

審査の結果の要旨

小前 兵衛

温度応答性培養皿では温度を32℃以下に低下させるだけでタンパク分解酵素を使用せずに培養している細胞を回収できる。この性質を利用し、コンフルエント状態になるまで温度応答性培養皿で細胞を培養し、温度を下げると細胞同士の接着は維持されたままシート状に細胞を回収できる。このシート状に回収されたシート状の細胞は「細胞シート」と呼ばれている。本研究では、ヒト iPS 細胞から分化誘導させたヒト iPS 心筋細胞からヒト iPS 心筋細胞シートを作製し、それをヌードラット皮下で移植、積層化することでヒト心筋組織の構築を試みたものであり、下記の結果を得た。

1. ヒト iPS 心筋細胞シートを3層に積層したものをヌードラットの背部皮下に移植したところ、肉眼的に全体が同期した拍動を観察できた。拍動している部位の電位を測定したところ、ホストの心電図や呼吸のリズムとは全く独立した、全体的に同期した周期的な変化を示した。組織切片の蛍光免疫染色を行った結果、層状にトロポニン T 陽性の組織、すなわち心筋組織を確認できた。トロポニン T 陽性の領域は α -アクチニンにも陽性で、横紋様に染色されサルコメア構造の存在が示唆された。さらに心筋組織の中には CD31 陽性細胞がリング状に染色され、毛細血管網を伴うことが分かった。レクチンをホストに注入したのちに作製した切片では、構築された心筋細胞内にもレクチンがリング状に染まり、構築したヒト iPS 心筋グラフトがホスト血流により灌流されることが分かった。

2. 次にヒト iPS 心筋細胞シートをさらに積層しより厚いヒト iPS 心筋グラフトの作製を試みた。一度に4層以上重ねた細胞シートを移植すると、毛細血管網を伴わないため細胞シート内部は壊死してしまい、結局3層程度の厚さ(80-100 μ m)になることがわかっている。そこでヒト iPS 心筋細胞シートを3層に積層したものを1日おきに連続3日間、ヌードラット背部皮下に移植した。2日目、3日目に移植される3層ヒト iPS 心筋細胞シートは前日に移植されたヒト iPS 心筋細胞シートの上に重ねるように移植し、計9層のヒト iPS 心筋細胞シートを積層した。移植したヒト iPS 心筋細胞シートにはホストからの血流とつながる毛細血管網が1日で形成される。その上に移植された3層のヒト iPS 心筋細胞シート内にはホストからの血流で灌流される毛細血管網が形成されるため、4層以上の厚いヒト iPS 心筋グラフトが構築できた。つまり、1日おきに移植すれば帰納的に構築するヒト iPS 心筋組織はどんどん厚くできることがわかった。

3. 移植したヒト iPS 心筋細胞シートは、最長移植13か月後まで肉眼的な拍動や電気的活動を観察できた。移植6か月後の切片を作製し、蛍光免疫染色を行ったところ毛細

血管網を伴った心筋組織が構築されており、構築したヒト iPS 心筋組織の細胞密度は高かった。分裂のマーカーを染色してみると移植 2 週間後では盛んにヒト iPS 心筋細胞が分裂しており、移植 6 か月後のものでは分裂が止まっていることが分かった。

4. 電子顕微鏡で移植されたヒト iPS 心筋グラフトを観察したところ、細胞の構造が時間経過で成熟することがわかった。

5. ノードラットの大腿動静脈に灌流される脂肪組織上で連続 2 日間、3 層のヒト iPS 心筋細胞シートを移植し 6 層のヒト iPS 心筋グラフトを作製した。2 週間後に大腿動静脈とともにヒト iPS 心筋細胞シート移植部位を摘出、血管付きヒト iPS 心筋グラフトとし、すぐに別個体のノードラットの頸部の動静脈に吻合した。移植 1 週間後で血管付きヒト iPS 心筋グラフトは肉眼的な拍動や電氣的な活動が観察でき、組織学的にも宿主血流から灌流される毛細血管網を有する心筋組織として生着していた。以上からヒト iPS 心筋グラフトは異所移植を行っても心筋としての性質が維持できることが確認できた。

以上、ヒト iPS 細胞より分化誘導させたヒト iPS 心筋細胞から、細胞シート工学の技術を用いることで 3 次元的な厚いヒト心筋組織の構築に成功した。さらに血管付きグラフトとして異所移植を行っても心筋としての性質が維持できることを確認した。今後、本研究で作製されたヒト心筋組織が実際に臨床の現場に持ち込まれ、心筋収縮力の補助などで実用化されれば数多くの重症心不全患者を治療できる可能性があると考え、学位の授与に値するものと考えられる。