

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 河崎 貴宣

### 論文題目

Novel detergent for whole organ tissue engineering.

### 論文内容の要旨

終末期心不全の最終的な治療手段は心移植もしくは左室補助デバイスしかない。しかしながらこれらの方法もドナー不足や免疫抑制剤による有害事象など欠点がある。組織工学的手法により無細胞の皮膚や血管、心臓弁のような有用な組織を作成することが可能になり、還流による全臓器の脱細胞も可能となった。しかしながら従来から使用されている硫酸ドデシルナトリウム(SDS)は細胞外マトリクスに障害を与えるだけでなく、糖鎖やサイトカインも除去することが知られている。このような変化が再細胞化へ悪影響を与え、炎症反応や血栓形成に寄与しているかもしれない。そこで我々は新規界面活性剤ラウリルエーテル硫酸ナトリウム(SLES)を用いてより脱細胞組織を作成し従来の方法で作成した脱細胞組織と比較検討を行った。

まず、我々は10-12週齢のWister ratをペントバルビタール腹腔内投与で麻酔を行った。その後、胸骨正中切開を行い、大血管を分離し上大静脈、下大静脈を切離し安楽死させた。上行大動脈を腕頭動脈近位部で肺動脈を左右分岐部でそれぞれ切離した。両側の肺静脈を結紮切離し、心臓を摘出した。上行大動脈に2mmのカニューーラを挿入し順行性にヘパリン化生理食塩水を還流し血液を洗浄した。-80度で凍結解凍を3回行った後、心臓を還流ポンプに接続した。12時間界面活性剤、15分間脱イオン水、30分TritonX-100で還流した後、500U/mlのDNase入りPBSで24時間還流を行った。血管連続性を評価するために順行性にトリパンブルーを注入し、血管外や心外膜への漏出がないことを確認した。HE染色とDAPI染色を行い、細胞成分の残存と遺伝性物質の残存の確認を行った。どちらのプロトコルでも十分に除去されていた。また、DNA残存量を測定したところいずれのプロトコルでも十分にDNAが除去されていることが確認できた。

次に心臓の細胞外マトリクス構成タンパクのうちコラーゲンI、コラーゲンIV、フィブロネクチン、ラミニンで免疫染色を行った。SDS,SLESどちらのプロトコルでも脱細胞後の組織で4つの構成タンパクが確認でき、同等の脱細胞能であることが確認できた。

脱細胞組織の微小構造を確認するために走査電子顕微鏡を用いて観察を行った。SLESで処理した心臓組織では細胞外マトリクスの微小構造が保持されていたが、SDSで処理した心臓組織では層状構造が破壊されていることが明らかとなった。

さらに、糖鎖のような高次構造を確認するためにアルシアンブルー染色、硫酸化グリコサミノグリカンの定量、グリカンプロファイリングを行った。アルシアンブルー染色では

SLESで処理した心臓は未処理の心臓と同等に染色されたが、SDSで処理した心臓はより薄く染色された。硫酸化グリコサミノグリカンの定量を行ったところSLESで処理した心臓では3/4残存していたのに対し、SDSで処理した心臓では検出されなかった。他のグリカンはGlycoStationを用いて解析を行った。このアレイの結果からSLESで処理した心臓は親水性タンパク分画の組成が元の心臓の組成と類似している一方、疎水性タンパク分画の組成はSDSで処理した心臓の組成と類似していることが明らかとなった。これはサイトカインのような親水性のタンパク質や細胞外マトリクスのような疎水性タンパク質がSLESで処理した心臓に残存していることが示唆された。次に我々はサイトカインの残存量をELISAを用いて測定した。basic FGFが有意にSLESで処理した心臓で多く残存していることが確認できた。

脱細胞組織の抗血栓性を評価するために脱細胞組織への血小板付着能を評価した。濃厚血小板液に脱細胞組織を浸漬し、付着しなかった血小板を洗浄した。付着した血小板をTritonX-100で処理しLDH活性をLDH cytotoxicity detection kitを用いて測定した。SLESで処理した組織のほうがSDSで処理したものに比べて明らかに低値であり、SLESで処理した組織への血小板付着能が少なく、抗血栓性を有していることが示唆された。また、炎症惹起性を評価するためにラットの腸間膜へ脱細胞組織を留置し2週間後に回収を行い、炎症細胞浸潤を評価した。CD68と膜侵害複合体(MAC)で免疫染色を行いImageJを用いて画像解析を行った。CD68、MACいずれでもSLESのほうが陽性の範囲が狭い結果が得られた。このことからSLESで作成した脱細胞組織の方がSDSで作成した脱細胞組織より抗炎症作用を有していることが示唆された。

組織工学においては細胞、細胞外マトリクス、サイトカインの3要素が重要と考えられている。SLESを用いたプロトコルで得られた脱細胞組織は従来のプロトコルよりも細胞外マトリクスの微小構造の破壊が少なく、糖鎖構造のような高次構造も保持されていた。さらに抗血栓性、抗炎症性を有していることが示唆され、全臓器組織工学における標準化プロトコルとして有用であると考えられた。