

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月21日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22591552

研究課題名（和文） 三次元培養心筋組織の作成：伸展刺激による細胞の配行と成熟、収縮力の増強

研究課題名（英文） Construction of 3D cardiac tissue: alignment and maturation of cells, and improvement of contraction force by extensional stimulation

研究代表者

谷口 繁樹（TANIGUCHI SHIGEKI）

奈良県立医科大学 胸部・心臓血管外科 教授

研究者番号：90183467

研究成果の概要（和文）：

人工心筋組織を作成するためのコラーゲンなど組織作成についての条件設定を行った。購入したコラーゲンを用いて作成した組織より自家製のコラーゲンを用いて作成した組織の方が、組織内の心筋細胞の割合が大きく、カルシウムハンドリングを司る遺伝子の発現も高く、収縮に関連する蛋白の割合が大きかった。また、コラーゲングル内での三次元培養それ自体がES細胞の心筋細胞への分化を誘導することも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Culture condition for constructing artificial cardiac tissue was examined. Housemade collagen increased the ratio of cardiac cells in the tissue, the expression of genes relating calcium handling, and the ratio of protein for contraction compared with commercial available collagen. It was also revealed that three-dimensional culture in collagen hydrogel itself might induce differentiation of ES cells into cardiac cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	700,000	210,000	910,000
24年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：再生医療、組織工学、細胞・組織、心筋細胞、ES細胞

1. 研究開始当初の背景

重症心不全患者に対する新たな治療の可能性を探るという方向性のもと、人工心筋組織が開発され、機能的、生理的に本来の心筋組織に似た性質を持つことが報告されてきた。また、近年では移植に適した形状である人工心筋組織の作成を目的に球状の人工心筋組織の作成が報告されている。

しかし、これまでの報告では球状のガラス玉の周囲に組織を凝集させ作成するという手法を用いていたため、細胞の成熟に不可欠な伸展刺激を与えることができなかった。

今回の検討では球状の人工心筋組織に周期的な伸展刺激を与える事による収縮力の増強、心筋細胞の配行性、成熟についての検討を行うことを目的とした。

2. 研究の目的

今回の検討では球状の人工心筋組織を伸展可能な柔軟なバルーンの周囲で作成し、周期的にバルーンを拡張、収縮させる事によって球状の人工心筋組織全体に伸展刺激を与える。その上で、伸展刺激を与え作成した組織と静的な環境で作成した組織と比較し、細胞の配行性や成熟への影響、また、収縮力の増強に対する効果を検討する。

3. 研究の方法

当初は下記の順序で検討を行う予定であった。

単離した新生児ラットの心筋細胞と液状のコラーゲンを混合し、球状の鋳型に注入し、培養することによって球状の人工心筋組織を作成する。内側の鋳型にはバルーンを用い、チューブを介して人工呼吸器に接続、培養中にバルーンを周期的に収縮拡張させ組織に伸展刺激を与える。組織の発生する収縮力はチューブに圧測定器を組み込み測定する。心筋細胞の成熟、また、細胞の配行性への影響については組織学的検討する。最終的に心筋梗塞を作成したラットの不全心に球状の人工心筋組織を移植し、心機能の改善効果をエコーで経時的に観察する。

しかし、十分な機能を持った心筋組織が作成されなかった為、心筋組織作成に必要な心筋細胞とコラーゲンの混合液の条件の最適化を中心に検討を行うこととした。条件設定の為、混合液に成分となるコラーゲン、馬血清 (HS)、トリ胎児抽出物 (CEE) などの違いによる様々な遺伝子の発現を検討することによって条件の最適化を図ることとした。

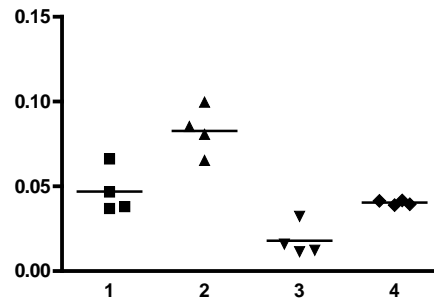
また、最終的には上記の最適化だけでは十分な組織の作成が困難であったため、心筋細胞の分化、成熟を促す添加物についての検討をES細胞を用いて行った。即ち、ES細胞とコラーゲンを混合した細胞混合物を培養することにより三次元の組織を作成した。心筋細胞の成熟に影響を与える可能性があるとして報告されているアスコルビン酸 (Vitamin C; Vit. C) を添加し心筋細胞への分化の効率について α MHC遺伝子の発現を指標に検討した。なお、コントロールとしてES細胞をハンギングドロップ法により培養し比較検討した。

4. 研究成果

下記の如く、自家製もしくは購入したコラーゲン、それぞれ2種類の馬血清 (HS)、トリ胎児抽出物 (CEE) を用いて作成した人工心筋組織から mRNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法で人工心筋組織に関連する様々な遺伝子の発現を定量した。

- 1、自家製コラーゲン、HS-1、CEE-1
- 2、自家製コラーゲン、HS-2、CEE-2
- 3、購入コラーゲン、HS-1、CEE-1
- 4、購入コラーゲン、HS-2、CEE-1

CSQ/GAPDH

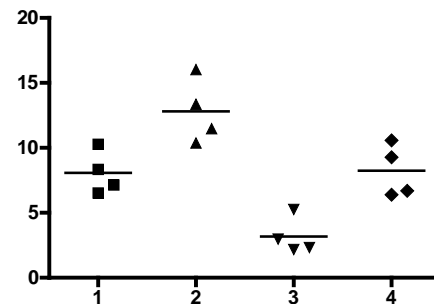


CSQ (calsequestrin) は心筋細胞のマーカーとして用いることの出来る蛋白であるが、上の結果から、自家製のコラーゲンと HS-2、CEE-2 を用いて作成した組織で、組織内で CSQ の発現が高い結果となった。

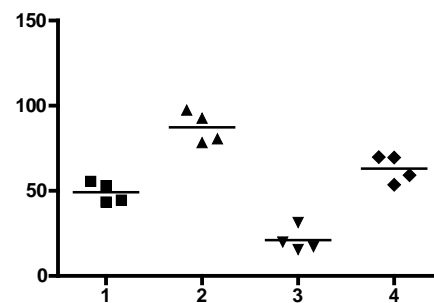
この結果から、コラーゲン、馬血清が心筋細胞の生存率、もしくは、成熟などに影響し、結果として組織内の心筋細胞の割合に影響することが明らかとなった。

続けて、心筋細胞の機能の一つであるカルシウムハンドリングに関する遺伝子 (SERCA2a、PLB: phospholamban) についての検討を行った。下に示すように、

r-SERCA2a/GAPDH



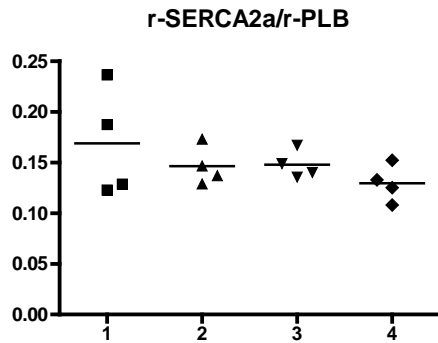
r-PLB/GAPDH



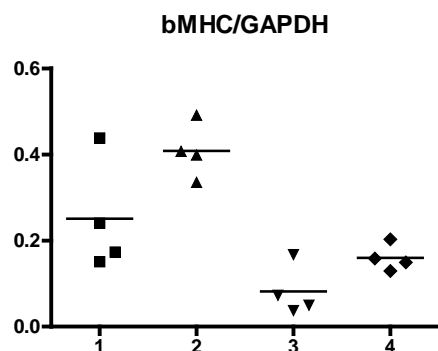
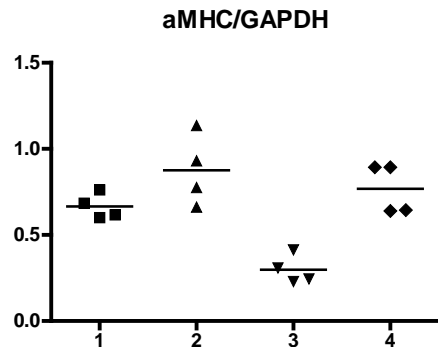
同様に自家製のコラーゲンと HS-2、CEE-2 を用いて作成した組織で SERCA2a、及び、PLB 高い発現を認めた。

細胞のカルシウムに対する反応性は SERCA2a/PLB の比率に関連するとされているが、次に示すように SERCA2a/PLB の比率がこれまでの報告より小さいことも同時に明らかとなった。

この結果が示す、心筋細胞の未成熟さがこの人工心筋組織がカルシウムに対する十分な反応性を持たない原因であると考えられた。

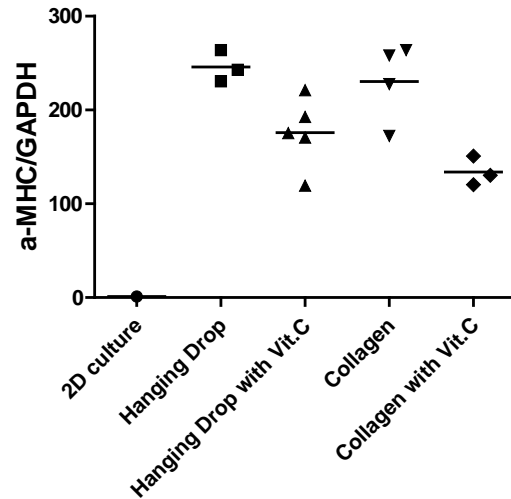


また、収縮に関連する蛋白の遺伝子 (aMHC: alpha myosin heavy chain、bMHC: beta myosin heavy chain) 発現に関しても、下に示すように、



同様の条件で作成した人工心筋組織が高い発現を持つことが分かった。しかし、この発現量もこれまでの報告に比して低く、この条件で作成した人工心筋組織が十分な収縮力を発生しない原因であると考えられた。

これらの結果から、条件の最適化だけでは良好な人工心筋組織の作成が困難であると考え、培養中に薬物を添加し、心筋細胞の生存率を上げる、もしくは、心筋細胞を成熟させる可能性のある物質についての検討を行った。



ハンギングドロップ法での培養と同様に、コラーゲングル内での培養でも、ES 細胞から心筋細胞への分化が aMHC 遺伝子の発現によって確認された。しかし、これまでに心筋細胞への分化を促進すると報告されているアスコルビン酸 (Vit. C) の添加によって aMHC 遺伝子の発現が高くなることは確認されなかった。

しかし、比較として施行した培養皿上での二次元培養 (2D culture) で aMHC 遺伝子の発現を認めなかったことから、コラーゲングル内での三次元培養それ自体に心筋細胞への分化を誘導する可能性があることを示す結果であると考えている。

これらの結果を組み合わせ、良好な球状の人工心筋組織の作成を目的に検討を継続している。

5. 主な発表論文等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 繁樹 (TANIGUCHI SHIGEKI)

公立大学法人 奈良県立医科大学 胸部・心臓血管外科 教授

研究者番号：90183467

(2)研究分担者

内藤 洋 (NAITO HIROSHI)

公立大学法人 奈良県立医科大学 胸部・心
臓血管外科 助教

研究者番号：00316069