

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293276

研究課題名(和文)自己完結型心臓移植に向けた脱細胞化技術を用いた新生心臓の作出

研究課題名(英文)Whole Heart Engineering with Decellularization and in vivo Incubation

研究代表者

五條 理志(GOJO, Satoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90316745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：臓器脱細胞技術の応用の問題点は、脱細胞に続く再細胞化過程における細胞生着は、脱細胞過程による細胞外マトリックスの障害である。この障害を最小にするための界面活性剤の探索を行い、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム(SLES)という界面活性剤が最もその条件を満たすことを見出した。このSLESを用いたブタの心臓の脱細胞プロトコルでの心房移植においては、耐圧性には問題なく、血栓形成も認めることもなかった。現在の脱細胞・再細胞化技術では臓器そのものをin vitroで再現することはできないものの、組織としての利用の可能性は極めて高いことを示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：Whole organ tissue engineering for various organs has demonstrated promising results for end-stage organ failure. However, the sodium dodecyl sulfate (SDS)-based protocol for standard decellularization has drawbacks such as clot formation in vascularized transplantation and poor cell engraftment in recellularization procedures. Preservation of the surface milieu of extracellular matrices might be crucial. We identified a novel detergent, sodium lauryl ester sulfate (SLES), that it could overcome the drawbacks associated with SDS.

Porcine decellularized atrial appendage using SLES could function for a prosthesis material in the same location as the pretreated tissue. On the other hand, whole heart transplantation did not work due to massive thrombus in vessels at the level of the capillary. Present study achieved to improve the decellularization process well to enable the decellularized tissues to be grafted to in situ position.

研究分野：再生医学

キーワード：脱細胞 再細胞化 組織工学 界面活性剤 移植

## 1. 研究開始当初の背景

心臓移植は重症心不全に対する最後の砦としての確固とした地位を築いているが、症例数は、アメリカでは 1990 年ごろより 2000-2500 例でプラトーの状態となり、ヨーロッパでも 2000 年頃より 1000 例程度で横這いとなり、ドナー不足は依然大きな問題で今もなお解決法が模索されている。日本においては、臓器移植法改正後、2011 年の 1 年間の間に心臓移植は 31 症例で実施されているが、待機期間は 900 日を越えている。一方、重症心不全治療の車の両輪と言われる人工心臓治療は、定常流タイプの小型の植込み型補助人工心臓の開発が進み、代表機種である HeartMate II のみの販売実績が 1 年間でアメリカでの心臓移植を上回る程となっている。しかし、人工心臓治療の第一義は心臓移植のブリッジであり、もう一つが徐々に多くなっている長期在宅治療：Destination Therapy である。一時注目を浴びた自己心回復を目標とすること(Bridge to Recovery)は稀な症例数となっている。欧米での Destination Therapy の長期安定性に関しては今後検証されるべき事項であり、多くの機種の Durability は 5 年を 1 つの基準と考えられ、日本でも移植へのブリッジのみが保険償還の条件である。このような状況の中では、現在の心臓移植に代わる受け皿が必要である。

代表者は、Bridge to Recovery(BTR)を目標に、補助人工心臓装着患者に自己骨髄細胞移植を行い一例の人工心臓の離脱症例を経験した(Gojo S, Ann.Thorac.Surg. 2007)。しかしながら、症例を重ねても人工心臓単独治療における BTR と有意差をもって有効であるということを示すことが出来なかった。

研究分担者である八木は、ラットにおいて脱細胞化と再細胞化、および新生肝移植に成功している(Uygun BE 2010)。現在、ブタを対象に全肝を対象に脱細胞化を行い、細胞外マトリックスのみの骨格に様々な細胞を生着させることで新生肝臓の作出を行っている。ラットからブタへのスケールアップを行う上で最も重要な点は微細構造の保持であり、血管床の維持であり、肝細胞及び間葉系幹細胞・前駆細胞を用いた Preseeding の後に、まだ機能的には未成熟の肝臓を生体に移植し肝臓本来の機能獲得を目指している。臓器レベルにおいて脱細胞化が報告されたのは心臓であるが、大動物においては未だ再細胞化・機能獲得の報告はなされていない。問題は、肝臓同様に微細構造の保持と、生理的心肥大をもたらす力学的負荷を掛けられないことによると考えられる。

心臓前駆細胞としてマウス心臓においては Sca-1 (+), Thy-1(+), CD90(+), c-kit(-),

CD34(-), CD31(-)の細胞集団が心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞に分化することを研究分担者らが示し、ヒトにおいても Sphere formation によって同等の細胞を取得できることを報告している。この細胞集団は、心臓の構成細胞のいずれにも分化し得て、かつ、間葉系幹細胞の表面抗原の特徴を有し、脱細胞化心臓骨格の再細胞化にとっては極めて有用であると考え (Kami D, Transplant. Proc. 2014)。また、ヒト心耳由来心臓前駆細胞の高い増殖性によりヒトやブタといったスケールの心臓を Repopulate しうるほどに増幅できることを研究分担者である上が報告している (Kami D, ISSCR 2012)。

その出口としての臨床応用の形態としては、補助人工心臓サポート下にある生体内で新生心臓を作出することである。この自己完結型の新しい臓器移植を大きな目標に見据え、新生心臓作出に向けその課題としてとして挙げられるのは、1) 心臓前駆細胞の生着の至適条件、2) 心臓前駆細胞の分化及び成熟の環境、3) 成体を維持するだけの力学的特性の獲得がある。これらに対して、体外循環の応用、LV Reloading model の大動物への応用をそれぞれの解決への糸口に検討を行いたい。研究代表者は大動物を用いた体外循環の研究では細胞性着に関して LV Unloading が重要であることを報告し、ブタを用いた羊膜細胞の心筋再生治療を報告してきた(Kimura M, J Stem Cells Regen Med, 2012)。小動物における脱細胞・再細胞化による心臓作出は既に報告されており、その Feasibility に関しては日本を含め複数の研究室より出されているが、脱細胞化の方法論には未だ標準化されたプロトコールは存在せず、様々な問題点が指摘されている。

## 2. 研究の目的

我々はラット心臓を用いて脱細胞プロトコールの標準化を確立することを第一の目標とする。具体的には、様々な界面活性剤の中で、より高い細胞外マトリックスを傷害せずに、そこに保持されるサイトカインを除去することなく、再細胞化においては細胞生着率を高めることを目標とする。現在までのプロトコールに使われてきた界面活性剤である Sodium Dodecyl sulfate(SDS)をコントロールに、上記項目がどのように動くかを詳細に検討する。心臓が容量・圧負荷に対して力学的仕事を行うことが特徴として挙げられ、抗張力を含めたより強い組織としての Integrity を必要とすると考え、細胞外マトリックスに対して保護的なプロトコールを確立する。

本研究は生体組織の脱細胞化技術を用いて作製した細胞外マトリックスのみの全心臓骨格に心血管系前駆細胞を生着させた後、

左心室に対する Non-working Model にて移植を行い生着細胞の成熟を促し、追って in vivo にて血液灌流を行いながら左心室への Reloading を行い、臓器としての力学的特性を獲得させる。このことにより、『生体をバイオリアクターとして用いた有効な駆出力を有する心臓の作出』を目的としている。

本方法の現実化によって、臨床への展開として、数十年変わらなかつた臓器移植に新しいスキーム：自己完結型治療としての臓器移植を提供できる可能性がある。重症心不全治療としての人工心臓補助下に、心臓を自己の生体内で作り出すことで、不全心と人工心臓を作出された心臓と置換する心臓移植への道筋を描くことを目指す。

### 3. 研究の方法

#### A. 小動物を用いた至適脱細胞化プロセスの確立

三洋化成工業より複数の界面活性剤を入手して、ラット心臓の灌流モデルにて、その濃度、灌流時間・速度・温度、及び灌流後の洗浄プロセスの組成・時間・速度・温度などをパラメータに、LC-MS を用いた核酸残留濃度を第一の Outcome として検討を行った。

至適核酸除去条件において細胞外マトリックスの組成(Collagen I, IV, Fibronectine, Laminin)の保存状態を確認した。また、電子顕微鏡を用いて、微細構造の保持の程度を観察した。更には、細胞外マトリックスに存在する糖鎖がどのような影響を受けているかを検討するために、Alcian Blue 染色を行い、かつ Glycan array にかけて、親水性分画及び疎水性分画における糖鎖解析を行った。

脱細胞組織の炎症惹起の問題は、使用している界面活性剤の残留に負うところと、その物質自体の反応性の両方に関わっているが、この2つの可能性を検討するために、界面活性剤の残留濃度測定と、invitro 及び in vivo における炎症惹起性を検討した。Invitro においては、血小板付着を LDH release assay にて、in vivo においては CD68 陽性細胞の集積を検討した。

脱細胞化心臓骨格は、ラット頸動静脈に LV non-working model の形で移植され、その Blood Sealing と細胞浸潤の過程を観察した。心外膜の Integrity に関して、肝臓の場合は十分な Integrity が保たれていて、灌流液の漏出は問題にならないとの結果であったが、ラット心臓においてはその Integrity は十分かどうかを検討した。in vivo への移植実験での漏出を規定する因子は外膜の Integrity 以外に灌流圧も大きく寄与してお

り、体血圧が直接かかる移植を想定する心臓においては肝臓及び肺といった報告されている臓器以上に外膜の保持が重要であろうと考えられる。

脱細胞化心臓組織を用いて、胎児心筋細胞、成人心筋細胞、iPS 細胞由来心筋細胞、線維芽細胞をドナー細胞として、invitro において静置培養して細胞の生着状況を観察した。また、灌流により上記細胞を用いて、脱細胞化心臓への細胞の生着を検討した。また、in vivo 移植において問題点として挙げられた血液凝固の問題を解決するために、血管内皮細胞及び内皮前駆細胞の播種の可能性を検討した。

#### B. ブタ脱細胞心臓の移植実験

小動物での至適脱細胞化プロセスの確立を受けて、ブタを用いた脱細胞及び移植実験を行った。脱細胞のための界面活性剤は Sodium Lauryl Ether Sulfate (SLES)を用い、灌流プロトコールは、小動物での至適化で検討を行った界面活性剤の濃度、灌流時間・速度・温度、及び灌流後の洗浄プロセスに用いる薬剤の組成・時間・速度・温度を同様に検討した。

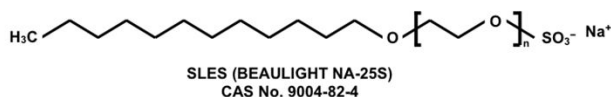
脱細胞化心臓骨格の組織学的な検討は、小動物で行われたように、細胞外マトリックスの組織学的検討と糖鎖構造の観点から検討を行った。

ブタへの移植モデルにおいては、小動物での移植実験において、血液凝固の問題を解決することができておらず、Whole Organ ではなく、その一部である心房組織を組織補填として使用可能かどうか、その後の組織修復がどのように行われるかを病理組織学的に検討を行った。

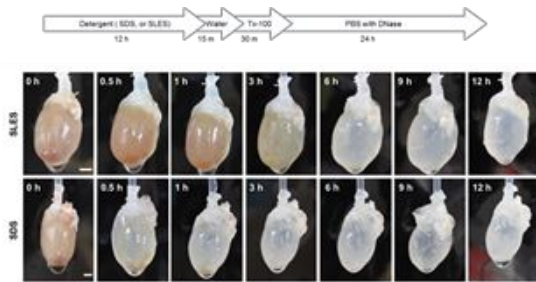
### 4. 研究成果

#### A. 小動物を用いた至適脱細胞化プロセスの確立

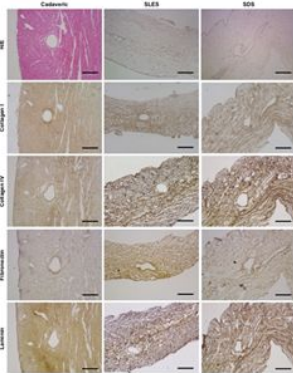
界面活性剤として Whole Organ Tissue Engineering には Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)が用いられてきたが、細胞外マトリックスへの極めて強い障害性が指摘されていた。本研究では、まずこの脱細胞化プロトコールを再細胞化のために至適化するために、界面活性剤の選定から行うこととし、十数種類の化学物質のスクリーニングを行い、最終的に SLES という化合物を選択するに至った。



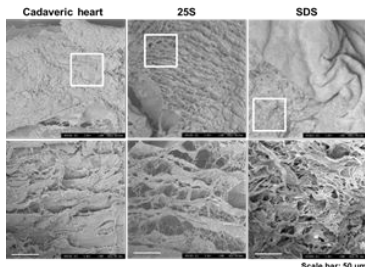
スクリーニングに当たっては、定量が可能なパラメーターとして組織中の核酸の除去、糖鎖の保持、サイトカイン(bFGF)を指標とした。その上で、界面活性剤の濃度・灌流時間・速度・灌流圧・温度及び灌流後の洗浄の薬剤の選択・灌流時間・灌流圧・温度の条件を検討した結果、1% SLES で 12 時間灌流の後、15 分間の蒸留水にて洗浄、Triton-100 にて引き続いて分解され残留している核酸除去を 30 分間行い、DNase を含む PBS にて最後の洗浄を 24 時間行うことで、極めて良好な脱細胞化が行われることが確立できた。脱細胞化プロセスで使用される薬剤の残留は、0.001%と極めて微量であった。



脱細胞化プロセスのコントロールとして SDS を用いたプロトコルを用いて、以下の実験を行った。細胞外マトリックスの中で、心臓において極めて重要な働きをしていると考えられる 4 つのタンパクを免疫染色にて観察を行った。Collagen I, IV, Fibronectine, Laminin の何れにおいても染色強度としては有意な差は認められなかった。このことが、このプロトコルで多くの実験が行われる基盤を与えていると考えられる。



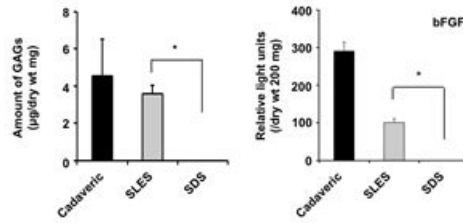
されている一方で、SDS においては完全に破綻しており、脈管構造を呈する部分においては所々において、SLES とは異なり連続性が欠落していた。



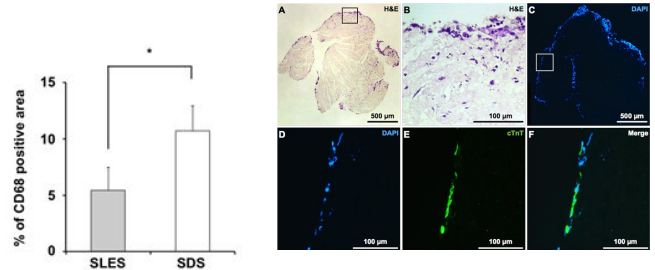
微細構造を検討するために、電子顕微鏡を用いた SEM において両プロトコルでの組織を観察したが、細胞外マトリックスの層状に敷き詰められた構造は、SLES においては保持

また、微細構造はムラが多く、SDS においても細胞外マトリックスが保持されているところ

もあったが、大多数の断面においては細胞外マトリックスの障害が目立ち、SLES においては障害をいずれの断面においても認めることはなかった。



糖鎖を定量化するために GAGs を測定した。SLES 処理群においては、摘出心とほぼ変わらない量の GAGs を維持しているものの、SDS においてはほとんど検出することは出来なかった。また、細胞外マトリックスには様々なサイトカインが保持され、生物反応に役割を果たしているが、bFGF では SLES 処理群においては、摘出心よりは減少するものの、1/3 程度には保持されていたが、SDS ではここでもほぼ認めることができなかった。



脱細胞化心臓組織を in vivo に移植を行い、その反応性を観察したところ、SDS 処理群においては SLES 処理群に対して、炎症細胞のマーカーである CD68 陽性細胞の割合が 2 倍以上の浸潤を認めており、薬剤残留濃度では SLES よりも低い SDS で炎症惹起性が高いことが認められた。また、invitro において心筋細胞の生着を確認したが、SLES ではその組織表面から内部に至る部分にも心筋細胞のマーカーであるトロポニン陽性細胞が確認できた。



脱細胞化心臓骨格をラット頸動脈に LV non-working model にて移植を行い、その Integrity を確認した。血液の漏出はなく、冠

状動脈への血液の灌流も良好であった。しかしながら、数分で肺動脈からの血液灌流が途絶してしまうことが再現性良く確認された。組織像においては、毛細血管レベルにおいて血液凝固が広範囲に起こっていることが原因であることが確認された。脱細胞プロトコルは SLES を用いることで再細胞化にとって至適なものとしてできた。脱細胞組織を in vivo において in

vivo incubator として利用し、組織体を再細胞化するためには血液凝固障害に対処するための方策が必要であることが判明した。内皮化は小口径人工血管の作成においてキーププロセスであり、30 年近く未解決の領域であり、WOTE においても微細構造を如何に保持して構造体を作成しても内皮化が必要であることは、今後の大きな課題である。

## B. ブタ脱細胞心臓の移植実験



ブタ心臓の脱細胞は、肝臓において実績を持っている分担研究者の八木らのシステムを導入して、界面活性剤を小動物でその効果を確認した SLES において実験プロトコルを作成した。SLES の灌流は3日間の時間を要しないと核酸の除去には至らず、その洗浄プロセスを含めると1週間という時間を必要とした。

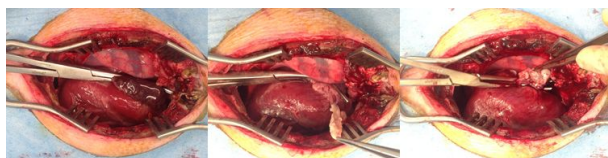
組織学的検討においては、小動物で示されたと同様に、細胞外マトリックスの微小構造は極めて良好に保持され、サイトカインが維持され、糖鎖はほぼ摘出心と同等のレベルで保持されていた。

当初の目的では、脱細胞化心臓組織を in vivo に移植して、生体を in vivo incubator とすることでより効率良く再細胞化プロセスを促進できると仮定していたが、小動物実験において、血液凝固による灌流不全という問題が抽出されたこと、及びこの問題の解決を図るには極めて困難な状況であることより、本研究においては、その方向を変更して脱細胞組織の一部、心房組織を組織補填として使用することでその生体反応を観察し、今後の WOTE に向けての知見の集積に資することを目的とした。

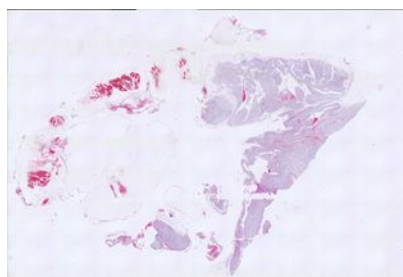


心房組織はマクロ的には Trabecula も保持され、形状もしっかりとした状態で脱細胞された。本組織体を用いて、右心耳及び左心耳の同部位

を切除し、置換する手術を施行した。



手術は心耳をクランプして切除後、トリミングした脱細胞化心耳組織を縫着した。でクランプ後、血液の漏出はなく、心耳内腔に血液が満ちる様を確認された。



1~2ヶ月後に犠牲死の後に心臓を摘出し、その病理組織学的検討を行った。

写真の右側は Native であり、左側が脱細胞組織体である。脱細胞組織には細胞浸潤は極めてわずかであった。しかしながら、心房組織内の血管と思われる管腔構造物には、血球が認められ、血栓は認められなかった。これは、移植後摘出されるまでの間、血管が Patent であったことを示唆するもので、冠状動静脈が血栓にて閉塞した小動物実験とは対照的な結果となった。また、心耳内腔には血栓の沈着は生じておらず、組織補填物としては、極めて良好な材料であることが確認できた。

これらの結果は、より良い脱細胞化プロトコルを確立できたことは大きな成果であり、今後の Whole Organ Tissue Engineering において多くの手がかりを与える結果を残せたと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Kawasaki T, Kirita Y, Kami D, Kitani T, Ozaki C, Itakura Y, Toyoda M, Gojo S. Novel detergent for whole organ tissue engineering to improve implantability of acellular scaffold. Tissue Engineering: Part A. 査読有 2015; 21: S135-6
2. Kawasaki T, Kirita Y, Kami D, Kitani T, Ozaki C, Itakura Y, Toyoda M, Gojo S. Novel detergent for whole organ tissue engineering. J Biomed Mater Res A. 査読有 2015; 103(10): 3364-73

[学会発表](計 5 件)

1. Kawasaki T, Kirita Y, Kami D, Kitani T, Ozaki C, Itakura Y, Toyoda M, Gojo S. Novel detergent for whole organ tissue engineering. TERMIS World Congress 2015; 2015/9/8-11: Boston (USA)
2. Kirita Y., Kawasaki T., Ishida R., Kitani T., Kami D., Adachi T., Gojo S. Novel detergent for organ decellularization can preserve cell surface structures. International

Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting; 2014/6/18-21: Vancouver (Canada)

3. 山南将志、河崎貴宣、上大介、渡辺太治、神田圭一、五條理志、夜久均。自由に設計でき、Shelf Ready Graft として利用可能な異種由来再生型小口径代用血管の開発。第 15 回日本再生医療学会総会; 2016/3/17-19: 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
4. 河崎貴宣, 木谷友哉, 桐田雄平, 上大介, 五條理志。脱細胞化組織を用いた iPS 細胞からの心筋分化誘導。第 13 回日本再生医療学会総会; 2014/3/4-6: 国立京都国際会館 (京都府京都市)
5. 上大介, 桐田雄平, 河崎貴宣, 石田良, 木谷友哉, 足立孝臣, 五條理志。新規界面活性剤による脱細胞化技術の検討 - より良い生体適合性を求めて。第 13 回再生心臓血管外科治療研究会; 2014/2/19: ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 脱細胞化処理液及び脱細胞化組織の製造方法

発明者: 五條理志、上大介、天野善之、杣本千沙

権利者: 京都府公立学校法人、三洋化成工業株式会社

種類: 特許

番号: P10184

出願年月日: 2015/9/5

国内外の別: 日本

取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五條 理志 (GOJO, Satoshi)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 90316745

### (2) 研究分担者

上 大介 (KAMI, Daisuke)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号: 80415588

八木 洋 (YAGI, Hiroshi)

慶応義塾大学・医学部・外科学・助教  
研究者番号: 20327547

的場 聖明 (MATOBA, Satoaki)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 10305576