

平成17年度戦略的技術開発委託費
医療機器ガイドライン策定事業
(医療機器に関する技術ガイドライン作成のための支援事業)

医療機器評価指標ガイドライン
再生医療分野（心筋シート）
開発WG報告書

平成18年3月

独立行政法人 産業技術総合研究所

目次

1. 当該技術分野の概要	1
2. ガイドライン作成の意義	3
3. ガイドライン検討過程	5
4. 調査アンケートの集計結果	8
5. 平成17年度のガイドライン検討結果	49
5.1 自己由来培養筋芽細胞シートの再生医療における安全性・信頼性を保証 するための(品質管理)試験項目	49
5.2 前臨床試験における安全性・有効性・科学性を評価するための試験項目	51
5.3 臨床プロトコル案	53
6. 今後への提言	57

参考資料

1. 開発WGの構成と議事録概要	59
2. 文献資料	72

1. 当該技術分野の概要

再生医療は、不可逆的臓器不全や欠損に対する完全治癒を目指す。この目的を達成するためには、採取された自己または非自己細胞を *in vitro* で標的である臓器に適応させるように組織化する技術の開発が必要である。その基本技術の一つと目されるのが我が国で開発された温度感受性高分子を利用した細胞シート作製技術である。この技術は既に角膜再生において臨床的に有用であることが自己細胞を用いて確認されている。最近はこの技術はさらに進歩して、重層した細胞シートも作製できるようになっている。これによって、細胞シート作製技術の適用は拡大することが期待されるようになった。その適用疾患の一つとして研究指導者によって挙げられているのが、自己骨格筋筋芽細胞を利用する重症心疾患である。これに関しては、既に動物実験が行なわれており、その結果から臨床的有用性が得られる可能性が示唆されている。

具体的には、自己由来培養骨格筋筋芽細胞シートの治療効果を動物モデル実験で立証した実験結果は以下の論文として公刊されている（文献資料参照）。

- ・冠動脈結紮ラット心筋梗塞モデルに対する自己培養骨格筋筋芽細胞シート移植

Memon IA, et al. (2005) Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 130:1333-1341.

注射による培養骨格筋筋芽細胞移植よりも高い左室駆出率及び左室径短縮率の回復
梗塞により薄弱化した左室壁の改善

心筋組織壊死後のリモデリングを原因とする線維化の抑制

心筋への造血幹細胞様細胞のリクルート

心筋での各サイトカイン (SDF-1, HGF, VEGF) 遺伝子発現量の増加

- ・ハムスター拡張型心筋症モデルに対する自己培養骨格筋筋芽細胞シート移植

Kondoh H, et al. (2006) Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res.* 69:466-475.

注射による培養骨格筋筋芽細胞移植よりも長い心機能維持作用(左室径短縮率で評価)

生着した筋芽細胞シートは筋肉様組織に分化し、血管密度の増加も認められた

心筋組織壊死後のリモデリングが原因となる線維化の抑制

ジストロフィン結合蛋白質である α 及び β サルコグリカンの発現回復

拡張型心筋症の発症後における生存率の向上（延命効果大）

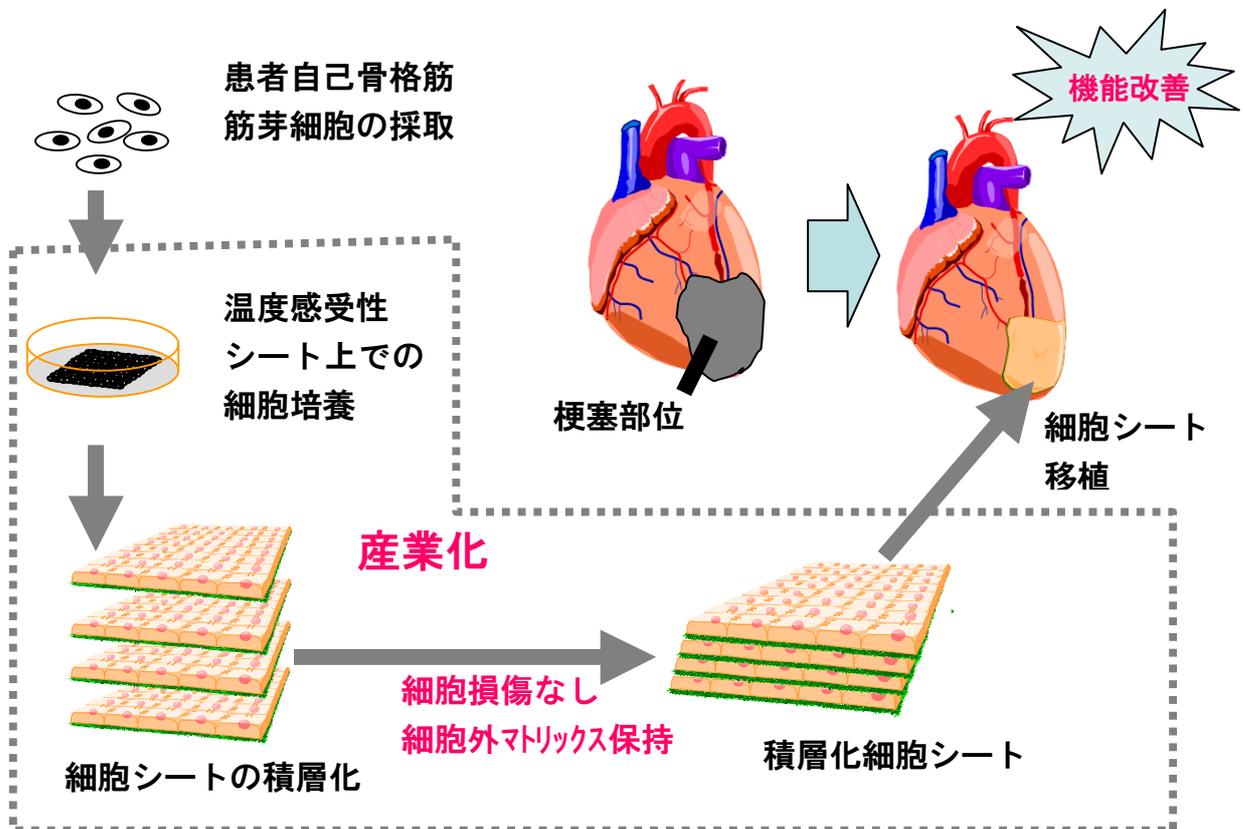
このように、培養骨格筋筋芽細胞シート（いわゆる心筋シート）を用いた重症心疾患治療の有効性を示唆する科学的根拠が得られはじめている。これらの知見をもとに、心筋シートの製

品化ガイドラインを策定することは、再生医療の発展、それに関連した産業群の育成の加速につながることを期待されている。

・重症心疾患を対象とする細胞シート技術の臨床展開の前提として確認しておくべき事項：

重層細胞シート技術に関しては、それが有効性をもたらす機序などについては科学的には必ずしも明確には説明されていない部分がある。それらには、骨格筋筋芽細胞を選択する理由あるいは骨格筋筋芽細胞が心筋機能回復に影響を与える機序、移植した細胞がシートとして生存する必要があることの実証（生体内で細胞シートが維持生存している確率）、必要と考える細胞シートの重層度とその理由、などが含まれる。また、重層細胞シート移植法が既存治療法に優るという事実をさらに様々な動物実験モデルにおいて分子細胞組織学的検査により証明していくことが望まれる。これらの疑問に対しては、既に得られている結果があればそれらを分かりやすく解説しなければならないし、また、さらに検討する必要があると考えるなら人細胞を用いた *in vitro* 基礎実験や動物を用いた *ex vivo* 基礎的実験を積み重ねるなどして臨床研究への移行の妥当性を非専門家にも納得させる努力は必要と思われる。このような基礎的なデータは被験者も強く要求するところであろう。

再生医療（骨格筋筋芽細胞シートを用いた重症心疾患治療技術）



2. ガイドライン作成の意義

再生医療は、従来型の対処療法的治療技術と異なり、器官を修復し完全に治す先端的根治治療技術である。組織を再生するために細胞を調製し患者へ戻すプロセスが必要になるが、全く新しい治療技術であるため、各段階で安全に有効な効果を生み出し、それを支える医療産業群を育成するために適切なガイドラインの設定が望まれている。しかしながら、再生医療においては、対象臓器、対象疾患、細胞ソース（自己か非自己か）、培養方法、組織化技術、使用医療材料などの条件ごとにガイドラインを設定する必要があり、再生医療一般のガイドラインに加え、最終製品開発の観点を加味したものを策定する必要がある。

既に我が国では、皮膚、角膜、軟骨、骨などでは、組織工学技術を活用した再生医療のヒト臨床が既に開始され、大きな注目と期待を集めている。さらに皮膚や角膜などでは、臨床研究の枠組みを超えて、産業化の段階に入ってきている。この角膜技術には、我が国の独創的技術である細胞シート技術が活用されている。この技術は他の再生医療への応用も期待されており、その中でも国民の期待の大きい重症心疾患への適用も視野に入ってきた。さらに、この細胞シートを製品として供給する企業も生まれてきており、これらの動きを加速するためには適切な専用のガイドラインが必要になっている。

本開発ワーキンググループでは、「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」を基本とし、さらに社会情勢等を勘案して、広く妥当であると認められるいつ中立かつ公平なガイドライン案を創り、これを公共の財産として活用させることで、安全性が十分に確保された再生医療の実用化・産業化を早期に実現させることを目的としている。平成17年度では、重症心疾患に対する再生医療をモデルケースに取り上げ、議論を行った。細胞ソースや活用する組織工学技術など多数の選択肢がある中、委員会での討議の結果、自己骨格筋由来筋芽細胞を細胞ソースとした培養骨格筋筋芽細胞シートを用いた移植医療技術に限定してガイドラインを検討することとした。

再生医療はテーラーメイド医療の典型であり、個人ごとに対応する新しい医療技術である。この医療においては、細胞あるいは細胞で構成した組織を臨床医療現場で用いるため、これらが医療に関わる製品としての位置づけを有し、これらの生産を受け持つ産業群がある。先端医療分野として確立するまでには技術開発や臨床研究など多額な投資が必要とされるが、完全に直すことのできる新しい根治技術であることを考えると、重篤な患者を救うという意義のある効果に加えて、医療経済的にも有効な開発である。初期の投資を効率的に行う観点からも、きちんとしたガイドラインの制定とそのための基盤的データや基準を満たした生産施設を提供する公的支援システムの整備が必要になる。

今回想定されている細胞シート移植法臨床研究は、非自己細胞を用いずに自己細胞を用いるものであることから倫理上の課題が他者に拡がる余地が極めて少ないという点で行なわれ易い。この場合の臨床研究遂行の妥当性の根拠は、主として、対象が他に根治療法のない重篤な疾患患者であること、動物実験結果が必ずしも人における結果として外挿できないこと、また、自己決定権に基づいて臨床研究に参加を強く望む被験者がいることに求めることができよう。

しかし、先に述べた疑問に回答を与える基礎実験データの詳細な解析結果が可能な範囲で得られ、かつ、上述の根拠を認めるとしても、被験者保護の観点からそれまでの研究段階で得られた知見を最大限に生かしたガイドラインを作成し、開発研究者には作製されたガイドラインに従って臨床研究を行なうことで有効性や有用性（リスク・ベネフィット比）を示唆するにたる定量的科学的データを蓄積するように求められることは、他の新規治療法の開発研究と同様に要求される。また、このようなガイドラインは、同時に、研究者の自己満足だけで終わるのではなく医療費抑制のための医療の効率化へ貢献するもの、かつ、医療産業活性化の視点から企業が積極的かつ継続的にサポートできるものに繋げていくものである必要がある。これらの必要性は、重層細胞シート作製技術の重症心疾患への適応という過去に類似した研究が行なわれたことのないためにリスクが予測困難な臨床研究の展開である以上、研究者にはとくに強く求められるであろう。

3. ガイドライン検討過程

合同検討会での決定を受け、再生医療（心筋シート）に関わる開発WGの運営方針を産業技術総合研究所で検討し、事務局体制を整備した。この分野に造詣の深い関係者の意見も参考にし、心臓外科医師や医療材料研究者を中心にした委員の選定を行った。幅広い関連学会関係者からの意見聴取を目的としたため、以下の学会と関係のある委員を選出した。日本組織工学会、日本バイオマテリアル学会、日本再生医療学会、日本胸部外科学会、日本心臓血管外科学会、日本人工臓器学会の6つである。

開発ワーキンググループ会議は3回開催し、以下の検討・議論を行った。第1回会議で、検討の進め方として、日本組織工学会における検討を踏まえつつ、委員会で議論することになった。また、その検討においては、以下の観点に留意することを基本方針とすることになった。

- ・ 論議の主題は、主として医療上の必要性、安全性の確保、医療産業化の可能性についてである。
- ・ 可能な限りヒトでの初期臨床研究を迅速に開始できるようにすることが目的である。
- ・ 作業手順は、オーソライズされた関連学術団体が提示する（案）について迅速に内容のブラッシュアップ作業を行なうこととする。
- ・ 委員会が考慮しなければならない初期臨床研究開始の条件は、医療上の必要性についての十分に予測、in vivo 及び動物実験による科学的論拠を明確化、具体的なリスクとベネフィット、リスク最小化、リスク・ベネフィット比の考慮である。
- ・ その他、予測できない危害発生に対する研究実施者の結果責任の取り方、国の財政的支援やそれに伴うセイフティネットの形成の必要性についても意見をまとめる。

これらの課程を経て報告書が作成されたが、その中で示されているガイドラインは（案）であり、基本的考え方については、委員会でコンセンサスが得られているが、細かな数値の設定等については科学的根拠にもとづく判断や臨床現場の要請をふまえた考え方が必要であり、今後の検討課題となった。

3.1 第1回開発WG会議（平成18年1月20日）

(1) 心筋シート材料に関する話題提供

世界をリードする細胞シート技術であり、心筋、肺、食道、角膜等への応用が進んでいる現状の情報を共有した。

(2) 心筋シート臨床応用に関する話題提供

重篤な心疾患モデル動物での細胞シートの治療効果が認められていることを理解した。

(3) ガイドラインの考え方に関する話題提供

医療機器ガイドラインの考え方について理解した。

(4) ガイドライン検討項目についての議論

今後の方針について、以下のように整理した。

進め方：素案を日本組織工学会で作成し当該開発WGで議論

考え方：細胞シート技術の早期実用化・商品化に向けたガイドラインを議論

リスクベネフィットバランスを考えた指針が重要

対象：現状認識から、骨格筋由来筋芽細胞を用いた細胞シートの心疾患患者への応用に関わるガイドラインを検討

3.2 第2回開発WG会議（平成18年2月28日）

(1) 日本組織工学会での検討項目案の説明

基本的な考え方：安全性に十分配慮しながら、細胞シート技術の実用化・産業を迅速に進めるためのベネフィットに関する評価項目を検討。

3つの大項目：(A) 細胞シートの有効性の推定

形態、生存率、生理活性物質、純度、分化度、増殖特性、電気生理学的検査、血清、機械的強度、不純物検査、無菌検査、感染症検査

(B) 前臨床試験での有効性の判断

モデル動物、移植法、観察期間、有効性評価

(C) ベネフィットを明確にできるような比較試験のデザイン

薬物治療、補助人工心臓装着、浮遊細胞移植、合成心筋パッチ

(2) 同案についての議論のまとめ

ミニマムリクワイアメントの明確化（安全性、有効性）

コントロールスタディ（必要性、差別化）

動物実験における病理組織所見も必要

3.3 第3回開発WG会議（平成18年3月22日）

(1) 3月16日の合同検討会の報告

WGの基本方針を以下のように説明したことを報告。

・ 論議の主題は、医療上の必要性、安全性の確保、医療産業化の可能性の3点

- ・ これらについて十分に合理的な説明ができるようなガイドライン素案を議論
 - ・ 可能な限り迅速にヒトでの初期臨床研究を開始できるようにすることが目的
 - ・ 関連学術団体が提示する案をもとに内容のブラッシュアップをすることが本WGの作業
 - ・ 医療上の必要性についての十分な予測、in vivo 及び動物実験による科学的論拠の明確化、具体的なリスクとベネフィットのリストアップとリスクの最小化とリスク・ベネフィット費の最適化について考慮する点を確認
- (2) 最終ガイドライン素案の説明、並びにアンケート調査結果の経過報告
- (3) 素案についての議論
- ・ 内容は完成とはいきれないが、その構成についてWG委員のコンセンサスあり
 - ・ 自己骨格筋筋芽細胞の細胞シートを重症心不全に適用することの特殊性に起因する問題点などについて考え方の議論
 - ・ 細胞シート開発の現状やそれを示す科学的データを明確にしてからガイドライン細部の記述を検討することを確認
 - ・ 細胞シートの品質保証についてカットオフ値を設定することの是非について議論
 - ・ 細胞シートから産生する物質についてのカットオフ値の考え方について議論
 - ・ ガイドラインは医療技術やバイオ技術の進展にともなってその数値基準も変化することから2年程度ごとに見直すべきとの意見あり
 - ・ 対象患者の考え方について、臨床現場の現状や動物実験の結果について十分に精査して検討する必要があるとの意見あり

4. 調査アンケートの集計結果

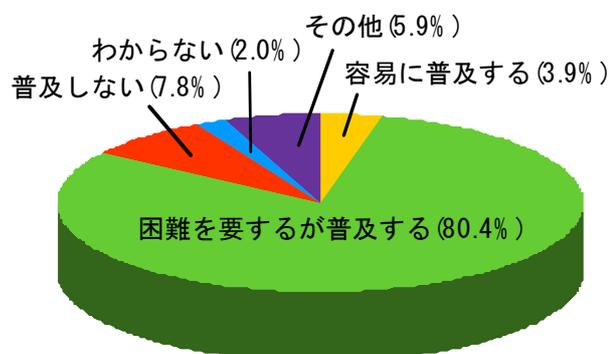
重症心疾患に対する心筋シートを用いた再生医療技術の産業化へのガイドライン策定にあたり、より広範な専門家からの意見を集約し、コンセンサスを得られやすいガイドライン案を作成するため、この分野の専門家51名にアンケート調査を行った。以下にその集計結果を示す。

重症心不全に対する培養筋芽細胞シート移植のガイドライン作成 に向けた調査アンケート結果

1. 心筋再生医療全般に関して

Q1. 心疾患に対する細胞移植療法に関する臨床応用についてどう思われますか。

A) 容易に普及する	2	3.9%
B) 困難を要するが普及する	41	80.4%
C) 普及しない	4	7.8%
D) わからない	1	2.0%
E) その他	3	5.9%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%

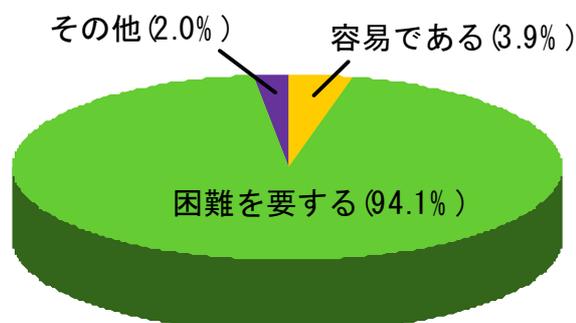


「その他」の内容：

- ・ 普及している、またはさらに普及するが近い将来普及しなくなる。
- ・ 技術的には可能と予想するが倫理問題、法整備等で国の対応の遅れが目立つ。
- ・ 症例を適切に選べば普及する。

Q2. 心疾患に対する細胞移植療法の産業化についてどう思われますか。

A) 容易である	2	3.9%
B) 困難を要する	48	94.1%
C) 不可能である	0	0.0%
D) わからない	0	0.0%
E) その他	1	2.0%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%

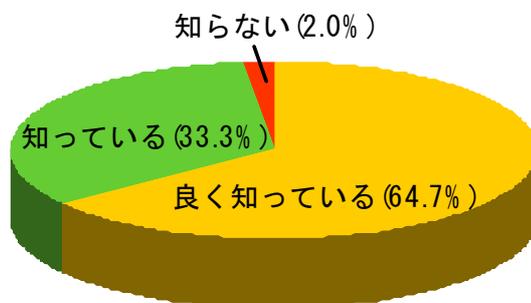


「その他」の内容：

- ・ 技術的には可能と予想するが倫理問題、法整備等で国の対応の遅れが目立つ。

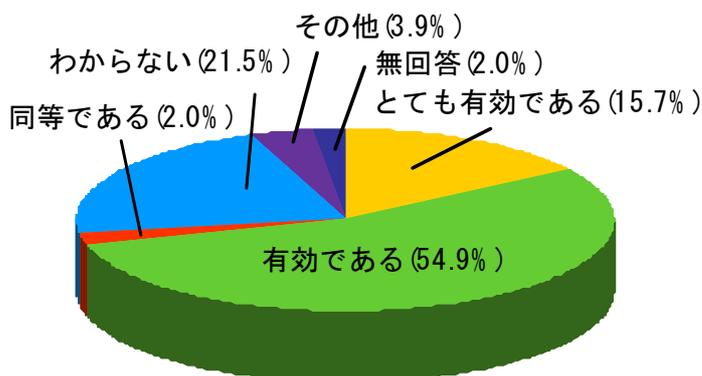
Q3. 細胞シート移植医療に関してご存じですか。

A) 良く知っている	33	64.7%
B) 知っている	17	33.3%
C) 知らない	1	2.0%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q4. 細胞シート移植医療は細胞浮遊液注入移植医療より有効であると思われますか。

A) とても有効である	8	15.7%
B) 有効である	28	54.9%
C) 同等である	1	2.0%
D) わからない	11	21.5%
E) その他	2	3.9%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%

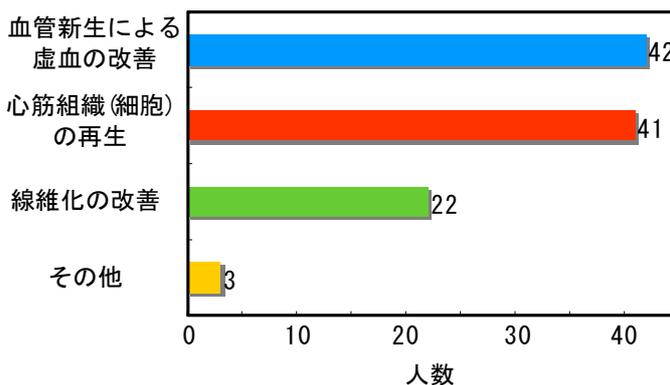


「その他」の内容：

- ・ さらなる検討が必要と思う。
- ・ それぞれに長所と短所があるため単純に比較するのは難しい。

Q5. 心疾患に対する細胞移植療法に関して、心機能回復のために期待する項目としてどのようなものが考えられますか。(複数回答可)

A) 血管新生による虚血の改善	42
B) 心筋組織(細胞)の再生	41
C) 線維化の改善	22
D) その他	3
無回答	0



「その他」の内容：

- ・ 心筋保護
- ・ 拡大心の wrapping 効果
- ・ サイトカイン放出

11. 心疾患に対する細胞移植療法で用いられるヒト由来細胞について

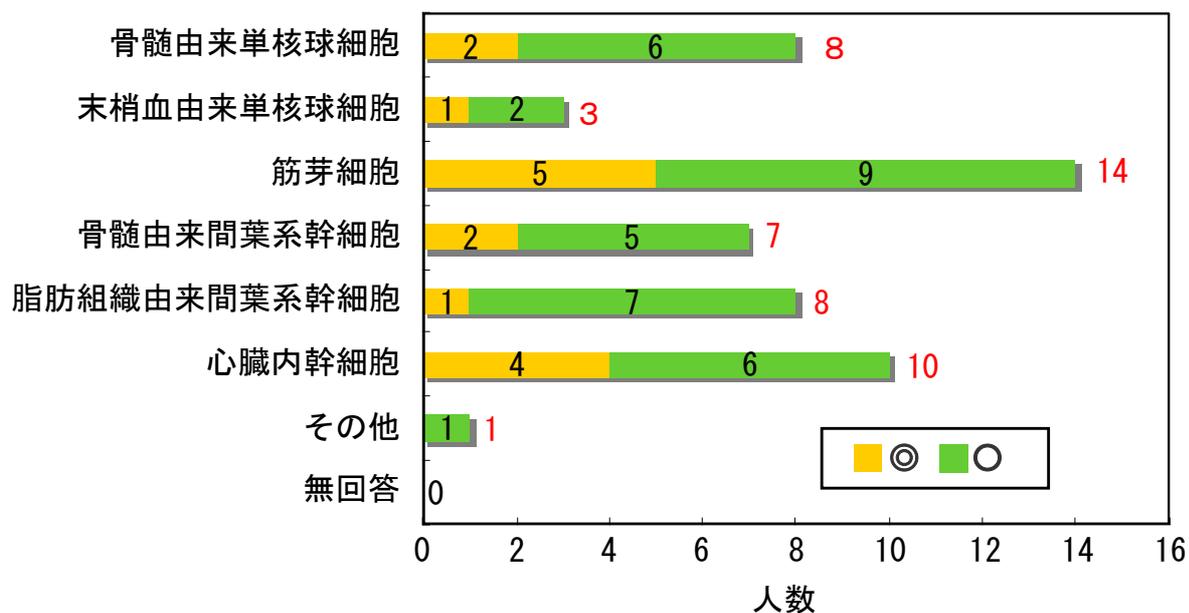
Q1. 心疾患に対する細胞移植療法の臨床応用及び産業化の推進を考慮した場合、原材料として用いられるヒト由来の細胞については「自己由来に限定する」又は「自己由来以外も考慮する」のどちらが望ましいと思われますか。

A) 自己由来に限定する	19	37.3%
B) 自己由来以外も考慮する	32	62.7%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q2. 「自己由来に限定する」と回答された方へ。細胞ソースとなるヒト由来細胞に関して、どれが有効であると思われますか。（複数回答可）また、最も有効と思われるものには◎（二重丸）を付けて下さい。

	◎	○
A) 骨髄由来単核球細胞	2	6
B) 末梢血由来単核球細胞	1	2
C) 筋芽細胞	5	9
D) 骨髄由来間葉系幹細胞	2	5
E) 脂肪組織由来間葉系幹細胞	1	7
F) 心臓内幹細胞	4	6
G) その他	0	1
無回答		0



「その他」の内容：

- ・ 骨格筋間質幹細胞

Q3. 上の設問において最も有効(◎二重丸を付けたもの)と選択した理由(特徴及び有用性などに関して)についてご回答下さい。

A) 骨髓由来単核球細胞：

- ・ 容易に採取でき、細胞数を十分確保できる。
- ・ 純度の高い培養・増殖技術が既に確立している。
- ・ 様々な growth factor を分泌することが証明されている。
- ・ 骨髓移植、虚血移植などで、実際の臨床応用がされており安全性が高い。

B) 末梢血由来単核球細胞：

- ・ 採取が容易。
- ・ 細胞移植を要する患者への骨髓穿刺と比べ負荷が小さい。
- ・ 患者への侵襲が少ない。

C) 筋芽細胞：

- ・ 採取が容易。
- ・ 培養が比較的容易。
- ・ 培養で増加能が高い。

- ・ 虚血に強い。
- ・ 心筋の再生を考えれば、ソースは筋肉由来がいいと思う。
- ・ 心筋再生には、筋由来細胞が望ましいため。
- ・ 自らが骨格筋由来幹細胞を心筋再生医療に応用しているから。

D) 骨髄由来間葉系幹細胞 :

- ・ 採取が簡単。
- ・ 安全性を証明しやすいこと。
- ・ 副作用が小さいと考えられること。
- ・ 移植した場に応じて最適化されやすいこと。

E) 脂肪組織由来間葉系幹細胞 :

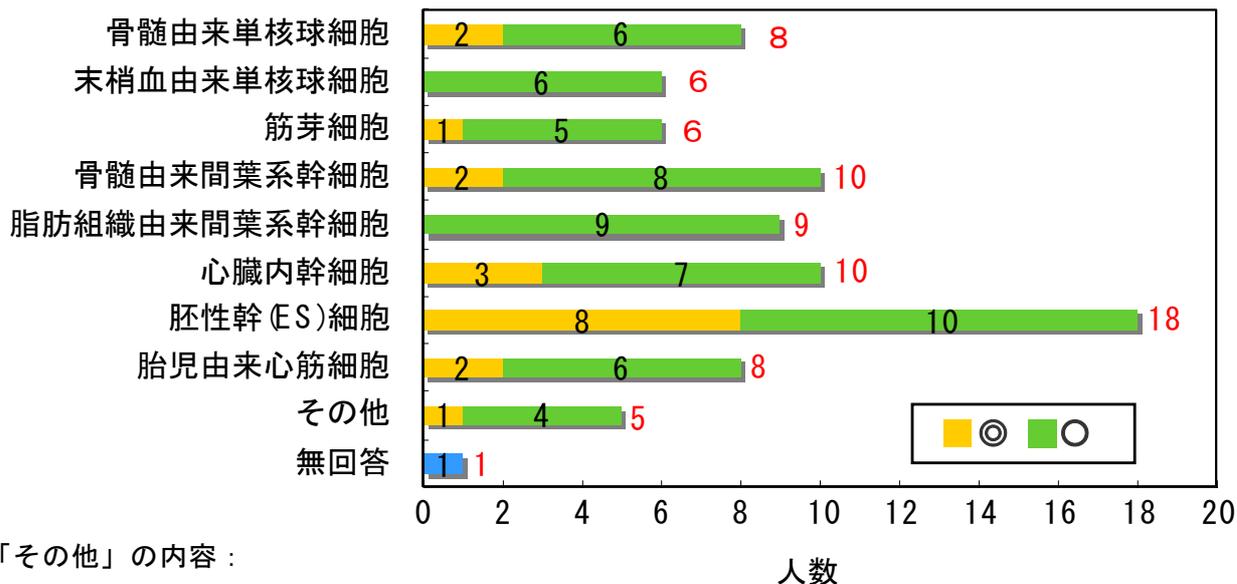
- ・ 患者への侵襲性を考慮すると、脂肪組織も倫理的ハザードが少ないと考える。

F) 心臓内幹細胞 :

- ・ 最も心筋に分化し易いと考えられるから。
- ・ いまだ臨床応用までの道のりは長いかもしれないが、心筋としてしっかり生着する可能性がもっとも高そうだから。
- ・ 細胞シートを移植する目的は、リモデリングにより Non-Function になった組織を補うことであり、そのためには、現在までのところ心臓内幹細胞においてのみ心筋細胞が分化する現状から、心臓内幹細胞が最も有効と考えた。

Q4. 「自己由来以外も考慮する」と回答された方へ。細胞ソースとなる自己由来以外のヒト由来細胞として何が有効であると思われますか。(複数回答可) また、最も有効と思われるものには◎(二重丸)を付けて下さい。

	◎	○
A) 骨髄由来単核球細胞	2	6
B) 末梢血由来単核球細胞	0	6
C) 筋芽細胞	1	5
D) 骨髄由来間葉系幹細胞	2	8
E) 脂肪組織由来間葉系幹細胞	0	9
F) 心臓内幹細胞	3	7
G) 胚性幹 (ES) 細胞	8	10
H) 胎児由来心筋細胞	2	6
I) その他	1	4
無回答		1



「その他」の内容：

- ・ 月経血、羊膜、間葉系細胞
- ・ 現状では不明
- ・ 臍帯血由来幹細胞
- ・ 羊膜

Q5. 前の設問において、最も有効(◎二重丸を付けたもの)と選択した理由(特徴及び有用性などに関して)についてご回答下さい。

A) 骨髄由来単核球細胞：

- ・ 単離が容易であるから。
- ・ 既に骨髄移植医療は確立されている。
- ・ 死体や脳死体からの細胞回収の可能であると思われる。

C) 筋芽細胞：

- ・ 多分化能がない。
- ・ 虚血に強い。
- ・ 成長因子の分泌能が高い。

D) 骨髄由来間葉系幹細胞：

- ・ 細胞ソースとして最も信頼性が高いと考えられるから。
- ・ 骨、骨髄性白血病治療等で有効性が証明されているから。
- ・ 多様な可能性を持ち、分化誘導法も含め今後期待される source であるため。

F) 心臓内幹細胞 :

- ・ 組織幹細胞の標的臓器における増殖・分化は同所性という観点から副作用の発現も最小に抑えられると考えられる。
- ・ 最も心筋細胞に分化する。
- ・ 骨や脂肪への分化が少ない。
- ・ 血管新生能も最も高い。

G) 胚性幹 (ES) 細胞 :

- ・ 自己由来以外として可能性が一番高いのは ES 細胞であろう。なぜならば理論上、核移植により拒絶を回避することができるから。その他に免疫抑制技術やバンクがどの程度発展できるかによる。
- ・ 産業化及び製品化のレベルで行うため。Potential が高い。
- ・ 免疫の問題をクリアできる (患者の細胞核を移植できれば)。細胞数の調整が可能。
- ・ 細胞ソースとしての優位性 (特にドナーに依存せず自己増殖してくれるから)。
- ・ 生命倫理・拒絶反応という解決すべき大きな問題があるが、ES 細胞は心筋への分化効率がもっとも高いため。
- ・ 他の方法に限界を感じるため。
- ・ 科学的にみて ES 細胞以外が心筋へ分化している事例はない (既に欧米では否定されている) 従って、心筋再生をめざすなら ES しか方法がない (他のメカニズムでは細胞移植方法の有用性は低い)。
- ・ 多能性が証明されている。
- ・ ES 細胞以外で現時点で有効な cell は無いと思われます。

H) 胎児由来心筋細胞 :

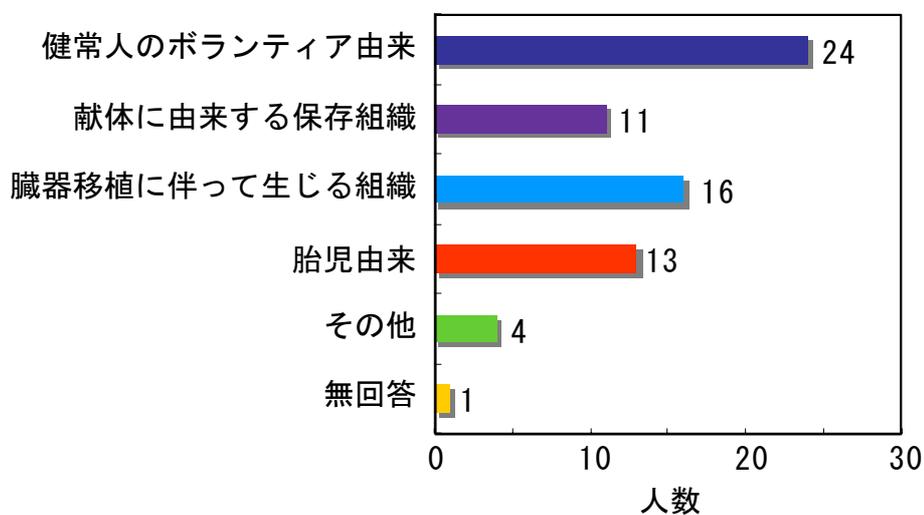
- ・ 最終分化細胞であり、他の幹細胞のように分化誘導を気にする必要がない。
- ・ 胎児由来組織は入手困難であるが移植するので有効と思われる。

I) その他 (月経血、羊膜、間葉系細胞) :

- ・ in vitro で心筋への誘導が高く分裂も多く不特定多数から sample できるため cell bank を形成しやすい。

Q6. さらに自己由来以外の細胞・組織のソースとしては、どのケースが有効と思われますか。(複数回答可)

A) 健常人のボランティア由来	24
B) 献体に由来する保存組織	11
C) 臓器移植に伴って生じる組織	16
D) 胎児由来	13
E) その他	4
無回答	1

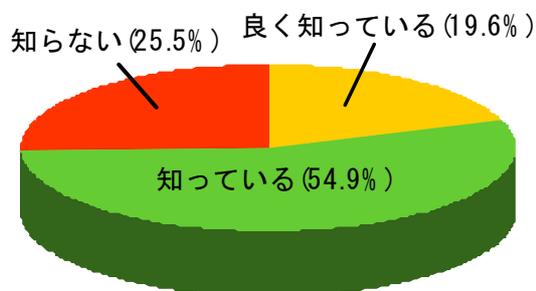


「その他」の内容：

- ・ 家族
- ・ ES 細胞
- ・ その他の手術サンプル、手術時についでに取る。
- ・ 組織バンク的なものを作っておく。

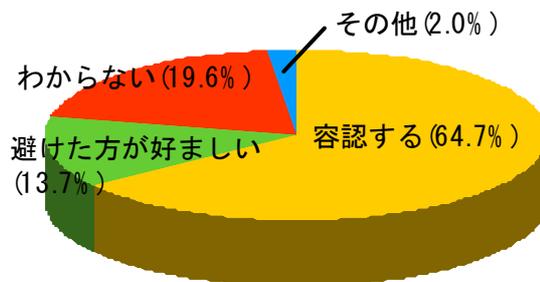
Q7. 細胞シート工学的な手法以外に、世界ではスキャフォールド(細胞培養支持担体)を用いた三次元的な再生心筋組織の作製に関する研究がなされております。現在、イタリアにおいてコラーゲンゲル内で培養した骨髄由来細胞の心臓への移植に関する臨床応用も計画されております。これらのスキャフォールドを用いた再生心筋組織移植医療に関する研究をご存じですか。

A) 良く知っている	10	19.6%
B) 知っている	28	54.9%
C) 知らない	13	25.5%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q8. 再生心筋組織の作製時にスキャフォールド(細胞培養支持担体)を使用することについてどう思われますか。

A) 容認する	2	64.7%
B) 避けた方が好ましい	41	13.7%
C) わからない	4	19.6%
D) その他	1	2.0%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%

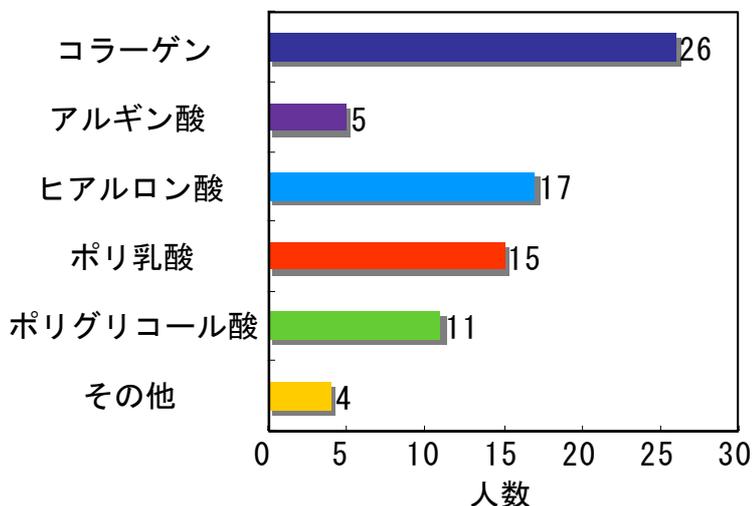


「その他」の内容：

- ・ 細胞間の隙間がある分 electrical couple が弱くなり power がでない。

Q9. 「容認する」と回答された方へ。使用可能と思われるスキャフォールド(細胞培養支持担体)の材料を選択して下さい。(複数回答可能)

A) コラーゲン	26
B) アルギン酸	5
C) ヒアルロン酸	17
D) ポリ乳酸	15
E) ポリグリコール酸	11
F) その他	4
無回答	0

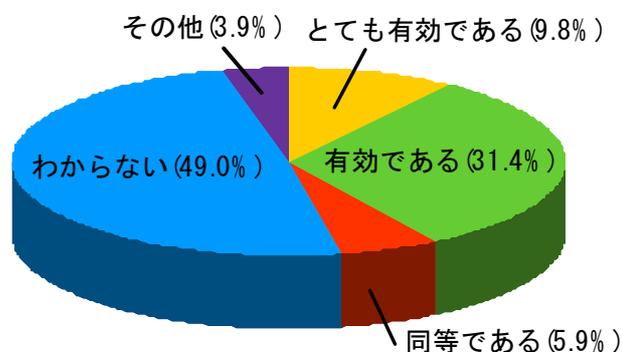


「その他」の内容：

- ・ 医療用具として FDA に認可されている合成高分子
- ・ 素材については利点、欠点などがよく分からない。臨床関係者には素材の知識はあまり無いと思われる。論文などで誰かが使っているから、とか既に汎用されているといった理由で選んでいると思われます。
- ・ ポリウレタン、合成ペプチド、ヒト由来組織
- ・ 不明

Q10. 細胞シート移植医療はスキャフォールドを用いた再生心筋組織移植医療より有効であると思われるか。

A) とても有効である	5	9.8%
B) 有効である	16	31.4%
C) 同等である	3	5.9%
D) わからない	25	49.0%
E) その他	2	3.9%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



「その他」の内容：

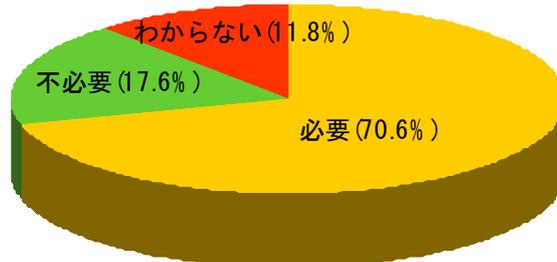
- ・ 現在の問題点を改善していけば必ずしも handy とならない可能性がある。
- ・ 現在の状況での使用は不明。

III. 心疾患治療のための筋芽細胞シートに関するガイドラインについてお尋ね致します。

(1)筋芽細胞シートの製造及び品質管理

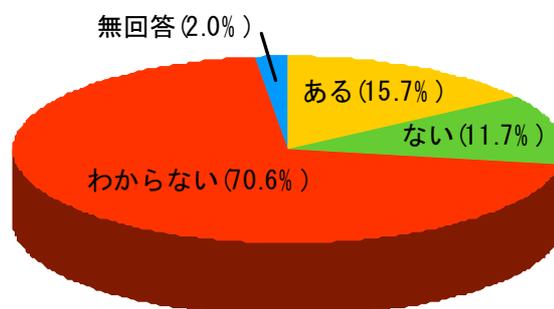
Q1. 骨格筋組織の採取場所をガイドラインで規定する必要性があると思われるか。

A) 必要	36	70.6%
B) 不必要	9	17.6%
C) わからない	6	11.8%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q2. 多くの場合、骨格筋組織のソースとして大腿部の内側広筋が用いられておりますが、その他に適切な場所が有りますか。

A) ある	8	15.7%
B) ない	6	11.8%
C) わからない	36	70.6%
無回答	1	0.0%
合計	51	100.0%

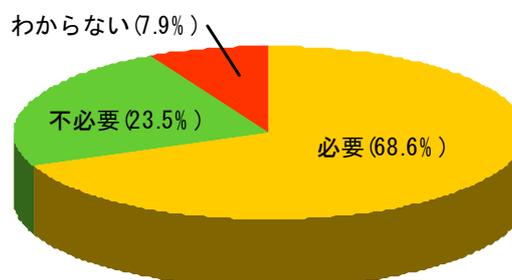


「ある」の内容：

- ・ 足趾骨間筋など
- ・ 外側広筋
- ・ 比較的大きく、外から目立たない場所であれば可能と思われます。
- ・ 腓骨周辺の筋
- ・ 大殿筋

Q3. 採取する組織の大きさをガイドラインで規定する必要があると思われますか。

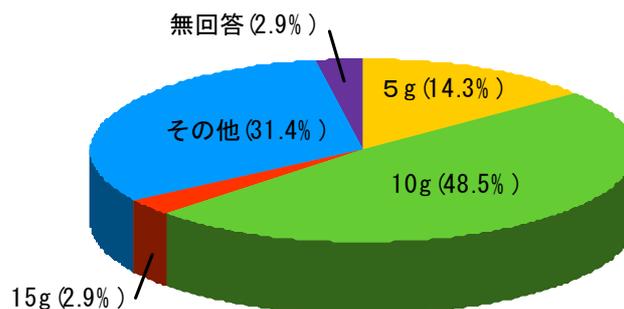
A) 必要	35	68.6%
B) 不必要	12	23.5%
C) わからない	4	7.9%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q4. 「必要」と回答された方へ、それはどれくらいの大きさですか。

(参考)：これまでに、骨格筋組織10gから筋芽細胞を単離し、3～4週間の継代培養を行うことで細胞数が約 3×10^8 個まで達することが報告されております。

A) 5 g	5	14.3%
B) 10g	17	48.5%
C) 15g	1	2.9%
D) その他	11	31.4%
無回答	1	2.9%
合計	35	100.0%

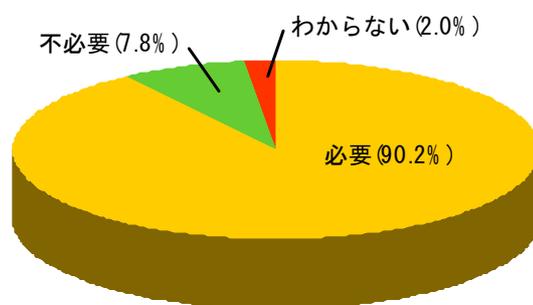


「その他」の内容：

- ・ 5～10g
- ・ 10～15g
- ・ 被採取者の体重、年齢により規定すべき。
- ・ 可能ならできるだけ多く。
- ・ 場合による。
- ・ 採取した後の部位に障害が発生しない量を試験して決定すべき。
- ・ わからない。

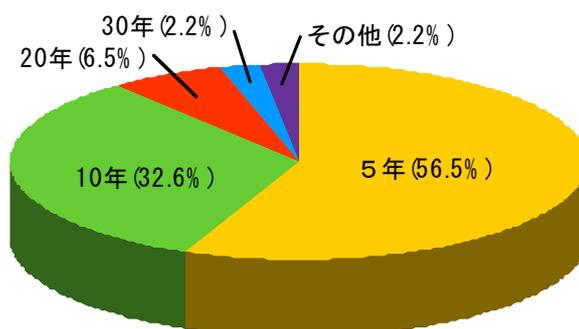
Q5. 採取した骨格筋組織の一部を移植後の追跡調査のために保管するが必要性があると思われますか。

A) 必要	46	90.2%
B) 不必要	4	7.8%
C) わからない	1	2.0%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q6. 「必要」と回答された方にご質問致します。保管期間はどれくらいが適切であると思われますか。

A) 5年	26	56.5%
B) 10年	15	32.6%
C) 20年	3	6.5%
D) 30年	1	2.2%
E) その他	1	2.2%
無回答	1	0.0%
合計	46	100.0%

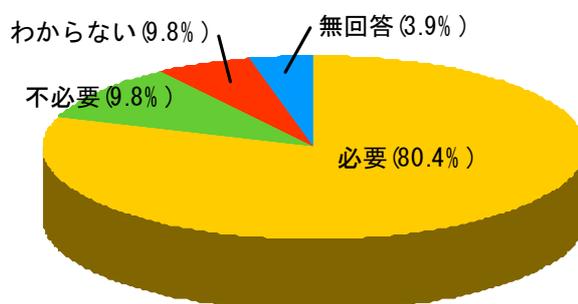


「その他」の内容：

- ・ 少なくとも生存期間中、死亡した場合は5～10年

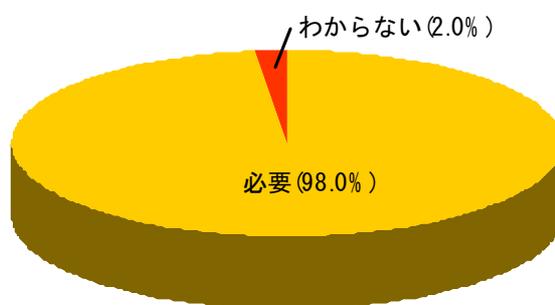
Q7. 骨格筋組織より筋芽細胞を単離する際に必要な酵素をガイドラインで規定する必要性があると思われますか。

A) 必要	41	90.2%
B) 不必要	5	7.8%
C) わからない	3	2.0%
無回答	2	0.0%
合計	51	100.0%



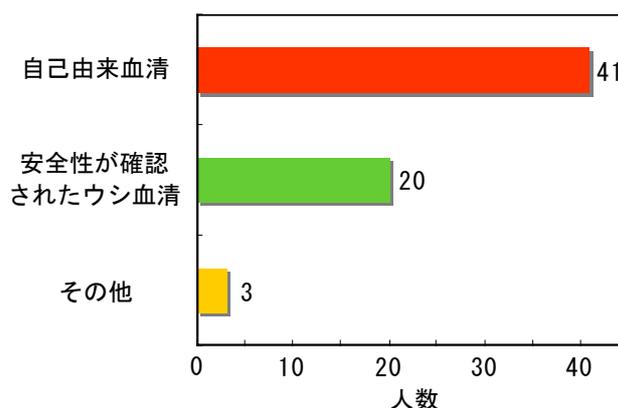
Q8. 筋芽細胞の培養時に使用する血清に関してガイドラインで規定する必要性があると思われますか。

A) 必要	50	98.0%
B) 不必要	0	0.0%
C) わからない	1	2.0%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q9. 「必要」と回答された方へ。どのような種類の血清が適切であると思われますか。(複数回答可)

A) 自己由来血清	41
B) 安全性が確認されたウシ血清	20
C) その他	3
無回答	0

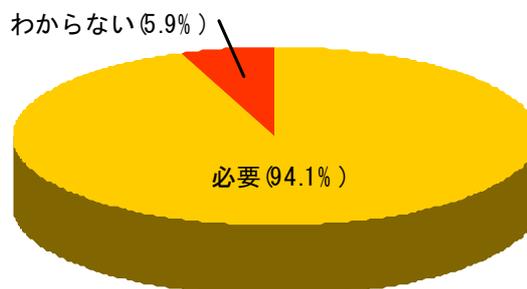


「その他」の内容：

- ・ もしくは無血清（可能であれば）
- ・ 安全の基準を統一すべきだと思う。

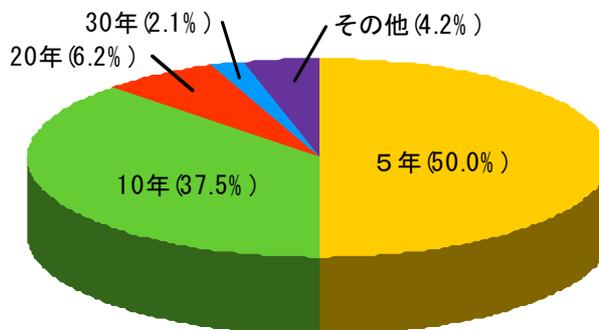
Q10. 骨格筋組織より単離した筋芽細胞を移植後の追跡調査のために凍結保存する必要性があると思われますか。

A) 必要	48	94.1%
B) 不必要	0	0.0%
C) わからない	3	5.9%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q11. 「必要」と回答された方へ。保存期間はどれくらいが適切であると思われますか。

A) 5年	24	50.0%
B) 10年	18	37.5%
C) 20年	3	6.2%
D) 30年	1	2.1%
E) その他	2	4.2%
無回答	0	0.0%
合計	48	100.0%

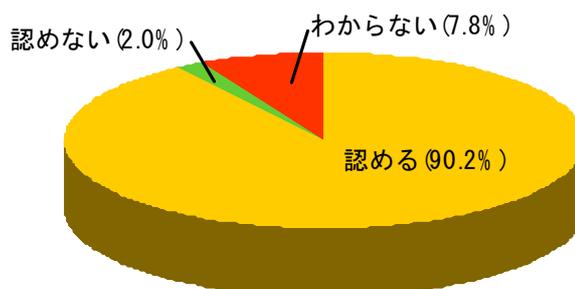


「その他」の内容：

- ・ 少なくとも生存期間中、死亡した場合は5~10年。
- ・ 移植後10年以上で出てきた病気などとの関連は付けられないと思うので、ここまで長期の保存は必要ないと思われる。

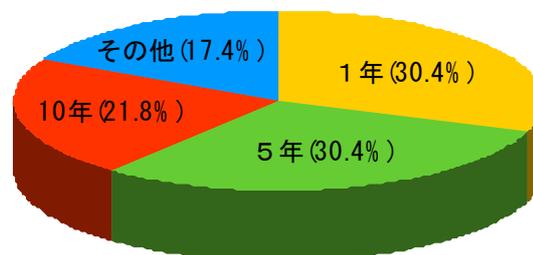
Q12. 骨格筋組織より単離した筋芽細胞を凍結保存し、後に必要に応じて筋芽細胞シートを作製することに関してどうと思われますか。

A) 認める	46	90.2%
B) 認めない	1	2.0%
C) わからない	4	7.8%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q13. 「認める」と回答された方へ。保存期間はどれくらいが上限であると思われますか。

A) 1年	14	30.4%
B) 5年	14	30.4%
C) 10年	10	21.8%
D) その他	8	17.4%
無回答	0	0.0%
合計	46	100.0%

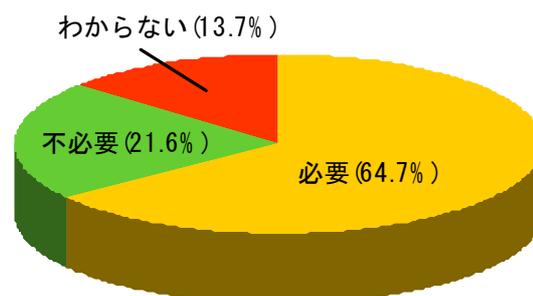


「その他」の内容：

- ・ 自家移植の場合は年数の制限なし。
- ・ 特に限定する必要はない。(細胞の質がよければ)
- ・ 安全性が確認できるまでの期間は、保存すべき、何年でも。
- ・ 状態によると思われる。
- ・ 品質のよいものが作れる限りはいくらでも。
- ・ 凍結保存の細胞への影響に関する知識がないのでわからない。
- ・ 筋芽細胞の活性が落ちない年数をスクリーニングして、その年数、ホストの年齢によって異なると思う。

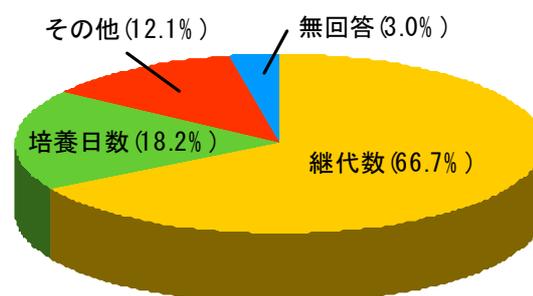
Q14. 筋芽細胞の培養期間に関してガイドラインで規定する必要性があると思われますか。

A) 必要	33	64.7%
B) 不必要	11	21.6%
C) わからない	7	13.7%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q15. 「必要」と回答された方へ、どの項目で規定すべきであると思われますか。

A) 継代数	22	66.7%
B) 培養日数	6	18.2%
C) その他	4	12.1%
無回答	1	3.0%



合計	33	100.0%
----	----	--------

「その他」の内容：

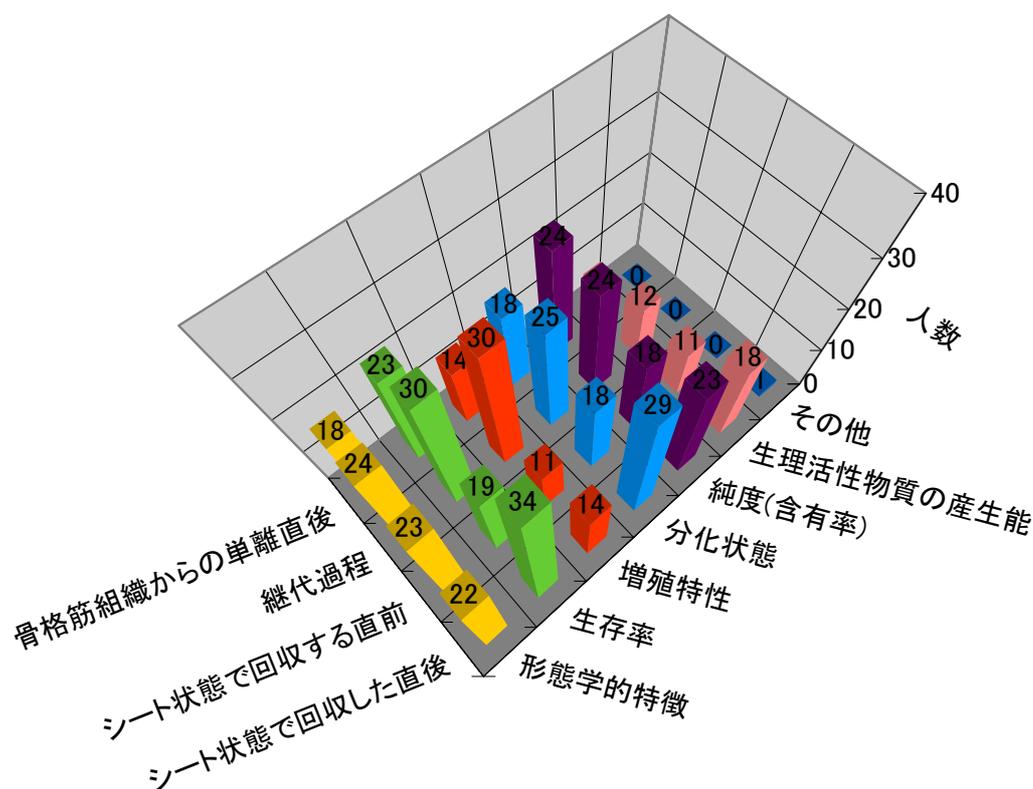
- ・ 継代数と培養日数の両方

Q16. 筋芽細胞シートの作製までには、骨格筋組織からの筋芽細胞の単離、継代培養による細胞数の増幅、温度応答性培養皿上へ再播種した後にシート状態で回収する工程が存在致します。各工程における筋芽細胞の特性を決定するための項目としてガイドラインで規定する必要性があるものはどれですか。下記の表で必要と思われる項目に関して○印をご記入下さい。

	骨格筋組織からの単離直後	継代過程	シート状態で回収する直前	シート状態で回収した直後	回答者数
形態学的特徴	18	24	23	22	37
生存率	23	30	19	34	45
増殖特性	14	30	11	14	38
分化状態	18	25	18	29	43
純度(含有率)	24	24	18	23	41
生理活性物質の産生能	8	12	11	18	26
その他	0	0	0	1	1

「その他」の内容：

- ・ シート状態で回収した直後：シートとして必要な機能をチェック。



Q17. 上の設問で「形態学的特徴」で「必要」と回答された方へ。どのような手法で評価すべきかをご記述して下さい。

評価方法に関して：

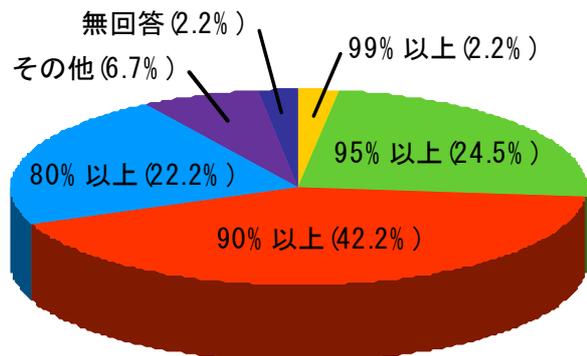
- ・ 光学顕微鏡観察
- ・ 実体顕微鏡観察
- ・ 電子顕微鏡観察
- ・ 顕微鏡観察。但し、専用ソフトを開発しソフトである程度の判定ができるようにする。また、顕微鏡観察では、視野に良好なところだけを選びがちだが、そうではなく、対象範囲の全てをチェックするようにする。
- ・ 光学顕微鏡、電子顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡の画像をイメージプロやメタモルフなどの画像解析ソフトで定量化する。
- ・ 単核・多核細胞比
- ・ 一般化するためには、病院等で routine work として行われている手法をとる必要がある。ので、HE 染色及び単純な免疫染色により評価する。
- ・ 走査型電子顕微鏡
- ・ 悪性化の有無を顕微鏡等で調べる必要がある。
- ・ 非侵襲的に且つ短時間であることが望ましい。また、移植するそのものの検体を見るべき。

(検査)

- ・ 分化マーカー等の免疫染色
- ・ 一部細胞を dish 上で培養し、多核であるかなど簡単にチェックする。
- ・ 同一テスト用細胞シートを作製し、光学顕微鏡、免疫細胞染色にて確認。
- ・ 細胞源の安定性を管理するためには、定点でのチェックは必要と考える。特に細胞腫瘍化あるいは非筋組織系細胞の混在の有無等。腫瘍化に関しては光学顕微鏡レベルの観察は避けられないと考えるが、観察可能な量に限界が生じるため、腫瘍マーカーや免疫組織化学染色的手法の併用が望ましい。
- ・ 光学顕微鏡を用いて、シート回収直前の細胞密度に関するガイドラインが必要と思われる。
- ・ 代表例の写真、細胞のサイズ
- ・ 筋管構造の有無
- ・ サンプルを抽出し腫瘍マーカー等で染色する。

Q18. 先の設問で「生存率」で「必要」と回答された方へ。それはどのくらいの値と規定すべきですか。また、どのような手法で評価すべきかをご記述して下さい。

A) 99%以上	1	2.2%
B) 95%以上	11	24.5%
C) 90%以上	19	42.2%
D) 80%以上	10	22.2%
E) その他	3	6.7%
無回答	1	2.2%
合計	45	100.0%



「その他」の内容：

- ・ 生存率に関してどのくらいの値を規定するのは現在のところ困難であると思われる。望ましい生存率はもちろん 100%であるが、現段階での生存率はどの程度であるかをモニタリングし、どの程度の生存率の culture でシートの効果が有るのかを検討すべき。
- ・ どの値が適切かわからない。
- ・ 各々の施設で 95%以上の生存率を移植用シートに用いて評価したことは現実的になく、95%以上生存する培養及びシート作製条件を確立した上で、その方法論を用いることをガイドラインとすべきである。

評価方法に関して：

- ・ 単離直後の場合は、サスペンションの中からいくらか取り出した cell の生存率を PI 等で

染めて、計算盤で計測する。

- ・ 培養してからは計測用のディッシュを余分に用意し、トリプシンでバラバラにして上記の方法でカウント。
- ・ フローサイトメトリーによる PI 等による核染色及び共焦点顕微鏡による画像を組み合わせる。
- ・ サンプルを抽出し、PI、TUNEL、HOECHST などの色素で染色する。
- ・ トリパンプルー染色
- ・ 検体（移植する）そのものを検査すれば手法は問わない。
- ・ 光顕的に浮遊する細胞（死細胞）を取り除く。
- ・ MTT assay
- ・ 同一テスト細胞シートにてヘキスト 33342 にて確認する。細胞源の回収直後については、手技の安定性や手法の是非を判断する上で有用。また、シート回収後の生存率については、つまり移植直前のシートの状態を示しており、厳格な基準を設定する必要があると考える。
- ・ TUNEL 染色やトリパンプルー染色が簡易的な手法として有用。
- ・ 同一ロットによる他の検体を検査する方法は不安に思う。
- ・ 顕微鏡観察下のカウント
- ・ 生体の害のない色素等を使用。

Q19. 先の設問で「増殖特性」で「必要」と回答された方へ。どのような手法で評価すべきかをご記述して下さい。

評価方法に関して：

- ・ 継代までの間隔と継代時の ^3H 等のラベル、シート化までの時間。
- ・ 一般的な MTT Assay
- ・ Brdu あるいは Thymidine の取り込み（DNA 合成）。
- ・ 目算（トリプシン処理後、トリパンプルーで染色して）
- ・ WST あるいは LDH Assay は simple だが種々のファクターにより影響を受ける（誤差大）。
- ・ Viability とその後の治療効果等不明なことが多く、データとしては必須。
- ・ Cell cycle に関与する遺伝子の検索。
- ・ 増殖が著しく遅い場合は stem がないと考えては如何と思いました。
- ・ サンプル抽出し免疫染色
- ・ 細胞数の経時的計測
- ・ ある一定期間内にどれくらい増殖するものなのかの標準的目安を定めるべきであると思う。体積や純度を用いてはどうか？
- ・ 老化であれば β -Gal 染色
- ・ 腫瘍化の除外

- ・ 少なくとも 1 回以上分裂することを確認したものだけをピックアップする。
- ・ ダブリングタイム
- ・ ki-67 による免疫染色で増殖性を調べる。
- ・ FACS analysis
- ・ 一部 dish で培養を続けて fusion するかなどをチェックする。
- ・ 増殖曲線に一定の基準を設定する必要があると考える。細胞シートの質（時に強度）は細胞増殖特性に大きく依存しているため、ある一定の増殖レベルからはずれる細胞源については除外すべきではないかと思われる。又、増殖能が著しく高いものについては腫瘍化の有無を調べる必要があると考える。
- ・ 培養の過程で万が一不死化することを考慮し、ある一定範囲内の doubling Time の細胞のみを使用することで、増殖特性は評価可能と考える。
- ・ 継代時の細胞数で評価する。
- ・ 培地からチェックできる手法
- ・ メディウムで把握できる特性と増殖特性の関連を調査する必要がある。
- ・ シートにする前の細胞の増殖をモニタリングすべき。継代時及びシート前の細胞数をカウンターにてカウントする。
- ・ 継代時に数を数える。
- ・ 目視のみで細胞がどのような密度で増殖するか評価する。

Q20. 先の設問で「分化状態」で「必要」と回答された方へ。どのような手法で評価すべきかをご記述して下さい。

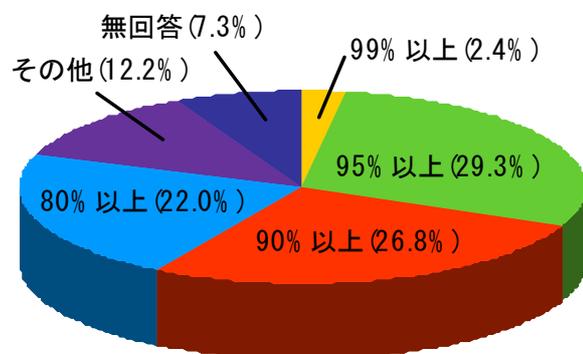
評価方法に関して：

- ・ 細胞表面マーカー
- ・ Western blotting
- ・ 心筋マーカー等で染色して確認
- ・ 可能なら表面抗原による免疫組織染色
- ・ desmin 陽性単核細胞と desmin 陽性多核 myotube の比率（免疫染色法による）
- ・ CD56 の発現率
- ・ 分化マーカーの抗原染色
- ・ 遺伝子発現、PCR
- ・ 骨格筋芽細胞特異的蛋白に対する抗体による免疫染色
- ・ 筋同定に必須な mRNA、Protein
- ・ myoblast か muscle fiber なのか鏡検できれば免疫を用いて調べる。
- ・ 腫瘍化の除外
- ・ 免疫組織学的手法

- ・ FACS
- ・ 顕微鏡レベルでの横紋や収縮状態の確認。
- ・ 顕微鏡観察
- ・ 一部 dish で培養を続けて fusion するかなどをチェックする。
- ・ 同一テスト用細胞シートを作製し、分化マーカー検出による筋芽細胞の分化ステップを評価する。
- ・ 幹細胞や ES 細胞が細胞源の場合は心筋への分化について詳細な検討が必要と思われるが、筋芽細胞をソースとする場合には、あまり重要な項目にならないと思われる。
- ・ MyoD etc の筋特異的転写因子
- ・ 染色。基本染色と PCNA などの DNA の分裂過程
- ・ 形態的特徴
- ・ 細胞の分化状態を顕微鏡にて目視する (myotube の形成等)
- ・ 形態観察
- ・ 細胞内小器官の状態を電顕で観察、mRNA タンパクの同定
- ・ 分化誘導による骨格筋及び他の lineage への分化率

Q21. 先の設問で「純度 (含有率)」で「必要」と回答された方へ。それはどのくらいの値と規定すべきですか。また、どのような手法で評価すべきかをご記述して下さい。

A) 99%以上	1	2.4%
B) 95%以上	12	29.3%
C) 90%以上	11	26.8%
D) 80%以上	9	22.0%
E) その他	5	12.2%
無回答	3	7.3%
合計	41	100.0%



「その他」の内容：

- ・ 90%と回答したが、他にどんな細胞が混入しているかによって場合分けしたほうがよいと思う。
- ・ myoblast と muscle fiber ならよしとする。
- ・ 造腫瘍性が疑われるような細胞、または不整脈などの原因となりそうな細胞が混在する可能性がある場合には純度 100%を目指すべき。
- ・ Fibroblast (心機能に影響しないような細胞) は多少 (10-20%) 混ざってもよいのでは。
- ・ 自己の組織に限るのであれば 80%前後で可能では。

- ・ その他、純度が高い方が良いのかある程度低い方が良いのか分からない。検定して結果を評価する必要があると思われる。

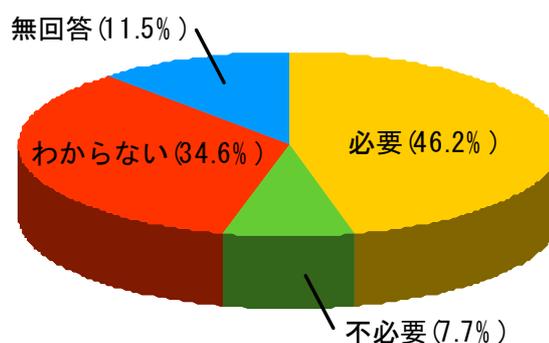
評価方法に関して：

- ・ Cell Suspension を表面抗原マーカーで FACS 解析。
- ・ desmin 陽性細胞数／総細胞数による fibroblast 等との判別。(免疫染色方法による)
- ・ 免疫染色 (Actin、Vinestine 等)
- ・ 鏡検や染色で
- ・ やや危険であるが薬剤添加等を行っても移植する検体そのものを検査することが望ましい。
- ・ 同一テスト用細胞シート作製し、免疫染色による。
- ・ CD56 の陽性率
- ・ どの程度の純度で機能改善が得られるか検討すべき。一部サンプリングの上、免疫染色 (desmin)。desmin 陽性細胞の核数／総核数。臨床応用する場合はより迅速にシートのクオリティーを評価するシステムを開発すべき。
- ・ フローサイトメトリーにて表面抗原の発現状態により評価する。

Q22. 先の設問で「生理活性物質の産生能」で「必要」と回答された方へ。筋芽細胞が産生する可能性が考えられる治療効果を有する生理活性物質として検討すべきものを選択して下さい。さらに、それ以外の生理活性物質がございましたら、どのような手法で評価すべきかも合わせてご記述して下さい。

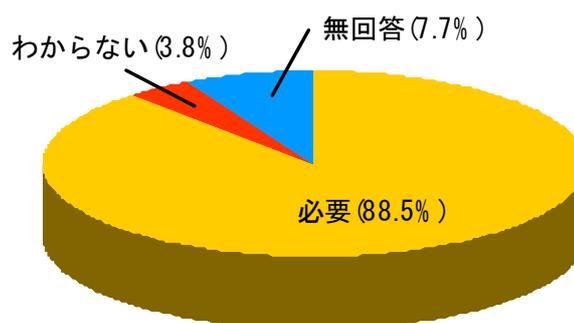
(1) HGF (肝細胞増殖因子)

A) 必要	12	46.2%
B) 不必要	2	7.7%
C) わからない	9	34.6%
無回答	3	11.5%
合計	26	100.0%



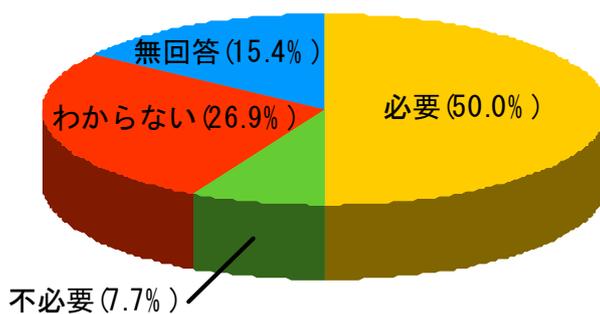
(2) VEGF (血管内皮増殖因子)

A) 必要	23	88.5%
B) 不必要	0	0.0%
C) わからない	1	3.8%
無回答	2	7.7%
合計	26	100.0%



(3) SDF-1(stromal derived factor-1)

A) 必要	13	50.0%
B) 不必要	2	7.7%
C) わからない	7	26.9%
無回答	4	15.4%
合計	26	100.0%



(4) 上記以外の生理活性物質名及び評価手法について

生理活性物質名に関して：

- ・ IL-1
- ・ IGF-I
- ・ b-FGF
- ・ PDGF-BB

評価手法に関して：

- ・ ELISA
- ・ RT-PCR
- ・ ウェスタンブロッティング

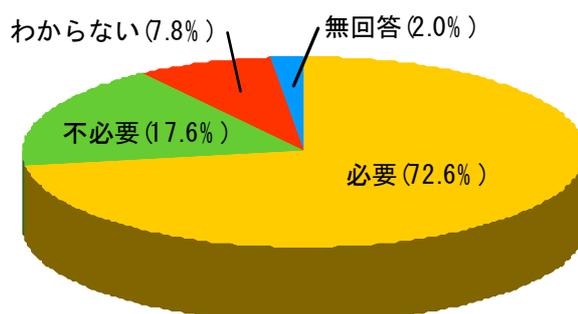
Q23. 先の設問で筋芽細胞の特性を決定するための項目について「その他（ ）」を「必要」と回答された方へ。どのような手法で評価すべきかをご記述して下さい。

評価方法に関して：

- ・ 培養液の ELISA による定量化
- ・ シート機能に関して評価と記入したが、細胞移植とシート移植では異なるのでシート特有の問題が有るのならば、それに関して評価すべき。また、不整脈に対しても必ず対処すべき。

Q24. 製造された筋芽細胞シートの移植後の追跡調査のために凍結保存をする必要性があると思われますか。

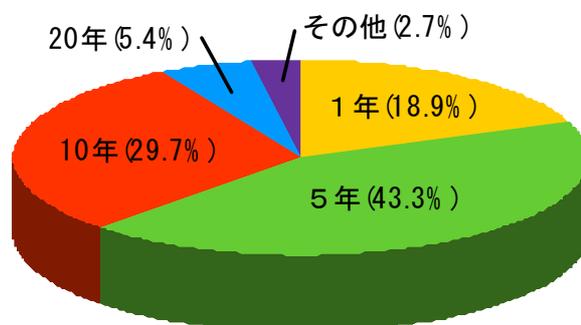
A) 必要	37	72.6%
B) 不必要	9	17.6%
C) わからない	4	7.8%
無回答	1	2.0%



合計	51	100.0%
----	----	--------

Q25. 「必要」と解答された方へ、保存期間はどれだけが適当と思われますか。

A) 1年	7	18.9%
B) 5年	16	43.3%
C) 10年	11	29.7%
D) 20年	2	5.4%
E) その他	1	2.7%
無回答	0	0.0%
合計	37	100.0%

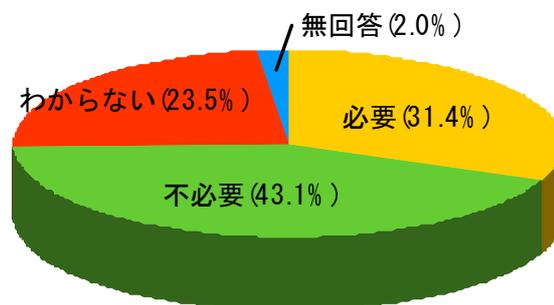


「その他」の内容：

- ・ 安全性が確認できるまでセルバンクとしての機能を装える。

Q26. 製造された筋芽細胞シートの力学的強度に関して具体的に数値をガイドラインで規定する必要性があると思われますか。

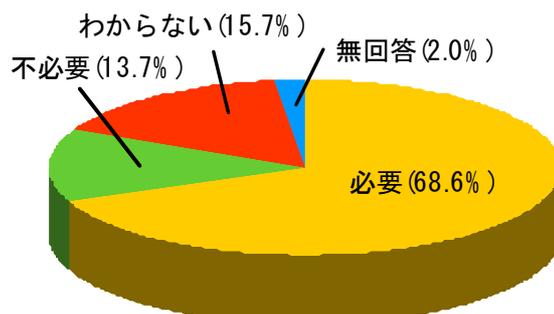
A) 必要	16	31.4%
B) 不必要	22	43.1%
C) わからない	12	23.5%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%



(2)筋芽細胞シート移植療法に関する前臨床試験について

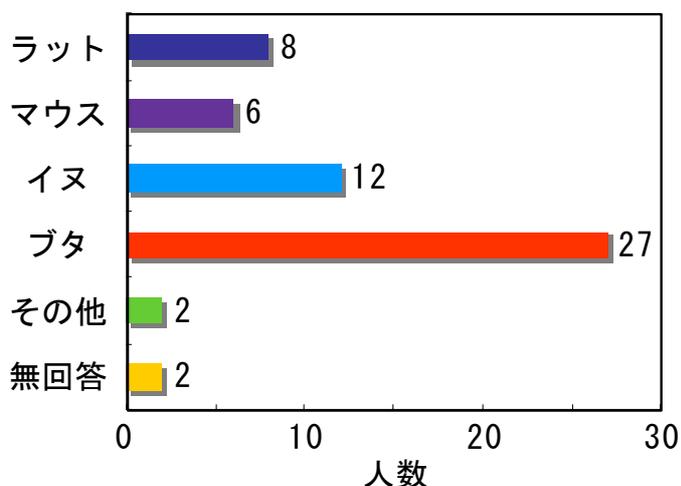
Q1. 有効性を評価するための実験動物種に関してガイドラインに明記する必要性があると思われますか。

A) 必要	35	68.6%
B) 不必要	7	13.7%
C) わからない	8	15.7%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%



Q2. 「必要」と回答された方へ、どの動物種が適切だと思われますか。(複数回答可)

A) ラット	8
B) マウス	6
C) イヌ	12
D) ブタ	27
E) その他	2
無回答	2

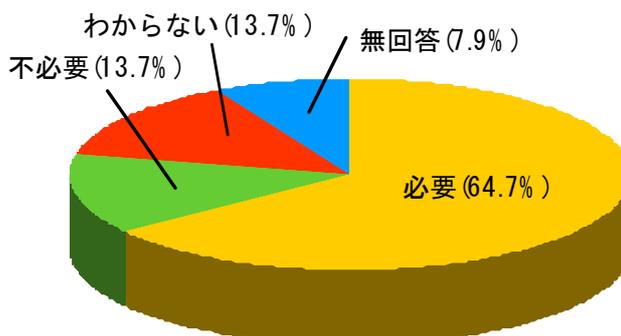


「その他」の内容：

- ・ マーモセットなどのサル
- ・ 可能ならサルで

Q3. 有効性を判定するための動物実験モデルに関してガイドラインで規定する必要性があると思われるですか。

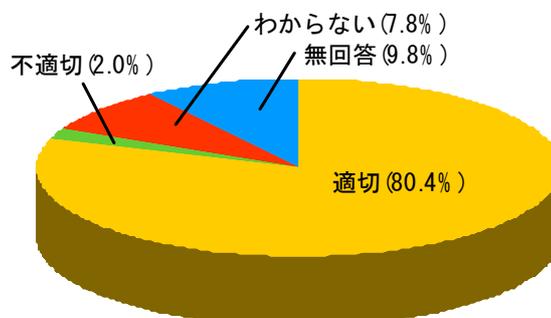
A) 必要	33	64.7%
B) 不必要	7	13.7%
C) わからない	7	13.7%
無回答	4	7.9%
合計	51	100.0%



Q4. 動物実験モデルに関しては、どのようなものが適切と思われますか。

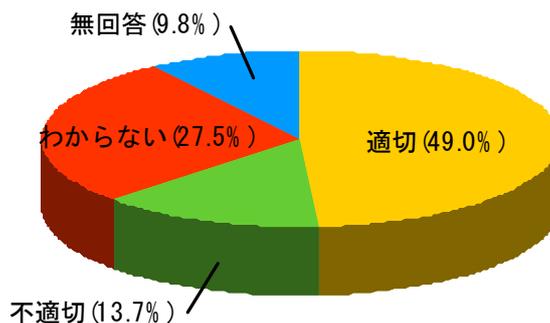
(1) 左冠動脈前下降枝の結紮による心筋梗塞モデル

A) 適切	41	80.4%
B) 不適切	1	2.0%
C) わからない	4	7.8%
無回答	5	9.8%
合計	51	100.0%



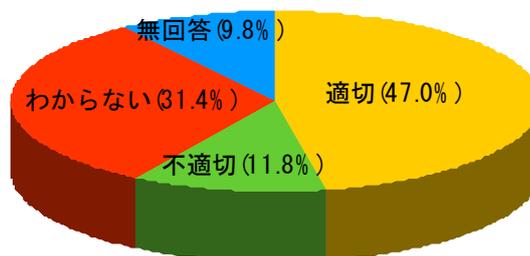
(2) 遺伝子改変による拡張型心筋症モデル

A) 適切	25	49.0%
B) 不適切	7	13.7%
C) わからない	14	27.5%
無回答	5	9.8%
合計	51	100.0%



(3) 持続的高速ペーシングによる拡張型心筋症モデル

A) 適切	24	47.0%
B) 不適切	6	11.8%
C) わからない	16	31.4%
無回答	5	9.8%
合計	51	100.0%

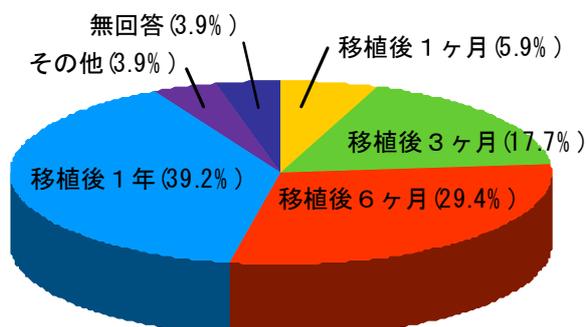


(4) その他のモデルに関して

- ・ どの疾患への臨床応用を考えているかによる。
- ・ 大動物による慢性実験

Q5. 移植時の有効性及び安全性を評価するために必要な期間はどれくらいが妥当であると思われますか。

A) 移植後 1 ヶ月	3	5.9%
B) 移植後 3 ヶ月	9	17.7%
C) 移植後 6 ヶ月	15	29.4%
D) 移植後 1 年	20	39.2%
E) その他	2	3.9%
無回答	2	3.9%
合計	51	100.0%

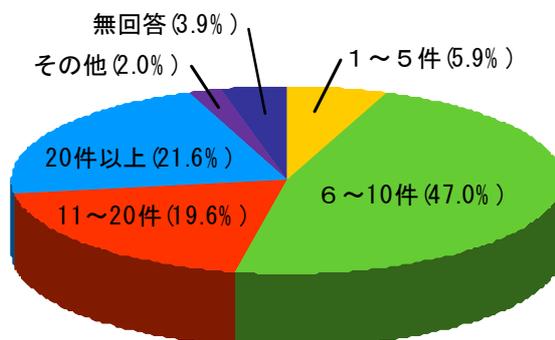


「その他」の内容：

- ・ どのような患者に移植するかによる。
- ・ さらに 2 年も最終的には必要と思われる。

Q6. 大型実験動物を用いた場合の目標症例数はどれくらいが妥当であると思われますか。

A) 1～5件	3	5.9%
B) 6～10件	24	47.0%
C) 11～20件	10	19.6%
D) 20件以上	11	21.6%
E) その他	1	2.0%
無回答	2	3.9%
合計	51	100.0%

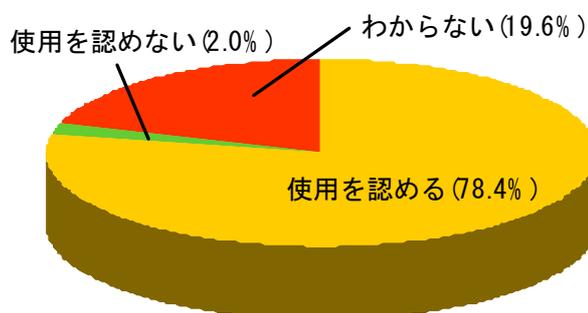


「その他」の内容：

- ・ わからない。

Q7. 筋芽細胞シートを温度応答性培養基材から回収し、移植のために移動させる場合に支援ツールとなる支持担体を用いるケースがあります。支持担体の使用に関して、どのように思われますか。

A) 使用を認める	40	78.4%
B) 使用を認めない	1	2.0%
C) わからない	10	19.6%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q8. 「使用を認める」と回答された方へ。使用する支持担体としてはどれが妥当であると思われますか。(複数回答可)

A) PVDF(ポリフッ化ビニリデン)膜やパーチメント紙などの細胞シートと分離可能な非生体分解性膜	19
B) フィブリンゲルまたはコラーゲンゲルなどの細胞シートと一体型の生体吸収性材料	23
C) わからない	5
D) その他	1
無回答	1
合計	46

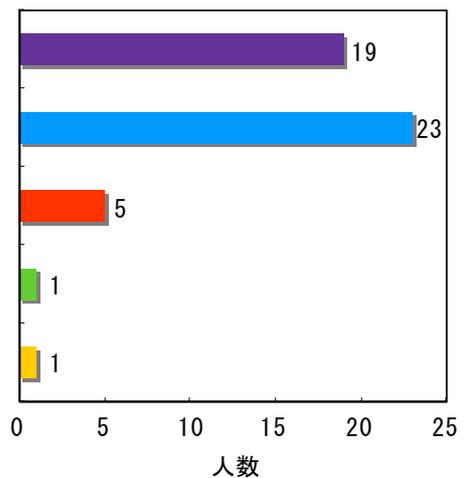
PVDF (ポリフッ化ビニリデン)膜やパーチメント紙などの細胞シートと分離可能な非生体分解性膜

フィブリンゲルまたはコラーゲンゲルなどの細胞シートと一体型の生体吸収性材料

わからない

その他

無回答



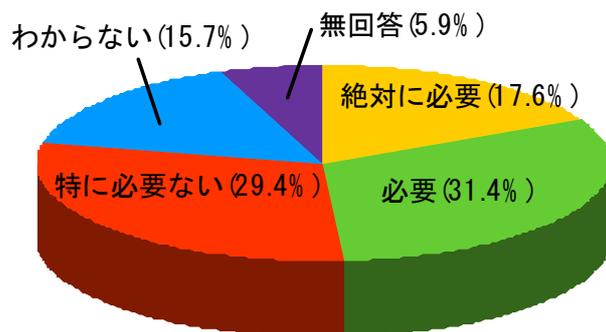
「その他」の内容：

- ・ 生体に安全であれば特に制限はない。

Q9. 前臨床試験における有効性及び安全性の評価項目としてガイドラインで規定すべき項目を選択して下さい。また、「絶対に必要」及び「必要」を回答された方へ。各項目に関して妥当と考えられる具体的な内容（数値・所見など）がございましたら、ご記入下さい。

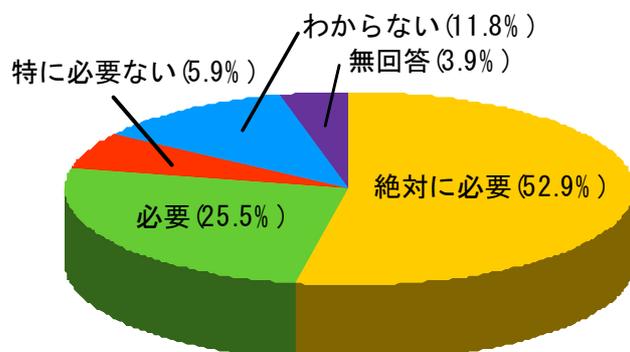
(1) 動脈血ガス検査

A) 絶対に必要	9	17.6%
B) 必要	16	31.4%
C) 特に必要ない	15	29.4%
D) わからない	8	15.7%
無回答	3	5.9%
合計	51	100.0%



(2) 十二誘導心電図

A) 絶対に必要	27	52.9%
B) 必要	13	25.5%
C) 特に必要ない	3	5.9%
D) わからない	6	11.8%
無回答	2	3.9%
合計	51	100.0%

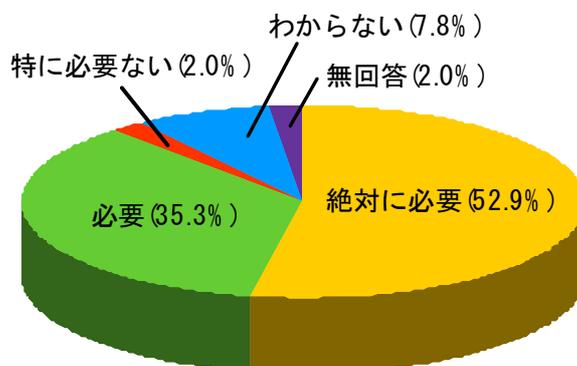


具体的な数値または所見に関して：

- ・ 致死性の不整脈が発生しない事をリアルタイムで観察する必要がある。(ST 値の上昇のチェック)

(3) ホルター心電図

A) 絶対に必要	27	52.9%
B) 必要	18	35.3%
C) 特に必要ない	1	2.0%
D) わからない	4	7.8%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%

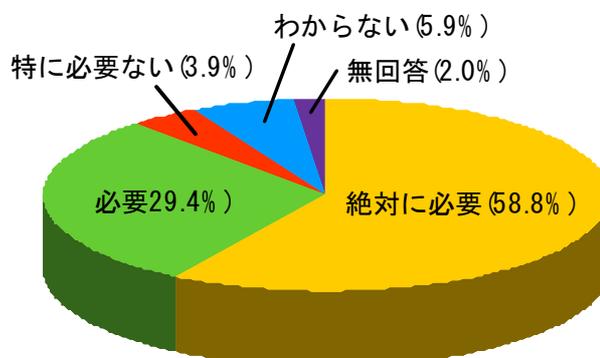


具体的な数値または所見に関して：

- ・ 致死性の不整脈が発生しない事を長期的に観察する必要がある。(VT, AP 等のチェック)
- ・ 不整脈の頻度

(4) 心臓超音波検査

A) 絶対に必要	30	58.8%
B) 必要	15	29.4%
C) 特に必要ない	2	3.9%
D) わからない	3	5.9%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%

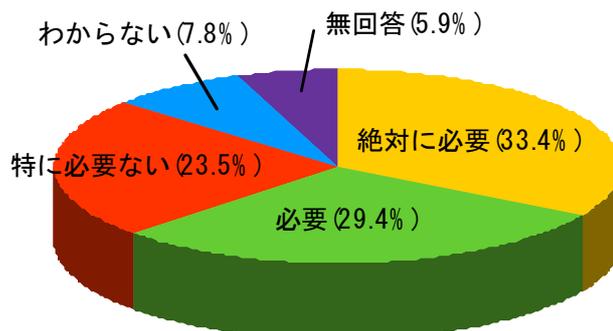


具体的な数値または所見に関して：

- ・ 心臓の動きに異常があるかを確認
- ・ 心機能評価
- ・ EF、FS、LVd、LVs、IVST、LVPWD など一般的な収縮能、拡張能

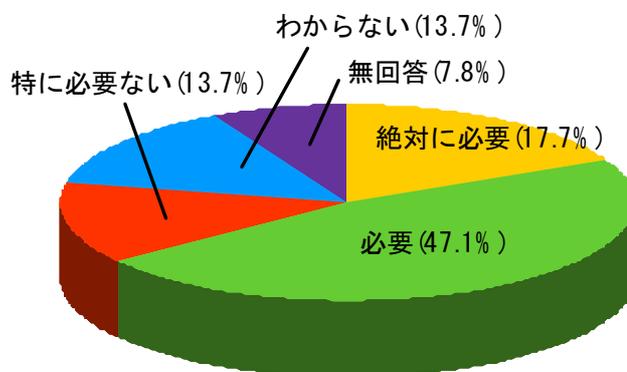
(5) 胸部レントゲン

A) 絶対に必要	17	33.4%
B) 必要	15	29.4%
C) 特に必要ない	12	23.5%
D) わからない	4	5.9%
無回答	3	2.0%
合計	51	100.0%



(6) 心筋シンチグラフィ

A) 絶対に必要	9	17.7%
B) 必要	24	47.1%
C) 特に必要ない	7	13.7%
D) わからない	7	13.7%
無回答	4	7.8%
合計	51	100.0%

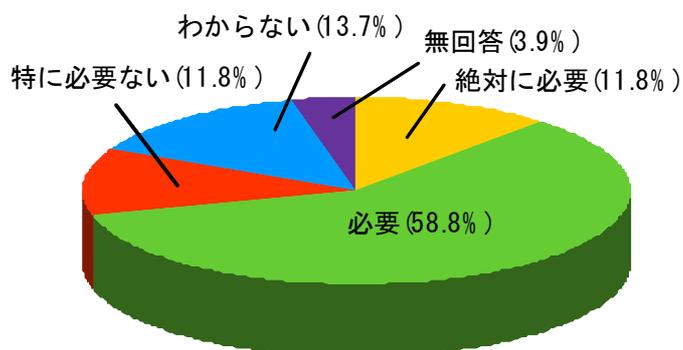


具体的な数値または所見に関して：

- ・ 虚血モデルの血流評価

(7) カテーテル検査による心内圧測定診断

A) 絶対に必要	6	11.8%
B) 必要	30	58.8%
C) 特に必要ない	6	11.8%
D) わからない	7	13.7%
無回答	2	3.9%
合計	51	100.0%

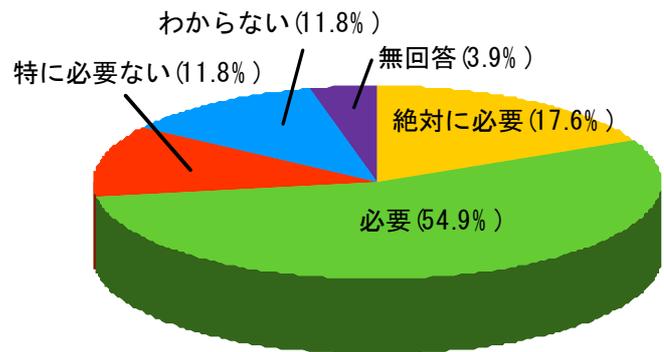


具体的な数値または所見に関して：

- ・ 心機能の評価
- ・ systolic/diastolic pressure、developed pressure、Dp/Df
- ・ PV loop

(8) カテーテル検査による冠動脈造影診断

A) 絶対に必要	9	17.6%
B) 必要	28	54.9%
C) 特に必要ない	6	11.8%
D) わからない	6	11.8%
無回答	2	3.9%
合計	51	100.0%

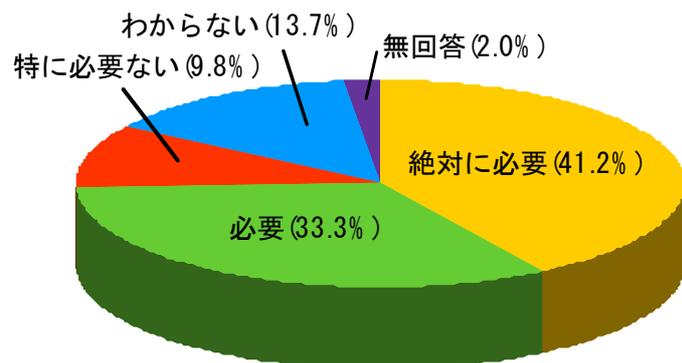


具体的な数値または所見に関して：

- ・ 心機能の冠動脈結紮モデルなら必要

(9) 組織学的・形態学的所見

A) 絶対に必要	21	41.2%
B) 必要	17	33.3%
C) 特に必要ない	5	9.8%
D) わからない	7	13.7%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%



「具体的な数値または所見」に関して：

- ・ 細胞シートの生着や心筋細胞の形態評価
- ・ 各種染色法（HE、マッソントリクローム、心筋 - 骨格筋マーカーによる免疫染色など）

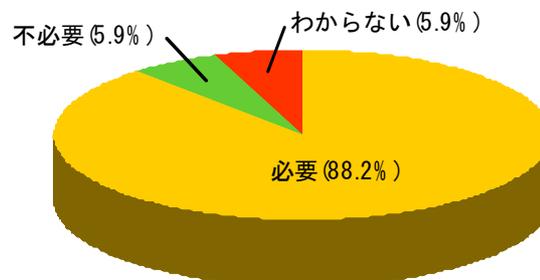
(10) その他の評価項目

- ・ PET
- ・ MRI
- ・ BNP 値

(3)筋芽細胞シート移植療法に関する臨床試験について

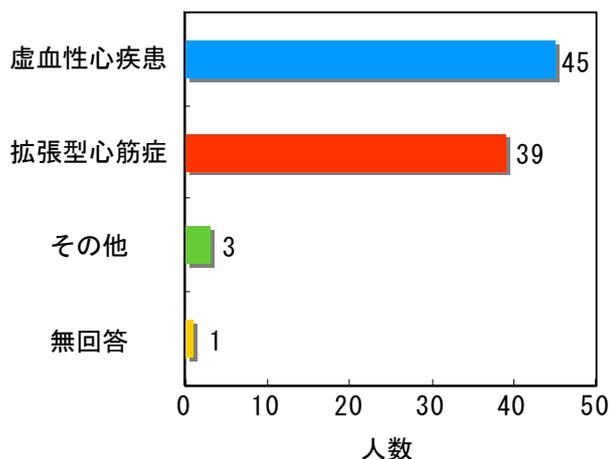
Q1. 適応疾患をガイドラインで規定する必要性があると思いますか。

A) 必要	45	88.2%
B) 不必要	3	5.9%
C) わからない	3	5.9%
無回答	0	0.0%
合計	51	100.0%



Q2. どの症例が有効適応疾患だと思われますか。(複数回答可)

A) 虚血性心疾患	45
B) 拡張型心筋症	39
C) その他	3
無回答	1



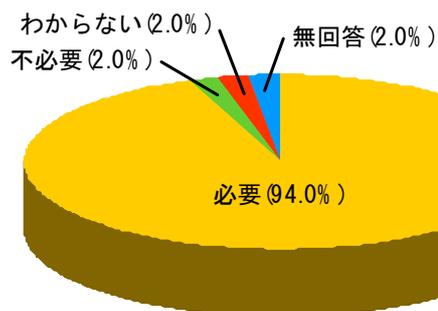
「その他」の内容：

- ・ 高血圧性心不全
- ・ 分からない
- ・ 洞不全症候群

Q3. 臨床研究を開始するにあたりガイドラインで明確な規定を設定する必要性があると思われる項目を選択して下さい。

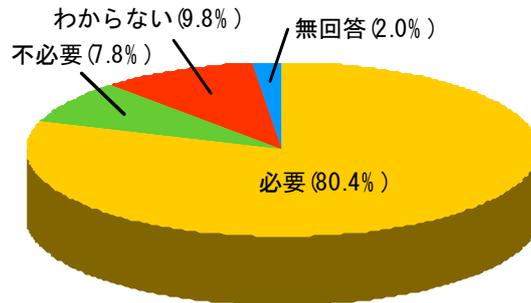
(1) 患者の選択基準

A) 必要	48	94.0%
B) 不必要	1	2.0%
C) わからない	1	2.0%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%



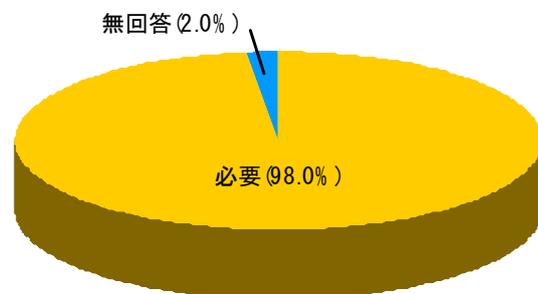
(2) 移植方法の標準化(術式の標準化)

A) 必要	41	80.4%
B) 不必要	4	7.8%
C) わからない	5	9.8%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%



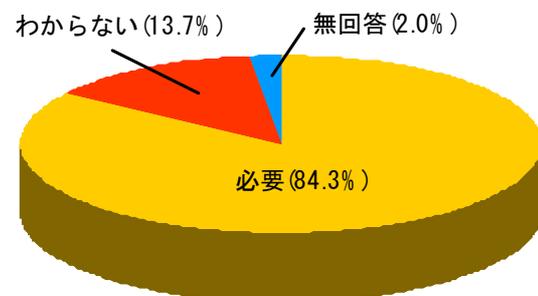
(3) 効果判定基準

A) 必要	50	98.0%
B) 不必要	0	0.0%
C) わからない	0	0.0%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%



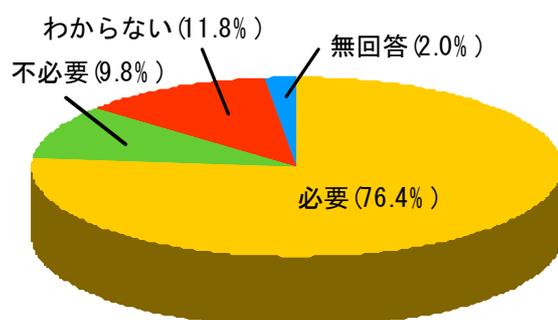
(4) 標準治療との比較のための効果判定基準

A) 必要	43	84.3%
B) 不必要	0	0.0%
C) わからない	7	13.7%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%



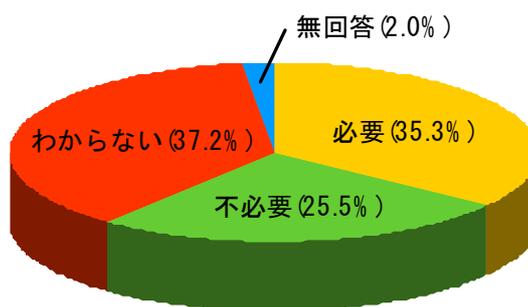
(5) 統計学的解析に基づいた患者数の設定基準

A) 必要	39	76.4%
B) 不必要	5	9.8%
C) わからない	6	11.8%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%



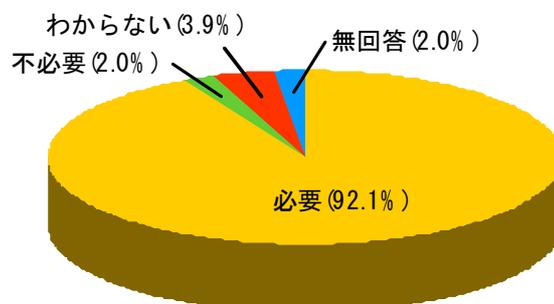
(6) 医療経済を基にした評価基準制度

A) 必要	18	35.3%
B) 不必要	13	25.5%
C) わからない	19	37.2%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%



Q4. 適応患者をガイドラインで規定する必要性があると思いますか。

A) 必要	47	92.1%
B) 不必要	1	2.0%
C) わからない	2	3.9%
無回答	1	2.0%
合計	51	100.0%



Q5. 「必要」と回答された方へ。以下の適応条件に関してどのように思われますか。

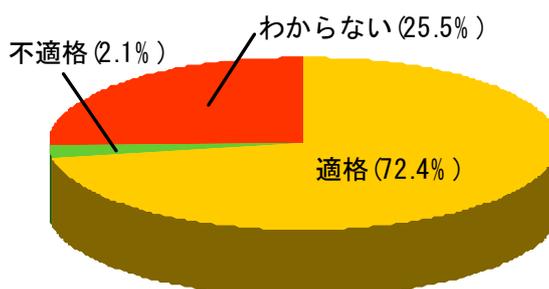
(1) NYHA心機能分類III度の心疾患患者

A) 適格	26	55.3%
B) 不適格	5	10.6%
C) わからない	16	34.1%
無回答	0	0.0%
合計	47	100.0%



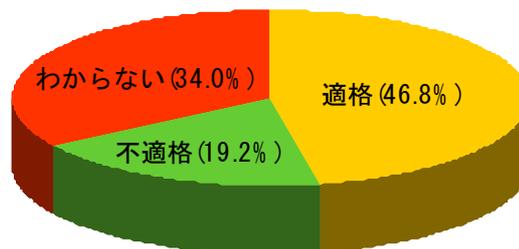
(2) NYHA心機能分類IV度の心疾患患者

A) 適格	34	72.4%
B) 不適格	1	2.1%
C) わからない	12	25.5%
無回答	0	0.0%
合計	47	100.0%



(3) 心臓超音波検査により左室駆出率の低下が認められた患者

A) 適格	22	46.8%
B) 不適格	9	19.2%
C) わからない	16	34.0%
無回答	0	0.0%
合計	47	100.0%

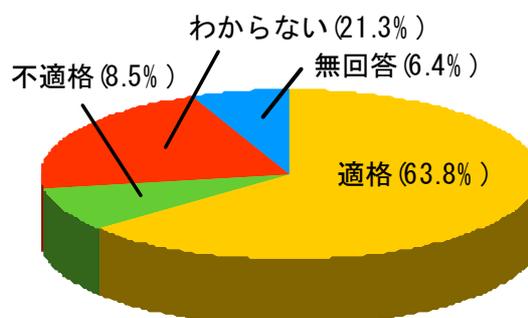


「適格」を回答された方へ。具体的な数値をご記入ください。

- ・ 30%以下
- ・ 35%：10%未満という重症なヒトと軽度低下に対する治療効果に差があると思われるから、一般的治療で使用するなら最初から重症に限定しないほうが良い。
- ・ 30%未満
- ・ 40%以下（LVG/心プールシミュで代用も可）
- ・ 30%くらい
- ・ MYOHEART™の基準に参照すべきであると思う。
- ・ 標準的なものを使用。既に規定されているようなものが望ましい。例：NYHA-AHA等
- ・ IV度のPtの場合の手術リスクが必要である。EFは30(%)以下
- ・ EF<15%
- ・ EF20%以下
- ・ EF35%以下
- ・ EF<30%
- ・ EF30-40%くらい
- ・ 20-40%(それだけでは決定できないが)
- ・ 左室駆出率の低下PV認められ、それに起因すると思われる症状があれば適格と思われる。

(4) 補助人工心臓装置を装着した患者

A) 適格	30	63.8%
B) 不適格	4	8.5%
C) わからない	10	21.3%
無回答	0	6.4%
合計	47	100.0%



(参考) : NYHA 心機能分類とは、ニューヨーク心臓学会 (New York Heart Association) が策定している患者の重症度を表す指標のことです。患者の自覚症状を問診し、患者が身体活動をどの程度制限されているかによって、心機能の状態を次の4つの度合いに分類します。

I 度	悪くない	身体活動を特に制限する必要はない。日常生活における身体活動では、疲れ、動悸、息切れ、狭心症症状などが起こらない。
II 度	少し悪い	身体活動を軽度に制限する必要がある。日常生活における身体活動で、疲れ、動悸、息切れ、狭心症症状などが起こる。
III 度	中程度に悪い	身体活動を中程度ないし高度に制限する必要がある。日常生活における軽い身体活動でも、疲れ、動悸、息切れ、狭心症症状が起こる。
IV 度	非常に悪い	身体活動を制限し安静にしているにもかかわらず、心不全症状や狭心症症状が起こり、少しでも身体活動を伴うと症状が増強する

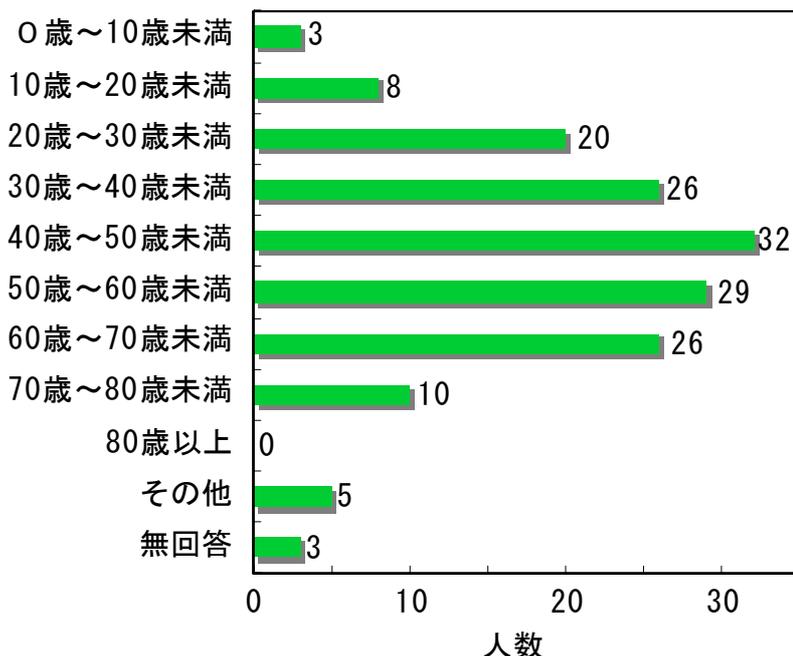
Q6. 以上の他に適応条件として重要と考えられる項目がございましたら、ご記述下さい。

適応条件に関して :

- ・ 対象疾患と心機能の基準を限定するに留めて、なるべく広く使用できるガイドラインの仮定を希望する。
- ・ MYOHEART™ (Myogenesis Heart Efficiency and Regeneration Trial) の基準に参照して、独自案を作成するのがよいのでは。
- ・ LVAD 装置日数
- ・ ドナー出現までの予測日数
- ・ 他に有効な治療法がない患者 (心移植は除く)
- ・ 外科的な手術であるため非侵襲的治療に抵抗性のある心不全が適応となるものと思われる。
- ・ 他の治療法 (移植以外) 適応が無い患者

Q7. 患者の対象年齢はどれくらいが妥当だと思われますか。(複数回答可)

A) 0歳～10歳未満	3
B) 10歳～20歳未満	8
C) 20歳～30歳未満	20
D) 30歳～40歳未満	26
E) 40歳～50歳未満	32
F) 50歳～60歳未満	29
G) 60歳～70歳未満	26
H) 70歳～80歳未満	10
I) 80歳以上	0
J) その他	5
無回答	3

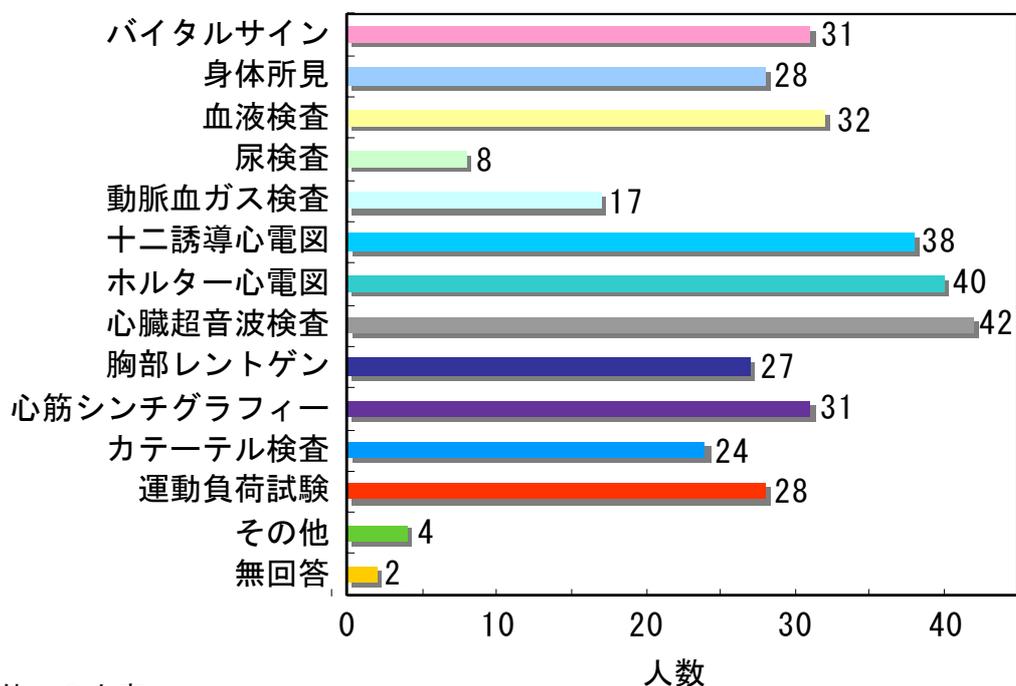


「その他」の内容：

- ・ まずは40～80才でスタートし、安全性を確認の上、年齢を下げる。
- ・ 安全性、有効性が明らかとなれば年齢制限不要。それまでは現在の臓器移植と同様が妥当。
- ・ 制限なし

Q8. 移植後における筋芽細胞シートの安全性・有効性の評価項目として重要と思われるものを選択して下さい。(複数回答可)

A) バイタルサイン	31
B) 身体所見	28
C) 血液検査	32
D) 尿検査	8
E) 動脈血ガス検査	17
F) 十二誘導心電図	38
G) ホルター心電図	40
H) 心臓超音波検査	42
I) 胸部レントゲン	27
J) 心筋シンチグラフィ	31
K) カテーテル検査	24
L) 運動負荷試験	28
M) その他	4



「その他」の内容：

- ・ PET
- ・ MRI
- ・ 運動耐容能（呼気ガス）
- ・ 遠影 CT (MDCT)

Q9. 筋芽細胞シート移植医療のガイドラインで規定すべき具体的な数値を決定するために、今後明らかとすべき研究課題がございましたら、ご記述下さい。

- (例)
- ・ 血管新生と筋芽細胞シートが産生するHGF及びVEGFの濃度との関連
 - ・ 心機能改善効果と筋芽細胞シートが産生するHGF及びVEGFの濃度との関連
 - ・ 筋芽細胞シートの厚みと心機能改善効果との関連

研究課題に関して：

- ・ 機能改善からみた筋芽細胞シートの有効積層化数
- ・ シートの viability からみた筋芽細胞シートの有効積層化数
- ・ 筋芽細胞の分化マーカー(分化度に対応したマーカーの同定)
- ・ 筋芽細胞シートの厚み(現在よりかなり厚くする必要がある)
- ・ 筋芽細胞シート治療心の終末像(ファイブrosisがどれくらいか。収縮性心膜炎様の病態をとらないか)
- ・ 炎症反応が遷延しないか。
- ・ 心筋シートの interaction

- ・ シートと心のう液との interaction
- ・ シート移植後の移植細胞の生着率
- ・ シート移植の範囲と心機能改善の関係
- ・ 移植シートの枚数、厚みと心機能改善の関係
- ・ 筋芽細胞の分離・純化基準
- ・ 伝導系の長期的な評価（特に不整脈の Follow）
- ・ Remodeling との関係
- ・ 筋芽細胞シートと不整脈の関係
- ・ 筋芽細胞シート移植位置と心機能改善効果との関係
- ・ 心不全、心疾患重症度と筋芽細胞シート移植効果との関係
- ・ 内皮前駆細胞＋筋芽細胞シートの作製及びその効果に関する検討
- ・ 筋芽細胞の分化に伴うコネキシン蛋白の減少～消失
- ・ 内在性心筋細胞との同期性興奮の減少～消失
- ・ コネキシン（特に Cx43）発現 cell にて（筋芽 cell）の確立による、同期性の向上及び致死性不整脈の減少～消失
- ・ シートの大きさと細胞数による心機能改善
- ・ シートのセルソースの比率
- ・ 筋芽細胞シートがベストか？他のセルソースは？
- ・ シートの移植による機能改善のメカニズム及びどの程度の心不全であれば回復可能か。
- ・ 厚みと接着面積を力学的に
- ・ 筋芽細胞シート内の伝導細胞発生、侵入の有無など。筋芽細胞シート内心筋と周囲心筋との電気的接続について
- ・ 筋芽細胞シート移植後の電気生理学的特性（移植シート内の電位変化）

Q10. その他に筋芽細胞シートを用いた心疾患治療法に関して、何かご意見または疑問点がございましたら、ご記述下さい。

- ・ シートの拍動がホストの心臓の拍動と同調するか。
- ・ シート（移植）と既存心筋との同調に関して不整脈の原因になるのでうまく移植後に同調するのか。
- ・ 昔行われた DCM の治療で、患者の骨格筋で心筋をくるむ手術との相違点を明確にしたい。
- ・ 心移植は法律を作って限定した施設で行うことになり研究が激減しました。自由度の高い制度を作り上げることを期待しております。又、組織工学的に他の領域でのひな型になるような汎用性の高いガイドラインになることを期待します。
- ・ 頑張ってください、期待しております。

- ・ 筋芽細胞と何らかの幹細胞を混合して、シートを作製してみてもどうかと考えています。
- ・ 是非とも成功させてほしい。たいへん期待しております。
- ・ シートと心筋の接着法。例えば、接着にも心筋に分化可能な幹細胞を利用するとか。
- ・ 行うべきではないと思います。海外での Cardiac Transplantation への橋渡しの可なり可能と思われる。
- ・ 筋芽細胞による cell sheet にはやはり短所が多く機能改善にも限界が予想される。しかし、純粋な心筋細胞によるシート作製には、今後の見通しは定かではない。実用化には筋芽細胞が最も可能性が高いですが、その有効性及び安全性を十分に御検討下さい。
- ・ 筋芽細胞移植は欧米でかなりの症例数が行われており、細胞移植とシート移植との有効性の差の検討が必要なのではないのでしょうか？（動物実験レベルではあるのかもしれませんが、本当にシートが必要かどうかの検証は必要なのでは？）
- ・ 骨格筋由来幹細胞が最近報告されており、筋芽細胞との有効性の比較 trial の施行。
- ・ 筋芽細胞シートは移植先の心臓と同期して収縮するのか？しないのならば筋芽細胞である必要はないのでは？（もっと elastic な細胞シートの方がよいくらい？）ポンプ機能改善できればよいのでは？fibroblast など。
- ・ 再生医療が工学と医学の融合した領域として着目されている中、真に医療に貢献する最良かつ最初の例として発展し、治療法として定着するように祈念します。
- ・ 移植手術そのものも侵襲が少なければと思う。
- ・ 大腿などの筋細胞切除後に長期に渡って問題がないかチェックする必要がある。
- ・ 早く、臨床試験に臨みたい。

Q11. 今後、他の細胞ソースを用いた培養細胞シートによる心疾患治療の臨床応用への可能性も期待されます。具体的な細胞ソース及びその細胞に特異的な規定項目がございましたら、ご記述下さい。

- ・ ヒト胎児細胞
- ・ 技術的な問題は比較的容易に解決されると思う。問題は再生医療や遺伝子治療に関して行政側のスタンスが曖昧な点に有る。小職も前臨床試験として厚生労働省にサルが望ましく、その成果を2, 3年で出すように強く要望された。しかし、動物愛護運動に押されれば、サルを用いた研究を中止させる等方針がまったく見えない。法的な整備を急速に進めさせるためにもお互い頑張りましょう。
- ・ Adipocyte derived stem cell
- ・ Vasculm smooth muscle cell
- ・ 骨格筋由来幹細胞
- ・ 骨髄由来間葉系幹細胞
- ・ EPC、fibroblast

- ・ 臨床の面から言うと、体の表面にある容易に採取ができる組織より単離された自己細胞が最も適当と思われる。このコンセプトからすると、筋芽細胞、脂肪組織由来間葉系幹細胞、血管平滑筋細胞、内皮細胞等が適当であるが現在のところどのセルソースが機能改善に適しているかもしくは単独の細胞によるシート移植よりも様々な細胞の共培養によるシート移植がより機能改善に適している可能性もあり、今後慎重に検討を加えた上で、臨床応用するのが望ましいと思われる。
- ・ 洞不全症候群に対するペースメーカー細胞の開発
- ・ 脂肪組織由来間葉系幹細胞から血管系の細胞を分化誘導して、筋芽細胞シートと合わせる。

5. 平成 17 年度のガイドライン検討結果

検討の結果、重症心不全に対する培養自己筋芽細胞シート移植のガイドライン素案として、以下の点を考慮することとなった。

5.1 自己由来培養筋芽細胞シートの再生医療における安全性・信頼性を保証するための(品質管理)試験項目

① 各種感染症の否定試験：

特に、B型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病、パルボウイルスB19感染症などに代表される各種感染症に関しては、骨格筋組織採取時にドナー(患者本人)に対する検査により安全性を確認すること。さらに、必要に応じて継代培養工程、最終製品である筋芽細胞シートについても否定試験を実施すること。

② 無菌試験及びマイコプラズマ否定試験：

最終製品である筋芽細胞シートに関して、移植に適用する前に無菌性(一般細菌、真菌否定)を試験により示すこと。さらに、適切なマイコプラズマ否定試験を実施すること。また、必要細胞数確保のための継代培養工程が長期に及ぶ場合には定期的に無菌試験を行うことが望ましい。数日以上維持された培養についてはマイコプラズマを検査すること。

③ エンドトキシン試験：

エンドトキシンによる汚染のないことを適切な試験法により示すこと。また、原料となる筋芽細胞や最終製品である筋芽細胞シートで試験を行うことの他に、製造工程内でも数回の管理試験を実施することが望ましい。

④ 生存率：

骨格筋組織より筋芽細胞を分離した直後、その後の継代培養工程、最終製品である筋芽細胞シートの各段階で定期的に測定すること。

(コメント：この部分は定量的表現をどのようにしたらよいかという点について多くの議論があり、結論が得られていない。何らかの数値的表現があった方がよいという点については委員間にコンセンサスが得られたが、どの程度の数値にするかでは意見の一致はまだない。上記の①②③の項目については、カットオフのための数値設定に異論はなかった。この④については、自己細胞を用いた細胞培養の場合は細胞シートの性質は個人の細胞の性質に依存し工業製品のような画一的品質保証がなされないこと、必ずしも生存率と細胞シートとしての効果に相関がないことが予想されること、患者の状況に応じてリスクとベネフィットを考える必要があること、などの理由からひとつのカットオフ値にすることには

異論が多く出された。これに対応するため、生存率をいくつかのランク分けにして規定する案なども出されたがコンセンサスを得るには至らなかった。患者に必要以上の不利益がおよぶことを避けるために、カットオフ値としては最低限の値にすべきとの意見もでた。このような議論であったため、この生存率の考え方については今後の検討課題とすることになる。いずれにせよ、in vivo 実験や動物実験の結果を精査し、それらから推定される科学的根拠にもとづく値をもとに議論すべきである点は委員共通の意見である。)

⑤ 培養筋芽細胞シート由来の生理活性物質に関する考慮：

筋芽細胞から分泌される特定の生理活性物質の分泌が最終製品である筋芽細胞シートの効能又は効果の本質である場合には、その目的としている必要な効果を発揮することを示すために、当該生理活性物質に関する検査項目及び規格を設定し、各々の分泌量を測定すること。

また、細胞由来の各種目的外生理活性物質については、必要に応じて適切な許容量限度試験を実施すること。

(培養工程中に産出された下記に代表される生理活性物質としては、血管新生及び線維の抑制に関与する HGF (肝細胞増殖因子)、血管新生に関与する VEGF (血管内皮増殖因子)、造血幹細胞のリクルートに関与する SDF-1 (stromal derived factor-1) が挙げられる。目的外のものとして、IL-1 β や IL-6 などの炎症惹起性サイトカインが考えられる。これらの有効濃度に関して動物実験等で確認した後に、本ガイドラインで基準値を規定する必要性については、目的外の炎症惹起性サイトカインについてはカットオフ値の設定が可能であるが、有効成分としての因子についてはカットオフ値になじまない旨の意見がでた。確認することの意義は認められるが、どのようにそれを測定・評価するかについては特段の提案はまだ出なかった。)

⑥ 筋芽細胞の純度試験：

骨格筋組織より筋芽細胞を回収した直後、継代培養工程、最終製品である筋芽細胞シートにおいて、筋芽細胞以外の混入細胞の有無について試験項目、試験方法、判断基準を示すこと。

(評価の意義は認められたが、混入細胞の割合や試験方法については今後の検討課題となった。)

⑦ 分化度：

骨格筋組織より筋芽細胞を回収した直後、継代培養工程、最終製品である筋芽細胞シートにおいて、筋芽細胞の分化状態判定に関する試験項目、試験方法、判定基準を示すこと。また、筋芽細胞の分化度合と効能との関連性を判定する試験項目及び試験方法も示

すこと。

⑧ 増殖特性：

継代培養工程及び最終製品である筋芽細胞シートにおいて、造腫瘍性の獲得能否定試験を実施し、安全性を確認すること。さらに、必要に応じて染色体数、転座、切断を解析し、染色体異常を否定すること。

⑨ 使用血清の種類及び濃度：

本移植ケースの場合は自己由来血清を使用することが望ましい。しかし、継代培養工程での細胞増殖性の著しい低下が認められる場合は安全性が確認されたウシ血清の使用を選択する。使用濃度に関しては、低栄養状態による筋芽細胞の分化誘導が知られているため、筋管形成率と細胞増殖率を考慮しながら使用濃度を決定すること。

⑩ 形態学的特徴：

最終製品である筋芽細胞シートの厚さに関しては、試験項目、試験方法、判定基準を示すこと。また、筋芽細胞シートの厚さと効能との関連性を判定する試験項目及び試験方法も示すこと。

⑪ 筋芽細胞シート製造工程由来不純物試験：

原材料に存在するか、又は製造過程で混入、残留、新たに生成又は添加される物質、分解物等、製品中に存在する可能性があるもので、かつ品質、安全性面からみて望ましくない物質等については、適切な純度試験を設定し、その存在を否定するか、又は存在許容量を規定すること。

⑫ 電気生理学的試験：

最終製品である筋芽細胞シートが移植後において不整脈誘発の危険性が低いことを示す試験項目、試験方法、判定基準を規定すること。

⑬ 力学的適合性試験：

最終製品である筋芽細胞シートは、移植過程及び移植後において一定の力学的強度を必要とするため適用部位を考慮した力学的適合性及び耐久性を確認すること。

(以上の培養自己筋芽細胞シートの安全性・信頼性との関連の科学的根拠を提出するための各項目に関して、具体的数値や測定方法等は今後の検討課題となった。)

5.2 前臨床試験における安全性・有効性・科学性を評価するための試験項目

- ① 前臨床試験に用いる対象動物種としては、イヌまたはブタの大型動物を使用すること。具体的疾患モデルとして、例えば、
- ・左冠動脈前下降枝の結紮による心筋梗塞モデル
 - ・遺伝子改変による拡張型心筋症モデル
 - ・持続的高速ペーシングによる拡張型心筋症モデル
 - ・補助人工心臓装着モデル
- などが考えられるが、選択に関しては今後の検討課題となった。

- ② 治療の有効性を示すために、治療効果や危険因子さらに医療経済学的な観点も合わせた比較対象試験を設定・実施すること。また、比較対象試験では、特に科学性を明らかにするとともに、治療効果の有効性は統計学的な有意性で示すこと。

(具体的な比較対象試験項目例として以下のものが考えらるが、ガイドラインにおいて記載すべきかどうか。また、記載した場合はどのモデルが妥当か、については今後の検討課題となった。)

- (例) ・利尿剤、強心剤、降圧剤などの用いた薬物治療モデル
- ・骨髄細胞及び骨格筋筋芽細胞の浮遊液注入移植治療モデル
 - ・生体分解性材料から成る合成心筋パッチ移植治療モデル
 - ・補助人工心臓装着モデル
 - ・薬物投与と補助人工心臓の装着を併用した治療モデル)

- ③ 筋芽細胞シートの移植に関しては、用いる筋芽細胞シートの積層枚数や移植箇所に関する基準を明確化すること。また、筋芽細胞シート移植支援治具を使用する場合は、その品質及び安全性に関する知見ならび当該原材料と細胞との相互作用等が細胞に及ぼす影響について明らかにすること。なお、生体吸収性材料を用いる場合には、分解生成物に関して必要な試験を実施すること。

- ④ 治療の有効性を判断するために、観察期間及び目標症例数を示すこと。

(実用化・産業化の遅延を伴わないような適切な日数(移植後の犠牲死までの飼育期間の設定)及び症例数の具体的な数値を規定すべきかどうか、規定する場合の具体的な数値については今後の検討課題となった。)

- ⑤ 適切に設計された疾患モデル動物を用いた試験により、最終製品である筋芽細胞シートの移植後における機能発現や作用持続性を評価すること。さらに、品質、安定性、安全性及び予想される有効性や機能の面から臨床試験を行うことの妥当性を明らか

にすること。特に、次の項目について詳細に比較・検討を実施すること。

(筋芽細胞シート移植後の有効性評価の判断基準としては、実際は数値設定を行わず、移植前後における各項目値で有意差が認められれば有効性があるものと評価する。)

(ア) 動脈血ガス検査

(イ) ホルター心電図

(ウ) 加算平均心電図

: 心室遅延電位の検出を行い、重症心室不整脈を予測すること。

(エ) 心臓超音波検査

: 左室駆出率または左室径短縮率を測定し改善状態を判断すること。

(オ) 心筋シンチグラフィ

: 虚血部位の有無を評価すること。

(カ) テーテル検査による心内圧測定診断

(キ) カテーテル検査による冠動脈造影診断

: 側副血行路の有無を判断すること。

(ク) 組織学的・形態学的所見

: 移植後の筋芽細胞シートにおけるシート内細胞の生存数ないしは残存数を明確化すること。

組織片の状態を長期的に観察し、生存あるいは癌化の有無を判断すること。

(ケ) 血中BNP(脳性ナトリウム利尿ペプチド)量の測定

5.3 臨床プロトコール案

対象患者

本再生医療モデルの適応症例は、当面は補助人工心臓装着を要する末期的虚血性心筋症患者を対象とする。将来的には、慢性的な重症心不全症例へと移行する。

選択基準

- 1) 虚血性心筋症により、高度心不全状態が持続し、最大限の内科的薬物療法や外科手術によっても効果が得られないNYHA 4度の心臓移植適応となる症例
- 2) 年齢18歳以上70歳未満であること
- 3) 対象患者本人が本研究の意義を十分に理解し、また家族の支援が得られること
- 4) 文書によるインフォームドコンセントが本人より得られていること

除外基準

以下のいずれかに抵触する患者

- 1) 骨格筋疾患の患者
- 2) 感染症 (HIV、HBV、HCV、HTLV-1、梅毒 (RPR 定性陽性)) に罹患している患者
- 3) 過去 6 ヶ月以内にアルコール中毒症又は薬物依存症の既往を有する患者
- 4) ホルター心電図で持続性心室頻拍を認める患者
- 5) 慢性心房細動の患者
- 6) 脳梗塞発症後 6 ヶ月未満の患者
- 7) 冠動脈形成術施行後 6 ヶ月未満あるいは冠動脈バイパス術施行後 3 ヶ月未満の患者
- 8) 心エコー図検査で左室内血栓を指摘された患者
- 9) 悪性腫瘍を合併している患者
- 10) 糖尿病性増殖性網膜症 (新福田分類 B I から B V) を合併している患者
- 11) 慢性関節リウマチの患者
- 12) G-CSF 製剤及びアフェレーシスに対する重篤な過敏症、副作用の既往を有する患者
- 13) 血液疾患 (白血病、骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群) を合併している患者
- 14) 間質性肺炎を合併している、あるいはその既往のある患者
- 15) 頭部 MRA 検査で脳動脈瘤を指摘された患者
- 16) 腹部 CT またはエコー検査で脾腫を指摘された患者
- 17) 肝硬変の患者
- 18) ワルファリンを服用中の場合、その中断が不可能な患者
- 19) 白血球 $4000/\mu\text{l}$ 未満または $10000/\mu\text{l}$ を超える患者
- 20) 血小板 $10\text{万}/\mu\text{l}$ 未満の患者
- 21) ヘモグロビン 10g/dl 未満の患者
- 22) AST (GOT) が 100IU/l 以上または ALT (GPT) 100IU/l 以上の患者
- 23) 心臓 MRI 及び左室造影の両検査がともに施行できない患者
- 24) 虚血性心疾患以外の原因 (重症下肢虚血、脊椎管狭窄症、関節疾患、中枢神経疾患、血管炎など) のため歩行に障害があり、トレッドミル負荷心電図検査による運動耐容能の評価が困難な患者
- 25) 妊婦、授乳婦、妊娠している可能性のある患者、治療期終了時までには妊娠を計画している女性患者
- 26) その他、臨床試験責任医師または分担医師が本研究の対象として不相当と判断した患者

中止基準

- 1) 筋芽細胞培養中に細菌やウイルス感染をおこしたとき
- 2) 筋芽細胞培養において、細胞移植時に目標細胞数にまで達しなかったとき
- 3) 骨髄単核球細胞を単離する前に、採取した骨髄液をサンプリングし細胞数を計算する。このとき、予定細胞数に達しておらず、かつ追加採取できないとき

- 4) 被験者が心移植を受けたとき
- 5) 補助人工心臓装着後、何らかの理由で補助人工心臓の機種を変更したとき
- 6) 被験者が臨床研究の中止を希望する場合
- 7) 上記以外で、医師が臨床研究の継続が困難と判断したとき

評価基準

自己由来の培養筋芽細胞シート移植における臨床研究の実施にあたっては、用いられる筋芽細胞シートの安全性に十分に注意し、被験者の安全の確保に努めること。さらに、安全性と有効性の評価判定方法については事前に十分な検討を行った上で、実施計画書で明確化するとともに倫理審査委員会の承認を得ること。また、安全性と有効性に関しては、最低でも追跡調査を含めた2年間は定期的な観察と評価を実践すること。次に、具体的な評価項目を記す。

① 臨床症状の観察

- ・ バイタルサイン：血圧（収縮期、拡張期）、脈拍、体重、体温
 - ・ 臨床症状：NYHA 分類
 - ・ 臨床症状-自覚症状：安静時息苦しさ、労作時息切れ、睡眠時息苦しさ、動悸、
倦怠感・易疲労感
 - ・ 身体所見：湿性ラ音、浮腫、過剰心音
- (検査時期)：手術前、手術直後、手術後1週、2週後、1ヵ月後、2ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、1年後、2年後。

② 血液検査・尿検査

- ・ 血液学的検査：赤血球、ヘモグロビン値、白血球数、血小板数、白血球分画
 - ・ 生化学的検査：血清電解質 (Na, K, Cl)、BUN、クレアチニン、血糖、尿酸、
総蛋白、アルブミン、カリウム、リン酸、総ビリルビン、抱合型ビリルビン、AST、
ALT、アルカリフォスファターゼ、LDH、CPK、CRP、BNP
 - ・ 尿検査：尿蛋白、尿糖（定性）、潜血、ケトン、PH、沈査
- (検査時期)：手術前、手術直後、手術後1週、2週後、1ヵ月後、2ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、1年後、2年後。

③ 動脈血ガス検査：PO₂、PCO₂、BE、PH、HCO₃

(検査時期)：手術前、手術直後、手術後1週、2週後。

④ 十二誘導心電図

(検査時期)：手術前、手術直後、手術後1週、2週後、1ヵ月後、2ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、1年後、2年後。

- ⑤ ホルター心電図：時間当りの持続性心室頻拍数で不整脈の症度を診断
(検査時期)：手術前、手術直後、手術後1週、1ヵ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、1年後、2年後。
- ⑥ 加算平均心電図：心室遅延電位の検出による重症心室不整脈の予測
- ⑦ 運動負荷心電図：安静時には認められない心筋虚血や不整脈の誘発の診断
- ⑧ 心臓超音波検査：左室駆出率及び左室拡張末期径
(検査時期)：手術前、手術直後、手術後1週、2週後、1ヵ月後、2ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、1年後、2年後。
- ⑨ 胸部レントゲン2方向：心胸郭比
(検査時期)：手術前、手術直後、手術後1週、2週後、1ヵ月後、2ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月後、1年後、2年後。
- ⑩ 心筋シンチグラフィ：移植部位の血流の定量し、虚血部位の同定
(検査時期)：手術前(可能であれば)、手術後3ヶ月、1年後、2年後
- ⑪ カテーテル検査による心内圧測定診断
(検査時期)：手術前、手術後3ヶ月
- ⑫ カテーテル検査による冠動脈造影診断

6. 今後への提言

臨床研究ガイドライン作成に当たっての基本的な考えを述べる。細胞からなる各種生物製剤の開発研究において一般的に言えることは、不注意に基づく細胞操作過程での病原菌などに汚染は絶対にあってはならないことであり、また信頼できるデータを得るために細胞操作を通じて起こる細胞機能変化を極力回避する工夫や移植された細胞が生体内の標的とされる場所に効率よく定着させる工夫が必要であることである。さらには、移植された細胞が生体にとって不都合な場所に定着しないようにする工夫も必要となることも少なくない。しかし、倫理面や安全面、とくに安全面で考慮しなければならないこととその要求の程度は、用いる細胞がヒト由来か非ヒト由来か、どの組織由来の細胞か、幹細胞かそうでないか、それが自己由来か非自己由来か、細胞治療剤作製に当たって培養操作が必要か不要か、細胞を加工した上で用いるのかそうでないのか、その加工の程度はどの程度なのか、スキャフォールドを用いたハイブリッドなのか否か、などによって大きく異なっている。したがって、ガイドライン作成のためには臨床研究をこれらに沿ってある程度納得いくようにカテゴライズすることが、その作成上は必要となろう。臨床研究ガイドライン作成に当たっては高度の専門的な科学的知識並びに俯瞰的な観点からの検討が必要である。また、ガイドラインは研究の進展によって進化すべきものであることから、それに迅速に対応できる仕組みづくりも必要である。

以下に、提言を述べる。

- (1) 流動性のあるガイドラインとしてその現状における最新の研究成果や知見をかんがみ、その上で2年に1回の割合でガイドラインの更新を行う。それに伴い、管理体制と組織体系の枠組みを構築する。
- (2) GLPに準拠した国立試験施設の設置を国へ要望する。
- (3) GLPに準拠した実験で取得された知見をパブリックデータとして公表し、産学官で共有することにより基準値設定の促進を計る。
- (4) 本再生医療を特別医療費として法的に容認させ、将来的にこれらのケースを混合診療で行えるように公に働きかける。

以上の案については、全体構成についての異論はほとんどなかったが、細部の項目の立て方や数値目標の是非あるいは目標値については、議論が十分とはいえないため、これはあくまで素案である。動向も見据えた今後の検討により、より完成されたガイドラインとすべきものである。

參考資料

1. 開発WGの構成と議事録概要

平成17年度は、以下の委員体制により3回の委員会を開催し、ガイドライン案の作成に関し意見交換を行った。

1.1 再生医療（心筋シート）開発WG委員名簿 （五十音順、敬称略）

明石 満	大阪大学大学院 工学研究科 応用化学専攻 分子創成化学コース (兼) 臨床医工学融合研究教育センター 教授
浅野 茂隆 (座長)	早稲田大学理工学術院 化学科生命理工専攻 教授
牛田 多加志	東京大学大学院医学系研究科 附属疾患生命工学センター 医療材料・機器工学部門 教授
許 俊鋭	埼玉医科大学病院 心臓血管外科 教授
米田 正始	京都大学医学部 心臓血管外科 教授
小林 英司 (副座長)	自治医科大学 教授
大和 雅之	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 助教授
四津 良平	慶応義塾大学 外科 (心臓血管) 教授
稲見 雅晴	株式会社ビーシーエス 代表取締役社長
坂井 秀昭	株式会社セルシード 知財管理室 室長

開発WG事務局

田口 隆久 (独) 産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門 副研究部門長

1.2 WG会議議事概要

第1回開発WG会議概要

開催日時 平成18年 1月20日

・事務局よりこれまでの経緯報告と事務局説明があった。

- ・ 経済産業省より本施策の内容説明があった。厚生労働省と経済産業省の合同施策であり、審査ベースと開発ベースのガイドラインを作成し、技術をいち早く市場にだせるような環境整備とすることが目的である。
- ・ 委員・参加メンバーの自己紹介があった。
- ・ 座長・副座長が選出された。
- ・ 話題提供者 1 より心筋シートについて、材料開発の立場から講演があった。
- ・ 話題提供者 2 より心筋シートの医療応用について講演があった。
- ・ 話題提供者 3 より医療機器ガイドラインの考え方について講演があった。
- ・ ここまでの内容について、以下の質疑があった。
 - 心筋シートが心臓の細胞とつながるのか。
 - 固定、接着の方法。
 - 細胞の生着率。
 - 心筋細胞シートと骨格筋筋芽細胞シートの差。
 - 心筋シートを使った方法がカテーテルで細胞注入する方法より優位な点。
 - 細胞培養開始から移植までにかかる日数
 - 培養素材表面分子の安定性。
 - 貼り付けた細胞シートでの細胞増殖性
 - 心筋シートの拍動の必要性。
 - 開発WGと審査WGでの検討の進め方。
 - 我が国における細胞シートの位置づけ（医療機器）について。
- ・ 委員から組織工学会における検討素案の説明があった。
- ・ ここまでの内容について以下の議論があった。
 - 心筋シートの効果についての数値目標の必要性。
 - 心筋シートの放出するサイトカインの効果。
 - 心筋シートに必要とされる厚さ。
 - 特化したガイドライン策定の必要性（細胞種、自家・他家）。
- ・ 次回に向けて、自家の骨格筋筋芽細胞を用いた細胞シートの製品化に向けたガイドラインを、実証的根拠にもとづく有効性、安全性等に配慮して検討することになった。

第2回開発WG会議概要

開催日時 平成18年 2月28日

- ・ 日本組織工学会の素案についての議論を行った。
- ・ 提案委員よりこの素案についての説明があった。
 - 素案をもとに、対面でインタビューとアンケート調査で意見を集約する。

再生医療の場合、明らかに細胞が主であり、生物学的、工学的という分離が現実には非常に難しい。したがって両WG報告の重なりは避けがたい。我々としては開発というところに非常にこだわり、企業が確認申請もしくはその後の治験等を進めていく際に、根拠になるようなガイドラインを提案したい。

生物学的、あるいは材料工学的評価数値を申請企業がすべて取りそろえることは困難であり、開発に時間がかかる原因にもなる。G L P準拠の実験によって組織的にオールジャパン的な研究チームをつくり、基礎的な数値を出し、そのプロトコールに則れば再現性よい結果が得られる状況にしておく必要がある。

・委員意見

臨床現場での使用を考えた場合はむしろカットオフ値は出さない方がよい。

カットオフ値が妥当かどうか、カットオフ値を設定することに意味があるかどうかを調べるためにここで書かれている工学的実証試験をやるべきであると記載したい。

多くの企業がこういう仕事に参入しやすいようなガイドラインをつくるのが当WGのミッション。企業の方が開発しやすい、最低限守ってほしいところをこのガイドラインの中に折り込めれば全体としてはよい。

・まとめ

客観性、すなわち科学的根拠がどのように与えられるかについての合意点を議論していただきたい。また既存の治療より、リスク・ベネフィットが下がるかどうかという科学的論拠も大切。

・委員意見

カットオフ論には慎重な方がよい。確率で議論できるものを作る必要がある。

学会のガイドラインとして科学性を担保し、ここまでやったら臨床応用可能というガイドラインをつくるのであれば、科学性を vivo と vitro でどのぐらい担保することが必要かという評価の仕方だけである。

ガイドラインというのは、一旦決めたら変えられないものではない、ということをもっと認識すべき。

G L P準拠というのは、実際に日本の医療機器に関しては本当に困難。ただ、困難だからやめようというのではなく、国内でそれに見合ったものを請け負ってくれる所をつくってほしい。

・まとめ

G L P準拠の評価に関しては、日本はオーソライズされた評価機関がない、審査機関がないという点が間違い。

このWGでガイドラインをつくる場合、臨床家がこれだけいる以上、これは当然クリニカルである。クリニカルに入るのをどう決めるかという、普通は科学性、安全性、倫理性をちゃんとはっきり言わなくてははいけない。

あくまで科学性、倫理性、安全性。安全性に関しては動物実験まで担保されなくてははいけない。もう1つは、先ほどから言われているようにプロトコルの内容。

・委員意見

このWGのケースで、骨格筋筋芽細胞を入れて、なぜ治ると考えるのか、あるいはなぜ治るような実験結果を得ているのかに関しては、学問がまだ未熟な段階でこういう大胆な話をしているので、そこが非常につくりにくいところ。その話は避けて逆にジェネラルなものを考える戦略もある、この点について意見を求める。

作用機構については、実際問題としては大きく2つ。左室の壁を分厚くする、もう1つはサイトカインの作用であり、このどちらか、あるいは両方で効いているはず。個人的にはあくまでもワンポイントリリーフ的に考えている。しかしながら、それであっても立派なワンステップにはなる。それを踏まえて、エンドポイントを設定すればいい。

in vivoに関しては、現在のところ補助心臓平成18年度ガイドラインでは補助心臓装着患者が対象となるので、イヌ、ブタ等の大型動物で必須項目はテストする。

ステップ・バイ・ステップでリスク・ベネフィットを証明しながら進むことが大切。

迅速な開発と必要経費の問題もある。

混合診療の問題も含めて提言の形でまとめることも可能。

今回の場合も特定患者を決めたとしたら、それに対してどういうリスク・アンド・ベネフィットがあるというのをそこではっきり決めて、その上でどのような安全性の試験をするといったような提言のほうが、本当のことを言うとしてありがたい。

・委員意見

いまの点は非常に重要。その問題で重要なのがちゃんとしたプロトコルにもとづく動物実験。それで安定させて、次の臨床に入るときには有効性は言わずに安全性と倫理性だけ言う。それで効果が認められれば次の段階に進む。

・委員意見

有効性に偏りすぎるとなかなかクリアできない問題がある。安全性に少しシフトしたような評価項目が必要。

科学的にきちんと検証する必要はあるが、ヒューマンでおこなう場合にどういいうガイドラインが必要かを明確にしておかなければいけない。

指針の関係で8月以降、欧米型に変わるらしいので、ヒトのデータがない状態で動物実験のデータを持って機構なり厚労省に行かなくてはいけない。そのときに、どれぐらいのデータを持っていったらいいかについて、ガイドラインが必要なのではないか。

ここはヒューマン・トライアルの最低レベルを一応我々のガイドラインに書いて、それ以上と、あとは企業に任せる。それぞれ証明の仕方は企業によって違うのでミニマムリクワイヤメントを示す。ミニマムで固定する必要はなく、ミニマム以上としてあとは企業に任せる。

・まとめ

1つは、臨床に入るために、ミニマムリクワイヤメントがどこまで必要か。そのためには、in vivo の実験でセルシートの安全性と信頼性についてどこまでデータを要求するのか。もう1つは、動物実験として難しいかもしれないが、どういう組み方をして、コントロールスタディが必要なかどうか。そのときの数値、定量化の問題に関してはいますぐに決める必要はないだろう。

もう1つはいろいろ出たプロポーザルについて、提案として箇条書きにする。さらに、もう一つ要望であるが、病理組織所見を動物実験のときに取っておいてほしい。

第3回開発WG会議概要

開催日時 平成18年3月22日

・合同検討会の報告

平成18年3月16日開催された、第3回次世代医療機器評価指標検討会（厚生労働省）/医療機器開発ガイドライン評価検討委員会（経済産業省）合同検討会の報告があった。この検討会では、各WGの座長がこれまでの検討結果を報告した。再生医療開発WGについては、浅野座長がこれまでの検討結果を報告した。この中で、特に、このWGの基本方針について説明した箇所について詳しい報告があった。その要点は、論議の主題が、医療上の必要性、安全性の確保、医療産業化の可能性について、の3点にあり、これらについて十分に合理的な説明ができるようなガイドラインを考え、それによって可能な限り迅速にヒトでの初期臨床研究を開始できるようにすることを目的とすることにあることが確認された。そのためには、関連学術団体が提示する案をもとに内容のブラッシュアップをすることが本WGの作業であり、その際、医療上の必要性についての十分な予測、in vivo 及び動物実

験による科学的論拠の明確化、具体的なリスクとベネフィットのリストアップとリスクの最小化とリスク・ベネフィット比の最適化について考慮する点も確認された。さらに、再生医療に関わる実用化にあたって、予測できない危害発生に対する研究実施者の結果責任の取り方、国の財政的支援やそれに伴うセイフティネットの形成の必要性について意見をまとめることとした。これらについて内容確認のための質疑が行われた。

- ・委員よりガイドライン素案の説明とそれに対する議論があった。

日本組織工学会で検討された素案について経過報告があった。内容は完成していないが、その構成についてはWG委員のコンセンサスが得られた。細部については、自己骨格筋芽細胞の細胞シートを重症心不全に適用することの特殊性に起因する問題点などについて考え方の議論があった。細胞シート開発の現状やそれを示す科学的データに基づいたガイドラインでないという意味がないことから、それらの点を明確にしてから細部の記述を検討することになった。細胞シートの品質保証についてカットオフ値を設定することの是非について議論があった。感染症チェック、無菌試験、エンドトキシンチェックについては異論がなかったが、細胞の生存率については一義的な設定は現実的でないので、基礎的な科学的データに基づいて検討することになった。その際にも、患者の利益を考えてカットオフ値は最低限の値とした方が良い旨の意見が多かった。また、細胞シートから産生する物質については、炎症惹起サイトカインはカットオフ値設定になじむが、栄養因子・増殖因子については再生医療効果としてポジティブな面もあるためなじまない旨の意見がでた。また、FBSの使用濃度等についても議論があったが、結論は今後の検討にゆだねられた。また、ガイドラインは医療技術やバイオ技術の進展にともなってその数値基準も変化することから、2年程度ごとに見直すことを明記すべきとの意見が出た。また、対象患者の考え方についても、臨床現場の現状や動物実験の結果について十分に精査して検討する必要がある旨コメントがあった。

さらに、このガイドライン作成に資する情報を得るために実施した、専門家への詳細な項目にわたるアンケート調査の結果の概要についても報告があった。これについても報告書に盛り込まれることになった。

2. 文献資料

第1章で取り上げた研究論文の1ページ目を以下に示す。

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Biochemical and Biophysical Research Communications 341 (2006) 573–582

BBRC
www.elsevier.com/locate/ybbrc



ELSEVIER

Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential

Sachiko Sekiya, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano *

Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

Received 16 December 2005

Abstract

Previously, we have demonstrated the long-term survival of myocardial cell sheet constructs in vivo, with microvascular network formation throughout the engineered tissues. The understanding and control of these vascularization processes are a key factor for creating thicker functional tissues. Here, we show that cardiac cell sheets express angiogenesis-related genes and form endothelial cell networks in culture. After non-invasive harvest and stacking of cell sheets using temperature-responsive culture dishes, these endothelial cell networks are maintained and result in neovascularization upon in vivo transplantation. Interestingly, we also discovered that all of the graft vessels are derived from the grafts themselves and these vessels migrate to connect with the host vasculature. Finally, blood vessel formation within the grafts can be controlled by changing the ratio of endothelial cells. In conclusion, myocardial tissue grafts engineered with cell sheet technology have their own inherent potential for the in vivo neovascularization that can be regulated in vitro.
© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Angiogenesis; Vascularization; Myocardial tissue graft; Tissue engineering; Cell sheet

Blood capillaries are precisely organized throughout nearly all tissues and support normal organ function via the supply of nutrients, as well as the removal of various metabolic wastes. In particular, the heart with its high metabolic activity has an increased need for nutrient supplementation and thus possesses an abundant vascular network. Capillary formation within these tissues occurs via two basic vessel-constructing processes: vasculogenesis that occurs in the developing embryo, and angiogenesis, which is the formation of new capillaries via sprouting or intussusception from pre-existing vessels [1].

Vasculogenesis occurs when the primary vascular plexus begins to form primitive blood vessels from angioblasts, which are the embryonic precursors of vascular endothelial cells [2]. After vasculogenesis occurs during embryonic development, new blood vessels are formed via angiogenesis. During the initiation of microvessel formation, there is a focal reduction both between interacting cells, as well as with the surrounding extracellular matrix (ECM), after which, deviation of pericytes occurs and endothelial cells

begin to proliferate and migrate in either a sprouting manner or via intussusception. Finally, after the formation of endothelial cell networks via intussusception and cell sprouting, functional blood vessels are constructed by the processes of maturation and remodeling.

In contrast to embryonic vessel development, angiogenesis in adults is generally limited to wound healing and changes in female reproductive organs during the menstrual cycle and pregnancy. However, improper vascularization does occur in some pathological situations, such as ocular neovascularization, inflammatory diseases, and tumor formation [3]. Conversely, critical vascular regression can also cause defects in functional organs, such as myocardial infarction and the formation of pressure sores. Therefore, the development of techniques for the proper regulation of vascularization is of significant clinical interest [4,5].

Recently, regenerative medicine has become increasingly popular as a possible method for treating patients suffering from severe organ failure [6–8]. Ideally, via the combination of biotechnology and cell biology, functional tissues that resemble native structures can be created to replace damaged organs [9–11]. Yet, thus far a major obstacle has been the inability to maintain thick, viable tissues both

* Corresponding author. Fax: +81 3 3359 6046.
E-mail address: tokano@abmes.twmu.ac.jp (T. Okano).

The FASEB Journal express article 10.1096/fj.05-4715fje. Published online January 26, 2006.

Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues

Tatsuya Shimizu,* Hidekazu Sekine,* Joseph Yang,* Yuki Isoi,* Masayuki Yamato,* Akihiko Kikuchi,* Eiji Kobayashi,[†] and Teruo Okano*

*Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666; and [†]Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine, Jichi University Medical School, 3311-1 Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498 Japan

Tatsuya Shimizu and Hidekazu Sekine contributed equally to this work.

Corresponding author: Teruo Okano, Ph.D., Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666 Japan. E-mail: tokano@abmes.twmu.ac.jp

ABSTRACT

Recently, the field of tissue engineering has progressed rapidly, but poor vascularization remains a major obstacle in bioengineering cell-dense tissues, limiting the viable size of constructs due to hypoxia, nutrient insufficiency, and waste accumulation. Therefore, new technologies for fabricating functional tissues with a well-organized vasculature are required. In the present study, neonatal rat cardiomyocytes were harvested as intact sheets from temperature-responsive culture dishes and stacked into cell-dense myocardial tissues. However, the thickness limit for layered cell sheets in subcutaneous tissue was ~80 μm (3 layers). To overcome this limitation, repeated transplantation of triple-layer grafts was performed at 1, 2, or 3 day intervals. The two overlaid grafts completely synchronized and the whole tissues survived without necrosis in the 1 or 2 day interval cases. Multistep transplantation also created ~1 mm thick myocardium with a well-organized microvascular network. Furthermore, functional multilayer grafts fabricated over a surgically connectable artery and vein revealed complete graft perfusion via the vessels and ectopic transplantation of the grafts was successfully performed using direct vessel anastomoses. These cultured cell sheet integration methods overcome long-standing barriers to producing thick, vascularized tissues, revealing a possible solution for the clinical repair of various damaged organs, including the impaired myocardium.

Key words: poly(*N*-isopropylacrylamide) • electrophysiology • microsurgery

Since Langer and Vacanti first reported the formation of bioengineered cartilage tissue shaped as an ear within mouse dorsal subcutaneous tissues, the field of tissue engineering has progressed rapidly. This initial study described constructs fabricated by seeding cell suspensions into three-dimensional (3-D) biodegradable scaffolds molded into the proper size and shape of an ear (1, 2). Since then, many researchers have attempted to reconstruct various tissues

Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters

Haruhiko Kondoh^a, Yoshiki Sawa^{a,*}, Shigeru Miyagawa^a, Satoru Sakakida-Kitagawa^b,
Imran A. Memon^a, Naomasa Kawaguchi^c, Nariaki Matsuura^c, Tatsuya Shimizu^d,
Teruo Okano^d, Hikaru Matsuda^a

^a Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Division of Cardiovascular Surgery, Department of Pathology, Molecular Pharmacology, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan

^c Division of Cardiovascular Surgery, School of Allied Health Science, Faculty of Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan

^d Tokyo Women's Medical University, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo, Japan

Received 15 March 2005; received in revised form 30 October 2005; accepted 1 November 2005

Time for primary review 27 days

Abstract

Objectives: Cell therapy is a promising strategy for ischemic cardiomyopathy. However, the direct injection method has limitations for generalized cell delivery, especially in dilated cardiomyopathy (DCM). We hypothesized that a sheet-shaped myoblast graft would be superior to direct injection for improving cardiac performance in DCM.

Methods: Male 27-week-old BIO TO-2 (DCM) hamsters that showed moderate cardiac remodeling were used as recipients. Myoblasts isolated from BIO F1B hamsters were cultured on dishes coated with poly(*N*-isopropylacrylamide), a temperature-responsive polymer, and spontaneously detached as a sheet-shaped graft at 20 °C without enzymatic treatment. Three different therapies were conducted: (1) sheet-shaped myoblast graft implantation (S group, *n* = 29); (2) myoblast injection (M group, *n* = 28); and (3) sham operation (C group, *n* = 28). In the S group, two sheet-shaped myoblast grafts were implanted on the left ventricle (LV) wall, and in the M group, myoblasts were injected into the right ventricle (RV) and LV walls.

Results: After the sheet-shaped myoblast grafts were implanted, echocardiography demonstrated that the dilated LV dimension was significantly reduced, whereas the hearts in other groups showed a progression of LV dilation. The fractional shortening in the M and C groups decreased significantly while that in the S group was maintained at the preoperative level for 3 months after the operation. Histological examination demonstrated that in the S group, the LV wall thickness was increased, with viable myoblasts, and myocardial fibrosis was decreased compared with the other groups. Immunohistochemical staining demonstrated alpha-sarcoglycan and beta-sarcoglycan expression on the basement membrane of the cardiomyocytes in the S group but not in the other groups. The life expectancy was significantly prolonged in the S group.

Conclusion: Sheet-shaped myoblast graft implantation improved cardiac performance and prolonged life expectancy, associated with a reduction in myocardial fibrosis and re-organization of the cytoskeletal proteins in DCM hamsters. Thus, sheet-shaped autologous myoblast graft implantation may induce restoration of the heart in DCM.

© 2005 European Society of Cardiology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cardiomyopathy; Myoblast; Sheet

1. Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) is one of the most common causes of chronic heart failure [1]. Contemporary medical therapy has dramatically improved the prognosis of

* Corresponding author. Tel.: +81 6 6879 3154; fax: +81 6 6879 3159.

E-mail address: sawa@surg1.med.osaka-u.ac.jp (Y. Sawa).

Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces

Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Yuki Isoi, Takumitsu Akutsu, Takeshi Setomaru, Kazuhiko Abe, Akihiko Kikuchi, Mitsuo Umezu, Teruo Okano

Abstract—Recent progress in cell transplantation therapy to repair impaired hearts has encouraged further attempts to bioengineer 3-dimensional (3-D) heart tissue from cultured cardiomyocytes. Cardiac tissue engineering is currently pursued utilizing conventional technology to fabricate 3-D biodegradable scaffolds as a temporary extracellular matrix. By contrast, new methods are now described to fabricate pulsatile cardiac grafts using new technology that layers cell sheets 3-dimensionally. We apply novel cell culture surfaces grafted with temperature-responsive polymer, poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm), from which confluent cells detach as a cell sheet simply by reducing temperature without any enzymatic treatments. Neonatal rat cardiomyocyte sheets detached from PIPAAm-grafted surfaces were overlaid to construct cardiac grafts. Layered cell sheets began to pulse simultaneously and morphological communication via connexin43 was established between the sheets. When 4 sheets were layered, engineered constructs were macroscopically observed to pulse spontaneously. *In vivo*, layered cardiomyocyte sheets were transplanted into subcutaneous tissues of nude rats. Three weeks after transplantation, surface electrograms originating from transplanted grafts were detected and spontaneous beating was macroscopically observed. Histological studies showed characteristic structures of heart tissue and multiple neovascularization within contractile tissues. Constructs transplanted into 3-week-old rats exhibited more cardiomyocyte hypertrophy and less connective tissue than those placed into 8-week-old rats. Long-term survival of pulsatile cardiac grafts was confirmed up to 12 weeks. These results demonstrate that electrically communicative pulsatile 3-D cardiac constructs were achieved both *in vitro* and *in vivo* by layering cardiomyocyte sheets. Cardiac tissue engineering based on this technology may prove useful for heart model fabrication and cardiovascular tissue repair. The full text of this article is available at <http://www.circresaha.org>. (*Circ Res.* 2002; 90:e40-e48.)

Key Words: cardiac tissue engineering ■ temperature-responsive cell culture surface ■ cell sheet ■ electrical communication ■ angiogenesis

Recently, cell transplantation to repair or supplement impaired heart tissue has been pursued by various approaches as an alternative therapy for heart transplantation.¹ Several possible cell types, including myoblasts, cardiomyogenic cells derived from bone marrow stroma, Lin⁻c-kit^{pos} bone marrow cells, multipotent endothelial cells, and embryonic stem cells, have been reported as human implantable cell sources.²⁻⁶ Myocardial injection of autologous myoblasts has been clinically performed and shown to produce some limited recovery from heart dysfunction.⁷ In these therapies using direct delivery of isolated cells, each cell differentiates and remodels in response to its surrounding environment, leading to tissue regeneration and functional repair.

In contrast to isolated cells, research on further advanced therapies to transplant tissue-engineered functional heart grafts has also now begun.⁸ As originally proposed by Langer and Vacanti,⁹ tissue engineering's most popular approach is based on the premise that preparations of cells, extracellular matrix (ECM), and growth factors together leads to tissue reconstruction, and that 3-dimensional (3-D) biodegradable scaffolds are useful as alternatives for ECM. This context has also been applied to cardiac tissue engineering. Eschenhagen, Zimmermann, and coworkers^{10,11} have developed a 3-D heart tissue model using a collagen matrix that allowed direct measurement of isometric contractile forces. Akins and coworkers¹² have shown 3-D contractile cardiomyocyte aggregates on polystyrene beads in rotating bioreactors. Papadaki

Original received October 15, 2001; resubmission received December 13, 2001; revised resubmission received January 14, 2002; accepted January 14, 2002.

From the Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science (T.S., M.Y., Y.I., A.K., T.O.), Tokyo Women's Medical University; the Department of Cardiovascular Science (K.A.), the Heart Institute of Japan, Tokyo Women's Medical University; and the Department of Mechanical Engineering (T.A., T.S., M.U.), Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

Correspondence to Teruo Okano, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666 Japan. E-mail tokano@lab.twmu.ac.jp

© 2002 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://www.circresaha.org>

DOI: 10.1161/hh0302.105722

Two-Dimensional Manipulation of Cardiac Myocyte Sheets Utilizing Temperature-Responsive Culture Dishes Augments the Pulsatile Amplitude

TATSUYA SHIMIZU, M.D., MASAYUKI YAMATO, Ph.D., AKIHIKO KIKUCHI, Ph.D.,
and TERUO OKANO, Ph.D.

ABSTRACT

Although cardiac myocytes adherent to tissue culture polystyrene (TCPS) dishes retain the spontaneous beating, the pulsatile amplitude is highly limited compared to that *in vivo*. One of the main reasons for the limited pulsation may be the interface between the cells and the TCPS surfaces. Release of these cells from rigid TCPS surfaces may augment their pulsatile amplitude. With this perspective, we have developed a novel cell manipulation technique to detach cultured cardiac myocytes from rigid surfaces and to rescue higher pulsatile amplitude of the cells using temperature-responsive culture dishes and discuss the possibility of improving this heart tissue model. Primary cardiac myocytes were cultured on the slightly hydrophobic dish surfaces grafted with a temperature-responsive polymer, poly(*N*-isopropylacrylamide). Cells adhered and proliferated, forming confluent cardiac myocyte sheets in a fashion similar to those on ungrafted TCPS dishes. Decrease in culture temperature resulted in surface change of the polymer from slight hydrophobic to highly hydrophilic due to extensive hydration of the grafted polymer on the dishes. This results in release of cardiac myocyte sheets from the dishes without enzymatic or EDTA treatment. When no support was used, the detached cardiac myocyte sheets shrank to one-tenth size, which ceased their pulsation. When chitin membranes were used to support the confluent sheets to prevent cell shrinkage, the detached cell sheets could be transferred and readily adhered onto another virgin TCPS dishes. These transferred cell sheets preserved the similar cell morphology and pulsation to those before the detachment. When polyethylene meshes were used to support cell sheet transfer, detached cardiac myocyte sheets partially attached to the mesh threads. Then, the constructs were inverted and placed in another culture dish to prevent direct association to dish surfaces. Moreover, the cardiac myocyte sheets were reorganized to heart tissue-like structures by the unisotropic contraction orientated by the mesh threads, and the pulsatile amplitude increased more than 10 times higher. This technique would bring about new insight in tissue engineering as well as cultured heart model.

Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets

Imran A. Memon, MBBS, PhD,^a Yoshiki Sawa, MD, PhD,^a Norihide Fukushima, MD,^a Goro Matsumiya, MD,^a Shigeru Miyagawa, MD, PhD,^a Satoshi Taketani, MD,^a Satoru K. Sakakida, MD, PhD,^c Haruhiko Kondoh, MD, PhD,^a Alexey N. Aleshin, MD, PhD,^a Tatsuya Shimizu, MD, PhD,^b Teruo Okano, PhD,^b and Hikaru Matsuda, MD^a



Dr Memon

Objectives: Autologous skeletal myoblast cell transplantation by means of the injection method is subject to the loss of intercellular communication, extracellular matrix, and cell numbers. We hypothesize that the implantation of skeletal myoblast cell sheets might be more advantageous in repairing the impaired heart by providing uniform and stable cell delivery with less cell loss and without disrupting the cell-cell microenvironment.

Methods: Left anterior descending coronary artery-ligated Lewis rat hearts (2 weeks, total n = 173) received 1×10^7 autologous skeletal myoblasts by means of cell transplantation either through myoblast injection or implantation of 2 monolayer-constructed myoblast sheets (5×10^6 cells per sheet) or through medium injection. Myoblast sheets were constructed with temperature-responsive, polymer-grafted cell-culture dishes, which release the confluent cells from the dish surface at less than 20°C.

Results: Echocardiographic results indicated higher improvement of cardiac performance in the myoblast sheet group than among the other groups until 8 weeks after cell transplantation. Histologic comparison revealed greater cellularity and abundant widespread neocapillaries within the noticeable uniform thickened wall in myoblast sheet group hearts only. Fibrosis was substantially reduced with skeletal myoblast sheet implantation compared with skeletal myoblast cell injection. Obviously higher numbers of hematopoietic stem cells (c-kit, stem cell antigen 1, and CD34) were observed in the myoblast sheet group infarct heart region. Reverse transcription-polymerase chain reaction results showed expression of stromal-derived factor 1, hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor as follows: myoblast sheets > myoblast injection > control.

Conclusions: Myoblast sheets repaired the impaired myocardium, reduced fibrosis, and prevented remodeling in association with recruitment of hematopoietic stem cells through the release of stromal-derived factor 1 and other growth factors. Our experiment indicates a therapy for patients with severe heart failure.

Devastating myocardial infarction leads to heart failure if left untreated and unsupported. After damage, the heart is capable of a very limited regenerative capacity.^{1,2} Heart transplantations and mechanical support with left ventricular (LV) assist systems are supportive in patients with heart failure but are subject to a few important limitations, such as organ rejection, donor shortage, infections, and durability of the assist systems. Autologous cellular cardiomyoplasty (cell transplantation [Ctx]) overcomes these shortcomings and has emerged as an independent potential therapy to regenerate-repair lost myocardium and improve cardiac function.³

From the Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery,^a and Molecular Pharmacology,^c Osaka University Graduate School of Medicine,^a Osaka, Japan, and Tokyo Women's Medical University, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science,^b Tokyo, Japan.

Received for publication March 10, 2005; revisions received July 17, 2005; accepted for publication July 19, 2005.

Address for reprints: Yoshiki Sawa, MD, Department of Surgery E1, Division of Cardiovascular Surgery, University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan (E-mail: i.memon@victorchang.unsw.edu.au).

J Thorac Cardiovasc Surg 2005;130:1333-41
0022-5223/\$30.00

Copyright © 2005 by The American Association for Thoracic Surgery

doi:10.1016/j.jtcvs.2005.07.023

Tissue Cardiomyoplasty Using Bioengineered Contractile Cardiomyocyte Sheets to Repair Damaged Myocardium: Their Integration with Recipient Myocardium

Shigeru Miyagawa,¹ Yoshiki Sawa,^{1,3} Satoru Sakakida,¹ Satoshi Taketani,¹ Haruhiko Kondoh,¹ Imran Ahmed Memon,¹ Yukiko Imanishi,¹ Tatsuya Shimizu,² Teruo Okano,² and Hikaru Matsuda¹

Background. We hypothesized that tissue-engineered contractile cardiomyocyte sheets without a scaffold would show histological and electrical integration with impaired myocardium, leading to the regeneration of infarcted myocardium.

Methods. Neonatal rat cardiomyocytes were cultured on Poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted polystyrene dishes and detached as a square cell sheet at 20°C. Two sheets were stacked to make thicker contractile cardiac sheets. In cross-section, the stacked sheets looked like homogeneous heart-like tissue. Two weeks after rats were subjected to left anterior descending (LAD) ligation, two treatments were conducted: 1) cardiomyocyte sheet implantation (T group, n=10), and 2) fibroblast sheet implantation (F group, n=10). The control group underwent no additional treatment (C group, n=10).

Results. Echocardiography demonstrated that cardiac performance was significantly ameliorated in the T group 2, 4, and 8 weeks after implantation. The cardiomyocyte sheets became attached to the infarcted myocardium, showed angiogenesis, expressed connexin-43, and appeared as homogeneous tissue in the myocardium. Electrophysiological experiments showed a QRS complex with one peak in the treated scar area in the T group, but two peaks, indicative of branch block, in that of the other groups. Furthermore, the threshold for pacing of the recipient heart was lower in the T group than in the other groups.

Conclusions. Cardiomyocyte sheets integrated with the impaired myocardium and improved cardiac performance in a model of ischemic myocardium. Techniques using such tissue-engineered cell sheets are introducing the promising concept of tissue cardiomyoplasty to the field of regenerative medicine.

Keywords: Heart failure, Transplantation, Tissue engineering, Myocardial infarction, Myocytes.

(*Transplantation* 2005;80: 1586–1595)

Myocardial infarction is an irreversible injury (1). Ischemic heart disease accounts for 50% of all cardiovascular deaths and is the leading cause of congestive heart failure. However, no medication or procedure used clinically has shown efficacy in replacing myocardial scar tissue with functioning contractile tissue. Thus, there is a need for new therapeutics to regenerate normal cardiomyocytes.

Recently, the implantation of bioengineered cardiac grafts using biodegradable scaffolds was proposed as a new

treatment strategy, but it has shown only a minimal benefit in improving cardiac performance, because of poor attachment to the myocardium (2, 3). To overcome this problem, we hypothesized that bioengineered cardiac tissue without any scaffold might show histological and electrical integration with the recipient heart and thereby elicit regeneration of the impaired myocardium.

Recent developments in tissue engineering show promise for the creation of functional cardiac tissues. The new technology allows layers of cell sheets to be created without using biodegradable alternatives for the extracellular matrix (ECM) (4). With this new technology, both cell-cell junctions and adhesive proteins within the confluent cultured cell monolayers are perfectly preserved, and the endogenous ECM, which is also preserved underneath the cell sheet by the harvesting method (5), plays an important role as an adhesive agent in the sheets' integration with the recipient heart. Moreover, these cardiomyocyte sheets are electrically communicative, pulsatile 3-D cardiac constructs (6). However, it is unknown whether such cardiomyocyte sheets can maintain their function after *in vivo* implantation.

This work was supported by a grant-in-aid for Scientific Research in Japan.

¹ Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan.

² Tokyo Women's Medical University Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo, Japan.

³ Address correspondence to: Yoshiki Sawa, M.D., Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

E-mail: sawa@surg1.med.osaka-u.ac.jp.

Received 10 March 2005. Revision requested 4 May 2005.

Accepted 13 June 2005.

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/05/8011-1586

DOI: 10.1097/01.tp.0000181163.69108.dd

この分野の最近の研究成果を示す原著論文（原文英語表記）の和訳を以下に示す。

文献資料 1

Circ Res. 2002; 90:e40-e48.

新しい三次元細胞シートマニピュレーション法と温度応答性細胞培養表面による拍動性心組織グラフトの作製

Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Yuki Isoi, Takumitsu Akutsu, Takeshi Setomaru, Kazuhiko Abe, Akihiko Kikuchi, Mitsuo Umezu, Teruo Okano

Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science (T.S., M.Y., Y.I., A.K., T.O.), Tokyo Women's Medical University

Department of Cardiovascular Science (K.A.), the Heart Institute of Japan, Tokyo Women's Medical University

Department of Mechanical Engineering (T.A., T.S., M.U.), Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

抄録: 近年、損傷心筋の修復を目的とした細胞移植療法が進歩しつつあり、生物工学的手法により培養心筋細胞から三次元（3D）心臓組織を構築する試みが加速している。心臓組織工学は現在、三次元の生分解性足場を作製し一時的な細胞外マトリックスとして使用するという従来技術を利用して進められているが、本稿では、細胞シートを三次元に重層化する新技术を用いて拍動性の心筋グラフトを作製する方法を紹介する。我々が使用しているのは、温度応答性ポリマーであるポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PIPAAm）を固定した新しい細胞培養表面である。コンフルエントな細胞は、単純にこの表面の温度を下げるだけで、酵素処理を行うことなく細胞シートとして表面から剥離する。PIPAAm 固定表面から剥離したラット新生仔心筋細胞シートを積層して心筋グラフトを作製した。積層した細胞シートは同期拍動を始め、シート間にはコネキシン 43 を介した形態学的な連絡が確立された。シートを 4 枚積層した構造体では、自発的な拍動が観察された。また、重層化した心筋細胞シートをヌードラットの皮下組織に移植する *in vivo* 試験を行った。移植 3 週間後、グラフトに由来する体表電位図が検出され、肉眼的にも自発拍動が確認された。組織学的検討では、心臓組織に特徴的な構造が認められ、拍動性組織中に複数の血管新生が生じていた。3 週齢のラットに移植した場合は、8 週齢のラットに移植した場合と比較して、心筋細胞の肥厚が大きく、結合組織の形成が少なかった。拍動性心筋グラフトが長期的に生存することを最大 12 週まで確認した。これらの結果が示しているように、*in vitro* においても *in vivo* においても、心筋細胞シートを重層化することにより、電氣的に連絡する拍動性三次元心筋構造体を得ることができた。この技術に基づく心臓組織工学は、心臓モデルの作製や心血管組織の修復に有用である可能性がある。

キーワード: 心臓組織工学, 温度応答性細胞培養表面, 細胞シート, 電氣的連絡, 血管新生

近年、損傷した心臓組織の修復・補強を目的とした細胞移植が、心臓移植に変わる治療法として、さまざまなアプローチから研究されている¹。ヒトへの移植に利用できる細胞源として、筋芽細胞、骨髄間質由来の心筋原細胞、Lin⁻c-kit^{pos} 骨髄細胞、多能性内皮細胞、胚性幹細胞など、さまざまな細胞種が報告されている²⁻⁶。自家筋芽細胞の心筋内注入は既に臨床で行われており、限界はあるものの心不全からある程度の回復が得られている⁷。単離細胞を直接送達するこうした治療法では、各細胞が周囲環境に反応して分化・リモデリングし、組織再生と機能回復をもたらす。

また、単離細胞の移植と異なり、組織工学的に作製した機能性心筋グラフトを移植するというさらに高度な治療法の研究も始まっている⁸。Langer と Vacanti⁹ が最初に提唱したように、組織工学で最も広く用いられているアプローチは、細胞、細胞外マトリックス（ECM）、成長因子を一緒に調製することで組織を再建できること、そして三次元（3D）の生分解性足場が ECM の代替として有用であることを前提としている。この考えは心臓組織工学にも適用されてきた。Eschenhagen ら及び Zimmermann ら^{10,11} はコラーゲンマトリックスを用いた 3D 心臓組織を開発し、等尺性収縮力の測定に成功した。Akins ら¹² は、バイオリアクター内で回転するポリスチレンビーズ上に、収縮性の 3D 心筋細胞凝集体が形成されることを示した。Papadaki ら¹³ は、生分解性ポリマー（PGA）の足場と回転バイオリアクターを用いて、*in vitro* インパルス伝播実験用の 3D 心筋構造体を作製した。アルギン酸塩の足場を用いて作製した心筋グラフトは、心筋梗塞による心不全をある程度回復させると報告されている¹⁴。また、Li ら^{15,16} は、生分解性ゼラチンメッシュを用いて組織工学的に作製した心筋グラフトの移植により、心筋の瘢痕と右室の流出路障害がいずれも軽減したと報告している。

本稿では、ECM の代替となる生分解性物質を使用せず、細胞シートを重層化することによって培養物から 3D 組織を構築する、新しい細胞マニピュレーション法の研究を報告する。成育可能な細胞シートを得るため、温

度応答性培養表面で細胞を培養した。これは温度応答性ポリマーであるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) を電子線照射により固定した表面で、37°Cの培養条件ではやや疎水性を示し細胞が接着できるが、32°C以下になるとPIPAAmが急速に水和・膨張するため、親水性へと可逆的に変化して細胞が接着できなくなる^{17,18}。このユニークな表面を用いると、単純に培養温度を下げることにより培養細胞が自発的に表面から離れる。酵素処理(トリプシン処理)と異なり、コンフルエントな単層培養細胞中の細胞間結合と接着タンパク質が完全に保持されるため、インタクトな細胞シートを得ることができる^{19,20}。この表面を利用して、さまざまな種類の細胞シートで回収と他の表面への移送が成功している²¹⁻²⁵。今回我々は、細胞シートの積層により3D組織を構築した。心臓組織工学において、こうした構造体が機能的な心臓組織となるためには、電気的連絡と機械的応答性を有している必要がある。PIPAAm固定表面から回収したコンフルエントな培養心筋細胞シートは、*in vitro*で同期拍動を維持する²⁴。また、先に報告したように、2枚重ねたニワトリ胚心筋細胞シートのシート間には電気的及び形態学的な連絡が構築される²⁶。これらの研究結果は、我々の技術が心臓組織工学に大きな可能性をもつことを示唆している。

この技術をさらに発展させるため、本研究では、正方形のラット新生仔心筋細胞シートを最大4枚重ねて、組織様構造体を作製した。この細胞グラフト構造体の形態と拍動特性を、*in vitro*及び*in vivo*皮下組織で分析した。

材料及び方法

本研究における動物の扱いはすべて、米国立衛生研究所の「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」に準じた。

正方形パターンのPIPAAm固定ポリスチレン細胞培養皿の作製

正方形パターンのPIPAAm固定細胞培養皿を作製する具体的な手順は既報のとおりである²²。簡潔には、IPAAmモノマー(興人[東京]の厚意により提供)を2-プロパノール溶液に溶解し、ポリスチレン(TCPS)製の組織培養皿(Falcon 3002, Becton Dickinson)に広げた。この培養皿に、Area Beam Electron Processing System(NHVコーポレーション)を用いて電子線(0.25 MGy)を照射し、IPAAmを重合させるとともに培養皿表面に共有結合させた。PIPAAm固定培養皿を低温の蒸留水で洗浄して、固定しなかったIPAAmを除去し、窒素ガス中で乾燥させた。第2段階として、このPIPAAm固定表面を正方形のカバーガラス(24 x 24 mm, 松浪硝子)でマスキングした。アクリルアミド(AAm)モノマーを2-プロパノールに溶解し、マスキングした培養皿表面に塗布した。この培養皿表面を電子線照射後、洗浄して、中央部がPIPAAm固定(温度応答性)表面の正方形、その周囲がポリAAm固定(細胞非接着性)表面である培養皿を得た。この正方形パターンのPIPAAm固定培養皿は、培養に使用する前にエチレンオキシドでガス滅菌した。

ラット新生仔心筋細胞の初代培養

ラット新生仔の心筋細胞を既報の手順²⁷に従って初代培養した。簡潔には、1日齢のWistarラット(日本生物材料センター, 東京)の心室を、37°Cのコラゲナーゼ含有Hanks溶液(クラスII, Worthington Biochemical)で消化した。単離した細胞を培地に懸濁した。培地の組成は、6% FBS, 40% Medium 199 (Gibco BRL), 0.2% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液, 2.7 mmol/L グルコース, 54%平衡塩類溶液(116 NaCl, 1.0 NaH₂PO₄, 0.8 MgSO₄, 1.18 KCl, 0.87 CaCl₂, 26.2 NaHCO₃含有, いずれも[mmol/L])とした。この細胞懸濁液を、細胞密度8 x 10⁶個/培養皿で播種し、37°C・5% CO₂の湿潤条件でインキュベートした。

心筋細胞シートのマニピュレーションによる積層構造体の作製

ラット新生仔心筋細胞を、温度応答性細胞培養表面上で、37°Cで4日間培養した。コンフルエントに達した細胞を細胞シートして回収するため、20°Cに設定した別のCO₂インキュベータに培養皿を移した。心筋細胞シートは1時間以内に自然に培養皿から剥離し、液体培地中に浮遊した。剥離直後に、細胞シート全体を10 mLピペットの先端で培地とともに静かに吸引し、適切な培養表面に移した。細胞シートを移した後、折り重なった部分を伸展させるため、シート中央部に培地を滴下した。シートが広がった後、培地を吸引してシートを培養表面に接着させた。シートは30分以内に再接着した。培地を追加してさらに培養を続けた。細胞シートを積層するため、PIPAAm固定培養皿から回収した別の心筋細胞シートを、同様の方法で先の培養皿に移した。2枚目のシートを1枚目のシートの直上に配置し、培地をゆっくり吸引して1枚目のシートの上に乗せた(2枚のシートは30分で十分接着した)。同じ手順を繰り返してさらにシートを積層した。拍動性グラフトを*in vitro*で構築するため、中心部の5 mm角の正方形部分を切り抜いたフレーム状のコラーゲン膜(20 mm角の正方形, Cellgen, 高研)の上に心筋細胞シートを乗せた。したがって、細胞シートの中心部分は支持がない状態になった。

ラットへの心臓グラフトの移植

雄のF344ヌードラット(3週齢6匹, 8週齢9匹; CLEA, 東京)を、ペントバルビタールナトリウム(30 mg/kg)の腹腔内注射により麻酔した。右背側の皮膚を3 x 2 cmに切開し、開創した。手術前に、PIPAAm固定表面の温度を下げて心筋細胞シートを回収し、Hanks溶液で洗浄しておいた。この細胞構造体をポリプロピレン製の支持シート(2 x 1.5 cm)に乗せ、支持シートから滑らせてラットの背側皮下組織に移植した。5-0ナイロン縫合糸で切開部を閉創した。既報のとおり、手術後、適切な期間をおいてラットを再度麻酔し、レシピエント

の心臓とグラフトの電位図を同時に記録した。次に、移植部位を開創してビデオ録画した。その後、グラフトを切除して組織学的検討に供した。ペントバルビタールの過量投与により動物を安楽死させた。2層の細胞シート構造体は3週齢ラット3匹と8週齢ラット6匹に、4層の構造体は3週齢ラット3匹と8週齢ラット3匹に移植した。2層構造体を移植した8週齢ラットのうち3匹は、移植後、3回に分けて分析した(1, 8, 12週)。他の12匹はすべて移植3週間後に分析した。

単離細胞の注入

3週齢の雄ヌードラット8匹には、細胞シート移植と併せて単離細胞の注入も行った。具体的には、心筋細胞シート4枚をトリプシン処理し、無血清培地200 μ Lに懸濁した。回収したこの細胞全部(9×10^6 個)を、滅菌した29ゲージ針で左背側皮下組織に経皮的に注入した。続いて、同じ個体の右背側皮下組織に、4層の細胞シート積層物を上記と同様の方法で移植した。処置後1, 2, 3, 7日に組織学的所見及び細胞生存度(TUNEL染色)を比較した。

細胞シートの肉眼観察及び顕微鏡観察

培養細胞及び心筋グラフトの静止画像をデジタルカメラ(FinePix, 富士フィルム)で撮影した。この静止画像をNIH画像ソフトウェアで解析して培養細胞のサイズを測定した。培養皿からの剥離後及び積層後の心筋細胞シートの顕微鏡像を、CCDカメラ(HV-D28S, Nikon)を介してデジタルビデオカメラ(DCR-TRV900, Sony)に記録した。また、グラフトの拍動の様子を肉眼像もデジタルビデオカメラで記録した。移植した拍動性組織の収縮時及び拡張時の長軸長を、NIH画像ソフトウェアに取り込んだ静止画像で測定した。収縮時長(S)及び拡張時長(D)から、短縮率を $D - S/D \times 100\%$ として計算した。

組織学的分析

細胞のF-アクチンと核を染色するため、細胞シートを4%パラホルムアルデヒドで固定した。次に、ローダミンファロイジン(Molecular Probes, Eugene)の1:100希釈液で2時間染色し、さらにDNA結合色素(Hoechst 33258)の1:500希釈液で5分間染色した。シートの平面及び断面の蛍光像を共焦点レーザー走査顕微鏡(TCS, Leica)で観察した。断面像については、シート状のグラフトをホルマリン固定、パラフィン包埋し、10 μ m厚に切り出して、通常の方法でヘマトキシリン-エオシン染色及びアザン染色を行った。アクチンを染色するため、試料を抗 α サルコメアアクチニン抗体(Sigma)の1:500希釈液とともに1晩インキュベートし、続いて、FITC標識抗マウスIgG抗体(Wako)の1:100希釈液とともにインキュベートした。血管内皮細胞を染色するため、試料を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ共役・抗第VIII因子関連抗原抗体(Dako)とともに1晩インキュベートし、続いて、発色物質溶液で5分間処理した。ギャップ結合の有無を調べるため、シート構造体の凍結切片を作製し、100%アセトンで固定して、抗コネキシン43抗体(Chemicon)の1:100希釈液とともに3時間インキュベートし、続いて、FITC標識抗マウスIgG抗体の1:200希釈液とともにインキュベートした。蛍光顕微鏡(ELIPSE TE300, Nikon)を用い、デジタルカメラ(Finefix S1 pro, 富士フィルム)で蛍光像を撮影した。重層化したシート構造体の厚さを、NIH画像ソフトウェアに取り込んだ顕微鏡像で測定した。移植した心臓組織グラフト中の結合組織の量を調べるため、同ソフトウェアを用いて、アザン染色像の青色部分の面積を測定した。グラフトの全面積を100%とし、青色領域の面積の比を算出した。また、ヘマトキシリン-エオシン染色断面像の細胞核を基準に心筋細胞の幅を測定した。各グラフトにつき、細胞100個の幅を測定して平均した。

TUNEL染色

移植した4層構造体及び注入した細胞を、in situ DNA断片検出キット(MK500, タカラバイオ)によりTUNEL染色した。凍結切片を4%パラホルムアルデヒドで固定した。陽性対照としてラット乳腺を使用した。試料を透過化処理した後、フルオレセイン共役dUTP及びTdTを添加して高湿度のチャンバに入れ、37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。Hoechst 33258の1:500希釈液で細胞核を対比染色した。蛍光顕微鏡で蛍光像を観察した。

透過電子顕微鏡観察

移植した心筋グラフトを3%グルタルアルデヒドで固定し、さらに1%四酸化オスミウムで後固定した。エタノール系列で脱水し、Poly/Bed812包埋キット(PolyScience)で包埋した。ウルトラミクロトーム(LKB-2088)で超薄切片を切り出し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した。切片を透過電子顕微鏡(JEM-200EX, JEOL)で観察した。

電気生理学的分析

2層心筋細胞シートの電位をシートごとに測定するため、2枚の細胞シートを部分的に重ねた。以後1週間、ヒーターコントローラ(TC-344B, Warner Instrument)とフローポンプ(MasterFlex L/S, Cole-Parmer Instrument)を用いて、37 $^{\circ}$ CのTyrode溶液(137 NaCl, 3.7 KCl, 0.5 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 5.6 グルコース, 4.0 HEPES含有;すべてmmol/L)をこの細胞シートに連続的に灌流した。各シートの1枚の部分に微小電極(直径100 μ m, ユニークメディカル)2本を配置した。生体電気増幅装置(UA102, ユニークメディカル)で電位を増幅し、データ取得システム(NR-2000, Keyence)で記録した。円板電極(直径11mm, 日本光電)を用い

てヌードラットの皮膚表面電位図を記録した。電極の位置は、レシピエント心電図用に右胸部上方、左肋骨下、右大腿部の3箇所、グラフトの電位図用に移植部位と左右の大腿部とした。両電位図とも、上記と同じ装置を用いて同時に増幅・記録した。

収縮力の測定

4層のグラフトを背中に移植した3週齢のヌードラットのグラフトの端に、移植3週間後、市販のストレインゲージ(AE-801, SensoNor, 幅0.95 mm)を取り付けた(n=3)。ゲージに接続したカトランスデューサ(UPB-301, ユニークメディカル)で収縮力を測定し、上記と同じデータ取得システムで記録した。

データ解析

データは平均±SDで表した。2群間の比較には対応のないStudent's t検定で行った。多群間比較には一元配置ANOVAを用い、F分布が有意であった場合はBonferroni検定で群間の差を特定した。P<0.05を有意とした。

結果

正方形のラット新生仔心筋細胞シートの剥離

ラット新生仔心筋細胞を正方形パターンの温度応答性培養表面で4日間培養し、コンフルエントな状態にした。この接着性を有する心筋細胞の面積は $5.98 \pm 0.12 \text{ cm}^2$ 、厚さは $20 \pm 4 \mu\text{m}$ であった(n=5, 図1上)。細胞は、 $88 \pm 13 \text{ bpm}$ の速度で自発的に同期拍動した(n=6)。培養温度を 37°C から 20°C に下げると、心筋細胞は連続したシートとして1時間以内に剥離した。この様子を<http://www.circresaha.org>のオンラインデータ Movie 1に示す。シート回収後、培養表面に残留細胞は認めなかった。培養表面から離れた心筋細胞シートは、細胞骨格張力の再構成のため収縮した。これをピペット操作によりただちにTCPS表面に移した。TCPS表面に再付着したシートの面積は $1.16 \pm 0.08 \text{ cm}^2$ に縮小し、厚さは $45 \pm 8 \mu\text{m}$ に増加した(n=5, 図1下)。この縮小したシートは数日以内に自発拍動を再開した。

積層したシート間の電氣的連絡

積層した心筋細胞シート間の電氣的連絡を調べるため、図2Aに示すように、TCPS培養皿上で2枚の心筋細胞シートを部分的に重ねた。重ねたシートの拍動は当初停止したが、1週間以内に自発的な同期拍動を再開した。電気生理学的検査により、各シートの単層部分で検出されたスパイクが $74 \pm 16 \text{ bpm}$ で完全に同期していることが見出された(n=3)(図2B)。この結果は、積層した心筋細胞シートの間電氣的連絡が確立されたことを示している。

In vitroの拍動性心筋グラフト

先に報告したように²⁴、硬質の培養皿は心筋細胞の運動を制限し、培養皿から心筋細胞を離すと拍動能が増大する。そこで、2 cm角の正方形の中央部を0.5 cmの正方形に切り抜いてフレーム状にしたコラーゲン膜に心筋細胞シートを乗せた。したがって、このフレーム状コラーゲン膜に乗せた2層構造体の中央部は培養材料とまったく接触しない状態となり、同期波を生成した。この様子をオンラインデータ Movie 2の顕微鏡像に示す。心筋細胞シートを4枚重ねると拍動を肉眼で観察できた(オンラインデータ Movie 3)。継続的な拍動に起因するコラーゲンフレームの変形が数日以内に観察され、最終的に自発拍動が停止した。2層シートの断面像には、融合した均質な組織と、その中に広範に存在するコネキシン43を認めた(図3)。2層構造体及び4層構造体の中央部の厚さは、それぞれ $23 \pm 3 \mu\text{m}$ 及び $53 \pm 4 \mu\text{m}$ であった(n=3)。

ヌードラット皮下組織中の心筋グラフトの体表電位図

ポリプロピレンシートを移送用デバイスとして使用して、積層した心筋細胞シートをヌードラットの背側皮下組織に移植した(<http://www.circresaha.org>のオンラインデータ Figure 1に示す)。移植3週間後、移植した個体12匹のうち5匹について、移植した心筋グラフトに由来する体表電位図をレシピエントの心電図とは独立に検出した(オンラインデータ Figure 2)。グラフトの拍動数は13~96 bpmで、レシピエント心臓($332 \pm 27 \text{ bpm}$, n=5)と比較して緩徐であった。最も早い例では2層構造体の電位図が処置2週間後に検出された。

移植した心筋グラフトの肉眼所見及び機能解析結果

移植3週間後に移植部位を開創したところ、グラフトは全例でもとの移植部位に位置しており、自発拍動が肉眼で確認できた(n=15)。皮膚とともに切除した2層構造体と、背側筋肉部位に残したままの4層グラフトについて、肉眼像をそれぞれオンラインデータのMovie 4及び5に示す。8週齢ラットに移植したグラフトの形状はほぼ正方形であったが、3週齢ラットではレシピエントの成長に起因するわずかな変形がみられた。グラフト内への血管の進入が観察された。また、拍動性グラフトの中に微小血管網が観察された。4群(3週齢ラットに移植した2層構造体, 同4層構造体, 8週齢ラットに移植した2層構造体, 同4層構造体, 各群n=3)の短縮率は、それぞれ $6.7 \pm 0.6\%$ 、 $8.9 \pm 0.5\%$ 、 $3.6 \pm 1.4\%$ 、 $5.4 \pm 1.4\%$ であった(図4)。このデータから、積層した細胞シートの数に依存して短縮率が大きくなる傾向が示された。3週齢ラットに移植した4層構造体は、8週齢ラットに移植したものと比較して、短縮率が有意に大きかった。ストレインゲージにより in situ

で測定した、3週齢ラットに移植した4層構造体の収縮力は、 1.18 ± 0.26 mN ($n = 3$)であった。最も早い例では、移植1週間後にグラフトの拍動が肉眼的に観察された。また、拍動性グラフトの生存は、移植後少なくとも12週まで確認された。

心筋グラフトの組織学的分析結果

3週齢ラットの背側皮下組織に移植した2層構造体の断面像を図5A~5Eに示す。ヘマトキシリン-エオシン染色とアザン染色により、結合組織の間に重層化した心臓組織が確認された。炎症性変化は認めなかった。サルコメアアクチニンの免疫蛍光染色では、細長い心筋細胞中によく分化したサルコメアが観察された。アザン染色及び抗第VIII因子関連抗原抗体による免疫染色で、赤血球を含む新生血管が複数観察された。抗コネキシン43抗体による免疫蛍光像では、心筋グラフト中にギャップ結合の形成が広範に観察された。透過電子顕微鏡像では、心筋グラフト中に、よく分化した筋フィラメント、典型的な毛細血管、デスモソームを認めた(図6)。3週齢及び8週齢のラットに移植した2層構造体の厚さは、それぞれ $41 \pm 10 \mu\text{m}$ 及び $33 \pm 10 \mu\text{m}$ であった($n = 3$)。4層構造体では、3週齢ラットの場合が $65 \pm 17 \mu\text{m}$ 、8週齢ラットの場合が $69 \pm 23 \mu\text{m}$ であった($n = 3$)。グラフトの厚さにはレシピエントの週齢による有意差はなかったが、組織学的には、結合組織の量及び細胞の幅がレシピエントの週齢によって異なっていた(3週齢: 図5B, 8週齢: 図5F)。3週齢ラット及び8週齢ラットに移植した2層構造体中の結合組織の割合は、それぞれ $32 \pm 3\%$ 及び $42 \pm 3\%$ であった($n = 3$) (図7A)。細胞幅の平均値は、3週齢ラットでは $5.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ($n = 3$)、8週齢ラットでは $3.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ ($n = 3$)であった(図7B)。これらのデータから、3週齢ラットに移植した心筋細胞グラフトは、8週齢ラットに移植したものと比較して、心筋細胞の肥厚が有意に大きく線維芽細胞組織の形成が有意に少ないことが示された。

単離細胞注入と細胞シート移植の比較

単離細胞注入に対する細胞シート移植の利点を明らかにするため、心筋細胞シート4枚と同等数の単離細胞を左背側皮下組織に注入し、4層心筋組織構造体を右背側皮下組織に移植した。処置後、細胞注入部位の皮下には隆起が生じたが、細胞シートの移植部位は滑らかであった。処置1週間後に両部位を開創したところ、左側には楕円形の細胞塊を、右側には平らな正方形の組織構造体を認めた(オンラインデータ Figure 3A)。注入を行った右側の断面像には、細胞密度の高い表面領域と、細胞のない中心部の壊死領域という、高密度細胞移植に典型的な所見を認めた(図8A)。一方、細胞シートは均質な層状組織を呈し、壊死部分を認めなかった(図8E)。抗コネキシン43抗体による免疫蛍光像では、処置1日後、細胞シート構造体中には既にギャップ結合が確立されていることが観察された。一方、注入細胞にはギャップ結合をほとんど認めなかった(図8B, 8F)。注入部位にはTUNEL陽性細胞が検出され、その大多数は処置2日後に観察された(図8C, 8D)。一方、4層心筋組織グラフト中には、どの時点でもTUNEL陽性細胞をほとんど認めなかった(図8G, 8H)。細胞注入部位には、エオシン好性の細胞質、核の変形、好中球を多く含む壊死組織も観察された(オンラインデータ Figure 3B)。

考察

ラット新生仔心筋を培養した細胞シートは良好に積層でき、シート間に電氣的連絡が確立された。4層の細胞構造体では *in vitro* で肉眼的に拍動が観察できた。背側皮下組織に移植した心筋グラフトには、皮膚表面電位、肉眼的な拍動、有意な血管新生を認め、サルコメア、デスモソーム、ギャップ結合などの心臓組織様構造も観察された。週齢の若いラットに移植したグラフトでは、心筋細胞の肥厚がより大きく、結合組織が少なかった。この拍動性心筋組織はヌードラット皮下で少なくとも3ヵ月間生存した。

細胞や培養組織の移植では細胞の取得源が重要な問題となっており、心臓組織への移植についてもさまざまな細胞種が検討されている¹。胎児の心筋細胞や胚性幹細胞から分化させた心筋細胞は倫理的な問題があり、筋芽細胞や骨髄由来の多能性細胞などの自家細胞が細胞取得源として最も望ましい可能性がある^{4,7}。また、細胞の送達方法については、心筋への直接注入、冠動脈への注入、心室内へのアプローチによる単離細胞の移植が試みられているが、細胞注入後早期に急性虚血による細胞死が高率に生じると報告されている²⁸。本研究で示されたように、単離細胞注入が組織中央部の壊死を伴うのに対して、細胞シートを移植に用いると、薄い面積の大きい構造体として、細胞を損失なく、より効率的に送達することができる。また、PIPAAmを適切なデザインで培養皿に固定することにより2次元の形状とサイズを制御でき、シート構造体の厚さも、積層するシートの数により制御できる。細胞シート構造体の作製1日後のコネキシン43免疫蛍光像でも、*in vitro* における細胞間連絡の連続性が確認された。この細胞送達法が有するこうした利点は、心臓組織修復の有効性向上につながる可能性がある。

冒頭で述べたように、いくつかの研究では、心臓組織工学用の一時的な支持体として三次元の生分解性足場が利用されている⁸。しかし、足場内への細胞の移動が不十分であることや、足場の生分解に起因する炎症性反応が問題となっている^{14,16}。本研究は、この戦略とは対照的に、生育可能かつインタクトな心筋細胞シートを用いた新しいアプローチを示すものである。このシートは、人工の足場を使用せず、細胞自身が産生するECMを有しており、三次元的に重層化して心臓組織を構築することができる。コンフルエントな培養心筋細胞がギャップ結合を発現し同期拍動を示すことは既に知られている²⁹。培養温度を下げることによりPIPAAm固定培養皿から回収した心筋細胞シートには、この密接な電氣的連絡が保たれている。我々は、3D心筋グラフトを作製するため、電氣的連絡を有する心筋細胞シートを積層して組織状のマルチシート構造体を得た。この回収方法(トリプシン処理を行わない方法)で回収した細胞シートは、シート下側の内因性ECMが保たれてお

り、このECMが接着物質として重要な役割を果たす²⁰。そのため、積層したシートは互いに接着し、組織の三次元再構成が速やかに生じた。ニワトリ胚及びラットの心筋細胞を用いた前回及び今回の研究が示しているように、積層したシート間の電氣的連絡は培養中に形成され、シート構造体は同期して拍動する²⁶。これらのデータから、心筋細胞シートをさらに積層することで、電氣的に連絡したより厚いシート構造体を作製できる可能性が示唆される。

本研究では、心筋グラフトを皮下組織に移植して、拍動と *in vivo* での生存を調べた。心筋梗塞による心機能不全をより効果的に回復させるには、積層した心筋細胞シートを心筋癒痕部に移植する方法が有益である可能性がある。前述したように、細胞シート移植では細胞注入より多くの細胞が生存すると考えられる。例えば拡張型心筋症の治療においては、複数回の細胞注入はリスクを伴う。したがって、損傷した心臓組織の広い領域に心筋細胞シートを配置する方法は、安全性及びサポート性がより高い治療インターベンションとなる可能性がある。いずれの場合も、レシピエント心臓とグラフトとの間の電氣的・形態学的な連絡が重要である。これまで、3D足場を用いて組織工学的に作製した心筋グラフトで、許容できる水準のレシピエントへの組織の統合が生じたことが形態学的解析により示されている¹⁴⁻¹⁶。これらの結果から、我々の技術で作製した心筋グラフトを損傷した心臓に応用できる可能性が強く示唆される。レシピエントとグラフトとの電氣的連絡を確認するには、新たな生理学的解析が必要である可能性があり、現在、この方向で研究を進めている。

心臓組織が健全に拍動するには、酸素を含んだ血液の十分な灌流が必要である。本研究では、皮下組織から移植心筋グラフトへと伸びる血管新生部位が複数確認された。この血管新生は、心筋細胞が分泌する血管内皮成長因子などの血管形成因子により誘発された可能性がある³⁰。三次元の生分解性足場を用いた心臓組織工学のこれまでの研究では、グラフト周辺部で細胞密度が高い一方、構造体内部には酸素灌流不足のため壊死や細胞不在が生じることが観察されている^{10, 11, 30a}。我々の技術でも、何らかの血管形成を行わなければ、デバイスに起因する局所的な低酸素状態のため構造体の厚さが制限されると思われる。注入細胞の断面像が示しているように(図8A)、血管形成がない場合は約100 μ m(ラット新生仔心筋細胞シートならば6枚)が組織の厚さの限界である可能性がある。成育可能なより厚い組織構造体を作製するには、新生血管の密度と方向を制御する新しい技術が必要となろう。我々の技術で作製した単層の内皮細胞は *in vivo* で毛細血管の形成を促進する³¹。したがって、心筋細胞シートの間に内皮細胞シートを意図的に挿入することで *in situ* 血管新生を促進し、より厚い組織構造体を作製できる可能性もある。この重要な点を明らかにするため、さらに研究が必要である。

軟部組織に移植した心筋グラフトを組織学的に分析した結果、3週齢ラットは8週齢ラットと比較して心臓組織様構造の分化が進んでいた。また、機能的分析でも、3週齢ラットに移植した4層構造体は8週齢ラットに移植したものと比較して短縮率が有意に大きかった。移植期間中のレシピエントの体重変化も、3週齢ラット(64 \pm 10 g \rightarrow 151 \pm 22 g)と8週齢ラット(183 \pm 10 g \rightarrow 232 \pm 23 g)とで大きく異なっていた。3週齢と8週齢の成長ホルモンの差は心筋の発達と相関すると報告されていることから、これがグラフトの分化に影響したとも考えられる³²。また、いくつかの研究で報告されているように、機械的な引張力も心筋細胞の肥厚性変化の差をもたらす可能性がある^{33, 34}。将来、組織工学的に作製した構造体を成人患者に適用するには、こうしたレシピエント依存性の現象を明らかにする必要がある。

皮下組織中のグラフトの拍動数はレシピエントの心拍数と比較して少なかった。これは、ラット新生仔の心室を心房と分離して心筋細胞を単離したこと、そして神経支配による協調的な刺激がないことに起因すると考えられる。また、背側皮下組織の温度が低いことも理由の一つである可能性がある。事実、培地の温度を高くすると、切除した心筋グラフトの拍動数が上昇した(データは示していない)。

PIPAAm固定表面から容易に回収した心筋細胞シートを、硬質の培養表面や他の心筋細胞シートの上に移すと、拍動は一時的に停止するが、数日以内に自発的に回復する。一方、シート1枚のみをフレーム状のコラーゲン膜の上に移した場合は、37 $^{\circ}$ Cでのインキュベート後ただちに中央部の拍動が始まる。したがって、細胞シート-培養表面間、あるいは細胞シート間の組織再構成は、一時的な拍動停止をもたらす可能性があり、構造体内の電氣的連絡が回復するには数日を要することもある。

フレーム状コラーゲン膜に乗せた積層心筋細胞シートは、オンラインデータのMovie2, 3に示すように拍動した。しかし、数日が経過すると、浮遊した状態のコラーゲンフレームは継続的な細胞シートの収縮のため屈曲し、その結果、構造体全体が収縮、凝集した。その後、シートの拍動が停止した。*In vivo*においては、オンラインデータのMovie4, 5に示すように、グラフトの収縮に反応する弾性の結合組織が良好に構成されていた。したがって、*in vitro*において心筋組織グラフトの継続的な拍動を促進するには、シート構造体を固定する何らかの弾性材料が必要となると考えられる。

結論として、温度応答性細胞培養表面を利用した細胞シートマニピュレーション法(細胞シートエンジニアリング)は、*in vitro*においても *in vivo*においても、電氣的に連絡する拍動性心筋グラフトを作製するのに非常に有用であることが示された。この技術は、*in vitro*の3D心臓組織モデルを構築し、臨床においても組織修復用の成育可能かつ機能的な心筋グラフト材料を改善するうえで大きな可能性を有している。

謝辞

本研究は、日本学術振興会の「未来開拓学術研究推進事業」(JSPSRFTF96100201)及び学研究費補助金・若手研究(13780693)の助成を受けた。また本研究は、財団法人・日本心臓血圧研究振興会の公募研究助成による助成も受けた。Prof. David W. Grainger (Colorado State University, 米国)のコメント及び技術面の批評に感謝します。

参考文献

1. Reinlib L, Field L. Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease? A workshop of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation*. 2000;101:e182-e187.
2. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest*. 1996;98:2512-2523.
3. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103:697-705.
4. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705.
5. Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adorini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10733-10738.
6. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 2001;108:407-414.
7. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279-280.
8. Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg*. 2001;72:577-591.
9. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260:920-926.
10. Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattochow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schafer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J*. 1997;11:683-694.
11. Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng*. 2000;68:106-114.
12. Akins RE, Boyce RA, Madonna ML, Schroedl NA, Gonda SR, McLaughlin TA, Hartzell CR. Cardiac organogenesis in vitro: reestablishment of three-dimensional tissue architecture by dissociated neonatal rat ventricular cells. *Tissue Eng*. 1999;5:103-118.
13. Papadaki M, Bursac N, Langer R, Merok J, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H168-H178.
14. Leor J, Aboulaia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S. Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation*. 2000;102(suppl III): III56-III61.
15. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation*. 1999;100(suppl II):II63-II69.
16. Sakai T, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim ET, Jia ZQ, Yau TM. The fate of a tissue-engineered cardiac graft in the right ventricular outflow tract of the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;121:932-942.
17. Yamada N, Okano T, Sakai H, Karikusa F, Sawasaki Y, Sakurai Y. Thermo-responsive polymeric surfaces: control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem Rapid Commun*. 1990;11:571-576.
18. Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res*. 1993;27:1243-1251.
19. Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Temperature-responsive culture dishes allow nonenzymatic harvest of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets. *J Biomed Mater Res*. 2000;51:216-223.
20. Kushida A, Yamato M, Konno C, Kikuchi A, Sakurai Y, Okano T. Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1999;45:355-362.
21. Kikuchi A, Okuhara M, Karikusa F, Sakurai Y, Okano T. Twodimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1998;9:1331-1348.
22. Hirose M, Kwon OH, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface. *Biomacromolecules*. 2000;1:377-381.
23. Kushida A, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture

- dishes and transfer to other surfaces. *J Biomed Mater Res.* 2001;54:37-46.
24. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Eng.* 2001;7:141-151.
 25. Yamato M, Utsumi M, Kushida A, Konno C, Kikuchi A, Okano T. Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature. *Tissue Eng.* 2001;7:473-480.
 26. Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, Shibata T, Isoi Y, Kikuchi A, Umezumi M, Okano T. Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res.* 2002;60:110-117.
 27. Kinugawa K, Shimizu T, Yao A, Kohmoto O, Serizawa T, Takahashi T. Transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 1997;81:911-921.
 28. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:907-921.
 29. Oyamada M, Kimura H, Oyamada Y, Miyamoto A, Ohshika H, Mori M. The expression, phosphorylation, and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Exp Cell Res.* 1994;212:351-358.
 30. Levy AP, Levy NS, Loscalzo J, Calderone A, Takahashi N, Yeo KT, Koren G, Colucci WS, Goldberg MA. Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *Circ Res.* 1995;76:758-766.
 - 30a. Bursac N, Papadaki M, Cohen RJ, Schoen FJ, Eisenberg SR, Carrier R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. *Am J Physiol.* 1999;277:H433-H444.
 31. Soejima K, Negishi N, Nozaki M, Sasaki K. Effect of cultured endothelial cells on angiogenesis in vivo. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101:1552-1560.
 32. Colao A, Marzullo P, Di Somma C, Lombardi G. Growth hormone and the heart. *Clin Endocrinol.* 2001;54:137-154.
 33. Komuro I, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Katoh Y, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y. Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J Biol Chem.* 1990;265:3595-3598.
 34. Fink C, Ergun S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T. Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *FASEB J.* 2000;14:669-679.

図 1. 剥離前 (Pre) 及び剥離後 (Post) の心筋細胞シート。正方形パターンの PIPAAm 固定培養皿で 4 日間培養したラット新生仔心筋細胞 (上段) と、温度を下げるにより剥離させて回収した心筋細胞シート (下段) を示す。左列が示しているように、正方形の細胞シートの面積は $5.98 \pm 0.12 \text{ cm}^2$ から $1.16 \pm 0.08 \text{ cm}^2$ へと縮小した。中央列と右列は、F-アクチン (赤) 及び細胞核 (緑) の染色像である。細胞は伸展していたが、剥離後に小さくなった。また、断面像でシートの厚さを測定したところ、支持体からの剥離後、経時的に $20 \pm 4 \mu\text{m}$ から $45 \pm 8 \mu\text{m}$ へと増加していた。データは平均 \pm SD; n = 5.

図 2. 積層した心筋細胞シートの電氣的同期。A: 積層した心筋細胞シートの電氣的分析の様子を示す。PIPAAm 固定培養皿から剥離した 2 枚の心筋細胞シート (シート 1, 2) を 60 mm 培養皿に移し、部分的に重ねた。2 本の電極を両細胞シートの単層部分に配置して、電位を増幅・検出した。B: 2 枚のシートで検出された代表的な電位図を示す。各シートの単層部分で検出されたスパイクは、 $74 \pm 16 \text{ bpm}$ で完全に同期していた。データは平均 \pm SD; n = 3.

Electrodes: 電極
Sheet: シート

図 3. In vitro の 2 層心筋細胞シートの断面像。2 枚の心筋細胞シートをフレーム状のコラーゲン膜に乗せた。この 2 層構造体の自由部分の断面像を示す。A: ヘマトキシリン-エオシン染色。2 層シートが互いに密着し、均質な組織になっている。B: 抗コネキシン 43 抗体による免疫蛍光染色。構造体全体にギャップ結合が観察される。

図 4. 移植した心臓組織グラフトの短縮率。心臓組織グラフトの拍動をデジタルビデオカメラで記録し (30 コマ/秒), NIH Image ソフトウェアに取り込んだ静止画像で収縮時 (S) 及び拡張時 (D) の長軸長を測定した。短縮率を $D - S / D \times 100\%$ として計算した。3 週齢ラットに移植した 2 層構造体, 同 4 層構造体, 8 週齢ラットに移植した 2 層構造体, 同 4 層構造体の短縮率は、それぞれ $6.7 \pm 0.6\%$, $8.9 \pm 0.5\%$, $3.6 \pm 1.4\%$, $5.4 \pm 1.4\%$ であった (各群, n = 3)。短縮率は、積層した細胞シートの数に依存して大きくなる傾向を示した。3 週齢ラットに移植した 4 層構造体は、8 週齢ラットに移植したものと比較して、短縮率が有意に大きかった。値は平均 \pm SD。一元配置 ANOVA と Bonferroni 検定を行った。*P < 0.05.

Fractional Shortening (%) :	短縮率 (%)
2 layers :	2層
4 layers :	4層

図 5. 3 週齢ラット (A~E) 及び 8 週齢ラット (F) に移植した 2 層細胞シート構造体の組織学的分析. A : ヘマトキシリン-エオシン染色. 皮下組織内で心筋組織が重層化している. B : アザン染色. 心筋組織が明瞭に確認できる. また, 橙に染色された赤血球を含む微小血管 (矢印) が見える. C : サルコメアアクチニンの免疫蛍光染色. 細長い心筋細胞中でサルコメアがよく分化している. D : 内皮細胞に特異的な第 VIII 因子関連抗原の染色により, 心臓グラフト内の血管新生も確認された (矢印). E : 抗コネクシン 43 抗体による免疫蛍光像. 拍動性の心筋グラフト中にギャップ結合が広範に形成されている. F : 8 週齢ラットに移植した 2 層細胞シート構造体のアザン染色. 3 週齢ラットに移植した構造体 (B) と比較して, 結合組織が多く, 心筋細胞の肥厚が小さい.

図 6. 移植した心筋グラフトの透過電子顕微鏡像. A : 筋フィラメント (Myo) がよく分化している. また, 複数の内皮細胞 (E) と周皮細胞 (P) からなる典型的な毛細血管 (C) が観察される. B : 心筋細胞の間に, 心筋組織の連絡部に特徴的なデスモソーム (Des) が存在している.

図 7. 移植した 2 層心筋組織グラフトにおける, レシピエントの週齢に依存的な組織学的差異. A : アザン染色像において, グラフト中の結合組織の量を調べるため, グラフトの全面積 (100%) に対する青色部分の面積を NIH ソフトウェアにより測定した. 3 週齢ラットに移植した 2 層構造体は, 8 週齢ラットに移植したものと比較して, 結合組織が有意に少なかった ($32 \pm 3\%$ vs. $42 \pm 3\%$; 各群 $n = 3$). B : ヘマトキシリン-エオシン染色の断面像において, 細胞核部分で細胞の幅を測定して, 心筋細胞の肥厚度を測定した. 各サンプルにつき細胞 100 個の幅を測定し, 3 つのサンプルを解析した. 3 週齢ラットに移植したグラフトは, 8 週齢ラットに移植したものと比較して, 細胞の幅の平均値が有意に大きかった ($5.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$ vs. $3.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$). データは平均 \pm SD. 対応のない t 検定を行った. * $P < 0.05$.

Connective tissue ratio (%) :	結合組織の割合 (%)
Cell width (μm) :	細胞の幅 (μm)

図 8. 細胞を単離したグラフト (A~D) と細胞シートグラフト (E~H) の組織学的比較. 心筋細胞シート 4 枚と同数のトリプシン処理した細胞を左背側皮下組織に注入し, 続いて, インタクトな 4 層構造物を同じ動物の右背側皮下組織に移植した. 7 日目に固定し, グラフト (Gr) と背側骨格筋 (S) をヘマトキシリン-エオシン染色した像を A と E に示す. 注入グラフトの表面部 (約 $100 \mu\text{m}$) は細胞密度が高いが, 中央部は細胞の少ない壊死組織となっている (A). 4 層の細胞シートグラフトは均質な積層組織となっており, 壊死を認めない (E). 抗コネクシン 43 抗体による免疫蛍光像では, 処置 1 日後の細胞シート構造体内に, よく形成されたギャップ結合を認める (F). 一方, 細胞注入部位にはギャップ結合をほとんど認めない (B). 処置 2 日後の注入グラフトと細胞シートグラフトの TUNEL 染色像 (D, H) 及び細胞核の対比染色像 (C, G). 注入グラフトには TUNEL 陽性細胞を認めるが, 4 層の細胞シートグラフトにはほとんど認めない.

文献資料 2

TISSUE ENGINEERING Volume 7, Number 2, 2001 141-151

温度応答性培養皿を用いた心筋細胞シートの二次元マニピュレーションによる拍動振幅の増加

TATSUYA SHIMIZU, M. D., MASAYUKI YAMATO, Ph. D., AKIHIKO KIKUCHI, Ph. D., and TERUO OKANO, Ph. D.

Institute of Biomedical Engineering, Tokyo Women's Medical University, Tokyo 162-8666, Japan.

抄録

心筋細胞は、ポリスチレン (TCPS) 製の組織培養皿に接着しても自発拍動性を維持するが、その拍動振幅は *in vivo* の場合と比較して大幅に制限される。その主な理由の 1 つとして考えられるのは、細胞と TCPS 表面との相互作用である。硬質である TCPS 表面から細胞を離すことにより、拍動振幅を増大できる可能性がある。我々はこの観点から、培養心筋細胞を硬質表面から剥離し、細胞の拍動振幅を大きくするための、温度応答性培養皿を用いた新しい細胞マニピュレーション法を開発したので紹介する。また、この心組織モデルの改善の可能性についても考察する。温度応答性ポリマーであるポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) を固定した、やや疎水性の培養皿表面で心筋細胞を初代培養した。心筋細胞は、ポリマーを固定していない TCPS 培養皿の場合と同様に、この培養皿表面に接着して増殖し、コンフルエントな心筋細胞シートを形成した。その後培養温度を下げると、培養皿に固定したポリマーが強力に水和して、ポリマー表面がやや疎水性から強い親水性に変化した。その結果、酵素や EDTA による処理なしに心筋細胞が培養皿から離れた。支持体を用いない場合は、剥がれた心筋細胞シートが 1/10 のサイズに縮小し、拍動が停止した。コンフルエントなシートを支持し細胞の収縮を防ぐためキチン膜を用いると、剥がれた細胞シートを移送して別の未処理 TCPS 培養皿に容易に接着させることができた。移送したこの細胞シートは、剥離前と同様の細胞形態と拍動性を維持していた。細胞シートの支持と移送にポリエチレンメッシュを用いた場合は、剥離した心筋細胞シートの一部がメッシュの糸に付着した。次に、培養皿表面との直接接触を防ぐため、この構造体を上下反転して別の培養皿に移した。さらに、メッシュの目により収縮の方向性が非等方になったため、心筋細胞シートが心組織様の構造に再構成され、拍動振幅が 10 倍以上に増大した。この技術は、組織工学にも培養心臓モデルにも新たな知見をもたらすと思われる。

はじめに

心臓移植はドナー不足という問題があるため、移植に代わる新しい心疾患の治療法が求められている¹⁻⁴。最近では幹細胞技術が進歩し、培養した筋細胞から心臓組織を組織工学的に再建することがいずれ可能になるであろう⁵⁻⁸。初代培養の心筋細胞は自発拍動を示すが、その拍動振幅は *in vivo* の場合と比較して大幅に制限され、臨床用途には不十分である。拍動が制限される主な理由の 1 つとして、ポリスチレン (TCPS) 製の組織培養皿の使用が考えられる。足場依存性である心筋細胞は、典型的な培養条件において、細胞外マトリックス (ECM) タンパク質を介して硬質かつ非可撓性の TCPS 培養皿に強固に接着する。心筋細胞は、培養基質に対しては安定的に接着することなく凝集するが、この硬質表面への固定が細胞運動の障害の理由であるとも考えられる。したがって、培養皿表面から細胞を離すことにより培養心筋細胞の拍動振幅が回復する可能性がある。

温度応答性ポリマーであるポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) を電子線照射により TCPS 培養皿の表面に固定した⁹⁻¹¹。この表面は、37°C の培養条件下ではやや疎水性であるが、32°C 付近の下限臨界溶液温度 (LCST) 以下では親水性に変化する。37°C では、ポリマー固定していない TCPS 表面での培養と同様、さまざまな種類の細胞がこの表面上に接着・伸展し、増殖する。しかし培養温度を LCST 以下まで下げると、PIPAAm 鎖の表面が急速に水和・膨張するため、細胞がポリマー固定表面から自発的に離れて、最終的にコンフルエントな生細胞シートとして浮遊する¹¹⁻¹⁸。低温処理のみで回収した内皮細胞及び肝細胞はトリプシン処理の必要がなく、トリプシン処理で回収した同様の細胞と比較して分化機能が良好に維持される¹²。我々はさらに、ポリマーを種々のパターンで固定した培養皿を用いてデザイン細胞シートを作製するとともに、温度応答性表面から別の支持体へと細胞シートを移送するための二次元細胞シートマニピュレーション法を開発した^{19,20}。この方法は、組織工学に利用できる高度な移植用構造体の作製に有用である可能性がある。さらに、細胞シートの積層による三次元層状構造体の作製も試みられている²¹。

本研究では、初代培養したニワトリ胚心筋細胞のマニピュレーションに上記の方法を応用した。まず、PIPAAm 固定培養皿における細胞の挙動を調べ、心筋細胞シートが剥離する機序を検証した。内皮細胞及び肝細胞を用いた我々の以前の研究では、播種密度の低い細胞が培養皿から離れるには、温度低下による物理化学的な表面変化に加えて、ATP を消費する細胞代謝が必要であった^{13,16}。本研究では、心筋細胞シートの剥離にも同じ機序が関与しているか検証した。また、細胞の拍動が剥離に及ぼす影響も分析した。第二の点として、心筋細胞シートの形態と機能を維持できる移送法を検討した。第三の点として、PIPAAm 固定培養皿とポリエチレンメッシュを用いて、心筋細胞シートを培養基質から離れた状態に保ち、非等方に配向して拍動振幅を増大させることを試みた。

材料及び方法

PIPAAm 固定ポリスチレン培養皿の作製

PIPAAm 固定細胞培養皿の具体的な作成手順は既報のとおりであるが¹¹, 簡潔には次のとおりである. N-イソプロピルアクリルアミド (IPAAm) は興人 (東京) の厚意による提供を受けた. 30 μ L, 60 wt% の IPAAm 溶液をイソプロピルアルコールに溶解して, 35 mm TCPS 培養皿 (Falcon 3001) に広げた. 次に, Area Beam Electron Processing system (NHVコーポレーション, 京都) を用いて 0.25 MGy の電子線を培養皿に照射した. 固定されなかった IPAAm を除去するため低温の蒸留水で PIPAAm 固定培養皿を洗浄し, 窒素ガス中で乾燥させた. PIPAAm 固定培養皿は, 培養に使用する前にエチレンオキシドガスで滅菌した. 減衰全反射フーリエ変換赤外分光法 (ATR-FTIR) で測定した結果, 本研究における PIPAAm の固定量は 2 μ g/cm² であった.

ニワトリ胚心室筋細胞の初代培養

既報の方法²²に従って, 初代のニワトリ心筋細胞を調製した. Hamburger-Hamilton ステージ 36 のニワトリ胚の心室をトリプシン処理して細胞を取得し, 培地中に懸濁した. 培地の組成は, ウシ胎仔血清 (FBS) 6%, Medium 199 40%, ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 0.2%, 2.7 mM グルコース, 平衡塩類溶液 (116 mM NaCl, 1.0 mM NaH₂PO₄, 0.8 mM MgSO₄, 1.18 mM KCl, 0.87 mM CaCl₂, 26.2 mM NaHCO₃) 5% とした. この細胞懸濁液を, 35 mm の PIPAAm 固定培養皿及び未固定培養皿に, 低密度 (細胞数 0.5 \times 10⁶ 個/培養皿) または高密度 (細胞数 3 \times 10⁶ 個/培養皿) に播種し, 37°C, 5% CO₂ の湿潤条件でインキュベートした. 培養 2 日後に細胞のマニピュレーションを行った.

細胞形態の観察

位相差顕微鏡 (ET300, ニコン, 東京) 及び蛍光顕微鏡 (DM IRB, Leica, ドイツ・Heidelberg) で細胞形態を観察した. 蛍光顕微鏡観察用では, 培養細胞を 4% パラホルムアルデヒドの Dulbecco リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液で 20 分間固定した. PBS で洗浄後, 0.5% Triton X-100 の PBS 溶液に 10 分間浸漬した. PBS で 3 回洗浄した後, ローダミンファロイジン (Molecular Probes, オレゴン州 Eugene) の 1:100 希釈液で染色して, F-アクチンを観察した. また, 核を染色するため, DNA 結合染色液 (Hoechst 33258, 5 ng/mL) でも染色した. 蛍光顕微鏡に取り付けた CCD カメラ (RS-170, COHU, カリフォルニア州 San Diego) で染色像を撮影し, Q550CW 画像分析システムと Qfish ソフトウェア (Leica) で分析した. PIPAAm 固定培養皿上の細胞を観察する際は, PIPAAm の水和による試料の剥離を防ぐため, すべての手順を 37°C で行った.

細胞拍動の分析

位相差顕微鏡像を, 顕微鏡に接続した CCD カメラ (G2400, 浜松ホトニクス, 浜松) でデジタルビデオレコーダー (DCRTRV900, SONY, 東京) に記録した. 細胞拍動のデジタル画像を Q550CW と Qwin で分析した. 各サンプルにつき 3 箇所を選択し, 1 秒当たり 30 画像の速度で分析して, 動きをプロットした. 3 回の実験の典型的な結果を示した.

細胞シートの剥離の分析

高密度に播種した心筋細胞を PIPAAm 固定培養皿上で 37°C で 2 日間培養した. この細胞を 20°C でインキュベートすると, 細胞がシートとして剥離し, シートが収縮した. 位相差顕微鏡像を CCD カメラでビデオ記録した. コンフルエントな心筋細胞の一部は, 温度を下げる前に, L-type カルシウムチャネルアンタゴニストであるニフェジピン (10 μ M) または ATP 合成阻害剤であるアジ化ナトリウム (20 mM) のいずれかで 30 分間処理した. ニフェジピンは, 電圧依存性のカルシウム電流をブロックすることにより, 筋細胞の拍動を阻害する. 剥離後に収縮した細胞シートを撮影し, 細胞シートの面積を NIH Image で測定した. 3 回の実験について値を平均 \pm 標準偏差として示した. 統計解析には Student t 検定を用い, $p < 0.05$ を有意とした.

キチン膜による心筋細胞シートの移送

心筋細胞シートの二次元マニピュレーションの手順を図 1 に示す. 支持材料としてキチン膜 (Beschitin-W, ユニチカ, 兵庫) を使用した. キチン膜を, 35 mm の PIPAAm 固定培養皿に入れやすいよう円形 (直径約 32 mm) にカットし, 培地を吸引した後, コンフルエントな細胞の上に乗せた. この培養皿を 20°C で 1 時間インキュベートした. 心筋細胞シートの剥離端がキチン膜に引っかかり, コンフルエントな細胞とその上に乗せたキチン膜が PIPAAm 固定培養皿から離れた. この細胞シートとキチン膜を未処理の TCPS 培養皿に移し, 培地 200 μ L 中で 37°C で 1 時間インキュベートして, 細胞シートを培養皿表面に付着させた. 次に, 培地 2 mL を加え, 37°C でさらに 1 時間インキュベートした. 最後にキチン膜のみを鑷子で静かに除去した. 37°C で 1 日培養後, 細胞の形態と拍動を分析した.

ポリエチレンメッシュによる心筋細胞シートのマニピュレーション

心筋細胞シートを硬質の培養基質から離れた状態に維持する手順を図 2 に示す. ポリエチレンメッシュ (ダイセルクラフト, 東京) を正方形 (2 \times 2 cm) にカットし, キチン膜の代わりに使用した. このメッシュは 125~250 μ m のポリエチレン糸で構成され, 目は 1 辺 1.25 mm の菱形である. 細胞シートの剥離手順は, 前述した細胞シートの移送手順と基本的に同じである. PIPAAm 固定培養皿からの剥離時, 心筋細胞シートは部分的にメッシュに付着していた. 次に, 培養皿表面との直接接触を防ぐため, この構造体を上下反転して別の培養皿に移した. 培地 2 mL を添加し, 37°C でインキュベートした.

結果

PIPAAm 固定培養皿で初代培養した心筋細胞

初代のニトリ胚心筋細胞を、PIPAAm 固定培養皿と非固定培養皿に播種した。心筋細胞は、いずれの培養皿表面でも同様に付着・接着・伸展した。

蛍光顕微鏡観察では、両条件下で同様に、細胞内にアクチンフィラメントが発達しているのが観察された(図 3a, b, d, e)。細胞を低密度に播種した場合は、PIPAAm 固定培養皿と非固定培養皿のいずれでも、一部の細胞が低拍動数 (< 60/分) で不規則に拍動した(データは示していない)。コンフルエントに達するよう心筋細胞を高密度で播種した場合は、細胞が互いに接触し、高拍動数 (> 100/分) で同期して拍動した。コンフルエントな心筋細胞の拍動は、両培養皿で同様であった(図 3c, f)。

心筋細胞及び心筋細胞シートの剥離

心筋細胞を低密度で播種し、37°C で 2 日間培養後、培養皿を 20°C でインキュベートした。対照の PIPAAm 未固定 TCPS 培養皿では、細胞の剥離が生じなかった。一方、PIPAAm 固定培養皿で培養した心筋細胞は、他の細胞種で既に観察されたのと同様^{11-13, 16}、剥離を生じた(データは示していない)。心筋細胞を高密度で播種し、37°C で 2 日間培養した。次に温度を 20°C まで下げると、コンフルエントな細胞が、単一の連続細胞シートとして 30 分以内に剥離した。この剥離した細胞シートは自然に収縮し、培地中に浮遊した(図 4a, b)。細胞シートの剥離後、培養皿上に細胞の残存は認めなかった。このような細胞シートの剥離は、PIPAAm 未固定培養皿では観察されなかった。細胞シートの同期拍動は、剥離中も(既に剥離した部分でも培養皿表面にまだ接着している部分でも)継続された。しかし、PIPAAm 固定培養皿から完全に剥離した後は、心筋細胞シートが収縮して 1/10 の面積になり、拍動が停止した。細胞シート剥離の分子的機序を明らかにするため、温度を下げる前に、L-type カルシウムチャネルアンタゴニストであるニフェジピン(心筋細胞の拍動を選択的に抑制する)または ATP 合成阻害剤であるアジ化ナトリウムで心筋細胞シートを処理した。いずれの化合物も心筋細胞の拍動を停止させたが、細胞シートの剥離を著明に阻害したのはアジ化ナトリウムのみで、ニフェジピンは剥離をわずかに遅らせたにとどまった(表 1)。この知見と一致して、アジ化ナトリウム処理シートでは収縮した細胞シートの平均面積が対照より有意に大きかったが、ニフェジピン処理シートと対照との間には有意差がなかった(図 4c)。

キチン膜による拍動心筋細胞シートの二次元マニピュレーション

細胞シートの剥離後の収縮を防ぐため、支持材料としてキチン膜を使用した(図 1)。キチン膜の支持により、剥離した心筋細胞を未処理の TCPS 培養皿へと安定的に移すことができた。移された心筋細胞シートは、37°C・2 時間のインキュベーション中に未処理の TCPS 表面に容易に接着し、キチン膜のみを細胞シートから剥がすことができた。F-アクチンの構成及び細胞の拍動を、(1)剥離を行っていない心筋細胞シート(対照)、(2)細胞シート支持体を用いずに移送した、収縮した心筋細胞シート、(3)支持体を用いて移送したインタクトな心筋細胞シートの 3 群で比較した(図 5)。収縮したシートでは、アクチン線維が崩壊し、細胞内で凝集体を形成していた(図 5d)。核間距離の短縮と核の重なりも、細胞シートの収縮と細胞の重なりを反映している(図 5e)。収縮した細胞シートでは心筋細胞の拍動が観察されなかった(図 5f)。一方、インタクトに移送された心筋細胞では、F-アクチンの形態と分布(図 5g)、核密度(図 5h)が対照(図 5a, b)と同様に保たれていた。またこのシートでは、同時拍動も剥離前の観察時と同様に保たれていた。拍動振幅も対照と同程度であった(図 5c, i)。

ポリエチレンメッシュに付着させた心筋細胞シートの再構成

キチン膜の代わりにポリエチレンメッシュを使用した場合は(図 2)、剥離した心筋細胞シートの一部がメッシュに付着した(図 6a)。この構造体を、培養皿表面との直接接触を防ぐため、上下反転して別の培養皿に移した。培養中、心筋細胞シートの端の一部がメッシュ糸の周囲に巻きついた。この部分的な保持により、シートは完全には収縮せずに一方向に収縮し、その結果、収縮方向に対して直角方向に伸長した形態となった(図 6a)。そのため、心筋細胞は向きが揃った状態となり、この方向に沿った大きな振幅で同期拍動を示した(図 6b)。また、この拍動振幅は、硬質の TCPS 培養皿表面に付着した、構成されていない心筋細胞と比較して、10 倍以上大きかった(図 6c, d)。

考察

高振幅の拍動の再現

従来の培養条件下では、心筋細胞は TCPS 培養皿に固定され、その運動性は TCPS が硬質であることによって大幅に制限される。温度応答性培養皿を使用して心筋細胞シートを硬質表面から離し、細胞シートの配向を適切に再構成することによって、細胞シートの拍動振幅が回復した。ポリエチレンメッシュを用いることにより細胞シートが一方向性に収縮し、これにより、ばらばらに配向していた心筋細胞が、収縮方向に対して直角の方向に再配向された。このような再配向は TCPS 培養皿では得られていない。硬質の培養皿表面から細胞シートを離すというこの培養系は、培養細胞の挙動について新たな知見をもたらすであろう。また、*in vivo* 組織様の構造の作製に寄与する可能性がある。

剥離の機序

PIPAAm 固定培養皿から温度応答性の細胞剥離が生じるには、「受動的」機序と「能動的」機序の両者が必要であることは既に報告した^{13,16}。前者は生理化学的な機序であり、温度を下げることで表面が比較的疎水性の状態から強い親水性の状態に変化することと関連している。表面のぬれ性は、タンパク質吸収と細胞接着の両方に影響する、重要なパラメータの1つである。やや疎水性の表面は、フィブロネクチンなどの細胞接着分子に対して吸着性を示し、したがって細胞接着性を有する。一方、強い親水性の表面は吸着を阻害する。細胞剥離の能動的機序はATP依存性の細胞代謝と関連している。細胞内信号伝達により媒介されるエネルギー依存性の能動プロセスには、チロシンのリン酸化や細胞骨格の再構成などがあり、伸展した状態の細胞形態を、表面特性の変化に伴って球状へと変化させる¹⁶。ATP合成阻害剤であるアジ化ナトリウムは、心筋細胞シートの剥離を著明に遅らせ、シートの収縮も阻害した。このことから、ATP依存性の代謝プロセスは、PIPAAm固定表面からの細胞シートの剥離に寄与する主要な機序の1つであることが示唆される。

細胞骨格が生み出す収縮力は多くの細胞種で観察されている。また、心筋細胞では拍動も検出される。しかし、拍動は心筋細胞シートの剥離には重要でないと思われる。ニフェジピンで細胞拍動を阻害した場合も、細胞シート剥離の遅延は最大15分にとどまった。したがって、細胞拍動が心筋細胞シートの剥離を促すとしても、その程度はごくわずかである可能性がある。剥離・収縮後の最終的な細胞シート面積の比較からも、心筋細胞の拍動が細胞シートの収縮に重要でないことが示唆される。

組織の工学的構築

心組織の細胞はギャップ結合によって緊密に相互連絡し、イオンをはじめとする種々の低分子を交換している²³。したがって、ギャップ結合は、組織や心臓全体の電気的な同期拍動にきわめて重要な役割を果たしている。機能的な三次元心組織を工学的に構築するには、構造体内にこのギャップ結合を形成することが不可欠となろう。培養皿で培養したコンフルエントな心筋細胞の細胞間にもギャップ結合タンパク質が発現していることが既に報告されている²⁴。温度応答性培養皿による細胞シートのマニピュレーションは、細胞間結合を損傷する酵素処理やEDTA処理を必要としないことから、マニピュレーション中もギャップ結合が維持されることが考えられ、細胞シートを電気的に連結したユニットとして扱える可能性がある。本研究では、形態と拍動を維持したまま心筋細胞シートを移送することができた。複数の心筋細胞シートを直接積み重ね、隣接する2つの層の間にギャップ結合を形成することができれば、機能的な三次元心組織を構築できる可能性があり、現在、この方向で研究を続けている。

結論として、我々は、温度応答性培養皿表面と支持材料を用いることで、機能的な心筋細胞シートの二次元マニピュレーション法を確立するとともに、剥離した細胞シートを配向しえた。その結果、心筋細胞シートの拍動振幅を増大させることができた。この技術は心臓の組織工学に有用であると思われる。

謝辞

本研究は、日本学術振興会「未来開拓学術研究推進事業」の助成を受けて行われた（JSPS-RFTF96100201）。

参考文献

1. Hunt, S.A., and Frazier, O.H. Mechanical circulatory support and cardiac transplantation. *Circulation*. 97, 2079, 1998.
2. Waterworth, P.D., Cozzi, E., Tolan, M.J., Langford, G., Bradley, P., Chavez, G., Dunning, J., Wallwork, J., and White, D. Pig-to-primate cardiac xenotransplantation and cyclophosphamide therapy. *Transplant. Proc.* 29, 899, 1997.
3. Milano, C.A., Allen, L.F., Dolber, P.C., Johnson, T.D., Rockman, H.A., Bond, R.A., and Lefkowitz, R.J. Marked enhancement in myocardial function resulting from overexpression of a human beta-adrenergic receptor gene. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* 109, 236, 1995.
4. Watanabe, E., Smith, D.M., Jr., Delcarpio, J.B., Sun, J., Smart, F.W., Van Meter, C.H., Jr., and Claycomb, W.C. Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant.* 7, 239, 1998.
5. Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87, 27, 1985.
6. Shambloott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13726, 1998.
7. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145, 1998.
8. Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konoshi, F., Kodama, H., Pang, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umazawa, A., and Ogawa, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 103, 697, 1999.
9. Bay, Y.H., Okano, T., and Kim, S.W. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(N,N9-alkyl substituted acrylamide) in water. *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* 28, 923, 1990.

10. Heskins, M., Guillent, J.E., and James, E. Solution properties of poly(N-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Chem.* A2, 1441, 1968.
11. Yamada, N., Okano, T., Sakai, H., Karikusa, F., Sawasaki, Y., and Sakurai, Y. Thermo-responsive polymeric surfaces: control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 11, 571, 1990.
12. Okano, T., Yamada, N., Sakai, H., and Sakurai, Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J. Biomed. Mater. Res.* 27, 1243, 1993.
13. Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, H., and Sakurai, Y. Mechanism of cell detachment from temperaturemodulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials.* 16, 297, 1995.
14. von Recum, H.A., Kim, S.W., Kikuchi, A., Okuhara, M., Sakurai, Y., and Okano, T. Retinal pigmented epithelium culture on thermally responsive polymer porous substrates. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9, 1241, 1998.
15. von Recum, H.A., Kim, S.W., Kikuchi, A., Okuhara, M., Sakurai, Y., and Okano, T. Novel thermally reversible hydrogel as detachable cell culture substrate. *J. Biomed. Mater. Res.* 40, 631, 1998.
16. Yamato, M., Okuhara, M., Karikusa, F., Kikuchi, A., Sakurai, Y., and Okano, T. Signal transduction and cytoskeletal reorganization are required for cell detachment from cell culture surfaces grafted with a temperature-responsvie polymer. *J. Biomed. Mater. Res.* 44, 44, 1999.
17. Kushida, A., Yamato, M., Konno, C., Kikuchi, A., Sakurai, Y., and Okano, T. Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 45, 355, 1999.
18. Kwon, O.H., Kikuchi, A., Yamato, M., Sakurai, Y., and Okano, T. Rapid cell sheet detachment from poly(N-isopropylacrylamide)- grafted porous cell culture membranes. *J. Biomed. Mater. Res.* 50, 82, 2000.
19. Kikuchi, A., Okuhara, M., Karikusa, F., Sakurai, Y., and Okano, T. Two-dimensional manipulation of confluent cultured vascular endothelial cells using temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9, 1331, 1998.
20. Hirose, M., Kwon, O.H., Yamato, M., Kikuchi, A., and Okano, T. Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface. *Bronacromolecules* 1, 399, 2000.
21. Yamato, M., Okuhara, M., Karikusa, F., Sakurai, Y., and Okano, T. Reconstruction of liver lobule like structure with cell sheets of hepatocytes and endothelial cells recovered from culture dishes grafted with temperature responsive polymer. *Trans. Soc. Biomater.* XXI, 82, 1998.
22. Shimizu, T., Kinugawa, K., Yao, A., Sugishita, Y., Sugishita, K., Harada, K., Matsui, H., Kohmoto, O., Serizawa, T., and Takahashi, T. Platelet-derived growth factor induces cellular growth in cultured chick ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* 41, 641, 1999.
23. Luque, E.A., Veenstra, R.D., Beyer, E.C., and Lemanski, L.F. Localization and distribution of gap junctions in normal and cardiomyopathic hamster heart. *J. Morphol.* 222, 203, 1994.
24. Oyamada, M., Kimura, H., Oyamada, Y., Miyamoto, A., Ohshika, H., and Mori, M. The expression, phosphorylation, and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Exp. Cell. Res.* 212, 351, 1994.

表 1. 心筋細胞シートが完全に剥離するまでの所要インキュベーション時間

	対照	アジ化ナトリウム	ニフェジピン
実験 1	15 分	4 時間	30 分
実験 2	30 分	1.5 時間	30 分
実験 3	30 分	1 時間	30 分
実験 4	15 分	6 時間	30 分

PIPAAm 固定培養皿で培養したコンフルエントな心筋細胞を、温度を下げる前に、L-type カルシウムチャンネルアンタゴニストであるニフェジピン (10 μM) または ATP 合成阻害剤であるアジ化ナトリウム (NaN₃, 20 mM) を添加して 30 分間インキュベートした。細胞シートが完全に剥離しているかを 15 分毎に確認した。4 つの実験のデータを示した。

図 1. 拍動する心筋細胞シートを移送するための二次元マニピュレーションの概念図。まず、PIPAAm 固定培養皿で心筋細胞をコンフルエントに達するまで培養し、その上に、円形にカットしたキチン膜を乗せる。20°C で 1 時間インキュベートした後、キチン膜と細胞シートを一緒に剥がし、未処理の TCPS 培養皿に移す。37°C で 2 時間インキュベートした後、キチン膜のみを静かに除去する。

Myocytes: 心筋細胞

PIPAAm-grafted dish: PIPAAm 固定培養皿

Chitin membrane: キチン膜
Detached cell sheet: 剥離した細胞シート
Normal dish: 通常の培養皿
Recovered cell sheet: 回収された細胞シート

図 2. ポリエチレンメッシュを用いた心筋細胞シートのマニピュレーションの概念図. まず, PIPAAm 固定培養皿で心筋細胞をコンフルエントに達するまで培養し, その上に, 正方形にカットしたポリエチレンメッシュを乗せる. 20°Cで1時間インキュベートした後, メッシュと細胞シートを一緒に剥がし, 培養皿表面との接触を防ぐため上下反転して別の培養皿に移す.

Myocytes: 心筋細胞
PIPAAm-grafted dish: PIPAAm 固定培養皿
Mesh: メッシュ
Invert: 上下反転
Recovered cell sheet free from surfaces: 表面に付着していない, 回収された細胞シート

図 3. PIPAAm 固定培養皿及び未固定培養皿上の心筋細胞の形態と拍動機能. ローダミンファロイジンで F-アクチンを染色して蛍光顕微鏡観察を行った (a~e). 低密度 (a, d) 及び高密度 (b, e) で播種した心筋細胞の像を示す. それぞれ, 上段は PIPAAm 未固定 TCPS 培養皿で培養した細胞 (a, b), 下段は PIPAAm 固定培養皿で培養した細胞 (d, e) である. また, PIPAAm 未固定 TCPS 培養皿 (c) 及び PIPAAm 固定培養皿 (f) について, 33 msec 毎に取得したデジタルビデオ画像で細胞の拍動を分析した. 3 回の実験の代表的なデータを示す. PIPAAm 固定培養皿と未固定培養皿とで, 心筋細胞の形態及び機能に差はみられない. 原画像の倍率: x400.
Motion: 運動

図 4. 心筋細胞シートの剥離. (a) PIPAAm 固定表面から細胞シートが剥離する様子を図示した. (b) 温度を下げると, コンフルエントになった細胞が剥離し, 収縮する. 収縮した心筋細胞シートを示す. (c) 収縮した心筋細胞シートの面積を NIH Image で測定した. アジ化ナトリウム (NaN_3 , 20 mM) で処理したシートは, 未処理のシート (C, 対照) と比較して面積が有意に大きい. しかし, ニフェジピン (Nif, 10 μM) で処理したシートと未処理のシートの間には有意差はなかった. 棒グラフは独立した 3 回の実験の平均値, エラーバーは標準偏差を示す. *未処理のシートに対して $p < 0.05$.
Sheet area (%): シートの面積 (%)

図 5. 剥離・移送した心筋細胞シートの形態と拍動機能. 付着したままの対照シート (上段), 剥離後に収縮したシート (中段), キチン膜を用いてインタクトに移送したシート (下段) について, 形態と拍動振幅を比較した. ローダミンファロイジンで F-アクチンを染色した (a, d, g). また, Hoechst 33258 で細胞核を染色した (b, e, h). 収縮したシートではアクチン線維が凝集し (d), 核の分布も密になっていた (e). インタクトに移送したシートでは, F-アクチンの形態 (g), 核の分布 (h) とともに対照シート (a, b) と同様であった. 収縮したシートは拍動を示さなかったが (f), インタクトに移送したシート (i) と対照シート (c) では同時拍動が観察された. 3 回の実験の代表的なデータを示す. 原画像の倍率: x400.
F-actin: F-アクチン
Nuclei: 細胞核
Motion: 運動

図 6. 一方向性の細胞配向と拍動振幅の増大. 培養中, 心筋細胞シートの端の一部がメッシュ糸の周囲に巻きついた. この部分的な保持により, シートは完全には収縮せず一方向に収縮し, その結果, 収縮方向に対して直角方向に伸長した形態となった (a). 四角形部分をさらに拡大すると, 各心筋細胞の向きが, 収縮方向に対して直角な一方向になっていることがわかる (b). 心筋細胞は向きが揃った状態となり, この方向に沿って同期拍動を示した (d). また, その振幅は TCPS に付着した細胞シート (c) より大きかった.
Motion: 運動

文献資料 3

Biochemical and Biophysical Research Communications 341 (2006) 573-582

組織工学的に作製した心筋細胞シートグラフトが有する内在性の血管形成能

Sachiko Sekiya, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano *

Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan

抄録

心筋細胞シートが *in vivo* において長期的に生存し、組織全体に微小血管網が形成されることは既に報告した。この血管形成プロセスを理解し制御することは、さらに厚い機能的組織を作製するため重要な要素となる。本稿では、心筋細胞シートが培養中で血管形成関連遺伝子を発現し、内皮細胞ネットワークを形成することを報告する。温度応答性培養皿を用いて細胞シートを非侵襲的に回収・積層した後も、この内皮細胞ネットワークは維持され、*in vivo* 移植後に血管新生を生じた。興味深いことに、グラフト血管はすべてグラフト自体に由来するものであり、これらの血管が伸びてレシipientの血管系と接続していることがわかった。また、グラフト内の血管形成は内皮細胞の比率を変えることにより制御できることもわかった。結論として、細胞シート技術により作製した心筋組織グラフトは、*in vivo* で血管形成を生じる内在性の能力を有しており、この血管形成は *in vitro* で制御可能である。

キーワード：血管形成，血管新生，心筋組織グラフト，組織工学，細胞シート

毛細血管は身体のほぼ全組織を精密に網羅し、栄養の供給と種々の代謝廃物の除去を担って臓器の正常な機能を支持している。特に心臓は代謝活性が高いため影響供給の必要性が高く、したがって豊富な血管網を有している。こうした組織における毛細血管形成は、2つの基本的な血管構築プロセスによって生じる。1つは、発達中の胚で生じる *vasculogenesis* であり、もう1つは、既存の血管からの発芽 (*sprouting*) や嵌入 (*intussusception*) によって新たな毛細血管が作られる *angiogenesis* である [1]。

Vasculogenesis は、始原脈管叢が、血管内皮細胞の胚性前駆細胞である血管芽細胞から原始血管を形成し始める過程である [2]。胚発達中の *vasculogenesis* が完了すると、その後、新しい血管は *angiogenesis* により形成される。微小血管形成の開始時には、相互作用する細胞もその周囲の細胞外マトリックス (ECM) も局所的に減少し、その後、周皮細胞の偏在が生じ、内皮細胞が増殖をはじめ、発芽や嵌入によって伸長する。嵌入や発芽によって内皮細胞ネットワークが形成されると、成熟とリモデリングの過程を経て機能的な血管が構築される。

胚の血管形成と異なり、成体の血管形成が生じるのは、一般的に、創傷治癒と、雌性個体の月経周期中及び妊娠中の生殖器に限られる。しかし、眼の血管新生、炎症性疾患、腫瘍形成など、一部の病理的状態でも不適切な血管形成が生じることがある [3]。一方、深刻な血管退行が原因で、心筋梗塞や褥瘡など、機能的臓器の障害が生じることがある。したがって、血管形成の適切な制御法を開発することには臨床的に非常に高い関心が寄せられている [4, 5]。

近年では、重篤な臓器不全をきたした患者を治療できる可能性があるとして、再生医学に注目が集まっている [6-8]。理想的には、バイオテクノロジーと細胞生物学の融合により、本来の構造に近い機能的組織を作製し、損傷した臓器を置換する [9-11]。しかし現在のところ、作製した構造体の中に機能的な血管網を作ることができないため、厚さのある成育可能な組織を *in vitro* でも *in vivo* でも維持することができず、これが大きなハードルとなっている [12]。したがって、作製した組織の中に機能的な微小血管を作り、栄養の適切な供給と老廃物の除去を可能にして、組織の厚さを増したときに観察される中心部の虚血を防ぐことの必要性が高まりつつある。しかし、通常の血管発達に関与するステップはよく解明されているものの、工学的に作製した組織中での機序はまだ不明な点も多く、その制御や操作は成功していない。工学的に作製した組織中における血管形成の機序を明らかにすることで、その発達制御と操作を行ってより厚い組織を作製するアプローチが可能となり、組織再生療法の長年のハードルを克服できる可能性がある。

温度応答性培養皿を用いた細胞シート工学による新しい組織再生方法は既に報告した [13]。この技術を用いると、さまざまな種類の培養細胞を [14-18]、タンパク質分解酵素を用いることなく温度を下げるだけで、インタクトなシートとして非侵襲的に回収することができる [19]。したがって、培養中に形成された重要な細胞間相互作用が、細胞回収中も維持される [20]。心筋細胞シートを非侵襲的に回収して *in vitro* で重層化したところ、この三次元構造体は同期拍動を示した [21]。この組織を皮下に移植する *in vivo* 実験では、構造体全体に微小血管網が形成され、拍動性組織が長期にわたって生存した [21]。

本研究では、細胞シート工学を用いて作製したこの心筋グラフト中の血管再建機序を解明することにより、血管を有する組織を作製するための最初のステップを示す。そして、グラフトの血管新生に関与するプロセスが明らかになれば、細胞シート中の内皮細胞を制御することで *in vivo* の血管新生を制御できることを示す。

方法

動物に関するすべての手技は、米国立衛生研究所の「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」(NIH Publication No. 85-23, 1996年改訂)及び東京女子医科大学の実験動物使用指針に準拠した。

温度応答性培養皿 正方形パターンの温度応答性培養皿(セルシード[東京]より提供)の具体的な作製方法は既報のとおりである[22]。簡潔には、N-イソプロピルアクリルアミド(IPAAm)モノマー溶液を市販のポリスチレン製組織培養皿に塗布した。この培養皿に電子線を照射して、IPAAmを重合させ、培養皿表面に共有結合させた。このポリIPAAm(PIPAAm)固定培養皿を低温の蒸留水で洗浄して、固定しなかったIPAAmを除去した。次に、正方形パターンのPIPAAm固定細胞培養皿を得るため、PIPAAm固定表面を正方形のカバーガラス(24 x 24 mm, 松浪硝子, 大阪)でマスキングし、アクリルアミド(AAm)モノマー(和光純薬工業, 東京)溶液を、マスキングした培養皿表面に塗布した。この培養皿表面に電子線を照射し、同様に洗浄した。このようにして、中央の正方形部分に温度応答性のPIPAAmが固定され、その周囲に細胞非接着性のポリAAmが固定された培養皿を得た。最期にこの培養皿をエチレンオキシドガスで滅菌した。

ラット新生仔心筋細胞の初代培養 1日齢のWistarラット(日本生物材料センター, 東京)の心室を、コラゲナーゼ(クラスII, Worthington Biochemical, ニュージャージー州Lakewood)を添加した37°CのHanks溶液(Sigma, ミズーリ州 St. Louis)で消化した。単離した細胞を培地に懸濁した。培地の組成は、6% FBS (Moregate Biotech, オーストラリア・クイーンズランド州 Bulimba), 35% Medium 199 (Invitrogen, カリフォルニア州 Carlsbad), 71.4 U/ml ペニシリン溶液, 71.4 µg/ml ストレプトマイシン溶液(Sigma, St. Louis, MO), 2.9 mM グルコース, 54%平衡塩類溶液(116 mM NaCl, 1.0 mM NaH₂PO₄, 0.8 mM MgSO₄, 1.2 mM KCl, 0.8 mM CaCl₂, 26.2 mM NaHCO₃含有)とした。この細胞懸濁液を、正方形パターンのPIPAAm固定培養皿に細胞密度4.8 x 10⁶個/培養皿で播種し、37°C・5% CO₂の湿潤条件でインキュベートした。強化緑色蛍光タンパク質(EGFP)陽性の心筋細胞を得るため、岡部勝教授(大阪大学・遺伝情報実験センター)のご厚意により提供されたEGFP陽性Sprague-Dawley(SD)ラット新生仔[SD TgN(act-EGFP)0sbCZ-004]から心室を摘出した。2-メトキシエストラジオール(2-ME)処理細胞または血管内皮成長因子(VEGF)処理細胞を得るため、1日後に、2 µM 2-ME(Sigma, ミズーリ州 St. Louis)または10 nM VEGF(R&D Systems, ミネソタ州 Minneapolis)を添加した新鮮な培地に交換した。

免疫細胞化学法 内皮細胞を染色するため、心筋細胞シートをDulbeccoリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、室温下にて4%パラホルムアルデヒド加PBSで5分間固定した。細胞を再度洗浄し、0.1%正常ヤギ血清でブロッキングし、抗CD31モノクローナル抗体(Serotec, 英国 Oxford)の1/200希釈液を添加して室温で1時間インキュベートした。二次抗体として、抗マウスIgG抗体共役Alexa Fluor 488(Invitrogen, カリフォルニア州 Carlsbad)の1/200希釈液を添加し、室温で1時間放置した。最後に、Hoechst 33342(和光純薬工業, 東京)による対比染色を5分間行って細胞核を染色した。染色像は、蛍光顕微鏡(ECLIPSE TE2000-U, Nikon, 東京)を用い、AxioCamカラーデジタルカメラ(Carl Zeiss, ドイツ Hallbergmoss)で撮影して、Axio-Vision 4.1ソフトウェアで画像処理した。内皮細胞ネットワークの形成を定量化するため、培養細胞シートの40x及び100x拡大像を1300 x 1030ピクセルの画像として取得した。各シートのCD31陽性細胞の面積をNIH Imageソフトウェアにより計算した。データは、各サンプルの画像20枚または5枚の平均値として表した。

遺伝子発現解析 血管形成関連遺伝子であるVEGF, シクロオキシゲナーゼ(Cox)-2, Ig及びEGFの相同ドメインを有するチロシンキナーゼ(Tie)-2, アンジオポエチン(Ang)-1, Ang-2について、心筋細胞シート中のmRNA発現をRT-PCRにより解析した。簡潔には、3日間または7日間培養した心筋細胞シートの全RNAを、RNeasyミニキット(Qiagen, カリフォルニア州 Chatsworth)を用いて分離・精製した。Superscript II RT-PCRシステム(Invitrogen, カリフォルニア州 Carlsbad)で逆転写を行い、続いて、ラット用MPCRキット(Maxim Biotech, カリフォルニア州 San Francisco)でPCRを行った。PCR産物を4%アクリルアミドゲルで電気泳動し、臭化エチジウムで染色した。

細胞シートのマニピュレーションによる積層構造体の作製 正方形パターンの温度応答性培養皿を使用し、ラット新生仔心筋細胞を37°Cで4日間培養した。コンフルエントに達した細胞を、酵素処理を行うことなく連続した細胞シートとして剥離させるため、20°Cに設定した別のCO₂インキュベータに培養皿を移した。心筋細胞シートは1時間以内に自発的に剥離し、細胞骨格の再構成とシート横方向の牽引力のためわずかに収縮して約1 cm²になった。細胞シート全体と培地をピペット先端に静かに吸引して、再度新しい温度応答性培養皿に移し、折り重なった部分を伸展させるため新鮮な培地をシートに滴下した。シートが伸展した後、培地を吸引し、37°Cでインキュベートして細胞シートを培養表面に完全に接着させた。細胞シートを積層するため、PIPAAm固定培養皿から剥離した別の心筋細胞シートを、1枚目の細胞シートの上に、同様の方法で移して重ねた。同じ手順を繰り返してin vitroで3層構造体を作製した。

背側皮下組織への心筋グラフトの移植 EGFP陽性または陰性の雄SDトランスジェニックラット(4~5週齢)またはヌードラット(4週齢)を、ペントバルビタールナトリウム(39 mg/kg)の腹腔内注射により麻酔した。背側の皮膚をL字形に切開し(約3 cm x 2 cm)、切開部の皮膚を持ち上げて下の組織を露出させた。PIPAAm固定表面上に積層した3層の心筋細胞シートを、培養温度を下げて剥離させ、培地で洗浄した。この細胞構造体を、滅菌したポリプロピレン支持シートに乗せ、ポリプロピレンシートから滑らせて背側皮下組織に移植した。皮膚との癒着を防ぐため、グラフトを0.5 mm厚のシリコーン膜(ユニークメディカル, 東京)でカバーし、5-0ナイロン糸で閉鎖した。

組織学的分析 移植後適切な時期に心筋組織グラフトを摘出し、10%中性緩衝ホルマリン(Wako)で固定した。続いてパラフィン包埋し、5 µm厚の切片に切り出した。通常の方法でヘマトキシリン-エオシン染色を行

った。GFP 発現細胞を検出するため、抗 GFP 抗体 (Invitrogen) の 1/200 希釈液で断面を免疫標識し (4°C・16 時間)、続いて、FITC 共役抗ウサギ IgG 抗体 (Wako) (緑色蛍光) または Alexa Fluor 568 共役抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) (赤色蛍光) の 1/400 希釈液による二次染色を 2 時間行った。心筋細胞を検出するため、抗 α -サルコメアアクチニン (Sigma) の 1/200 希釈液で断面を免疫標識し (4°C・16 時間)、続いて、Alexa Fluor 488 共役抗マウス IgG 抗体 (緑色蛍光) または Alexa Fluor 568 共役抗マウス IgG 抗体 (赤色蛍光) による二次染色を 2 時間行った。ヘマトキシリン-エオシン染色した切片で単位面積あたり血管数をカウントして血管を定量化した。

初代培養心筋細胞からの内皮細胞の分離 心筋細胞シート中の内皮細胞の比率を制御するため、初代培養した心筋細胞の懸濁液から磁気細胞分離法 (MACS) により内皮細胞を分離した。簡潔には、初代培養した心筋細胞の懸濁液をマウスモノクローナル抗ラット CD31 抗体とともにインキュベートした。灌流緩衝液 (5% BSA 及び 2 mM EDTA 含有 PBS) で後、細胞を抗マウス IgG 共役マイクロビーズ (Miltenyi Biotec GmbH, ドイツ Bergisch Gladbach) とともにインキュベートし、再度、灌流緩衝液で洗浄した。標識した細胞を、MiniMACS システム (Miltenyi Biotec GmbH, ドイツ Bergisch Gladbach) の磁場内の LS カラムに入れた。灌流緩衝液でカラムを洗浄して磁場から取り出し、カラム内に捕捉された細胞を灌流緩衝液で洗い流した。内皮細胞を除去したこの心筋細胞懸濁液を用いて、内皮細胞を含まない細胞シートを作製した。また、GFP 陽性内皮細胞を含む心筋細胞シートを作製するため、GFP 陰性の心筋細胞 (内皮細胞を含まない) と、精製した GFP 陽性内皮細胞を、9:1 の割合で混合した。

データ解析 データはすべて平均 \pm SD で表した。2 群間の比較には対応のない Student t 検定を、多群間の比較には一元配置 ANOVA を用いた。F 分布が有意であった場合は Tukey 検定で群間の差異を特定した。p < 0.05 を有意とした。

結果

心筋細胞シートの血管形成能

心筋細胞シートが血管形成能を内在的に有しているか否かを検証するため、培養細胞シート中の内皮細胞の有無、及び血管形成関連遺伝子の発現を調べた。内皮細胞マーカーである CD31 を検出した結果、この拍動性心筋細胞シートはかなりの量の内皮細胞を含んでおり、培養 4 日後には内皮細胞がネットワーク状に配置していた (図 1A)。遺伝子発現解析でも、血管形成促進遺伝子としてよく知られている VEGF とシクロオキシゲナーゼ-2 (Cox-2) がいずれも、*in vitro* の培養細胞シート中に継続的に発現していた (図 1B)。また、内皮細胞特異的な受容体である Tie-2 の mRNA も顕著な発現が確認された (図 1B)。これに対応して、Tie-2 のリガンドであり血管形成の成熟過程に関与する Ang-1 も時折発現し、一方、Ang-1 の Tie-2 結合に拮抗する Ang-2 は検出されなかった (図 1C)。これらの結果を総合すると次のことがいえる。すなわち、拍動性心筋細胞シートは、ネットワーク状に配置する内皮細胞と、血管形成の促進に関連する主要遺伝子の発現を有しており、それ自体が血管新生能を有していた。

心筋細胞シート内の内皮細胞ネットワークの形成

心筋細胞シート中に形成された内皮細胞ネットワークをさらに詳しく調べるため、培養期間を通じて CD31 陽性細胞の有無を観察した。播種から 1 日後、細胞シート中の心筋細胞は非同期の拍動を開始したが、内皮細胞は少数がまばらに分布しているのみであった (図 2A)。2 日後、拍動が同期しはじめ、内皮細胞もシート内で増殖・発芽が始まった (図 2B)。播種から 3 日後には発芽した内皮細胞が互いに接続しはじめ (図 2C)、4 日後には心筋細胞シート全体にわたって内皮細胞ネットワークが形成された (図 2D)。細胞シート中の CD31 陽性部分の面積を定量した結果もこれを裏付けるものであった。すなわち、内皮細胞に相関する面積は経時的に増加し、播種 4 日後には細胞シートの全面積の $11.7 \pm 5.9\%$ に達した (図 2E)。さらに、心筋細胞シート中のこの内皮細胞ネットワークは、Matri ゲルで培養した内皮細胞でよく知られている発芽形態と外観が類似していた。また、心筋細胞シートの一部には、内皮細胞による細管形成も観察されたが、これらの管状構造が *in vitro* で連続性を示すことはなかった (データは示していない)。

心筋細胞シート中の内皮細胞の反応性を調べるため、培養細胞を 2-ME または VEGF で処理してこれらの物質が内皮細胞ネットワークの形成に及ぼす影響を検討した。未処理の対照群では CD31 陽性部分の面積比が平均 $8.0 \pm 0.2\%$ であったのに対して (図 3A)、2-ME 処理群では内皮細胞ネットワークの形成が有意に抑制され、全面積に対する比はわずか $0.3 \pm 0.2\%$ となった (図 3B)。一方、VEGF を培地に添加した場合は内皮細胞ネットワークの形成が促進された ($13.6 \pm 5.2\%$) (図 3C)。以上の結果から、心筋細胞シートの中には、本来の血管と同様の性質をもつ内皮細胞ネットワークが能動的に形成されていることが示された。

In vivo 移植により生じる心筋組織グラフトの血管新生

In vivo で心筋組織グラフト中に新たに形成される血管の由来を確認するため、EGFP 発現ラット新生仔に由来する心筋細胞シートを 3 枚積層し、これを正常ラットの背側皮下組織に移植した。処置 1 週間後に移植部位を開創したところ、グラフトは自発的に同期拍動しかつ元の形状を維持しており、組織全体が生存していることが示唆された。組織を摘出して組織学的に分析したところ、先に報告した結果と同様 [21]、よく確立された血管構造がグラフト中に観察された (図 4A, B)。しかし、予想と異なっていたのは、抗 GFP 抗体による染色の結果、グラフト中のほぼすべての血管で EGFP の発現を認めたことである (図 4C, D)。したがってこれらの血管はグラフト由来であることが示された。さらに、グラフトに由来する EGFP 発現血管の一部は、移植部位

直下のレシピエント組織中でも検出された (図 4C, D)。

レシピエント由来の血管が心筋グラフト中に進入するかどうかを調べるため、EGFP 陰性の心筋組織グラフトを EGFP 発現ラットに移植した。移植 1 週間後にグラフトを染色したところ、抗 α -サルコメアアクチニン抗体による心筋の染色は陽性であったが (図 5C)、EGFP 陽性の血管は検出されなかった (図 5A, B)。連続切片の染色でも、EGFP 陽性のレシピエント血管は、心筋グラフトとその下のレシピエント皮下組織との間の境界領域で EGFP 陰性のグラフト血管と吻合しているのが観察された (図 6)。したがって、細胞シート中の内皮細胞ネットワークは、*in vivo* 移植後、グラフト内で成熟して管状の血管網を形成することが示唆される。また、グラフトのみに由来するこれらの新生血管は、その下の組織に進入してレシピエントの血管と接続していた。

心筋組織グラフト中の血管新生の制御

移植した心筋組織中に新しく形成された血管は完全にグラフト由来であることが明らかになったため、心筋細胞シート中の内皮細胞の割合を制御することを試みた。そして、この割合が、*in vivo* におけるグラフトの血管新生にどのように影響するかを検討した。単離した初代培養の心筋細胞懸濁液から MACS により内皮細胞を分離したところ、懸濁液全量に対する割合は $18.9 \pm 9.8\%$ ($n = 7$) であった。MACS 後に残った細胞懸濁液で内皮細胞を含まない心筋細胞シートを作製すると、内皮細胞ネットワークが顕著に少なくなった (図 7A)。しかし、内皮細胞を除去した心筋細胞と EGFP 陽性内皮細胞を 9:1 の割合で混合してハイブリッド細胞シートを作製すると、先とまったく同様の内皮細胞ネットワークが再度形成された (図 7B)。3 層の混合細胞シートをヌードラットの皮下に移植した実験では、移植した心筋グラフト中に、グラフト由来の EGFP 陽性血管が明瞭に観察された (図 7D, E)。内皮細胞を含まない細胞シートでグラフトを作製し移植した場合は、内皮細胞の含有比を制御したハイブリッド細胞シート群と比較して、移植 3 日後の血管量が顕著に少なかった (図 7C)。これらの結果から、細胞シート中の内皮細胞が、バイオエンジニアリング組織中の新生血管の形成に大きく寄与することが確認された (図 7F)。また、心筋細胞中に最初に播種する内皮細胞の割合を制御することにより、グラフトの血管新生を制御することができた。

考察

外科的吻合を伴わない、組織移植物の微小血管形成については、複数の研究が行われている。ヒト皮膚グラフトを無胸腺マウスに移植した研究では、グラフト血管はレシピエントの循環系と吻合したが、長期的にはグラフト由来のヒト内皮細胞が進行的に変性し、レシピエントの内皮細胞が侵入してグラフト由来の細胞を徐々に置換した [23]。同様に、豚島グラフトを皮下及び腎皮膜に移植した場合も、移植組織の血管再生を担ったのは主としてレシピエント由来の内皮細胞であったと報告されている [24, 25]。また、培養皮膚をラット皮下組織に移植した場合は、心血管の形成にグラフト由来とレシピエント由来の両方の内皮細胞が関与した [26]。

これら既報の結果とは対照的に、3 層細胞シート構造体を背側皮下組織に移植した本研究では、グラフトに由来する内皮細胞ネットワークが血管再建を完全に担っていた。興味深いことに、このグラフト由来の新生血管は、グラフトの下のレシピエント組織にまで進入し、レシピエントの血管系と機能的結合を形成していた。また、*in vivo* の血管形成制御実験でも、*in vitro* の内皮細胞ネットワークが機能的な微小血管を形成し、移植後にレシピエント組織中へと伸びることが確認された。

工学的に作製した組織内で内皮細胞ネットワークが形成されるには、ECM 分子や分泌されるタンパク質など多数の生体因子が重要であると報告されている [27]。3 次元 Matri ゲルとコラーゲンゲルで内皮細胞を培養すると、休眠状態の玉石形態から発芽性の血管形成状態へと可逆的に変化することがよく知られている [28, 29]。同様に、内皮細胞が心筋細胞シート中に含まれていた本研究でも、ECM の代替物を添加していないにもかかわらず、*in vitro* でこの発芽形態とネットワーク形成が観察された。我々の方法で調製した単離細胞の懸濁液には、心筋細胞のみならず内皮細胞も含まれ、さらに、線維芽細胞や他の ECM 産生細胞も多数含まれる。したがって、これらの細胞がコラーゲンなど適切な ECM 分子を産生し、心筋細胞シート内の内皮細胞ネットワーク形成を促進すると考えられる。

ECM 環境と併せて、成長因子やサイトカインなど分泌される種々のタンパク質が血管新生のプロセスに関与すると報告されている。本研究の結果でも、*in vitro* で心筋細胞シート中に VEGF 及び Cox-2 の mRNA 発現を認めた。心筋細胞による VEGF の分泌が微小冠血管の成長に必要であることが報告されており [30]、培養心筋細胞に VEGF 遺伝子が発現することも示されている [31]。Cox-2 も血管形成に関与する重要な酵素であり、やはり心筋細胞中の発現が知られている [32]。また、ヒト臍静脈内皮細胞をラット新生仔心筋細胞による馴化培地で培養すると、心筋細胞が分泌した VEGF により内皮細胞の Cox-2 発現が誘導される [33]。このことから、細胞シート中の心筋細胞による VEGF 産生と、Cox-2 発現とが、内皮細胞の発芽とネットワーク形成を促進するのではないかと考えられる。同様に、心筋細胞と内皮細胞との直接的な細胞間相互作用が、*in vitro* においてアポトーシスを起こしかけた心筋細胞を回復させること、そしてこの効果は馴化培地を使用した場合より強いことが報告されている [34]。また、以前の報告によれば、3 次元の多孔性足場内で内皮細胞、線維芽細胞、骨格筋芽細胞を共培養すると、工学的に作製した骨格筋の血管形成に大きく寄与する [27]。このことは、細胞間相互作用が内皮細胞ネットワークの形成に重要であることを示している。心筋細胞シートにおいては、内皮細胞が豊富な領域を心筋細胞のクラスターが囲んでいることが観察され、心筋細胞からのタンパク質分泌と直接的な細胞間相互作用の両者が内皮細胞ネットワーク形成を促進することが示唆された。したがって、心筋細胞と内皮細胞の間には互恵的な関係があり、これが *in vitro* における内皮細胞ネットワークの形成に寄与すると考えられる。

生物工学的に作製したグラフトの迅速な *in vivo* 血管新生を可能にする重要な要因の1つは、温度応答性培養皿を利用した細胞シート工学である。温度応答性培養皿は、温度応答性ポリマーである PIPAAm を通常のポリスチレン (TCPS) 組織培養表面に共有結合させることによって作製される [13, 19]。トリプシンなどのタンパク質分解酵素を使用する従来の細胞回収方法の場合、細胞は、個々のあるいは単離した細胞の懸濁液として回収される。そうした回収方法では、培養中に形成された内皮細胞ネットワークや、心筋細胞と内皮細胞との重要な細胞間相互作用は、破壊されると予想される。温度応答性培養皿の場合、37°Cでは、通常の TCPS 表面と同様に培養皿表面で細胞を培養できる。しかし、単純に培養温度を 20°Cまで下げることにより、培養皿表面が疎水性から親水性へと可逆的に変化する。このとき、培養皿に固定したポリマーは水和して急速に膨張する。培養皿表面と培養細胞との間に形成されたこの水和層のため、すべての培養細胞とそれに付着した ECM をインタクトなシートとして非侵襲的に回収することが可能になる [20]。したがって、温度応答性培養皿から回収した心筋細胞シートは、細胞自身が分泌した ECM が維持されているうえ、内皮細胞ネットワークも損傷されずインタクトに保たれ、VEGF や Cox-2 など血管形成促進遺伝子の発現も損なわれない。培養中に生じた分化状態を維持できることは、タンパク質分解酵素による細胞回収方法と非常に対照的である。血管形成能を内在的に有しているこのような培養組織を移植すると、グラフト由来の内皮細胞ネットワークが速やかに成熟して微小血管が形成される。

組織工学、特に心臓組織工学の将来的な応用として、機能的な血管を有する、厚く細胞密度の高い構造体を作製することが求められている。成長因子の投与や遺伝子治療による方法が試みられているが、現在のところ、*in vitro* においても *in vivo* においても制御が比較的困難である。しかし本研究では、心筋組織グラフトの血管新生機序が明らかになったことから、心筋細胞シート中の内皮細胞の割合を制御することで *in vivo* の血管形成を制御できる可能性があることを明確に示した。これらの結果から、種々の細胞源に由来する内皮細胞を共培養し、グラフト中の内皮細胞の割合を変えることで、特定の組織に最適な血管形成条件を得ることが十分可能であると考えられる。

ただし、内皮細胞ネットワークの形成は制御可能であるものの、この未成熟なネットワークは *in vitro* では1週間程度しか生存できない（データは示していない）。したがって、成熟した血管網を *in vitro* 条件で構築するには、生体因子のみならず、*in vivo* 環境を模倣するため血流やずれ応力などの物理的な刺激も加える必要があると考えられる [35, 36]。

結論として、細胞シート工学により作製した心筋組織グラフトは、*in vivo* で血管を再建させる内在性の能力を有している。心筋細胞シート中の内皮細胞の割合を制御することにより血管形成能も制御でき、これにより、厚みのある機能的組織の作製を困難にしている物質輸送の問題を克服できる可能性が高い。生体組織に近い構造体を作製することは、より現実に近い実験モデル系をつくることにつながり、組織工学や再生医学、そして他の分野に新しい用途をもたらす可能性をもっている。

謝辞

Joseph Yang 氏（東京女子医科大学）のコメントと技術的批評に感謝します。また、EGFP トランスジェニックラットをご提供くださった岡部勝教授（大阪大学）、内皮細胞制御実験にご協力くださった Yuko Kanauchi 氏（東邦大学）にも感謝します。本研究は、文部科学省の「21世紀 COE プログラム」、ハイテクリサーチセンター整備事業、科学研究費補助金・若手研究（B）；厚生労働省の「循環器病研究委託費」、再生医療等研究事業；財団法人・日本心臓血圧研究振興会の公募研究助成による助成を受けた。

参考文献

- [1] W. Risau, Mechanisms of angiogenesis, *Nature* 386 (1997) 671-674.
- [2] W. Risau, I. Flamme, Vasculogenesis, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11 (1995) 73-91.
- [3] J. Folkman, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat. Med.* 1 (1995) 27-31.
- [4] M. Ueda, Y. Terai, K. Kanda, M. Kanemura, M. Takehara, H. Futakuchi, H. Yamaguchi, M. Yasuda, K. Nishiyama, M. Ueki, Tumor angiogenesis and molecular target therapy in ovarian carcinomas, *Hum. Cell* 18 (2005) 1-16.
- [5] A. Kawamoto, H.C. Gwon, H. Iwaguro, J.I. Yamaguchi, S. Uchida, H. Masuda, M. Silver, H. Ma, M. Kearney, J.M. Isner, T. Asahara, Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia, *Circulation* 103 (2001) 634-637.
- [6] C. J. Koh, A. Atala, Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine, *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2004) 1113-1125.
- [7] K.M. Kulig, J.P. Vacanti, Hepatic tissue engineering, *Transpl. Immunol.* 12 (2004) 303-310.
- [8] H.M. Nugent, E.R. Edelman, Tissue engineering therapy for cardiovascular disease, *Circ. Res.* 92 (2003) 1068-1078.
- [9] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, L. Peterson, Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, *N. Engl. J. Med.* 331 (1994) 889-895.
- [10] R. S. Kirsner, V. Falanga, W. H. Eaglstein, The development of bioengineered skin, *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 246-249.

- [11] T. Shin'oka, Y. Imai, Y. Ikada, Transplantation of a tissueengineered pulmonary artery, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 532–533.
- [12] T. Walles, T. Herden, A. Haverich, H. Mertsching, Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival, *Biomaterials* 24 (2003) 1233–1239.
- [13] N. Yamada, T. Okano, H. Sakai, F. Karikusa, Y. Sawasaki, Y. Sakurai, Thermo-responsive polymeric surfaces: control of attachment and detachment of cultured cells, *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 11 (1990) 571–576.
- [14] M. Harimoto, M. Yamato, M. Hirose, C. Takahashi, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes, *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (2002) 464–470.
- [15] K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, N. Maeda, H. Watanabe, K. Yamamoto, S. Nagai, A. Kikuchi, Y. Tano, T. Okano, Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface, *Transplantation* 77 (2004) 379–385.
- [16] K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, E. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano, Y. Tano, Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1187–1196.
- [17] Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma, T. Okano, Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps, *BJU Int.* 93 (2004) 1069–1075.
- [18] J. Yang, M. Yamato, C. Kohno, A. Nishimoto, H. Sekine, F. Fukai, T. Okano, Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds, *Biomaterials* 26 (2005) 6415–6422.
- [19] T. Okano, N. Yamada, H. Sakai, Y. Sakurai, A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide), *J. Biomed. Mater. Res.* 27 (1993) 1243–1251.
- [20] A. Kushida, M. Yamato, C. Konno, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (1999) 355–362.
- [21] T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, T. Akutsu, T. Setomaru, K. Abe, A. Kikuchi, M. Umezu, T. Okano, Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces, *Circ. Res.* 90 (2002) e40–e48.
- [22] M. Hirose, O.H. Kwon, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface, *Biomacromolecules* 1 (2000) 377–381.
- [23] M. Demarchez, D. J. Hartmann, M. Prunieras, An immunohistological study of the revascularization process in human skin transplanted onto the nude mouse, *Transplantation* 43 (1987) 896–903.
- [24] T. Linn, K. Schneider, H.P. Hammes, K.T. Preissner, H. Brandhorst, E. Morgenstern, F. Kiefer, R.G. Bretzel, Angiogenic capacity of endothelial cells in islets of Langerhans, *FASEB J.* 17 (2003) 881–883.
- [25] P. Vajkoczy, A.M. Olofsson, H.A. Lehr, R. Leiderer, F. Hammersen, K.E. Arfors, M.D. Menger, Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin, *Am. J. Pathol.* 146 (1995) 1397–1405.
- [26] D.M. Supp, K. Wilson-Landy, S.T. Boyce, Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice, *FASEB J.* 16 (2002) 797–804.
- [27] S. Levenberg, J. Rouwkema, M. Macdonald, E.S. Garfein, D.S. Kohane, D.C. Darland, R. Marini, C.A. van Blitterswijk, R.C. Mulligan, P.A. D'Amore, R. Langer, Engineering vascularized skeletal muscle tissue, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 879–884.
- [28] S. Kobayashi, E. Ito, R. Honma, Y. Nojima, M. Shibuya, S. Watanabe, Y. Maru, Dynamic regulation of gene expression by the Flt-1 kinase and Matrigel in endothelial tubulogenesis, *Genomics* 84 (2004) 185–192.
- [29] I. Segura, A. Serrano, G.G. De Buitrago, M.A. Gonzalez, J.L. Abad, C. Claveria, L. Gomez, A. Bernad, A.C. Martinez, H.H. Riese, Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis, *FASEB J.* 16 (2002) 833–841.
- [30] F. J. Giordano, H.P. Gerber, S.P. Williams, N. VanBruggen, S. Bunting, P. Ruiz-Lozano, Y. Gu, A.K. Nath, Y. Huang, R. Hickey, N. Dalton, K.L. Peterson, J. Ross Jr., K.R. Chien, N. Ferrara, A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 5780–5785.
- [31] A.P. Levy, N.S. Levy, J. Loscalzo, A. Calderone, N. Takahashi, K.T. Yeo, G. Koren, W.S. Colucci, M.A. Goldberg, Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes, *Circ. Res.*

- 76 (1995) 758-766.
- [32] N. Degousee, J. Martindale, E. Stefanski, M. Cieslak, T.F. Lindsay, J.E. Fish, P.A. Marsden, D.J. Thuerlauf, C.C. Glembocki, B.B. Rubin, MAP kinase 6-p38 MAP kinase signaling cascade regulates cyclooxygenase-2 expression in cardiac myocytes in vitro and in vivo, *Circ. Res.* 92 (2003) 757-764.
- [33] G. Wu, A.P. Mannam, J. Wu, S. Kirbis, J.L. Shie, C. Chen, R.J. Laham, F.W. Sellke, J. Li, Hypoxia induces myocyte-dependent COX-2 regulation in endothelial cells: role of VEGF, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285 (2003) H2420-H2429.
- [34] D.A. Narmoneva, R. Vukmirovic, M.E. Davis, R.D. Kamm, R.T. Lee, Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: implications for cardiac regeneration, *Circulation* 110 (2004) 962-968.
- [35] B.P. Chen, Y.S. Li, Y. Zhao, K.D. Chen, S. Li, J. Lao, S. Yuan, J.Y. Shyy, S. Chien, DNA microarray analysis of gene expression in endothelial cells in response to 24-h shear stress, *Physiol. Genomics* 7 (2001) 55-63.
- [36] J.P. Cullen, S. Sayeed, R.S. Sawai, N.G. Theodorakis, P.A. Cahill, J.V. Sitzmann, E.M. Redmond, Pulsatile flow-induced angiogenesis: role of G(i) subunits, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 1610-1616.

図 1. 心筋細胞シートは内在性の血管形成能を有する。(A) 心筋細胞シート中の内皮細胞が CD31 発現細胞として検出された(緑)。細胞核を Hoechst 33342 で対比染色した。(B) 心筋細胞シートから抽出した RNA の RT-PCR 分析。培養 3 日目, 7 日目とも, VEGF, Cox-2, Tie-2 が発現している。(C) RT-PCR により心筋細胞シート中で検出された血管形成関連遺伝子の全遺伝子発現解析結果。(++) 発現あり, (+) 一部発現あり, (-) 発現なし。

Culture period:	培養期間
Gene:	遺伝子
Result:	結果

図 2. 心筋細胞シート中の内皮細胞は発芽によって成長する。心筋細胞シート中の CD31 の発現を, (A) 培養 1 日後, (B) 2 日後, (C) 3 日後, (D) 4 日後に検出した。(E) グラフは, 各時点における, 心筋細胞シートに対する CD31 陽性部分の面積の割合を示す (* $p < 0.05$, $n = 3$)。

CD31 positive area fraction (%) :	CD31 陽性部分の面積の割合 (%)
Culture period (days) :	培養期間 (日)

図 3. 心筋細胞シート中の内皮細胞は反応性を示す。培養 4 日後に CD31 を免疫染色した。(A) 対照群, (B) 2 μ M 2-メトキシエストラジオールで処理した細胞, (C) 10 nM ラット組換え VEGF で処理した細胞。内皮細胞ネットワークの形成に違いを認める。(D) グラフは, 各条件で処理した心筋細胞シートの CD31 陽性部分の面積の割合を示す (* $p < 0.05$, $n = 3$)。

CD31 positive area fraction (%) :	CD31 陽性部分の面積の割合 (%)
control:	対照群

図 4. 移植した 3 層心筋細胞シート中の微小血管形成。移植 1 週間後の組織像。(A, B) ヘマトキシリン-エオシン染色像。グラフトとその下のレシピエント組織内に, レシピエントの内皮細胞を含む微小血管の形成を認める(黒矢印)。(C, D) 抗 EGFP 免疫染色像(赤色蛍光)。グラフト由来細胞を示す。矢印は, (A, B) の血管が EGFP 陽性であること, また, 血管腔内にレシピエントの内皮細胞が存在することを示している(白矢印)。EGFP 陽性の血管がレシピエント組織中へと発芽していることに注意。

図 5. EGFP 発現ラットの皮下に移植した心筋組織グラフトの免疫組織学的分析。移植 1 週間後の染色像である。(A) ヘマトキシリン-エオシン染色像。EGFP 陰性の移植組織中に微小血管の形成を認める。(B) EGFP の免疫染色像(赤)。グラフト中に染色をほとんど認めないことから, 血管形成は EGFP 陰性のグラフト細胞によるものであることが示唆される。(C) 抗 α -サルコメアアクチニン抗体による染色像。グラフト中に心筋の存在を認める。

図 6. EGFP 陽性のレシピエント組織とグラフトとの境界部に血管の吻合を認める。(A, B) EGFP の免疫染色像(緑)。EGFP 陰性のグラフト内皮細胞が EGFP 陽性のレシピエント細胞と吻合し, 成熟した微小血管を形成している。(C) (A, B) に隣接する連続切片のヘマトキシリン-エオシン染色像。血管腔内に赤血球を認める。(D) α サルコメアアクチニンの免疫染色像。血管は, 移植した心筋グラフトとその下のレシピエント組織の間の境界部に存在している。(E) 連続切片の観察結果を図式化したもの。

Graft derived vessel:	グラフト由来の血管
Host derived vessel:	レシピエント由来の血管

図 7. 内皮細胞を制御することにより, in vivo の血管新生を制御できる。単離心筋細胞の懸濁液から MACS に

より内皮細胞を除去した。(A) 抗 CD31 染色像. 内皮細胞を含まない心筋細胞懸濁液は, *in vitro* で発芽による内皮細胞ネットワークを形成しない。(B) 内皮細胞を心筋細胞に 1:9 の割合で加えると, *in vitro* で発芽によるネットワーク形成が回復した。(C) 3 層心筋細胞シートの皮下移植から 3 日後, 内皮細胞を含まない心筋細胞シートは *in vivo* で血管を形成していない。(D) 一方, EGFP 陽性の内皮細胞を 1:9 の割合で加えると, *in vivo* でも血管形成が回復した。(E) 抗 EGFP 免疫染色像. グラフト内の全血管が, グラフト由来の EGFP 陽性細胞 (緑) で構成されている。(F) グラフト中の血管形成の定量分析結果を示す. EC (-) は内皮細胞なしで作製したグラフト, EC (+) は内皮細胞と心筋細胞の割合 1:9 で作製したグラフト (* $p < 0.05$, $n = 3$).

No. of vessels in the grafts (per mm^2): グラフト中の血管数 (mm^2 あたり)

文献資料 4

Transplantation 2005;80: 1586-1595

バイオエンジニアリング収縮性心筋細胞シートを用いた組織心筋形成による損傷心筋の修復：レシピエント心筋との統合

Shigeru Miyagawa,¹ Yoshiki Sawa,^{1,3} Satoru Sakakida,¹ Satoshi Taketani,¹ Haruhiko Kondoh,¹ Imran Ahmed Memon,¹ Yukiko Imanishi,¹ Tatsuya Shimizu,² Teruo Okano,² and Hikaru Matsuda¹

1 Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan.

2 Tokyo Women's Medical University Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo, Japan.

3 連絡先著者

本研究は文部科学省科学研究費の助成を受けた。

背景：組織工学的に作製した、足場をもたない収縮性心筋細胞シートは、損傷心筋と組織学的・電氣的に統合し、梗塞心筋の再生をもたらすという仮説を立てた。

方法：ラット新生仔の心筋細胞を、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)固定ポリスチレン培養皿で培養し、20°Cで正方形の細胞シートとして剥離した。2枚のシートを重ねて厚みを増し、収縮性心筋シートを作製した。この積層シートの断面は、均質な心臓組織様を呈していた。ラットの冠動脈左前下行枝(LAD)を結紮し、2週間後、①心筋細胞シートの移植(T群, n = 10)、②線維芽細胞シートの移植(F群, n = 10)のいずれかを行った。また、何も処置を行わない対照群を設けた(C群, n = 10)。

結果：心エコーの結果、T群では移植後2, 4, 8週の心機能が有意に改善していた。心筋細胞シートは梗塞心筋に付着し、血管形成とコネクシン43の発現を示し、心筋中で均質な組織の様相を呈していた。電気生理学的検査では、瘢痕処置領域のQRS群がピークがT群では1つだったのに対して、他の2群では脚ブロックを示す2つのピークを認めた。またT群は、レシピエント心臓のペースング閾値も他の2群より低かった。

結論：心筋細胞シートは、虚血心筋モデルにおいて、損傷心筋と統合して心機能を改善させた。このような組織工学細胞シートを用いた手技は、再生医学の分野に組織心筋形成(tissue cardiomyoplasty)という有望な概念をもたらすも。

キーワード：心不全、移植、組織工学、心筋梗塞、筋細胞

心筋梗塞は不可逆的な損傷である(1)。虚血性心疾患は心血管疾患による死亡の50%を占め、鬱血性心不全の主要原因となっている。しかし、現在臨床で用いられている薬剤や手技のうち、心筋瘢痕組織を機能的な収縮性組織で置換できる有効な方法はない。このため、正常な心筋細胞を再生するための新しい治療法が求められている。

近年、新しい治療戦略として、生分解性の足場を用いて生物工学的に心筋グラフトを作製し、これを移植する方法が提唱されているが、心筋への付着が不十分なため、心機能改善という利点はごくわずかしが得られていない(2, 3)。我々はこの問題を克服するため、組織工学的に作製した、足場をもたない心臓組織は、レシピエント心臓と組織学的・電氣的に統合し、損傷心筋の再生をもたらすのではないかと考えた。

近年の組織工学の進歩に伴って、機能的な心臓組織の作製が可能になりつつある。新しい技術により、細胞外マトリックス(ECM)を代替する生分解性物質を使用することなく、細胞シートを層を作成できるようになった(4)。この技術を用いると、コンフルエントに培養した細胞単層中の細胞間結合と接着タンパク質をまったく損なわずにすむうえ、内因性ECMも細胞回収時に細胞シートの下に維持され(5)、これがシートとレシピエント心臓との統合の際に接着剤として重要な役割を果たす。また、これらの心筋細胞シートは、電氣的に連絡できかつ拍動する三次元心筋構造体である(6)。しかし、こうした心筋細胞シートがin vivo移植後も機能的性を維持できるか否かはまだ明らかになっていない。

そこで本研究では、①心筋細胞シートが、移植後も生存し、損傷心筋と組織学的・電氣的に統合するか、②移植した心筋細胞シートが心機能の改善をもたらすか、の2点について検討した。

材料及び方法

心筋梗塞モデル

動物に関するすべての手技は、National Society for Medical Researchの「Principles of Laboratory Animal Care」及び米国国立衛生研究所の「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」(NIH Publication No. 86-23, 1985年改訂)に準拠した。既報の手順に準じて(7)、雄のLewisラット30匹(300g, 8週齢; Seac Yoshitomi Ltd, 福岡)に急性心筋梗塞を誘発した。動物を、心筋細胞シート移植群(T群, n = 10)、線維芽細胞シート移植群(F群, n = 10)、コラーゲン膜のみ移植群(C群, n = 10)の3つの処置群に無作為に割り付けた。

ラット新生仔心室筋細胞の初代培養

既報の手順に準じて (6) ラット新生仔心室筋細胞の初代培養を行った。簡潔には、1~2日齢のラット新生仔を深麻酔にて安楽死させ、ただちに心臓を摘出して、37°Cのコラゲナーゼ（クラス II, Worthington Biochemical）添加 Hank 溶液で分解した。単離した細胞を培地に懸濁した。培地の組成は、6% FBS, 40% Medium 199 (Gibco BRL), 0.2% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液, 2.7 mmol/L グルコース, 54% 平衡塩類溶液（組成 (mmol/L) : 116 NaCl, 1.0 NaH₂PO₄, 0.8 MgSO₄, 1.18 KCl, 0.87 CaCl₂, 26.2 NaHCO₃）とした。この細胞懸濁液を平板培地に播種し、37°C・5% CO₂ の湿潤空气中でインキュベートした。

心筋細胞シートのマニピュレーションによる積層構造の作製

既報の手順に準じて (6) 心筋細胞シートのマニピュレーションを行った。簡潔には、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PIPAAm) 固定ポリスチレンで作製した、正方形の温度応答性細胞培養表面上で、ラット新生仔心筋細胞を 37°C で 4 日間培養した。コンフルエントに達した細胞を細胞シートとして剥離するため、培養皿を別の CO₂ インキュベータに移して 20°C でインキュベートした。心筋細胞シートは自発的に培養皿から離れた。この細胞シート全体を、適切な培養表面に移した。シートの折り重なった部分を伸ばすため、シート中央部に培地を滴下した。細胞シートを積層するため、別の心筋細胞シートを PIPAAm 固定ポリスチレン培養皿から剥離し、上記と同様の手順で先の培養皿に移した。2 枚目のシートを 1 枚目のシートのすぐ上に配置し、培地をゆっくり吸引することにより 1 枚目のシートの上に重ねた。この心筋細胞シートの厚さは約 50 μm で (6)、シート 1 枚あたりの心筋細胞数は 1 × 10⁶ 個であった。線維芽細胞シートは、上記と同様に、単離した線維芽細胞を同じ培養皿で 2 日間培養し、正方形の細胞シートを上記と同様に剥離した。

線維芽細胞の初代培養

既報の手順に準じて (8) 線維芽細胞の初代培養を行った。簡潔には、8 週齢 Lewis ラットの下の筋肉から得た細胞懸濁液を、Percoll™ (Amersham Biosciences, スウェーデン) による密度勾配遠心法で線維芽細胞と筋芽細胞とに分離した。

心筋細胞シートの移植

LAD 結紮 2 週間後の Lewis ラットに心筋細胞シートを移植した。ラットを塩酸ケタミン (22 mg/kg) とペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg) で麻酔し、挿管して、酸素を補充した空気 (2 L/分) を、1 回換気量 5 ml, 呼吸数 60 回/分で換気した。左第 5 肋間で開胸して心臓を露出させた。表面の癒痕と壁運動の異常に基づき、目視により梗塞部位を確認した。梗塞心筋上に心筋細胞シートまたは線維芽細胞シートを移植し、シート保護のためコラーゲン膜 (20 mm 角正方形, Cellgen, 高研) で覆った。対照群は、コラーゲン膜のみを使用して同様の処置を行った。

移植したシートを識別するため、移植前に、PKH26 赤色蛍光細胞リンカーキット (Sigma-Aldrich Corp., ミズーリ州 St. Louis) で新生仔の心筋細胞を標識した。標識した心筋細胞シートを Lewis ラットの梗塞心筋に移植し、2 週間後に安楽死させた。

ラット心機能の測定

既報の手順に準じて (9), 移植後 2, 4, 8 週に SONOS 5500 (PHILIPS Medical Systems, 米国) で心エコー検査を行った。カラーキネシス法により心腔の動きをリアルタイムで観察し、局所収縮機能を評価した (10)。

組織学的評価

心筋細胞シート移植後の 2 週と 8 週に左室の心筋標本を取得した。標本は 10% 中性ホルムアルデヒドに浸漬し、パラフィン包埋した。各標本から数枚の連続切片を切り出し、ヘマトキシリン・エオシン染色して顕微鏡観察した。

血管内皮細胞を標識するため、既報の手順に準じて (9), HRP 結合抗第 VIII 因子関連抗原に対する EPOS 共役抗体 (EPOS 抗ヒト von Willebrand 因子/HRP, DAKO, デンマーク) による免疫組織化学染色を行った。顕微鏡下で倍率 200x の視野 10 箇所を無作為に選択し、各視野内の染色陽性血管内皮細胞を計数した。結果は 1 平方ミリメートルあたり血管数として表した。

α-アクチニンサルコメア抗原及びコネクシン 43 関連抗原の免疫組織化学染色を行うため、一次抗体として抗 α-アクチニンサルコメア抗体 (Sigma-Aldrich Corp., ミズーリ州 St. Louis) または抗コネクシン 43 抗体 (CHEMICON international Inc., カリフォルニア州 Temecula) を、二次抗体として alexa488 共役ヤギ抗マウス IgG (Invitrogen Corp. カリフォルニア州 Carlsbad) を使用した。さらに、DAPI (同仁化学研究所, 熊本) による対比染色を行った。スライドの観察には共焦点レーザー顕微鏡 (Radiance 2100, Bio-Rad Laboratories, Inc., カリフォルニア州) を使用した。

電気生理学的解析

多点電極皿 (Panasonic : MED プローブ) の準備方法は既報のとおりである (11)。解析装置は、100 μm 間隔で 8 × 8 のパターンに配置された 64 本の平面微小電極を有する (Panasonic : MED-P10AP)。この 8 × 8 アレイを覆うように心筋細胞シートを置き、37°C に設定した小型の CO₂ インキュベータに MED プローブを入れて電気

反応を記録した。二次元電流源密度 (CSD) の連続解析を行って、心筋細胞シート中の電氣的伝達を調べた。既報の手順に準じ (12, 13), MED64 Performer™ (アルファメッドサイエンス, 日本) で二次元 CSD/電位データを計算した。

電位を検出するため、未処置の癒痕部、心筋細胞シートを移植した癒痕部、または線維芽細胞シートを移植した癒痕部に、電極 (直径 100 μm , ユニークメディカル, 東京) の 1 つを配置した。残り 2 つの電極は左肋骨下と右大腿部に配置した。また、レシピエントの心電図を取得するため、右乳房上部、左肋骨下、右大腿部の 3 箇所電極を装着した。いずれの電位図も、生体電氣増幅器 (UA-102, ユニークメディカル, 東京) で増幅し、データ取得システム (UAS-108S, ユニークメディカル, 東京) で記録した。

閾値を分析するため、刺激用の微小電極 2 つを、未処置の癒痕部、心筋細胞シートを移植した癒痕部、または線維芽細胞シートを移植した癒痕部に配置した。レシピエントのペースング心電図を取得するため、電極の 1 つを正常心筋に取り付け、残り 2 つを左肋骨下と右大腿部に取り付けた。この状態で、同じ刺激装置を用いて 300 bpm のペースで癒痕部を刺激し、関心領域の閾値を評価した。

データ解析

データは平均±標準偏差として表し、StatView 5.0 プログラム (Abacus Concepts, カリフォルニア州 Berkeley) で複数段階の分散分析 (ANOVA) を行った。まず、心エコーデータを二元配置反復測定 ANOVA で解析して全経過時間にわたる差異を分析し、Tukey-Kramer post-hoc 検定による一元配置 ANOVA で各時点の比較結果の有意性を検証した。その他の数値データは Tukey-Kramer post-hoc 検定による一元配置 ANOVA で解析した。p < 0.05 を統計有意とした。

結果

心筋細胞シートの組織学的特徴

培養物の温度を下げることにより、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) 固定ポリスチレンから心筋細胞シートを剥離させて、単層のシートを取得した (図 1A)。このシートを 2 枚重ねると、ただちに互いに付着した。断面を観察すると、2 枚のシートが密接な結合を形成し、均質な心臓組織様を呈していた (図 1B)。免疫組織化学染色では、心筋細胞シート中にばらばらに配向したコネキシン 43 が観察された (図 1C)。 α -アクチニンサルコメアタンパク質に対する免疫組織化学染色では、心筋細胞シートの多数の細胞が染色された (図 1D)。

心筋細胞シートの電氣的特徴

心筋細胞シートの代表的な電氣活動を検出しえた。限局的な電流シンクが、電流源を伴ってシートの左側から生じていた。この電流源 - 電流シンクのペアは、経時的に心筋細胞シートの左側から右側へと広がった (図 2)。

組織学的評価

T 群及び F 群は、C 群と比較して左室 (LV) の壁厚が有意に増加していた。また、T 群は、F 群及び C 群と比較して左室の断面積が減少していた (図 3A~C)。心筋細胞シートの移植時、シートは結紮なしで梗塞心筋にただちに付着した (図 3D)。PKH26 で標識したラット新生仔心筋細胞シートを Lewis ラットの梗塞心筋に移植した後、梗塞心筋中の PKH26 標識心筋細胞シートを検出した (図 3E)。免疫組織化学染色では、移植した PKH26 標識心筋細胞シート中、及びシートとレシピエント心臓との接触領域周囲に、ばらばらに配向したコネキシン 43 が観察された (図 3F)。また、PKH26 標識細胞の大多数に α -アクチニンの発現を認めた (図 3G)。

移植 2 週間後の心筋細胞シートをヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色により組織学的に観察したところ、シートはアライメントして梗塞心筋に良好に付着しており、炎症細胞の集積もなかった。黄色の矢印は心筋細胞シートの保護に使用したコラーゲンシートを示している (図 3H, I)。移植 8 週間後の心筋細胞シートの肉眼観察でも、シートとレシピエント心臓とが密着していることが観察された。同時に行った HE 染色による組織学的観察でも、心筋細胞シートがアライメントして癒痕の中心部でレシピエント心臓と統合していることが確認された (図 3J, K)。第 VIII 因子の免疫染色では、PKH26 標識心筋細胞シートの内部及び周囲に第 VIII 因子陽性細胞が多数観察された (図 3L)。

F 群及び T 群では、C 群と比較して、移植後の全壁厚の回復が有意に大きかった (図 4A)。また T 群では、血管密度が他の 2 群より有意に高かった (C vs. F vs. T: 3.1 ± 1.1 vs. 5.0 ± 1.5 vs. $8.2 \pm 1.8 \times 10^2/\text{mm}^2$; P < 0.05; 図 4B)。

梗塞心筋の機能的回復

B モード撮影から、T 群では C 群と比較して左室の拡張が良好に抑制され、全体的な壁運動も良好に保たれていることが観察された (図 5A)。M モード撮影では、T 群に前壁の運動低下を認め、C 群には前壁の運動異常を認めた (図 5B)。また、カラーキネシスを読影した結果、T 群の局所的収縮機能は移植前より改善していたが、F 群と C 群の前壁運動は改善していなかった (図 5C)。

3 群間で、ベースライン時の駆出率 (EF)、左室内径短縮率 (FS)、左室収縮終期面積 (LVESA) に有意差はなかった。

移植 2 週間後の二次元心エコーでは、他群と比較して T 群の EF (C vs. F vs. T: 45.2 ± 6.9 vs. 42.5 ± 4.9

vs. $63.9 \pm 6.6\%$; $P < 0.05$) (図 5D) 及び FS (C vs. F vs. T: 18.9 ± 3.2 vs. 16.9 ± 2.4 vs. $29 \pm 4.1\%$; $P < 0.05$) (図 5E) が有意に改善していた。この機能的改善は移植 4 週間後及び 8 週間後も維持されていた。また T 群は、他群と比較して 4 週間後及び 8 週間後の LVESA が有意に小さかった (C vs. F vs. T, 8 週間後: 0.57 ± 0.10 vs. 0.48 ± 0.17 vs. 0.26 ± 0.05 cm^2 ; $P < 0.05$) (図 5F)。

電気生理学的評価

電気生理学的分析として癒痕処置部位の QRS 波を検討したところ、T 群では全匹でピークが 1 つだったのに対して、F 群及び C 群では、全匹に、脚ブロックを示す 2 つのピークを認めた (図 6A)。また、QRS 群の振幅 (V) も、T 群では改善していたが F 群及び C 群では低値のままであった (C vs. F vs. T: 0.83 ± 0.64 vs. 0.72 ± 0.04 vs. 2.78 ± 0.90 V; $P < 0.05$; 図 6B)。

T 群は、レシピエント心臓のペーシング閾値も F 群及び C 群より低かった (C vs. F vs. T: 4.9 ± 0.9 vs. 3.0 ± 0.7 vs. 1.7 ± 0.5 V; $P < 0.05$) (図 6C)。

考察

最近開発された針注入による細胞心筋形成術は、低下した心機能を回復するための新しいアプローチを提供している (14)。心筋細胞移植法はさらに、①組織形成プロセス (グラフトの形状、サイズ、一貫性) をより良好に制御できる、②移植技術が容易である、③最小限の細胞損失で多数の細胞を移植できる、という利点をもたらす。一方、注入法には、細胞損失率が高く、トリプシン処理によりコネキシン 43 などの表面タンパク質も失われるという短所がある。

本研究では、足場をもたない収縮性心筋細胞シートを移植し、心機能の解析と組織学的評価を行った。心筋細胞シートは梗塞心筋に付着し、付着部位には血管形成が生じていた。グラフトは均質な筋細胞組織様を呈し、コネキシン 43 を発現しており、*in vivo* で同期して収縮した。この工学的に作製した構造体中の心筋細胞は、良好にアライメントしており、移植部位への炎症細胞の集積もごくわずかであった。この心筋細胞シートの移植により心機能が大幅に改善した。電気生理学的評価では、心筋細胞シートにより癒痕部の導電性が改善し、処置部の QRS 群がピーク 1 つの正常な形状に戻ったことが確認された。これらのデータは我々の仮説を裏付けるものである。すなわち、収縮性心筋細胞シートは、損傷心筋と組織学的・電氣的に統合するとともに血管形成とコネキシン 43 の発現を示し、心機能の有意な改善をもたらす。

再生療法を成功させるには、電氣的統合と組織学的統合という 2 つの面の統合を実現する必要がある。移植したシート的心筋細胞がアライメントし、梗塞心筋の局所的及び全体的な収縮機能を有意に改善させたことから、動的な統合が生じていることが示唆された。梗塞をきたした心臓の構造的変形や心機能低下には、損傷部分のリモデリングが関与している (15)。Kelley らは、ヒツジの心筋梗塞モデルを用いて、梗塞心筋上にメッシュを乗せて左室の膨張を抑制すると左室の幾何学形状と安静時機能が温存されることを示した (16)。損傷した心臓の収縮能力を回復させるには、機能不全をきたした組織において①左室幾何学形状の温存と②局所収縮機能の改善を図ることがいずれも不可欠であると考えられ、したがって、左室の拡張を軽減するだけでは不十分である可能性がある。拍動しない線維芽細胞シートは、拍動するシートと比較して収縮機能の改善に失敗したという本研究の結果も、この考えを裏付けている。本研究の実験では、LAD 結紮後に減少した前壁厚が T 群で有意に回復したが、他の 2 群では壁厚の回復がみられなかった。厚さ $100 \mu\text{m}$ の心筋細胞シートがなぜ前壁厚の回復と心機能の改善をもたらしたのかは明らかでない。我々の最近の研究では、細胞シートがストローマ細胞由来因子 1 (SDF-1) (17)、肝細胞成長因子 (HGF)、VEGF など多数のサイトカインを発現していること、そしてこれらのサイトカインが一部の幹細胞の移動を促し、創傷治癒と血管新生を促進することが明らかになった (データは示していない)。したがって我々は、心筋細胞シートの生存、一部の幹細胞の移動、移植した心筋細胞シートが継続的に分泌する血管形成因子により惹起される血管形成が、梗塞心筋の再生に寄与するのではないかと考えている。

本研究では、心筋細胞シートの電氣的な統合も確認された。電氣的導体、すなわち、コネキシン 43 を発現する心筋細胞シートは、癒痕部の伝達導電性を高め、QRS 群のピーク数を 2 つから 1 つへと改善させた。これは梗塞心筋中の脚ブロックが解消したことを示唆している。脚ブロックのパターンは心筋の線維形成または壊死と関連性があると考えられており (18)、こうした組織学的変化は心電図の QRS 群の振幅に反映される (19)。同期的な壁運動 (エコーで観察される)、脚ブロックの解消 (QRS 群のピークが 1 つであることにより示される)、癒痕部のペーシング閾値の低下は、移植した心筋細胞シートとレシピエント心筋との間に電氣的結合が形成されたことを示している。我々は、コネキシン 43 を有する細胞シートのみが、細胞シート下部に発現した接着分子を介してレシピエント心筋と密接な接触を形成し、細胞シートとレシピエント心筋との間に電氣的連絡をもたらしたと考えている。

また、本研究では組織学的な統合も確認された。すなわち、移植した心筋細胞シートは梗塞心筋に良好に付着し、血管形成を生じた。Kushida らは、温度応答性培養皿から剥離した細胞シートでは、シート中の接着物質が良好に維持されていると報告している。 (5)。このシートは、接着分子が表面によく保持されており、複数の臓器に良好に付着・統合する。また、細胞コミュニティを維持したまま細胞を送達することは細胞の生存と成育に重要である可能性があるが、これは注入法による細胞送達では実現できない。これらの結果から、足場をもたない心筋細胞シートがレシピエント心筋とともにシンシチウムを形成すると示唆される。針注入法で多数の細胞損失が生じることを鑑みると、心筋細胞シート移植法は、より多数の細胞の送達と細胞コミュニティの維持を可能にし、心機能を大幅に改善できるという利点をもたらす可能性がある (20)。

細胞シート技術の臨床応用を考えると、細胞の採取源は非常に重要な問題である。これまでのところ、細胞移植の臨床応用に最も広く用いられているのは筋芽細胞である。筋芽細胞は心筋細胞と比較して虚血に対する耐容能が高く、したがって現在でも、細胞シート移植の臨床応用に最も適した細胞採取源の1つである。

結論として、収縮性心筋細胞シートが損傷心筋と動的・電氣的・組織学的に統合することが本研究により示された。これらのデータは、虚血性心疾患において、心筋瘢痕組織の再生を促進して機能的な収縮性組織を形成する方法として、細胞シート移植を試みる根拠となるものである。

謝辞

技術的支援をいただいた Masako Yokoyama 氏, Akiko Nishimura 氏, Shigeru Matsumi 氏, Tadahiro Matsumoto 氏, に感謝します。

参考文献

1. Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, et al. Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 1993; 88: 107-115.
2. Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, et al. Bioengineered Cardiac Grafts. A New Approach to Repair the Infarcted Myocardium? *Circulation* 2000; 102: III-56-III-61.
3. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al. Survival and Function of Bioengineered Cardiac Grafts. *Circulation* 1999; 100: II-63-II-69.
4. Okano T, Yamada N, Sakai H, et al. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(*N*-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 1243-1251.
5. Kushida A, Yamato M, Konno C, et al. Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces. *J Biomed Mater Res* 1999; 45: 355-362.
6. Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002; 90(3): e40.
7. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, et al. Cellular mechanism of myocardial infarct expansion. *Circulation* 1988; 78: 186-201.
8. Yablonka-Reuveni Z, Nameroff M. Skeletal muscle cell populations. Separation and partial characterization of fibroblast-like cells from embryonic tissue using density centrifugation. *Histochemistry* 1987; 87: 27-38.
9. Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, et al. Myocardial regeneration therapy for heart failure. Hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation* 2002; 105: 2556-2561.
10. Lang RM, Vignon P, Weinert L, et al. Echocardiographic quantification of regional left ventricular wall motion with color kinesis. *Circulation* 1996; 93: 1877-1885.
11. Shimono K, Brucher F, Granger R, et al. Origins and distribution of cholinergically induced beta rhythms in hippocampal slices. *J Neurosci* 2000; 20: 8462-8473.
12. Shimono K, Kubota D, Brucher F, et al. Asymmetrical distribution of the Scaffer projections within the apical dendrites of hippocampal field CA1. *Brain Res* 2002; 950: 279-287.
13. Pieper CF, Pacifico A. Improved spatial resolution for cardiac mapping using current source density-based electrode arrays. *Pacing Clin Electrophysiol* 1995; 18: 34-44.
14. Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, et al. Rebuilding a Damaged Heart Long-Term Survival of Transplanted Neonatal Rat Cardiomyocytes After Myocardial Infarction and Effect on Cardiac Function. *Circulation* 2002; 105: 1720-1726.
15. Tyagi SC. Extracellular matrix dynamics in heart failure: A prospect for gene therapy. *J Cell Biochem* 1998; 68: 403-410.
16. Kelley ST, Malekan R, Gorman JH 3rd, et al. Restraining infarct expansion preserves left ventricular geometry and function after acute anteroapical infarction. *Circulation* 1999; 99: 135-142.
17. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 362: 697-703.
18. Agarwal AK, Venugopalan P. Right bundle branch block: varying electrocardiographic patterns. Aetiological correlation, mechanisms and electrophysiology. *Int J Cardiol* 1999; 71(1): 33-39.
19. Sakamoto A, Ono K, Abe M, et al. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: An animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 13873-13878.
20. Miyagawa S, Sawa Y, Takano H. Efficacy of a Novel Cellular Cardiomyoplasty Using Cardiac Sheet for Myocardial Regeneration: Compared with Needle Injection. *Circulation* 2002; 106: 11420.

図 1. 心筋細胞シートの組織学的特徴。(A) 温度を下げることにより、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)

固定ポリスチレンから単層心筋細胞シートを剥離した。(B) *In vitro* の2層心筋細胞シートの断面像。2枚のシートは密着し、均質な心臓組織様を呈した。(C) 抗コネキシン43抗体による免疫蛍光染色。心筋細胞シート全体にギャップ結合を認める。コネキシン43：赤、細胞核：緑。(D) 心筋細胞シート中に α -アクチニン陽性細胞を多数認める。 α -アクチニン：赤、細胞核：緑。

図2. 心筋細胞シートの電気的特徴。心筋細胞シート中の電流源密度の変化を経時的に示す(35 ms)。各フレームは、電極アレイ部位で自発的活動を記録した際の、各時点(フレーム左上に示す)における電流源密度の計算結果を示している。青色は電流シンクの最大点、黄色は電流源の最大点。限局的な電流シンクが、電流源を伴ってシートの左側から生じていた(0 ms)。この電流源-電流シンクのペアは、記録中(0~35 ms)、心筋細胞シートの左側から右側へと広がった。

図3. 心筋細胞シートの肉眼像及び鏡検像。C群(A)と比較して、T群(B)及びF群(C)では前壁が有意に回復していた。T群では左室の短軸面積が他の2群より小さかった。これに対して、C群では左室が拡張し、前壁がT群及びF群と比較して薄かった。矢印はそれぞれ、瘢痕部(A)、線維芽細胞の移植部位(B)、心筋細胞シートの移植部位(C)を示す。(D) 矢印は、移植直後の心筋細胞シートを示す。(E) PKH26で標識した心筋細胞シートは生存し、梗塞心筋に付着した。(F) 移植したPKH26標識心筋細胞シート中、及びシートとレシピエント心臓との接触領域周囲に、ばらばらに配向したコネキシン43が発現していた。コネキシン43：緑、PKH26標識心筋細胞シート：赤。(G) 移植した心筋細胞シート中のPKH26標識細胞は α -アクチニンを発現していた。 α -アクチニン：緑、PKH26標識心筋細胞シート：赤、細胞核：青。(H, I) 移植した心筋細胞シートの顕微鏡写真。シートが瘢痕領域を覆い、レシピエント心筋とアライメントして統合している。移植2週間後。黒矢印は移植した心筋細胞シートを、黄矢印はコラーゲンシートを示す(H：弱拡大像、I：強拡大像)。(J, K) 移植8週間後、積層心筋細胞シートは、瘢痕中央部に単独の島として確認できた。黒矢印は移植した心筋細胞シートを示す(J：弱拡大像、K：強拡大像)。(L) PKH26標識心筋細胞シートの内部及び周囲に第VIII因子陽性細胞が多数観察された。第VIII因子：緑、PKH26標識心筋細胞シート：赤、細胞核：青。

図4. 組織学的評価。(A) 心筋細胞シート移植後の前壁厚の回復。LAD結紮により減少した前壁厚は、C群と比較してT群とF群で有意に回復した。*C群に対して $P < 0.05$ 。#F群に対して $P < 0.05$ 。C：対照群、F：線維芽細胞シート移植群、T：心筋細胞シート移植群、AWTh：前壁厚。(B) 血管密度。第VIII因子関連抗原に対する免疫染色で評価したところ、心筋細胞シート移植群では血管密度が有意に改善していた。*C群に対して $P < 0.05$ 。#F群に対して $P < 0.05$ 。C：対照群、F：線維芽細胞シート移植群、T：心筋細胞シート移植群。

図5. 移植が梗塞心筋にもたらす機能的効果。(A) Bモード撮影では、T群(右側)はC群(左側)と比較して左室の拡張が良好に抑制されていることが観察された。T群では、全体的な壁運動も、C群と比較して回復していた。(B) T群では、左室前壁の運動が同期していた(右側)。一方、C群の前壁は運動異常を示した(左側)。矢印は左室前壁を示す。(C) カラー解析では、前壁の局所機能が移植前より改善したことが示された(左側：移植前、右側、移植後)。矢印は前壁を示す。(D, E) 収縮機能を駆出率(D)及び内径短縮率(FS)(E)で評価した。T群では移植2週間後に有意な改善を認め、この機能的改善は移植4週間後及び8週間後も維持されていた。C：対照群、F：線維芽細胞シート移植群、T：心筋細胞シート移植群。(F) 移植2, 4, 8週間後、T群の左室収縮終期面積(LVESA)は他の2群と比較して有意に小さかった。*C群に対して $P < 0.05$ 。#F群に対して $P < 0.05$ 。

図6. 移植した心筋細胞シートとレシピエント心筋との電氣的連絡の解析結果。(A) 電気生理学的分析として瘢痕処置部位のQRS群を検討した。T群ではピークが1つだったのに対し、F群及びC群では、脚ブロックを示す2つのピークを認めた。対照群(A1)、線維芽細胞シート移植群(A2)、心筋細胞シート移植群(A3)；心筋細胞シート移植後(A3左側)、心筋細胞シート移植前(A3右側)。(B) 電気生理学的分析で、T群のQRS群の振幅に改善を認めた。F群及びC群の振幅は低値のままであった。(C) T群は、レシピエント心臓のペースング閾値もF群及びC群より低かった。*C群に対して $P < 0.05$ 。#F群に対して $P < 0.05$ 。C：対照群、F：線維芽細胞シート移植群、T：心筋細胞シート移植群。

Body surface:	体表
scar:	瘢痕部
Fibroblast sheet implantation site:	線維芽細胞シート移植部
Cardiomyocyte sheet implantation site:	心筋細胞シート移植部
Post value:	移植後
Pre value:	移植前
Amplitude (V):	振幅 (V)
Threshold (V):	閾値 (V)

文献資料5

The FASEB Journal express article 10.1096/fj.05-4715fje.

細胞シートグラフトの多段階手術による拡散限界の克服と、血管を有する厚い心筋組織の作製

Tatsuya Shimizu,* Hidekazu Sekine,* Joseph Yang,* Yuki Isoi,* Masayuki Yamato,* Akihiko Kikuchi,* Eiji Kobayashi,† and Teruo Okano*

*Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666

†Division of Organ Replacement Research, Center for Molecular Medicine, Jichi University Medical School, 3311-1 Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498 Japan

本研究には清水と関根が同等に関与した。

抄録

近年、組織工学は急速に進展しているが、血管形成を十分に行えないことが細胞密度の高い組織を作製するうえで大きな障害となっており、低酸素、栄養不良、老廃物蓄積という問題があるため、成育可能な組織を得るにはそのサイズが制限される。そのため、よく組織された血管系を有する機能的組織を作製するための新しい技術が求められている。本研究では、ラット新生仔の心筋細胞を温度応答性培養皿からインタクトなシートとして回収して積層し、細胞密度の高い心筋組織を作製して、皮下組織に移植した。しかし、この積層細胞シートの厚さの上限は約80 μ m(3層)であった。この限界を克服するため、3層グラフトを1日、2日または3日の間隔を空けて繰返し移植することを試みた。移植間隔を1日または2日にした場合、積層した2つのグラフトは完全に同期し、壊死を起こすことなく組織全体が生存した。また、この多段階移植により、よく組織された微小血管網を有する、厚さ約1mmの心筋が得られた。さらに、外科的に接続できる動静脈上で作製した機能性の多層グラフトは、これらの血管から完全な血液灌流を得ることがわかり、血管の直接吻合による異所移植を良好に行うことができた。この培養細胞シート統合法は、厚く血管を有する組織の作製を長年困難にしていた障害を克服でき、変性心筋をはじめとする種々の損傷臓器を修復する臨床手技の可能性を開くものといえる。

キーワード：ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、電気生理学、マイクロサージェリー

Langer と Vacanti が耳の形状をした軟骨組織をマウスの背側皮下組織で作製したと最初に報告して以来、組織工学の分野は急速に進歩している。この最初の研究では、耳の形状と適切なサイズに成形した三次元(3D)の生分解性足場に細胞懸濁液を播種することによって軟骨組織が作製された(1, 2)。以来、多くの研究者が、低下または消失した臓器機能の回復を目的として、この足場技術を用いて種々の組織の再構築を試みており(3-7)、皮膚、軟骨、大血管では既に組織工学による代替物が臨床応用されている(8-10)。最近では、重篤心不全患者の増加を受けて、次世代の組織工学の1つとして心筋を作製する研究が盛んになっている(11-15)。

しかし、有望な成果が得られている一方で、この分野には新たな問題も生じている。大きなハードルの1つは、心臓、肝臓、腎臓など、細胞密度が高い組織をいかに効果的に作製できるかという点にある。足場を使用する方法では、単離した細胞の懸濁液を多孔性ポリマーの足場に播種するが、細胞密度を高くすることが困難であることが問題となっている。また、このような足場は生分解を受けながら徐々に細胞外マトリックス(ECM)で置換されてゆくが、その結果、ECMが多く細胞密度が低い構造体ができあがる。したがって、足場を用いる方法は、ECMの豊富な組織には有用であるが、細胞密度の高い組織の再建には適さないと考えられる。細胞密度の高い組織の作製を困難にしているもう一つの重要な要因は、必要な養分を迅速かつ継続的に供給し、代謝廃物を除去するための血管網がないことである。これは、血管の必要性がそれほど高くない、細胞密度の低い組織と対照的な点である。十分な血管をもたない培養組織では壊死が誘発され、その結果、成長が抑制され、最終的な大きさが制限される。こうした背景から、よく発達した血管網を有する、細胞密度の高い三次元組織の再建を向上させるため、新しい技術の開発が強く望まれている。

我々は、コンフルエントな単層の培養細胞シートを重層化して三次元組織を再建するという、足場を使用しない独自の組織工学技術「細胞シート工学」を開発した。温度応答性ポリマーであるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)を共有結合させた温度応答性培養表面から、培養した細胞シートを回収する(16, 17)。一般的に、コンフルエントに達した培養細胞は、酵素処理により単離して細胞懸濁液として回収するが、PIPAAm固定表面でコンフルエントに達した細胞は、培養温度を下げるだけで、連続した成育可能な細胞シートとして培養表面から離れる(18)。これは、培養表面が疎水性(細胞接着性)から親水性(細胞非接着性)へと急速に変化することによる(19)。我々は既にさまざまな細胞種について細胞シートのマニピュレーション法を確立し、これを組織工学に応用している(20-25)。例えば、単層の細胞シート法を用いて、損傷した角膜表面を自家口腔粘膜上皮細胞で置換する臨床試験を行い、全例で著明な視力回復を得た(26)。そして細胞密度の高い三次元組織を再建する試みとして、この細胞シート工学を心筋の組織工学に応用している(27)。

心筋においては、機能的な同期拍動を得るため、電氣的及び構造的な細胞間結合がきわめて重要である。我々は既に、培養し重層化したラット新生仔心筋細胞シートのシート間に電氣的及び形態学的な連絡が形成されることを確認しており、このシートを用いて、*in vivo* と *in vitro* の両方において、同期拍動する心筋組織の作製に成功している (28)。コンフルエントな細胞シート同士を直接接触させて積層すると、電氣的・機械的な同期が迅速に確立され、心筋の機能的な拍動が得られる。我々は、こうした研究結果から、細胞密度の高い機能的な組織を作製する場合、細胞シートを重層化する技術は、足場を用いた組織工学と比較して大きな利点を有すると考えている。しかし、まだ血管を適切に構築するには至っておらず、物質輸送が問題となるため、細胞シートを無制限に積層することは実現できていない。

本研究では、重層化した細胞シートの厚さの限界を明らかにし、多段階移植法によりこの限界を克服することを試みた。また、外科的に接続できる動静脈を利用して多層グラフトを異所移植する新しい治療戦略を紹介する。

材料及び方法

動物実験はすべて、「東京女子医科大学 実験動物使用指針」に準拠した。

温度応答性培養表面

正方形パターンの PIPAAm 固定細胞培養皿の具体的な作製方法は既報のとおりである (29)。簡潔には、IPAAm モノマー (興人 [東京] より提供) を 2-プロパノールに溶解し、ポリスチレン製の組織培養皿に塗布した。この培養皿に、Area Beam Electron Processing System (NHV コーポレーション, 京都) を用いて電子線 (0.25 MGy) を照射し、IPAAm を重合させるとともに培養皿表面に共有結合させた。PIAAm 固定培養皿を低温の蒸留水で洗浄して、固定しなかった IPAAm を除去し、窒素ガス中で乾燥させた。次に、この PIPAAm 固定表面を正方形のカバーガラス (24 x 24 mm, 松浪硝子, 大阪) でマスキングした。アクリルアミド (AAm) モノマー (和光純薬工業, 東京) を 2-プロパノールに溶解し、マスキングした培養皿表面に塗布した。この培養皿表面を上記と同様に電子線照射した。このようにして、中央の正方形部分に温度応答性の PIPAAm が固定され、その周囲に細胞非接着性のポリ AAm が固定された培養皿を得た。最後にこの培養皿をエチレンオキシドガスで滅菌した。

ラット新生仔心筋細胞の初代培養

1 日齢の Wistar ラット (日本生物材料センター, 東京) の心室を、コラゲナーゼ (クラス II, Worthington Biochemical, ニュージャージー州 Lakewood) を添加した 37°C の Hanks 溶液 (Sigma, ミズーリ州 St. Louis) で消化した。単離した細胞を培地に懸濁した。培地の組成は、6% FBS (Moregate Biotech, オーストラリア・クイーンズランド州 Bulimba), 40% Medium 199 (Invitrogen, カリフォルニア州 Carlsbad), 0.8% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (和光純薬工業, 東京), 2.7 mM グルコース, 54% 平衡塩類溶液 (116 mM NaCl, 1.0 mM NaH₂PO₄, 0.8 mM MgSO₄, 1.18 mM KCl, 0.87 mM CaCl₂, 26.2 mM NaHCO₃ 含有) とした。この細胞懸濁液を、正方形パターンの PIAAm 固定培養皿に細胞密度 4.8 x 10⁶ 個/培養皿で播種し、37°C・5% CO₂ の湿潤条件でインキュベートした。緑色蛍光タンパク質 (GFP) 陽性の心筋細胞を得るため、岡部勝氏より提供された GFP 陽性 SD ラット新生仔 (SD TgN (act-EGFP) 0sbCZ-004) から心室を摘出した。

心筋組織グラフトの作製

正方形パターンの温度応答性培養皿を使用し、ラット新生仔心筋細胞を 37°C で 4 日間培養した。コンフルエントに達した細胞を、酵素処理を行うことなく連続した細胞シートとして剥離させるため、20°C に設定した別の CO₂ インキュベータに培養皿を移した。心筋細胞シートは 1 時間以内に自発的に剥離し、細胞骨格の再構成とシート横方向の牽引力のためわずかに収縮して約 1 cm₂ 角の正方形になった。細胞シート全体と培地をピペット先端に静かに吸引して、再度、温度応答性培養皿に移し、折り重なった部分を伸展させるため新鮮な培地をシートに滴下した。シートが伸展した後、培地を吸引し、37°C でインキュベートして細胞シートを培養表面に完全に接着させた。細胞シートを積層するため、PIAAm 固定培養皿から剥離した別の心筋細胞シートを、1 枚目の細胞シートの上に、同様の方法で移して重ねた。同じ手順を繰り返して *in vitro* でさらにシートを積層した。

作製した心筋組織グラフトの移植

雄の F344 ノードラット (4~6 週齢) をペントバルビタールナトリウム (30 mg/kg) の腹腔内注射により麻酔した。背側の皮膚を L 字形に切開し (約 3 cm x 2 cm), 切開部の皮膚を持ち上げて下の組織を露出させた。PIPAAm 固定表面上に積層した心筋細胞シート (1~6 枚, それぞれ n = 4) を、培養温度を下げて剥離させ、Hank 溶液で洗浄した。この細胞構造体を、滅菌したポリプロピレン支持シート (2 x 1.5 cm) に乗せ、ポリプロピレンシートから滑らせて背側皮下組織に移植した。皮膚との癒着を防ぐため、グラフトを 0.5 mm 厚のシリコーン膜 (ユニークメディカル, 東京) でカバーし、7-0 ナイロン糸で閉創した。多段階移植として、3 層のグラフトを 1 日, 2 日, または 3 日間隔で繰返し移植した (2 段階移植: n = 16, 10 段階移植: n = 5)。毎回、シリコーン膜をいったん除去し、移植後に新しいシリコーン膜を入れた。処置後の適切な時期に、上記と同様の方法でラットを麻酔し、生理学的・形態学的解析を行った。その後、ペントバルビタールの過量投与によりラットを安楽死させた。

血管アクセス可能なグラフトの作製と異所移植

雄のF344ヌードラット(7~8週齢)を麻酔し、大腿部の皮膚を切開・開創した。大腿動静脈の分枝である尾側浅腹壁動静脈を露出させた。動静脈が比較的滑らかになっている部分に、背側皮下組織への移植と同様の方法で、3層の心筋組織グラフト2つを1日間隔で移植した(n=13)。2週間後、麻酔とヘパリン投与(400 IU/kg, 静注)を行ったうえでグラフトを大腿動静脈とともに摘出し、大腿部の血管端部を結紮した。摘出したグラフトの血液灌流を調べるため、大腿動脈の切除端から墨汁を注入して、グラフト全体を固定した(n=4)。また、異所移植の可能性を調べるため、摘出したグラフトをただちに低温の乳酸加 Ringer 液に浸漬した(n=4)。別のヌードラット(9~10週齢)を麻酔し、頸部の皮膚を切開してその下の組織を露出させた。総頸動脈と頸静脈を露出させて分枝を分離し、後の出血を防ぐためクランプをかけた。既報のカフ法(30)により、グラフトの動静脈を頸部の動静脈に接続した。簡潔には、大腿動脈と大腿静脈をそれぞれ22ゲージと21ゲージのカフに導入し、外転させて、周囲を6-0絹糸で固定した。このカフ上に頸動脈と頸静脈を静かに滑らせて被せ、周囲を6-0絹糸で固定した。クランプを外し、グラフトの拍動を確認してから切開部を開創した。グラフトの生存を2週間にわたって調べた後、グラフトを固定し、ラットを安楽死させた。

組織学的分析

断面を観察するため、摘出したグラフトをホルマリン固定し、パラフィン包埋して、矢状方向の10 μ m厚切片を作製した。従来法によるアザン染色を行った。各グラフトにつき5枚の断面の顕微鏡像でグラフトの厚さを測定した。

免疫組織化学染色を行うため、パラフィン包埋した切片を、マウス抗コネキシン43モノクローナル抗体(Chemicon International, カリフォルニア州)の1/200希釈液またはマウス抗トロポニンT-心筋型モノクローナル抗体(NeoMarkers, カリフォルニア州 Fremont)の1/200希釈液とともに、4 $^{\circ}$ Cの高湿チャンバ内で1晩インキュベートした。切片をPBSで洗浄し、Alexa Fluor^(R)488標識ヤギ抗マウスIgG抗体(Molecular Probes, オレゴン州 Eugene)の1/200希釈液とともに室温で2時間インキュベートした。最後に、細胞核を染色するためDNA結合色素Hoechst 33342(Sigma)の1/500希釈液で対比染色を行い、共焦点レーザー走査顕微鏡(TCS-SP, Leica Microsystems AG, ドイツ Wetzlar)で観察した。

透過電子顕微鏡観察

摘出した組織を4%パラホルムアルデヒドで1時間前固定し、2%グルタルアルデヒドで1晩固定し、さらに2%四酸化オスmiumで3時間後固定した。これをエタノール系列で脱水し、EPON812に包埋した。超薄切片(80~90 nm)を酢酸ウラニル及びピクエン酸鉛で染色して、透過電子顕微鏡(TEM; JEM2000EX, JEOL, 東京)により85 kVで観察した。

電気生理学的解析

2つ重ねた3層グラフトの電位をグラフトごとに検出するため、2つのグラフトを部分的に重なるように移植した。処置1ヵ月後、移植部位を麻酔下に開創し、各グラフトの非重複部分に2本の微小電極(直径100 μ m, ユニークメディカル)を配置した。電位は生体電気増幅器(UA102, ユニークメディカル)で増幅し、データ取得システム(NR-2000, キーエンス, 大阪)で記録した。電気伝播を解析するため、刺激用の2極電極(TF200-029, ユニークメディカル)を1つのグラフトの端部に配置し、電気刺激装置(UPS-801, ユニークメディカル)で単相のペーシングパルス(2~4 Hz, 5 ms, 2~3 V)を印加した。

ビデオ録画

拍動する心筋組織グラフトの肉眼像をデジタルビデオカメラ(DCR-TRV900, SONY, 東京)で録画した。録画した画像をAdobe Premiere Pro ソフトウェアで編集した。

エコー画像

12 MHz トランスデューサ(PLM-1202S, 東芝)を備えた市販の超音波システム(SSA-550A, 東芝)でエコー像を記録した。グラフトの断面像を麻酔下に取得し、拡張期のグラフトの厚さを測定した。

データ解析

データは平均 \pm SDで表した。統計解析には対応のないStudent t検定を用いた。P < 0.05を有意とした。

結果

積層細胞シートの厚さは一次虚血により制限される

積層細胞シートの厚さの限界を調べるため、PIAAm固定培養皿から回収したラット新生仔心筋細胞シートの積層数を変えて(1~5枚) *in vitro*で積層し、ヌードラットの背側皮下組織に移植した。グラフトがその上の皮膚層に癒着するのを防ぐため、グラフトをシリコーン膜で覆った。したがって、レシピエント組織からの栄養の拡散は下側からのみ起きた。処置1ヵ月後にグラフトを摘出して固定し、生存組織の最終的な厚さを測定した。アザン染色の結果、1, 2, 3層のグラフトは壊死を起こすことなく完全に生存していたが(図1A~C)、4, 5層のグラフトでは一部が異常な脈管と結合組織で置換されており、壊死の発生が示唆された(図1D, E)。

摘出した組織の厚さは、3層グラフトまでは線形に増加していたが、4、5層のグラフトでは飽和していた（それぞれ、厚さ 25 ± 6 , 44 ± 6 , 78 ± 14 , 80 ± 16 , $82 \pm 5 \mu\text{m}$ ）（図 1F）。したがって、*in vivo* の皮下組織に移植した積層心筋細胞シートの厚さの限界は約 $80 \mu\text{m}$ であると考えられる。

厚さの制限は多段階手術により克服できる

シートグラフトの生存の過程を観察する中で、グラフト内の血管形成が移植直後に始まり、よく組織された血管網が *in vivo* において数日以内に形成されることが見出された（データは示していない）。そこで、先に移植したグラフト内で血管新生が十分生じるよう間隔を空けて、積層細胞シートを繰返し移植することで、細胞シート組織の厚さの制限を克服できるのではないかと考えた（図 2）。この仮説を検証するため、3層の心筋細胞シートグラフトを繰返し移植する実験を行った。この3層グラフトは、上記のように、主として栄養の拡散のみによって生存したものである。このような3層グラフトを、1日、2日、または3日間隔でラットの背側皮下組織内に2つ重ねた。心筋組織を置換できる、自発拍動性・同期性・厚さを備えた組織を構築するには、十分な血管新生と併せて、2つの3層グラフトの間に十分な電氣的連絡が確立されることが不可欠である。そこで、電気生理学的解析と形態学的解析も行った。

2つの3層グラフト間の電氣的連絡を調べるため、2つ目のグラフトを1つ目のグラフトに部分的に重ね、*in vivo* で電極を各グラフトに配置して、各グラフトの電位を別々に測定した（図 3A）。2つ目の3層細胞シートの移植から1ヵ月後に観察したところ、1日または2日間隔で移植したケースでは、2つのグラフトは皮下で自発拍動し、完全な同期も生じていた（図 3B, C）。しかし、3日間隔で移植したケースでは、2つのグラフトは電氣的に分断していた（図 3D）。電機伝播の解析でも、1日間隔でグラフトを重ねたケースでは、一方のグラフトの端部に与えた刺激が他方のグラフトに伝播された（図 3E, F）。同様の電気伝播は2日間隔のケースでも観察されたが、3日間隔のケースでは伝播が観察されなかった（データは示していない）。2つ重ねた各グラフトの拍動を別々に直接検出するため、1つ目の3層グラフトを GFP 発現ラットの新生仔心筋細胞で作製し、1日後に GFP 陰性のグラフトを重ねるという組織マーキングシステムを用いて実験を行った。通常の照明下では2つのグラフトを識別できなかったが、蛍光照明と通常の照明を同時に用いると、GFP 陽性グラフトと非蛍光性グラフトの同期拍動が観察された（捕捉データの Video 1 を参照）。

移植1ヵ月後にグラフトの組織学的検討も行った。対照として6層グラフトを単回移植した群では、アザン染色でグラフト内に著明な壊死組織を認めた（図 4A）。これに対して、3層グラフトを1日間隔で2回移植した群では、微小血管網がよく組織され、組織全体が生存していた。これらのケースでは、2つのグラフトが密接に連絡して、均質で細胞密度の高い厚い組織が形成されており（図 4B）、電気生理学的特性もこの所見と一致していた。1日間隔の移植で作製したこの成育可能な組織は、単回移植で作製した組織と比較して有意に厚かった（ 171 ± 15 vs. $82 \pm 5 \mu\text{m}$, $P < 0.05$, $n = 4$ ）。2日間隔で移植した場合は、進入してきた結合組織によって2つのグラフトのかなりの部分が分離されていたが、一部の領域では直接接触が保たれていた（図 4C）。しかし、3日間隔で移植した場合は、進入してきた厚い結合組織によって2つのグラフトが完全に分離されていた（図 4D）。

多段階移植により厚さ約 1 mm の拍動性心筋組織グラフトが得られる

以上の電気生理学的解析及び形態学的解析の結果から、我々の仮説が確認され、心筋組織グラフトをさらに重層化する研究を行う価値があると考えられた。そこで次に、3層細胞シートグラフトを1日または2日間隔で最大10回移植する実験を行った。10回移植を行ったケースでは、グラフトの自発的・同期的な収縮／拡張サイクルを移植部位の体外から肉眼で観察しえた（捕捉データの Video 2 を参照）。心エコーでも拍動性的心筋組織が確認でき（捕捉データの Video 2 を参照）、最後の細胞シート移植から1週間後に測定した組織の厚さは $0.9 \pm 0.1 \text{ mm}$ であった（ $n = 3$ ）。移植部位を外科的に開創したところ、心筋様の活発な拍動が観察され（捕捉データの Video 2 を参照）、この拍動はグラフトを外科的に摘出した後も数分間持続した（捕捉データの Video 3 を参照）。10段階移植により作製したグラフトのアザン染色では、多層で厚く細胞密度の高い心筋と、組織全体にわたりよく組織された微小血管が観察された（図 5）。固定した断面で測定した組織の厚さは $0.84 \pm 0.16 \text{ mm}$ （ $n = 3$ ）であった。これらの所見から、細胞シートを統合する本研究の方法を用いれば、拡散の制限により厚さが制限されるこれまでの手法をはるかに上回る、成育可能かつ機能的な心筋組織グラフトを作製できることが示された。また、電気生理学的特性や組織全体の挙動も完全に維持されることから、この方法は、細胞密度の高い組織の作製でハードルとなっていた血管形成の問題を克服できる新しい技術となる可能性をもっている。

レシピエント血管上への移植により、外科的にアクセスできるグラフトが実現する

心臓を含む多くの内臓では、移植手技1回ごとに比較的高い合併症リスクが伴うため、臨床においては、作製した組織を直接多段階移植しようとするのが困難が生じると考えられる。直接移植する代わりに、成育可能な厚い組織を異所で作製し、これを標的臓器に移植することで合併症リスクを軽減できる可能性がある。上記の実験では、厚く細胞密度の高い組織を皮下で作製でき、必要な血管も、周囲のレシピエント組織に由来すると思われる血管形成により良好に生じた。しかし、レシピエントの微小血管を外科的に切断し、標的組織中の血管へと異所的に接続することは技術的に不可能である。したがって、異所で作製したグラフトは、外科的にアクセス可能でかつ耐久性のある、動静脈への導管を有している必要がある。この課題を克服するため、レシピエントの大きな動静脈上に積層細胞シートを繰返し移植すれば、グラフト全体にわたる血液灌流が確保され、

したがってレシピエントによるグラフト内への血管形成が誘発され、外科的にアクセスできる血管を有するグラフトが得られるのではないかと考えた（図 6）。この仮説を小動物モデルで検証するため、レシピエント血管の候補として大腿動静脈を選択した。ヌードラットの大腿部を切開して、大腿動静脈の分枝である尾側浅腹壁動静脈を露出させ、この上に 3 層心筋細胞シートを 1 日間隔で繰返し移植した。処置 2 週間後に移植部位を開創したところ、グラフトはこれらの血管上で強く同期拍動していた（捕捉データの Video 4 を参照）。このレシピエント動静脈によるグラフトの血液灌流を調べるため、グラフトを大腿動静脈とともに摘出し、大腿動脈の端部から墨汁を注入した。観察の結果、墨汁は大腿動脈から尾側浅腹壁動脈に流入し、グラフト内へと拡散した（捕捉データの Video 4 を参照）。この墨汁は、最終的に尾側浅腹壁静脈と大腿静脈から排出された。墨汁を灌流させた心筋組織グラフトの断面の観察では、グラフト内の血管網全体が墨汁で染色されていた（図 7A, B）。このことは、血管形成がレシピエントから誘発されたこと、及び、血液が確かにこの動脈から供給されていることを示しており、我々の第 2 の仮説が確認された。

2 段階移植した心筋組織グラフトの免疫組織化学分析では、厚いグラフト中に散在するコネキシン 43 を認め、ギャップ結合の存在が示唆された（図 7C）。グラフト中の心筋細胞間に電気的連絡が観察されたのはこのギャップ結合によるものと考えられる。抗トロポニン T 抗体による染色では、移植 3 日後にはびまん性かつ不規則な染色を認めたが、7 日後にはサルコメアが発達し、よく組織化されていた（図 7D, E）。また、透過電子顕微鏡観察でも、筋フィラメントや介在板など、正常心筋に特徴的な構造を認めた（図 7F）。

外科的にアクセス可能なグラフトは異所移植後も生存する

作製した組織の異所移植の可能性についても検討した。ヌードラットの大腿部から、上記と同様の多層グラフトを、接続可能なレシピエント動静脈とともに摘出し、これを別のヌードラットの頸部に移植した。そして、グラフトから突出する大腿動静脈を、新しいレシピエントの頸動静脈にそれぞれ接続した。血液灌流を再開させると、グラフトは数秒後に自発拍動を始めた（捕捉データの Video 4 を参照）。これらのグラフトは処置 2 週間後も生存して特徴的な拍動を維持しており、異所的に作製した組織を移植するという臨床応用の可能性が示唆された。

考察

これまでの研究でも、組織工学的に作製し移植した心筋グラフトが生存したと報告されているものの（13, 31）、受動的拡散の制限があるため、成育可能な厚い組織の作製は困難となっている。我々の細胞シート工学でも、4 層の心筋グラフトで細胞密度の高い拍動性組織を作製できたものの、グラフト中心部で生じる虚血のため、有効に積層できる細胞シートの数には限界がある（28）。

本研究では、細胞シートを多段階移植するという方法で、細胞密度が高く十分厚みのある組織を作製することができた。コンフルエントな細胞シートを直接重ねて作製した 3 層の心筋グラフトを、やはり直接重ねることによって、細胞密度が高く、厚みがあり、生存可能な組織が得られた。このタンデム細胞シート移植を 2 日未満の間隔で行うことにより、2 つのグラフト間の電気的・形態学的連絡が迅速かつ完全に確立された。統合した心筋細胞シート間に直接細胞間連絡が確立されるため、電気的同期が可能となり、作製した心筋組織に自発的な同期拍動が生じた。一方、3 日間隔で移植したケースでは最初のグラフト上に被包組織が形成されており、これがグラフト間の導電を阻害したと考えられる。このケースでは、電気生理学的分析でも電気的な分断が確認された。

組織をスケールアップして用途を拡大する可能性に関しては、血管形成という固有の問題を克服するため、多くの課題が残されている。大きな問題の 1 つは、細胞密度の高いグラフト内にどのようにして微小血管網を作成するかということである。微小血管をもたない、細胞密度の高い組織を移植しようとする、ガス（酸素や二酸化炭素など）、液体、溶解代謝物などの物質輸送の限界があるため、生存できる組織の厚さが制限される。このため、栄養の拡散が十分でない移植組織の内部では、必要な血管網が形成されるよりはるかに前に細胞が壊死してしまう。成長因子の投与、遺伝子導入、血管始原細胞との共培養などにより血管の成長を促進し、厚い組織の作製をある程度は実現できる可能性がある。しかし現在のところ、このような方法では、低酸素や壊死を防げるほど十分な血液灌流を、厚く細胞密度の高いグラフトに迅速にもたらすことはできない。別のアプローチとして、*in vitro* で予め血管網を構築しておいて組織を作製する方法も研究されているが（32, 33）、選択した細胞種を三次元で培養する技術を確立するにはさらに研究が必要である。また、工学的に作製した血管が、真に効率的かつ有効なネットワークとして組織の生存を維持できるかという疑問があり、これも明らかにする必要がある。*In vivo* での発達段階を考えると、微小血管網は周囲の組織の成長に付随して形成される。したがって、細胞密度の高い組織を作製するには、組織とその血管網とを同時に構築することが不可欠である可能性もある。この点に関して、細胞シートの統合を基礎とした多段階手術という本研究のアプローチは、適切な血管網の構築を伴いつつ物質輸送の制限を受けずに生存可能な厚い組織を作製するうえで、実現可能性が高いと考えられる。

大多数の組織工学グラフトは直接的な血管網や吻合をもたず、したがって、移植直後は周囲のレシピエント組織からの受動的な灌流／拡散による栄養供給に依存せざるを得ず、長期的には、レシピエントから多数の微小血管が侵入して血管が形成される必要がある。しかし本研究では、レシピエントの移植部位の動静脈を利用して外科的にアクセス・接続可能な血管を構築し、この血管から灌流を行うことで、成育可能な厚い組織を作製しえた。このアプローチにより、異所的に作製した細胞密度の高い組織を血管の直接吻合によって移植することが始めて可能になった。この *in vivo* 組織工学法は、今回示した心筋モデルに限らず多数の組織に広く応

用可能であり、したがって組織工学にさらなる発展をもたらすものと思われる。そして将来的には、心筋を含むさまざまな組織の修復に貢献することが期待される。

結論として、積層培養細胞シートの多段階移植により、ラット背側皮下組織において厚く細胞密度の高い機能的な心筋を作製できることが示された。これは、移植直後の血管の不足により頻繁に生じる問題である。物質輸送の限界を克服するものである。また、既存の血管を利用して移植組織内の血管網形成を誘導する技術から、異所的に作製した細胞シートを血管吻合により移植するという臨床的な可能性が示された。細胞シートの統合を基礎とするこれらの新しい戦略は非常に広い可能性を有しており、組織工学の分野を大きく進歩させるものと期待される。

謝辞

David W. Grainger 氏 (Colorado 州立大学) のコメントと技術的批評に感謝します。また、GFP トランスジェニックラットをご提供くださった岡部勝氏 (大阪大学・遺伝情報実験センター) にも感謝します。本研究は、文部科学省の「21 世紀 COE プログラム」、 「ハイテクリサーチセンター整備事業」; 厚生労働省の「循環器病研究委託費」, 「再生医療等研究事業」; 財団法人・日本心臓血圧研究振興会の公募研究助成による助成を受けた。

参考文献

1. Langer, R., and Vacanti, J. P. (1993) Tissue engineering. *Science* **260**, 920-926
2. Gao, Y., Vacanti, J. P., Paige, K. T., Upton, J., and Vacanti, C. A. (1997) Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast. Reconstr. Surg.* **100**, 297-302 (discussion 303-294)
3. Koh, C. J., and Atala, A. (2004) Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1113-1125
4. Kulig, K. M., and Vacanti, J. P. (2004) Hepatic tissue engineering. *Transpl. Immunol.* **12**, 303-310
5. Nugent, H. M., and Edelman, E. R. (2003) Tissue engineering therapy for cardiovascular disease. *Circ. Res.* **92**, 1068-1078
6. Shin, H., Jo, S., and Mikos, A. G. (2003) Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 4353-4364
7. Stock, U. A., and Vacanti, J. P. (2001) Tissue engineering: current state and prospects. *Annu. Rev. Med.* **52**, 443-451
8. Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331**, 889-895
9. Kirsner, R. S., Falanga, V., and Eaglstein, W. H. (1998) The development of bioengineered skin. *Trends Biotechnol.* **16**, 246-249
10. Shin'oka, T., Imai, Y., and Ikada, Y. (2001) Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N. Engl. J. Med.* **344**, 532-533
11. Leor, J., Aboulaflia-Etzion, S., Dar, A., Shapiro, L., Barbash, I. M., Battler, A., Granot, Y., and Cohen, S. (2000) Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* **102**, 11156-11161
12. Papadaki, M., Bursac, N., Langer, R., Merok, J., Vunjak-Novakovic, G., and Freed, L. E. (2001) Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280**, H168-H178
13. Sakai, T., Li, R. K., Weisel, R. D., Mickley, D. A., Kim, E. T., Jia, Z. Q., and Yau, T. M. (2001) The fate of a tissue-engineered cardiac graft in the right ventricular outflow tract of the rat. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **121**, 932-942
14. Zandonella, C. (2003) Tissue engineering: The beat goes on. *Nature* **421**, 884-886
15. Zimmermann, W. H., Schneiderbanger, K., Schubert, P., Didie, M., Munzel, F., Heubach, J. F., Kostin, S., Neuhuber, W. L., and Eschenhagen, T. (2002) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ. Res.* **90**, 223-230
16. Okano, T., Yamada, N., Sakai, H., and Sakurai, Y. (1993) A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J. Biomed. Mater. Res.* **27**, 1243-1251
17. Yamada, N., Okano, T., Sakai, H., Karikusa, F., Sawasaki, Y., and Sakurai, Y. (1990) Thermo-responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **11**, 571-576
18. Kushida, A., Yamato, M., Konno, C., Kikuchi, A., Sakurai, Y., and Okano, T. (1999) Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **45**, 355-362
19. Kushida, A., Yamato, M., Konno, C., Kikuchi, A., Sakurai, Y., and Okano, T. (2000) Temperature-responsive culture dishes allow nonenzymatic harvest of differentiated Madin-Darby

- canine kidney (MDCK) cell sheets. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**, 216-223
20. Harimoto, M., Yamato, M., Hirose, M., Takahashi, C., Isoi, Y., Kikuchi, A., and Okano, T. (2002) Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes. *J. Biomed. Mater. Res.* **62**, 464-470
 21. Kushida, A., Yamato, M., Kikuchi, A., and Okano, T. (2001) Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **54**, 37-46
 22. Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Maeda, N., Watanabe, H., Yamamoto, K., Nagai, S., Kikuchi, A., Tano, Y., et al. (2004) Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* **77**, 379-385
 23. Shimizu, T., Yamato, M., Akutsu, T., Shibata, T., Isoi, Y., Kikuchi, A., Umezu, M., and Okano, T. (2002) Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 110-117
 24. Shiroyanagi, Y., Yamato, M., Yamazaki, Y., Toma, H., and Okano, T. (2004) Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps. *BJU Int.* **93**, 1069-1075
 25. Yamato, M., Konno, C., Utsumi, M., Kikuchi, A., and Okano, T. (2002) Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture. *Biomaterials* **23**, 561-567
 26. Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Nagai, S., Kikuchi, A., Maeda, N., Watanabe, H., et al. (2004) Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1187-1196
 27. Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., and Okano, T. (2003) Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* **24**, 2309-2316
 28. Shimizu, T., Yamato, M., Isoi, Y., Akutsu, T., Setomaru, T., Abe, K., Kikuchi, A., Umezu, M., and Okano, T. (2002) Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ. Res.* **90**, e40-e48
 29. Hirose, M., Kwon, O. H., Yamato, M., Kikuchi, A., and Okano, T. (2000) Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface. *Biomacromolecules* **1**, 377-381
 30. Xiu, D., Uchida, H., To, H., Sugimoto, K., Kasahara, K., Nagai, H., Fujimura, A., and Kobayashi, E. (2001) Simplified method of heterotopic rat heart transplantation using the cuff technique: application to sublethal dose protocol of methotrexate on allograft survival. *Microsurgery* **21**, 16-21
 31. Zimmermann, W. H., Didie, M., Wasmeier, G. H., Nixdorff, U., Hess, A., Melnychenko, I., Boy, O., Neuhuber, W. L., Weyand, M., and Eschenhagen, T. (2002) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* **106**, Suppl. 1, I151-I157
 32. Kaihara, S., Borenstein, J., Koka, R., Lalan, S., Ochoa, E. R., Ravens, M., Pien, H., Cunningham, B., and Vacanti, J. P. (2000) Silicon micromachining to tissue engineer branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Eng.* **6**, 105-117
 33. Neumann, T., Nicholson, B. S., and Sanders, J. E. (2003) Tissue engineering of perfused microvessels. *Microvasc. Res.* **66**, 59-67

図 1. 急性虚血による移植組織の物質輸送の制限。枚数の異なる (1~5 枚) 心筋細胞シートを皮下組織に移植し、4 週間後に固定・アザン染色した。1 層 (A)、2 層 (B)、3 層 (C) のグラフトには層状の成育可能な心筋組織を認める。4 層 (D) と 5 層 (E) のグラフトには、異常な血管網 (黒矢印) と結合組織を伴う壊死部分を認める。両方向の矢印は成育可能な細胞シート層を示す。橙に染色された赤血球は血管の存在を示す。(F) 移植したグラフトの最終的な厚さを示したグラフである。厚さは、3 層グラフトまでは線形に増加したが、4、5 層のグラフトではプラトーに達した (それぞれ、厚さ 25 ± 6 , 44 ± 6 , 78 ± 14 , 80 ± 16 , $82 \pm 5 \mu\text{m}$)。データは平均 \pm SD ($n = 4$)。

Thickness (μm):	厚さ (μm)
Cell sheet number:	細胞シート数

図 2. 血管を有する細胞密度の高い組織を作製するための多段階手術の概要。(A, B) コンフルエントな細胞シートを 3 枚重ねて最初のグラフトを作製し、in vivo 移植する。(C) 当初、グラフトは栄養の拡散のみによって生存するが、数日以内にグラフト内に微小血管網が発達する。(D, E) その後、2 つ目の 3 層グラフトを 1

つ目のグラフトに重ねる。(F) こうして得られる細胞密度の高い多層グラフトは微小血管による灌流を受ける。

図 3. 積層した心筋組織グラフト間の電気生理学的連絡。(A) 電気的分析の様子を示した図。ラット背側皮下組織中で、3 層グラフト 2 つを、1 日、2 日、または 3 日の間隔を空けて部分的に重ねた。この処置から 1 ヶ月後、移植部位を開創し、in vivo で露出したグラフトの単層部分に 2 本の電極 (x 及び y) を配置した。(B~D) 検出された代表的な電位記録。移植間隔が 1 日 (B) 及び 2 日 (C) のケースでは 2 つのグラフトの自発拍動が完全に同期していたが、移植間隔が 3 日 (D) のケースでは同期がみられなかった。(E) 一方のグラフトの端に刺激用の 2 極電極を配置し、単相のペーシングパルス (2~4 Hz, 5 ms, 2~3 V) を印加してグラフト間の電気的連絡を調べた。2 本の電極 (x 及び y) を各グラフトの単層部分に配置して誘発電位を検出した。(F) 積層した心筋組織グラフト (移植間隔 1 日のもの) に印加した電気刺激は、一方のグラフト (x) からもう一方 (y) へと伝播された。「S」は刺激を、矢印は誘発電位を示す。

図 4. 積層した心筋組織グラフト間の形態学的連絡。さまざまな 6 層グラフトのアザン染色像を比較した。(A) 単回移植で作製したグラフト。著明な壊死組織を認める。正常組織の大部分が、血管を有する組織で置換されている。(B) 1 日間隔のタンデム移植で作製したグラフト。2 つのグラフトが密着しており、微小血管網を伴う完全な厚さの組織が生存している。(C) 2 日間隔のタンデム移植で作製したグラフト。2 つのグラフトは結合組織によりやや隔てられている。(D) 3 日間隔のタンデム移植で作製したグラフト。2 つのグラフトが完全に分離している。

図 5. 1 日間隔・10 回の多段階移植で作製した、細胞密度の高い厚い組織のアザン染色像。よく組織された微小血管を有する、細胞密度の高い多層の心筋が形成されている。両方向の矢印は成育可能な心筋細胞シートの層を示す。グラフト厚の測定結果は 0.84 ± 0.16 mm であった。データは平均 \pm SD (n = 3)。

図 6. 外科的に接続可能な血管を有する多層グラフトの作製方法の概念を示す。(A) 外科的にアクセス可能な動静脈上に 1 つ目のグラフトを移植する。(B) この場合、グラフトは、新生血管と既存の血管の両方から供給を受ける。(C, D) 血管が十分に形成されたら、1 つ目のグラフトの上に 2 つ目のグラフトを移植する。(E, F) 微小血管網を有するグラフトは、移植可能な血管を介してレシピエントの灌流を受ける。このグラフトと血管を外科的に切除すると、異所移植が可能である。

図 7. 外科的にアクセス可能な血管の上で作成した心筋組織グラフト。(A) アザン染色像。尾側腹壁動脈 (a) 及び同静脈 (v) の上で多段階移植により多層心筋組織グラフト (g) を作製し、2 週間後に固定したもの。レシピエントの大腿動脈から墨汁を注入すると、グラフトの内部及び周囲の血管が染色された。(B) A の四角形部分の強拡大像。グラフト内に微小血管網が十分発達しており (墨汁で染色された部分)、選択した動脈からの血液供給が確立したことが示唆される。(C) コネキシン 43 の免疫組織化学染色像。組織全体に染色部位が散在し、グラフト内にギャップ結合が生じたことが示唆される。(D) 抗トロポニン T 抗体による染色像、移植 3 日後。染色はびまん性かつ不規則である。(E) 同、移植 7 日後。心筋細胞が染色され、サルコメアもよく組織化されている。(F) 移植 7 日後の TEM 像。よく組織化された筋フィラメント (Mf)、ミトコンドリア (Mt)、介在板 (ICD) など、心筋に特徴的な構造を認める。

文献資料 6

Cardiovascular Research 69 (2006) 466-475

拡張型心筋症ハムスターへのシート状筋芽細胞移植による心機能温存期間の延長

Haruhiko Kondoh^a, Yoshiki Sawa^{a,*}, Shigeru Miyagawa^a, Satoru Sakakida-Kitagawa^b, Imran A. Memon^a, Naomasa Kawaguchi^c, Nariaki Matsuura^c, Tatsuya Shimizu^d, Teruo Okano^d, Hikaru Matsuda^a

^a Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Division of Cardiovascular Surgery, Department of Pathology, Molecular Pharmacology, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan

^c Division of Cardiovascular Surgery, School of Allied Health Science, Faculty of Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Japan

^d Tokyo Women's Medical University, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo, Japan

抄録

目的: 細胞療法は虚血性心筋症に対する治療戦略として有望であるが、直接注入法は細胞を広範に送達するには制限があり、特に拡張型心筋症 (DCM) においてはこれが問題となる。我々は、DCM の心機能改善において、シート状筋芽細胞グラフトが直接注入法より優れているという仮説を立てた。

方法: 中等度の心筋リモデリングがみられる 27 週齢の雄 B10 T0-2 (DCM) ハムスターをレシピエントとして用いた。B10 F1B ハムスターから単離した筋芽細胞を、温度応答性ポリマーであるポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) でコーティングした培養皿で培養し、酵素処理を行うことなく温度を 20°C にしてシート状のグラフトを自然に剥離させた。治療法として、(1) シート状筋芽細胞グラフトの移植 (S 群, n = 29), (2) 筋芽細胞の注入 (M 群, n = 28), (3) 擬似手術 (C 群, n = 28) の 3 種類を行った。S 群では左室 (LV) にシート状筋芽細胞グラフトを 2 枚移植した。M 群では右室 (RV) 及び左室の心壁に筋芽細胞を注入した。

結果: シート状筋芽細胞グラフト移植後の心エコーでは、拡張していた LV のサイズの有意な縮小を認めたが、他の 2 群では LV 拡張が進行していた。M 群及び C 群では左室内径短縮率が有意に低下したが、S 群では術後 3 カ月にわたって術前と同レベルに維持された。組織学的検討では、S 群に LV 壁厚の増加と筋芽細胞の生存を認め、心筋線維形成が他の 2 群と比較して軽減していた。免疫組織化学染色では、S 群の心筋細胞の基底膜に α -サルコグリカンと β -サルコグリカンの発現を認めたが、他の 2 群にはこれを認めなかった。S 群では期待寿命が有意に延長した。

結論: DCM ハムスターでは、シート状筋芽細胞グラフトの移植により、心筋線維形成の軽減と細胞骨格タンパク質の再構成に伴って心機能が改善し、期待寿命が延長した。したがって、シート状自家筋芽細胞グラフトの移植は DCM の心臓再建につながる可能性がある。

キーワード: 心筋症, 筋芽細胞, シート

1. はじめに

拡張型心筋症 (DCM) は慢性心不全の原因として特に多いものの 1 つである [1]。近年の治療法により心不全の予後は劇的に向上しており、かなりの数の患者が、左室再形成手術、植込み型除細動器、心臓再同期など積極的な治療法の候補者となったまま待機している [2]。しかし死亡率は依然として高く、こうした患者を支える最終的な救命手段として、心臓移植や、左室補助装置 (LVAD) を用いた機械的サポートが受け容れられている [3-5]。残念ながら、心臓移植にはドナー不足、拒絶、感染などの制限があり、LVAD も耐久性のため有用性が限られ [5]、このため、現在でも新しい戦略が求められている。

DCM は、病理学的には広範な心筋リモデリングを特徴とする。この心筋リモデリングは、主として、心筋細胞の細胞骨格タンパク質及び筋細胞膜タンパク質の変化に伴う心筋線維形成によって生じ、このため心筋細胞の減少と機能低下をきたす [6]。その結果、心筋リモデリングは心室の拡張と菲薄化を伴って慢性的に進行し、進行性の鬱血性心不全につながる。

近年、虚血性心筋症の治療法として筋芽細胞移植が研究されており、動物モデルではこの手技の機能的な利点が示されている [7, 8]。また、自家筋芽細胞移植の臨床試験も始まっている [9]。しかし DCM については、筋芽細胞移植の効果に関する報告はわずかしかなく、左室の機能的な利点は低いと示唆されている [10-12]。

非虚血性心筋症の治療については、筋芽細胞の送達方法として、冠動脈内注入法と心筋直接注入法という 2 つの方法が報告されている [10, 11]、いずれも臨床応用するにはいくつかの制限がある。冠動脈内注入法では、冠動脈塞栓のリスクがあるため、注入できる筋芽細胞の数が限られる [10]。心筋直接注入法では、広範に拡張をきたした心筋に対して均一に筋芽細胞を送達するため、心室の多数の箇所注入を行う必要がある。事実、B10 14.7 DCM ハムスターのモデルを用いた研究では、心室の 6 箇所に注射針で筋芽細胞移植を行っても心筋線維形成が軽減しなかったと報告されている [12]。また、移植細胞の接着、移動、増殖、分化、及び細胞

死には微小細胞間連絡と細胞外マトリックスが重要な役割を果たすが、いずれの送達方法でもこれらの損傷を避けられない[13].

組織工学を利用した細胞送達を行うことでこれらの欠点を克服できる可能性がある。組織工学に使用される足場で心筋再生を支持することも考えられるが、炎症反応や表面接着分子の損失など、生体適合性、生分解性、細胞毒性上の問題があり、このため有効性が制限される可能性がある[14, 15]。我々は、こうした障害を解消し、足場を用いない細胞シートの作製方法を確立した[16, 17]。この細胞シートは、細胞間連絡結合、内因性細胞外マトリックス (ECM)、統合的な接着物質を保持している。このシート状新生仔心筋細胞グラフトを梗塞心筋に非結紮的に移植すると、グラフトが損傷心筋と一体化し心機能が改善した[18]。

我々は、このエビデンスを踏まえ、シート状筋芽細胞グラフトの移植は直接注入法による筋芽細胞の移植と比較して DCM の心機能を良好に温存できるという仮説を立てた。本研究では、DCM のハムスターモデルを使用し、シート状筋芽細胞グラフトの移植が、具体的に 1) 心機能の温存、2) 心筋リモデリング範囲の縮小、3) 期待寿命の延長をもたらすかを調べた。

2. 方法

2.1. 実験動物

27 週齢の雄 B10 T0-2 ハムスター (Bio Breeders, マサチューセッツ州 Fitchburg) を使用した。動物の扱いは National Society for Medical Research の「Principles of Laboratory Animal Care」及び米国立衛生研究所の「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」(NIH Publication No. 85-23, 1996 年改訂) に準拠した。動物を無作為に 3 群に分け、それぞれ、シート状筋芽細胞グラフトの移植 (S 群, $n=29$)、筋芽細胞の注入 (M 群, $n=28$)、開胸術のみ (C 群, $n=28$) を行った。各群合計 13 匹について、術後 1, 2, 8 週に組織学的分析を行った。各時点で安楽死させた個体数を図の説明に示した。残りの個体 (S 群 $n=16$, M 群 $n=15$, C 群 $n=15$) は心機能及び死亡率の評価に使用した。

2.2. 骨格筋芽細胞の単離

B10 F1B ハムスターの下肢両側の骨格筋から筋芽細胞を単離した。動物を安楽死させ、骨格筋を摘出して PBS (NaCl, 136.9 mmol/L; KCl, 2.7 mmol/L; Na_2HPO_4 , 8.1 mmol/L; KH_2PO_4 , 1.5 mmol/L; pH 7.3) で洗浄した。線維組織、腱、脂肪組織をできる限り除去した後、筋肉を細切して計量し、コラゲナーゼ (Gibco BRL, メリランド州 Rockville) (5 mg/mL) で 40 分間酵素処理した。遠心分離 (1200x g, 10 分間) により細胞を回収し、20% FBS (ICN Biomedicals, オハイオ州 Aurora) を添加して酵素反応を停止させたうえで、再度遠心分離した。上清を除去し、20% FBS と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco BRL) を添加した DMEM (Gibco BRL) 培地に細胞を再懸濁した。この細胞を、まず 100 mm コラーゲンコーティング培養皿 (イワキガラス, 日本) に播種し、5% CO_2 ・高湿度の条件で培養した。翌日、細胞を洗浄し、培地を交換した。5 日後、コンフルエントに達する前に、トリプシン処理で細胞を回収し、DMEM で洗浄した。この培養物にはデスミン陽性細胞が約 50% 含まれていた (図 1A)。細胞数をカウントし、直接注入法により、またはシート状筋芽細胞グラフトとして、DCM 心臓に用いた。

シート状筋芽細胞グラフトの作製には温度応答性培養皿 (セルシード [東京] より提供) を使用した。この「インテリジェント」培養皿の具体的な作製方法は既報のとおりである[17]。簡潔には、市販の組織培養用ポリスチレン培養皿に、N-イソプロピルアクリルアミド (IPAAm) モノマー溶液を塗布する。この培養皿に電子線を照射すると、IPAAm が重合し培養皿表面に共有結合する。この培養皿の表面は、37°C では疎水性であり細胞接着性を示すが、32°C 以下では親水性となり、細胞接着性を失う。この温度応答性培養皿に細胞懸濁液 (細胞密度 5×10^6) を播種し、37°C のインキュベーター内に 1 日間放置した。1 日後、培養皿を 20°C で 1 時間放置することにより細胞を自発的に剥離させ、グラフトとして使用できる、足場のないシート状の単層筋芽細胞を得た。この筋芽細胞グラフトの面積は $1.00 \pm 0.05 \text{ cm}^2$ 、厚さは $60 \pm 10 \mu\text{m}$ であった (図 1B, C)。このグラフトを 2 枚重ねて厚みを増し、移植に使用した。

2.3. 手術手順

ペントバルビタール (50 mg/kg) の腹腔内注射によりハムスターを麻酔し、挿管して、ベンチレータ (モデル SN-480-7, シナノ製作所, 東京) で陽圧換気を維持した。呼吸数は 50 回/分、1 回換気量は大気 2.0 mL とした。2.5 cm の左側開胸により心臓を露出させた。M 群では、細胞懸濁液約 0.2 mL (培養細胞 10×10^6 個を含む) を 30G ツベルクリンシリンジで右室壁の 1 箇所と左室壁の 3 箇所 (前側自由壁, 心尖, 後壁) に注入した。S 群では、シート状筋芽細胞グラフトを前側自由壁と後側自由壁に無縫合で直接移植することにより、同数の細胞を送達した。C 群では左側開胸のみを行った。

2.4. ハムスターの心機能の測定

イソフルランで麻酔して心エコー測定を行った。血液動態を安定させるため、麻酔薬の濃度を 1% まで低下させ、この状態を 20 分間維持した。心エコーには市販の心エコー装置 SONOS 5500 (Agilent Technologies, 米国) を使用した。12 MHz の環状アレイトランスデューサを用いた。M モードの心エコー図を記録し、左室収縮終期径 (Ds), 左室拡張終期径 (Dd), 左室内径短縮率 (Fs) を計算した。心エコー読影者は、試験群を知らされない状態で読影を行った。

2.5. 組織学的分析

術後1, 2, 8週に左室の心筋標本を取得した。心臓の横断切片(厚さ $2\mu\text{m}$)を10%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色及びMasson三色染色を行った。血管内皮細胞を標識するため、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗第VIII因子関連抗原(EPOS抗ヒト von Willebrand 因子/HRP, DAKO, カリフォルニア州 Carpinteria)による免疫組織化学染色を行った。染色手順は製造業者の指示に従った。ジアミノベンジジン/過酸化水素でシグナルを可視化した。切片は凍結切片(厚さ $4\mu\text{m}$)を使用した。また、以下のタンパク質について3段階染色を行った[15]。一次抗体として、抗骨格筋ミオシン(速筋型)、抗 α -サルコグリカン、抗 β -サルコグリカン(それぞれ、クローンMY-32 [Sigma, ミズーリ州 Saint Louis], Ad1/20A6, bSarc/5B1 [Novo Castra, イギリス])を使用した。二次抗体としてビオチン標識ウサギ抗マウス抗体(K0675, DAKO)を使用し、続いて、イソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)共役ストレプトアビジン(F0422, DAKO)で染色した。共焦点顕微鏡ECLIPSE TE 2000-U (Nikon, 日本)で各タンパク質を観察した。

各標本につき5枚以上の切片を作製し、各染色切片を2名の病理医が独立かつ盲検的に評価した。Masson三色染色した切片を、Windows MetaMorph ソフトウェア(Universal Imaging Corporation, ペンシルベニア州 Downingtown)で測面法を用いて画像解析し、線維形成部分の面積のパーセンテージを計算した。図4の免疫組織化学像はこれと同条件で撮影したものである。緑色の輝度がその最大輝度の半分以上である部分の面積パーセンテージを、同じ測面法により計算した。計算結果を、F1Bハムスターの値に対するパーセンテージとして表した。1切片につき10箇所以上の弱拡大視野を同ソフトウェアにより解析した。

2.6. 術後経過の評価

T0-2ハムスターに対するシート状筋芽細胞グラフト移植の救命効果を、細胞注入法及び偽手術との比較により評価した。動物を無作為に各治療群に割り付け、術後60日間飼育した。M, C, S各群の生存率を、SPSS Ver. 11.0 (SPSS Inc, イリノイ州 Chicago)を用いてKaplan-Meier法により計算し、60週時点の各群間の有意差をログランク解析により検定した。

2.7. 統計解析

値はすべて平均 \pm S.E.M.で表し、StatView 5.0プログラム(Abacus Concepts, カリフォルニア州 Berkeley)で複数段階の分散分析(ANOVA)を行った。まず、心エコーデータを二元配置反復測定ANOVAで解析して全経過時間にわたる差異を分析し、Tukey-Kramer post-hoc検定による一元配置ANOVAで各時点の比較結果の有意性を検証した。生存率以外のその他の数値データはTukey-Kramer post-hoc検定による一元配置ANOVAで解析した。 $p < 0.05$ を有意とした。

3. 結果

3.1. 心機能に対する筋芽細胞移植の効果

図2に、心エコーによる心機能評価結果を示す。27週齢ハムスターのDd, Ds, Fsは、3群間で有意差なしであった。術後、C群ではDdとDsが徐々に増大し、Fsが低下した。M群のDdとDsはC群よりやや小さかったものの、やはり徐々に増大した。しかし、Dsの進行的な増大はC群よりM群のほうが遅く、Fsも術後4週まではC群よりM群のほうが有意に高かった。筋芽細胞注入の効果は一過性で、注入後8週にはFsが低下しはじめた。一方、S群ではDdとDsの進行的な増大が顕著に軽減されており、Fsも、少なくとも術後12週までは術前と同レベルに維持された。

3.2. 筋芽細胞シート移植後の心筋細胞の形態学的改善

図3に、術後1週目のS, M, C各群の典型的なHE染色像と心臓の骨格筋ミオシンの速筋型染色像を示す。HE染色では、M群とC群の間には著明な違いを認めないが、S群ではM群及びC群と比較して左室壁が肥厚しているのがわかる。この肥厚はS群に広く観察され、骨格筋ミオシンの速筋型染色から、この肥厚部分の細胞が筋肉様細胞であることが示唆された。図3Cは第VIII因子染色像である。S群のこの肥厚部分では第VIII因子陽性の細動脈及び毛細血管が著明に増加していた。

図4Aに、術後8週目の各群の代表的なMasson三色染色像を示す。線維形成領域を定量化したところ、C群とM群の間に有意差はなかったが、S群ではC群及びM群と比較して心筋線維形成が有意に抑制されていた(図4B)。

図5に、F1Bハムスターの心筋細胞の α -及び β -サルコグリカンを染色した、代表的な免疫組織化学染色像を示す。F1Bハムスターの筋細胞膜中には α -及び β -サルコグリカンが明確に検出された。一方、 δ -サルコグリカン遺伝子のプロモーター領域が欠失しているT0-2ハムスターでは、 δ -サルコグリカンのみならず α -、 β -、 γ -サルコグリカンも発現を認めなかった[19]。この結果はC群及びM群のT0-2ハムスター(図5)にみられた。興味深いことに、S群のT0-2ハムスターでは、手術2週間後に α -及び β -サルコグリカンが検出された。そしてS群ではこれらのタンパク質が術後8週間を経過しても検出された。

図6に、図5の免疫組織化学信号を定量分析した結果を示す。各群について、緑色信号が背景より強かった部分の面積をF1Bハムスターと比較し、各タンパク質の相対的な発現レベルを示した。術後2週の時点で、3つのタンパク質の信号はいずれも、F1Bハムスターでみられた正常レベルには達しなかったが、S群の信号はC群及びM群と比較して有意に強かった。すなわち、筋芽細胞シート移植から2週間後に、3つのタンパク質すべ

てについて弱い有意な発現が観察され、この発現は移植後少なくとも8週間持続した。

3.3. 筋芽細胞シート移植後の期待寿命の延長

筋芽細胞注入群 (M 群) 及び偽手術群 (C 群) は手術 1 週間後から死亡しはじめ、生存数は術後 4~10 週の期間にわたって徐々に減少した (図 7)。C 群と M 群とで生存率に有意差はなかった ($p = 0.5835$)。一方、シート状筋芽細胞グラフトを移植した群 (S 群) では、やはり手術 1 週間後から死亡個体が出現し、生存数が術後 4~8 週の期間にわたって徐々に減少したものの、生存期間が他の 2 群と比較して長く、生存率も有意に高かった (S 群 vs. C 群 : $p = 0.0025$, S 群 vs. M 群 : $p = 0.0055$)。したがって、T0-2 ハムスターの期待寿命は、シート状筋芽細胞グラフトの移植により著明に延長したと結論できる。

4. 考察

本研究は、シート状筋芽細胞グラフトの移植により、成体心筋症ハムスターにおいて左室の進行的な拡張を有意に軽減し、心機能を温存できることを示している。心機能に対するこの好ましい効果は、細胞骨格タンパク質の再発現及び心筋線維形成の軽減と関連性があり、その結果、成体心筋症ハムスターにおいて期待寿命の延長をもたらした。このように、心機能に対する好ましい効果と組織学的な改善がみられることから、シート状筋芽細胞グラフトの移植は、ヒトの DCM においても心臓再建の有力な治療戦略であると考えられる。

T0-2 ハムスターは、 δ -サルコグリカンのプロモーター領域が欠失するヒト遺伝性 DCM を再現するモデルであり、 α -、 β -、 γ -、 δ -サルコグリカンの発現消失を伴う [20-22]。このハムスター系統は、出生後、アポトーシスのため心筋細胞の数が進行的に減少し、主として心筋線維形成からなる心筋リモデリングが生じて心室の拡張と菲薄化をきたし、進行性の鬱血性心不全に至る。そして、約 30 週齢から死亡が始まる [23]。遺伝的介入による治療法には、遺伝子送達に関連する倫理的問題をはじめとする重大な制約がある。そこで我々は、心筋リモデリングを軽減し、細胞の数的・機能的損失による心室拡張を防ぐことが、この疾患に対する理想的な治療戦略であると考えた。

近年、虚血性心筋症の治療法として筋芽細胞移植が研究されており、動物モデルではその機能的利点が確立されている [7, 8]。しかし DCM に対する筋芽細胞移植の効果については、前臨床研究が少数報告されているのみであるうえ、それらの文献によれば左室に対する機能面の利益は少ない [10-12]。正確な機序は明らかになっていないが、骨格筋芽細胞を細胞心筋形成術 (cellular cardiomyoplasty) に使用した場合は、次のような順序でイベントが起こるとされている。心筋内に移植された細胞は、まず、拡張機能不全に影響を与える。次に、移植細胞が筋管及び筋線維内に十分に組み込まれると、収縮機能が改善する。移植細胞は、心臓の壁応力に対する方向に自ら配向して、障害部位の菲薄化と拡張を防ぐ [9]。つまり筋芽細胞は、心臓の壁応力に対して機械的支持を与える効果をもつとも考えられる。したがって、DCM により広範に変性した心臓に対して、より均一かつ効果的に筋芽細胞を送達することができれば、そのような機械的支持の効果を向上できる可能性がある。

本研究では、心室の 4 箇所筋芽細胞を直接注入したハムスターにおいて、収縮機能には有意な改善がみられたものの、心室拡張は抑制されなかった。B10 14.7 DCM ハムスターモデルを用いて心室の 6 箇所に直接注入法で筋芽細胞を移植した最近の研究でも、心室拡張は軽減しなかったと報告されている [12]。これらの結果から、特に DCM においては、直接注入法では広範な細胞送達を十分に行えないことが示唆される。一方、シート状筋芽細胞グラフトを移植したハムスターでは、術後 3 ヶ月間にわたって心室拡張の進行が抑制された。この長期的抑制には、シート状筋芽細胞グラフトの 2 つの利点が重要な役割を果たしたと考えられる。1 つは、シート状筋芽細胞グラフトがレシピエント組織に迅速に接着することである。これは、このグラフトが基底面に ECM を有していることによる。ECM は接着物質として作用し、他の細胞シートやさらにはレシピエント組織への付着を促進する [24]。レシピエント組織への迅速な接着により、細胞の針注入でしばしば生じる細胞の位置ずれを回避できると考えられる [16]。もう 1 つの利点は、筋芽細胞を効率的に移植できることである。清水らが報告しているように、単離細胞の注入では中央部の組織壊死が生じやすいのに対して、面積の大きい構造体である細胞シートは細胞の損失を伴わないため、より効果的な移植が可能となる [16]。したがって、シート状筋芽細胞グラフトの移植は、広い心臓変性部位に対して効率的かつ広範に筋芽細胞を送達し、DCM の心室拡張を抑制するうえで、優れた方法であると考えられる。

最近では、筋芽細胞が、肝細胞成長因子 (HGF)、インスリン様成長因子 (IGF)、線維芽細胞成長因子 (FGF) などの成長因子の分泌能をもつことが多数報告されている [25]。また、HGF または VEGF により惹起される血管新生、あるいは HGF による抗線維形成作用が、DCM の変性心臓に有益であるとの考えが示されている [21, 26]。我々も、筋肉収縮時に形質膜に強度を与える機械的機能を有するとともに信号伝達に重要な役割を果たす、 α -ジストログリカン、 α -及び β -サルコグリカンなどの細胞骨格タンパク質の再構築を HGF がもたらすことを報告した [27]。本研究では、シート状筋芽細胞グラフトを移植したハムスターにのみ、心筋線維形成の軽減と α -及び β -サルコグリカンの再発現を認めた。DCM の変性心臓の心機能改善に伴う心筋線維形成の軽減及び細胞骨格タンパク質の再発現は、S 群において筋芽細胞が効率的に移植され、この筋芽細胞から HGF など何らかのサイトカインが分泌されて誘導されたものであろう。

T0-2 ハムスターの期待寿命が、 δ -サルコグリカン遺伝子のトランスフェクションや、アンジオテンシン変換酵素阻害剤であるエナラプリルの経口投与により有意に改善したとの報告がある [12, 21]。これらの研究では 5~6 週齢で治療が開始されたが、これは、心筋細胞数の減少や心機能低下が生じる前の時期である。また別の治療法として、筋芽細胞、平滑筋細胞、または心筋細胞を用いる細胞心筋形成術も研究されており、その

治療開始時期は、約 15 週齢、すなわち心筋細胞の損失や線維形成などの心筋リモデリングが進行しはじめ、心機能の軽度な障害が起きる時期であった[28-30]。しかし、細胞心筋形成術の研究は、形態学的な改善や期待寿命の延長が見出されていない。本研究では、27 週齢のハムスターに対してシート状筋芽細胞グラフトの移植または筋芽細胞の直接注入を行った。筋芽細胞注入群では期待寿命が延長しなかったのに対して、シート状筋芽細胞グラフト群では、これほど後期に治療を行ったにもかかわらず、細胞骨格タンパク質の再構成、心筋線維形成の軽減、左室拡張の抑制がみられ、その結果、期待寿命が延長し、変性心臓の心機能もより長期にわたって温存された。このことは非常に興味深い。

本研究の結果に関して、いくつかの制約に言及しておく必要がある。1つは筋芽細胞の由来である。本研究では、F1B ハムスターは骨格筋芽細胞の表現型が正常であるという理由から、F1B 系統の筋芽細胞を用いた。しかし、T0-2 ハムスターでも、 δ -サルコグリカン遺伝子が大幅に欠失しているため骨格筋芽細胞に遺伝的な異常はあるものの、その表現型は保たれている[31]。臨床においては、遺伝的な筋肉疾患を原因とする DCM の場合、主として自家筋芽細胞が使用されると思われる。2つ目の制約は、筋芽細胞移植後に不整脈リスクが生じる可能性である[32]。不整脈リスクは虚血状態との関連性が指摘されている。また、骨格筋細胞と心筋細胞とで細胞膜の電気特性が異なるため、リエントリー回路が形成される可能性があり、これが不整脈リスクと関係するともされている[33, 34]。S 群及び M 群では、術後 4 週までは心機能が温存されていたにもかかわらず早期に死亡した例があったが、その理由の1つがこの不整脈リスクである可能性も考えられる。このリスクは虚血性と非虚血性の心筋疾患で同程度であるが、臨床応用に向けた最適のアプローチを判断するため、さらなる研究が必要である。もう1つの制約は、筋芽細胞シートがどのようにしてレシピエントの心機能を改善させ、心筋の組織学的改善をもたらすのか、その詳細が明らかになっていないことである。

以上まとめると、シート状筋芽細胞グラフトの移植は、細胞骨格タンパク質の再構成を誘導し、抗線維形成効果と心機能の温存をもたらした。その結果、DCM のハムスターモデルの期待寿命が延長した。

謝辞

技術的支援をいただいた Akiko Nishimura 氏、Masako Yokoyama 氏、Aiko Miki 氏に感謝します。

参考文献

- [1] Abelmann WH, Lorell BH. The challenge of cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:1219-39.
- [2] Towbin JA, Bowles NE. The failing heart. *Nature* 2002;415:227- 33.
- [3] Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, et al. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U. S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 1996;334:1349 -55.
- [4] Packer M, O' Connor CM, Ghali JK, Pressler ML, Carson PE, Belkin RN, et al. Effect of amlodipine on morbidity and mortality in severe chronic heart failure. Prospective randomized amlodipine survival evaluation study group. *N Engl J Med* 1996;335:1107- 14.
- [5] Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Fiore B, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: fifteenth official report-1998. *J Heart Lung Transplant* 1998;17:656- 68.
- [6] Bowles NE, Bowles KR, Towbin JA. The ' 'final common pathway' ' hypothesis and inherited cardiovascular disease. The role of cytoskeletal proteins in dilated cardiomyopathy. *Herz* 2000;25:168- 75.
- [7] Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996;98:2512-23.
- [8] Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;4:929 - 33.
- [9] Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini JC, Prosper F, D' Attellis N, et al. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1121- 30.
- [10] Suzuki K, Murtuza B, Suzuki N, Smolenski RT, Yacoub MH. Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure. *Circulation* 2001;104:1213 [Abstract].
- [11] Ohno N, Fedak PW, Weisel RD, Mickle DA, Fujii T, Li RK. Transplantation of cryopreserved muscle cells in dilated cardiomyopathy: effects on left ventricular geometry and function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126:1537- 48.
- [12] Pouly J, Hagege AA, Vilquin JT, Bissery A, Rouche A, Bruneval P, et al. Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy? *Circulation* 2004;110: 1626-31.
- [13] Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 1993;27:1243- 51.
- [14] Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, et al. Bioengineered cardiac

- grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 2000;102:11156 [Abstract].
- [15] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 1999;100:1163 [Abstract].
- [16] Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperatureresponsive cell culture surfaces. *Circ Res* 2002;90:e40.
- [17] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 2003;24:2309- 16.
- [18] Miyagawa S, Sawa Y, Takano H, Sakakida S, Taketani S, Imran M, et al. Impaired myocardium regeneration with bioengineered contractile cardiomyocyte sheets—a novel concept of tissue cardiomyoplasty for repairing damaged myocardium. *Circulation* 2002; 106:11-420 [Abstract].
- [19] Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, et al. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:13873 -8.
- [20] Bajusz E, Baker JR, Nixon CW, Homburger F. Spontaneous, hereditary myocardial degeneration and congestive heart failure in a strain of Syrian hamsters. *Ann NY Acad Sci* 1969;156:105- 29.
- [21] Shimizu T, Okamoto H, Chiba S, Matsui Y, Sugawara T, Akino M, et al. VEGF-mediated angiogenesis is impaired by angiotensin type 1 receptor blockade in cardiomyopathic hamster hearts. *Cardiovasc Res* 2003;58:203- 12.
- [22] Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest* 2000; 106:1511- 9.
- [23] Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton- extracellular matrix linkage. *Cell* 1995;80:675- 9.
- [24] Kushida A, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: the noninvasive harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces. *J Biomed Mater Res* 2001;54:37 - 46.
- [25] Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001;91:534-51.
- [26] Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Hiraoka K, Yamasaki K, Hashiya N, et al. Angiogenesis and antifibrotic action by hepatocyte growth factor in cardiomyopathy. *Hypertension* 2002;40:47- 53.
- [27] Kondoh H, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Sakakida-Kitagawa S, et al. Re-organization of cytoskeletal proteins and prolonged life expectancy caused by hepatocyte growth factor in a hamster model of late-phase dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:295- 302.
- [28] Kawada T, Nakazawa M, Nakauchi S, Yamazaki K, Shimamoto R, Urabe M, et al. Rescue of hereditary form of dilated cardiomyopathy by rAAV-mediated somatic gene therapy: amelioration of morphological findings, sarcolemmal permeability, cardiac performances, and the prognosis of T0-2 hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:901-6.
- [29] Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Li G, Yau TM. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg* 2000;70:859- 65.
- [30] Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Kim EJ, et al. Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circulation* 2000;102:111204 [Abstract].
- [31] Nigro V, Okazaki Y, Belsito A, Piluso G, Matsuda Y, Politano L, et al. Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum Mol Genet* 1997;6:601 -7.
- [32] Steinberg JS, Gaur A, Sciacca R, Tan E. New-onset sustained ventricular tachycardia after cardiac surgery. *Circulation* 1999;99: 903- 8.
- [33] Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry GE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000;149:731- 40.
- [34] Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100: 7808- 11.

図 1. (A) デスミンを染色した初代培養の筋肉細胞。(B) シート状筋芽細胞グラフトは、酵素処理を行うことなく温度応答性培養皿から容易に離れた。(C) このグラフトの断面 HE 染色像。細胞間連絡結合が保たれていることがわかる。

図 2. 心機能。(A, B) Dd と Ds は心エコーで計測。(C) Fs は Dd と Ds から算出。C 群では、Dd, Ds とともに徐々に増大し、Fs が低下した。M 群の Dd と Ds は C 群よりやや小さかったものの、やはり徐々に増大した。M 群の Fs は術後 4 週まで C 群より有意に高かった。一方、S 群では Dd と Ds の進行的な増大が顕著に軽減されており、Fs も、少なくとも術後 12 週までは術前と同レベルに維持された。(実線 = S 群; 点線 = M 群; 破線 = C 群;

* 術前 [27 週齢] に対して $P < 0.05$; * M 群及び C 群に対して $P < 0.05$; ◆ C 群に対して $P < 0.05$
 (weeks of age): (週齢)

図 3. 術後 1 週の T0-2 ハムスターの心筋の変化. 組織切片に HE 染色または骨格筋ミオシンの速筋型の染色を施した. (A) HE 染色像; (B) 骨格筋ミオシンの速筋型の染色像; (C) 第 VIII 因子の染色像. S 群では, M 群及び C 群と比較して左室壁が肥厚している. S 群において, この肥厚は広範にわたっており (矢印), 骨格筋ミオシン陽性細胞を多数含んでいた. この肥厚部分では新血管の数が増加していた (各群につき $n = 3$).

C group: C 群
 M group: M 群
 S group: S 群

図 4. シート状筋芽細胞グラフトの移植による, T0-2 ハムスターの左室の線維性変化の抑制. Masson 三色染色した組織切片を画像解析して線維形成領域を定量化した. DCM ハムスターの心臓の線維形成領域のパーセンテージは, シート状筋芽細胞グラフトの移植により有意に抑制されたが, 筋芽細胞の針注入による影響は受けなかった (各群につき $n = 5$, 術後 8 日, * $P < 0.05$).

C group: C 群
 M group: M 群
 S group: S 群
 %fibrosis: 線維形成領域 (%)

図 5. 心筋細胞の α -及び β -サルコグリカンの免疫染色像. (A) α -サルコグリカン; (B) β -サルコグリカン. F1B: 27 週齢の F1B ハムスター. F1B ハムスターの筋細胞膜中には α -及び β -サルコグリカンが明確に検出された. C 群及び M 群ではいずれのタイプのサルコグリカンも検出されなかった. 一方, S 群では, 術後 2 週で心筋細胞に α -及び β -サルコグリカンが発現し, この発現は術後 8 週になっても確認された.

Alpha-sarcoglycan: α -サルコグリカン
 Beta-sarcoglycan: β -サルコグリカン
 C group: C 群
 M group: M 群
 S group: S 群

図 6. 図 5 の免疫組織信号の定量分析結果. (A) α -サルコグリカン; (B) β -サルコグリカン. 手術 2 週の時点で, 両タンパク質の信号はいずれも, F1B ハムスターでみられた正常レベルには達しなかったが, S 群の信号は C 群及び M 群と比較して有意に強かった (各群につき $n = 5$, * $P < 0.05$).

Alpha-sarcoglycan: α -サルコグリカン
 Beta-sarcoglycan: β -サルコグリカン
 C group: C 群
 M group: M 群
 S group: S 群

図 7. 生存率. C 群と M 群との間には有意差がなかったが, S 群と M 群の差は有意であった (S 群: $n = 16$, M 群: $n = 15$, C 群: $n = 15$).

Survival Rate (%): 生存率 (%)
 Weeks of age: 週齢
 C group: C 群
 M group: M 群
 S group: S 群
 P value (log-rank analysis): P 値 (ログランク解析)
 Group: 群

文献資料 7

J Thorac Cardiovasc Surg 2005;130:1333-41

工学的に作製した自家筋芽細胞シートの移植による損傷心筋の修復

Imran A. Memon, MBBS, PhD,^a Yoshiki Sawa, MD, PhD,^a Norihide Fukushima, MD,^a Goro Matsumiya, MD,^a Shigeru Miyagawa, MD, PhD,^a Satoshi Taketani, MD,^a Satoru K. Sakakida, MD, PhD,^c Haruhiko Kondoh, MD, PhD,^a Alexey N. Aleshin, MD, PhD,^a Tatsuya Shimizu, MD, PhD,^b Teruo Okano, PhD,^b and Hikaru Matsuda, MD^a

Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery,^a and Molecular Pharmacology,^c Osaka University Graduate School of Medicine,^a Osaka, Japan
Tokyo Women's Medical University, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science,^b Tokyo, Japan.

目的: 注入法による自家骨格筋芽細胞移植では、細胞間連絡及び細胞外マトリックスの損失や細胞数の減少が生じる。我々は、骨格筋芽細胞シートの移植は、細胞の損失が少なくかつ細胞間微小環境を損傷しない均一で安定的な細胞送達を可能にし、したがって、損傷した心臓の修復に有利ではないかと考えた。

方法: 冠動脈左前下行枝を結紮した Lewis ラットの心臓 (2 週齢, n = 173) に、筋芽細胞注入、単層筋芽細胞シート 2 枚の移植 (細胞数 5×10^6 個/シート)、または培地注入のいずれかにより、自家骨格筋芽細胞 1×10^7 個を送達した。筋芽細胞シートの作製は、20°C 未満でコンフルエントな細胞を培養皿表面から離す温度応答性のポリマー固定細胞培養皿を用いた。

結果: 心エコーの結果、筋芽細胞シート群では細胞移植後 8 週までの心機能改善が他群より優れていた。組織学的比較では、筋芽細胞シート群のみ細胞充実度が高く、また、心壁の均一な肥厚を認め、心壁内には多数の新生毛細血管が広範に生じていた。骨格筋芽細胞シートの移植は、骨格筋芽細胞の注入と比較して、線維形成が大幅に軽減されていた。筋芽細胞シート群の梗塞部位は造血幹細胞 (c-kit, 幹細胞抗原 1, CD34) の数が顕著に多かった。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によりストローマ細胞由来因子 1、肝細胞成長因子、血管内皮成長因子の発現を調べたところ、[筋芽細胞シート群 > 筋芽細胞注入群 > 対照群] の順に発現が強かった。

結論: 筋芽細胞シートは、ストローマ細胞由来因子 1 及びその他の成長因子を放出して造血幹細胞を誘引し、これに伴って損傷心筋の修復、線維形成の軽減、及びリモデリングの抑制をもたらす。本研究は、重篤な心不全患者に対する治療法を示唆するものである。

略語

ANOVA = 分散分析

BrdU = 5'-ブロモ-2'-デオキシウリジン

Ctx = 細胞移植

EF = 駆出率

HGF = 肝細胞成長因子

HSC = 造血幹細胞

LAD = 冠動脈左前下行枝

LV = 左心室

MHC = ミオシン H 鎖

MI 群 = 筋芽細胞懸濁液注入群

MS 群 = 筋芽細胞シート移植群

RT-PCR = 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応

Sca-1 = 幹細胞抗原 1

SDF-1 = ストローマ細胞由来因子 1

VEGF = 血管内皮成長因子

心筋梗塞は、処置や支持療法を受けずに放置すれば心不全につながる破壊的な疾患である。損傷した心筋の再生能は非常に限られている^{1,2}。心不全患者の支持療法としては心臓移植や左室 (LV) 補助システムによる機械的支持があるが、これらには、臓器の拒否、ドナー不足、感染、補助システムの耐久性など、いくつかの重要な制約がある。自家細胞による心筋形成術 (細胞移植 [Ctx]) はこれらの欠点を克服できる方法であり、損なわれた心筋を再生・修復し心機能を改善する独立した治療法として注目されている³。

骨格筋芽細胞は、数百個単位に増殖する能力で筋肉再生の質を維持しており、臨床用途に最も適した自家細胞種として利用できる⁴。筋芽細胞移植による心機能の改善がいくつかの研究室から報告されている⁵⁻⁷。しかし、培養皿から細胞を剥離するためトリプシンを使用すると、微小細胞間連絡や細胞外マトリックスが損傷し、細胞の生存と増殖が抑制されるため、細胞移植療法に悪影響を及ぼすと考えられる⁸。細胞間連絡因子は、細胞の接着、移動、増殖、分化、細胞死に重要な役割を果たしており⁹、したがって細胞療法の利点を最大限に生かすためにはこの因子を維持する必要がある。細胞の能力を維持できる、信頼性の高い細胞送達モードを選

択することは、細胞の種類及び数を決定することと同等の価値があるといえる。

組織工学による組織再生は、心臓修復の各基準を満たし、かつ、いくつかの欠点を解消できる¹⁰。組織工学用の足場の使用は、心筋再生を支持するものの、炎症反応や表面接着分子の損失など、生体適合性、生分解性、細胞毒性上の問題があり、このため有効性が制限される。こうした欠点を解消するため、我々は、足場を用いない細胞シート作製技術を確認した¹¹。この技術により作製した細胞シートは、細胞間連絡結合、内因性細胞外マトリックス (ECM)、統合的な接着物質を保持していることが確認された¹²。このようにして作製した新生仔心筋細胞シートを梗塞心筋に非結紮的に移植すると、シートが損傷心筋と一体化し心機能が改善した¹³。臨床用途においては、骨格筋芽細胞を使用することにより、倫理的問題や細胞入手源の問題を回避できる。こうした理由から自家骨格筋芽細胞を選択し、筋芽細胞シートを作製した。

最近の知見が示唆するところによれば、局所的にまたは形質転換により送達されたストローマ細胞由来因子 1 (SDF-1) の発現は、幹細胞を可動化して集め、血管新生を起こす過程に関与している¹⁴。SDF-1 は骨格筋組織で分泌されることから¹⁵、筋芽細胞を移植すれば、造血幹細胞 (HSC) を心臓の梗塞部位に誘引して心臓再生と血管形成を惹起できる可能性がある。

我々は、この考えを進めて、筋芽細胞シートが (1) 心臓修復用の好適かつ有望な細胞運搬物・細胞送達物として機能するか、(2) SDF-1 の分泌によって造血幹細胞 (始原細胞) を誘引するか、(3) 心臓リモデリングを抑制して心臓の形態と機能を改善させるか、を検討した。

材料及び方法

実験動物

筋芽細胞のドナー及びレシピエントとして、雌雄の Wistar-Lewis ラット 173 匹 (180~220 g, 6~10 週齢; Seac Yoshitomi Ltd) を使用した。動物の扱いは National Society for Medical Research の「Principles of Laboratory Animal Care」及び米国立衛生研究所の「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals」(NIH Publication No. 86-23, 1985 年改訂) に準拠した。ラットの各群への割付を表 1 に示す。

筋芽細胞の単離と筋芽細胞シートの作製

既報の修正プロトコル¹⁶に従って筋芽細胞を単離し、増殖させた (筋芽細胞懸濁液注入 [MI] 群: n = 40, 筋芽細胞シート移植 [MS] 群: n = 43, 及び各細胞移植群。梗塞した心臓に、心筋内への直接注入または作製した筋芽細胞シートの移植により細胞を送達した。

筋芽細胞シートの作製には、既報のとおり¹⁷、温度応答性ポリマー (ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド) でコーティングした専用の培養皿を使用した。この培養皿の表面は、37°C では疎水性を示し、20°C 未満では親水性になる。この温度応答性培養皿に、細胞密度 5×10^6 の細胞懸濁液を播種し、37°C のインキュベーター内に 1~2 日間放置した。こうして得たコンフルエントな細胞を、培養皿を 20°C で 1 時間放置することにより培養皿から自発的に剥離させて、自由な単層細胞シートを得た。この細胞シートの面積は $1.00 \pm 0.05 \text{ cm}^2$ 、厚さは $50 \pm 10.0 \mu\text{m}$ であった (図 1B, C)。このシートを 2 枚重ねて厚みを増し、移植に使用した。したがって、この移植用グラフト 1 枚の細胞含有数は約 1.0×10^7 個であった。単一の筋芽細胞シートの細胞を計数したところ、回収された細胞数は $5 \times 10^6 \pm 5693.96$ 個であった。

手術手順

ラットを麻酔し (ケタミン及びキシラジン)、挿管して、ベンチレータ (モデル SN-480-7, シナノ製作所, 東京) で陽圧換気を維持した。既報のとおり¹⁸、第 4~第 5 肋間で開胸し、冠動脈左前下行枝 (LAD) を結紮して急性心筋梗塞を誘発した。2 週間後、ラットを (1) MS 群 (n = 29, 細胞数 1×10^7 個/シート)、(2) MI 群 (n = 25, 細胞数 1×10^7 個/0.2 mL Dulbecco 修飾 Eagle 培地)、(3) 培地注入群 (対照群, n = 29) の 3 つの治療群に無作為に割り付けた。MI 群では、梗塞部位とその周囲の 5 箇所に 30 ゲージのツベルクリンシリンジで細胞を注入した。MS 群では、細胞シートを癒痕部位に無縫合で直接移植することにより、同数の細胞を送達した。処置後、胸壁への癒着を防ぐため、生分解性コラーゲンシート ($\phi 33 \text{ mm}$, Kokencellgen) で心臓を覆った (図 1E)。

心機能の評価

麻酔が得られた後、ベースライン時 (LAD 結紮後 2 週間かつ細胞移植前) 及び細胞移植後 2, 4, 8 週に心機能をモニターした (各群・各時点につき n = 5)。12 Mhz の環状アレイトランスデューサを備えた超音波装置 (SONOS 5500, Agilent Technologies) で心エコーを実施した。まず、左室内径最大部分において 2 次元モードで短軸像を撮影し、同時に収縮期及び拡張期の左室面積を測定した。左室の短軸面積から左室容積を算出した。短軸像を用いて、左室の前壁及び後壁に垂直となるよう M モードのカーソル位置を決定した。拡張期の測定は、左室拡張期径が見かけ上最大になる時点で行った。左室収縮終期径の測定は、左室後壁の収縮運動が最前方になった時点で行った。左室拡張終期径及び左室収縮終期径を測定した。短軸上の前壁 - 後壁間距離を用いた。長さ及び面積のデータは、3 回の拍動の平均値として表した。左室駆出率 (LVEF) を、 $LVEF (\%) = [(LVDd^3 - LVDs^3) / LVDd^3] \times 100$ により計算した。面積縮小率 (Fractional area shortening; FAS) を $FAS (\%) = EDA - ESA / EDA \times 100 (\%)$ により計算して評価するため、拡張終期面積及び収縮終期面積を求めた。

組織学的検討

処置 2 週間後にヘマトキシリン・エオシン染色及び Masson 三色染色を行い、各群の梗塞部位の組織学的特徴を評価した。各群の個体 (MS 群: n = 10, MI 群: n = 10, 対照群: n = 9) から心臓を摘出し、10%ホルマリンで固定した。各個体につき、左室中央部から少なくとも 3 枚の不連続切片を作製し、前壁厚を測定した。

パラフィンブロックを切り出し、脱パラフィン後、速筋型骨格筋ミオシン H 鎖 (MHC) に対するモノクローナル抗骨格筋ミオシン抗体 (MY-32, Sigma, ミズーリ州 St Louis) と、遅筋型骨格筋 MHC に対するモノクローナル抗ミオシン抗体 (NOQ7.5.4D, Sigma) による免疫染色を行った。

梗塞部位の血管を検出するため、DAKO 社製 EPOS von Willebrand 因子/ホースラディッシュペルオキシダーゼ・キット (DakoCytomation, デンマーク) を用いて、von Willebrand 因子の免疫組織化学染色を行った。手順は製造業者の指示に従った。各切片につき 100x の弱拡大視野 10 箇所を分析し、血管密度を評価した。結果は 1 平方ミリメートル当たり血管数で表した。

Masson 三色染色切片を MetaMorph ソフトウェア (UIC) で画像解析し、測面法により線維形成領域の面積パーセンテージを定量化した。各切片につき弱拡大視野 10 箇所を分析し、梗塞部位の線維形成量を評価した (Olympus, 日本)。

5'-プロモ-2'-デオキシウリジン投与による分化細胞の特徴付け

既報のとおり、筋芽細胞移植日から 5 日間連続で 5'-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) を腹腔内注射し、処置後の心臓の梗塞部位における分化細胞の同定と特徴付けを行った¹⁴。この実験に使用した動物数は、MS 群 14 匹、MI 群 10 匹、対照群 15 匹である。筋芽細胞移植後 7 日目または 14 日目に心臓を摘出し、2 分割した。2 分割のうち一方は液体窒素中で凍結して切片を作製し、免疫組織化学染色に供した。もう一方は、後で RNA 抽出を行うため、RNAlater 溶液 (QIAGEN) 中に保管した。

抗 BrdU In-Situ 検出キット (BD Pharmagen) を使用して、心筋梗塞部位の BrdU 陽性細胞を観察した。使用手順は製造業者のプロトコルに従った。心筋組織の切片を、CD34, c-kit (CD117), von Willebrand 因子 (以上, Santa Cruz, Inc), 幹細胞抗原 1 (Sca-1, BD Inc), トロポニン-T (NeoMarkers) に対する抗体で免疫染色した。免疫染色用の組織は 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。一次抗体でインキュベート後、二次抗体として、ヤギ抗マウス Alexa Fluor 488, ヤギ抗マウス Alexa Fluor 546, ヤギ抗ウサギ Alexa Fluor 546, ロバ抗ヤギ Alexa Fluor 546 (以上, Molecular Probes, Inc) を使用した。一次抗体による二重染色後、BrdU 染色を行った (抗プロモデオキシウリジン, マウス IgG₁, モノクローナル PRB-1, Alexa Fluor 488 共役)。SlowFade Antifade キット試薬と 4,6-ジアミノ-2-フェニルインドール核染色剤を添加してカバーガラスをかけた。微分干渉コントラスト光学系を備えた蛍光顕微鏡 (Polaroid, Olympus, 日本) でスライドを観察した。視野 10 箇所 (100x) について 1 平方ミリメートル当たり染色細胞数を計数した。

リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応による遺伝子転写物の定量化

保存した標本から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) により全 RNA を分離し、Omniscript 逆転写酵素 (QIAGEN) で逆転写を行った。既報のとおり、ABI PRISM 7700 でリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を実施した^{19,20}。SDF-1 及び還元グリセルアルデヒド-リン酸脱水素酵素に対するフォワードプライマー、リバースプライマー、プローブの配列は割愛する。各遺伝子 (各 RNA サンプル) の測定は 3 回行った。7 日間保管した標本のみ、RT-PCR により SDF-1, 肝細胞成長因子 (HGF), 血管内皮成長因子 (VEGF) の発現を測定した。

統計解析

データはすべて平均±標準偏差で表し、StatView 5.0 ソフトウェア (Abacus Concepts) で複数段階の分散分析 (ANOVA) を行った。まず、反復測定二元配置 ANOVA で図 2 の経時的データを解析し、Tukey-Kramer post-hoc 検定により特定の 2 群間を比較した。その他の数値データは一元配置 ANOVA で解析し、Bonferroni 法により有意性を検定した。

結果

心機能に対する筋芽細胞移植の影響

心筋梗塞による術後 24 時間以内の急性死亡率は 20%未満であった (動物数には算入しなかった)。再手術時に少数の死亡例があった (MS 群: n = 1, MI 群: n = 5, 対照群: n = 1)。LAD 結紮から数週間後の心室リモデリングの結果として、ベースライン時の心エコーと比較して心腔が全体的に増大し心臓ポンプ機能が低下するという特徴がみられた。術後 2, 4, 8 週の時点で、対照群の心臓には、心室腔拡張を伴う駆出率の低下を認めた。MI 群は対照群と比較して駆出率が良好であったが (2, 4, 8 週), 左室腔拡張の軽減度は他群と比較して有意差がなかった。シート移植を行った MS 群では、2, 4, 8 週の駆出率が対照群と比較して有意に改善し、MI 群との比較でも 2, 4 週の駆出率が有意に改善していた。処置後に左室腔面積の著明な縮小を認めたのは MS 群のみであった。MS 群では、4, 8 週に、左室収縮終期面積、左室拡張終期面積とも有意に縮小していた。また MS 群では、2, 4 週の FAS (%) も他群と比較して有意に改善していた (図 2)。

組織学的所見

左心室前壁は、筋芽細胞移植前に既に線維性の瘢痕で置換され、左室の他の健常部位と比較して大幅に菲薄化していた (図 3, ベースライン)。処置 2 週間後、MI 群では瘢痕組織中に単独の細胞を認めたものの、形態学的所見は対照群、MI 群ともベースライン時と同様であった。これに対して、MS 群では前壁に多数の細胞を

認めた。前壁内に均一に分布するこれらの球形ないし卵形の細胞が前壁の大部分を占め、瘢痕部分を置換していた(図3, A)。MS群の前壁は均一で、有意に肥厚していた(図3, B)。ベースライン、MI群、対照群の間には前壁の厚さに大きな差はなかった。前壁の心筋線維形成については、MI群も対照群と比較して有意に減少していたが、MS群ではMI群及び対照群と比較して線維形成の減少がより顕著であった(図3, C)。組織学的観察及び定量は主として細胞移植の14日後に実施した。

MS群の心外膜部には、細長い筋線維の(部分的または完全な)細胞層を認めた。また、主として心筋中央部に、小さい単独の筋線維が観察された。細胞移植から2週間後、速筋型MHCを免疫染色した連続切片を観察すると、グラフトが主に速筋線維からなる骨格筋構造で占められていた。一部(約20%)は遅筋型MHCが染色陽性となり、遅筋型筋線維への転換が示唆された。MI群では、主として心筋中央部に、コラーゲン状物質に囲まれた小さい単独の筋線維が観察された。

各群について、前壁中の局所毛細血管密度を評価した。MI群、MS群とも、局所毛細血管の数が増加していた。処置2週間後に血管密度を定量化したところ、MS群の血管密度($26.1 \pm 4.7 \times 10^2/\text{mm}^2$)は、MI群($14.4 \pm 3.4 \times 10^2/\text{mm}^2$)及び対照群($4.1 \pm 2.1 \times 10^2/\text{mm}^2$)と比較して顕著に高かった($P < .0001$)。MI群の血管密度($14.4 \pm 3.4 \times 10^2/\text{mm}^2$)も対照群($4.1 \pm 2.1 \times 10^2/\text{mm}^2$)と比較して有意に高かった($P < .0001$)。

免疫蛍光染色

処置14日後に行ったBrdUと各細胞マーカー(c-kit, Sca-1, and CD34)の二重染色では、MI群及び対照群と比較してMS群でこれらの細胞数が多かった(図4, A)。

細胞移植の14日後、c-kit細胞、Sca-1細胞、CD34細胞の梗塞部位1平方ミリメートルあたり細胞数は、MI群及び対照群と比較してMS群のほうが有意に多かった(図4, C)。細胞移植7日後の時点では、14日後と比較して、全群でこれら染色陽性細胞の数がやや多かったが、有意差となったのはMS群のみであった(データは示していない)。

遺伝子発現による成長因子の評価

細胞移植1週間後のRT-PCRでは、SDF-1の発現が、MS群(0.09 ± 0.02 , $P < .05$) > MI群(0.05 ± 0.02) > 対照群(0.02 ± 0.01)と、対照群と比較してMS群で強かった(図4, D)。SDF-1及びHGFをコードしている遺伝子の発現は、対照群の梗塞部位で最も弱く、MI群ではやや強くなっていた($P < .05$)。また、筋芽細胞シートを移植したMS群では、針注入により細胞を移植したMI群及び対照群と比較して、成長因子(HGF及びVEGF)の発現も有意に強かった(図4, E及びF)。MI群のVEGFの発現レベルは対照群と同程度であった。

考察

本研究では、工学的に作製した自家筋芽細胞シートが、梗塞した心壁を修復し、心臓リモデリングを軽減して心機能を改善させるかを検討した。

再生医学及び組織工学の概念は、損傷や疾患を有する組織に健常な細胞を送達し、目的臓器の内因的な修復・再生システムを刺激することである²¹。組織工学は足場の使用を基礎とし、組織の再生を通じて損傷組織を回復させる。しかし、Zimmermannら²²及びKofidisら²³が指摘しているように、足場による組織構築はいくつかの欠点を伴う。

Kushidaら²⁴が報告しているように、細胞シート組織は、細胞移植に有利な特徴として、①インタクトな膜タンパク質と接着タンパク質を維持している、②細胞外マトリックス分子が組み込まれている、③細胞間クロストークにより成長因子を分泌する、④培養皿から細胞を回収する際の酵素反応(トリプシンまたはディスパーゼ)による細胞微小環境の破壊がない、という点を備えている。

MS群では筋芽細胞シート移植後に前壁の均一な修復がみられ、これは、左室腔の幾何学的形状の再リモデリングに主要な役割を果たしたと考えられる。このリモデリング軽減の理由は、筋芽細胞をシートの形態で効率的に送達することにより、瘢痕領域を覆うとともに、境界部を細胞で架橋できたことによるものと思われる。筋芽細胞シートでは細胞微小環境がもとのまま良好に保たれており、このことが、必要なすべての細胞活動(成長因子の分泌など)を支持していると考えられる。MI群では、移植された細胞は、細胞間連絡をもたない状態で線維性瘢痕に囲まれて心腔内に定着する。そこで基本的な細胞微小環境の構築を開始するが、その速度は遅く、初代細胞の生存を困難にする。

細胞充実度が高かったもう1つの理由として、移植細胞から放出されたSDF-1やその他の成長因子が何らかの役割を果たしたことが考えられる。これらの因子は、細胞の移動、接着、増殖に関与する。我々は、invitroの筋芽細胞シートでSDF-1の発現を確認した(データは示していない)。HSCはCXCR4受容体を有し、幹細胞ホーミング因子に特異的なリガンドであるSDF-1と結合均衡を確立して、骨髄中へのホーミングを維持する。したがって、筋芽細胞シートから放出されるSDF-1によりHSCが誘引され、このことが、細胞充実度及び修復が向上する機序と関連している可能性がある^{14,15}。MS群ではMI群と比較してHGF及びVEGFの分泌が多く、このことも損傷心筋の修復に有利に働いた可能性がある。筋芽細胞はHGFなどの成長因子の自然の供給源として作用し、筋芽細胞自体の増殖や他の細胞の誘引に用いた研究から、血管形成・抗線維形成要因として作用することが確認されている²⁵。

Balsamら²⁶の知見から、HSCが虚血心筋において継続的に造血作用をもたらすことが示された。本研究でも、細胞移植2週間後、c-kit, Sca-1, CD34を発現する細胞が多数観察された。Murryら²⁷は、HSCが心筋細胞に分化転換することはないと述べている。しかし、Lin⁻c-kit⁺骨髄細胞が筋細胞へと活発に転換するとするOrlic

ら²⁸の知見については議論が分かれている。HSCが心機能改善にどの程度寄与するのか正確なところは不明であるが、Askariら¹⁴は、HSCの存在下で細胞充実度の向上と瘢痕領域の置換が生じ、このことが、左室重量の増加と左室拡張の軽減によるリモデリング解消に寄与する主要因であると述べており、我々もこれに同意する。細胞充実度の向上による線維形成部の置換がHSCのもたらす利点であるとも考えられる。

その能力には限界があるものの、組織修復に関与する心筋幹細胞が心臓中に存在することが最近報告された^{29,30}。しかし、これらは他の部位から移入してきた細胞であり、その心の由来は骨髄であるとする報告もある³¹。これらの細胞は、走化性因子の影響で可動化し、骨髄または心臓内のいずれかから、修復中の組織へと移動するとも考えられる。本研究では、内皮細胞及び心筋性細胞とBrdU陽性細胞との共存も、わずかではあるが観察された。これらHSC細胞及び内皮細胞の由来と分化転換傾向を正確に解明するにはさらなる研究が必要である。

本研究では、MI群、MS群とも、移植した筋芽細胞のサイズに関する定量的な評価及び比較を行わなかったが、未発表の別の実験では、MI群、MS群について、処置後の移植細胞の生存率をRT-PCRで評価した。雄ラットの筋芽細胞を雌のレシピエントに移植し、1日後に心臓を摘出した。心臓全体からゲノムDNAを抽出し、雄性特異的なDNA、すなわち移植細胞の存在を示すDNAの量を測定した。その結果、MS群 3.71 ± 0.55 に対してMI群 1.71 ± 0.50 であった($P < .05$)。したがって、筋芽細胞の生存率もシート移植のほうが高いと推察される。この結果は、細胞(筋芽細胞、線維芽細胞など)の生存率について大まかな評価を示すものにはすぎないが、我々の他の知見と矛盾しない。

我々が以前行ったカラーキネシス心エコーによる研究では、線維芽細胞シートの移植後、局所的な収縮機能の回復は起こらなかった¹³。Hutchesonら³²も、線維芽細胞移植では筋芽細胞移植と比較して収縮機能の改善がみられなかったと報告している。メッシュの移植も、左室の幾何学形状の維持を助けるのみで、局所的な収縮機能の向上はもたらさない³³。本研究で線維芽細胞シートやメッシュを対照群に用いなかったのはこのためである。本研究では胸壁への癒着を防ぐために生分解性コラーゲンのシートを使用したが、このシートが心筋幾何学形状のリモデリングに対して効果をもたないことは、対照群の結果から明白である。

結論として、組織による心筋形成術は、梗塞した心壁を修復でき、HSCを誘引して心臓リモデリングの軽減と心機能の改善をもたらせることから、細胞による心筋形成術より優れているといえる。

RT-PCRの技術的支援をいただいたMasako Yokoyama氏と、心エコーの技術的支援をいただいたShigeru Miyagawa氏に感謝します。

参考文献

1. Quaini F, Kajstura J, Anversa P, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002;346:5-15.
2. Nygren JM, Jovinge S, Jacobsen SE, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*. 2004;10: 494-501.
3. Piano MR, Carrigan TM. Cellular cardiomyoplasty: a new therapeutic approach for regenerating the myocardium. *J Cardiovasc Nurs*. 2003; 18:374-81.
4. Paganì FD, Aretz TH, Aaronson KD, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemic-damaged myocardium in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:879-88.
5. Suzuki K, Murtuza B, Yacoub MH, et al. Single fibers of skeletal muscle as a novel graft for cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;123:984-93.
6. Menasche P, Hagege AA, Duboc D, et al. Autologous skeletal myoblasts transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;1078-83.
7. Taylor DA, Glower DD, Kraus WE, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*. 1998;4:929-33.
8. Okano T, Yamada N, Sakai H, et al. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly (N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res*. 1993;27:1243-51.
9. Shaw P, Sheetz M, Kuhlbrandt W. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Science; 2004. p. 1065-126.
10. Zimmermann WH, Kostin S, Eschenhagen T, et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res*. 2002;90:223-30.
11. Shimizu T, Umezumi M, Okano T, et al. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res*. 2002;90:e40-8.
12. Okano T, Yamamoto M, Shimizu T, et al. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*. 2003;24:2309-16.
13. Miyagawa S, Memon I, Sawa Y, et al. Efficacy of a novel cellular cardiomyoplasty using cardiac sheet for myocardial regeneration: compared with needle injection. *Circulation*. 2002;106(19 suppl): 11420

14. Askari AT, Unzek S, Penn MS, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;362:697-703.
15. Ratajczak MZ, Peiper S, Janowska WA, et al. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells*. 2003;21:363-71.
16. Memon IA, Yoshiki S, Matsuda H, et al. A combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in the canine hearts for ischemic cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005. In press.
17. Shimizu T, Yamato M, Okano T, et al. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*. 2003;24:2309-16.
18. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, et al. Cellular mechanism of myocardial infarct expansion. *Circulation*. 1988;78:186-201.
19. Tori M, Kitagawa-Sakakida S, Shirakura R, et al. Initial T-cell activation required for transplant vasculopathy in retransplanted rat cardiac allografts. *Transplantation*. 2000;70:737-46.
20. Kitagawa-Sakakida S, Sawa Y, Matsuda H, et al. Selective chemokine and receptor gene expressions in allografts that develop transplant vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2002;21:1090-100.
21. Lanza RP, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering. Academic Press; New York: 2003. p. 13-5.
22. Zimmermann WH, Didie M, Eschenhagen T, et al. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngeneic rats. *Circulation*. 2002;106(suppl 1): 1151-7.
23. Kofidis T, Akhyari P, Haverich A, et al. In Vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002; 124:63-9.
24. Kushida A, Yamato M, Okano T, et al. Decrease in culture temperature releases monolayer endothelial cell sheets together with deposited fibronectin matrix from temperature-responsive culture surfaces. *J Biomed Mater Res*. 1999;45:355-62.
25. Tatsumi R, Anderson JE, Allen RE, et al. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol*. 1998;194:114-28.
26. Balsam LB, Weissman IL, Robbins RC, et al. Hematopoietic stem cells adopt mature hematopoietic fates in ischemic myocardium. *Nature*. 2004;428:668-73.
27. Murry CE, Soonpaa MH, Field LJ, et al. Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428:664-8.
28. Orlic D, Kajstura J, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-5.
29. Beltrami AP, Kajstura J, Anversa P, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763-76.
30. Oh H, Bradfute SB, Schneider MD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12313-8.
31. Dreyfus PA, Chretien F, Gherardi RK, et al. Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am J Pathol*. 2004;164:773-9.
32. Hutcheson KA, Atkins BZ, Taylor DA, et al. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant*. 2000;9:359-68.
33. Kelley ST, Malekan R, Edmunds LH, et al. Restraining infarct expansion preserves left ventricular geometry and function after acute anteroapical infarction. *Circulation*. 1999;99:135-42.

表 1. 実験動物の割り付け

群	細胞療法を行った個体数 (計)	心エコー(2, 4, 8週後)	染色(14日後) *	RT-PCR(7日後) /DB(7, 14日後)	筋芽細胞を単離した個体数
MS	29 + 1†	n = 5	n = 10	n = 14	n = 43
MI	25 + 5†	n = 5	n = 10	n = 10	n = 40
C	29 + 1†	n = 5	n = 9	n = 15	n = 0

合計 = Lewis ラット 173 匹。RT-PCR: リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応, DB: 二重免疫蛍光染色, MS: 筋芽細胞シート, MI: 筋芽細胞注入, C: 培地注入。*組織染色(ヘマトキシリン・エオシン, Masson 三色染色, 第 VIII 因子)。†死亡数。

図 1. 免疫組織化学染色(A: 40x)では, 培養細胞の約 60~70%がデスミン陽性の筋肉系細胞であることが確認された。ヘマトキシリン・エオシン染色(B)及び Masson 三色染色(C: 400x)から, 筋芽細胞シートは細胞充実度が高く, 線維性内容物が少ないことがわかる(bar = 50 μm)。2枚のシートを重ねて複合シートグラ

フトを作製した (D). グラフトをラット心臓の梗塞部位に移植した (E).

図 2. 筋芽細胞シート移植群では心機能が改善した. 冠動脈左前下行枝の結紮から 2 週間後のデータをベースラインとした. A: 左室収縮終期面積 (LVESA), B: 左室拡張終期面積 (LVEDA), C: 左室駆出率 (LVEF), D: 面積縮小率 (FAS). *対照群に対して $P < .05$, #筋芽細胞シート群 vs. 筋芽細胞注入群で $P < .05$. BL: ベースライン, MS: 筋芽細胞シート群, MI: 筋芽細胞注入群, C: 対照群.

図 3. (A) ベースライン (BL), 対照群 (C), 筋芽細胞注入群 (MI), 筋芽細胞シート移植群 (MS) の心臓の弱拡大像 (10x) 及び強拡大像 (400x). 冠動脈左前下行枝の結紮から 2 週間後に摘出したベースライン心臓では梗塞部位に完全な癒痕形成を認め, 対照群も同様の所見であった. MI 群でも, 癒痕部位にやや細胞充実を認めるものの, 組織学的所見はベースライン及び対照群と同様であった. MS 群の梗塞部位は細胞の豊富な組織で占められていた. MS 群のみ, 前壁厚が MI 群及び対照群と比較して有意に大きかった (B). 心筋の線維形成の程度はベースラインと対照群が同程度で, MI 群では軽減していた (C). しかし MS 群では, 線維形成率が MI 群及び対照群と比較して顕著に低下していた. *対照群に対して $P < .05$, #MS 群 vs. MI 群で $P < .05$.

Anterior wall thickness (μm):	前壁厚 (μm)
Percentage of fibrosis (%):	線維形成率 (%)

図 4. 筋芽細胞シート群 (MS; A-右) は細胞充実度が高かったが, 筋芽細胞注入群 (MI; A-中央) 及び対照群 (C; A-左) は細胞充実度が低かった. 二重蛍光染色像をマージし, 黄~橙色の染色パターンを得た (400x). 抗 BrdU In-Situ 検出キットで, 梗塞部位の BrdU 陽性細胞を観察した (B). MS 群のみ, 梗塞した心筋の修復部位で HSC の増加を認めた (C). *対照群に対して $P < .05$, #MS 群 vs. MI 群で $P < .05$. 筋芽細胞移植 1 週間後に, ストローマ細胞由来因子 1 (SDF-1; D), 肝細胞成長因子 (HGF; E), 血管内皮成長因子 (VEGF; F) の各遺伝子の相対発現レベルを測定したところ, MS 群が有意に高かった. *対照群に対して $P < .05$, #MS 群 vs. MI 群で $P < .05$.

Number of double stained cells per mm^2 :	1 mm^2 あたりの二重染色陽性細胞数
14 days:	14 日後
Relative gene expression:	遺伝子の相対発現レベル

この報告書は、平成17年度に独立行政法人 産業技術総合研究所が、経済産業省からの委託を受けて実施した成果を取りまとめたものです。

— 禁無断転載 —

平成17年度 戦略的技術開発委託費
医療機器ガイドライン策定事業
(医療機器に関する技術ガイドライン作成のための支援事業)
再生医療分野 (心筋シート)
開発WG報告書

連絡先

〒100-8901
東京都千代田区霞が関1-3-1
経済産業省商務情報政策局サービス産業課 医療・福祉機器産業室
TEL : 03-3501-1562
FAX : 03-3501-6613
URL : <http://www.meti.go.jp/>

発行

〒305-8566
茨城県つくば市東1-1-1
独立行政法人 産業技術総合研究所 人間福祉医工学研究部門
医療機器開発ガイドライン検討実務委員会
TEL : 029-861-7014
FAX : 029-861-7848
E-Mail : human-ws@m.aist.go.jp