

## 臨床応用を目的とした立体心筋組織構築に向けた 脱細胞化血管床の開発

戸部 友輔<sup>\*,\*\*</sup>, 坂口 勝久<sup>\*,\*\*</sup>, 佐野 和紀<sup>\*\*</sup>, 関根 秀一<sup>\*\*</sup>,

清水 達也<sup>\*\*</sup>, 小林 英司<sup>\*\*\*</sup>, 梅津 光生<sup>\*</sup>, 岡野 光夫<sup>\*\*</sup>

\* 早稲田大学 先進理工学研究科 生命理工学専攻 [〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2]

\*\*東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

\*\*\*慶應義塾大学 医学部 ブリヂストン臓器再生医学寄付講座

### 1. 緒言

本研究では、細胞をシート状に回収した細胞シートの積層化により生体外で立体心筋組織を構築し、移植治療する方法の確立を目指している。生体内において組織には微細な血管網が張り巡らされ、酸素や栄養素が持続的に供給されており、この供給が途絶えると組織は壊死する。そのため生体外で組織を構築するには、細胞シート内に灌流を誘導する血管床が重要となる。

そこで本研究では動脈と静脈のループがあり、異所移植が容易な腸管を用いた新規血管床の開発を目指した。脱細胞化した腸管に、ヒト血管内皮細胞を播種することで、ヒトに移植可能な血管床を作製することを目的とし、脱細胞化条件の検討、及びヒト血管内皮細胞播種による内皮化条件の検討を行った。

### 2. 実験方法

ラットの腸管(φ=7 mm, L=20 mm)を動脈と静脈の循環が閉じるように単離後、動脈及び腸管部より灌流脱細胞化を行った。流量 25 μL/min で、まず 4℃下において超純水を 15 h, 続いて 25℃下においてデオキシコール酸 Na を 4 h, 最後に 37℃下において DNase-I を 3 h 灌流することで脱細胞化した。処理後の検体の HE 染色, Hoechst 染色による核の形態観察, 及び DNA 量の測定結果より脱細胞化組織の基準<sup>1)</sup>を満たすかどうか評価することで、核酸分解酵素濃度の検討を行った。

また、脱細胞化腸管にヒト血管内皮細胞を播種後、灌流培養することで脱細胞化組織内血管を内皮化することを目的とし、細胞の播種方法の検討を行った。動脈一方向からのみ、動脈静脈双方向からの播種の二つのアプローチで内皮化を試みた。

以上、全ての動物実験は東京女子医科大学動物実験倫理委員会の承認(承認番号 15-26)を得て行った。

### 3. 実験結果

単離後 PBS 処理のみの Control, 及び脱細胞化後の組織内 DNA 量の測定結果を表 1 に示す

(Condition 1: DNase 2×10<sup>4</sup> kU, Condition 2: DNase 2×10<sup>3</sup> kU)。核の形態観察, DNA 量の測定結果より基準を満たすことが確認できた。

また再播種後の血管網の観察結果より、双方向から播種後一週間培養を行うことで、血管を内皮化させることに成功した(図 1)。

Table 1 The amount of DNA in the tissue

|         | Control    | Condition1 | Condition2 |
|---------|------------|------------|------------|
| Average | 122.5±11.2 | 13.3±12.1  | 19.1±15.8  |

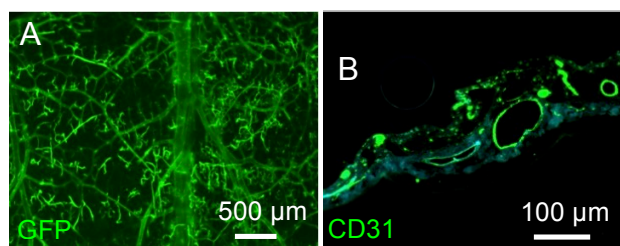


Fig. 1 Histological observation of the reseeded rat intestine. A) Microscopic observation of the vascular structures of reseeded intestine with GFP-HUVEC. B) Cross section of reseeded intestine stained with CD31.

### 4. 考察

脱細胞化により核だけでなく他のタンパク質も少なからずダメージを受け、動静脈のコネクションが多く存在する粘膜層が脱離する。そのため、動静脈のうち一方向からの細胞播種では、両血管内に細胞を生着させることが難しいと考えられる。

### 5. 結言

生体由来の臨床応用可能な血管床の開発を目的とし、脱細胞化、また脱細胞化後の組織内血管の内皮化実験を行い、ラットの腸管においてこれに成功した。今後、臨床応用を目指して、スケールアップしたブタの腸管(φ=20 mm, L= 50 mm)を用い実験を行う。

### 文 献

- 1) P.W.Carpro, et al: An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials 32:3233-3243, 2011.