

再生心筋組織移植における ホスト-グラフト間形態的結合の解析

関根 秀一

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所



重症心不全に対する治療として、組織工学の技術により細胞から組織を構築して不全心筋部へ移植する方法が研究されている。我々はシート状の細胞を積層化し 3 次元組織を再構築する細胞シート工学により心筋再生の研究を行ってきた。これまでに同期して拍動する心筋組織の再生が可能となっている。この再生心筋組織を不全心筋部へ移植する場合、ホスト心臓と電氣的に結合し同期して心機能を補助するかが重要となる。そこで本研究では異所性に作製した心筋梗塞モデルに重層化心筋細胞シートの移植を行い、ホスト心臓とグラフトの電氣的結合の有無を形態学的に解析した。グラフト移植後 7 日の組織切片においてグラフトの心筋細胞とホスト非梗塞部の心筋細胞との間に細胞-細胞間結合を認めた。免疫組織染色および透過電子顕微鏡による観察の結果、それぞれの細胞間にコネクシン 43 の発現を認め介在板の存在も確認した。またこの結合した細胞を介して低分子の蛍光色素が移動することも確認した。これらのことから重層化心筋細胞シートは正常心筋組織とギャップジャンクションを形成し同期して拍動し、心機能を改善しうることを示唆された。

1. 序論 : 虚血性心疾患や拡張型心筋症にともなう重症心不全に対しては、脳死患者からの心臓移植が最終的な治療法となっているが、ドナー不足が大きな問題となっている。また機械的な左室補助装置や植込み型人工心臓の使用は、感染および血栓形成や感染などの問題があり長期的な生命維持は困難なのが現状である。そこで近年新たな治療法として再生医療が注目され、自己筋芽細胞や骨髄由来細胞を不全心筋組織内へ注入することにより心筋組織を再生させる方法が臨床応用されている。しかし細胞懸濁液注射による治療は移植片のサイズ、位置の制御の困難さ、さら

には移植部からの細胞流出や壊死による細胞損失が問題となっている。そこで近年、組織工学的手法を用い *in vitro* で細胞を組織化したうえで再生組織として不全心筋部に移植する研究が始まっている。

組織再構築を行う際に細胞の足場として生体吸収性の支持体を使用する方法が一般的な手法であるが、支持体内部へ十分な細胞数を播種することが困難であり、結果として細胞成分が少なく大量の結合組織ができあがってしまう。心臓弁など細胞が疎な組織の作製には適するが、心臓など細胞が密で複雑な構造と機能を持つ組織を作製するには次世代の新

たな技術開発が必要となっている。このような背景のもと我々は生体吸収性の支持体を利用することなく組織・臓器を再構築する細胞シート工学とよぶ新技術により心筋組織再構築の研究を行っている。これは培養皿表面に加工を施し温度変化のみで細胞の接着・脱着を制御するというものである。表面に修飾されているポリ *N*-イソプロピルアクリルアミドは水中 32°C に下限臨界溶液温度をもつ温度応答性高分子で、低温側では水和して高分子鎖が大きく広がった構造になり水に溶解する。この高分子を電子線により共有結的に固定すると、37°C では弱疎水性になり細胞が接着し、32°C 以下に温度を下げると親水性に変化し細胞が脱着する表面ができる。従来、培養細胞を培養皿から脱着し回収するにはプロテアーゼが用いられるが、この方法では細胞と培養皿表面を接着させている接着蛋白を分解するばかりか、細胞膜表面の蛋白までも分解してしまう。しかし温度応答性培養皿を用いた場合では、温度を降下させるだけで細胞-細胞間接着や細胞外マトリックス(ECM)の構造と機能を破壊することなく細胞をシートとして回収できる。さらにこの細胞シートを積層化することにより 3 次元組織を構築できる。また積層化により再構築された組織は細胞とそれが産生する少量の ECM のみからなるため、生体吸収性の支持体を使用する時に生ずる問題を回避できる¹⁾。

この技術を用い新生児ラット心筋細胞シートの回収・積層化を行ったところ、*in vitro* において積層化された 2 枚の心筋細胞シート間に速やかに形態的かつ電氣的な結合が形成さ

れ、組織全体が同期して自律拍動することが示された。またこの積層化心筋細胞シートを免疫寛容ラットの皮下筋膜上組織に移植したところ、ホスト心臓の心電図とは異なる移植心筋グラフトに固有の電位が測定された。移植組織は肉眼レベルで拍動を確認でき、組織内には毛細血管網が新生し、円柱状によく伸びた心筋細胞、ギャップジャンクションまたはデスモソームなど生体心筋組織によく似た組織像を呈することが明らかとなっている²⁾。さらにこの移植心筋グラフトは拍動を維持したままラットの寿命に近い約 2 年間生着することも明らかとなっている³⁾。またその積層化心筋細胞シートの心筋梗塞モデルへの移植においては、細胞シート移植後 2 週間において左心室駆出率が改善することが明らかとなった⁴⁾。しかしこの心筋グラフトを不全心筋に対する治療として移植を行った場合、ホスト心臓と電氣的に結合することを証明することは重要不可欠であり、さらに詳細に解析する必要がある。そこで本研究では異所性心筋梗塞モデルに重層化心筋細胞シートを移植し、ホスト心筋細胞と移植グラフト心筋細胞との電氣的結合を形態学的に解析することを目的とした。

2. 方法 : 温度応答性培養皿上に新生仔 GFP トランスジェニックラットの心筋細胞を培養し、心筋細胞シートを作製した。F344 無胸腺ラットの頸部に異所性に SD ラットの心筋細胞⁵⁾を行い、左冠状動脈前下降枝の結紮を行うことにより心筋梗塞モデルを作製した。温度低下により回収した細胞シート 3 枚を重層化し心筋グラフトとして梗塞部を含む心臓表面へ

移植した。1、3、日および1週間後に移植部を摘出し固定後その組織切片を経時的に観察した。またアクチニン、GFP、コネキシン 43 に対する免疫組織染色および透過型電子顕微鏡により宿主心筋と心筋グラフトとの細胞-細胞間結合の形態学的解析を行った。さらにギャップジャンクションを移動可能な低分子蛍光物質であるカルセイン(MW ; 623)をトレーサーとして心筋グラフトに取り込ませた後に移植を行い、グラフトから宿主への細胞間輸送を解析した。また移植後の心外膜中皮細胞の存在を調べるためカルレチニンと ICAM-1 に対する免疫組織染色を行った。

3. 結果 : 1週間後の組織切片により心筋グラフトが全層にわたって生着していることが示された。梗塞部位上において心筋グラフトは線維化した組織を被覆するように生着していた。非梗塞部心筋組織上においては3日後になるとグラフトの心筋細胞が宿主側へ遊走をはじめ、1週間後には宿主心筋細胞と完全に結合することが認められた。ホスト-グラフトの心筋細胞結合部位においては免疫組織染色の結果、コネキシン 43 が陽性に発現していることが確認された。透過電子顕微鏡による観察では介在板の存在も確認された。さらにこの結合した細胞間をカルセインが輸送されることも確認された。次にカルレチニンおよび ICAM-1 に対する免疫組織染色を行った結果、心筋グラフト移植前に存在していた単層のカルレチニン陽性の中皮細胞が1日後には減少し、中皮細胞が存在していた心外膜の ICAM-1 陽性細胞が解離することが認められた。さらに3日後にはカルレチニン陽性

の細胞は完全に消失し、ICAM-1 陽性の細胞は進展した形態へ変化することを確認した。

4. 考察 : 本研究の結果より重層化心筋細胞シートは宿主心臓と形態学的に結合を有することが示された。移植1週間後の免疫組織染色においてアクチニン陽性細胞で結合し、その結合部位においてコネキシン 43 を陽性に認めたこと、また透過型電子顕微鏡で介在板の存在を確認したこと、さらにはこの結合した細胞間をカルセインが移動する細胞間輸送も確認されたことから、細胞-細胞間結合部位にギャップジャンクションを形成してホスト-グラフト間に電気的な結合ができていることが示唆された。心筋グラフト移植後の心外膜中皮細胞の存在については、単層でカルレチニン陽性の細胞が減少し、ICAM-1 陽性の細胞が心外膜上から解離することから脱分化したと考えられる。さらに時間の経過とともにカルレチニン陽性の細胞は完全に消失し、ICAM-1 陽性の細胞は進展した形態へ変化することから間葉系細胞に再分化したと考えられる。

5. 結論 : 不全心筋部を被覆するように重層化心筋細胞シートを移植した場合、心外膜中皮細胞はホスト-グラフト間に挟まれることにより機能を失い、非梗塞部を介して電気的結合を生じ、グラフトが宿主心臓と同期して拍動し心機能を改善しうることを示唆しており心筋の再生医療において極めて重要な新知見である。

6. 参考論文

1. Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Fukai F, Okano T. Cell sheet

- engineering: recreating tissue without biodegradable scaffolds. *Biomaterials*. 2005; 26:6415-22.
2. Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Takumitsu Akutu, Takeshi Setomaru, Kazuhiko Abe, Akihiko Kikuchi, Mitsuo Umezu, Teruo Okano. 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.
3. Shimizu T, Sekine H, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets. *Tissue Eng*. 2006; 12:499-507
4. Miyagawa S, Sawa Y, Sakakida S, Taketani S, Kondoh H, Memon IA, Imanishi Y, Shimizu T, Okano T, Matsuda H. Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: Their integration with recipient myocardium. *Transplantation*. 2005; 80:1586-1595.
5. Xiu D, Uchida H, To H, Sugimoto K, Kasahara K, Nagai H, Fujimura A, Kobayashi E. Simplified method of heterotopic rat heart transplantation using the cuff technique: application to sublethal dose protocol of methotrexate on allograft survival. *Microsurgery*. 2001; 21:16-21.
- H. Sekine, T. Shimizu, S. Kosaka, E. Kobayashi, T. Okano, "Cardiomyocyte bridging between hearts and bio-engineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells", *J Heart Lung Transplant*, 25:324-32 (2006).

主要論文

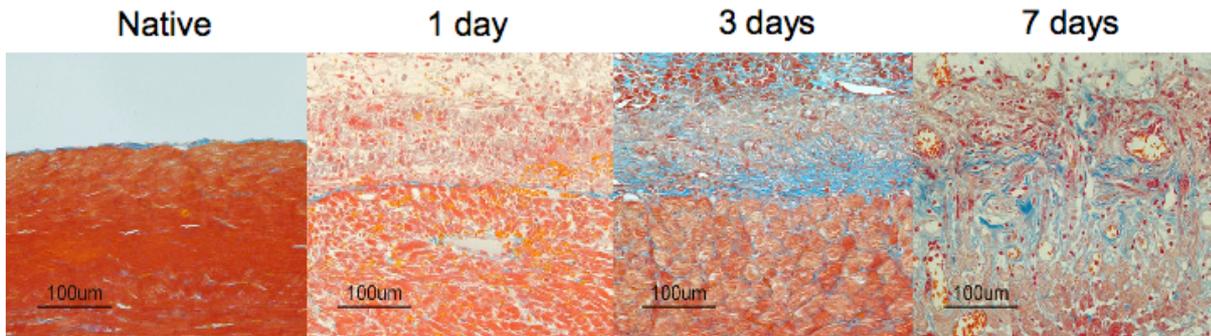


Figure 1 非梗塞部心筋組織上においては3日後になるとグラフトの心筋細胞がホスト側へ遊走をはじめ、1週間後には完全にホスト心筋細胞と結合する.

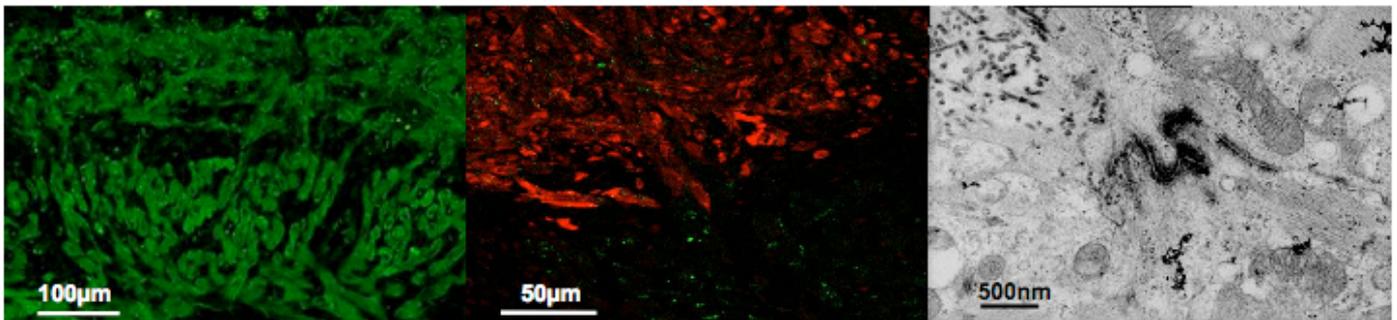


Figure 2 アクチニン陽性(緑)の細胞によりホスト-グラフト間での結合を認めた. また結合部位においてコネクシン43(緑)の発現も認められ、透過型電子顕微鏡では介在板の存在も確認された.