

論文の内容の要旨

論文題目 APPLICATION OF DECELLULARIZED MATRICES ENGINEERED BY A NOVEL CIRCULATED SONICATION TREATMENT TO AORTIC TISSUE REGENERATION

(新規循環ソニケーション技術により調製した脱細胞化マトリックスの動脈組織再生への適用)

氏名 アズラン アズヒム

背景・目的

末期の臓器不全および心血管疾患患者のバイパス手術において必要な動脈および器官の増加により、代替医療の確立が不可欠となっている。バイオマテリアル研究の急速な発展によって、新規材料の開発を通じて代替医療品の開発がなされてきており、代替医療品の開発数は将来的にも有意に増加すると予測される。組織を再生させるための足場材料としては合成された高分子を用いるケースが多いが、一方で細胞接着、マトリックス産生の観点からは生体材料で構成されたバイオ足場が有効とされている。そのバイオ足場を製作する方法は種々研究されてきているが、その中でも生体組織を脱細胞化することによりバイオ足場を作製する方法は有力な方法の一つである。本研究では生体組織を脱細胞化する方法としてソニケーション技術を導入した。

本研究では、ソニケーション処理によってバイオ足場を調製し、バイオ足場への血管内皮 (VSM) 細胞の播種効率を検証し、そしてラットに移植した後にバイオ足場の組織学的状態を解析することを通じて、ソニケーション処理によって作製した脱細胞化バイオ足場の組織再生における有効性を検証することを目的とする。

結果・考察

バイオ足場は、細胞浸潤および接着をみるために、6日間静置培養の条件下で、VSM細胞を播種した。細胞播種の6日間後にバイオ足場は、VSM細胞の浸潤を観察するためにHE染色により評価した。Fig. 1bは、ソニケーション処理で脱細胞化した足場における細胞播種の3日間後にHE染色したサンプルを示す。また、VSM細胞を足場に浸潤し、マトリックス間に細胞を

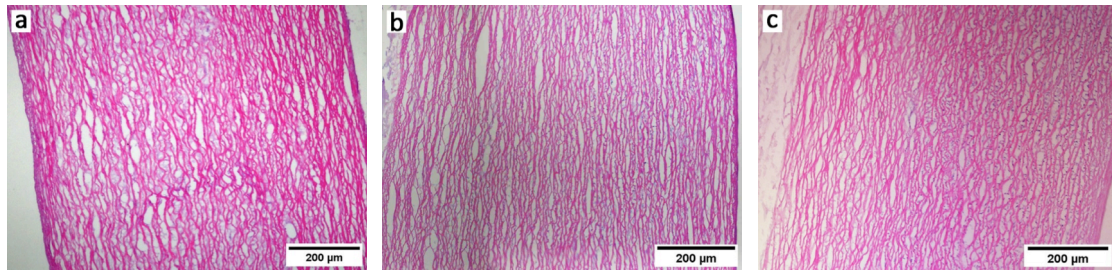


Fig. 1 Seeding of VSMCs onto decellularized arterial tissue. H-E staining of sonicatedly decellularized tissue on 0 day (a), 3 days (b), and 6 days (c). The H-E staining showed that most cells infiltrated onto luminal side of decellularized tissue after 6 days of cell-seeding.

生着し組織が再生することが観察された。Fig. 1c は、細胞播種の 6 日後に VSM 細胞の高い密度で、播種した細胞が足場の全体に均一に分布していることを示す。

Fig. 2 に示すようにバイオ足場への VSM 細胞の浸透深さを、各サンプル間で比較した。超音波処理において、0.1%と 2% SDS で脱細胞化された血管由来足場においては、VSM 細胞はそれぞれ 0.43mm と 0.35mm の浸透深さを示した。その結果により、ソニケーション処理により調製された脱細胞化足場においては細胞増殖・生着が良好であり、VSM 細胞の浸潤・再生が可能であることが示された。

Fig. 3 に示すように、細胞播種の 0, 2, 3 及び 6 日間脱細胞化し、その足場への VSM 細胞の生着を評価するために Scanning Electron Microscopy (SEM)により観察した。静的播種条件下および 1.5×10^4 cell/cm²/well の播種密度で、2 日後に内皮側 (Fig. 3c) や外皮側 (Fig. 3d) 共に、VSM 細胞が生着していることが観察された。Fig. 3e と Fig. 3f に示すように、細胞播種の 3 日目の SEM 画像において、血管足場の外膜および内皮表面にも VSM 細胞の生着が確認された。バイオ足場に接着した細胞の播種密度は、静的培養によるインキュベーション時間とともに増加することが示された。脱細胞化足場の SEM 画像では、6 日後に外膜および内皮表面上の VSM 細胞の密度が高く、コントロールであるネイティブの動脈足場に匹敵する単層構造が維持されていた。

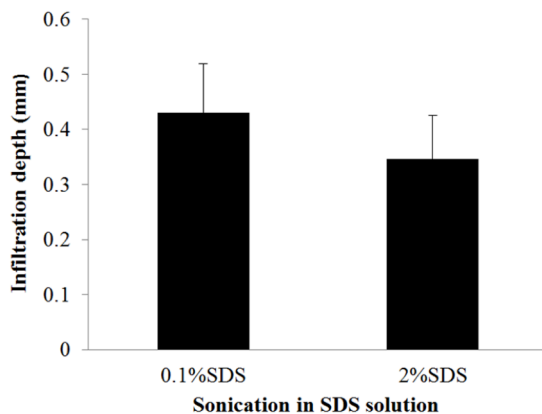


Fig. 2 Infiltration depth of VSMCs onto decellularized tissues after 6 days of cell-seeding. Sonication treatment was performed in two SDS concentration, 0.1% SDS and 2% SDS.

Fig. 4 は、ソニケーション処理によって脱細胞化された組織に対する宿主反応を異種移植で評価した結果を示している。皮下移植の 7 日目において、ラットの皮膚の表面の外観を観察した。ネイティブ標本 (Fig. 4a) では、0.1% SDS ソニケーションで脱細胞化したサンプル (Fig. 4b) と、2% SDS での処理されたサンプル (Fig. 4c) と比較して、ラットの皮膚により顕著な赤みを示した。

Fig. 5 は、移植 7 日後および 35 日後の動脈サンプルの HE 染色像を示している。脱細胞化サンプルと比較して、ネイティブのサンプル (Fig. 5a) 周辺はより顕著な炎症が観察された。0.1% SDS でソニケーション脱細胞化されたサンプル (Fig. 5b) および 2% SDS での処理されたサンプル (Fig. 5c) の両方において、移植 7 日後と比較して少ない炎症反応を示した。また、Fig. 5i および Fig. 5h に示されるように、移植 35 日後に、2% SDS でソニケーション脱細胞化されたサンプル、そして 0.1% SDS で処理されたサンプルにおける炎症反応は、ネイティブのサンプルと比較して抑制されている所見が得られた。

脱細胞化組織によって誘発される炎症反応の程度を調べるために、異種移植を、7~35 日間実施した。ネイティブ・サンプルの炎症領域は 2% SDS でソニケーション脱細胞化されたサンプル

よりも 13 倍高いことが見出された (図の非表示)。ソニケーション脱細胞化サンプルは、ネイティブ・サンプルと比較して、最小限の炎症反応を示した。また、7 日間移植したサンプルは、ラットの皮膚の表面の外観から炎症の確認ができた (Fig. 4)。マクロファージの密度は、皮下移植後の 7 日間に、ネイティブ・サンプルに比べて、0.1% SDS と 2% SDS ソニケーション脱細胞

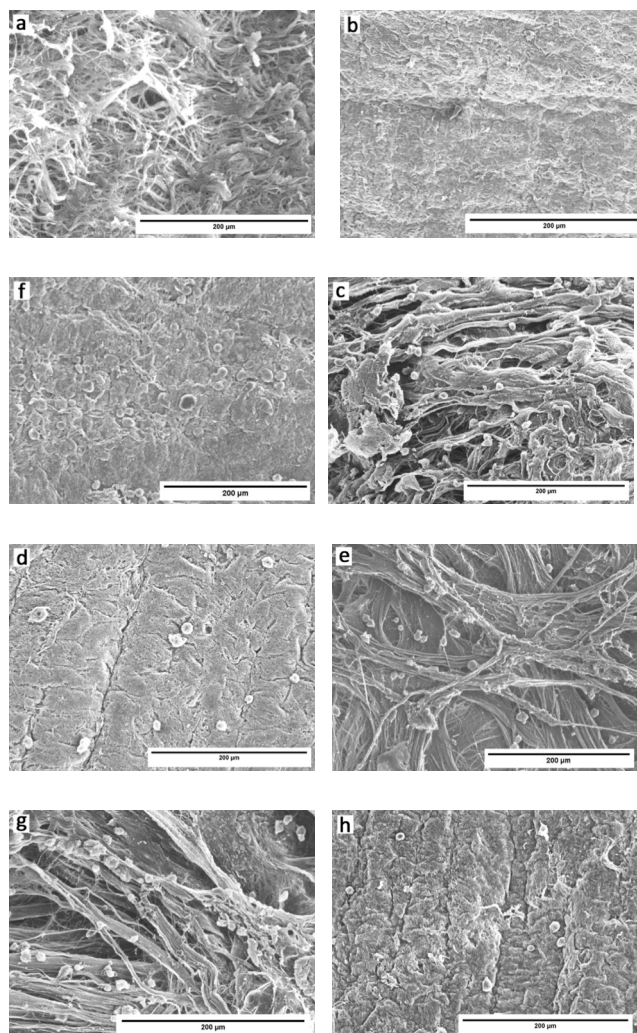


Fig. 3 Scanning electron micrographs of VSMCs seeded on adventitial surface for 0-day (a), 2-day (c), 3-day (e), 6-day (g), and endothelial surface for 0-day (b), 2-day (d), 3-day (f), 6-day (h).



Fig. 4 Surface appearances of rat's skin after 7 days of implantation for native samples (a), sonicatedly decellularized samples treated with 0.1% SDS (b), and sonicatedly decellularized samples treated with 2% SDS (c).

胞化されたサンプル周囲において、より低いという所見が得られた。それぞれのソニケーション脱細胞化されたサンプルにおいて、移植後 35 日に達した時点において、マクロファージの遊走がより抑制され、密度が低いという所見が得られた。

本研究では、動脈組織を 0.1%SDS および 2%SDS ソニケーション処理によって脱細胞化した。脱細胞化組織は、0.1%SDS に比べて 2%SDS ソニケーション処理の方が細胞核の除去および ECM アーキテクチャの保持が良好であった。ソニケーション処理において、ラットで皮下移植時に最小限の炎症反応が観察されるように、低免疫原性の脱細胞化組織を調製することが可能となった。しかしながら、ソニケーション処理から調製した脱細胞化組織の特性をより詳しく評価するために更なる研究を実施する必要があると考えられる。脱細胞化のためのソニケーション技術は、大きさや種類の異なる様々な組織からバイオ足場を調製することに適用できると考えられる。

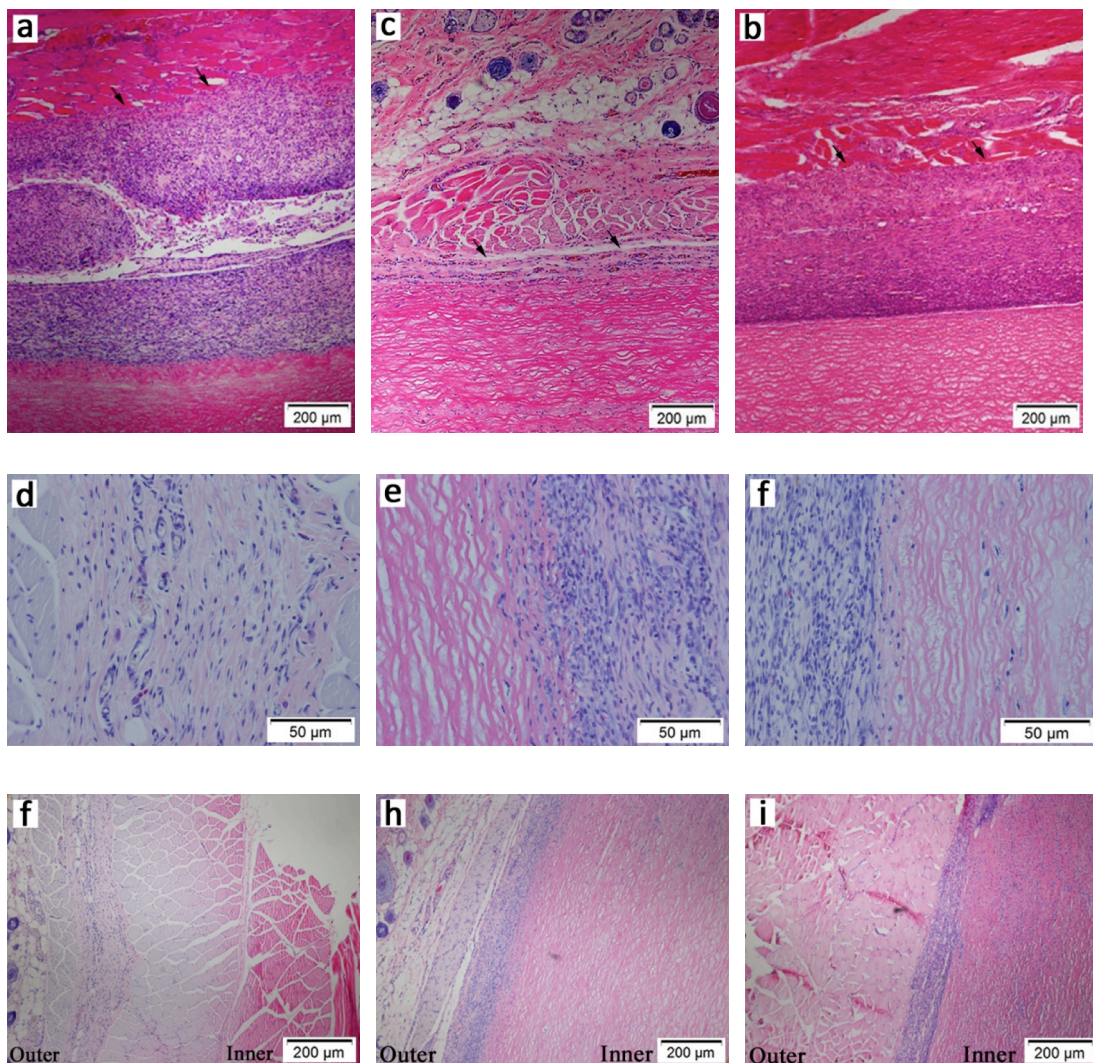


Fig. 5 Histological evaluation of xeno-implantation in native arterial tissue after 7 days (a), (d) and 35 days of implantation (g), arterial tissue decellularized by sonication treatment in 0.1% SDS after 7 days (b), (e) and 35 days of implantation (h), and 2% SDS after 7 days (c), (f) and 35 days of implantation (i), respectively.