

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成21年度～平成22年度

課題番号：21791329

研究課題名（和文） 幅広い応用力を秘めた三次元培養心筋組織作成の試み

研究課題名（英文） Cardiac tissue engineering by 3D-culture in collagen hydrogel

研究代表者

内藤 洋 (NAITO HIROSHI)

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（和文）：

三次元人工心筋組織を作成する為の至適な培養条件（コラーゲンの種類やマトリゲル使用の有無）について検討した。自家製のコラーゲンをを用い、マトリゲルを使用した組織が、これまでに報告されてきた人工心筋組織に近い性質を持つことが明らかとなった。しかし、収縮力が小さい、カルシウムに対する反応性が乏しいなどの問題は残存しており、コラーゲンやマトリゲル以外の条件の最適化が必要なことも同時に明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The optimum culture conditions (type of collagens, with or without use of Matrigel) for constructing artificial three-dimensional cardiac tissue were evaluated. The condition of using home-made collagen and Matrigel was found to have properties similar to the artificial myocardial tissue which have been reported. However, the problems of small contraction force and poor responsiveness to calcium are remaining. It still needs to optimize culture conditions in addition to collagen and Matrigel.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究代表者の専門分野：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、組織工学、心筋再生

1. 研究開始当初の背景

近年の再生医療に関連した研究の一つとして、*in vitro* で薬剤などに対する心筋の反応などをシミュレートすることを目的とした人工心筋組織の作成が様々な研究機関において試みられている。

これまで薬剤や成長因子などの心筋細胞

に対する直接的な効果については *in vitro* で培養心筋細胞を用いて検討されてきた。それらにおいては、心筋細胞のもっとも重要な機能である収縮力に対する効果を論じた報告は少なく、間接的な結果である蛋白や関連する遺伝子の変化、また、細胞の肥大化など生化学的、遺伝子学的に検討され、報告され

ている。これは *in vitro* の研究では収縮力そのものの測定が困難であることに起因するのではないかと考えられる。これらのことから、薬剤や成長因子などが心筋細胞の収縮力に対する直接的な影響を *in vitro* においての簡便に検討し得る実験系の開発が望まれる。

近年、ドイツのグループによって開発された人工心筋組織 (Engineered Heart Tissue: 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きた。EHT は *in vitro* で心筋組織の収縮力を容易に測定することが可能であるという極めて大きな利点があるにも関わらず、一般的に使用されるほどの広がりを見せていない。実験系が広く使用されるためには、どのような施設においても簡便に再現性を持って、安定した結果が得られる必要があるが、EHT には実験の安定した施行が困難であるという欠点がある。

これまでの報告からすると極めて理想的な人工心筋組織であると考えられるため、EHT の日本での作成を目的に約 2 年前より研究を行ってきた。

2. 研究の目的

細胞培養を含む実験系では牛胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) など unknown な要素が除外できず、一旦培養条件の設定に手間取ると修正が極めて困難になることが起こり得る。

これまでの検討で、肉眼での EHT の拍動は確認出来ているが、収縮力自体が報告されているものより弱い、カルシウムに対する反応性が乏しい、などの問題点が残存している。

今回の検討では *in vitro* で薬剤や成長因子などの心筋細胞に対する直接的な効果を検討するための人工心筋組織 (EHT) を作成する為の至適な培養条件を決定する事を目標とした。

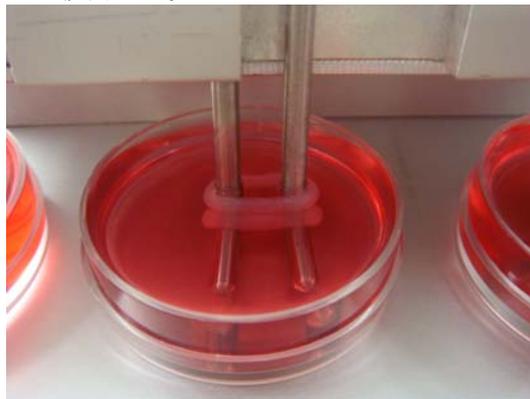
3. 研究の方法

EHT を作成するのに使用する素材を変更し、至適な培養条件を検討した。

従来、EHT に使用するコラーゲンは自ら抽出した物が望ましいと報告されてきた。しかし、この実験系が一般に広がるためには、購入可能な製品の使用が望ましい為、入手可能な製品での比較検討を行った。また、様々な成長因子や細胞外マトリックスの混合物であるマトリゲルの添加についても同時に検討を行うこととした。

以下に EHT 作成手順を示す。生後 2-3 日

目の新生児 Wistar ラットから心臓を採取、洗浄し、トリプシンで細胞を単離する。単離した細胞とタイプ I コラーゲンと混合し、心筋細胞混合物を作成した。同混合物をドーナツ型の鋳型に注入し培養、培養 7 日目に周期的な拡張刺激を与えるストレッチャーに移動し (写真)、培養 12 日目に等尺性収縮力測定試験を行った。その後、組織をサンプリングし、RNA を抽出、real-time RT-PCR で培養条件による様々な遺伝子の発現の違いについて検討した。



組織の拍動については経時的に肉眼的、顕微鏡的に観察した。

real-time RT-PCR では Calsequestrin (CSQ: 心筋細胞のハウスキーピング遺伝子) の発現を GAPDH (ハウスキーピング遺伝子) の発現で標準化することによって全細胞数中の心筋細胞の割合を検討した。続いて、心筋細胞数に違いがあったため、細胞数の違いの原因を検索するために、これまでのアポトーシスによる細胞数減少の報告を参考に、アポトーシス関連の遺伝子である Bax/BCL2 の割合を検討した。また、収縮関連蛋白については成人型である α -MHC 遺伝子、胎児型である β -MHC 遺伝子の発現を測定し、カルシウムに対する反応性の問題についての検討を加えるため、細胞内でカルシウムハンドリングに関連する SERCA 及び phospholamban (PLB) の発現量を測定した。

(検討を行う項目)

3 種類のコラーゲンについて検討した。全てラット由来のコラーゲンである。

- 1、自家製 (H.M.)
- 2、Invitrogen 社製 (Inv.)
- 3、Becton Dickinson 社製 (BD)

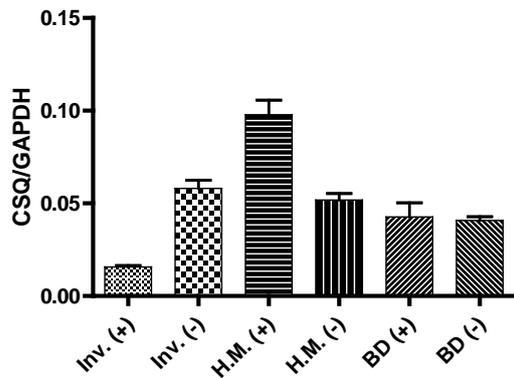
上記の 3 種類のコラーゲンを使い、マトリゲルの添加の有り、無し、を加えた 6 条件で人工心筋組織を作成した。

4. 研究成果

顕微鏡的に培養初期には細胞の拍動が観

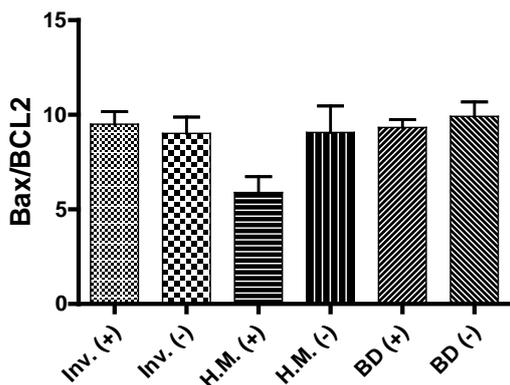
察され、培養の継続と共に一体化した拍動、また、収縮力測定を行う時期には肉眼的にも拍動が確認できる組織が形成された。しかし、自家製のコラーゲンをを用いた組織では、ほぼ全ての組織で測定が可能な収縮力を発生していたのに対して、購入したコラーゲンをを用いて作成した組織では約半数で収縮力の測定が出来なかった。それらの収縮力は報告されているものより小さく、また、全ての組織において本来持つはずであるカルシウムに対する収縮力の上昇も認めなかった。

real-time RT-PCR による培養条件による様々な遺伝子の発現の違いについての検討結果を以下に示す。



心筋細胞のハウスキーピング遺伝子である CSQ の発現は、自家製のコラーゲンをを用い、同時にマトリゲルを使用した組織で最も高く、同条件で作成した組織で心筋細胞の割合が多くなることが明らかとなった。

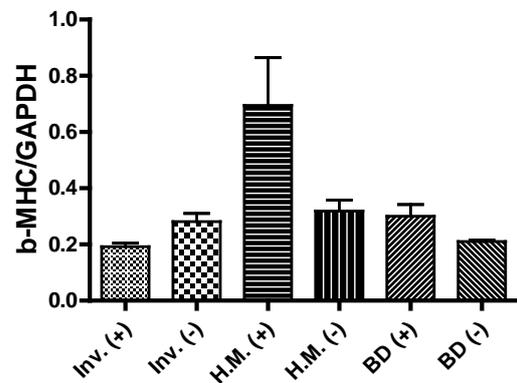
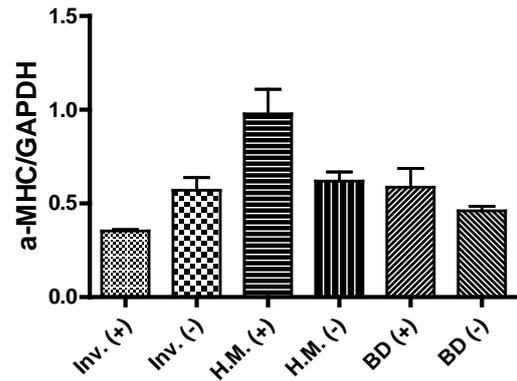
アポトーシスについて検討すると、



以上のように、自家製コラーゲン+マトリゲルの条件では Bax/BCL2 の割合が低く、アポトーシスが抑制されていることが明らかとなった。

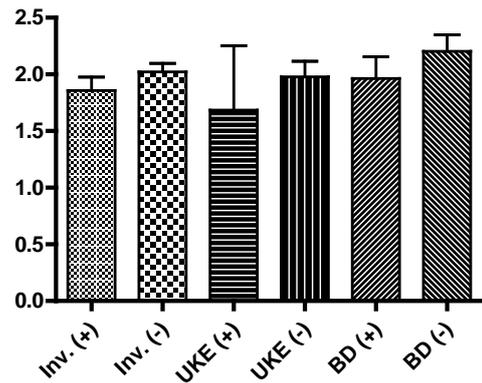
続いて、収縮タンパクである MHC 遺伝子に

る β -MHC の発現について検討した。

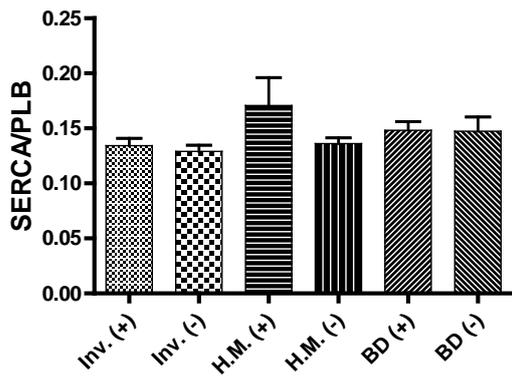


結果的には自家製コラーゲン+マトリゲルの条件で成人型、胎児型共に最も発現が高いことが明らかとなった。

a-MHC/b-MHC



しかし、組織の培養を継続することによって、心筋細胞が成熟し、それに伴い a-MHC の割合が上昇するとこれまで報告されているのに反して、今回の検討では培養条件による違いは認められなかった。



カルシウムハンドリングに関連する遺伝子についても同様に、自家製コラーゲン+マトリゲルの条件がこの中では望ましい結果であったが、それでもこれまでの報告よりは PLB に対する SERCA の割合が低く、このことがカルシウムに対する収縮力の反応性が乏しい原因であることが明らかとなった。

(まとめ)

今回の検討では、従来報告されているのと同様に自家製のコラーゲンを用い、マトリゲルを使用した組織が、これまでに報告されてきた人工心筋組織に近い性質を持つことが明らかとなった。しかし、収縮力が小さい、カルシウムに対する反応性が乏しいなどの問題は残存しており、コラーゲンやマトリゲル以外の条件の最適化が必要なことも同時に明らかとなった。

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 Naito H, Tojo T, Kimura M, Dohi Y, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Taniguchi S. Engineering bioartificial tracheal tissue using hybrid fibroblast-mesenchymal stem cell cultures in collagen hydrogels. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2011 Feb;12(2):156-61.
- ② Naito H, Dohi Y, Zimmermann WH, Tojo T, Takasawa S, Eschenhagen T, Taniguchi S. The Effect of Mesenchymal Stem Cell Osteoblastic Differentiation on the Mechanical Properties of Engineered Bone-like Tissue. *Tissue Engineering Part A*. in press

[学会発表] (計 2 件)

- ① Hiroshi Naito, Takashi Tojo, Michitaka Kimura, Yoshiko Dohi, Wolfram-Hubertus Zimmermann, Thomas Eschenhagen, Shigeki Taniguchi. Engineering Bioartificial Tracheal Tissue Using Hybrid Fibroblast-Mesenchymal Stem Cell Cultures in Collagen Hydrogels. 2010, 24th EACTS Annual Meeting.
- ② 内藤 洋、土肥祥子、東条 尚、木村通孝、谷口繁樹。間葉系幹細胞の骨分化におけるコラーゲン内での三次元培養の有用性。2010年、第9回日本再生医療学会総会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 洋 (NAITO HIROSHI)

奈良県立医科大学 医学部 助教

研究者番号：00316069