



Title	Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix
Author(s)	安井, 治代
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51913
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	安井 治代
論文題名 Title	Excitation propagation in three-dimensional engineered hearts using decellularized extracellular matrix (脱細胞化細胞外マトリックスを用いて構築した三次元立体心臓組織の興奮伝播)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 心不全治療の進歩にもかかわらず、心臓移植はいまだ重症心不全に対する最終的な治療法となっている。しかし深刻なドナー不足が続いており、新たな治療法として再生治療が期待されている。重症不全心を心筋再生療法にて治療し、移植に匹敵するような効果を期待するためには、多くの心臓細胞を置換し、臓器構造を作ることが必要と考えられる。一方、生体由来の鋳型である脱細胞化細胞外マトリックスを用いて三次元臓器を構築する方法が報告されているが、心臓に関しては、臓器全体としての機能・形態的特徴に関して十分な評価がなされていない。そこで我々は、脱細胞化細胞外マトリックスとラット新生仔心臓細胞から作成した三次元再細胞化心臓の興奮伝播を、臓器全体として検討することを目的として研究を行った。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ラット成獣心を0.5% SDSと1% Triton-X100を用いて脱細胞化し、これを鋳型として用いた。次に、ラット新生仔由来心臓細胞を単離した。必要に応じてGFPやカルシウム感受性色素であるGCaMP2を用いて細胞の標識を行った。単離した細胞を、経冠動脈的に脱細胞化心臓に注入した。このようにして作成した再細胞化心臓の機能、形態解析を行った。SDSとTriton-X100にて灌流すると、徐々に細胞成分が流れ去り、最終的には細胞外マトリックスを残してすべての細胞成分が心臓から取り除かれた。 GFPで標識した細胞を経冠動脈的に灌流したところ、播種細胞が徐々に末梢血管から間質に漏出する様子が観察された。細胞は心臓全体に不均一に生着し、また、血管内だけでなく間質にも認められた。経時的に観察を行ったところ、生着した細胞は心臓内に保持されていた。 再細胞化した心臓は2-3日で拍動を開始した。免疫染色では、心筋細胞のマーカーと考えられるα-actinin陽性細胞は、ラミニン陽性の細胞外マトリックスに囲まれる形で観察された。電子顕微鏡所見においても、再細胞化心臓では、細胞外マトリックス内にサルコメア構造の存在を認め、再細胞化心臓に心筋細胞が生着していることが確認された。 α-actinin陽性細胞はconnexin43 (Cx43)の発現を伴っていたが、その発現は軽微であった。内皮細胞マーカーとしてCD31、血管平滑筋マーカーとしてsmooth muscle actin (SMA)で染色を行ったところ、CD31陽性細胞、SMA陽性細胞はそれぞれα-actinin陽性細胞と不規則に混在しており、脱細胞化された血管構造には局限していなかった。再細胞化心臓の蛋白発現をウェスタンブロット法により調べたところ、心臓の収縮性蛋白と考えられるα-actinin、myosin heavy chain、troponin Iは成獣心と同様豊富に発現していたが、Cx43とVE-cadherinは成獣心に比べると著明な減少を示し、免疫染色と同様の所見であった。 GCaMP2発現細胞を脱細胞化心臓に播種し、高解像度カメラを用いて心臓全体の観察を行った。自発的な興奮は全体として安定して伝播しているように観察されたが、isochrone map (等時線図)からは、不均一な伝播が示唆された。さらに詳しく調べるため、蛍光顕微鏡を用いて心臓全体の興奮伝播の観察を行った。また、各サンプルにおいて離れた3か所でCa^{2+} transient (CaT)を記録し、周波数解析を行った。同期した興奮伝播も認められたが、一部では、非同期で無秩序な興奮も認められ、様々な興奮伝播様式を呈していた。 〔総括(Conclusion)〕 ラット新生仔由来心臓細胞と、ラット脱細胞化マトリックスを用いて、立体臓器(心臓)の構築を行った。GCaMP2標識細胞を用いて、再細胞化した心臓の興奮伝播様式を臓器として観察した。興奮が安定して伝播する領域も見られたが、不均一な伝播も認められ、再細胞化心臓は臓器としてダイナミックな興奮伝播を呈した。機能的な三次元心臓組織を構築するにあたり、催不整脈性を評価する手段として今回示した臓器全体でのイメージングは有用であると考えられる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 安井 治代			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	坂田 泰史
	副 査	大阪大学教授	桑木 宏実
	副 査	大阪大学教授	岡村 康司

論文審査の結果の要旨

脱細胞化細胞外マトリックスを使用し三次元心臓組織を構築する方法が報告されているが、臓器全体としての機能、形態的特徴に関して十分な評価がなされていない。本研究では、構築した立体心臓組織の興奮伝播を臓器全体として検討した。

経冠動脈的に脱細胞化マトリックスに播種したラット新生仔由来心臓細胞が、間質に移行する様子を観察した。カルシウム感受性色素（GCaMP2）にて標識し光学的イメージングを行ったところ、同期した興奮伝播も認められたが、一部では非同期で無秩序な興奮も認められ、再細胞化心臓は臓器としてダイナミックな興奮伝播を呈した。免疫染色では、心筋細胞、内皮細胞、血管平滑筋細胞が無作為に混在し、心筋細胞の錯綜配列がみられ、コネキシン43の発現は減少していた。

機能的な三次元心臓組織を構築するにあたり本手法は有用と考える。

以上より、本研究は学位の授与に値すると考えられる。