

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 年度 ～ 2008 年度

課題番号：19591642

研究課題名 (和文)

新しい心不全治療：三次元人工心筋組織の臨床応用を目指して

研究課題名 (英文)

New therapy for heart failure: Engineered heart tissue toward to clinical use

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

研究成果の概要：新生児ラットの心臓から単離した細胞と液状のコラーゲンを混合し、鋳型に注入し培養することによって肉眼で拍動の観察可能な人工心筋組織を作成した。収縮力測定試験ではこれまでに報告されているような収縮力は得られなかったが、その異常の原因が、細胞内のカルシウムハンドリングに関連する異常によるものである可能性を遺伝子発現の検討によって明らかにした。今後の検討によっては、病的な心筋組織のモデルとして利用可能な人工心筋組織作成の可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：心臓大血管外科学、再生医療、心筋再生、組織工学

1. 研究開始当初の背景

近年、重症心不全患者に対する新たな治療として心筋への様々な成長因子の注入療法が試みられ、心機能改善の報告がなされている。今回の研究対象である IGF-1 (insulin-like growth factor-1) についても臨床的に使用され良好な結果が報告されている。しかし、心筋細胞自体に対する直接の効果は明らかではなく、臨床使用をサポートするエビデンスは in vivo 実験における心機能改善効果によっているのが現状である。

一方、in vivo における研究では成長因子などは目的とする細胞のみに作用するわけではなく、様々な臓器に影響を及ぼす可能性があり、心筋細胞に対する直接の効果を検討することは困難である。また、in vitro の報告としては、培養心筋細胞に IGF-1 を添加することによって収縮蛋白の増加や収縮蛋白に関連する遺伝子発現が上昇すること、また、心筋細胞の肥大化を示す結果は示されているが、心筋細胞の収縮力に対する影響を論じた報告はない。これは in vitro の研究では

生化学的、遺伝子学的な検討は可能であるが、収縮力そのものの測定が近年まで困難であったことに起因すると考えられる。IGF-1の心筋細胞の収縮力に対する直接の効果を検討することは重大な意義を持つと考えられるが、これまでは *in vitro* において IGF-1 等、成長因子などの心筋細胞の収縮力に対する直接的な影響を簡便に検討し得る実験系は存在しなかった。

2. 研究の目的

近年、ティッシュエンジニアリングによる再生医療に関連し人工心筋組織 (Engineered Heart Tissue: EHT) が開発され、ラットの心筋梗塞部に移植することによる心機能改善効果が報告されている。EHT は機能的、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おり、*in vitro* で心筋組織の収縮力を比較的容易に測定することが可能であるという利点もある。従って、今回の目的とする IGF-I 等の様々な成長因子や薬剤の心筋細胞の収縮力に対する直接の効果を検討することにおいて、EHT は理想的な実験系であると考えられる。

今回の目的は、IGF-1 の心筋細胞の収縮力に対する直接の影響を *in vitro* 人工心筋モデルである EHT を用いて明らかにすることである。これまでの EHT による報告は EHT を開発した海外のグループからのものが殆どであり、同様の機能を持つ人工心筋組織の作成に成功したという報告は殆ど無い。従って、まず、安定して EHT を作成することを目標とし、その後、IGF-1 の心筋細胞の収縮力に対する直接の影響についての検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 人工心筋組織の作成

人工心筋組織作成の方法については、これまでに開発グループによって報告されてきた方法を踏襲して行う。

新生児 Wistar ラットから清潔操作にて心臓を摘出する。心臓をハサミで細分化した後 PBS(-) で洗浄し、トリプシンで細胞を単離する。単離した細胞 (2.5×10^6 個)、Wistar ラットの尾から抽出したタイプ I コラーゲン、2 倍濃度の培地を混合、NaOH で pH を調節した心筋細胞混合物を作成する。同混合物をドーナツ型の鋳型 (内径 8 mm、外径 16 mm、高さ 5 mm) に注入し、約一時間の 37°C インキュベーターによるゲル状化の後、培地 (DMEM、10% 馬血清、2% 鶏胎児抽出物、ペニシリン・

ストレプトマイシン) を追加し培養を開始する。培地交換は培養 1、3、5 日目に行い、7 日目以降は周期的な拡張刺激 (10% の拡張、2 Hz) を与えるストレッチャーに移動し、その後は毎日の培地交換の上 12 日目まで培養を続けた。

(2) 検討の方法

① 肉眼および顕微鏡による観察

連日、肉眼および顕微鏡下に観察し、組織の凝集、拍動の様式・範囲、拍動の周期などについての観察を行う。

② 収縮力測定試験

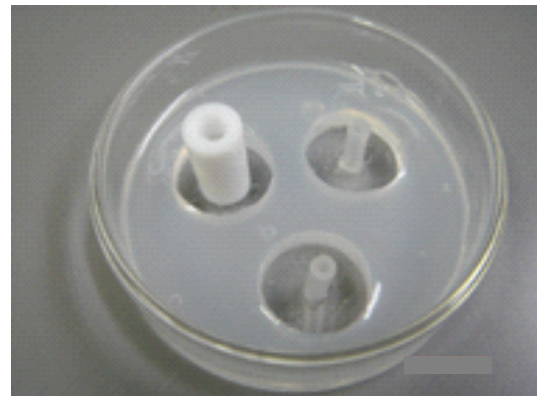
37°C の通気した Tyrode 液中で初期長を変えて収縮力を測定し最適な長さを決定した後、等尺性収縮力測定を行った。外液中のカルシウム濃度 (0.2 mM から 2.8 mM) を変化させた時の収縮力を測定する。

③ 遺伝子発現の定量

EHT より RNA を抽出、RT で cDNA を作成し、real-time RT-PCR を行い、様々な遺伝子の発現量を定量する。

4. 研究成果

写真のような鋳型に細胞とコラーゲンの混合物を注入することによって、組織を作成した。

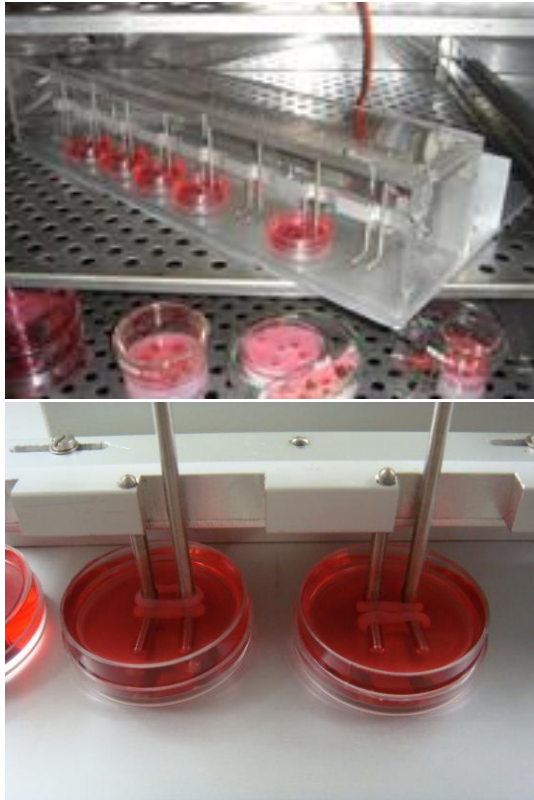


① 肉眼および顕微鏡による観察

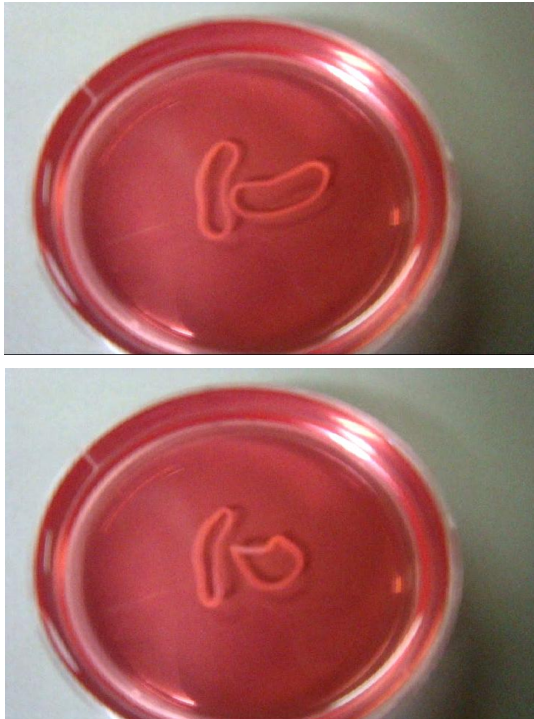
単離した心筋細胞と液状のコラーゲンの混合物は、約 1 時間、37°C のインキュベーターによってゲル状化し、培地を加えても崩壊しなかった。

最初は単離されたまま静止していた細胞が、培養 2 日目頃より自己拍動を開始し、徐々に近傍の細胞と一体化し拍動する様子が顕微鏡下に観察された。

培養 7 日目には心棒の周囲に凝集し、形状が保たれる強度を持つ組織が出来上がったため、ストレッチャーに移動し培養を続けた。

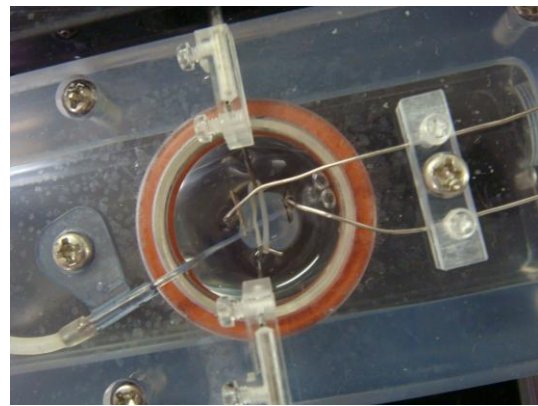
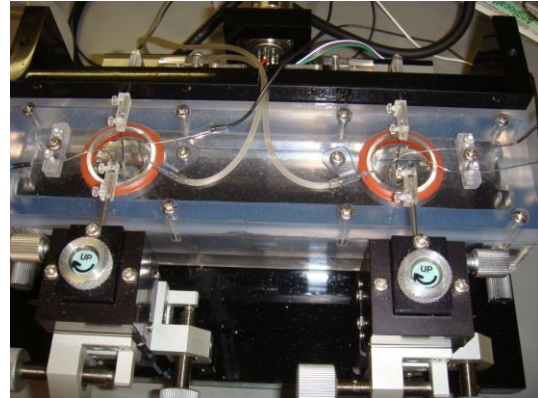


周期的な伸展刺激によって、さらに拍動が大きくなり、培養 12 日目には肉眼で拍動を観察する事が可能となった。写真上が拡張している組織で、下が収縮している組織である。

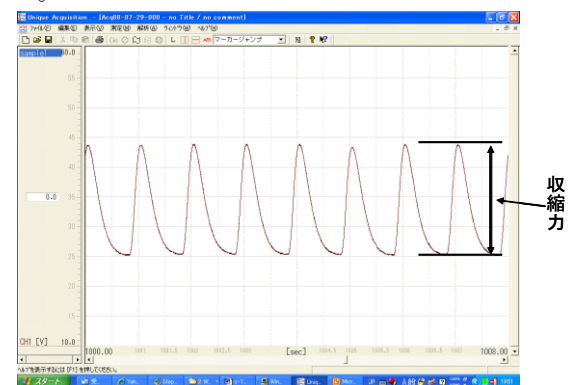


②収縮力測定試験
収縮力測定試験は、写真のようなオルガン

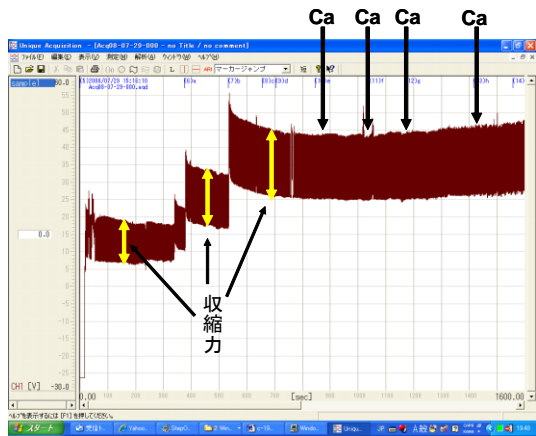
バスを用いて施行した。写真下のような収縮力を測定するセンサーに接続されたアームに組織を固定し、組織を挟む電極から電気刺激を与え、ペーシング下に収縮力を測定した。



以下に収縮力測定試験の結果を示す。グラフ下が拡張期にセンサーにかかる力、上が収縮期にセンサーにかかる力であり、その差が組織の発生させる収縮力となる。1 Hz のペーシングに刺激された収縮力が測定され、最大 0.5 mN 程度の収縮力の発生を認めた。



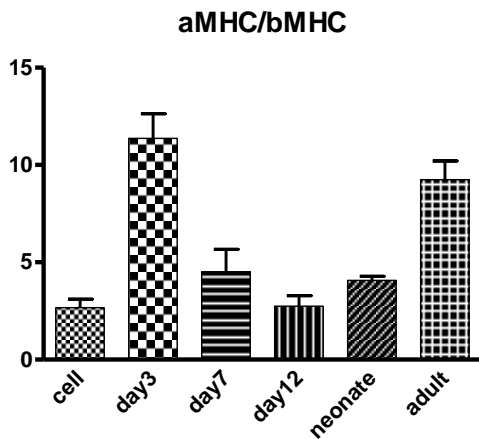
また、アーム間の距離を長くすることによる収縮力の上昇（フランク・スターリングの法則）を認めた。しかし、Tyrode 液中のカルシウム (Ca) 濃度を上昇させることによる収縮力の上昇は認めなかった。



③遺伝子発現の定量

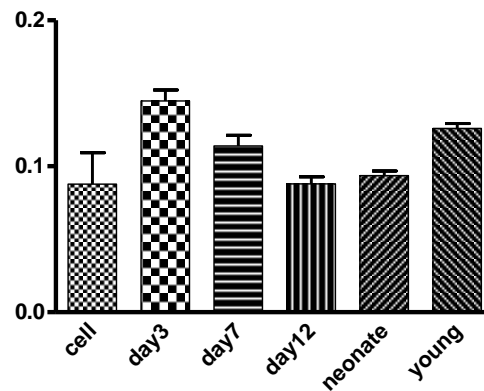
収縮力の絶対値が小さい、カルシウム濃度上昇による収縮力の上昇が認められない原因が組織の発育に問題があるのではないかと考え、組織内の様々な遺伝子の発現についての検討を行った。

まず、MHCについての検討の結果を示す。alpha-MHC (aMHC) は胎児型、beta-MHC (bMHC) は成体型の MHC とされており、これまでの報告では組織の発育と共に急速に胎児型から成体型に変化するとされてきた。しかし、今回の検体では培養の継続と共に aMHC の bMHC に対する割合が低下、即ち、成体型の割合が低下していることが明らかとなった。



同様に細胞内でカルシウムハンドリングを司っている SERCA2a と PLB (Phospholamban) の比率も培養の経過と共に低下し、これが、カルシウムに対する反応性を低下させている原因となっているのではないかと考えられた。

SERCA2a/PLB



④まとめ

今回の検討では、新生児ラットの心臓から単離した細胞と液状のコラーゲンを混合し、鋳型に注入し培養することによって肉眼で拍動の観察可能な人工心筋組織を作成することに成功した。収縮力測定試験ではこれまでに報告されているような収縮力は得られなかったが、その異常の原因が、細胞内のカルシウムハンドリングに関連する異常によるものである可能性を人工心筋組織の遺伝子発現の検索によって明らかにした。

現在は上記のような所見を考慮し、正常な心筋組織の作成条件を決定すべく至適な培養条件を探っている。条件設定が終了し、安定した組織の作成が可能となれば、様々な検討に利用可能な人工心筋組織を安定して作成できる可能性を持つ。

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)

[学会発表] (計4件)

内藤 洋、東条 尚、木村通孝、長田陽子、谷口繁樹、層構造を持った人工気管組織の作成、第24回日本呼吸器外科学会総会、2007年5月、横浜

内藤 洋、東条 尚、木村通孝、長田陽子、河合紀和、谷口繁樹、Tissue Engineering により作成した人工気管組織を用いた気管移植術、第60回日本胸部外科学会総会、2007年10月、仙台

Hiroshi NAITO, Takashi TOJO, Michitaka KIMURA, Yoko NAGATA, Norikazu KAWAI, Shigeki TANIGUCHI, REGENERATION OF TRACHEA USING TISSUE ENGINEERING TECHNOLOGY, 12th Congress of the APSR, 2 Dec 2007, Gold Coast

内藤 洋、土肥祥子、東条 尚、木村通孝、長田陽子、河合紀和、谷口繁樹、三次元培養

法によるコラーゲンゲル内における骨髄間
葉系幹細胞の骨分化、第7回日本再生医療学
会総会、2008年3月、名古屋

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 医学部
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 医学部
助教
研究者番号：00316069