#### Review

# 細胞シート工学による補助ポンプ型立体心筋組織の創生

関根 秀一, 清水 達也

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

# Development of Cardiac Tissues with the Ability for Independent Cardiac Assistance Using Cell Sheet Based Tissue Engineering

Hidekazu Sekine and Tatsuya Shimizu

Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University, TWIns, Tokyo, Japan

For severe heart failure because of congenital heart disease, coronary artery disease, and dilated cardiomyopathy, heart transplantation is the definitive treatment approach for patients. However, a lack of donor organs remains a longstanding and serious problem worldwide. Artificial hearts, such as left ventricular assist devices, present problems related to thromboembolism, infection, gastrointestinal bleeding, and finite durability. Direct injection of isolated skeletal myoblasts and bone marrow-derived cells or cardiac stem cells has already been used clinically as a method to improve heart function by regenerating the myocardium and blood vessels. However, direct injection of the dissociated cells has shown to be slightly effective, and it is often difficult to control the form, dimensions or position of implanted cells. In an attempt to solve these problems, research has been initiated on reconstructing functional three-dimensional cardiac grafts using tissue engineering methods as a treatment for the next generation. Cell sheet transplantation has already been shown to be able to cure damaged hearts. In addition to cardiac patches transplanted directly onto damaged hearts, the next challenge is to fabricate organ-like tissues, such as tubular or spherical structures that are able to function as a cardiac pump with the potential for circulatory support.

先天性心疾患や虚血性心疾患,拡張型心筋症に伴う重症心不全に対しては,脳死患者からの心臓移植が最終的な治療法となっているが,ドナー不足が大きな問題となっている.また左室補助装置や植込み型人工心臓の使用は,感染や血栓形成などの問題があり長期的な生命維持は困難なのが現状である.そこで近年新たな治療法として再生医療が注目され,これまでに自己筋芽細胞や骨髄由来細胞,あるいは心臓幹細胞を不全心筋組織内へ注入することにより心筋組織を再生させる細胞移植療法がすでに臨床応用されている.しかし,細胞懸濁液注射による治療は移植片の大きさや移植位置の制御の困難さ,移植部からの流出や壊死による細胞の損失が大きな問題となっている.これらの問題を解決するために生体外で細胞を組織化し再生組織として機能不全部位に移植するというティッシュエンジニアリング手法を用いた研究が積極的に進められている.我々は細胞シート工学の技術を用い細胞シートを積層化することによりパッチ状の機能的心筋組織を再生し心筋梗塞部へ移植することで心機能が改善きすることを示してきた.また次世代の心筋再生医療を目指し補助ポンプとなりうる管心筋組織の作製に取り組んでいる.

Keywords: regenerative medicine, heart failure, tissue engineering, cell sheet

### はじめに

再生医療は薬物療法や外科的治療などでは根治でき ない難治性疾患に対する治療として大きな注目を集め ており、将来的には臓器移植に代わる置換型の再生組 織・臓器の再生も期待されている。 これまでに自己由 来の細胞浮遊液を不全組織内へ注入することにより組 織を再生させる細胞注入療法がすでに臨床応用されて いる. 細胞注入療法に次ぐ再生治療法として合成高分 子や天然高分子から作製した生分解性の足場(スキャ フォールド), または脱細胞化した組織に細胞を播種 することで構築した組織を移植するティッシュエンジ ニアリング技術が追及されており、骨、軟骨、皮膚な ど細胞密度が低く血管要求性の低い組織に関しては臨 床応用も行われている. しかしこれまでのティッシュ エンジニアリング技術では拡散による酸素・栄養の供 給ならびに老廃物の除去の限界に起因する構築可能な 組織厚やその機能に関する制限があり、特に心臓、肝 臓、腎臓など細胞密度が高く血管要求性が高い組織の 構築には革新的な技術開発による再生組織内への機能 的血管網付与を実現することが必須となっている. 本 稿では細胞シート工学を基盤とした心筋組織の再生と 機能的血管網付与による3次元組織のスケールアップ 技術、ならびに補助ポンプ型立体組織の作製について 紹介する.

#### 心筋の再生医療

心筋に対する細胞移植治療の研究が始まったのは 1990年代前半で、アメリカの Soonpaa らは心臓に移 植されたマウス胎児心筋細胞はホスト心筋に生着する ことを示した<sup>1)</sup>. その後,心筋細胞のみならずさまざ まな種類の細胞を使った細胞懸濁液移植は心機能の回 復を助けることが報告された2). 心筋再生における細 胞ソースの一つとして、虚血に対し比較的耐性がある とされる骨格筋の筋芽細胞が代替として用いられてき た. フランスの Menasche らは 2003 年に患者本人の 骨格筋より採取した筋芽細胞の注入移植(MAGIC II study) を 動脈バイパス術と併用して行ったところ 心機能が回復することを報告した<sup>3)</sup>. しかしながら不 整脈を引き起こし死亡する例もあったため、抗不整脈 薬や植込み型除細動器の併用が必須であった. 近年, 高い心筋分化能力ならびに増殖能を持つ細胞ソース として盛んに研究されているのは ES 細胞と iPS 細胞 で、ともにヒト細胞からの心筋細胞への分化誘導法も 確立され、心不全動物モデルへの移植実験においても

分化誘導させた心筋細胞はホストの心臓に生着し心機能も改善されることが示されている<sup>4,5)</sup>. iPS 細胞はES 細胞研究が持っているヒト胚を破壊するという道徳的な倫理的問題を解決できるため細胞のバンク化による他家移植の実現が大きく期待されている.

# ティッシュエンジニアリングを用いた 心筋再生研究

生体内や培養系で体の組織構造を再生させる研究の領域をティッシュエンジニアリングと呼ぶが、これは1980年代後半にマサチューセッツ工科大学の Langer博士とハーバード大学の Joseph Vacanti 医師が提唱した概念で、医学と工学の融合により生まれた学際的な学問である。組織の再生には細胞、細胞の足場となる細胞外マトリックスや細胞の分化と増殖のためのサイトカインが必要であるとし、その足場をポリ乳酸やその共重合体からなる生分解性のスキャフォールドを用いて作製した。方法は3次元の生分解性支持体に細胞を播種し培養を行ったのちに生体内へ移植する。生体内では支持体が緩やかに分解・吸収され、細胞が産生する細胞外マトリックスと置換されるため、生体に類似した組織構造が再生できるというものである。

心筋組織の再生においても同様に、細胞の足場とな る生分解性スキャフォールドを用いるのが主流となっ ている. 組織工学的手法を用いることでの大きな利点 は、細胞注入療法で課題となっている細胞の流出や壊 死による細胞の損失を克服できること、また細胞注入 やサイトカイン療法では達成できない先天性心疾患 などの欠損部位に対する治療を可能としうることであ る<sup>7)</sup>. 細胞を播種する支持体としてゼラチン, アルギ ン酸または PGA の多孔性スポンジなどを用いた研究 が報告されている <sup>8-10)</sup> (Fig. 1A). またコラーゲン溶 液と心筋細胞を混和しモールド内で培養することによ り3次元の心筋組織を構築する研究も報告され、この 研究では in vitro での伸展負荷により心筋組織に配向 性を持たせ、さらに心筋細胞を肥大させることも示さ れている<sup>11)</sup> (Fig. 1B). さらには溶液状フィブリンあ るいはコラーゲン溶液と細胞を混ぜ合わせたのち、不 全心筋部に注入するという細胞注入療法と組織工学と の中間のアプローチも報告されており<sup>12)</sup>, これによ り細胞懸濁液の移植時に問題となる細胞の損失を軽減 できる可能性も報告されている (Fig. 1C).

組織工学により再生した心筋組織を心筋不全部へ移植する研究においては、Liらは生分解性のメッシュ 状ゼラチンにラット胎児心筋細胞を播種し培養した

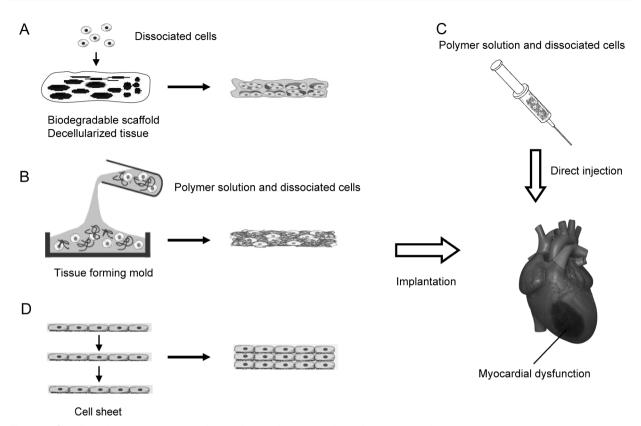


Fig. 1 Cardiac tissue reconstruction using a tissue engineering approach

A: Dissociated cells are seeded into prefabricated porous scaffolds or decellularized tissue matrices. B: A mixture of dissociated cells and biodegradable liquid biomolecules is seeded into an appropriate mold, and the molecules are then polymerized. C: Mixtures of cells suspended within biodegradable liquid biomolecules are set into the injector. D: Entire cell sheets released from temperature-responsive culture surfaces are layered. Cell sheets adhere to each other via a biological extracellular matrix, resulting in scaffold free 3-D tissue.

後、これをグラフトとして心筋障害モデルへ移植を行ったところ、心筋細胞を播種していないゼラチンメッシュの移植に比べ左心室収縮期圧が改善されることを示した<sup>8)</sup>. また Leor らはアルギン酸を使った多孔性の足場へラット胎児心筋細胞を播種し、心筋梗塞モデルに移植した. その結果、左心室収縮能の改善は認められなかったものの心筋リモデリングによる左心室拡大を抑制できることを報告した<sup>9)</sup>. さらに Zimmermann らはコラーゲン溶液とラット新生仔心筋細胞を混和しシリコーンモールド内で培養することにより作製した 3 次元心筋組織を心筋梗塞モデルへ移植したところ、移植組織が不整脈を誘発することなく正常心筋と電気的に結合することを明らかにした. このモデルでは左心室収縮能が改善し、左心室拡大も抑制されることが示された<sup>11)</sup>.

## 細胞シート工学による心筋組織の構築

組織再構築を行う際に細胞の足場としてスキャ

フォールドを使用する方法は、スキャフォールド内部へ十分に細胞数を播種することが難しく、結果として細胞成分が少なく大量の結合組織が多い組織ができあがってしまう.心臓弁や軟骨など細胞が疎な組織の作製には適するが、心臓や腎臓、肝臓など細胞が密で複雑な構造と高い機能を持つ組織を作製するには新たな技術開発が必要となっている.

そのような中、我々はスキャフォールドを用いることなく組織を再構築する細胞シート工学と呼ぶ技術を開発し心筋再生の研究を進めてきた。細胞シート工学とは培養皿表面に加工を施し温度変化のみで細胞の接着・脱着を制御できるという技術で、表面に修飾されているポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PIPAAm)は水中32℃に下限臨界溶液温度をもつ温度応答性高分子で、この高分子を電子線により共有結合的に固定すると、37℃では弱疎水性になり細胞が接着し、32℃以下に温度を下げると表面が親水性に変化し細胞が脱着する表面ができる。従来、培養細胞を回収するにはトリプシンなどのプロテアーゼを使

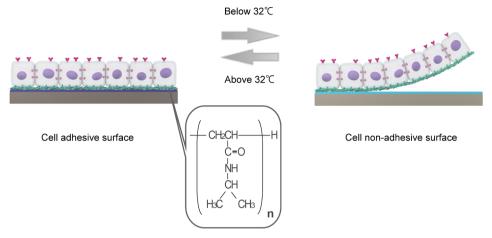


Fig. 2 Cell-sheet-based tissue engineering

Culture cells can be harvested as cell sheet using temperature-responsive culture dishes created by grafting the temperature-responsive polymer poly(*N*-isopropylacrylamide) to tissue culture dishes. Under culture conditions at 37°C, the dish surfaces are relatively hydrophobic and cells attach and proliferate. When the temperature is reduced below 32°C, the polymer surface becomes hydrophilic, allowing spontaneous cell detachment.

用するが、この方法では細胞と培養皿表面を接着させている接着蛋白を分解するばかりか細胞膜表面の蛋白までも分解してしまう。しかし温度応答性培養皿を使用した場合、温度を降下させるだけで細胞-細胞間接着や細胞外マトリックスの構造と機能を破壊することなく細胞をシートとして回収できる(Fig. 2). さらにこの細胞シートを積層化することにより3次元組織を構築できる(Fig. 1D). また積層化により再構築された組織は細胞とそれが産生する微量の細胞外マトリックスのみからなるため、スキャフォールドを使用する時に生じる問題を回避できる<sup>13)</sup>.

温度応答性培養皿を用いて新生仔ラットの心筋細胞シートを作製し in vitro で 2 枚積層化を行ったところ,積層化された心筋細胞シート間に数十分で形態的かつ電気的な結合が形成され,同期して自律拍動する組織が作製できることが示された <sup>14, 15)</sup>. またこの積層化心筋細胞シートをラットの背部皮下組織に移植したところ,ホスト心臓の心電図とは異なる移植心筋グラフトに固有の電位が測定され,移植組織は肉眼で拍動を確認できるレベルであった.移植組織内には毛細血管網が新生し,心筋組織は円柱状に伸びたサルコメア構造とギャップジャンクションまたはデスモソームなど生体心筋組織によく似た組織像であった <sup>16)</sup>. さらにこの移植された心筋グラフトは拍動を維持したままラットの寿命である約 2 年間の間,生着し続けることも示された <sup>17)</sup>.

積層化心筋細胞シートの心不全モデルへの移植においては、心筋グラフトとホストの正常心筋との間に心筋細胞同士の結合が起こるとともに、それらの細胞間

にギャップジャンクションが形成され電気的な結合が確立されることが示された  $^{18)}$ . また細胞懸濁液移植に比べ細胞の生着率が圧倒的に良いことも明らかにされた  $^{19)}$ . さらに血管内皮細胞と心筋細胞を共培養して細胞シートを作製すると血管内皮細胞の網目状のネットワークが構築され  $^{20)}$ , その心筋グラフトを移植すると網目状の血管内皮細胞のネットワークが直接的に血管新生に寄与し、虚血心の機能回復を加速させることも明らかとなった  $^{21)}$ .

## 再生心筋組織のスケールアップ

我々は1層から数層までに重ねた細胞シートの再 生治療研究を行いながら、同時に再生組織のスケール アップによる高機能化も進めている. 組織の高機能化 には再生組織内へ血管網の付与を行い、酸素・栄養の 透過性を向上させ老廃物の排出を図る必要があるが, 一つの方法として、最初に移植した積層化心筋細胞 シートにホスト側からの十分な血管新生を待ち、新た な積層化心筋細胞シートを24時間ごとに段階的に移 植する手技を考案した. この方法によって in vivo に おいて約1mm厚の収縮力が増大した心筋組織を再 生させることを可能とした<sup>22)</sup>. またこれを受けて in vitro で再生組織内へ血管網を付与し厚みのある心筋 組織の再生を試みた. まず血管新生の場となる血管床 と組織灌流用バイオリアクターを開発し、血管床上へ 積層した心筋細胞シートへの毛細血管新生の評価を 行った(Fig. 3). 血管床はラット大腿動静脈を含む筋 組織を外科的に成形し1週間生体内へ留置することに

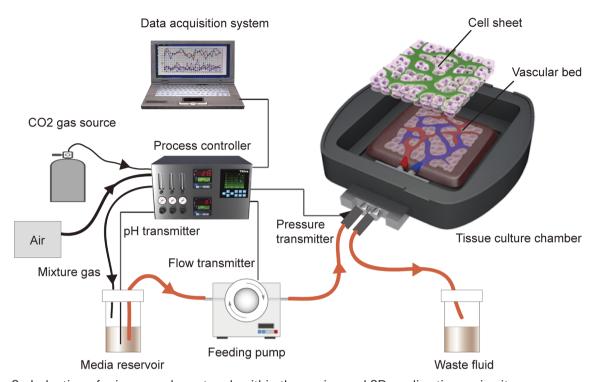


Fig. 3 Induction of microvascular network within the engineered 3D cardiac tissues in vitro

Cardiac cell sheets co-cultured with endothelial cells were transferred onto a vascular bed containing connectable blood vessels, which was perfused with a bioreactor system.

より毛細血管の動静脈短絡を誘導させ、灌流液が動脈 から組織さらに静脈へ戻るような組織を作製した. 血 管内皮-心筋共培養細胞シートを血管床上へ積層化し b-FGF を添加した灌流液を用いて組織灌流培養を行 うことで、3日後には心筋組織内で再生された毛細血 管と血管床の毛細血管との間に血管を介したつながり ができることを確認した. また3層の細胞シートを段 階的に4回積層化することで約200 µmのより厚みの ある心筋組織の構築を可能とした. さらに細胞シート の段階的積層により作製した血管付き心筋組織を生体 へ吻合移植を行ったところ、移植された組織は移植2 週間後において細胞の機能を保持したまま生着してい ることが確認できた23).また、血管内皮-心筋共培養 細胞シートを微小流路付きコラーゲンゲルの血管床モ デルを用いて還流培養することで、微小流路と積層化 細胞シートの毛細血管を血管内皮細胞の増殖、および 移動によりつなぐことにも成功した 24).

#### 補助ポンプ型立体心筋組織の構築

我々はさらに効果的な治療法の開発を目指し、細胞シート工学による新展開として補助ポンプとなりうる管状心筋組織の構築にも着手している. これまでの

報告では Yost らは管状コラーゲンの管腔に心筋細胞 を数回に分けて注入することで in vitro において自律 拍動するチューブを作製できることを示した<sup>25)</sup>. 一 方で我々は in vitro において管状フィブリンゲルを足 場にしてその外周に心筋細胞シートを巻きつけること によりチューブ状心筋組織を作製した. この管状心筋 組織は肉眼レベルで拍動するとともに管腔内圧を生じ た <sup>26)</sup>. さらに心筋細胞シートを大動脈外周に巻きつ けることで移植可能な管状心筋組織を作製し、異なる 個体の大動脈との置換移植を行った(Fig. 4). その結 果,置換移植後4週間においてホストとは異なる管状 心筋組織単独の自律拍動が肉眼および電位測定で確認 でき、さらに内圧測定では約6mmHgの内圧較差が 計測された. 組織切片では動脈の外周に心筋組織の生 着が認められ、規則正しい筋節構造、多量のミトコン ドリアおよびデスモソームが確認された。また腹腔内 移植群と大動脈置換移植群で比較したところ、その組 織厚は腹腔内移植群に対し大動脈置換移植群の場合で は有意に増大し、BNP および MHC- $\alpha$ 、 $\beta$ の遺伝子発 現量も明らかに増大することが認められた。これらの 結果より細胞シートを用いて作製した再生心筋チュー ブは生体に類似した組織構造を示し、さらに in vivo での拍動下で心筋組織がストレッチされることにより

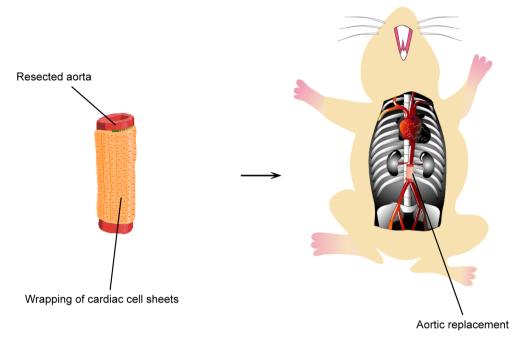


Fig. 4 Fabrication and replacement of cardiac tubes

Individual cardiac cell sheets are sequentially wrapped around a resected aorta to produce pulsatile cardiac tubes in vitro. After resection of the host aorta, the myocardial tube is replaced in a host blood vessel.

再生心筋組織が成長・肥大することが明らかとなった<sup>27)</sup>. また内圧較差が生じたことはホストの血行動態を変化させ得る可能性を示しており、組織再生から臓器再生への先駆けになるものと考える.

今後、先に述べた in vitro での組織スケールアップ 技術を管状心筋組織の構築に応用することで、より厚 く収縮力が増大した補助ポンプとなる管状心筋組織を 作製することが可能になると考える。

#### おわりに

血液循環を制御可能とする組織・臓器を構築するには、ヒトへ移植可能な心筋細胞や再生組織のスケールアップなどの課題を克服する必要があるが、ティッシュエンジニアリングによる再生医療研究はさまざまなアプローチにより飛躍的に進んでおり、小児の先天性心疾患も含めた重症心不全に対する治療への応用として重要なものになると予想され、さらなる努力と学際的な技術開発により達成しうるものと信じる.

#### 引用文献

 Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, et al: Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. Science 1994; 264: 98–101

- Laflamme MA, Murry CE: Regenerating the heart. Nat Biotechnol 2005; 23: 845–856
- 3) Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al: Myoblast transplantation for heart failure. Lancet 2001; **357**: 279–280
- Caspi O, Huber I, Kehat I, et al: Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. J Am Coll Cardiol 2007; 50: 1884–1893
- Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, et al: Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. Circulation 2009; 120: 408–416
- 6) Langer R, Vacanti JP: Tissue. Eng Sci 1993; 260: 920-926
- Zandonella C: Tissue engineering: The beat goes on. Nature 2003; 421: 884–886
- Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al: Survival and function of bioengineered cardiac grafts. Circulation 1999; 100 Suppl: II63–II69
- Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, et al: Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? Circulation 2000; 102 Suppl 3: III56–III61
- Bursac N, Papadaki M, Cohen RJ, et al: Cardiac muscle tissue engineering: Toward an in vitro model for electrophysiological studies. Am J Physiol 1999; 277: H433– H444
- Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, et al: Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. Nat Med 2006; 12: 452–458
- 12) Christman KL, Fok HH, Sievers RE, et al: Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. Tissue Eng 2004; 10: 403–409
- 13) Yang J, Yamato M, Kohno C, et al: Cell sheet engineering:

- Recreating tissues without biodegradable scaffolds. Biomaterials 2005; **26**: 6415–6422
- 14) Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, et al: Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. J Biomed Mater Res 2002; **60**: 110–117
- 15) Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, et al: Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation. Biomaterials 2006; 27: 4765–4774
- 16) Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, et al: Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. Circ Res 2002; 90: e40–e48
- 17) Shimizu T, Sekine H, Isoi Y, et al: Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets. Tissue Eng 2006; **12**: 499–507
- 18) Sekine H, Shimizu T, Kosaka S, et al: Cardiomyocyte bridging between hearts and bio-engineered myocardial tissues with mesenchymal transition of mesothelial cells. J Heart Lung Transplant 2006; 25: 324–332
- 19) Sekine H, Shimizu T, Dobashi I, et al: Cardiac cell sheet transplantation improves damaged heart function via superior cell survival in comparison with dissociated cell injection. Tissue Eng Part A 2011; 17: 2973–2980
- 20) Sekiya S, Shimizu T, Yamato M, et al: Bioengineered car-

- diac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential. Biochem Biophys Res Commun 2006; **341**: 573–582
- 21) Sekine H, Shimizu T, Hobo K, et al: Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. Circulation 2008; 30 Suppl: S145– S152
- 22) Shimizu T, Sekine H, Yang J, et al: Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. FASEB J 2006; 20: 708– 710
- Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, et al: In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. Nat Commun 2013; 4: 1399
- Sakaguchi K, Shimizu T, Horaguchi S, et al: In vitro engineering of vascularized tissue surrogates. Sci Rep 2013; 3: 1316
- 25) Yost MJ, Baicu CF, Stonerock CE, et al: A novel tubular scaffold for cardiovascular tissue engineering. Tissue Eng 2004: 10: 273–284
- Kubo H, Shimizu T, Yamato M, et al: Creation of myocardial tubes using cardiomyocyte sheets and an in vitro cell sheet-wrapping device. Biomaterials 2007; 28: 3508–3516
- 27) Sekine H, Shimizu T, Yang J, et al: Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering. Circulation 2006; 114 Suppl: 187–193