

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790978

研究課題名 (和文)

人工心筋組織移植による心筋梗塞治療：移植に最適な人工心筋組織の新たな開発

研究課題名 (英文)

Construction of optimal shape engineered heart tissue for myocardial infarction

研究代表者

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

研究成果の概要：球状の鋳型に新生児ラットの心臓から単離した心筋細胞と液状のコラーゲンの混合物を注入することによって、球状の人工心筋組織を作成することに成功した。これまでは外側の鋳型をアガロースゲルで作成していたため、人工心筋組織作成のたびに鋳型も作成する必要があった。しかし、今回の検討では、より簡便にポリプロピレン製のコニカルチューブを外側の鋳型として用いても球状の人工心筋組織の作成が可能であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	0	2,800,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	180,000	3,580,000

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、再生医療の一つとして、人工心筋組織を作成し、心筋梗塞後などの不全心に移植することによる心機能回復の可能性についての検討が様々な組織において行われている。その一つとして、人工心筋組織 (Engineered Heart Tissue: EHT) が開発され、EHT が機能的、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いる。また、EHT の心筋梗塞作成後のラットに移植することによる心機能改善効果についても報告されている。

EHT は新生児ラットの単離心筋細胞とコラーゲンの混合物を鋳型に注入することにより作成される。同混合物の培養により組織が形成され、周期的な伸展刺激を与える事によ

り組織がより成熟し、収縮力を発生する人工心筋組織を作成することができる。しかし、この人工心筋組織は当初の目的が、薬剤の心筋細胞に対する影響を検討するための *in vitro* での人工心筋モデルであったこともあり、移植に適した形状であるとはいえない。

2. 研究の目的

今回の研究の目的は、まず、

(1) 移植に適した形状である球状の人工心筋組織を簡便に作成する方法について検討する。

続いて、

(2) 心筋梗塞を作成したラットに移植し、人工心筋組織の移植による心機能改善効果について検討する。

ことである。

心筋梗塞後早期に、梗塞心筋部を全体的に被覆することのできる形状をした、能動的な収縮性に優れた厚みのある人工心筋組織を移植することにより、remodelingの回避により心筋梗塞部以外の心機能が維持され、同時に、移植された人工心筋組織の能動的な収縮によって心筋梗塞部局所の収縮力が改善し、心臓全体とした心機能の改善が見込まれる。

3. 研究の方法

(1) 球状の人工心筋組織の作成

① 鋳型の変更

これまでの報告では、球状の人工心筋組織の作成には外側の鋳型はアガロースゲルが用いられてきた。しかし、この方法では、組織作成のたびに鋳型から作成する必要があるため、再利用可能な鋳型をとしてポリプロピレン製のコニカルチューブを外側の鋳型として用いる可能性について検討する。

② 組織の作成

人工心筋組織は従来報告されてきた方法を基本的には踏襲し、改良を加えて作成した。

即ち、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、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。前述の鋳型に注入し、約 2 時間の 37°C インキュベート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) を追加し培養した。

(2) 組織の評価

① 収縮力測定試験

今回の検討の目的が球状の人工心筋組織を移植することによる梗塞心筋の機能改善であるため、人工心筋組織は本来の心筋に類似した機能を持つ必要がある。従って、収縮力測定試験を行う。

具体的には、37°C の通気した Tyrode 液中のカルシウム濃度を変化させ、等尺性収縮力測定を施行する。

② 遺伝子発現の定量

組織から 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

(1) 球状の人工心筋組織の作成

① 新しい簡便な鋳型

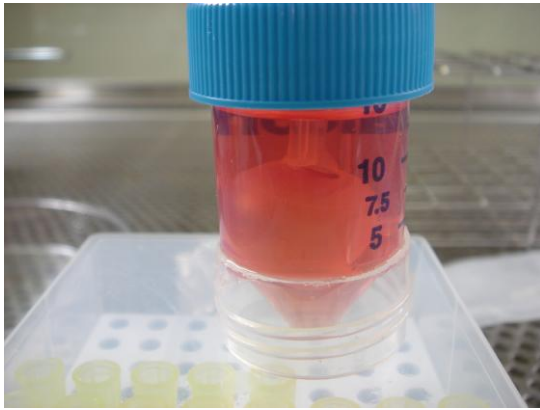
切断したポリプロピレン製のコニカルチューブ内に直径 15 mm のガラス球を固定し、球状の鋳型を作成した。



② 組織の作成

この鋳型に新生児ラットの心臓から単離した心筋細胞と液状のコラーゲンの混合物を注入した。約 2 時間、37°C でインキュベートすることによってゲル状化し、ゲル状化した組織は培地を上から加えても崩壊することはなかった。

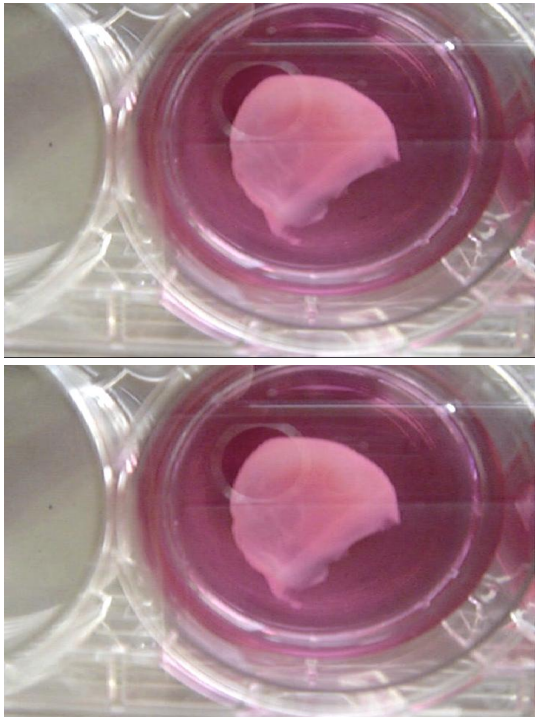
培養の継続と共にゲル状化した組織は徐々に中心のガラス球の周囲に凝集した。



組織は鑄型から外しても袋状の形状は保たれていた。



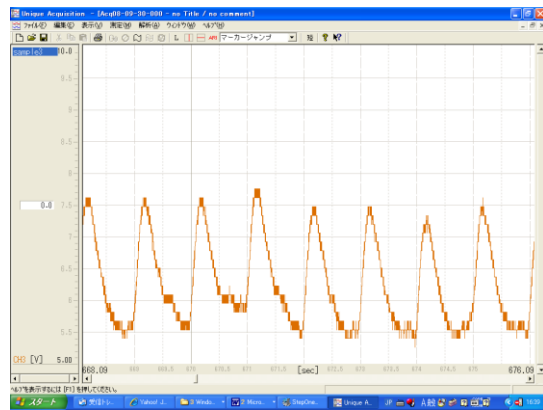
周期的な拍動は肉眼的に観察可能であった。
(上の写真：収縮期、下の写真：拡張期)



(2) 組織の評価

①収縮力測定試験

まず、同じ心筋細胞とコラーゲンからなる混合物から作成した従来型の輪ゴム状の人工心筋組織の収縮力測定試験を施行した。

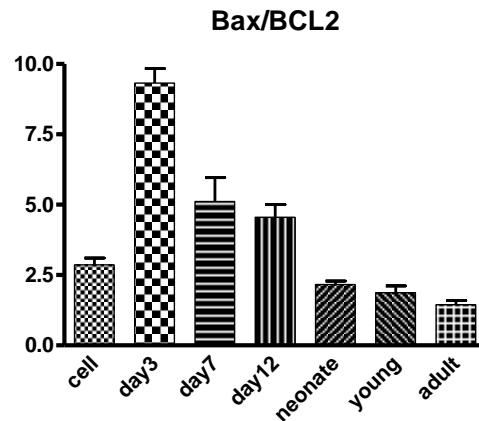


収縮力の測定は可能であったが、収縮力の絶対値がこれまで報告されて来たものより小さい、また、細胞外カルシウム濃度が上昇しても収縮力の上昇が確認できないなどの問題点が明らかとなった。球状の人工心筋組織でも全く同じ細胞とコラーゲンの混合物を使用しているため、同様の異常が発生しているものと考えられた。従って、球状の人工心筋組織の収縮力測定の前に混合物の異常の原因解明、改善を図る方針とした。

②遺伝子発現の定量

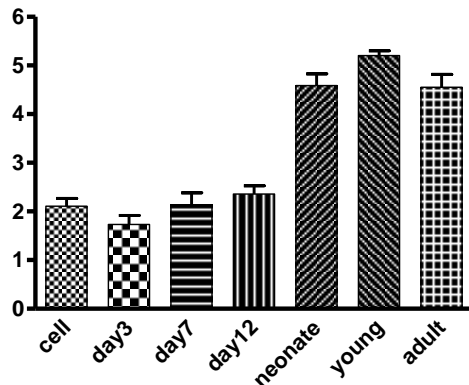
輪ゴム状の人工心筋組織をサンプルとし検討を行った。

培養条件の異常により過剰な細胞死が起こることによって細胞数が減少し、収縮力が低下している可能性について検討した。しかし、アポトーシスの指標となる Bax/BCL2 の比率は培養の継続と共に低下し、培養条件の異常は示唆されなかった。



しかし、細胞の単離の過程で失われた alpha-MHC (aMHC) は本来なら培養の継続と共に回復してくるはずであるが、今回の検体では回復が見られないなどの問題点が明らかとなった。

aMHC/GAPDH



(3) まとめ

球状の鋳型に新生児ラットの心臓から単離した心筋細胞と液状のコラーゲンの混合物を注入することによって、球状の人工心筋組織を作成することに成功した。これまでは外側の鋳型をアガロースゲルで作成していたため、人工心筋組織作成のたびに鋳型も作成する必要があった。しかし、今回の検討では、より簡便にポリプロピレン製のコニカルチューブを外側の鋳型として用いても球状の人工心筋組織の作成が可能であることを示した。

遺伝子発現についての検討で、組織の発育に問題がある可能性が示唆された為、現在は輪ゴム状の人工心筋組織を用いて正常な人工心筋組織作成の条件設定を継続している。

今回の検討で簡便に球状の人工心筋組織を作成する方法を見出したため、輪ゴム状の人工心筋組織で条件設定が済めば、正常の機能を持つ球状の人工心筋組織も作成が可能であると考えられる。

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)

[学会発表] (計4件)

- ① 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
- ② 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

③ 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

④ 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

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