慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	New Method for Manufacturing Cardiac Cell Sheets Using Fibrin-Coated Dishes and Its Electrophysiological Studies by Optical Mapping.
Sub Title	フィブリン塗布培養皿を用いた心筋細胞シートの作成法および電気生理学的検討
Author	板橋, 裕史
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.4 (2005. 12) ,p.12-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20051202-0012

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

A New Method for Manufacturing Cardiac Cell Sheets Using Fibrin-Coated Dishes and Its Electrophysiological Studies by Optical Mapping.

（フィブリン塗布培養皿を用いた心筋細胞シートの作成法および電気生理学的検討）

板　橋　　裕　史

内容の要旨

工学と生命科学の協力によって著しい発展を遂げている組織工学の研究分野において、近年斬新な手法として細胞シート工学が注目されている。

今回われわれはフィブリン塗布培養皿を用いて簡便に細胞シートを作製する手法を新たに開発した。フィブリノーゲンとトロンビンの溶解液を混合後、直ちに細胞培養皿に塗布し培養皿の表面で重合させることによりフィブリン塗布培養皿を作製した。新生仔ラットの心室筋を用い、上述の培養皿上で心筋細胞の初代培養を行った。培養皿の表面にコーティングされた薄いフィブリン層は心筋細胞が分泌するタンパク分解酵素により徐々に分解され、次第に心筋細胞と培養皿表面の結合が疎となってゆく。4日後には膜状に連結した心筋細胞を容易に剥離することが可能となり、心筋細胞シートを回収することができた。次に2枚の心筋細胞シートを用い、その一部を重ね合わせた状態で培養を継続すると、2枚の心筋細胞シートは同期した自律収縮を行うようになった。電位感受性色素di-4ANEPPSを用いたオプティカルマッピング法を用いて、活動電位が心筋細胞シート間を伝播する様子を詳細に検討した。3日間の共培養期間を設けることによって2枚の心筋細胞シート間には安定した電気的結合が形成されることが観察された。免疫組織学的解析により、シート内の個々の心筋細胞間にはコネキシン43の発現が確認されたことから心筋細胞シート内および心筋細胞シート間でギャップ結合が形成されていることが推測された。3層に重ねた心筋細胞シートをヌードラットの皮下に移植し2週間後に観察した。移植された心筋細胞シートが収縮する様子が肉眼で確認できた。また組織学的検討により、移植された心筋細胞は生体内で良好に伸展し横紋構造の再構築がおこなわれ、心筋細胞が集団として配向されていることが観察された。われわれの開発した方法により作製された心筋細胞シートは、心筋組織としての電気的性質および収縮能を維持しており、移植片として有効利用することが可能であると考えられた。また本手法は心筋細胞以外の様々な細胞で応用が可能であり、多くの臓器分野において新たな組織工学的手法として利用することが可能であると考えられた。

論文審査の要旨

組織工学の領域において、東京女子医科大学岡野光夫教授らにより温度感応性培養皿を用いて作製する細胞シート法が提唱されているが、本研究ではフィブリン塗布培養皿を用いた独自の細胞シート作製法が示された。フィブリン塗布培養皿上で新生仔ラット心室筋細胞の初代培養を行ったところ、フィブリン層は心筋細胞が分泌するタンパク分解酵素により分解され、心筋細胞と培養皿表面の結合が疎となり、4日後には膜状に連結した心筋細胞シートを剥離し回収することが可能となった。2枚の心筋細胞シートの一部を重合し培養を継続すると、同期した自律収縮を行うようになった。電位感受性色素di-4ANEPPSを用いた光マッピング法を用いて心筋細胞シート間の電気活動を解析したところ、3日後には心筋細胞シート間に良好な電気的結合が形成されることが示された。免疫蛍光染色により、心筋細胞間にコネキシン43が発現し、心筋細胞シート間にギャップ結合が再構築されていることが示された。3層の心筋細胞シートをヌードラットの皮下に移植したところ、2週間経過後も心筋シートは生着し自律収縮を行っていた。さらに移植された心筋細胞は横紋構造を再構築し、互いに配向していた。以上の結果から本手法が新たな心筋移植片作製法となる可能性が示唆された。

審査ではまず上皮様構造などの細胞の構造、配列に極性を持った組織を再構築するためには、細胞シートを作成する際にそれぞれの細胞に極性を持たせて配列させる必要がある、との指摘があった。また今回は新生仔心筋細胞を用いて細胞シートを作製したが、成獣心筋細胞でも細胞シートの作製が可能か、また新生仔心筋細胞を成獣心臓に移植した場合、円滑な電気的結合が形成されるか、を検討すべきとの助言があった。ついで本実験では、2枚の心筋細胞シート間で電気的結合が形成される理由としてギャップ結合の再構築がなされていることが示されたが、他にも細胞シート間の絶縁構造が消失した可能性、などの機序を除外するための詳細な解析を行うことが望ましかったとの助言があった。さらに心筋細胞シートを用いて心筋グラフトを作る際には、左心系の圧に耐えうる性質が必要になると考えられるが、重層細胞シートに強度を持たせることは可能であるか、との質問がなされた。これに対し、現在温度感応性培養皿を用いて作製された細胞シートでは、肝細胞、内皮細胞などの異なった種類の細胞シートを重層化する試みがすでに行われているが、同様に線維芽細胞シートを加えて結合組織の形成を促す、あるいはコラーゲンフィルムなどの細胞外基質成分を加える、などの方法により強度を確保できる可能性があると回答された。

以上より、本研究にはなお検討すべき課題が残るものの、細胞シート工学という新たな手法が様々な臓器分野において容易に応用される可能性を示したという点で、有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　小川　聡
　　外科学　四津　良平　　生理学　柚崎　通介
　　生理学　岡野　栄之
学力確認担当者：北島　政樹、四津　良平
　　審査委員長：四津　良平

試問日：平成17年 6月22日