

ラット心筋梗塞モデルを用いた細胞シート積層化の有効性検討

○ 榎原 基嗣¹⁾, 水町 涼治¹⁾, 森田 枝美¹⁾, 吉原 佐江子¹⁾, 田代 貴士¹⁾, 片山 誠一¹⁾, 廣中 直行¹⁾, 西 勝英^{1),2)}
1) 株式会社LSIメディエンス 薬理研究部, 2) 熊本大学医学部 名誉教授

演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある企業等はありません。

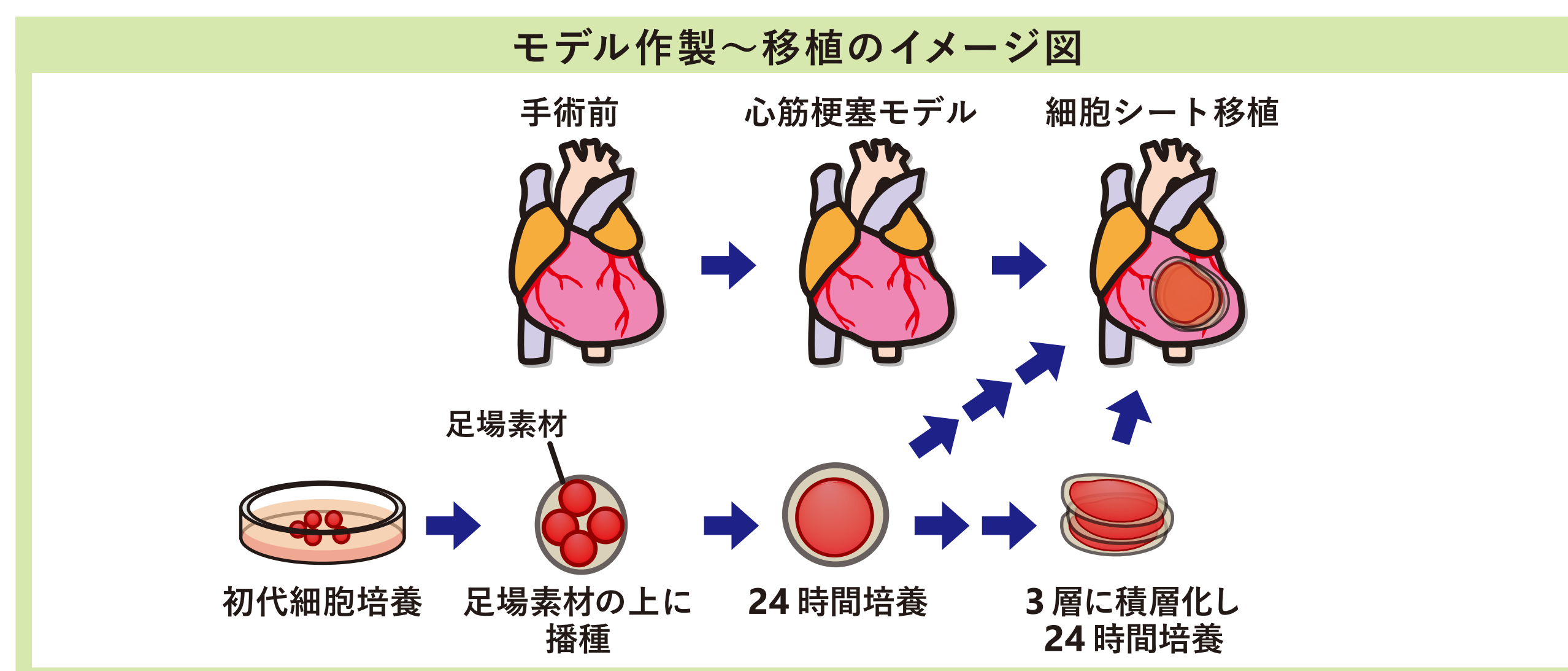
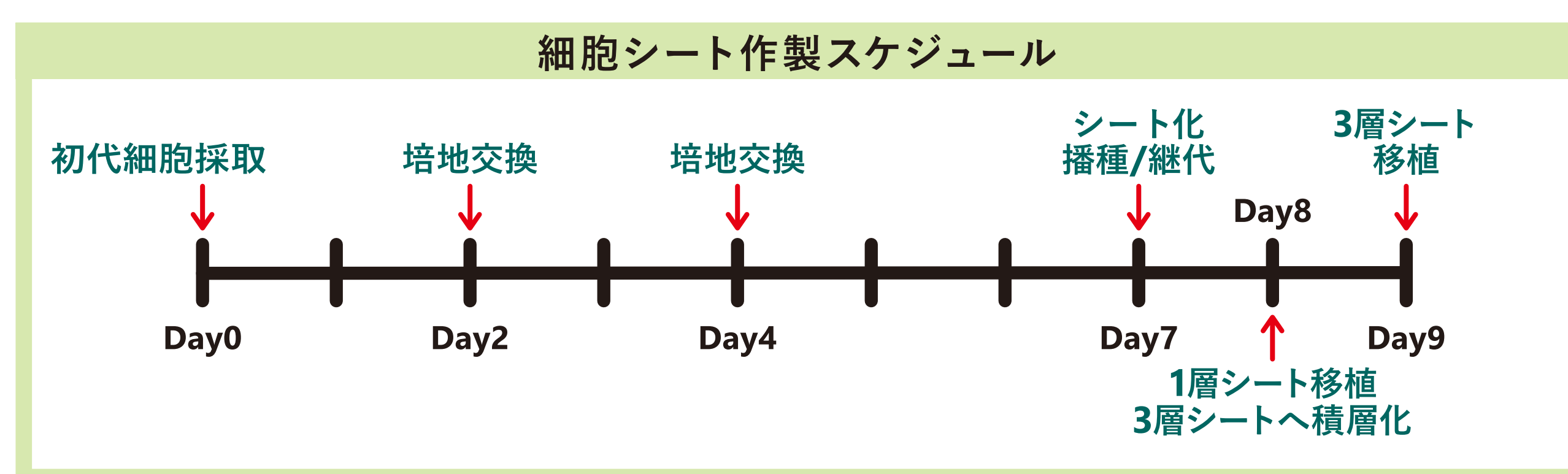
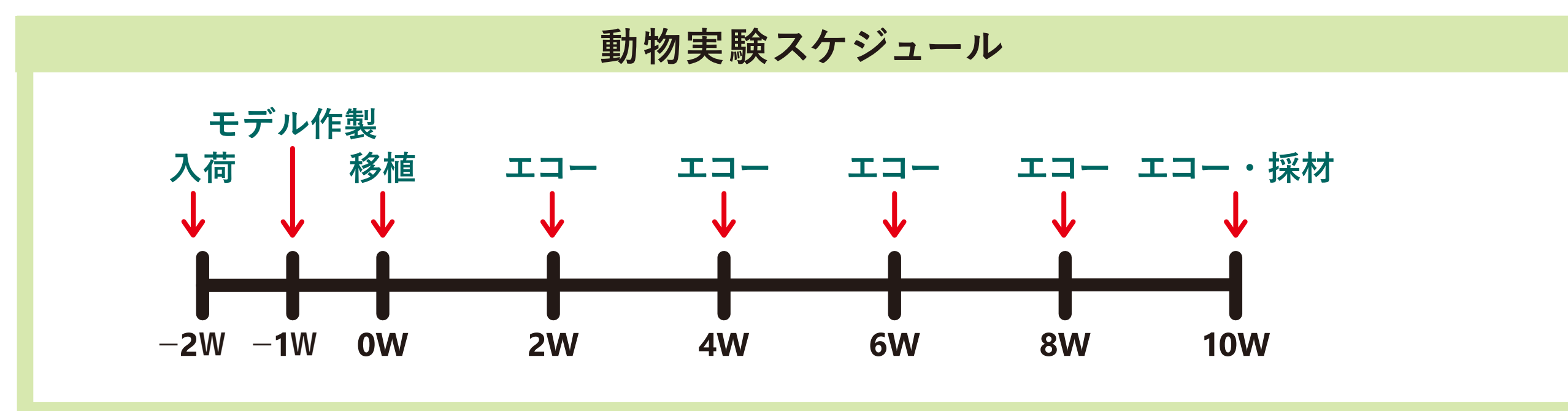
目的

心不全の治療として、これまでは心臓移植や外科的心筋切除手術等が行われてきた。心臓への直接的な外科的手術は侵襲やリスクが大きい。再生医療分野においては、心筋梗塞に対する「細胞治療」の研究が多く行われている。中でも、近年、心筋梗塞に対する細胞シートによる治療法が発表され、注目を集めている。また、積層化させた細胞シートの方が単層（1層）のシートよりも心機能改善効果が高いと報告されている。我々はこれまでに、心筋梗塞モデルラットにおいて梗塞部位への細胞の直接注入移植や単層細胞シート移植で心機能が改善することを報告している。今回、心筋梗塞モデルラットを用いて細胞シートの積層化による有効性の検討を行った。

方法

動物： ラット, Crl:CD(SD), ♂, 9週齢(入荷時; 8週齢)
モデル： 虚血-再灌流モデル
細胞： SDラット胎児(妊娠18日目)由来初代心筋含有細胞(以下、初代細胞)
細胞シート： 初代細胞を予備培養後、足場素材(ゼラチン: Genocel, 株式会社ニッケ・メディカル, コラーゲン: セルキャンパス, 多木化学株式会社)上で 2×10^6 cells/sheetの条件下で24時間培養(37°C, 5% CO₂)。
3層積層化： 足場素材上に播種後24時間で3枚のシートを重ね合わせて作製。重ね合わせ翌日に移植。
移植： 初代細胞を培養している足場素材ごと、左心室梗塞部位に貼付移植。
移植タイミング： 虚血-再灌流モデル作製後1週間
評価方法： エコーによる評価。移植(投与)後より2週間おきに10週間計測。移植後10週のエコー計測後に心臓を採取、線維化評価を実施。
群構成：

群	例数	足場素材	シートの枚数	細胞数
Control	4	コラーゲン	1枚	2×10^6 cells
ゼラチン1層	4	ゼラチン	1枚	2×10^6 cells
コラーゲン1層	4	コラーゲン	1枚	2×10^6 cells
コラーゲン3層	4	コラーゲン	3枚	6×10^6 cells



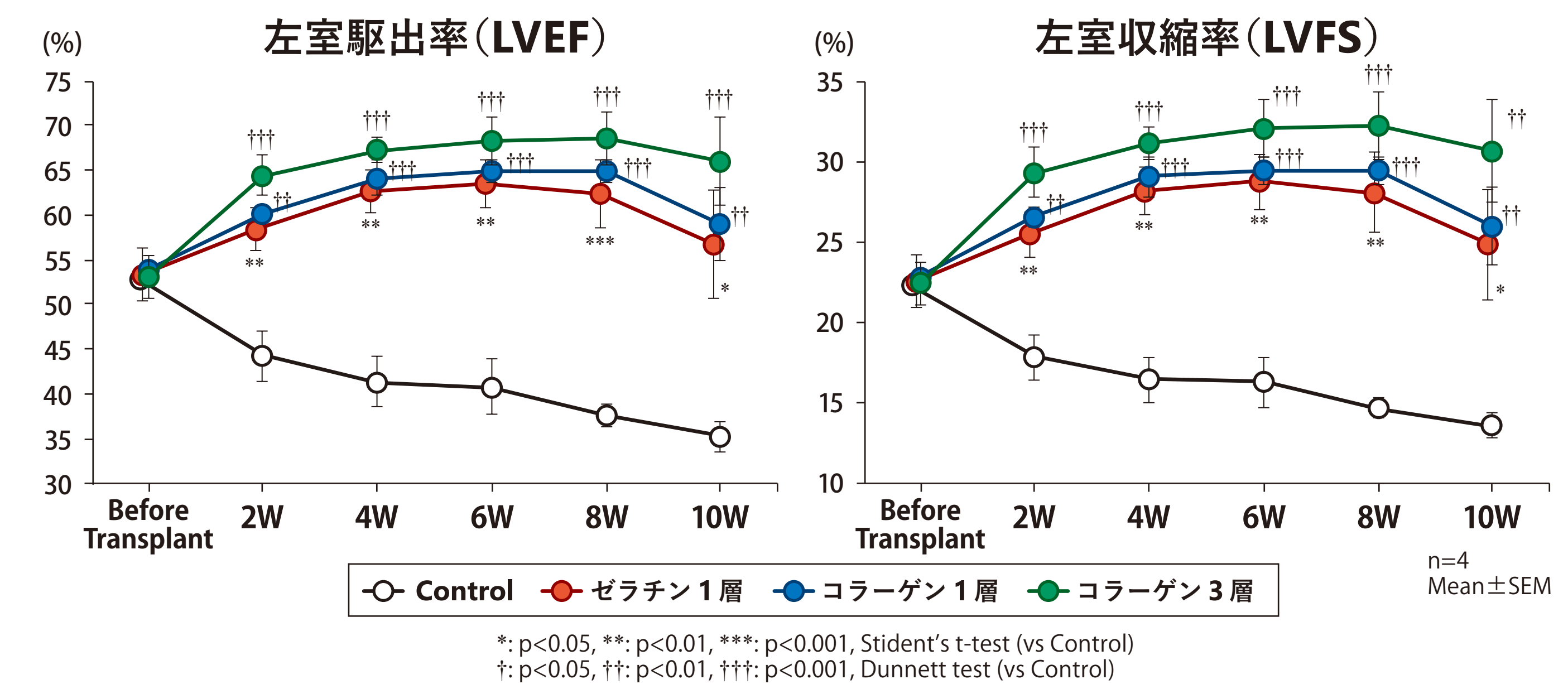
結果

まとめ

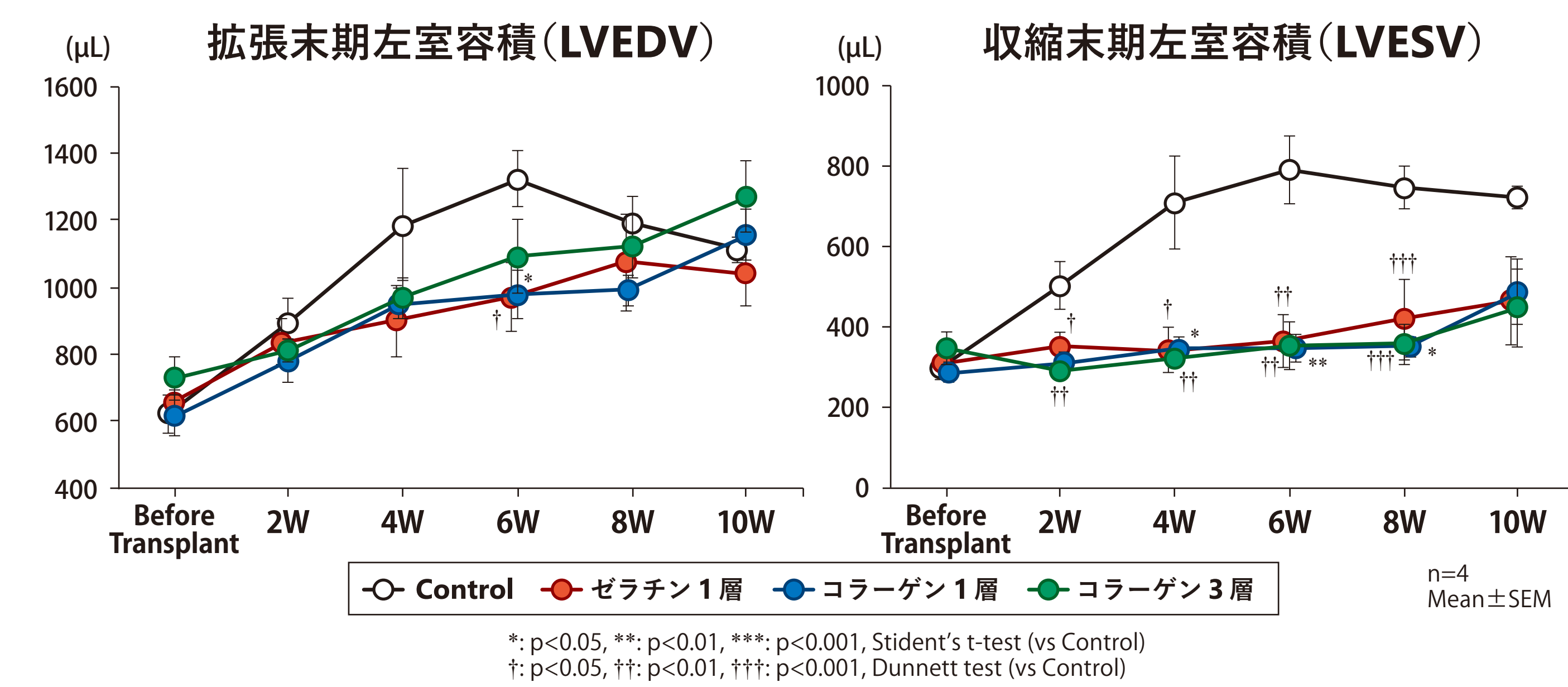
- 3層に積層化させた細胞シートを作製することができた。
- ゼラチン足場素材を用いた細胞シート1層は、前回発表と同様にControl群と比べて心機能を改善しており、再現性を確認できた。同時に、コラーゲン1層群とコラーゲン3層群においても、Control群と比べて心機能が改善したことから、細胞シートは心筋梗塞モデルによる心機能の悪化を抑制することが示唆された。また、細胞シート移植による心機能の改善効果は、収縮末期左室容積(LVESV)の結果を考慮すると、収縮機能を改善することで現れていることが考えられた。
- コラーゲン3層群はコラーゲン1層群と比べて心機能の代表的なパラメータであるLVEFおよびLVFSが高値を推移したことから、積層化させた細胞シートの方が心筋梗塞による心機能の悪化を抑制する可能性が示唆された。
- 線維化評価では、コラーゲン素材が心臓断面に占める線維化領域の割合を抑制する可能性が考えられたが、足場素材の違いによる線維化への影響や再現性についてさらなる検討が必要であると考えられた。

ラット心筋梗塞モデルへの細胞シート移植は心筋梗塞による心機能低下を改善する。さらに、細胞シートは3層の方が1層よりも心機能低下を改善することが示唆された。

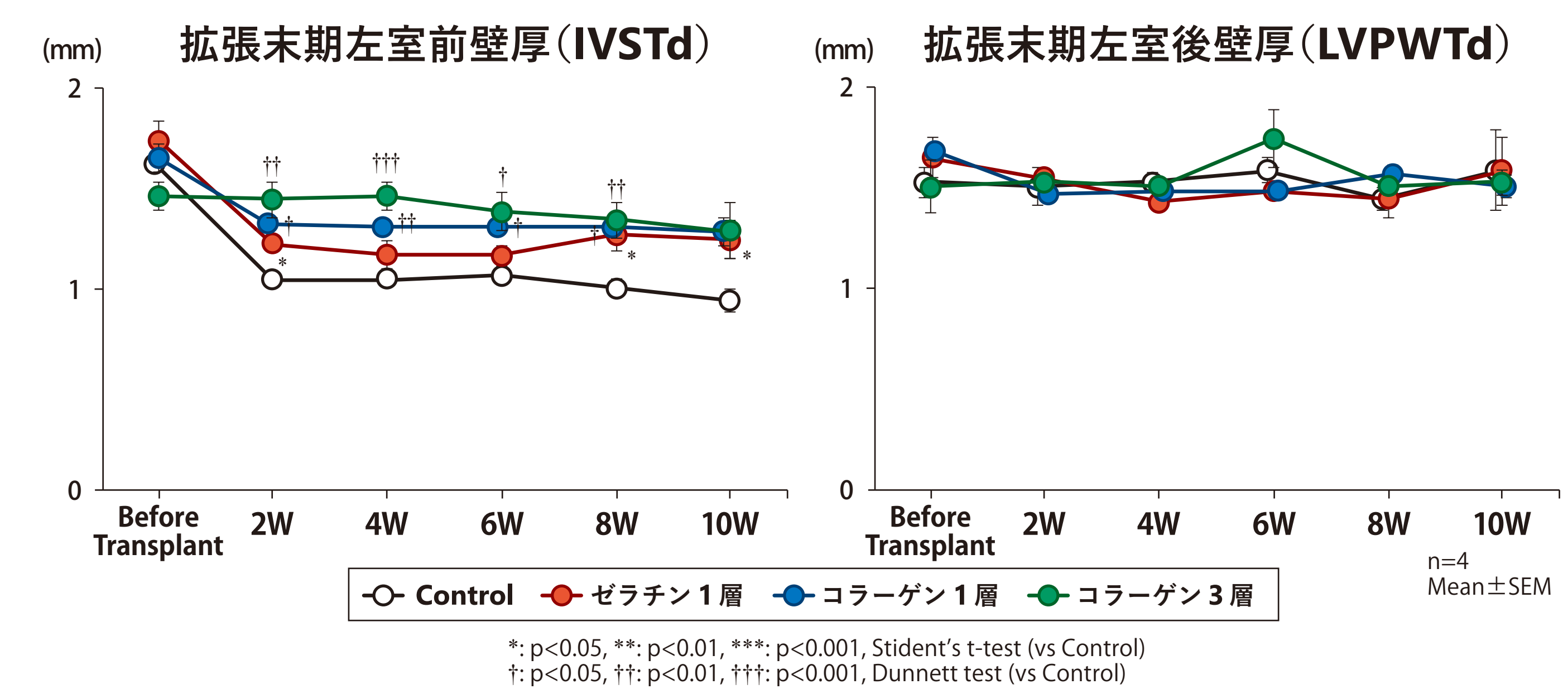
心機能評価 (エコー)



左室駆出率 (LVEF)、左室収縮率 (LVFS)
・ゼラチン1層群はControl群と比べて移植後10週まで有意に高値で推移した。
・コラーゲン1層群およびコラーゲン3層群はControl群と比べて移植後10週まで有意に高値で推移した。
・コラーゲン3層群はコラーゲン1層群と比べて有意差はないものの移植後10週まで有意に高値で推移した。
これらのことから、細胞シートは、心機能を改善した。また、コラーゲン3層の方が1層よりも心機能を改善させることが示唆された。

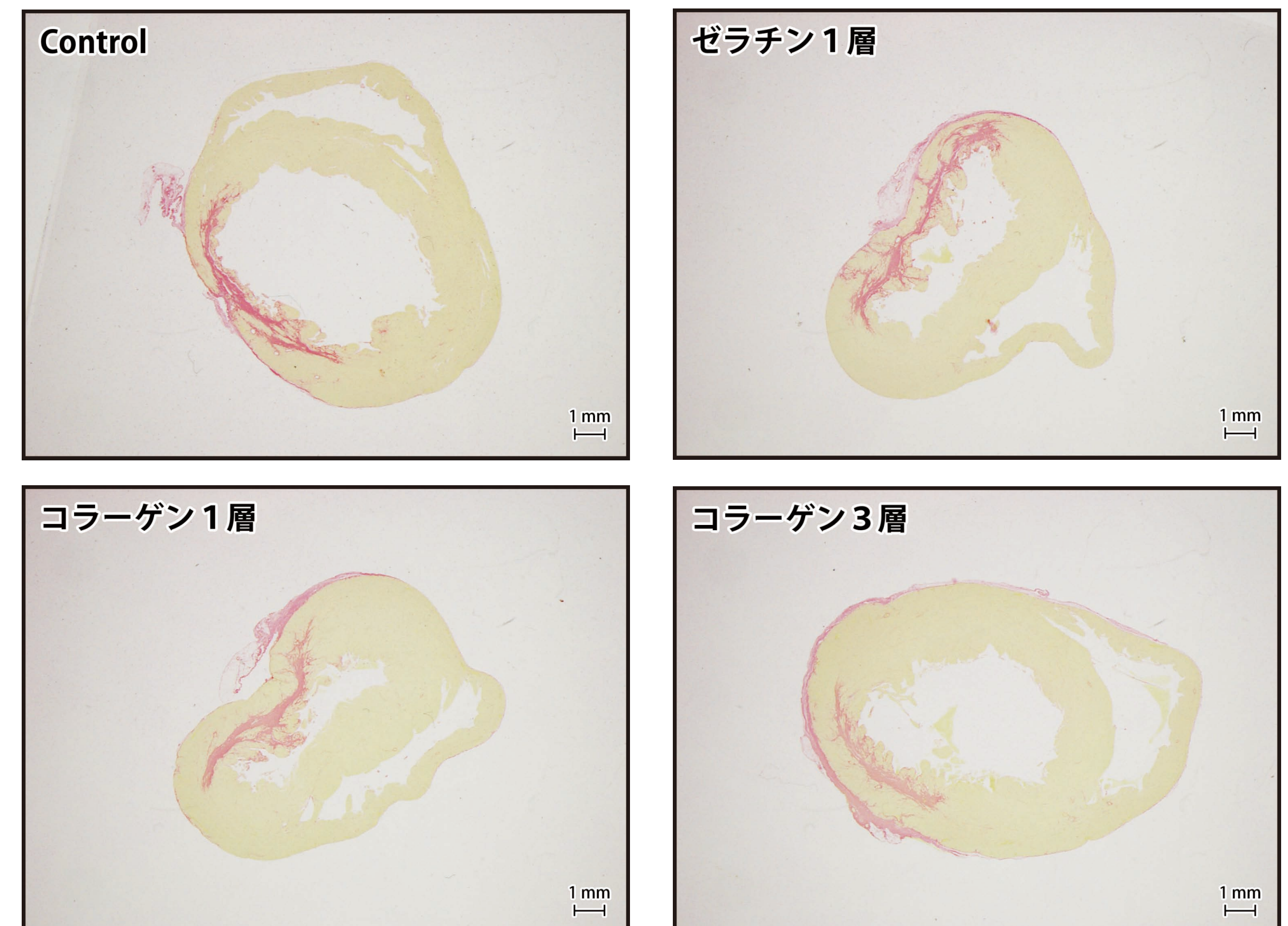


拡張末期左室容積 (LVEDV)
・移植後8週および10週で全ての群が同程度であった。
収縮末期左室容積 (LVESV)
・ゼラチン1層群はControl群と比べて移植後8週まで有意に低値で推移した。
・コラーゲン1層およびコラーゲン3層群はControl群と比べて移植後8週まで有意に低値で推移した。
これらのことから、細胞シートは拡張機能ではなく、収縮機能に改善効果があることが示唆された。



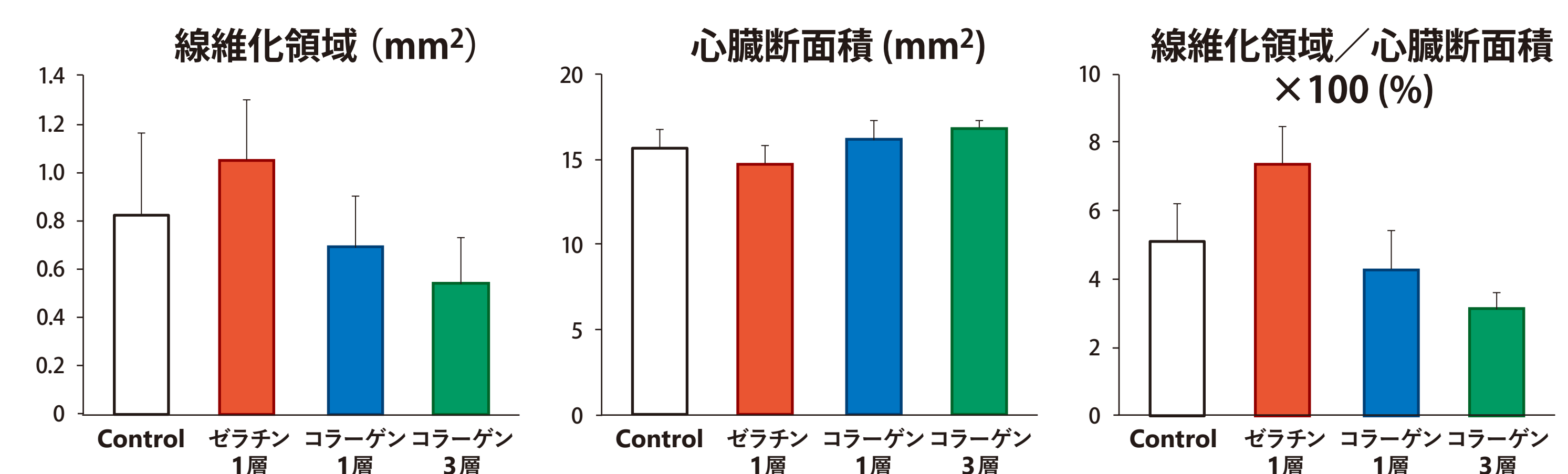
左室前壁厚 (IVSTd)
・コラーゲン1層および3層群はControl群と比べて高値を推移した。
・ゼラチン1層群はControl群と比べて移植後10週まで高値で推移し、移植後2, 8および10週では有意に高値であった。
・コラーゲン1層群はControl群と比べて移植後10週まで高値を推移し、移植後2, 4, 6および8週で有意に高値であった。コラーゲン3層群はControl群と比べて移植後10週まで高値を推移し、移植後2, 4, 6および8週で有意に高値であった。
左室後壁厚 (LVPWTd)
・全ての群が同程度を推移した。
これらのことから、細胞シートは、梗塞の起こった前壁の菲薄化を抑制する可能性が考えられた。

線維化評価



線維化領域をシリュスレッド陽性(赤色)で示す。なお、HE染色標本において、線維化のほか、梗塞部位を主体とする炎症性細胞浸潤を伴う例も認められたが、その程度に群間差は認められなかった。また、梗塞部位外の心筋に顕著な変化はなかった。

線維化領域定量評価



線維化領域では、
・有意差はないものの、コラーゲン1層および3層はControl群と比べて低値を示した。
心臓断面積では、
・全ての群が同程度であった。
心臓断面積に占める線維化領域の割合では、
・有意差はないものの、ゼラチン1層群はControl群と比べて高値を示し、コラーゲン1層および3層はControl群と比べて低値を示した。さらに、コラーゲン3層群は1層群よりも低値を示した。
これらのことから、コラーゲン素材は心筋梗塞による線維化を抑制する可能性が考えられた。