

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 18 年度～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 江橋 具

平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
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) 図表	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 38
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 47

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 流動研究員

研究要旨

本研究は、超高静水圧印加処理を用いて動物組織を脱細胞化することにより、生体由来スキャフォールドを作製し、これを足場とした細胞培養により、移植用筋組織片を生体外にて構築するための基礎研究である。スキャフォールドで三次元培養した間葉系幹細胞や筋芽細胞などの未成熟細胞に対し、生体内の筋組織環境を模倣した力学的刺激を与え、細胞の分化を誘導できることがわかった。また、脱細胞化筋組織スキャフォールドは、生体内における組織再生誘導能を有し、厚みのある組織の再生への有効性が高いと考えられ、筋組織再生のための足場と新規培養法を開発できた。

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。最近では、圧縮空気による筋力の補助装置が開発され、運動器の補助に利用されているものの、根本的な治療法はいまだに存在しないのが現状である。遺伝子的な治療法の開発も試みられているが、ジストロフィー症モデルマウスではヒトと同等の筋力低下が起こらないなどの問題もあり、研究レベ

ルでも治療法開発には困難な点が多い。また、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。さらに、事故や腫瘍の摘出などで筋組織に損傷を受けた場合、患者自身の健常組織を筋皮弁として移植する治療が行なわれるものの、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。

このように、筋組織の障害や損傷に対する治療法はさまざまであるが、近年では、細胞を利用した再生医療の研究が盛んに行なわれ、その技術が筋組織に関しても適用されている。例えば、患者の患部以外の骨

格筋組織から単離した筋芽細胞を患部に注射器により移植する方法や、骨髄から採取した間葉系幹細胞を心筋梗塞部位に移植する方法が臨床的に検討されている。これらの治療法は、効果的との報告もあるものの、筋芽細胞を利用する場合には、細胞を取得するために患者の健常組織に損傷を与えるだけでなく、細胞採取を含む多重手術が必要であることから、患者への負担は大きい。また、細胞移植の場合、単に細胞懸濁液を注入するだけでは、細胞の注射部位への固定は難しく、移植後に別の場所へと移動してしまうことが問題となっている。特に、運動性の高い筋組織では、定着性が低いため、移植した細胞の数に対する治療効果が低下してしまうことも解決すべきである。

そこで本研究は、動物の骨格筋あるいは心筋から、超高静水圧印加処理を用いて、脱細胞化筋スキヤフォールドを作製し、これに未分化・未成熟な細胞を播種して三次元培養することにより、大きく厚みのある再生型筋肉移植片を作製することを目的とした。患者の負担を減らすために、増殖性の高い幹細胞や前駆細胞を採取し、培養系で増殖させた後に分化・成熟させて、生体外にて骨格筋組織を作製することにより、将来的には移植後の定着性や機能性の良好な移植片として利用可能な組織の開発を目指した。

B. 研究方法

本研究では、われわれの研究室で開発した脱細胞化処理法により、動物の筋組織から脱細胞化スキヤフォールドを作製し、これを足場として用いた細胞の三次元培養を行った。また、脱細胞化スキヤフォールドへの細胞播種が、通常の技術では困難であったため、新規細胞播種法の検討を行なった。さらに、脱細胞化スキヤフォールドを生体に移植した場合に、組織再生能を有するかを調べた。

I. スキヤフォールドによる三次元培養

B-1. 脱細胞化スキヤフォールドの作製

骨格筋スキヤフォールドはクラウン系ミニブタ（ジャパンファーム、鹿児島）の大腿筋を 15 mm x 20 mm x 3 mm の長方形に、筋線維が長軸方向と並行になるように細切したものから作製した。心筋スキヤフォールドに関しては、クラウン系ミニブタや Lewis または F344 系ラット（日本エスエルシー、静岡）から摘出した心臓から調整した。ブタ心筋の場合は、厚さ 3 mm にスライスして、ラット心筋の場合は右心室外壁を切り取った。それぞれの筋組織を PBS (-) に浸漬して、空気が入らないようにパックし、冷間等方圧加圧装置（Dr CHEF; 神戸製鋼所、神戸）にて、980 MPa の圧力を 10 °C 温度下で 10 分間与えた。施圧後の組織はパックから取り出し、PBS (-) にてすすぎ、所定の洗浄液にて 3 週間洗浄を行った。洗浄工程の最後の 3 日間は、PBS (-) にて洗

浄液を置換した。また、すべての洗浄工程は 37°Cにて行い、洗浄終了後は抗生物質入りの PBS (-) に浸漬して 4°Cにて保存した。

B-2. スキャフォールドの評価

作製したスキャフォールドの脱細胞化については、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色とスキャフォールドの残留 DNA 量の計測により評価した。さらに組織学的にはエラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色を行なった組織切片と、走査型電子顕微鏡観察による組織学的検討とを行った。

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随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、クラウン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°C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。

一方、マウス由来株化筋芽細胞の利用も試みた。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。

B-3-2. 骨髄由来幹細胞の取得

骨髄由来間葉系幹細胞は、体重 150 g から 200 g 程度の SD ラット (日本エスエルシー、静岡) 大腿骨から取得した。動物から大腿骨頭から膝の関節の大腿骨部分を分離した。骨髄にシリンジを用いて PBS (-) を注入することにより骨髄を摘出し、ピペ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、接着した細胞を骨髄由来幹細胞とした。

B-4. 細胞の分化誘導

B-4-1. 筋芽細胞の分化

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 (Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) + 10% fetal bovine serum (FBS) + 10 µg/mL basic fibroblast growth factor (Sigma; MO, USA) から分化誘導培地 (DMEM + 10% FBS) に変更すること筋細胞への分化を誘導した。分化誘導した細胞は、hoechst 33324 による核染色をして蛍光顕微鏡下で、そして走査型電子顕微鏡により細胞形態の変化を観察した。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。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質であるデスミンの mRNA の有無を確認した。

次に、株化筋芽細胞の C2C12 細胞の分化の確認を行なった。この細胞は、培地に DMEM + 10% FBS を用いて通常のコラーゲンコートディッシュにてコンフルエントまで細胞を増殖させると、自然に細胞が分化し、細胞融合が起こるため、培地などの変更は行なわずに細胞の形態にて分化を確認

した。

B-4-2. 間葉系幹細胞の分化

骨髄由来間葉系幹細胞は、細胞播種後 DMEM + 10% FBS + 5% horse serum にて培養し、細胞が培養皿の 70% 程度に増殖した時点で、5-azacytidine (10 µg/mL; Sigma) を含む DMEM + 10% FBS に培地を変更して 24 時間培養し、その後、再び通常培地で培養を続けた。分化誘導を行なってから経時的に細胞の形態を位相差顕微鏡下で観察した。

B-5. スキャフォールドへの細胞播種

スキャフォールドへの細胞播種は、遠心操作を利用して行なった。培養皿で培養し、増幅させた細胞をトリプシン処理により剥離し、およそ 1×10^6 個の細胞を 2 mL の培地に懸濁した。培養に用いるスキャフォールドを、培地で 3 回洗浄し、50 mL チューブに移し、細胞懸濁液 2 mL を添加した。その後、遠心操作 (100 x g, 1 min. x 6 times) を行い、細胞をスキャフォールドに接着させた。遠心操作の各回のあいだに、チューブを軽くゆすって、沈殿した細胞を再度浮遊させる動作を行なった。遠心終了後、スキャフォールドはチューブからスキャフォールドと同じ大きさのチャンバーに移動し、静置培養を開始した。

B-6. 培養実験

チャンバーに移した細胞播種後のスキャ

フォールドは、いずれの細胞でも増殖培地を用いて、3 日間の静置培養を行った。静置培養開始から 3 日目にそれぞれの細胞に対して力学的刺激を与える培養実験を開始した。スキヤフォールドの長軸方向（繊維方向）の両端をクリップで挟み、シリコンチャンバーにいれ、伸縮培養装置（ストレッチス、大阪）に装着した（図 1）。チャンバーには各細胞の増殖培地を加えた。

力学的刺激は、スキヤフォールドを周期的に収縮させる伸縮刺激と一過性の伸長刺激の二通りを行った。いずれの刺激においても、スキヤフォールドを挟んだクリップ間の長さを 12.0 mm とし、これが 13.2 mm (歪 10%) にまで伸ばすこととした。

伸縮刺激は、伸縮周期を 0.5 Hz とし、ブタ骨格筋由来筋芽細胞では連続的伸縮刺激（図 2a）と一過性にスキヤフォールドを伸長させて、そのままの状態を維持する、伸長刺激（図 2b）を行い、マウス株化筋芽細胞の C2C12 細胞では、伸長刺激を与えた。

間葉系幹細胞の培養では、一過性の刺激である伸長刺激と、伸縮刺激を 10 分間と歪 10% の状態で 50 分間静止を保つ状態を 1 セットとした断続伸縮刺激を 5 回繰り返し、その後、3 日間、伸長した状態で静置培養を行った（図 2c）。

すべての培養実験では、スキヤフォールドをクリップに挟まずにチャンバー内で静置培養した細胞をコントロール群とした。

B-7. 細胞の分化評価

刺激開始前後の細胞の形態の変化を調べるため、刺激開始直前のスキヤフォールドと、刺激開始から一定期間ごとに回収したスキヤフォールドを 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、HE 染色を行ない、細胞の形態を観察した。一部の培養では、走査型電子顕微鏡によるスキヤフォールド表面の細胞形態を観察した。

間葉系幹細胞の培養では、細胞の分化を遺伝子発現レベルで調べるため、細胞から mRNA (messenger RNA) を回収し、real time PCR にて筋細胞分化マーカーである MyoD 発現量を経時的に測定した。

II. 新規細胞播種法の検討

脱細胞化心筋スキヤフォールドは、もともと心筋に組織間隙が少ないことから、密な構造であった。したがって、通常の細胞懸濁液滴下や前述の遠心操作による細胞播種法では、細胞をスキヤフォールド内部に侵入させることができなかった。そこで、このような密なスキヤフォールドへの細胞播種法を新たに開発するため、無針注射器による細胞播種法を検討した。無針注射器は通常、経皮的インスリン注射器として利用されており、ばね圧力による薬液噴射により組織内に液を注入できる。

B-8. スキャフォールドと細胞

脱細胞化心筋スキャフォールドは厚さ 3 mm または 10 mm のものを利用した。使用した細胞は株化線維芽細胞の L929 を用いた。細胞を 1×10^7 cells/mL の密度で cellmatrix (新田ゼラチン、大阪) に懸濁した。

B-9. 播種条件

細胞播種は、通常の細胞懸濁液のスキャフォールドへの滴下、注射針を通したスキャフォールド内部への注入と、無針注射器 (シマジェット; 島津製作所、京都) を用いた三通りを検討した。無針注射器を用いた場合には、細胞懸濁液をノズルに充填し、100 μ L の懸濁液を 5 回に分けて注射した。この際、スキャフォールドとノズルの先端が密着すると、噴出力が強いために細胞がスキャフォールドを通過してしまうため、ノズルをスキャフォールド表面から 5 cm 離して注射した。

B-10. スキャフォールドの細胞観察

播種直後のスキャフォールド内外の細胞を観察するために HE 染色または細胞生死染色 (cellstain double staining kit; 同仁科学、熊本) を行ない、スキャフォールドの細胞の分布を確認した。また、無針注射器で播種した細胞の増殖能を調べるため、播種翌日と 3 日目に MTT 法により生細胞量を計測した。また、スキャフォールド厚が 10

mm のものに関しては、一ヶ月の培養を行い、培養終了時にスキャフォールドを中性緩衝ホルマリンにて固定し、HE 染色にてスキャフォールド内部の細胞を観察した。

B-11. 生体組織への細胞移植と評価

心筋梗塞などの筋疾患の治療のために細胞移植が行われるが、この場合、骨髄細胞などの細胞懸濁液を、注射針を通して注入する方法が一般的である。本研究で開発した無針注射器による細胞播種法を、組織への細胞移植に適用できるかを調べるため、マウスを用いた細胞移植実験を行なった。

細胞は、GFP マウスの線維芽細胞を取得し、PBS (-) に懸濁して、無針注射器により麻酔下のマウス大腿筋に注射した。翌日、骨格筋を摘出し共焦点レーザー顕微鏡にて組織内の細胞を観察した。

III. スキャフォールド移植実験

本研究の最終目標は、スキャフォールドを用いて培養した細胞を移植片として利用することにある。そこで、まずスキャフォールド単独の移植実験を行ない、生体内でのスキャフォールドの組織再生能を調べた。

B-12. スキャフォールド移植

スキャフォールドは、ラット右心室外壁を脱細胞化したものを利用した。ドナー動物として、F344 系ラットを用い、移植を行なう動物は Lewis ラット (7-8 週齢、♂)

とした。

移植実験は、ラットに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。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-13. スキャフォールドの評価

脱細胞化スキャフォールドを移植した動物は、移植後 2 週間、1 ヶ月、3 ヶ月後に心臓を摘出し、実体顕微鏡下での観察後、10% 中性緩衝ホルマリンにて固定化したのち HE 染色とマッソントリクローム (MTC) 染色を行ない、組織学的観察を行なった。

B-14. 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

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 3)。また、EVG 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 4)。脱細胞化骨格筋スキャフォールドを、走査型電子顕微鏡にて観察した結果、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(図 5)。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いるのが確認された。

組織の脱細胞化を DNA 量の計測により評価した結果を図 6 に示す。脱細胞化の処理後には DNA 量が劇的に減少し、良好に核が除去できていることが、示された。

さらに、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（図 7）。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く、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。

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。培地の変更後、1 週間ほどで細胞の形態が変化し始め、2 週間がたつと細胞融合して、多核の細長い繊維状の筋管細胞様の形態を示した（図 8a）。さらに電子顕微鏡にて細胞形態を観察しても、多方向性に筋管細胞様の細胞が伸びているのが多数観察された（図 8b）。これらの細胞から RNA を抽出して RT-PCR を行ったところ、筋細胞特異的タンパク質のデスミン mRNA が発現しており、取得した細胞が筋芽細胞であることが確認された（図 9f）。

ブタ筋芽細胞の分化細胞と株化筋芽細胞を用いて、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 10）。

また間葉系幹細胞は、分化誘導培地によ

る刺激後、通常の培地で培養を続けると、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 11）。

C-3. 筋芽細胞への力学的刺激の効果

ブタ骨格筋筋芽細胞を用いて、スキャフォールドで培養した細胞の連続的な伸縮刺激と一過性の伸長刺激を行い、刺激から 2 週間後の細胞の形態を HE 染色にて観察した。その結果、伸縮刺激でも伸長刺激でも、ともに細胞は丸い形状を示したままで、刺激による細胞の形態変化は認められなかったことから、細胞の分化・成熟は起こっていないと考えられた（図 12）。また、ブタ骨格筋由来筋芽細胞は、線維芽細胞がかなりの割合で混入していると考えられる。そのため、培養を 2 週間も継続したために、筋芽細胞よりも線維芽細胞量が増加して、刺激を与えても細胞の形態に変化が起らなかったのではないかと考えられた。

そこで次に、マウス株化筋芽細胞の培養を行った。この細胞では、伸縮刺激と伸長刺激の両方を試み、刺激開始から 3 日目における細胞の形態観察を行なった。

まず、伸縮刺激をした場合の走査型電子顕微鏡による観察結果を図 13 に示す。刺激群とコントロール群の間で、細胞の形態はほとんど変化が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。このマ

トリクスは細胞とスキヤ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。

次に、伸長刺激を行った場合の HE 染色像を図 14 に示す。この場合には、刺激群とコントロール群のいずれの条件でも、スキヤ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。細胞は、スキヤフォールド骨格の間隙に入り込んで、スキヤフォールド繊維に対して垂直方向に伸び、生体内の筋細胞において、細胞質が大きく、細胞膜に沿って核が存在しているという、筋細胞の特徴的な形態であった。したがって、株化筋芽細胞は、力学的刺激よりも、スキヤフォールドに播種するだけで筋細胞へと変化する可能性が考えられた。

C-4. 間葉系幹細胞への力学的刺激効果

スキヤフォールドに細胞を播種して静置培養を 3 日間おこなったところ、スキヤフォールドは、細胞の収縮力により中央に向かって引張を受け、図 15 に示したとおり、全体が収縮した。したがって、スキヤフォールド上や内部で良好に増殖したことが考えられた。

さらに、刺激を開始すると、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ヤ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 16)。したがって、間葉系幹細胞はスキヤフォールドにて培養し、伸長刺激したことにより筋細胞へと分化した可能性が考えられた。

次に、間葉系幹細胞の伸縮培養を行い、細胞の筋分化マーカーである MyoD 発現量を調べた結果を図 17 に示す。伸縮培養を行った場合、コントロール群と刺激群の両方とも、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。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。

C-5. 無針注射器による細胞播種法の検討

脱細胞化心筋スキヤフォールドへの細胞播種法を検討した。細胞懸濁液の滴下により細胞を播種した場合の HE 染色の結果、細胞はスキヤフォールド表面には接着したものの、内部に侵入した細胞はなかった (図 18a)。これに対し、注射針による播種では、スキヤフォールド内部に大量の細胞を播種することが可能だったが、スキヤフォールド内で細胞塊を形成し、スキヤフ

scaffold 全体を細胞化するためには、何箇所にも注射針を刺す必要があると考えられた (図 18b)。さらに、 scaffold の骨格は注射針の侵入路で断絶されることがわかり、われわれの scaffold の長所である、力学的特性が失われる恐れが考えられた。

これらに対し、無針注射器を用いて細胞を播種した直後の蛍光色素による生死細胞の染色像を図 19a に示す。図は、 scaffold 内部の生細胞を緑に、死細胞を赤く染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した結果である。 scaffold の骨格が長方形に赤く染色されているが、死細胞と考えられる像はみつからなかった。したがって、細胞は、注射器の強い噴射圧力にも耐えることができたと考えられる。一方、緑色に染色された生細胞は、 scaffold のあちこちに散在するように播種されたのがわかった。さらに、 scaffold の深さ方向に断続的に観察した結果、細胞をさまざまな深さにも播種できたことが確認された (図 19b)。

次に、 scaffold に細胞を播種して、静置培養を行い、1 日目と 3 日目に MTT 法による細胞数の変化を計測した結果を図 20 に示す。細胞は 3 日間間に良好に増殖しているのがわかり、注射による噴射圧力は、長期的にみても細胞の増殖に影響していないといえた。さらに 1 ヶ月間培養を継続し、培養終了時に HE 染色を行な

った結果を図 21 に示す。図は、 scaffold 表面からおよそ 350 μm の深さの切片像である。この結果から、 scaffold の骨格構造は密であったにもかかわらず、播種された細胞は長期間生存しうることがわかった。通常、三次元的な培養においては、酸素や栄養の供給面から、細胞は 200 μm 程度の深さまでしか生存できないといわれているが、本研究で利用した scaffold 内部では、それ以上の深さの場所で 1 ヶ月にもわたり生存が可能であったといえる。これは scaffold の水分の吸収性にも影響したと考えられた。

C-6. 生体組織への細胞移植

近年、細胞移植による組織の治療が盛んに行われるようになってきている。注射針による細胞注入は、組織に広範囲にわたって移植する場合に、何ヶ所にも注射しなくてはならない。 scaffold への細胞播種実験から、細胞を広範囲に注入できることがわかったため、同様の手法でマウス骨格筋に GFP ラベルされた細胞を移植した翌日に組織内を観察した結果を図 22 に示す。組織内には、緑色にラベルされた細胞が散在しており、本研究で用いた細胞播種法は、生体組織に応用しても、細胞が良好に組織内に移植できることがわかった。移植された細胞は 24 時間後においては、注入位置に留まっており、組織外への流出はない様子であった。

本研究では、通常の注射針による注入をコントロールとして行わなかったものの、細胞移植用としても利用可能であることが示唆された。

C-7. スキャフォールドの生体移植

スキャフォールドが生体内に移植された際に再生誘導能があるかを調べるため、心筋外壁にスキャフォールドを移植した。移植時の外観を図 23 に、また、移植したスキャフォールドの HE 染色と EVG 染色結果を図 24 に示す。移植したスキャフォールドは、もともと心臓の内腔側か外壁側かにより組織学的に違いがあり、内腔側をホストの心筋外壁に密着させた方が、移植後の密着性が保たれることがわかったことから (図 25) 以後の実験は、全てスキャフォールドの内腔側面をホスト心筋の外壁に密着する向きで移植した。移植後、2 週間、4 週間、3 ヶ月時に心臓を摘出して、スキャフォールドとその周辺部の組織を実体顕微鏡下で観察、また、HE 染色および MT C 染色して観察した。

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 26)。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 27)。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 27)。

次に、摘出した心臓とスキャフォールドの HE 染色を行なった結果を図 28 から 30 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 28)。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 28)、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 29)。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 30)。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 MTC 染色した結果を図 31a に示す。この染色像から、移植時に手術糸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 31b)。

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

本研究は、脱細胞化スキャフォールドを用いた筋組織再構築のための基礎的検討を

行った。スキャフォールドの利用方法として、生体外での利用、すなわち、細胞を培養して移植片を作製することと、生体内での利用、すなわちスキャフォールドの移植実験に分けられる。さらに、細胞を利用する再生医療には欠かせない、細胞のスキャフォールドへの播種および生体組織への注入に関する検討を行った。

D-1. 生体外筋組織作製の試み

本研究では、生体外での筋組織構築のために、細胞ソースとして、組織から分離した筋芽細胞または骨髄から分離した間葉系幹細胞を用いた。筋芽細胞は、骨格筋の小片から採取できるものの筋芽細胞以外の線維芽細胞の混入もあるため、本研究では細胞の単離が難しく、混入した線維芽細胞の影響が大きく結果に影響したと考えられた。しかし、アメリカの Dennis らのグループは、骨格筋から分離した筋芽細胞と線維芽細胞を決まった割合で混合して、ラット生体内への移植や培養を行うことにより、収縮力をもつ骨格筋小片を作製することに成功している。しかし、筋芽細胞を取得するためには、患者の筋組織を傷つけないとならず、最適な手段とはいいがたい。

本研究では、筋芽細胞のほかに、間葉系幹細胞を用いた筋組織再建も試みた。間葉系幹細胞は骨髄由来であるため、患者への侵襲が少なく、増殖能も高いことから、培養による増幅が可能である。採取した骨髄

からある程度必要細胞数まで増幅させた後に、スキャフォールドに播種して、分化誘導刺激を与えれば、将来的には患者の組織を生体外で作製することも可能になるだろう。

力学的刺激による間葉系幹細胞の分化への影響について、これまでにいくつか報告がある。特に有名なのが、軟骨や骨をターゲットとして、圧縮刺激を加える培養法がある。これに対し、伸縮や伸長などの引張り応力による刺激は最近まで報告がなかった。しかし、これらの研究でも、引張り応力により腱や軟骨を再生できるとの報告が数多く、筋細胞への分化に関してはほとんど報告がない。これに対し、間葉系幹細胞を筋細胞へと分化させるための一般的な培養法として、5-azacytidine による刺激がある。この試薬は、生体では細胞内の cytidine に対するアナログで、DNA や RNA のジメチル化を起こす作用を持つ。したがって、間葉系幹細胞でも筋細胞の分化に関与する遺伝子に作用していることが考えられる。スキャフォールドにて培養した細胞を、5-azacytidine により分化誘導し、それを移植用組織片とするには、5-azacytidine の残留が問題となりかねない。もし、組織内に残留していた場合には、患者の生体内でいずれかの細胞に侵入して、遺伝子を制御する恐れがあり、とても利用可能とはいきれない。したがって、本研究のように、力学的刺激を利用することで、有害化学物質に拠

らない細胞分化は有効性の高い技術であると考えられる。一方、細胞培養には、まだ動物血清を用いているため、基礎研究が発展するにつれ、無血清培養が必須条件となってくることも今後、克服すべき課題である。

D-2. スキャフォールド移植

本研究では、超高静水圧印加処理により脱細胞化した筋組織を移植する実験を行なった。移植後、スキャフォールドには多数の毛細血管が侵入し、明らかな生体反応が認められた。マテリアルを移植すると、程度や最終産物が異なる生体応答が引き起こされる。われわれが用いたスキャフォールドで、ラットを用いた実験では、スキャフォールドは、生体応答を活性化する作用を持っていることが明らかとなった。しかし、炎症は必ずしも悪い傾向ではなく、生体が組織を再生する際には、必ず起こる反応である。本研究ではスキャフォールド移植後に、主にマクロファージなどの血球細胞と、同時に、毛細血管が大量に侵入していくことがわかった。われわれがこれまでに行ってきた、血管や心臓弁といった循環器系の器官では、組織内の細胞成分が完全に除去されていたが、同じ手法を筋組織に適用したところ、細胞内タンパクと考えられる成分が除去しきれいかなかった。これにより、スキャフォールドを移植した場合に炎症が早期に起こったと考えられる。しかし

ながら、移植後の経過観察から、初期にはほとんどがマクロファージ系細胞であったものが、徐々に線維芽細胞様の細胞や、筋細胞のような細胞の形態を示す部分が現れたことから、本研究で観察された程度の炎症は、逆に組織再生能を高めることが可能ではないかと考えられた。また、スキヤフォールド内に侵入した毛細血管は、幹細胞を骨髄などから動員できる器官でもあり、血流に乗ってやってきた幹細胞が、スキヤフォールド内で分化・成熟する可能性も考えられるため、筋組織のような厚みのある組織を再構築させるには、全く不活性なスキヤフォールドを用いるよりも有効である可能性も考えられた。

E. 結論

本研究では、超高静水圧印加処理により脱細胞化した筋組織をスキヤフォールドとして用いた、筋組織再構築のための基礎的検討を行なった。その結果、用いたスキヤフォールドは、生体内で組織再生誘導能を有することがわかった。また、筋芽細胞や骨髄由来間葉系幹細胞のスキヤフォールドを用いた培養の結果、筋芽細胞は筋細胞へと成熟できること、間葉系幹細胞の培養からは、細胞に伸長刺激や伸縮刺激などの力学的引張刺激を行うことにより、筋細胞への分化誘導が可能であることがわかった。したがって、本研究の手法を利用することにより、将来的に移植可能な筋組織を作製

できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

F-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) 江橋 具, 山岡哲二. 血液の細胞：宿敵か救世主か. バイオマテリアル 2008; 1:47-54.
- 3) Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing. High Press Biosci Biotech. 2007; 1(1): 161-5.
- 4) Kimura T, Iwai S, Moritan T, Nam KW, Mutsuo S, Yoshizawa H, Okada M, Furuzono T, Fujisato T, Kishida A. Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery. J Artif Organs. 2007; 10: 104-8.
- 5) 澤田和也, 寺田堂彦, 藤里俊哉. 繊維と

- 線維（生体繊維の洗浄と再生医療への展開）．繊維と工業. 2007; 63(5): 120-4.
- 6) 藤里俊哉, 北村惣一郎. 心臓弁. 笹義人監修. 再生医療工学の技術. シーエムシー出版. 2007; 142-7.
- F-2. 学会発表**
- 1) 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) .
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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) .
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 江橋 具、永谷憲歳、橋本成広、藤里俊哉. 脱細胞化筋スキュ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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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

- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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
- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) 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)
- 26) Fujisato T, Funamoto S, Yoshida K, Yamaoka T, Kimura T, Kikuchi M, Kobayashi Y, Kishida A, Nakatani T. Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation. The 2007 Annual

- meeting of The Society for Biomaterials. Chicago, USA. 2007年4月18日～21日. Transactions of the 32nd Annual Meeting of Society for Biomaterials 2007; 860.
- 27) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Regenerative vascular graft for aortic root reconstruction in porcine model. The Society for Heart Valve Disease 4th Biennial Meeting. New York, USA. 2007年6月15日～18日. Abstract book of The Society for Heart Valve Disease 4th Biennial Meeting 2007; 323.
- 28) 寺田堂彦, 藤里俊哉. 移植用生体弁の力学評価. 平成19年度繊維学会年次大会 第9回生命工学材料とバイオテクノロジーに関するシンポジウム. 東京. 2007年6月20～22日. Fiber Preprints, Japan 2007; 62(2 Symposia): 15.
- 29) 藤里俊哉, 菊地正博, 坂下哲哉, 舟山知夫, 小林泰彦, 船本誠一, 木村剛, 岸田晶夫, 山岡哲二. 放射線照射による脱細胞バイオスキャフォールドの調製. 第2回高崎量子応用研究シンポジウム. 高崎. 2007年6月21～22日. 第2回高崎量子応用研究シンポジウム要旨集 2007; 185.
- 30) 船本誠一, 橋本良秀, 佐々木秀次, 南広祐, 望月 學, 藤里俊哉, 木村 剛, 小林尚俊, 岸田晶夫. 超高压処理技術を応用した人工角膜の作製と評価. 第15回生物関連高圧研究会 20周年記念シンポジウム. 横浜. 2007年9月6～7日. 第15回生物関連高圧研究会 20周年記念シンポジウム要旨集 2007; P-1.
- 31) 寺田堂彦, 藤里俊哉, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 再生型生体弁の特性評価. 日本機械学会 2007年度年次大会. 吹田. 2007年9月9日～12日. 日本機械学会 2007年度年次大会講演論文集 2007; 5: 291-2.
- 32) 山崎健一, 林 宏行, 小林裕之, 宇戸禎仁, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御. 第18回バイオフィロンティア講演会. 福岡. 2007年10月6日～7日. 第18回バイオフィロンティア講演会講演論文集 2007; 23-4.
- 33) Fujisato T, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Tissue Regeneration by Acellular Scaffolds by Detergent-Free Treatment. Joint meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and The 2nd International Federation for Artificial Organs. Osaka.