

## ラット急性心筋梗塞モデルにおける脱細胞化粉末の組織治癒の検討

## Effect of Decellularized Tissue Powder on Rat Model of Acute Myocardial Infarct

○田淵正樹 (札幌医科大学) 船本誠一 (札幌医科大学) 根岸淳 (札幌医科大学)

南広祐 (東京医科歯科大学) 木村剛 (東京医科歯科大学) 藤里俊哉 (大阪工業大学)

岸田晶夫 (東京医科歯科大学) 樋上哲哉 (札幌医科大学)

Masaki TABUCHI, Sapporo Medical University School of Medicine, Seiichi FUNAMOTO, Sapporo Medical University School of Medicine, Jun NEGISHI, Sapporo Medical University School of Medicine, Kwangwoo NAN, Tokyo Medical and Dental University, Toshia FUJISATO, Osaka Institute of Technology, Akio Kishida, Tokyo Medical and Dental University, Tetsuya Higami, Sapporo Medical University

**Abstract:** Many research groups have been investigating new treatment modalities for myocardial infarction. There are aspects to consider in the clinical application, such as low cell integration and engraftment rate in cell injection techniques. Decellularized tissues are considered materials that promote regeneration of traumatic tissues. The property of the decellularized tissues is sustained after processing to powder form. In this study, we tried to apply the decellularized tissue powder on rat model of acute myocardial infarct. We found that the decellularized tissue powders, especially liver powder, promoted cell integration and neovascularization in vitro and in vivo. The decellularized liver powder induced neovascularization in the infarct area, which resulted in suppression of myocardial necrosis. The results of this study suggested that the decellularized liver powder could be applied as a blood supply material for myocardial infarct treatment.

**Key Words:** decellularized tissue powder, acute myocardial infarct, neovascularization

## 1. はじめに

近年、組織幹細胞を用いた再生医療技術の研究が活発に行われている。心臓領域の再生医療技術では、幹細胞移植療法や細胞シート療法が検討されており、移植した幹細胞や細胞シートが、組織治癒に関係する種々の細胞の誘導因子を放出し、自己の組織幹細胞を誘導することが示唆されている。そこで、私達は、組織治癒に関係する細胞誘導因子を放出する材料としての脱細胞化組織に注目し、新たな治療法の可能性を検討している。脱細胞化組織の特性として、異種及び異所性拒絶を生じず、その粉末には、組織治癒や再生を促進する作用が報告されている。

本研究では、脱細胞化組織粉末による自己治癒能力を活用した新たな心筋梗塞治療の可能性を調べた。

## 2. 実験方法

Wister rat (10週令)より、肝臓および心臓を摘出し、高静水圧法を用いた脱細胞化処理により、細胞を組織内より除去した。その後、凍結乾燥処理を行った後に、粉碎処理し、脱細胞化粉末を作成した。

作成した脱細胞化粉末を HE 染色および走査型電子顕微鏡 (SEM) により、脱細胞化の評価と粉末の形状を評価した。加えて、脱細胞化粉末の細胞毒性および細胞遊走性試験を行った。

生体適合性を評価するため、ラット皮下埋植試験を行った。ラット皮下埋植モデルでは、wister rat (10週令)を鎮痛薬および麻酔薬により不動化させ、ラット背部を剃毛後、イソジン溶液にて皮膚表面を消毒した。その後、皮下を 10 mm 切開し、切開部より皮下組織を剥離し縦・横に 20 mm ほど剥離し、剥離した部位に、脱細胞化粉末・フィブリンゲル (脱細胞化粉末 + フィブリン糊) を移植した。移植後

3 日後に移植部位を摘出し、組織周囲の炎症反応を評価した。

脱細胞化粉末の組織治癒に対する効果をラット急性心筋梗塞モデルで検討した。ラット急性心筋梗塞モデルでは、wister rat (10週令)を鎮痛薬および麻酔薬により不動化させ、サーフローの外筒を挿管チューブとし、挿管後は人工呼吸器管理とした。その後、左側開胸により心臓へアプローチを行い、7-0 プロリン糸を用いて、冠動脈 (左前下行枝) を結紮した。前下行枝結紮による左室前壁の心筋梗塞モデルを作成し、白色化した心筋梗塞部へ、脱細胞化粉末およびフィブリン糊を塗布し心筋梗塞部位への治療とした。治療後は、閉胸し自発呼吸を確認するまで人工呼吸器管理を継続して、抜管後は体温低下を防ぐため 37°C にケージを加熱し、経過を観察した。4 週間後にラットを犠死させ、心臓を摘出し、組織学的に評価した。

## 3. 結果

高静水圧法により、ラット肝臓・心臓の脱細胞化が可能だった。HE 染色で、細胞化肝臓には、明確な残存 ECM 構造体が認められなかったが、脱細胞化心臓は、明確な ECM 構造体が認められた。

SEM 所見では、脱細胞化組織は、直径 500  $\mu$ m 以下の粉末状に調整可能だった。肝臓粉末は、細かい粒子形状を示し、心臓粉末は、比較的サイズの大きな板状を示した。

脱細胞化粉末の in vitro 評価では、心臓および肝臓の脱細胞化組織粉末に細胞毒性は認めず、脱細胞化肝臓粉末に細胞遊走性を認めた。

ラット皮下埋植試験では、脱細胞化肝臓粉末、心臓粉末ともに、顕著な炎症反応の惹起は認めなかった。脱細胞化組織粉末・フィブリンゲルに新生血管の誘導とゲル内への

細胞浸潤を認めた。また、心臓組織粉末に比べ、肝臓組織粉末において、強い細胞浸潤を認めた。(Fig 1)

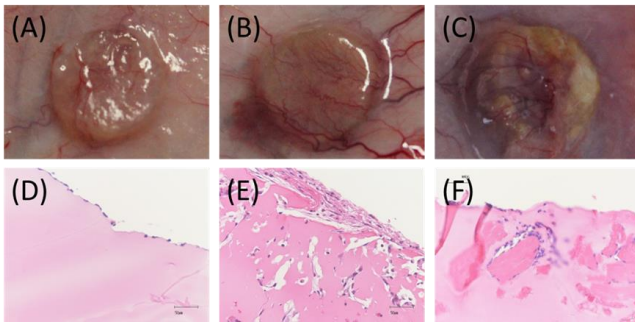


Fig 1. Photographs and H-E-stained sections of the fibrin gels after 7 days implantation in rats. (A, D) fibrin gel, (B, E) fibrin gel including with the decellularized liver powder, and (C, F) fibrin gel including with the decellularized heart powder. Scale bar: (D-F) 50  $\mu$ m.

ラット急性心筋梗塞モデルにおいては、未治療群、フィブリン糊添加群と比較し、脱細胞化肝臓粉末+フィブリン糊添加群では、新生血管の増生が認められた。

#### 4. 考察

高静水圧法によるラット肝臓および心臓組織からの脱細胞化組織粉末作製が可能だった。脱細胞化処理には他にも界面活性剤法があるが、高静水圧法においても、ほぼ同一の脱細胞化の結果が得られたと考えられる。生体適合性を評価するため、ラットを用いた動物実験を行った結果、脱細胞化組織粉末は、炎症反応を惹起せずに、宿主細胞を誘導することが示された。また、組織ごとに、脱細胞化組織粉末の性質が異なることが示された。ラット急性心筋梗塞モデルにおいては、脱細胞化肝臓粉末により梗塞周囲への新生血管誘導の可能性も示された。

心筋梗塞が生じると、虚血に陥った心筋部位へ血管誘導などの自己治癒力が惹起されているが、その作用は非常に弱いため、虚血心筋は壊死に至る。さらにその後におこるリモデリングにより、梗塞部位の菲薄化が生じる。これらの過程を脱細胞化組織粉末の作用により、改善できる可能性が考えられる。

これらのことから、脱細胞化粉末を利用した新たな心筋梗塞治療の可能性を示した。

#### 参考文献

- (1) Negishi J, Funamoto S, Kimura T, Nam K, Higami T, Kishida A. Effect of treatment temperature on collagen structures of the decellularized carotid artery using high hydrostatic pressure. *J Artif Organs* 2011;14:223-231.
- (2) Fischer M, Llauro JG. Collagen and Elastin Content in Canine Arteries Selected from Functionally Different Vascular Beds. *Circulation Research* 1966; 19: 394-399.