキャフォールドの外観は、術後 3 ヶ月経っても、移植時とほぼ変わらない様子を呈していた(図 5)。すなわち、生体内で分解された様子もなく心筋外壁に固定化されたままであった。スキャフォールドの表面を実体顕微鏡にて観察したと

ころ、移植後 2 週間目から多数の毛細血管が表面を走り、炎症反応が誘起されている様子であった。その後半年経っても、表面の毛細血管は依然として存在していた (図 5)。

次に摘出した心臓とスキャフォールドのヘマトキシリン・エオジン染色を行なった結果を図 6 から 8 に示す。移植から 2 週間後のスキャフォールドは、外部から血球と考えられる細胞が侵入していたものの、スキャフォールドの厚さ方向の中心部までは侵入していなかった (図 6a)。スキャフォールド内の細胞は、心筋と接着した面およびその逆側の両面から侵入していることがわかった。さらに、スキャフォールド中心部の浸潤細胞の先頭部分 (スキャフォールドに細胞が浸潤していない部分との境界) には、毛細血管が存在しているのが確認できたことから (図 6c)、スキャフォールドに侵入した細胞が、血流由来の細胞も含まれることがわかった。

術後 4 週間たつと、スキャフォールド全体に細胞が侵入しており、スキャフォールド内部への血管新生は、2 週間のものと比較すると減少している様子が観察された (図 7)。このときの細胞の形態は、術後 2 週間のものと比較しても、ほとんど変わらなかった。これに対して術後 3 ヶ月経つと、スキャフォールド内部の細胞は種々の細胞が混在していることがわかった (図 8)。スキャフォールドには、移植後早期から観察されたマクロファージと考えられる細胞だけでなく、マクロファージが融合した巨細胞様の細胞も

観察された。一方、これらの血球だけでなく、線維芽細胞のような細胞も多数観察され、炎症により組織再生が誘発された可能性も考えられた。

術後 2 週間のときの組織をマッソン・トリクローム染色した結果を図 9a に示す。この染色像から、移植時に手術系を通した部分の周辺が青く染色され、心筋に線維化が起こっていることがわかった。また、移植後の日数が増えるにしたがって、コラーゲンがスキャフォールド全体を覆っているようにも見える像が観察された。ただし、2 週間の時点では繊維間の結合はゆるかったのに対し、術後 3 ヶ月経つと、スキャフォールドを囲むコラーゲンは密度を増しているのが確認された (図 9b)。

以上の結果から、脱細胞化心筋スキャフォールドを移植すると、炎症反応を誘起して、これによりスキャフォールドの自己組織化が誘導されると考えられた。

D. 考察

マテリアルに対する生体応答の一つに、炎症反応がある。炎症反応は、損傷を受けた組織の治癒に欠かせない過程で、まずは損傷部あるいは異物と認識された部位に血流量の増加と血管新生が起こる。血管の新生に伴い、損傷組織や異物を排除するための貪食細胞が血流によって運ばれ、血管外へ遊走し組織へと浸潤、食作用を開始すると共に、新たな組織を構築するための細胞と、損傷組織ある