

17. Marsh, D. Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 355(suppl):S22-30; 1998.
18. Matsumoto, T.; Kawamoto, A.; Kuroda, R.; Ishikawa, M.; Mifune, Y.; Iwasaki, H.; Miwa, M.; Horii, M.; Hayashi, S.; Oyamada, A.; Nishimura, H.; Murasawa, S.; Doita, M.; Kurosaka, M.; Asahara, T. Therapeutic potential of vasculogenesis and osteogenesis promoted by peripheral blood CD34-positive cells for functional bone healing. *Am. J. Pathol.* 169:1440-1457; 2006.
19. Matsumoto, T.; Mifune, Y.; Kawamoto, A.; Kuroda, R.; Shoji, T.; Iwasaki, H.; Suzuki, T.; Oyamada, A.; Horii, M.; Yokoyama, A.; Nishimura, H.; Lee, S. Y.; Miwa, M.; Doita, M.; Kurosaka, M.; Asahara, T. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. *J. Cell. Physiol.* 215:234-242; 2008.
20. Mifune, Y.; Matsumoto, T.; Kawamoto, A.; Kuroda, R.; Shoji, T.; Iwasaki, H.; Kwon, S. M.; Miwa, M.; Kurosaka, M.; Asahara, T. Local delivery of granulocyte colony stimulating factor-mobilized CD34-positive progenitor cells using bioscaffold for modality of unhealing bone fracture. *Stem Cells* 26:1395-1405; 2008.
21. Minami, A.; Kasashima, T.; Iwasaki, N.; Kato, H.; Kaneda, K. Vascularised fibular grafts. An experience of 102 patients. *J. Bone Joint Surg. Br.* 82:1022-1025; 2000.
22. Ono, M.; Kubota, S.; Fujisawa, T.; Sonoyama, W.; Kawaki, H.; Akiyama, K.; Shimono, K.; Oshima, M.; Nishida, T.; Yoshida, Y.; Suzuki, K.; Takigawa, M.; Kuboki, T. Promotion of hydroxyapatite-associated, stem cell-based bone regeneration by CCN2. *Cell Transplant.* 17:231-240; 2008.
23. Quarto, R.; Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Kutepov, S. M.; Mukhachev, V.; Lavroukov, A.; Kon, E.; Marcacci, M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N. Engl. J. Med.* 344:385-386; 2001.
24. Rodriguez-Merchan, E. C.; Forriol, F. Nonunion: general principles and experimental data. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 419:4-12; 2004.
25. Takahashi, T.; Kalka, C.; Masuda, H.; Chen, D.; Silver, M.; Kearney, M.; Magner, M.; Isner, J. M.; Asahara, T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 5:434-438; 1999.
26. Tondreau, T.; Meuleman, N.; Delforge, A.; Dejeneffe, M.; Leroy, R.; Massy, M.; Mortier, C.; Bron, D.; Lagneaux, L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 23:1105-1112; 2005.
27. United States Food and Drug Administration. Guidance Document for the Preparation of Investigational Device Exemptions and Pre-market Approval Applications for Bone Growth Stimulator Devices. Rockville, Maryland: United States Food and Drug Administration; 1988.
28. Zou, X. H.; Cai, H. X.; Yin, Z.; Chen, X.; Jiang, Y. Z.; Hu, H.; Ouyang, H. W. A novel strategy incorporated the power of mesenchymal stem cells to allografts for segmental bone tissue engineering. *Cell Transplant.* 18:433-441; 2009.

Figure legends

Fig. 1: Pre-operative radiograph and 3 dimensional (3D)-computed tomography (CT).

Anteroposterior radiograph (left panel) led to a diagnosis of noninfected defect type nonunion showing no bridging of four cortical sides. This finding was supported by 3D-CT (right panel).

Fig. 2: Intra-operative findings

Following refreshing fibrous tissue at the nonunion site and the surrounding cortical bone and grafting autologous iliac bone, CD34⁺ cells dissolved in 5 ml of atelocollagen gel were locally administered into the fracture site (bone defect site).

Fig. 3: Post-operative radiograph and 3D-CT

Twelve weeks after the treatment, anteroposterior radiograph (left panel) provided diagnosis of achieved union showing the bony bridging in three of four cortical sides. The radiographical diagnosis was supported by 3D-CT (right panel).

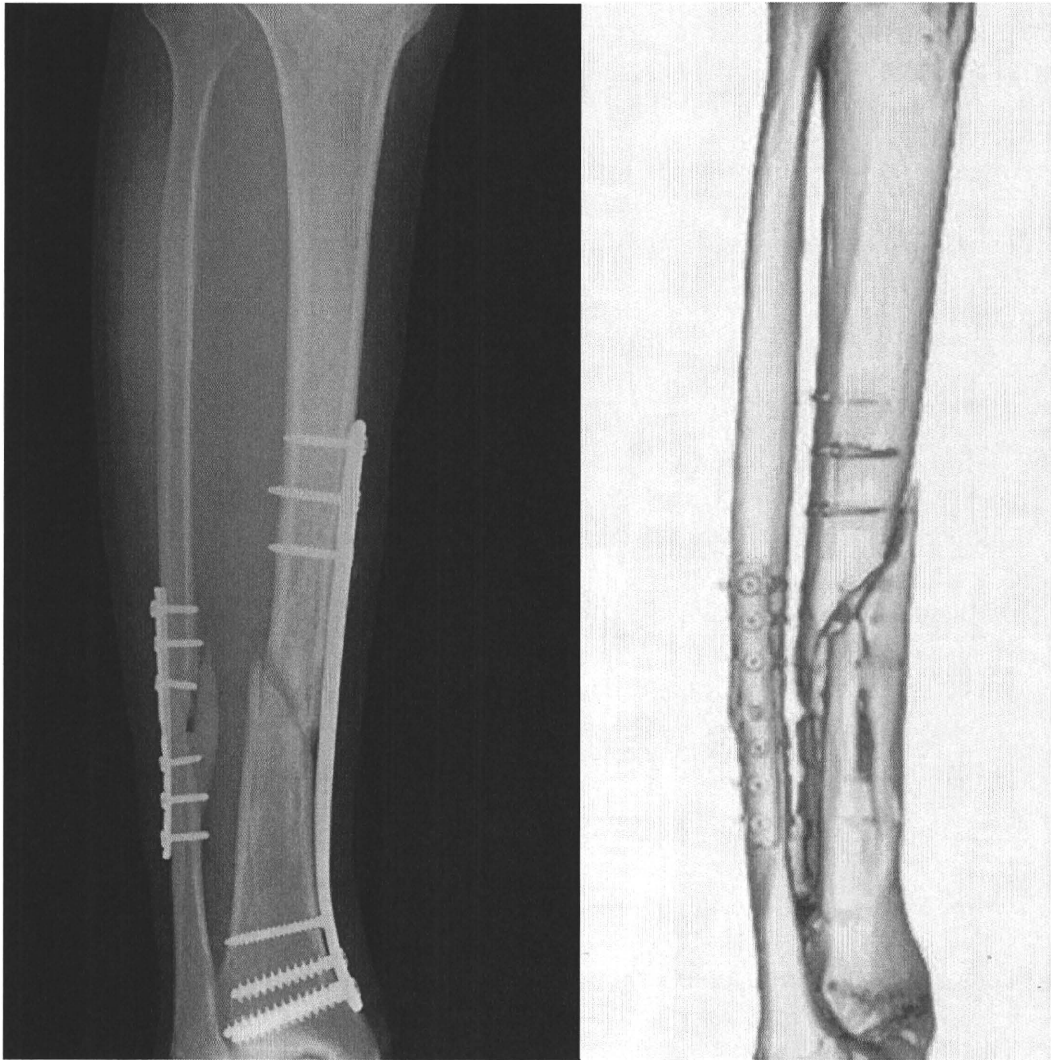


Figure 1

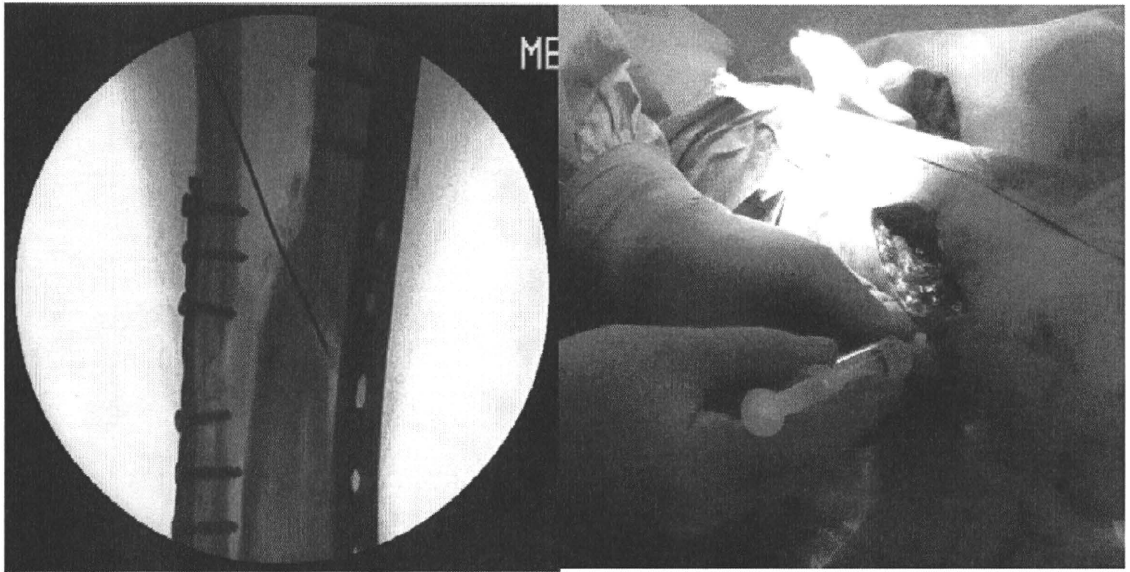


Figure 2

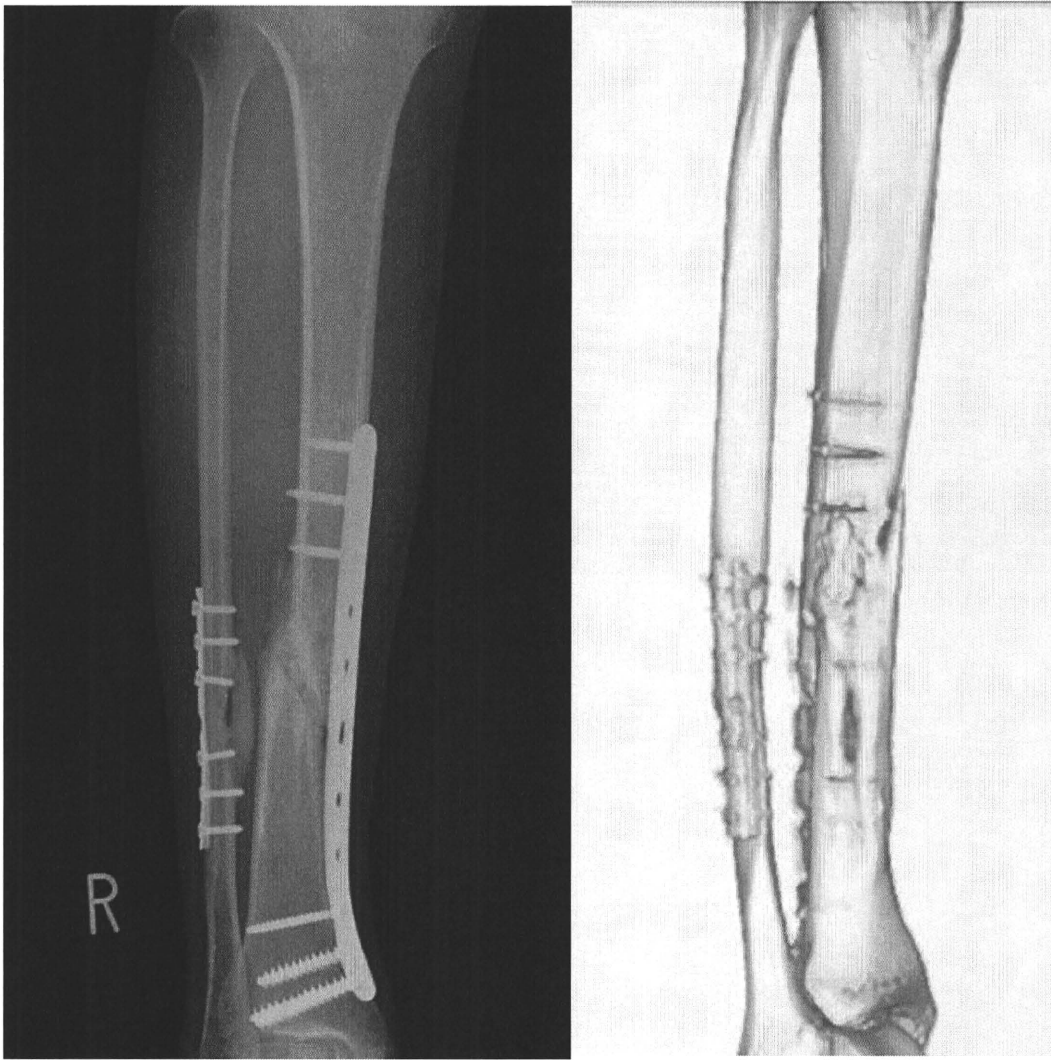


Figure 3

Oral Presentation (English) 80 (OE80) (M)

Molecular Biology / Genetics, Myocardium (Basic)

March 20 (Sun) 13:50 - 15:20

Room16 (Pacifico Yokohama, Annex Hall 2F F202)

OE-475

Endothelial Progenitor Cell Injection Augments Therapeutic Effects of Cardiac Progenitor Cell Sheet Transplantation into Rat Myocardial Infarction Model

Takenori Matsuda

Takenori Matsuda¹

Daisuke Yoshioka¹, Shigeru Miyagawa¹, Miki Komatsu², Hiroshi Akimaru², Atsuhiko Saito¹, Atsuhiko Kawamoto², Takayuki Asahara², Yoshiki Sawa¹

Cardiovascular Surgery, Osaka University, Osaka¹, Institute of Biomedical Research and Innovation, Kobe²

Human cardiac progenitor cells (CPCs) have cardiomyogenic potential but relatively less angiogenic potential in myocardial infarction (MI) model. Because angiogenesis is critical for tissue regeneration, augmented angiogenesis will be needed for robust myocardial regeneration with CPCs. On the other hand, human endothelial progenitor cells (EPCs) have angiogenic potential. In addition, we adopted cell sheet technology to improve CPC survival and integrity after transplantation. Our hypothesis is co-injection of EPCs augments the therapeutic effects of CPC sheet transplantation into MI model. We used commercially available G-CSF mobilized peripheral blood-derived CD34 positive cells as EPCs. We derived CPCs (FACS-sorted C-Kit positive cells) from human heart sample with collagenase digestion under informed consent and ethical committee-approved methods. FACS analysis revealed 12.7% of the transplanted cells were C-Kit positive. Two weeks after LAD ligation, two CPC sheets were transplanted onto a nude rat heart then 10^5 of EPCs were injected at the border zone. Echo analysis revealed EPC co-injection augments therapeutic effects in percent fractional shortening upon 2 weeks after transplantation [No intervention vs. CPC sheet vs. CPC sheet+EPC injection (2 weeks - pre transplantation) = -3.3 ± 2.2 vs. 1.6 ± 1.8 vs. 10.8 ± 2.2 , $p=0.0145$ vs. CPC sheet, Tukey-Kramer HSD, $n=5-7$]. These results have implied that EPC co-injection augments therapeutic effects of CPC sheet for rat sub-acute MI model.

Vascular network formation in cell sheet transplantation and bioengineered three-dimensional tissues

Katsuhisa Matsuura, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano

Institute of Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University

Cell transplantation has been used for myocardial ischemia as new therapeutic strategies. Since cell transplantation has been reported to induce angiogenesis through paracrine mechanisms, tissue-like morphology of cell sheet is suitable for engraftment, which lead to enhance angiogenesis for the long period. Recently we have reported that cardiac Sca-1(+) cell sheet transplantation improved the cardiac function of myocardial infarction model though in part VCAM-1/VLA-4 signaling-mediated angiogenesis. Endothelial cell co-cultured tissue-engineered cardiomyocytes sheets improved the cardiac function of ischemic heart and blood vessels originating from the engineered endothelial cell/cardiomyocyte tissue bridged into the infarcted myocardium to connect with capillaries of the host heart. We previously reported to construct 3-D cell-dense tissues by stacking cell sheets, however poor vascularization remains a major obstacles in bioengineering cell-dense tissues, limiting the viable size of constructs due to hypoxia, nutrient insufficiency and waste accumulation. Since repeated transplantation of triple-layer grafts enabled to create about 1 mm thick tissue with well organized microvascular network in vivo, we next challenged to fabricate microvasculature in vitro. Endothelial cell co-culture in 3-D tissue introduced endothelial cell networks and some cells formed tube-like structure. Furthermore when the 3-D tissues were transplanted in vivo, these vascular networks contributed to rapid blood supply via blood vessel connections between host and graft. Now, the increase of thickness of 3-D tissue using continuous media perfusion through in vitro fabricated endothelial cell networks is next challenge.

1P-051 心筋再生治療のためのヒト心臓由来C-Kit陽性細胞に対する維持培養法の検討

松田 剛典^{1,2,3}, 宮川 繁¹, 秋丸 裕司², 小松-堀井 美希², 齋藤 充弘⁴, 川本 篤彦², 浅原 孝之^{2,5}, 澤 芳樹^{1,4}

¹大阪大学大学院 医学系研究科 心臓血管外科, ²先端医療振興財団 血管再生研究グループ, ³日本学術振興会 特別研究員 (DC1), ⁴大阪大学医学部附属病院 未来医療センター, ⁵東海大学医学部 再生医療科

【背景】新たな心筋再生療法として、ヒト心臓前駆細胞を用いた治療法の開発が行われているが、その維持培養方法の検討は十分に行われておらず、臨床応用の上でその検討が重要な課題である。

【目的】ヒト心臓由来C-Kit陽性細胞における維持培養条件を最適化すること

【方法】FACSを用いて単離したC-Kit陽性細胞を用いて、C-Kit陽性率の変動に寄与していると考えられた播種細胞数 (2×10^4 , 8×10^4 または 3.2×10^5 cells/100mm dish) と1継代当りの培養日数 (3, 4, 5日間) に関して検討を行った。また、上記3つの播種細胞数で5日間培養したサンプルを用いて、Real Time PCRに依り、遺伝子発現レベルを比較した。

【結果】 2×10^4 cells/dish, 5 days/passageという条件において、他の条件に比して有意にC-Kit陽性率の低下と細胞倍化時間の遅延を抑制した。Real Time PCR解析の結果、 2×10^4 cells/dishの条件に比して 3.2×10^5 cells/dishの条件において、血管平滑筋細胞マーカー、血管内皮細胞マーカー、さらにストレス応答性遺伝子の発現が有意に亢進していた。

【結語】 2×10^4 cells/100mm dish, 5 days/passageという条件で最も効率的にヒト心臓由来C-Kit陽性細胞を維持培養可能である事が示唆された。

1P-088 ヒトc-kit陽性心筋幹細胞を用いた分化心筋・血管ハイブリッドシートの心筋梗塞モデルへの治療効果

秋丸 裕司¹, 堀井 美希¹, 岩崎 弘登¹, 松田 剛典², 川本 篤彦¹, 澤 芳樹², Piero Anversa³, 浅原 孝之^{1,4}

¹先端医療センター 血管再生研究グループ, ²大阪大学大学院 医学系研究科 心臓血管外科, ³Harvard Medical School, ⁴東海大学医学部 基盤診療学系 再生医療科

ヒト心筋幹細胞 (CSC: Cardiac Stem Cell) はc-Kit, Sca-1ホモログ, sphere形成などを指標に同定されている。我々は外科的手術により摘出された心臓片から接着増殖培養法によりc-Kit陽性CSCを単離した後、温度応答性培養皿上にて血清非存在下、dexamethasoneによる心筋・血管への分化誘導と同時に分化細胞を細胞シート化する培養条件を確立し、さらに心筋梗塞ラットへの心機能改善効果を検証した。作製した心筋・血管シートは転写因子Nkx2.5, GATA-4, Isl-1や収縮蛋白質cTnIの発現が未分化CSCに比べて有意に増加していることが確認された。一方、血管内皮マーカーであるKDR, VE-cadは分化誘導に従って減少したが、PECAMI, Tie-2は亢進が認められた。in vitroで心筋・血管シートを酸化ストレスに暴露した後にdehydrogenase活性とKi67の発現を調べた結果、細胞生存活性と増殖活性が亢進していることから酸化ストレスに耐性を持つことが分かった。未分化CSCシートではこのような抵抗性は認められなかった。それぞれの細胞シートを積層化して慢性心筋梗塞ラットに移植して治療効果を調べたところ、移植2週間後の左室収縮能および局所壁運動指標が移植なしの対照群に比べていずれの細胞シート移植群でも改善した。心筋・血管シートの細胞数はCSCシートの細胞数の5分の1で作製可能なことから、少ない細胞数で酸化ストレスに耐性を有し、心筋梗塞に対して有効な治療効果を示すことが分かった。

FRI/SAT #Y 37

DEVELOPMENT OF IN VITRO SINGLE CELL-BASED CULTURE SYSTEM TO ASSESS STEM CELL FATE INTO ENDOTHELIAL LINEAGE

*Masuda, Haruchika. Cantas, A. Ito, Rie. Shizuno, Tomoko.
Akimaru, Hiroshi. Asahara. Takayuki,*

Dept of Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine
Isehara, Japan. Lab for Early Embryogenesis, RIKEN Center for
Developments/Biology, Kobe, Japan

Background; Over the last decade, various studies have disclosed the critical role of CD34+ or CD133+ hematopoietic stem cell population in postnatal vasculogenesis, as the source of bone marrow (BM) derived endothelial progenitor cell (EPC). The population after mobilization from BM, experiences the biphasic aspects of nonadhesive circulating fate to adhesive. In the foci of postnatal vasculogenesis, then finally functions as tissue recruited EPC exerting neo-angiogenesis. However, the assessment of vasculogenic feature in the circulating stem cell is hampered due to the absence of an assay system to precisely evaluate EPC differentiation potential from the stem cell fraction. Here, we report an in vitro assay system combining nonadhesive liquid culture of the stem cell with the following adhesive culture to chase the cell fate into EPC. **Methods and Results;** Single umbilical cord-blood (UCB)-CD133+ cells were cultured with or without nonadhesive culture (NAdC) for 7 days in STEMSPAN liquid medium containing VEGF, Flt-3 ligand, TPO, SCF and IL6. Then, the cultured cells were subsequently cultured for 18 days in methylcellulose medium for the numerical assessment of adhesive clonogenicity of primitive and definitive EPC-CFU (pEPC-CFU and dEPC-CFU) reflecting nonadhesive EPC differentiation hierarchy as EPC colony forming assay (EPC-CFA). Single UCB-CD133+ cells at post NAdC exhibited the augmented potential not only of commitment into endothelial lineage from 25% to 38%, compared to pre NAdC by evaluating the frequency of the single cells producing pEPC-CFU and/or dEPC-CFU. Further, the differentiation potential was enhanced from 5% to 18% in the frequency of the single cells producing dEPC-CFU together with 20% to no in pEPC-CFU. **Conclusion;** Our in vitro EPC assay system allows us to enumerate the vasculogenic fate of stem cell in nonadhesive phase in in vivo circulation or ex vivo culture, condition, therefore contributes to the precise understanding of EPC biology.

心筋のティッシュエンジニアリング

Myocardial tissue engineering



清水達也

Tatsuya SHIMIZU

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

◎重症心不全に対するあらたな治療法として、細胞浮遊液を不全心筋組織内に注入する再生治療が臨床応用されている。しかし移植場所の制御が困難なことや流出・壊死により細胞が損失するため、効率的な移植ができていないという課題もある。そこで近年、より有効な治療法として注目されているのがティッシュエンジニアリングを用いた再生医療である。ティッシュエンジニアリングには、生体吸収性の高分子(スキャフォールド)に細胞を播種して組織化する方法や、シート状の細胞を積層することで組織化する方法がある。これらの組織を心臓へ移植することで、細胞浮遊液の注入より効率的な細胞移植が実現しており、虚血心筋モデルや拡張型心筋症モデルでの心機能改善効果が確認されている。さらにティッシュエンジニアリングにより、心筋細胞を用いて収縮弛緩する三次元組織再生の研究開発もはじまっており、その発展に大きな期待が寄せられている。



Key Word : ティッシュエンジニアリング, 細胞シート, スキャフォールド

近年、循環器領域における再生医療の発展はめざましく、虚血性心疾患や拡張型心筋症に対するあらたな治療法として注目され、すでに自己の骨髄由来細胞や筋芽細胞を不全心筋組織内に細胞浮遊液として注入することにより、血管あるいは心筋組織を再生させる治療法が臨床応用されている。一方、細胞の投与方法として、ティッシュエンジニアリングの技術により細胞を組織として移植することで、より効率的に不全組織を再生させる方法が追究されている。さらに幹細胞研究とティッシュエンジニアリングの進展により、収縮弛緩する心筋組織そのものを細胞から再構築する研究開発も世界的に開始されており、重症心不全に対する次世代再生医療として期待されている。

本稿では、心筋再生医療におけるティッシュエンジニアリングについてその現状と課題を概説するとともに、日本発世界初のティッシュエンジニアリング技術“細胞シート工学”について述べる。

ティッシュエンジニアリング

ティッシュエンジニアリングの概念はアメリカ

の工学者 Langer と外科医 Vacanti らが共同で提唱したもので、医工学の融合により生まれた学問である。組織・臓器の再生には、①細胞、②細胞の足場となる細胞外マトリックス(ECM)、および③細胞の分化・増殖のための液性因子が必要であると考え、その足場を生体吸収性の高分子(スキャフォールド)を用いて作製した。その生体吸収性スキャフォールドに細胞を播種・培養した後、生体へ移植すると、生体内ではスキャフォールドが酵素分解あるいは加水分解によって徐々に分解・吸収され、細胞が産生する ECM と置換されるため、生体と同様の組織が再生できるというものである。スキャフォールドとしてはコラーゲン、ゼラチン、アルギン酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、およびそれらの共重合体などが用いられる。製造工程としては、あらかじめ作製した生体吸収性高分子からなるスキャフォールドを足場として細胞を播種する手法がもっとも頻繁に用いられている(図 1-A)。また溶液状のスキャフォールド材料と細胞を混合した後に直接不全部に注入したり、モールドに流し込んで重合ゲル化する手法もある

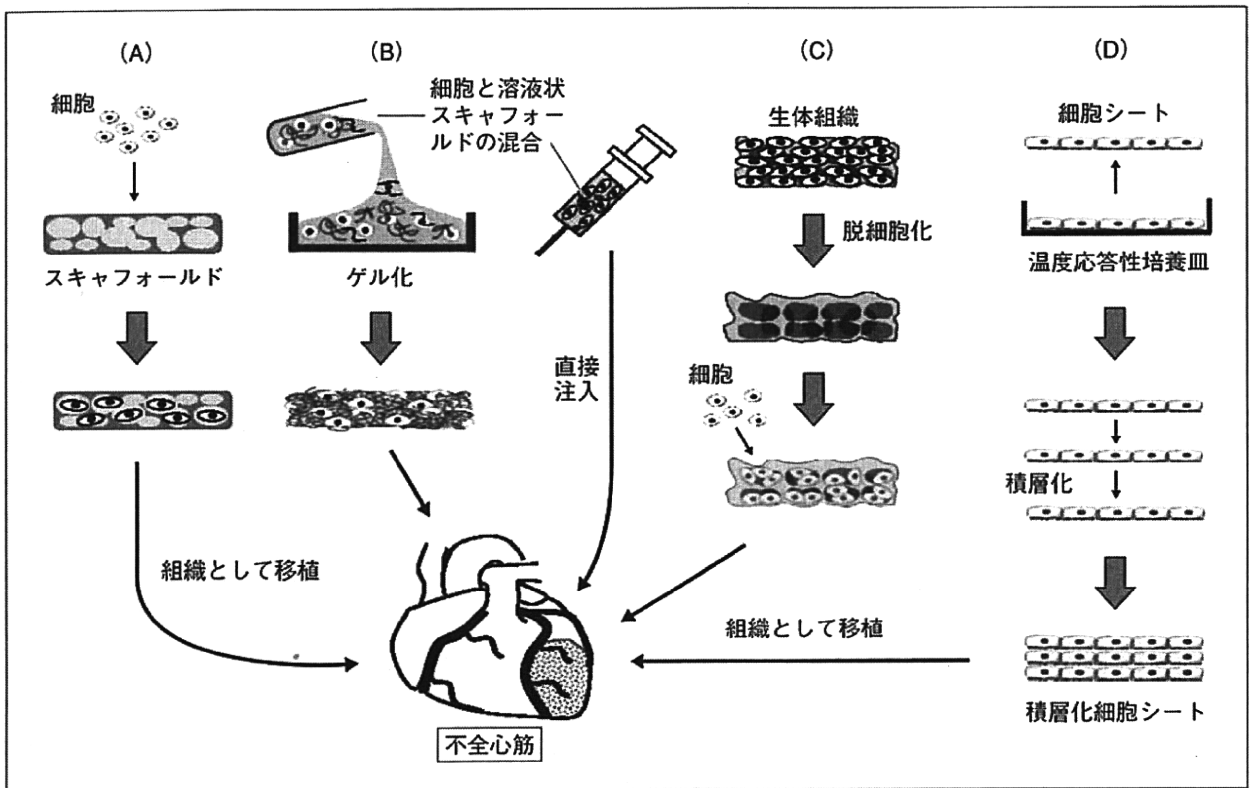


図 1 ティッシュエンジニアリングによる心筋再生医療

(図 1-B). 生体組織を脱細胞化した ECM そのものをスキャフォールドとして使用し、目的の細胞を再度播種することで組織化する試みも行われている(図 1-C). これらの手法により生体のさまざまな組織・臓器の再生が試みられており、皮膚、角膜、軟骨、膀胱、血管に関してはすでに臨床応用が行われている。

細胞シート工学

ティッシュエンジニアリングの技術の大きな利点は、細胞注入療法で課題となっている細胞の流出や壊死による細胞の損失を克服できることや、形のあるものを再生して組織・臓器と置換できることにある。しかし、スキャフォールドを使用する方法では、内部へ十分な細胞を播種することが困難であり、その結果細胞密度が低く結合組織の多い不均一な組織が再生されることになる。またスキャフォールド分解時に炎症反応を惹起することも課題としてあげられている。そこでこれらの問題を克服する方法として注目されているのが、スキャフォールドを用いることなしに細胞の組織化を実現する“細胞シート工学”である¹⁾。インテ

リジェント培養基材“温度応答性培養皿”を用いることでシート状の細胞を作製し、この二次元的な細胞シートをひとつの組織として移植したり積層化することにより三次元組織を再生したうえで病変部に移植することが可能である(図 1-D)。

細胞シート回収には、温度降下処理のみで細胞に損傷を与えることなく脱着させることのできる温度応答性培養皿を用いる。この基材は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(PIPAAm)を電子線を用い通常のポリスチレン培養皿表面に厚さ 20~30 nm で共有結合したもので、培養温度(37°C)では疎水性の表面となるため、細胞が接着するのに対し、温度降下処理(32°C以下)により親水化するため、細胞が培養皿表面から膜蛋白や細胞接着分子とともに損傷を受けることなく脱着する。細胞をコンフルエントな状態に培養した場合は細胞と細胞が直接あるいは細胞外マトリックスを介してたがいに接着している。トリプシンやディスパーゼなどの蛋白分解酵素を用いた通常の細胞回収法では、細胞と培養皿の接着が解離するとともに細胞間接着も破壊されるため、細胞はばらばらになって浮遊することになる。

一方、温度応答性培養皿上での温度降下処理においてはこの細胞間接着にはまったく影響を与えないため、培養皿と細胞の接着のみが解離し細胞をシート状に回収することが可能である。また生体吸収性スキャフォールドを用いることなく細胞シート(「サイドメモ」参照)を積層化することで三次元組織を再構築でき、スキャフォールドを用いた場合には作製困難であった高細胞密度の組織再生が可能となっている。すでにこの培養皿を用い、種々の細胞シートの回収・移動・積層化・移植が可能となっている²⁾。

細胞を用いた心筋再生医療の現状と課題

重症心不全に対する細胞移植療法はすでに1,000人を超える患者に実施されている。不全心筋に注入する細胞として当初より着目されたのが、筋芽細胞である。筋芽細胞は自己の筋肉組織から採取が可能であり虚血に対して耐性があることから使用されてきた。しかし不整脈により死亡した症例があったため、抗不整脈薬や植込み型除細動装置の併用が必要となり、さらにその後、フェーズII試験(MAGIC II)が行われたが、有意な心機能

サイド メモ

細胞シートの臨床応用

角膜疾患に対しては自己の角膜あるいは口腔粘膜上皮細胞シートの移植が臨床応用され、失明した患者の視力が回復しており、ドナー角膜移植に代わる治療法として注目されている。現在フランスで治験がスタートしており、ヨーロッパでの普及が見込まれている。また早期表在食道癌に対する内視鏡的な粘膜除去術後には粘膜創傷治癒過程における狭窄が合併症として問題になっており、頻回のブジーを余儀なく行う場合もあり、患者にとっては負担になっている。そこで粘膜除去術直後に自己の口腔粘膜上皮細胞シートを移植することで創傷治癒を促進し狭窄を防止できる。この治療法も臨床研究がはじまっており、患者の quality of life の向上が期待できる。循環器領域では拡張型心筋症に対する自己筋芽細胞シートの臨床応用も国内で開始されている。そのほか歯周病、気胸、肝疾患など数多くの不全組織・臓器に対する細胞シート移植の研究が行われ、早期の臨床応用に期待が寄せられている。

改善効果が認められなかったため、現在中断となっている³⁾。一方、開胸下でなくカテーテルを用いて自己筋芽細胞を心室内腔より注入する手法でいくつかの治験が継続中であり、筋芽細胞を用いた細胞注入療法の有効性の判断に関してはそれらの結果を待つ必要がある。

筋芽細胞同様、免疫拒絶や倫理的問題がない細胞ソースとして注目されてきたのは骨髄由来の細胞である。それぞれの採取法によりその分画に相違はあるが、すでに多くの臨床研究が行われ有効性が示されつつある⁴⁾。もっとも数多く行われている手法としては、採取した骨髄から単核球分画を遠心操作のみで採取しカテーテルを用いて経冠動脈的に注入する手技である。これまでに左室駆出率(EF)が平均して2.9%改善することが報告されているが、有意な改善は認められなかったとする報告もあり、移植するタイミングや移植細胞数によって効果に差異がある可能性も指摘されている⁴⁾。

細胞浮遊液の注入による移植法において経時的な細胞死を評価した研究では、注入した細胞の90%以上が失われている可能性があるとされている⁵⁾。さらに、¹⁸F-FDGでラベルした骨髄由来細胞を移植した患者のPET画像において心臓にとどまっている細胞はわずか3%だけであり、多くは肝や脾にトラップされていることが示されており、細胞注入療法の問題点が明確になっている⁶⁾。そこでこの課題の解決に向けて、ティッシュエンジニアリングにより細胞を組織として不全心筋部に移植する研究が行われている。

スキャフォールドを用いたティッシュエンジニアリング技術による心筋再生医療として、コラーゲンスポンジに骨髄由来間葉系幹細胞を播種した組織や生体吸収性のバイクリルメッシュに線維芽細胞を播種した組織を不全心筋に縫合貼付する臨床研究や治験が海外においてははじまっている^{7,8)}。ティッシュエンジニアリングの技術の大きな利点は、細胞注入療法で課題となっている細胞の流出や壊死による細胞の損失を克服できることである。しかし、スキャフォールドを使用する方法では内部へ十分な細胞を播種することが困難であったり、惹起される炎症反応により結果として細胞

密度が低く結合組織の多い不均一な組織が再生されることになるといった問題点も生じており、スキヤフォールドの多孔性の向上や成分・組成の調整による生体吸収性の制御が追究されている。

● 細胞シートを用いた心筋再生医療

スキヤフォールドそのものに起因する問題点を克服する手法として、前記した細胞シート工学の心筋再生医療への応用が世界的な注目を集めている。シート状の組織として不全心筋に移植することで、より効率的に細胞を移植することが可能となっている。ルシフェラーゼ遺伝子を導入したラット心筋細胞の心筋梗塞モデルへの直接注入と細胞シート移植を *in vivo* imaging system により経時的に比較したところ、移植直後よりその生着度に明確な差が認められ、移植した細胞シートが梗塞部に長期にわたって生着していることが明らかとなった。また、細胞浮遊液移植群に比べ細胞シート移植群のほうが虚血によって低下した心機能をより改善することも確認された⁹⁾。また臨床応用が可能な細胞として筋芽細胞シートや脂肪組織あるいは月経血由来の間葉系幹細胞シート移植により心機能が改善することが確認されている¹⁰⁻¹²⁾。

これらの研究では VEGF や HGF など種々のサイトカインの安定かつ持続的な分泌による強力な血管新生促進や stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) などによる幹細胞動員が心機能の改善に寄与している可能性が示唆されている。心筋内幹細胞を用いた細胞シート移植の研究においては、VCAM-1/VLA-4 シグナルを介した血管新生や細胞死の抑制により心機能が改善することも示されている¹³⁾。一方、虚血モデルのみならず心筋症ハムスターモデルおよびイヌ持続的高速ペーシングモデルへの筋芽細胞シート移植により心機能が改善することが確認され、細胞シート移植の拡張型心筋症への適応の可能性が示された^{14,15)}。これらの成果をもとに大阪大学心臓血管外科(澤教授)において、左室補助装置を装着した拡張型心筋症の患者に対する自己筋芽細胞シート移植の臨床試験が開始されており、その効果が期待されている。

虚血部への血管内皮細胞の供給および移植した

細胞シートそのものへの血管新生促進を目的として、血管内皮細胞あるいはその前駆細胞を共培養した細胞シートの移植研究も行われている。ラット線維芽細胞と血管内皮前駆細胞(EPC)の共培養積層化細胞シートを心筋梗塞モデルへ移植したところ、線維芽細胞シート単独移植群および EPC 浮遊液注入群に比べ血管新生促進・線維化抑制効果が向上し、心機能もより改善した¹⁶⁾。またラット心筋細胞シートに関しても内皮細胞を共培養することで心機能がより改善することが明らかとなった¹⁷⁾。いずれの場合も、ともに移植した EPC や血管内皮細胞が血管構成細胞として再生組織内における血管新生に寄与していることが示された。

このように重症心不全に対する細胞シート移植は種々の細胞、種々の動物モデルにおいてその有用性が示されており、今後の臨床応用の成果に期待がかかる。

● 拍動する心筋組織の再生

細胞の注入療法、そしてより効率的な組織移植に続く次世代の再生医療として、ティッシュエンジニアリングの技術を用いることで物理的に収縮弛緩する心筋組織そのものを再生し移植する試みがはじまっている。脱細胞化したラット心臓にラット心筋細胞を再度播種することで収縮・弛緩する心臓を再生しうるということが Ott らにより示されている¹⁸⁾。これに関してはブタ心臓での脱細胞化が試みられているが、スケールアップにより細胞をいかに内部まで播種するかが課題となっている。一方、Zimmermann らのグループは、コラーゲン溶液とラット心筋細胞を混和しシリコンモールド内で培養することにより収縮・弛緩する心筋組織の再生に成功している。彼らはリング状あるいはパウチ状の心筋組織を作製し心臓に移植することを試み、その有効性を確認しており、今後さらなる発展が期待できる¹⁹⁾。

著者らも細胞シートを用いて機能的な心筋組織を再生する研究を展開してきた(図 2)²⁰⁾。ラット心筋細胞シートを重層化する研究では、2枚の心筋細胞シートは重層化後およそ 30 分という短時間内で同期を開始することが明らかとなった²¹⁾。さらに心筋細胞シートを積層化したところ、心筋

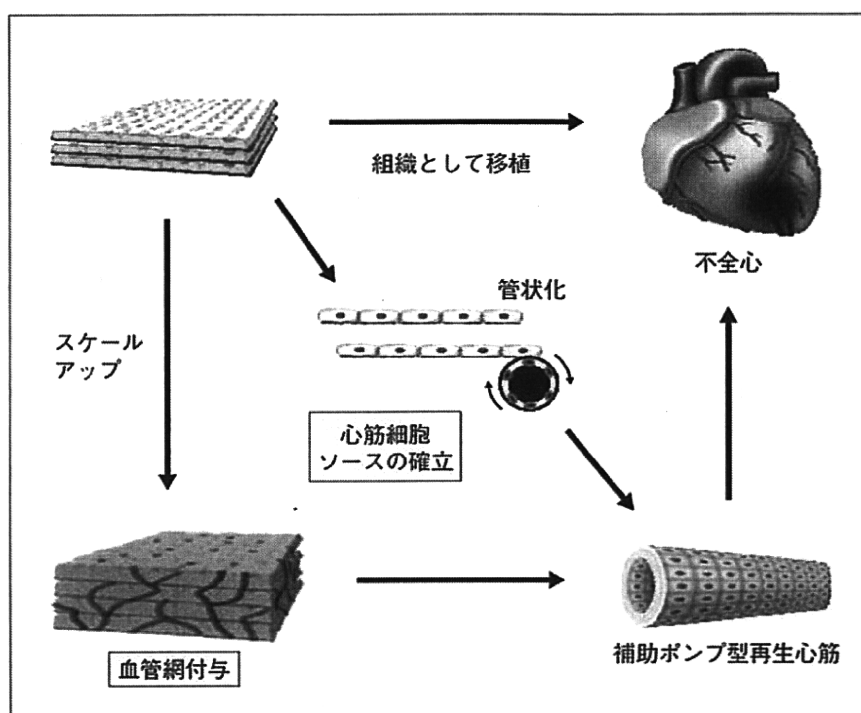


図 2 細胞シートを用いた心筋再生医療

細胞シートは *in vitro* において肉眼レベルで同期して自律拍動を開始した。さらに免疫不全ラットの皮下組織に積層化心筋細胞シートの移植を行ったところ、移植した組織は皮下組織で自律拍動を維持するとともに、組織切片上、発達した横紋構造・介在板・豊富な毛細血管網を伴った心筋様組織が再生され、1年以上拍動を維持して生存することが示された^{22,23)}。

次なる課題として、より収縮力が強く高機能な心筋組織の再生には血管網を付与し再生組織の厚みの増大を図る必要がある。心筋組織では血管網が約 10%の体積を占有しており、組織内毛細血管相互の距離も約 $15\mu\text{m}$ ときわめて高密度な血管網が形成されている。毛細血管網を伴わず培地や間質液の拡散のみで生存できる心筋組織の厚さは $100\mu\text{m}$ 程度であり、それ以上の厚みのある心筋組織の再生には新規技術開発が必要となっている。血管網付与によるスケールアップはティッシュエンジニアリングの研究フィールドにおける共通の課題であり、著者らも細胞シート工学を基盤として多面的なアプローチで再生組織内の血管網新生に取り組んでいる。ラット心筋細胞と内皮細胞を共培養した細胞シート内では血管内皮細胞のネットワーク構造が形成され、それらが移植後

の血管新生を促進させるとともにより厚い心筋組織の再生が可能であることが明らかとなっている²⁴⁾。

さらに *in vivo* においては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あら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、厚さ約 1 mm (3層×10回)、しかも同期して自律拍動する心筋組織を再生することを可能とした。さらに縫合可能な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も可能であることを示した²⁵⁾。これは生体の再生能力を利用した方法であるが、現在 *in vitro* で厚い組織を再生する研究を展開している。

心筋再生医療の課題と展望

心筋再生医療の研究開発は飛躍的に進んでおり、近い将来、重症心不全に対する治療法のひとつとして多くの患者を救うことが期待される。しかし、心機能改善効果のメカニズムに関して不明な点も多く、細胞種や投与方法に関する比較も不十分であり、基礎研究者と臨床医がたがいにコミュニケーションをとり合いながら心筋の再生医療を進展させていくことが肝要であろう。そのなかで

ティッシュエンジニアリングにより組織として細胞を移植することの有用性は明確になりつつあり、今後の発展が期待できる。

また次世代の心筋再生医療として、収縮・弛緩する心筋組織そのものを再生する試みに関しては、ヒト心筋細胞を大量に分化誘導する技術、血管網付与によるスケールアップ技術の確立が必須となっているが、前者に関してはES/iPS研究が飛躍的に進歩しており、後者に関してもティッシュエンジニアリング技術によりその可能性が示されていることから、十分実現可能ではないかと考えられる。さらに補助ポンプとなりうるチューブ状の心筋組織を再生する試みもはじまっており^{26,27)}、将来的にはティッシュエンジニアリングにより心臓移植の代替となるような組織・臓器の創生も夢ではないと考える。

文献

- 1) Shimizu, T. et al. : *Biomaterials*, **24** : 2309-2316, 2003.
- 2) Yang, J. et al. : *Biomaterials*, **28** : 5033-5043, 2007.
- 3) Menasche, P. et al. : *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **20** : 131-137, 2008.
- 4) Martin-Rendon, E. et al. : *Eur. Heart J.*, **29** : 1807-1818, 2008.
- 5) Zhang, M. et al. : *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **33** : 907-921, 2001.
- 6) Hofmann, M. et al. : *Circulation*, **111** : 2198-2202, 2005.
- 7) Chachques, J. C. et al. : *Cell Transplant.*, **16** : 927-934, 2007.
- 8) Mirsadraee, S. et al. : *Tissue Eng.*, **12** : 763-773, 2006.
- 9) Miyagawa, S. et al. : *Transplantation*, **80** : 1586-1595, 2005.
- 10) Memon, I. A. et al. : *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **130** : 1333-1341, 2005.
- 11) Miyahara, Y. et al. : *Nat. Med.*, **12** : 459-465, 2006.
- 12) Hida, N. et al. : *Stem Cells*, **26** : 1695-1704, 2008.
- 13) Mathuura, K. et al. : *J. Clin. Invest.*, **119** : 2204-2217, 2009.
- 14) Kondoh, H. et al. : *Cardiovasc. Res.*, **69** : 466-475, 2006.
- 15) Hata, H. et al. : *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **132** : 918-924, 2006.
- 16) Kobayashi, H. et al. : *J. Artif. Organs*, **11** : 141-147, 2008.
- 17) Sekine, H. et al. : *Circulation*, **118** : S145-S152, 2008.
- 18) Ott, H. C. et al. : *Nat. Med.*, **14** : 213-221, 2008.
- 19) Zimmermann, W. H. et al. : *Nat. Med.*, **12** : 452-458, 2006.
- 20) Masuda, S. et al. : *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60** : 277-285, 2008.
- 21) Haraguchi, Y. et al. : *Biomaterials*, **27** : 4765-4774, 2006.
- 22) Shimizu, T. et al. : *Circ. Res.*, **90** : e40-e48, 2002.
- 23) Shimizu, T. et al. : *Tissue Eng.*, **12** : 499-507, 2006.
- 24) Sekiya, S. et al. : *J. Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, **341** : 573-582, 2006.
- 25) Shimizu, T. et al. : *Faseb J.*, **20** : 708-710, 2006.
- 26) Sekine, H. et al. : *Circulation*, **114** : I87-I93, 2006.
- 27) Kubo, H. et al. : *Biomaterials*, **28** : 3508-3516, 2007.

* * *

