

## 細胞シート工学による心筋再生医療



清水達也

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

虚血性心疾患や拡張型心筋症に伴う重症心不全に対する再生医療としては細胞浮遊液を不全心筋組織に注入することにより血管新生あるいは心筋組織を再生させる方法の有効性が示され臨床応用が始まっている。しかしながら細胞浮遊液の注入による移植法では、細胞が互いに解離した状態で組織内に導入されるため移植場所の制御が困難なことや流出・壊死により細胞が損失することが問題となっている。そこで次世代の心筋再生医療として、組織工学的な手法を用いて細胞から作成した組織を移植することでより効率的に細胞をデリバリーする治療法が追究されている。組織の作成法として世界的には生体吸収性支持体を用いる手法が主流となっているが分解時に炎症を生じることや細胞密度の高い組織を作ることが困難なことが新たな課題となっている。これに対し我々は細胞シートの積層化により支持体を用いることなく細胞密度の高い三次元組織を構築することを可能とした。また虚血心筋モデルや拡張型心筋症モデルに重層化細胞シートを移植することで心機能が改善することを確認した。さらにこれらの成果をもとに拡張型心筋症に対する細胞シート移植の臨床応用も開始されている。このように細胞シートを用いた組織再生技術はこれまで不可能であったことを可能としており心筋組織の再生医療に大きく貢献するものと考えられる

近年の幹細胞生物学や再生医学の発展により、循環器領域においても虚血性心疾患や拡張型心筋症による重症心不全に対する再生医療が現実的なものとなっている。特に細胞浮遊液を傷害心筋組織内に注入することにより血管あるいは心筋組織を再生させる方法は世界中で研究が行われ、自己の筋芽細胞や骨髄由来単核球細胞を用いた細胞移植の臨床応用が既に始まっている。これまでに左室駆出率約5%改善という細胞移植の有効性を示すデータもあれば、殆ど心機能は改善しなかった

あるいは不整脈を誘発したといった報告もなされており、これからさらに大規模な臨床研究を行い安全性・有効性に関する議論を深めていく必要がある。一方、細胞浮遊液の注入による移植法では、細胞が互いに解離した状態で組織内に導入されるため移植場所の制御が困難なことや流出・壊死により細胞が損失することが問題となっている。そこで近年、ティッシュエンジニアリングの技術を用い体外で心筋組織を再構築し不全心筋部に移植する研究が始まっている。組織の再生を目的に

細胞の足場として生体吸収性高分子材料を用いることが世界的な主流となっているが心筋組織に関してもこの手法に基づいた研究が報告されている。これまでに生体吸収性高分子からなる支持体を作成し、それを足場として細胞を播種する手法 (Figure 1A) および溶液状の支持材料と細胞を混合したのち重合する手法 (Figure 1B) が報告されている。前者の方法としては、生体吸収性高分子の支持体としてメッシュあるいはスポンジ状のポリグリコール酸, ゼラチン, アルギン酸を用いた研究が報告されているが、あらかじめ作成された支持体内部への細胞播種が困難なことが課題となっている。一方、後者の手法としてはコラーゲン溶液と心筋細胞を混和しシリコンモールド内で培養することにより比較的均質な3次元心筋組織の再生が可能となっている。前記した2つの手法はいずれも生体外で心筋組織を形作ったうえで移植しようとするものであるが細胞浮遊液の移植と再生心筋組織の移植の中間に位置する手法としてフィブリンあるいはコラーゲン溶液と細胞を混合したものを直接不全心筋部に注入する方法も報告されている (Figure 1C)。これにより細胞浮遊液の移植時に問題となる細胞の損失を軽減できる可能性があるが浮遊液単独の注入同様に注入部位の組織傷害が問題となることが予測される。一方、我々は独自に開発した細胞シート工学の技術を用いて心筋組織再生の研究を展開してきた。温度応答性培養皿から温度降下処理のみで回収した細胞シートを積層化することで生体吸収性の支持体を用いることなく3次元組織を再構築できる (Figure 1D)。

この技術により支持体を用いた場合には作製困難であった細胞密度の高い組織再生が可能であり高分子の分解に伴う炎症反応を回避することもできる。ラット心筋細胞シートを重層化すると細胞シート間には1時間以内にギャップジャンクションが形成され同期して拍動することが明らかとなっている。この短時間での電氣的結合は細胞シート脱着時に細胞下面に温存されている接着因子が細胞シート間で糊のような役割をしていることに起因する。積層化された心筋細胞シートは *in vitro* において肉眼レベルで同期して自律拍動し、皮下組織に移植後、1年8ヶ月まで拍動を維持して生存することが示された。また積層化心筋細胞シートをラット心筋梗塞モデルへ移植したところ、グラフトーホスト間には心筋細胞同士の接着が起こるとともにそれらの細胞間にギャップジャンクションが形成されていることが示された。さらに虚血によって低下した心機能が改善することも確認された。臨床応用に関しては、現時点では心筋細胞のソースが未確立であるため代替として筋芽細胞や間葉系幹細胞を用いた移植実験が行われている (大阪大学心臓血管外科、国立循環器病センターとの共同研究)。既にラット心筋梗塞モデルおよび心筋症ハムスターモデルへの筋芽細胞シート移植およびラット心筋梗塞モデルへの脂肪組織由来間葉系幹細胞シート移植により心機能が改善することが確認されている。また、前臨床試験としてブタ心筋梗塞モデルならびにイヌ拡張型心筋症モデルへの自己筋芽細胞シート移植でも心機能改善効果が確認された (Table 1)。現在、これらの研究

成果をもとに左室補助装置を装着した拡張型心筋症の患者への細胞シート移植の臨床応用が開始されている。これら細胞シート移植の心機能改善効果のメカニズムとして細胞が互い連結した組織として損失なく移植されることで細胞浮遊液の注入に比べより効果的な心機能改善をもたらすものと考えられる。これまでの研究では細胞シートから分泌される VEGF や HGF などが強力に血管新生を促進するとともにアポトーシスや線維化を抑制、さらに stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) が傷害心筋への幹細胞動員に寄与している可能性が示唆されている。このように種々の液性因子が細胞シートから安定かつ持続的に分泌されることにより心筋再生に貢献しているものと考えられる。今後さらに有効な細胞シート移植治療の開発に向けてはいくつかの課題がある。第一は細胞ソースである。現段階では心筋の代替として種々の細胞を用いて細胞シートを作製しているが将来的に何らかのヒト幹細胞から移植可能な心筋細胞を十分量にまで分化増殖させる技術が確立すれば、ラット心筋細胞を用いて作製したような肉眼レベルで拍動するヒト心筋組織の再生が可能となり、物理的に収縮弛緩を補助するような心筋組織再生の実現も可能であろう。もうひとつの大きな課題はいかに組織内部に血管網を新生し心筋組織をスケールアップするかである。生体内においては積層化細胞シートを繰り返し移植することにより厚い組織も再生可能となっているが、将来的にはあらかじめ生体外で還流可能な血管網を有した組織を再生することが理想的である。このような再生

組織内へ十分な血管網を導入する技術の確立はティッシュエンジニアリングにおける共通の課題でありブレークスルー的な技術革新が必要となっている

ティッシュエンジニアリングによる心筋組織再生は、細胞ソース、3次元組織構築法、血管新生法、移植法と多分野にまたがって解決すべき課題も多いが、その中で細胞シートを用いた手法は重症心不全に対するより有効な再生医療の実現に向けた基盤技術になるものと期待される。

#### 主要論文

1. S. Miyagawa, Y. Sawa, S. Sakakida, S. Taketani, H. Kondoh, IA. Memon, Y. Imanishi, T. Shimizu, T. Okano and H. Matsuda. "Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: their integration with recipient myocardium", *Transplantation*. 80,1586-1595 (2005)
2. H. Kondoh, Y. Sawa, S. Miyagawa, S. Sakakida-Kitagawa, IA. Memon, N. Kawaguchi, N. Matsuura, T. Shimizu, T. Okano and H. Matsuda. "Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters", *Cardiovasc Res*. 69, 466-475 (2006)
3. Y. Miyahara, N. Nagaya, M. Kataoka, B. Yanagawa, K. Tanaka, H. Hao, K. Ishino, H. Ishida, T. Shimizu, K. Kangawa, S. Sano, T. Okano, S. Kitamura and H. Mori.

“Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction”, *Nat Med.* 12,459-465(2006)

4. H. Sekine, T. Shimizu, S. Kosaka, E. Kobayashi and T. Okano. “Cardiomyocyte bridging between hearts and bioengineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells”, *J Heart Lung Transplant.* 25,324-32(2006)

5. T. Shimizu, H. Sekine, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano. “Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets”, *Tissue Eng.* 12,499-507(2006)

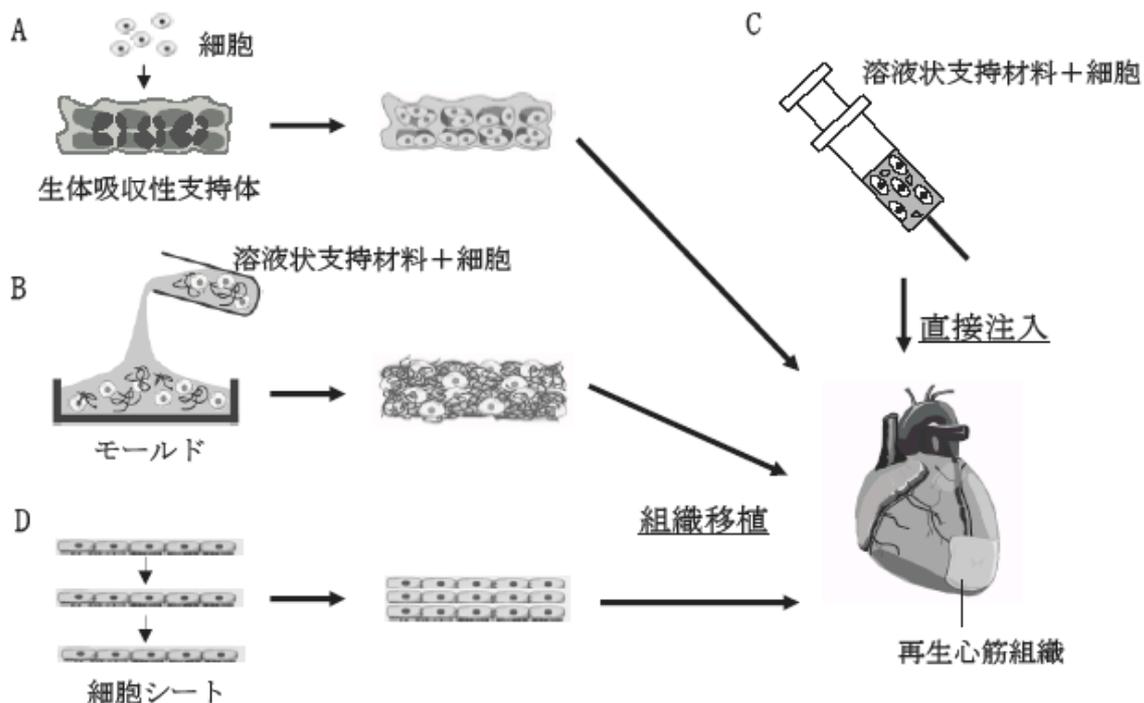


Figure 1 組織工学による心筋組織再生

A: あらかじめ生体吸収性高分子からなる多孔性支持体を作製し、それに細胞を播種する。支持体は徐々に分解し細胞あるいは生体が産生する細胞外マトリクスと置換されて組織が再生される。B: 溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合したものをモールドに流し込み、ゲル化させることで細胞を3次元に組織化する。C: 溶液状の生体吸収性材料と細胞を混合したものを不全心筋に直接注入する。D: 温度応答性培養皿からシート状に回収した細胞シートを積層化することで3次元組織を再生する。

報告者	対象心疾患モデル (作製方法)	細胞シート種	移植時期 (移植枚数)	効果
Miyagawa et al.*	ラット心筋梗塞 (冠動脈結紮)	心筋細胞シート	梗塞2週間後 (2枚)	・左室駆出率および左室内径短縮率の改善 ・左室前壁厚および局所血管密度の増加 ・幹細胞シートに対する優位性
Memon et al.*	ラット心筋梗塞 (冠動脈結紮)	筋芽細胞シート	梗塞2週間後 (2枚)	・左室拡大の抑制ならびに左室駆出率の改善 ・左室前壁厚の増加および線維化の抑制 ・移植部位でのSDF-1, HGF, VEGFの遺伝子発現の増加 ・移植部位へのc-kit, Sca-1, CD34陽性細胞の動員増進 ・細胞浮遊液注入に対する優位性
Miyahara et al.#	ラット心筋梗塞 (冠動脈結紮)	脂肪組織由来間葉系幹細胞シート	梗塞4週間後 (1枚)	・左室拡張末期ならびに径の減少 ・左室前壁厚の増加および左室内径短縮率の改善 ・血中MCP-1の上昇の抑制 ・固体生存率の改善 ・移植物の一部が心筋・血管内皮・平滑筋細胞に分化 ・幹細胞シートに対する優位性
Kondo et al.*	心筋症ハムスター (遺伝子欠損)	筋芽細胞シート	27週齢 (2枚)	・左室拡大の抑制ならびに左室内径短縮率の改善 ・線維化の抑制 ・ $\alpha$ -および $\beta$ -サルコグリカンの発現回復 ・生存期間の延長 ・細胞浮遊液注入に対する優位性
Hata et al.*	イヌDCM様心不全 (持続的高速ペースメーキング)	筋芽細胞シート	処置4週間後 (3枚)	・左室駆出率および左室内径短縮率の改善 ・左室拡大の抑制ならびに前壁厚の増加

\*は大阪大学心臓血管外科 #は国立循環器病センターとの共同研究による

Table 1 心不全モデルへの細胞シート移植