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

Title	Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel Three-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique Functionally Integrates With the Host Heart, In Vivo
Sub Title	心筋細胞移植における細胞シート法の有用性と機能的統合に関する検討
Author	古田, 晃
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.3 (2007. 9) ,p.19-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070901-0019

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.

Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel Three-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique Functionally Integrates With the Host Heart, In Vivo

（心筋細胞移植における細胞シート法の有用性と機能的統合に関する検討）

古　田　　晃

内容の要旨

再生医療に対する社会的関心は高く、幹細胞移植による心筋再生治療の研究は急速に進歩した。近年、その臨床応用にむけ、安全かつ高い生着効率を持つ細胞移植技術の開発が望まれている。心臓生理学的見地では、移植されたグラフト心筋細胞は、ホスト心臓内への生着もさることながら、ホストとの電気的同期の証明が極めて重要である。仮に電気的同期が生じない場合、1）ホスト心筋拡張期にも収縮し、拡張能を悪化させる可能性　2）不完全な電気的結合が緩徐伝導を生じ、リエントリー性不整脈基質を生じる可能性　3）ホスト心筋の電気的受攻期に偶発的なグラフト収縮が生じ、圧受容型イオンチャネルを介した興奮によって、ホスト心筋細胞に致死的不整脈を生じる可能性、といった副作用が想定される。これらの問題の根本的解決には、グラフトーホスト間の強固な電気的統合が必須となる。

本研究では、従来の単離細胞移植と比べ圧倒的に細胞生着効率が高いとされる細胞シート法を用いて、電気的結合および催不整脈性を生体位心で検討した。

細胞シート法とは、in vitroで培養増殖させた細胞を培養皿から回収して生体に戻す際、酵素反応を用いずに、培養時に構築される3次元構造を保持したまま移植を行う事を可能とした最新のバイオテクノロジーである。本研究では、ラット初代培養心筋シートを、フィブリンポリマー培養皿を用いて作製した。実際に用いたホスト心臓は免疫学的拒絶反応の少ないNude Ratを用いた。Nude Ratを吸入麻酔下で開胸し、心表面に150～300μm厚の熱凝固壊死層を生じさせ、擬似心筋梗塞（MI）を作製した。回収した細胞シートを重層化（2層）しMI部に移植し閉胸、7日後に再開胸し心摘出、膜電位感受性色素Di-4ANEPPSを用いた光マッピング法で細胞シートの電気的興奮伝搬過程とペーシング閾値の計測、および不整脈誘発試験を行った。また、組織学的検討を行い、移植後心臓の細胞構築を観察した。

細胞シート非移植群ではMI域に活動電位を認めなかったが（n＝9）、移植群ではMI域に活動電位の興奮伝導を認め（n＝9）、グラフトーホスト間に電気的結合（双方向性の興奮伝導）を確認した。また移植部位に異方向性伝導が観察され、グラフトが生体位心で異方向伝導特性を獲得する事が判明した。不整脈誘発試験では、両群ともに不整脈の発生を認めなかった。組織学的検討にて、ホストからの血管新生とグラフトの長期生存、およびホスト心筋との緻密な結合が観察できた。

以上により、細胞シート法を用いた細胞移植は、ホスト心筋と緊密な電気的統合を生じる事が生体位心で証明された。本研究は、この移植技術が循環器疾患領域において、生着効率の高い、安全かつ有効なツールとなる事を示している。本法の応用が心筋再生療法の有効性を飛躍的に向上させる可能性が示唆された。

論文審査の要旨

近年、幹細胞移植による心筋再生治療の研究は急速に進歩しており、その臨床応用にむけ、安全かつ高い生着効率を持つ細胞移植技術の開発が望まれている。細胞シート法は、従来の単離細胞移植と比べ圧倒的に細胞生着効率が高い移植法であることが報告されたが、この方法のホスト生体位心における電気的結合および催不整脈性の有無は未解明であった。本研究では、細胞シート法を用いて心臓電気生理学的見地より解析を行い、移植後、グラフトにおける活動電位の興奮伝導と、グラフト-ホスト間の電気的結合の成立（双方向性の興奮伝導）を確認した。さらに移植部位にホスト心筋の心筋線維方向に応じた異方向性伝導特性が観察された。また不整脈誘発試験では、移植後も不整脈が発生しないことが確認された。

審査では、まず催不整脈性が検討されていることをふまえて、ホストとグラフト両者間の電気的結合の緻密性について質問があった。両者において計測した活動電位持続時間には差を認めなかった。すなわち、このことは均一な脱分極および再分極を可能とし、緻密性かつ安定性を保持した強固な電気的結合を示唆し得ると回答された。また、用いた全モデルが左室前壁梗塞であったことをふまえ、梗塞部位を多様化させた場合、抗不整脈効果の一貫性を保ち得るのか質問がなされた。梗塞責任病変の部位により併発する不整脈のタイプは異なってくるものであり、各ケースに応じた最善の移植方法の検証は、今後の検討課題であると回答された。さらに、細胞シート法として、なぜ温度感受性培養皿ではなくフィブリン培養皿を用いたのか質問があった。今回我々が作製した熱凝固壊死層への移植においては、温度感受性シートに比しフィブリンシートはその初期接着が極めて良好であったためと回答された。また、グラフトが厚さ0.1mm未満と非常に薄いシートであることをふまえ、シートの多重層化は心機能改善に有効かと質問がなされた。本研究では2枚重ねのシートを用いたが、3枚以上にすると、組織への酸素供給不足が生じ細胞シートの状態が悪化した。HGF（hepatocyte growth factor）などの血管新生因子の注入にて、多重層化シート移植による心機能改善の効率化は誘導できるかもしれないが、今後の検討課題であると回答された。最後に、壊死層は恒久的に残存してしまうのか質問があった。組織学的解析にて、グラフト細胞のより深層への遊走を示唆し得る所見を観察した。この現象は壊死組織がやがて心筋組織に置換される可能性を示すものだが、本研究では遊走を証明するには至っていないと回答された。

以上のように、本研究は今後さらに検討されるべき課題を残しているが、細胞シート法の安定性および安全性を心臓電気生理学的に解明し、心筋再生医療への応用の可能性を示した点で有意義な研究と評価された。

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　岡野　栄之
発生・分化生物学　須田　年生
学力確認担当者：池田　康夫
審査委員長：四津　良平

試問日：平成19年4月25日