

## 特 集

## ティッシュエンジニアリングによる循環制御

関根 秀一\*, 清水 達也\*

## はじめに

虚血性心疾患や拡張型心筋症に伴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。さらに次世代の再生医療としてティッシュエンジニアリング(組織工学)により *in vitro* で組織を再構築し、作製された組織を不全心筋部に移植することにより循環を制御し心機能を改善しうることが実験レベルで示されている。

本特集では心筋組織再生について概説するとともに、我々が独自に開発した組織工学的手法「細胞シート工学」によって作製した再生心筋組織について紹介する。

## 心筋の再生医療

心筋組織に対する細胞移植の研究が始まったのは1990年代前半からで、Soonpaaらは移植したマウス心筋細胞がホスト心筋に生着し、低下した心不全モデルにおいても心機能が回復しうることが示した<sup>1)</sup>。また心筋細胞のみならず種々の細胞の心筋不全モデルへの移植により心機能が回復することが報告されてきた<sup>2)</sup>。

心筋再生における細胞移植の細胞ソースの一つとして、虚血に対し耐性があるとされる筋芽細胞

が代替として用いられてきた。Menascheらは患者本人の骨格筋より採取した筋芽細胞の注入移植を冠動脈バイパス術と併用して行ったところ心機能が回復することを示した<sup>3)</sup>。しかしながら不整脈を惹き起こし死亡する例もあったため、抗不整脈薬や植込み型除細動器の併用が必須となっている。またOrlicらは骨髄中のc-kit陽性細胞を心筋梗塞部に注入すると、移植された多くの細胞が心筋細胞へ分化し心筋組織が再生したと報告している<sup>4)</sup>。骨髄由来細胞の心筋細胞への分化に関しては否定的な報告もされているが<sup>5)</sup>、血管新生を促すことや心機能が改善することが多く報告されており骨髄由来の細胞注入療法が臨床応用されている<sup>6)</sup>。また骨髄から細胞を採取することなく顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)や顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)の投与により骨髄から幹細胞を動員し、虚血部の心筋組織の再生を促進させることも報告されている<sup>7,8)</sup>。現在これらのサイトカインの皮下投与が非侵襲的な治療法として臨床応用されているが、病変部の心筋細胞そのものにそれらのサイトカインが作用しアポトーシスを抑制することで心機能を改善しうるという報告もされている<sup>9)</sup>。また将来的な心筋の細胞ソースとして盛んに研究されているのはES細胞で、動物モデルへの移植実験においても分化誘導させた心筋細胞がホストの心臓に生着し心機能を改善することも示されている<sup>10)</sup>。ES細胞の使用に関しては倫理的問題、免疫拒絶または奇形腫形成などの解決すべき問題も多く、臨床応用に至るまでには十分な基礎研究と社会的なコンセンサスが必須である。一方、最近特に注目されているのは心筋内幹細胞で、心臓に存在するc-kitあるいはsca-1陽性の細胞を虚血障害部へ注入移植すると心筋細胞へ分化することが報告がされている<sup>11,12)</sup>。また転写因子

\*東京女子医科大学先端生命医科学研究所

Islet 1 を発現する細胞が心筋の前駆細胞ではないかとする報告もされ<sup>13)</sup>、これらの報告は心筋再生の可能性を大きく広げる知見であるが、臨床応用に至るには心臓生検により採取する少量のサンプルからいかに分離・増殖をさせるかが課題となる。

### ティッシュエンジニアリングによる心筋組織再生

生体内や培養系で体の組織構造を再生させる医学の領域をティッシュエンジニアリングまたは組織工学と呼ぶが、1980年代後半にマサチューセッツ工科大学の工学者 Langer とハーバード大学医学部の外科医 Vacanti JP が共同で提案した概念であり医学と工学の融合により生まれた新たな学問領域である<sup>14)</sup>。彼らは組織の再生には細胞、細胞の足場となる細胞外マトリックス (ECM)、細胞の分化・増殖のためのサイトカインが必要であると、その足場をポリ乳酸 (PGA) やポリ L 乳酸 (PLLA) およびその共重合体 (PLGA) からなる生体吸収性の支持体を用いて作製した。方法としては 3 次元の生体吸収性支持体に細胞を播種、そして培養したのち生体へ移植する。生体内では支持体が徐々に分解・吸収され、細胞が産生する ECM と置き換わるため、生体に類似した組織構造が再構築できるというものである。

心筋組織の再生においても他の臓器に対する組織工学と同様に、細胞の足場となる生体吸収性の支持体を用いるのが主流となっている。組織工学的手法を用いることでの大きな利点は、細胞注入療法で課題となっている細胞の流出・壊死による細胞の損失を克服できること、また細胞注入やサイトカイン療法では成し得ない先天性心疾患などの欠損組織に対する治療を可能とすることである<sup>15)</sup>。細胞を播種する支持体としてゼラチン、アルギン酸、PGA のメッシュや多孔性のスポンジなどを用いた研究が報告されている<sup>16~18)</sup>。また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 3 次元の心筋組織を構築する研究も報告されている<sup>19)</sup>。この研究では *in vitro* での伸展負荷により心筋組織に配向性を持たせ、さらに細胞を肥大させることにも成功している。さらには溶液状のフィブリンあるいはコラーゲン溶液と細胞を混和後、不全心筋部に注入するという細胞注入療法と組織工学の中間に位置するアプ

ローチも報告されており<sup>20,21)</sup>、これにより細胞懸濁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。

### 細胞シート工学による心筋組織再生

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は、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。

こうした背景のもと、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」と呼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) (PIPAAm) 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合的に固定すると、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・回収するにはトリプシンなどの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、温度を降下させるだけで細胞-細胞間接着や 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。さらに図 1 に示すように、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 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<sup>22)</sup>。

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気的な結合が形成され、組織全体が同

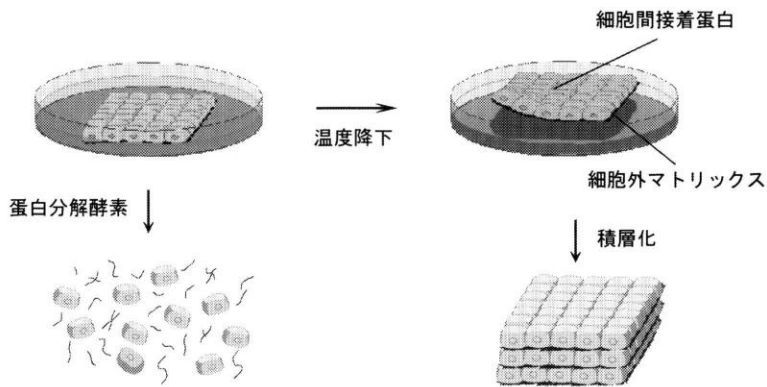


図1 細胞シート工学による組織再構築

期して自律拍動することが示された<sup>23)</sup>。またこの積層化心筋細胞シートを免疫不全ラットの皮下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た<sup>24)</sup>。さらにこの心筋グラフトは拍動を維持したまま1年8ヵ月まで生着することも明らかになった<sup>25)</sup>。

### 再生組織による心機能改善

組織工学的手法により再生した心筋組織を心筋不全モデルへ移植する研究に関して、Liらは生分解性のメッシュ状のゼラチンにラット胎児心筋細胞を播種し培養した後、これをグラフトとして心筋障害モデルの心臓表面へ移植を行ったところ、心筋細胞を播種していないゼラチンメッシュの移植に比べ左心室収縮期圧が改善されることを示した<sup>16)</sup>。またLeorらはアルギン酸を使った多孔性の足場へラット胎児心筋細胞を播種し、心筋梗塞モデルに移植した。その結果、左心室収縮能の改善は認められなかったもののリモデリングによる左心室拡大を抑制することを報告した<sup>17)</sup>。さらにZimmermannらはコラーゲン溶液とラット新生仔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作製した3次元心筋組織を心筋梗塞モデルへ移植したところ、移植組織が不整脈を誘発することなく正常心筋と電氣的に結合することを明らかにした。さらに左心室収縮能が改善し、

左心室拡大も抑制されることを示した<sup>26)</sup>。

我々も種々の細胞シートを使用し心機能が改善することを示してきた。ラット新生仔心筋細胞から作製した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、グラフト-ホスト間に心筋細胞同士の結合が起こるとともに、それらの細胞間にギャップジャンクションが形成され電氣的な結合が確立されることを示した<sup>27)</sup>。さらに細胞シート移植後2週間において左心室駆出率(EF)が $45.2 \pm 6.9$ から $63.9 \pm 6.6\%$ に改善することが明らかとなった<sup>28)</sup>。また骨格筋より採取した筋芽細胞を用いて筋芽細胞シートを作製し心筋梗塞モデルまたは拡張型心筋症ハムスターへの移植を行ったところ、心筋細胞シート移植と同様に左心室収縮能の改善および左心室拡大の抑制が確認された<sup>29,30)</sup>。さらに脂肪組織由来間葉系幹細胞シートの心筋梗塞モデルへの移植実験においても、心機能が改善することが明らかとなった<sup>31)</sup>。これらに関しては細胞シートから分泌される種々の増殖因子による血管新生の促進や線維化の抑制または幹細胞の誘導に起因する効果と考えられ、細胞シートを不全心筋へ移植することの有効性が示されている。

### 新たな挑戦

我々は再生心筋組織をパッチ様に貼り付けることにより治療するコンセプトに加え、さらに効果的な治療法の開発を目指し、細胞シート工学による新展開として補助ポンプとなりうるチューブ状心筋組織の構築に着手している。これまでの報告ではYostらはチューブ状のコラーゲン組織を作製するデバイスを開発し、バイオリアクターを用い

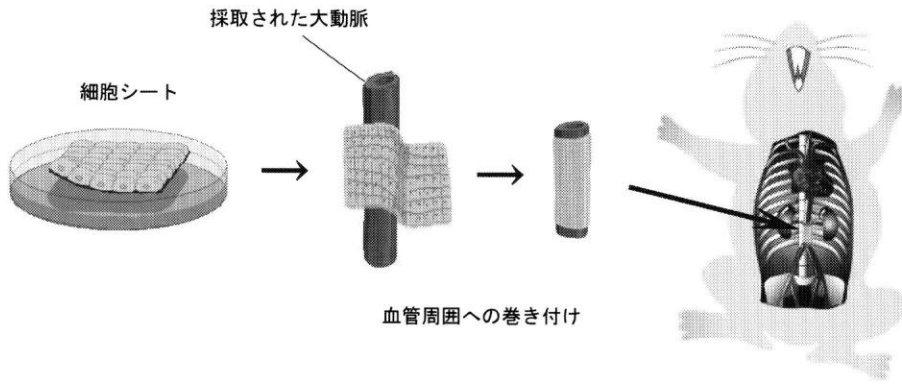


図2 チューブ状心筋組織の作成と腹部大動脈への置換移植

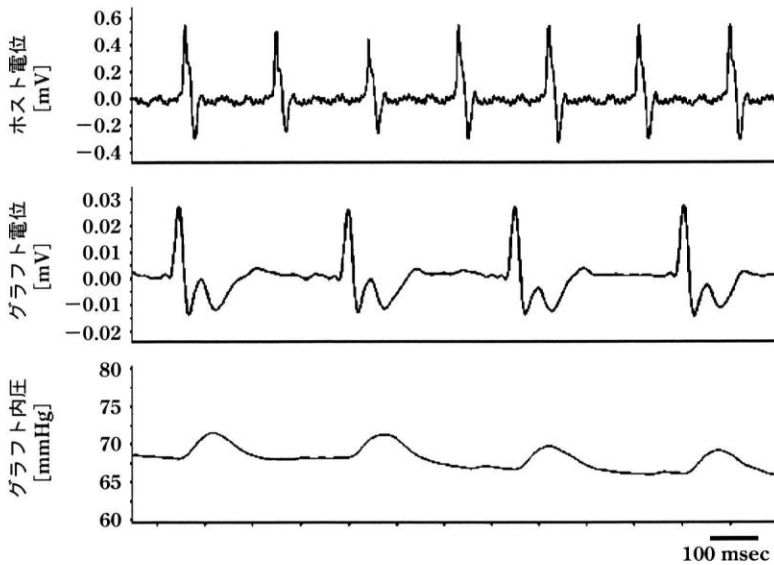


図3 心筋チューブの内圧測定

てそのコラーゲンの管腔にラット心筋細胞を数回に分けて注入することで *in vitro* において自律拍動するチューブを作製できることを示した<sup>32)</sup>。一方、我々は心筋細胞シートを管状化した心筋チューブを作製し大動脈との置換移植を行ったところ、心筋チューブが自律拍動による内圧を生じ、ホストの血行動態に影響を与えることを *in vivo* において初めて示した<sup>33)</sup>。

具体的には、図2に示すように大動脈を採取し、その血管周囲へラット心筋細胞シートを連続的に巻付けることによって管状心筋組織の作製を行った。作製したチューブ状心筋組織をラット腹部大動脈へ置換移植し、電気生理解析、血管内圧測定、組織学解析および遺伝子発現を腹腔内に移植した

コントロール群と比較した。置換移植後4週間に於いてホストとは異なる心筋チューブ単独の自律拍動が肉眼および電位測定で確認できた。内圧測定では図3に示すように平均  $5.9 \pm 1.7 \text{ mmHg}$  の内圧較差が計測された。組織切片では動脈の外周に心筋組織の生着が認められ、規則正しい筋節構造、多量のミトコンドリアまたはデスモソームが確認された。また腹腔内移植群と大動脈置換移植群で比較したところ、その組織厚は腹腔内移植群に対し大動脈置換移植群の場合では有意に増大し、Brain natriuretic peptide (BNP)、Myosin heavy chain (MHC) の遺伝子発現量も明らかに増大することが認められた。これらの結果より、細胞シート工学を用いて作製した再生心筋チューブは生体に類似

した組織構造を示し、さらに *in vivo* での拍動条件下に移植することにより再生心筋組織が成長・肥大することが明らかとなった。また内圧が生じたことはホストの血行動態を変化させうる可能性を示しており、組織再生から臓器再生への先駆けになるものと考えられる。今後、さらに細胞シートを多層化することによって、より厚く収縮力の強い心筋組織を構築することが可能となり、補助ポンプとしての機能を有するような心筋チューブの作製が期待できる。

## おわりに

将来的に循環制御を可能とするようなバイオ心筋チューブの作製には、ヒトに移植可能な心筋細胞の分化・増殖や再生組織内への血管網付与によるスケールアップなど大きな課題を克服する必要があるが、ティッシュエンジニアリングは多面的なアプローチにより飛躍的に進んでおり、心不全に対する治療の選択肢として重要なものとなると予想され、学際的な技術開発により達成しうるものと信じる。

## 文 献

- 1) Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, et al: Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994; 264: 98-101.
- 2) Laflamme MA, Murry CE: Regenerating the heart. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 845-56.
- 3) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279-80.
- 4) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-5.
- 5) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al: Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in ischaemic myocardium (PubMed → myocardial infarcts). *Nature* 2004; 428: 664-8.
- 6) Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al: Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-8.
- 7) Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al: Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-8.
- 8) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-9.
- 9) Harada M, Qin Y, Takano H, et al: G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005; 11: 305-11.
- 10) Menasche P: Embryonic stem cells pace the heart. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1237-8.
- 11) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-76.
- 12) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, 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.
- 13) Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al: Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433: 647-53.
- 14) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-6.
- 15) Zandonella C: Tissue engineering: The beat goes on. *Nature* 2003; 421: 884-6.
- 16) Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al: Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 1999; 100: II63-9.
- 17) Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, et al: Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 2000; 102: III56-61.
- 18) Bursac N, Papadaki M, Cohen RJ, et al: Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. *Am J Physiol* 1999; 277: H433-44.
- 19) Fink C, Ergun S, Kralisch D, et al: Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *FASEB J* 2000; 14: 669-79.
- 20) Christman KL, Fok HH, Sievers RE, et al: Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Eng* 2004; 10: 403-9.
- 21) Kofidis T, de Bruin JL, Hoyt G, et al: Injectable bioartificial myocardial tissue for large-scale intramural cell transfer and functional recovery of injured heart muscle. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128: 571-8.
- 22) Yang J, Yamato M, Kohno C, et al: Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 2005; 26: 6415-22.
- 23) Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al: Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res* 2002; 60: 110-7.
- 24) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, 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: e40-48.
- 25) Shimizu T, Sekine H, Isoi Y, et al: Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets. *Tissue Eng* 2006; 12: 499-507.
- 26) Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, et al: Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 2006; 12: 452-8.
- 27) Sekine H, Shimizu T, Kosaka S, et al: Cardiomyocyte bridging between hearts and bioengineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 324-32.
- 28) Miyagawa S, Sawa Y, Sakakida S, et al: Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: Their integration with recipient myocardium. *Transplantation* 2005; 80: 1586-95.
- 29) Memon IA, Sawa Y, Fukushima N, et al: Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1333-41.
- 30) Kondoh H, Sawa Y, Miyagawa S, et al: Longer preservation of cardiac performance by sheet-shaped myoblast implantation in dilated cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 466-75.
- 31) Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, et al: Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006; 12: 459-65.
- 32) Yost MJ, Baicu CF, Stonerock CE, et al: A novel tubular scaffold for cardiovascular tissue engineering. *Tissue Eng* 2004; 10: 273-84.
- 33) Sekine H, Shimizu T, Yang J, et al: Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering. *Circulation* 2006; 114: I87-93.