

博士論文

iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた
ヒト三次元心筋組織の構築

小前 兵衛

iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた

ヒト三次元心筋組織の構築

東京大学大学院博士課程医学系研究科

外科学専攻 心臓外科

指導教官：小野 稔 教授

小前 兵衛

要旨

重症心不全治療では厚い心筋組織の再生が望まれている。過去、細胞シート工学を用いて新生児ラット心筋細胞シートを積層しラット心筋の構築に成功している。近年は iPS 細胞由来ヒト心筋細胞を入手できる。同手法でヒト心筋組織の構築を試みた。

ヌードラット皮下にヒト iPS 心筋細胞シートを移植するとヒト心筋組織として生着し時間経過で成熟した。シートを 3 日間連続で重ねて移植すると更に厚い心筋組織となった。

次に大腿動静脈が灌流する鼠径部の皮下組織上で心筋組織を構築し、血管付き心筋グラフトとして摘出、血管吻合により別個体へ異所性に移植可能なことを確認した。

本研究で構築したヒト心筋組織は新たな心不全治療の選択肢になりうる。

1 序文

1.1 背景

近年、重症心不全に対する内科的・外科的治療は飛躍的に進歩しているが、根治できる唯一の方法は心臓移植のみである。しかし、心臓移植の場合は、腎臓移植などとは異なり、死体から摘出されすでに拍動が停止している心臓は移植には適さない。それゆえドナー心臓は脳死下で摘出される必要がある。そして、日本では社会的な要請から移植医療を推進させるために脳死判定や臓器移植に関する法制度の整備が進められ、2010年7月からは改正臓器移植法が全面施行され、脳死下でも臓器提供が可能になった。

確かに、その後は臓器提供数と移植件数は増加傾向にある(図 1-a)。しかし、日本人特有の死生観や倫理観が定着している影響もあってか、脳死下での心臓提供数はそれほど多くなく、心臓移植は年間せいぜい 30 件程度にとどまっている(図 1-b)。その一方で日本における心臓移植登録者数は増加し続け、2014 年 9 月 30 日時点で 300 人を超えている¹(図 1-c)。ドナー心臓数が絶対的に不足しているのが現状である。

渡航移植という手段もあるが、莫大な経済的負担と労力が必要となるため実現はなかなか難しく、実際に行われている件数はごくわずかである。また、2008 年 5 月に国際移植学会が「イスタンブール宣言」を出したことにより、自国内の

臓器提供を増やして自国内で移植を受ける傾向がすすみ、アメリカとカナダを除く海外では他国患者への臓器移植は受け入れなくなっている。渡航移植を受け入れているアメリカとカナダもいわゆる「5%ルール」を継続しているが、廃止される可能性も否定できない。

ドナー心臓数が絶対的に不足している日本では、重症心不全患者は bridging therapy として補助人工心臓サポート下で心臓移植の順番がまわってくるまで長期間の待機を強いられる。半数以上の患者は1年以上待機しており、10%を超える患者は5年以上も待機している(図 1-d)。この長い待機期間中に原病の悪化や合併症で心臓移植に到達できずに多くの命が失われている²。

日本人の考え方の変化や臓器提供の啓発活動により今後、提供されるドナー心臓数は徐々に増えるだろうが、レシピエントの数はそれ以上の勢いで多くなると予想され、現状のように心臓移植のみで重症心不全を根治するのは限界がある。

そこで新たな手法として、再生医療が注目されている。重度に障害された心筋組織の機能を何らかの方法で再生できれば、あるいは人工的に構築した心筋組織・心臓をドナー心臓に代わって移植できれば、より多くの重症心不全患者を救えるのではないかと期待されている。

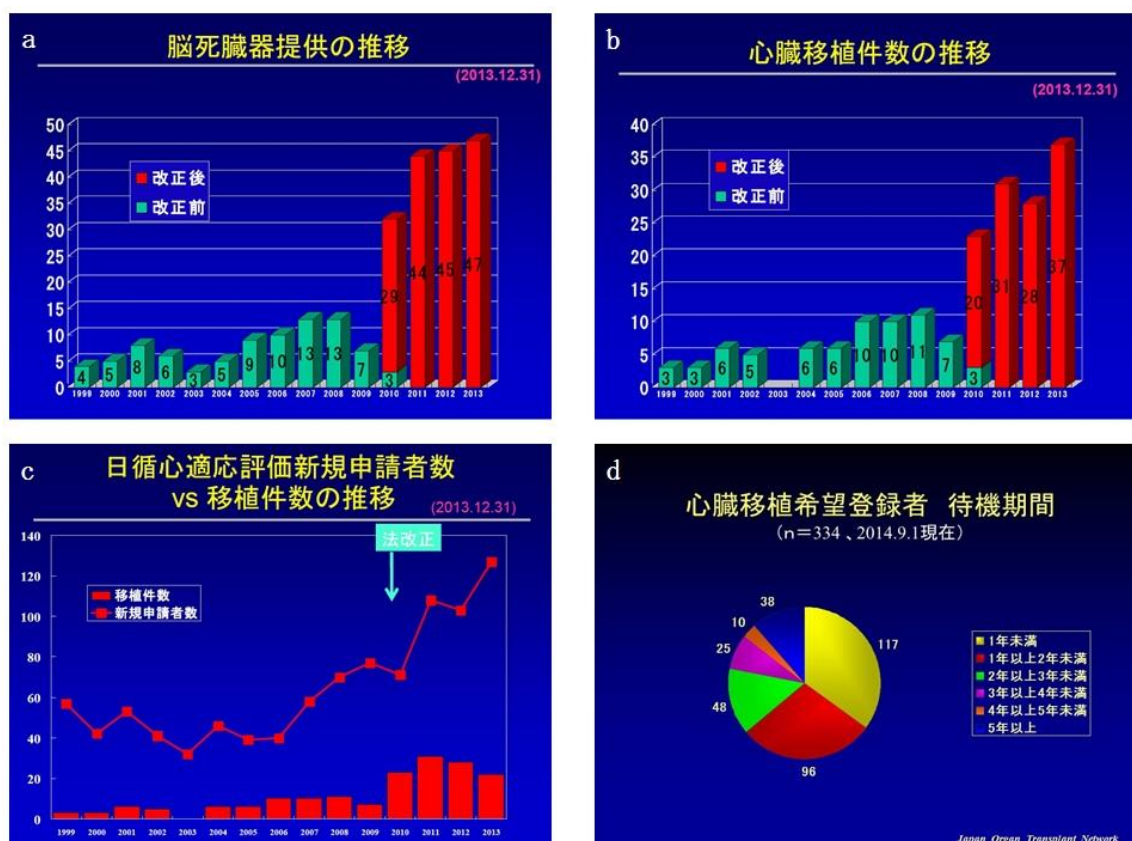


図1 我が国の心臓移植の現状

1-a, b, c: 日本心臓移植研究会 心臓移植のまとめより抜粋 1-d: 日本臓器移植ネットワークホームページ 移植希望登録者数詳細データより抜粋

1.2 再生医療の流れ

1980年代にランガーとヴァカンティは、生体に対して無害な生分解性の素材由来のスキヤフォールド(足場)の上にヒト軟骨細胞を播種・培養して定着させラットの背部皮下に移植した。そしてスキヤフォールドは生体内で分解・吸収され、細胞外マトリックスに置換され、播種されていたヒト軟骨細胞はスキヤフォールドの形状のまま残った。このマテリアル工学の技術を応用した画期的な手法でヒト軟骨組織の作製に成功した³。その軟骨の形状がヒトの臓器の中でも複

複雑な三次元構造をもつヒト耳介軟骨でも再生できたことから、他の複雑な構造を持つ組織も人工的に作製できる可能性が見いだされ、マテリアル工学と再生医療を融合させた組織再生工学の概念が提唱された。それを機にさまざまな分野で再生医療の研究がめざましく進歩することとなる。

組織再生工学の手法で人工的に組織を再生するためには目的の組織を構成する生きた細胞が必要である。ただ、大抵の細胞を採取するためには生体への侵襲を伴う。さらに、分裂しない細胞は増殖させられないため、必要数を集めることが難しい。それ以前に、解剖学的に採取不可能な細胞もある。そのような入手困難な細胞で構成される組織や臓器では再生に関する研究はなかなか進められなかった。

その一方で、あらゆる細胞へ分化できる多能性幹細胞についての研究も進められており、多能性幹細胞を分化誘導させることで、入手困難な体細胞を入手できるようになってきた。そして 2007 年にはその当時に盛んに研究に使われていた胚性幹細胞 (ES 細胞) が抱えていた弱点である倫理的な問題をクリアした、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) がヒトでも樹立された⁴。その結果、ほとんど分裂しない、入手困難であったヒトの心筋細胞が入手可能になり、それまではアプローチが難しかったヒトの心筋再生に関する研究が盛んに行われるようになった。

1.3 細胞シート工学について

心筋組織をはじめ分厚い組織を人工的に作製するためには組織工学の技術を応用して細胞の密度を高める必要がある。大半の手法は前述のような生分解性のスキャフォールドを利用するものである⁵⁻⁹。新しい手法としては臓器を脱細胞化してスキャフォールドとして用い、目的の細胞を生着させて臓器を再生させるという方法もある¹⁰。

スキャフォールド法はスキャフォールドを自由に設計することで、思い通りの形状のグラフトを簡単に構築できるという大きな利点がある。一方で、生体異物反応として炎症反応が起こること、スキャフォールドへの感染時の対処が困難なこと、スキャフォールドは分解後に細胞外マトリックスに置換されるため、細胞密度が非常に高い組織の作製が困難であることなどの問題点も挙げられる。

それに対して、本研究で用いた細胞シートによる組織工学はスキャフォールドを用いない手法の代表的なものである。細胞シートによる組織工学では「温度応答性培養皿」と呼ばれる特殊な培養皿を用いる。温度応答性培養皿とは、通常の培養皿の底面に電子線でポリ α -イソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)と呼ばれる特殊な性質をもった高分子を共有結合させたものである。PIPAAm は温度応答性の高分子であり、細胞の培養温度(37℃)では疎水性を示すが、32℃以下になると親水性に変化する¹¹。このため培養温度下ではPIPAAm は疎水性を示し、通

常の培養皿と同様に細胞は温度応答性培養皿底面に接着・増殖するが、温度降下処理(32℃以下)を行うと PIPAAm が共有結合した培養皿底面が親水性に変化し、底面に接着していた細胞は、自然に培養皿底面から剥離する¹²(図 2-a, b)。

この温度応答性培養皿を用いてコンフルエントになるまで細胞を増殖させた状態で温度を下げてしばらくすると、細胞同士の接着は保たれたままで細胞と培養皿底面のみが自然に剥離し、シート状になった細胞を回収できる。これを細胞シートと呼ぶ¹³(図 2-c, d)。

通常の培養皿で細胞を増殖させた場合と異なり、細胞シートは酵素処理を行わずに細胞を回収できる。従って細胞シートでは細胞膜タンパクが維持されているため、組織に近い状態で細胞を回収できるという利点がある。さらに、この細胞シートを生体内に移植しても、異物であるスキャフォールドを用いないため、生体異物反応が起こる可能性が少ない。さらにこの細胞シートを積層化できれば非常に密度の高い組織を構築することが可能になる。

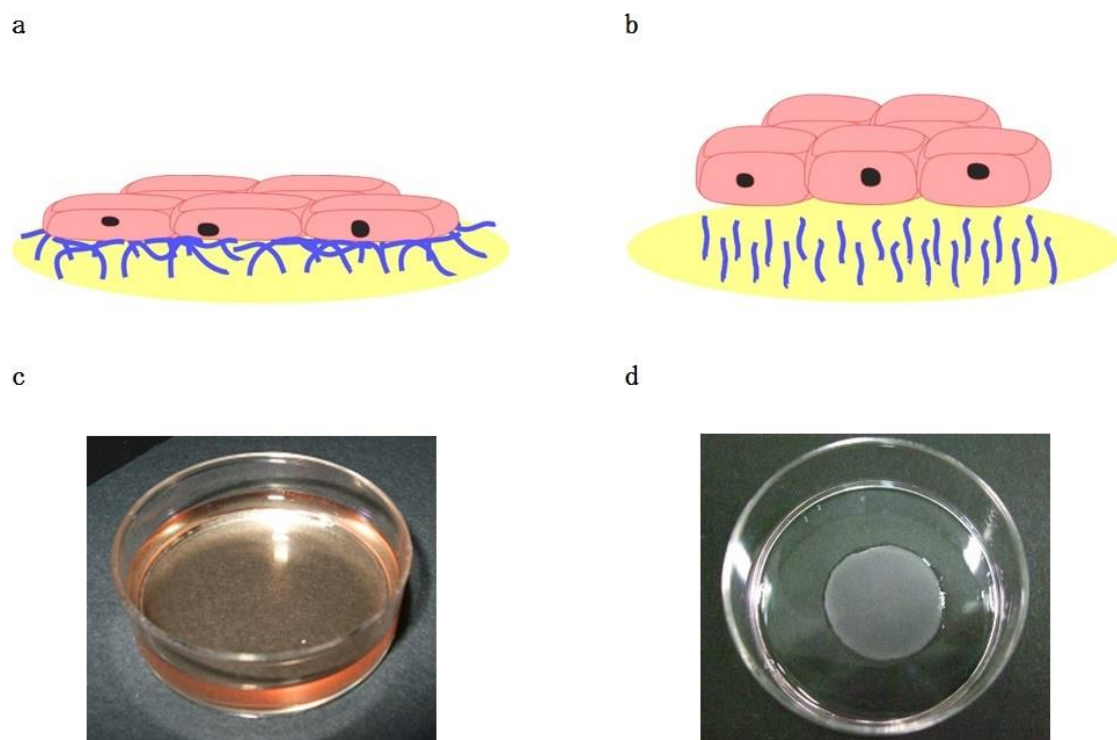


図2 温度応答性培養皿と細胞シート

2-a：通常の細胞培養温度(37℃)での模式図；温度応答性培養皿底面(黄色)に共有結合しているポリ *N*-イソプロピルアクリルアミド(PIPAAm；青色)は疎水性を示すため細胞膜タンパクと結合して細胞は底面と接着している。 2-b：室温(20℃)での模式図；PIPAAmは32℃以下では親水性を示すため、細胞膜タンパクと結合できなくなり、細胞は自然に剥離する。 2-c：細胞シート(37℃)；細胞はコンフルエント状態で底面に接着。 2-d：細胞シート(20℃)；細胞は自然にシート状に剥離する。細胞シート自体の張力で径は少し縮む。(培地は吸引除去)

1.4 心筋の再生医療の現状

心筋組織そのものを再生するには至らないが、生きた細胞を用いて心筋を再生させる治療法はすでにヒトの臨床へ持ち込まれおり、ある程度の有効性と安全性が報告されているものもある。自己複製能を有する前駆・体性幹細胞や、多能性幹細胞から分化させた種々の細胞を経カテーテル的に冠動脈経由で、ある

いは障害された心筋組織に直接注入して投与することで心機能を改善させようという細胞注入法が代表的である¹⁴⁻¹⁷。この方法の正確なメカニズムは完全には解明されていないものの、投与した細胞が分泌するさまざまな因子のパラクライン効果によって、血管新生が誘導される可能性や、近年報告されるようになった心筋の幹細胞が活性化して心筋再生を誘導する可能性が議論されている¹⁸。

しかし、細胞注入では目的の部位以外に細胞が流出したり、注入した細胞が壊死したりするため、細胞生着率は低い。スキャフォールド法や細胞シート法を用いれば細胞生着率は上がり、効果も高くなることが期待され動物実験レベルで様々な方法が試されている。

ヒトの臨床に持ち込まれた例を挙げると、重症心不全患者に対する骨格筋芽細胞シート移植が挙げられる。これは重症心不全患者本人の下肢骨格筋より抽出した筋芽細胞を細胞シートにして心臓表面に移植すると心機能が改善し、左心補助装置依存状態から離脱したと大阪大学のグループが報告した¹⁹。この結果を踏まえて、重症心不全患者への骨格筋芽細胞シート移植の効果について臨床試験が実施され、現在第Ⅱ相試験まで終了している。この心機能改善効果も筋芽細胞シートから分泌される HGF や VEGF などの因子のパラクライン効果によるものと考えられている。

臨床で応用されている心筋再生法の効果の大半は、移植細胞のパラクライン

効果によるものと考えられるが、その有効性には恐らく限界があるだろう。重症心不全を根本的に治療するためには、分厚く機能的なヒト心筋組織を作製し、移植することが必要と考えられる。

1.5 新生児ラット心筋細胞シート積層による心筋組織の構築

東京女子医科大学の清水らは細胞シート工学を用いて新生児ラットの心筋細胞から新生児ラット心筋細胞シートを作製し、積層することでラット心筋組織を構築できることを報告している^{20, 21}。新生児ラット心筋細胞シートは細胞膜タンパク質であるギャップジャンクションが温存されているため、もとの心筋組織のように全体が同期した自律的な電氣的活動と肉眼的拍動を確認することができる。さらに心筋細胞シートをオーバーラップさせて重ねると、はじめはそれぞれのリズムで拍動しているが、時間が経つと心筋細胞シート間に電氣的結合が形成されて 2 枚が同期して自律拍動するようになることが報告されている²²。

さらに清水らは 1 層では 20-30 μ m 程度の厚さの新生児ラット心筋細胞シートをラット生体内で計 30 層まで繰り返して積層することで、厚さ 1mm の自律的に拍動するラット心筋組織を作製することにも成功している²³(図 3)。

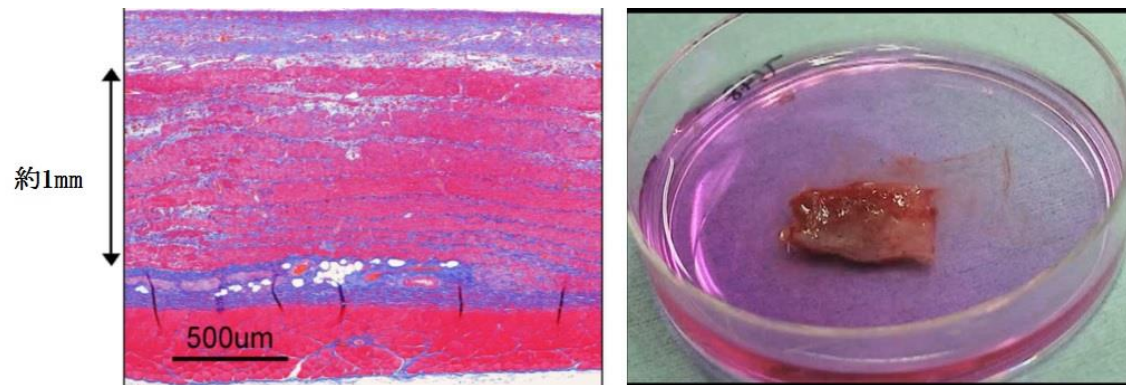


図3 新生児ラット心筋細胞シートを積層してできた心筋組織
(Shimizu T et. al. FASEB journal 2006;20:708-710 より抜粋)

2 目的

ヒト心筋細胞を用いて細胞シートを作製し積層すれば、ラットの先行研究と同様にヒト心筋組織を構築できると考えられる。しかし、ヒト心筋細胞は入手が困難であり、分裂しない細胞なので細胞シート工学によるヒト心筋組織の構築は不可能であった。しかし近年のめざましい幹細胞に関する研究の進歩、とりわけ iPS(induced pluripotent stem)細胞の樹立や、ES(embryonic stem)細胞・iPS細胞などの多能性幹細胞から様々な細胞への分化誘導法の確立によって、ヒト心筋細胞を比較的容易に入手できるようになった。

そこで、本研究はヒト iPS 細胞から分化誘導させた心筋細胞から細胞シートを作製し生体内で積層することで厚いヒト心筋組織を構築できるか、また作製できた心筋組織は異所性に移植できるか評価を行うことで、移植可能なヒト心筋組織となり得るかを検討した。

3 方法

本研究で行った動物実験は 2006 年に National Research Council より発行された” Guide for the care and Use of Laboratory Animals” および東京女子医科大学動物実験規定を遵守して行った。

3.1 ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導

本研究ではヒト iPS 細胞として 253G1 株(RIKEN)を用いた。ヒト iPS 細胞はマイトマイシン C で処理されたマウス胎仔線維芽細胞(MEF; ReproCELL)をフィーダー細胞として、5 ng/ml の塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF; ReproCELL)を添加した霊長類 ES 細胞用培地(ReproCELL)で維持培養した。ヒト iPS 細胞は 3-4 日ごとに ES/iPS 細胞剥離液(CTK 溶液; ReproCELL)を用いて適当な大きさのコロニーにして継代した。

3.1.1 バイオリアクターシステム

ヒト iPS 細胞の培養・増殖から心筋細胞への分化誘導はバイオリアクターシステムの中の浮遊培養系で行われた(図 4)。バイオリアクターシステムとは、生体触媒を不溶性の担体に固定し、反応溶液を流して有用物質を単離するための装置の総称であり、容器内の温度、pH、圧力、基質濃度、酸素濃度、二酸化炭素

濃度、攪拌速度などを制御し、反応条件を一定に保つことで効率良く生体触媒を働かせることができ、さまざまな細胞培養にも応用されている。

本実験では容器としては8連スクリーニング用培養装置(BioJr. 8; ABLE Co.)内で iPS 細胞を浮遊状態で培養、分化誘導をかけた。心筋細胞へ分化させるまでの間はバイオリアクターシステムを用いることで溶存酸素 40%、pH 7.2、温度 37℃、攪拌速度 40rpm の条件を維持した。

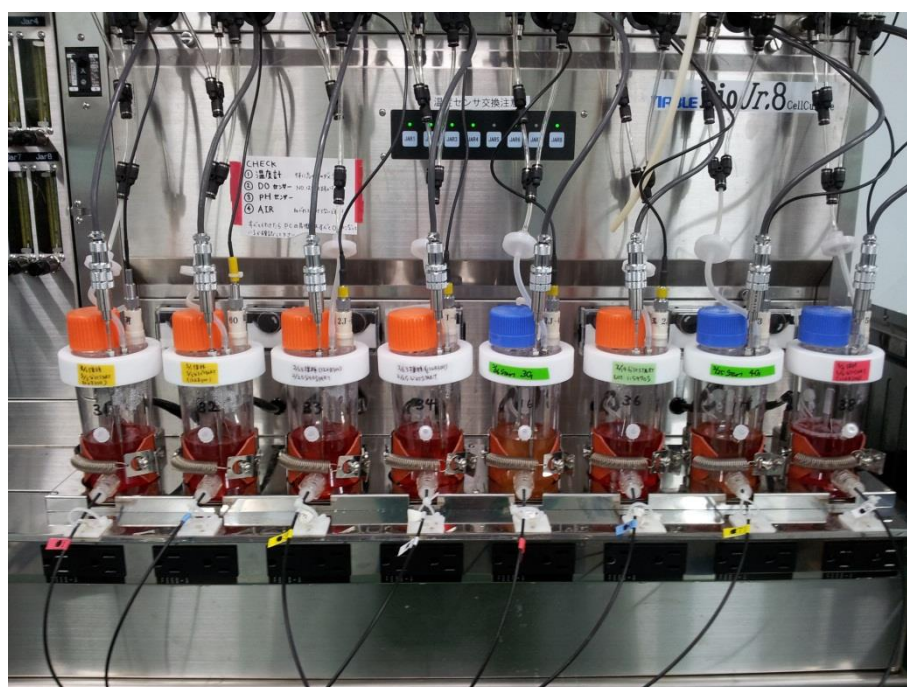


図4 バイオリアクターシステム
(Matsuura et al. BBRC. 425, 321, 2012 より抜粋)

3.1.2 心筋細胞への分化誘導(図5)

東京女子医科大学の松浦らが報告した方法を改良して、ヒト iPS 心筋細胞を作製した²⁴。CTK 溶液を用いてヒト iPS 細胞を処理し、おおよそ計 2×10^7 個の細

胞をコロニーの状態で回収した。

フィーダー細胞を必要としないヒト ES/iPS 細胞維持用無血清培地 (mTeSR1; STEMCELL) 100ml を BioJr. 8 に入れ、回収した細胞を播種した。2 日目に形成された胚様体を、50 μ g/ml アスコルビン酸、2mM L-グルタミン、400 μ M 1-チオグリセロールが添加されたヒト ES/iPS 細胞用培地 (StemPro 34) に入れ、バイオリアクターシステム下で 18 日目まで培養した。その間、図 5 で示すようにさまざまな添加因子を投与することでヒト iPS 心筋細胞へと分化誘導をかけた。

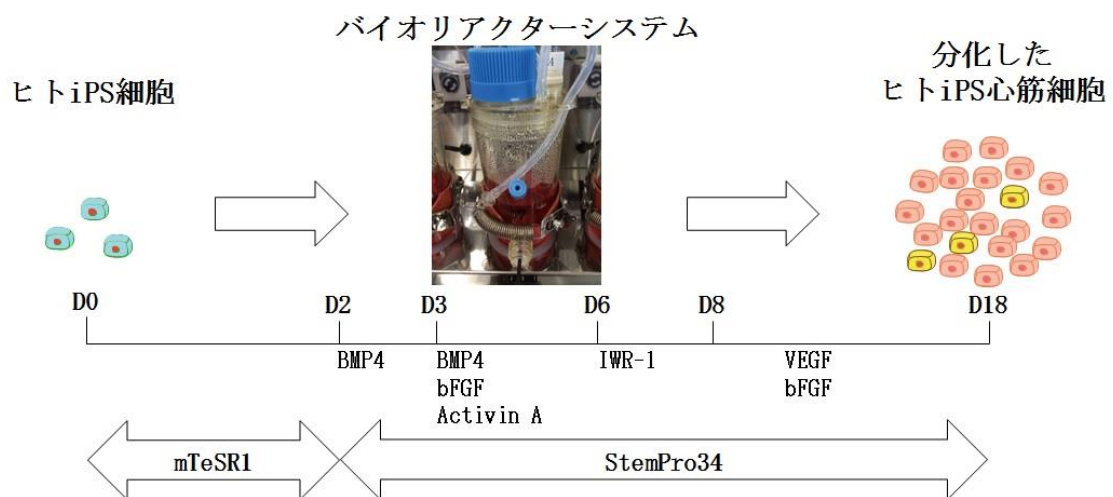


図 5 ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導
(Matsuura et al. BBRC. 425, 321, 2012 より抜粋、改変)

3. 1. 3 分化誘導したヒト iPS 心筋細胞の評価

バイオリアクター装置内で分化誘導させた細胞は 1.5×10^8 個まで増殖していた。フローサイトメトリーでは約 80%の細胞がトロポニン T 陽性細胞であり、含まれるヒト iPS 心筋細胞の割合に等しいと考えられた。未分化な細胞を示唆

する Tra-1 60 陽性細胞の割合は 1%だった。(図 6)

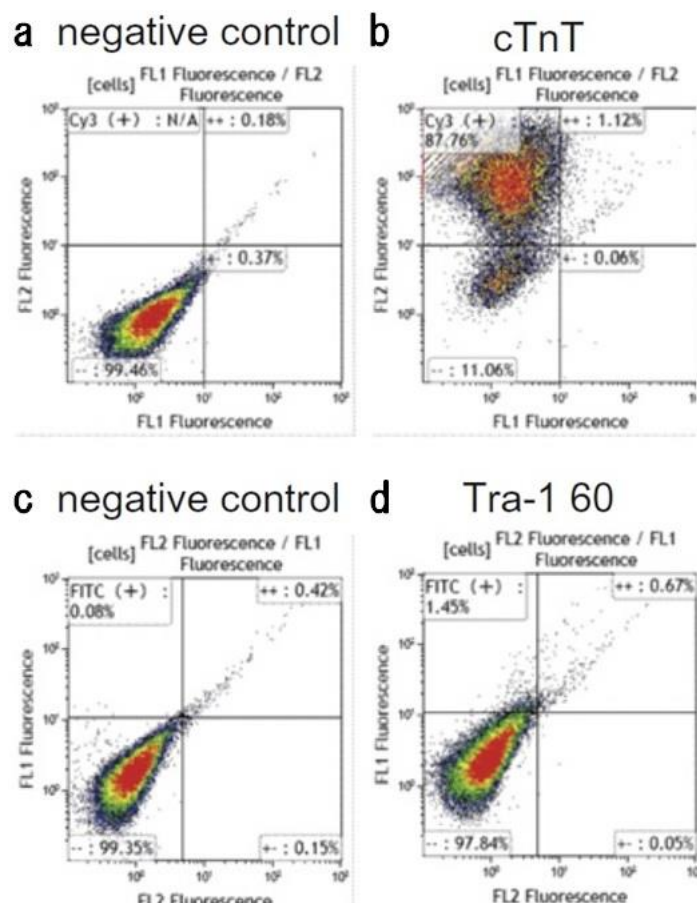


図 6 ヒト iPS 心筋細胞のフローサイトメトリーの評価

(Matsuura et al. BBRC. 425, 321, 2012 より抜粋)

6-a: トロポニン T のネガティブコントロール 6-b: トロポニン T(心筋) 6-c: Tra-1 60 のネガティブコントロール 6-d: Tra-1 60(未分化細胞)

トロポニン T(6-b)とトロポニン Tのネガコン(6-a)は二次抗体に cy3 を、Tra-1 60 と Tra-1 60 のネガティブコントロールは FITC を用いて染色した。縦軸に cy3・FITC の蛍光の相対値を、横軸にその細胞の自家蛍光の相対値をとり、各細胞に対してプロットしている。(グラフの縦軸、横軸はそれぞれの蛍光が検出器で電流を発生させたときに生じる電圧を増幅したもので、単位は「チャンネル」)それぞれのネガティブコントロール(6-a, c)は縦軸・横軸共に同程度の蛍光の相対値となっている。目的のトロポニン T 陽性細胞、Tra-1 60 陽性細胞はそれぞれ cy3、FITC の蛍光が強くなるのでグラフの左上領域にプロットされる。左上の領域にプロットされた細胞数の、全体細胞数に対する割合が目的とする細胞の割合となる。

3.2 ヒト iPS 心筋グラフト

3.2.1 ヒト iPS 心筋細胞シートの作製

あらかじめ細胞との接着を強めるために 35mm 温度応答性培養皿 (UpCell; CellSeed) にウシ胎児血清 (FBS) を入れ、37°C で 2 時間静置し表面をコーティングした。分化誘導後のヒト iPS 心筋細胞を含む細胞凝集塊は 0.05% トリプシン/EDTA を用いて単一細胞へ浮遊処理した。コーティングした温度応答性培養皿から FBS を除去した後、10% FBS、10 μ M の Rho キナーゼインヒビター (Y27632; Wako) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Sigma-Aldrich) を温度応答性培養皿に入れ、2 x 10⁶ 個のヒト iPS 心筋細胞を播種し、37°C で 1 日間培養した。翌日に培地を 10% FBS 添加のみの DMEM 培地に交換し、コンフルエントに達するまで 37°C 下で約 1 週間培養した。

播種したヒト iPS 心筋細胞が顕微鏡下で全体に同期して拍動しているのを確認したのちに 20°C の培養器に移動させるとヒト iPS 心筋細胞は 1 時間以内にシート状に自然に剥離した。(図 7-a)

以降、これをヒト iPS 心筋細胞シートと呼ぶ。

3.2.2 移植用ヒト iPS 心筋細胞シートの準備

直径 35mm の温度応答性培養皿の底面から剥離したヒト iPS 心筋細胞シートは

直径 20mm 程度に収縮する。ピペットで培地を静かに滴下することで折れ返ったしわを伸ばし、温度応答性培養皿底面にヒト iPS 心筋細胞シートがつく程度まで培地を吸引した後に 37℃で 1 時間静置して温度応答性培養皿底面に再び接着させた。その上に別に自然剥離させた 1 層のヒト iPS 心筋細胞シートを培地とともにピペットを用いて移動し、折れ返りを伸ばしながら底面に接着している 1 層目の細胞シートに重ね、残った培地を吸引除去して計 2 層にした。その 2 層の細胞シートをしっかりと接着させるために再び 37℃で 1 時間静置した。同様に 2 層のヒト iPS 心筋細胞シートの上に別の 1 層のヒト iPS 心筋シートを重ねて 37℃で 1 時間静置させることで合計 3 層にした。(図 7-a)

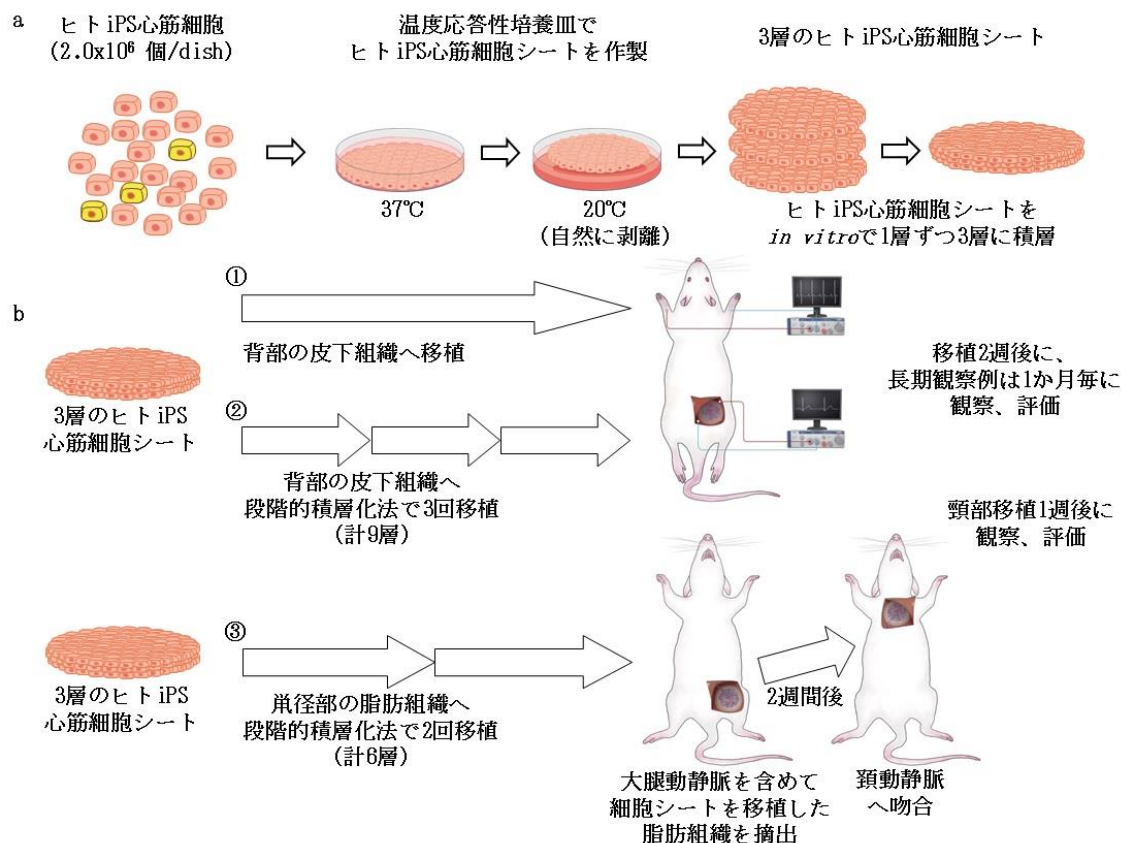


図7 ヒト iPS 心筋細胞シート移植によるヒト iPS 心筋グラフトの作製

7-a : 移植するヒト iPS 心筋細胞シートの作製。回収したヒト iPS 心筋細胞を温度応答性培養皿で培養し、温度降下させることで自然に細胞がシート状に剥離し、ヒト iPS 心筋細胞シートが作製できる。1層ずつ3回重ねて3層とした。

7-b : ヒト iPS 心筋グラフトの作製。①まず、3層のヒト iPS 心筋細胞シートをヌードラットの背部皮下に移植した。評価は移植2週後、その後は1か月おきに行った。②次に背部皮下で3層のヒト iPS 心筋細胞シートを3回重ねることによって9層の厚いヒト iPS 心筋グラフトを作製した。観察は移植2週後に行った。③大腿動静脈が灌流する鼠径部の脂肪組織上で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を含めた血管付きグラフトとして摘出し、別個体の頸部の動静脈に血管吻合して異所性に移植した。その1週後に評価した。

3.2.3 ヒト iPS 心筋グラフトの作製

生後4-5週のオスヌードラット(Fischer 344: Charles River)に2%セボフルレンで十分に吸入麻酔をかけ、背部に2cm x 2cm程度のL字型の皮膚切開をつ

けて皮下組織を剥離、露出した。

移植する 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートは、37℃で顕微鏡下での拍動を確認したのちに温度応答性培養皿から剥離させるために 20℃で 1 時間静置しておいた。乳酸リンゲル液をいれて温度応答性培養皿底面から完全に浮かせた 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートを、滅菌した 2cm x 1.5cm 大の長方形のポリプロピレン板ですくいとり、露出したヌードラットの背部皮下組織上に移植した(図 7-b-①)。周囲との癒着を防止するために、0.5mm のシリコン膜で移植した細胞シートの上面を覆って固定し、皮膚切開を閉じた。移植部位はまず移植 2 週間後に観察し(n=5)、長期間観察する群は、その後 1 か月ごとに観察した。(n=9 最長 13 か月まで)

以降、生体に移植した積層細胞シートをグラフトと呼ぶ。

3.3 厚いヒト心筋組織の作製

3.3.1 段階的積層化法

1 層の細胞シートは厚さが 20-30 μ m である。清水らの報告によると、積層した新生児ラット心筋細胞シートをラット皮下に移植したところ 3 層までは壊死なく生着し、積層数にほぼ比例した厚さのラット心筋組織となるが、4 層以上の場合は内部が壊死してしまい、80-100 μ m 以上にはならなかった(図 8-a)。これは細

胞シート内には毛細血管網がないので、酸素などの必要な物質が十分に供給されず、老廃物も排出されないことが原因である。

一方で、3 層までの新生児ラット心筋細胞シートは単純拡散で代謝されるため移植後も壊死せずに生着する。生着した新生児ラット心筋グラフトを調べると、生体への移植 24 時間後にはグラフト内にも血管網が形成されており、直下のホストの毛細血管網とつながって血流をうけて栄養されていることが分かった。このように移植したグラフトに毛細血管網を付与する移植部位直下の毛細血管網のことを血管床と呼ぶ。

次に 3 層の新生児ラット心筋細胞シートを移植して 24 時間後にその上に別の 3 層の新生児ラット心筋細胞シートを移植したところ、壊死することなく生着して分厚いラット心筋組織となっていた。これは、初めに移植されていた新生児ラット心筋グラフトに形成された毛細血管網が血管床となり、新たに移植された新生児ラット心筋細胞シート内に毛細血管網が形成されたからである。

つまり、24 時間おきに 3 層の新生児ラット心筋細胞シートを同じ部位に積層していくと、前に移植したグラフト内に毛細血管網が形成され、同時に次に移植される細胞シートの血管床となる。これを繰り返せば、内部が壊死することなく厚い組織を構築することができる(図 8-b)。この手法を段階的積層化法と呼ぶ。

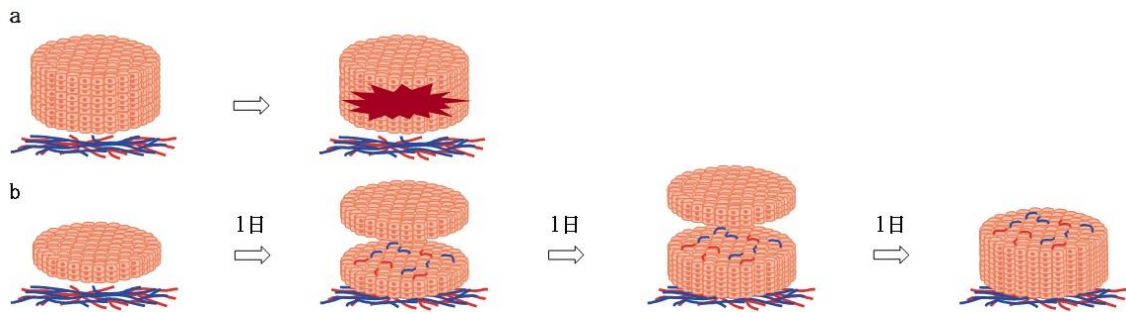


図8 段階的積層化法

8-a : 4 層以上に積層した細胞シートを一度に移植した場合、内部が壊死してしまい、厚さ 80-100 μ m 以上の組織はできない。 8-b : 3 層の細胞シートを移植すると内部に毛細血管網が形成され生着する。1 日後にその上に別の 3 層の細胞シートを移植すると 1 日後には新たな細胞シート内にも毛細血管が形成され生着し計 6 層になる。さらにその上に同じように 3 層の細胞シートを移植すると生着する。このように 1 日おきに細胞シートを繰り返し移植することで細胞シート内に毛細血管網が形成されるため内部壊死せず、分厚い組織が構築できる。

3.3.2 9 層のヒト iPS 心筋グラフトの作製

3 層のヒト iPS 心筋グラフト作製と同じ方法で、生後 4 週のオスヌードラットの背部に皮下組織の上に 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートを移植した。周囲との癒着防止のために、移植部を 0.5mm のシリコン膜で覆うように固定し、皮膚切開を閉じた。

次の日に再び創を開け、覆っていたシリコン膜を除去し、生着した 3 層のヒト iPS 心筋グラフトの上に別の 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートを移植し、再びシリコン膜で覆ったうえで皮膚を閉じ、6 層のヒト iPS 心筋グラフトとした。そして 3 日目も同じように新たな 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートを移植してシリコン膜で覆い、皮膚を閉じた。このように段階的積層化法を用いて 9 層の厚い

ヒト iPS 心筋グラフトを作製した。(図 7-b-②)

初めの 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートを移植して 2 週後に移植部位を観察した。(n=4)

3.4 血管付きヒト iPS 心筋グラフトの作製と異所移植

血管吻合の手技の都合上、体重 300g-350g のオスマードラットを使用した。十分な吸入麻酔下で、鼠径部に皮膚切開をおき、大腿動静脈の分枝で灌流される皮下の脂肪組織上で段階的積層化法を用いて 6 層のヒト iPS 心筋グラフトを作製した。(n=2)

2 週後に創を開け、6 層のヒト iPS 心筋グラフトと脂肪組織を確認し、大腿動静脈を中枢側に鼠径靱帯まで剥離した。1000 単位のヘパリンを陰茎静脈叢に注入し、大腿動静脈末梢側を脂肪組織への分枝直後で結紮して切断、大腿動静脈の中枢側は鼠径靱帯の部位で結紮せずに切断して 6 層のヒト iPS 心筋グラフトを血管付きグラフトとして脂肪組織とともに取り出し、氷冷したヘパリン入り生食につけて一時的に保存した。

続いて別のオスのヌードラットの頸部の皮膚を切開。片側の胸鎖乳突筋を切除し頸部の動静脈を露出し確保した。頸部の動静脈に、保存しておいた血管付きグラフトの大腿動静脈中枢側断端を動脈・静脈どうしでそれぞれカフ法により

吻合した。癒着防止のためにグラフトを 0.5mm のシリコン膜で覆い、皮膚を閉じた。

頸部への移植 1 週後に移植部位を観察した。(図 7-b-③)

3.5 評価方法

ヌードラットに十分な麻酔をかけた上で移植部位の皮膚を再び切開し、被覆しているシリコンシートを除去して移植部位の評価を行った。観察が終了した個体はセボフルレンによる深麻酔下で、頸椎脱臼法により犠牲死させた。

3.5.1 組織学的評価

ヒト iPS 心筋グラフト移植部位を、直下のホストの皮下組織を含むように切除し、切片を作製した。ホスト血流との連続性を検証する個体には 1mg のレクチン(Abcam)をホストの陰茎静脈叢に注入し、十分時間が経ったのちにヒト iPS 心筋グラフト移植部位を摘出した。

摘出した組織から凍結標本を作製して 6-10 μm の切片を作製し、H-E 染色と蛍光免疫染色を行った。蛍光免疫染色の一次抗体として、マウス抗トロポニン T 抗体(Thermo Fisher Scientific)、ウサギ抗 CD31 抗体(Thermo Fisher Scientific)、マウス抗 α アクチニン抗体(Sigma-Aldrich)、ウサギ抗 Ki67 抗体(Abcam)、ウサ

ギ抗ヒストン H3 抗体 (Abcam) を用いた。二次抗体としては、蛍光標識されたヤギ抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes)、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes) を用いた。

蛍光免疫染色された切片は共焦点顕微鏡 (Olympus) で観察した。

3.5.2 電子顕微鏡での解析

電子顕微鏡用の標本は東海電子顕微鏡解析によって作製された。取り出した組織は樹脂に包埋された後、厚さ 70nm の切片を作製した。切片は 2%酢酸ウラニルで染色し、透過型電子顕微鏡 (JEOL Ltd.) で 80kV の加速電圧で観察した。デジタル画像は CCD カメラ (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) で撮影した。

3.5.3 電気生理学的解析

ヒト iPS 心筋グラフト移植部位を挟むように電極針を刺し、生体電気増幅器 (Unique Medical) で増幅し、データ収集システム (ADInstruments) で記録した。同時にホストの心電図と体圧も記録した。

3.5.4 膜電位マッピング

異所移植モデルと同様に 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートを鼠径部皮下の脂肪

組織上に移植した。3 週後に血管付きヒト iPS 心筋グラフトとして摘出し、血管付きグラフト観察用に培地を灌流できるように改変した顕微鏡用培養装置であるティッシュチャンバー(Tokai Hit)に設置した(図 9)。膜電位感受性色素である 2mM の RH237(Molecular Probes)をジメチルスルフォキシドに溶解させたものと筋収縮を抑制するための 5 μ M のブレビスタチン(TOCRIS)を 2.5ml の培地に溶解させたものを 50 μ l/分の流速で灌流した。その後、バイオリアクターで O₂ 濃度 20%、CO₂ 濃度 5%、pH 7.4、37°C に維持し、培地を流速 50 μ l/分で灌流した。

RH237 を灌流して 1 時間後に、取り出した血管付きヒト iPS 心筋グラフトは 532nm 波長の LED 光源(BrainVision)で励起され、蛍光像はダイクロイックミラー(650nm 波長でカットオフ)で現像された。715nm 波長で放射された蛍光はタンデムレンズスコープと CMOS カメラ(BrainVision)で集光された²⁵。

データは専用の解析ソフト BV_Ana(BrainVison) で処理した。

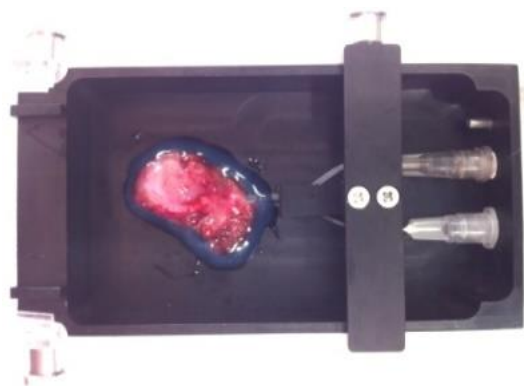


図 9 ティッシュチャンバー

血管付きグラフトの動静脈をそれぞれ培地注入用と培地排出用の注射針でカニューレーションし、バイオリアクターシステム下で管理しながら培地を灌流し、一定条件下で組織に培地を灌流したまま観察することができる。

3.5.5 統計学的解析

統計学的解析として Student' s unpaired t-test を行った。P 値は 0.05 未満で有意差ありとした。

4 結果

4.1 3層のヒト iPS 心筋グラフトから作製された心筋組織

3 層のヒト iPS 心筋グラフトは移植 2 週後で観察すると全例に肉眼的な拍動を認めた(図 10-a)。グラフト移植部の電位を計測したところ、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(図 10-b)。作製した組織切片の HE 染色の結果、テラトーマ(奇形腫)を示唆する構造物は認めなかった(図 10-c)。蛍光免疫染色ではヒト iPS 心筋グラフト移植部位に一致して層状にトロポニン T 陽性の組織、すなわち心筋組織を確認できた。さらにその心筋組織層の中には、リング状に CD31 陽性細胞が存在し、毛細血管網を伴うことが分かった(図 10-g)。トロポニン T 陽性の領域は α -アクチニンにも陽性でもあり、拡大して観察すると横紋様になっており、心筋組織に特有なサルコメア構造が示唆された(図 10-h)。3 層のヒト iPS 心筋グラフトで構築した心筋組織の厚さは $165 \pm 40 \mu\text{m}$ であった。レクチンを注入したのちに作製した標本の切片では、心筋組織層の中にレクチンでリング状に染まる構造物が存在しており、作製した心筋組織はホストの血流から灌流されていることが分かった(図 10-i)。

また、膜電位マッピングの結果、膜電位の変化には方向性があり、ヒト iPS 心筋グラフトは不整脈様の電氣的活動をしていないことが分かった(図 11)。

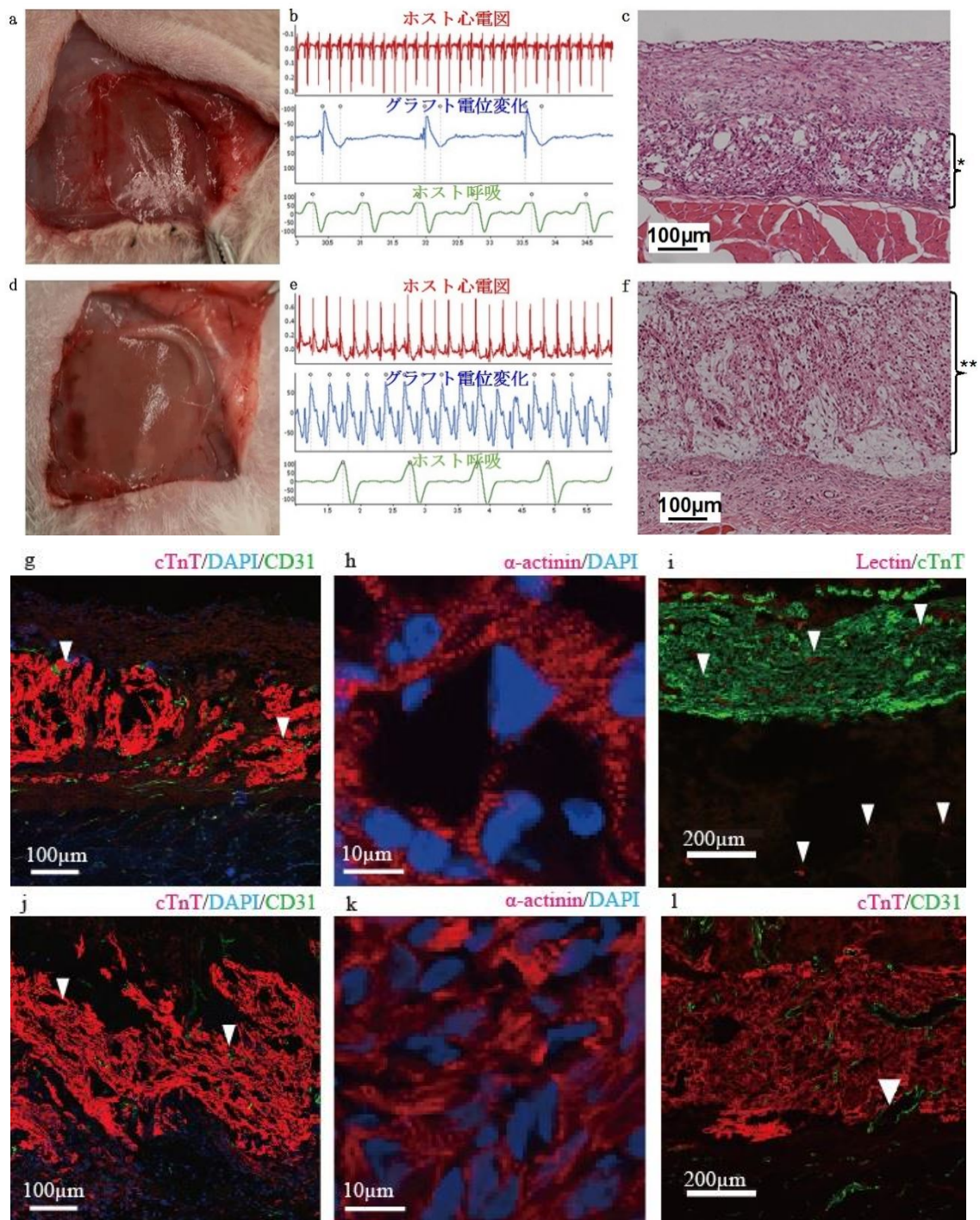


図 10 3 層と 9 層のヒト心筋グラフト移植 2 週後の観察

10-a-c, g-i : 3 層ヒト iPS 心筋グラフト 10-d-f, j-l : 9 層ヒト iPS 心筋グラフト 10-a, d : 移植部位の肉眼的所見。明らかな腫瘍形成は認めない。 10-b, e : グラフトの電位変化(青線)はホスト心電図(赤線)や呼吸(緑線)とは別の周期的な変化を示した。 10-c, f : HE 染色。9 層のヒト iPS 心筋グラフト (**= $359 \pm 161 \mu\text{m}$) は 3 層のグラフト (*= $165 \pm 40 \mu\text{m}$) に比べて有意に厚い組織であった。(p<0.01) 10-g, j : ヒト iPS 心筋グラフト内に毛細血管組織(▼)が形

成されている。 10-h, k : アクチニンが横紋様に染色されており、心筋組織に特有なサルコメア構造の存在が示唆される。 10-i : ヒト iPS 心筋グラフトはホストからの血液灌流を受けている(▼)。 10-l : ヒト iPS 心筋グラフトにホスト側から入り込む毛細血管(▼)。

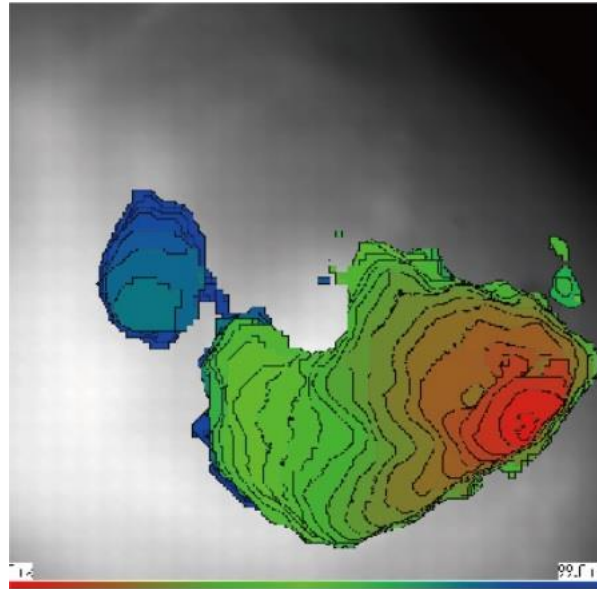


図 11 膜電位マッピングの結果

膜電位感受性色素 RH237 は細胞膜電位の変化に伴い蛍光強度を減少させる。膜電位変化に伴い蛍光強度が減少した領域を疑似色で表現した。その領域の変化を経時的に記録し、3ms ごとのデータを重ね合わせた。疑似色で赤色から青色の方向に時間の経過が表現されている。右下の赤い小さな領域が最初に膜電位が変化し始めた領域で、その後、徐々に膜電位変化領域は伝播して(オレンジから茶色の領域まで)拡大していき、緑色を経て青い領域まで伝播していることがわかる。つまり、方向性をもって膜電位は伝播しており、不整脈様の電気活動は行っていないことがわかる。

4.2 ヒト iPS 心筋グラフトから作製された厚い心筋組織

段階的積層化法で作製した9層のヒト iPS 心筋グラフトは、移植後2週間で、4例中3例に肉眼的拍動を観察できた(図 10-d)。9層のヒト iPS 心筋グラフトは3層の時と同様にホストの心拍や呼吸とは独立した、全体的に同期した周期的な

電氣的活動をしていた(図 10-e)。HE 染色ではテラトーマを示唆する構造物は認めず(図 10-f)、蛍光免疫染色では毛細血管網を伴う心筋組織であることが確認できた(図 10-j, k)。移植されたヒト iPS 心筋グラフトに毛細血管がホスト組織側から貫いて入っているのが確認できる部分もあった(図 10-l)。

9 層のヒト iPS 心筋グラフトから構築された心筋組織の厚さは $359 \pm 161 \mu\text{m}$ で 3 層のものより有意に厚い組織となっていた。(P<0.01)

4.3 ヒト iPS 心筋グラフトから作製された心筋組織の長期観察

移植 2 週後と比べて長期観察例の方がグラフトの拍動は強く安定し、肉眼所見で血管網がより発達している印象だった(図 12-a, b)。ヒト iPS 心筋グラフト移植 6 か月後からの組織切片で蛍光免疫染色を行ったところ、サルコメア構造と毛細血管網を有する、細胞間にギャップジャンクションを有する心筋組織であった(図 12-c, d)。移植 2 週後のグラフトの組織よりも移植 6 か月後の方が細胞の密度が高かった。

肉眼的拍動と全体に同期した電位変化は移植後 13 か月まで認められ(図 12-e)、組織学的にも成熟した心筋組織の残存が確認できた(図 12-f, g)。

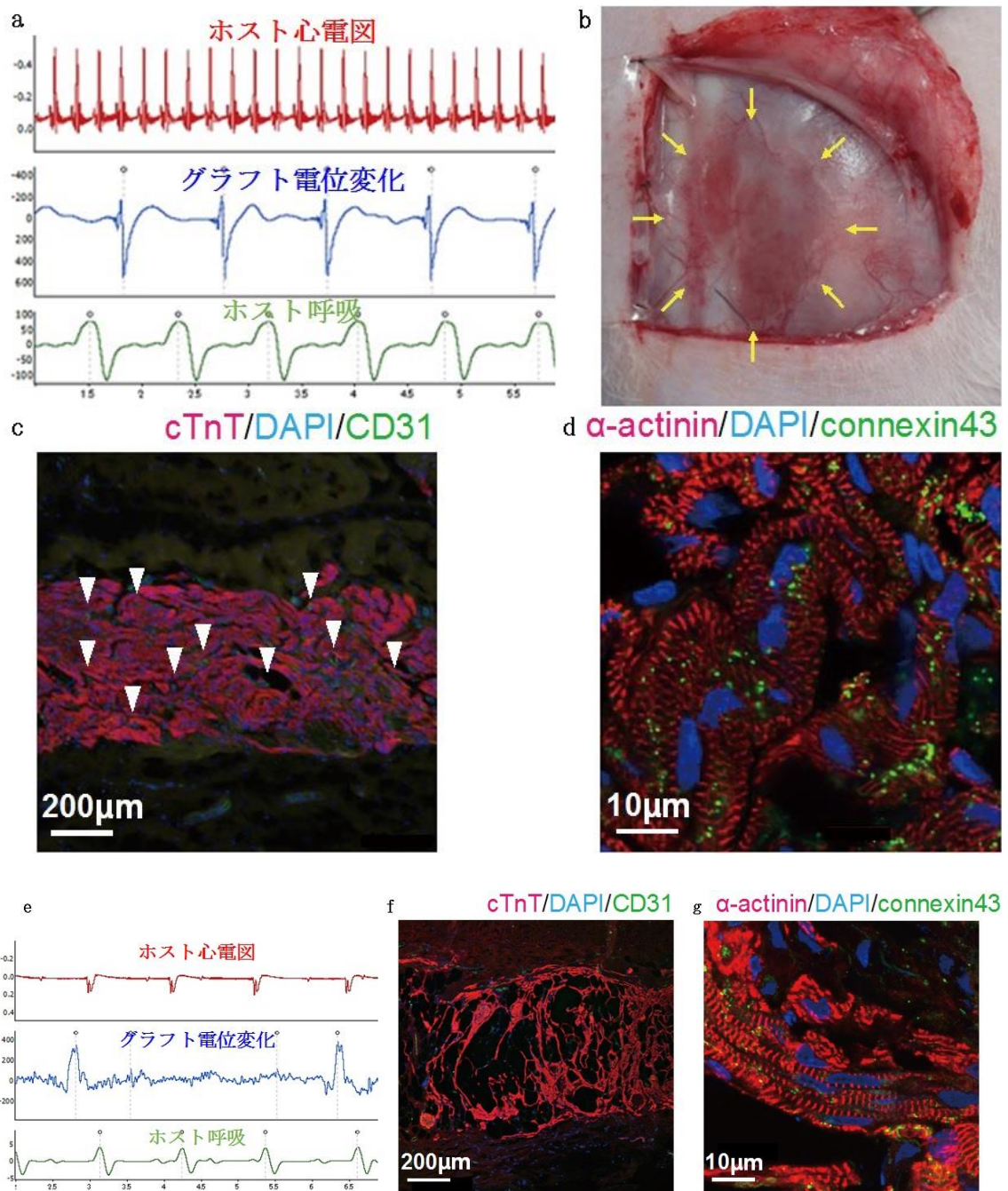


図 12 長期モデルの観察

12-a-d : 移植 6 か月後の結果 12-e-g : 移植 13 か月後の結果

12-a : グラフト電位(青線)は全体に同期した周期的な変化を示す。 12-b : 肉眼所見。矢印で囲まれた部分がヒト iPS 心筋グラフト。 12-c : 心筋細胞の密度は高く毛細血管網(▼)も発達している。 12-d : サルコメア構造は明瞭でギャップジャンクションを多数認める。 12-e : グラフト電位(青線)は全体に同期した周期的な変化を示す。術中に徐脈になった(赤線)。 12-f, g : 毛細血管網、サルコメア構造、ギャップジャンクションを有する成熟した心筋組織が確認できる。

4.4 生体に移植されたヒト iPS 心筋細胞の分裂

時間経過で構築した心筋組織の密度が高くなるということは移植したヒト iPS 心筋グラフトに含まれる細胞が分裂しているからと考えられたため、細胞分裂マーカーである Ki67 とリン酸化ヒストン H3 (PHH3) で染色した。その結果、移植 2 週後のヒト iPS 心筋細胞の核に一致して Ki67、PHH3 がともに陽性になり、ヒト iPS 心筋細胞が盛んに分裂していることが分かった。一方、移植 6 か月後のヒト iPS 心筋グラフト内の心筋細胞では両者ともに陰性であり、細胞は分裂していないことがわかった。(図 13)

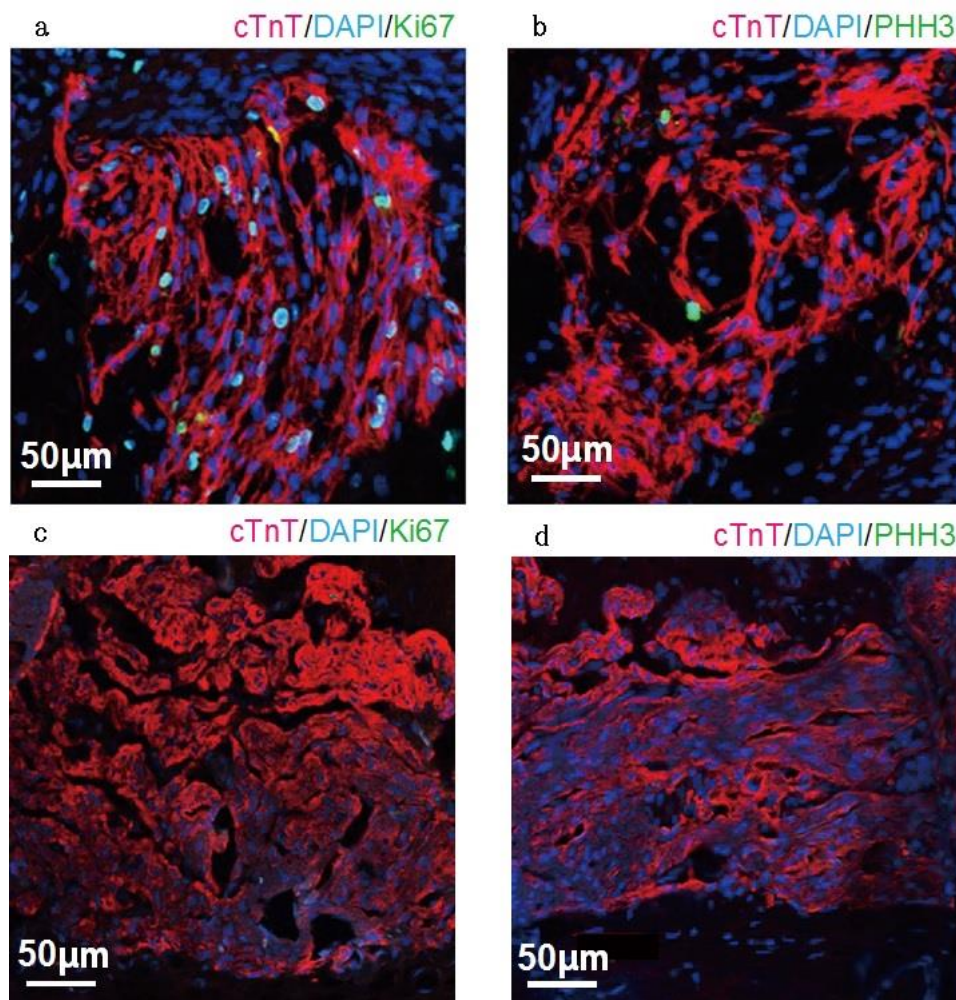


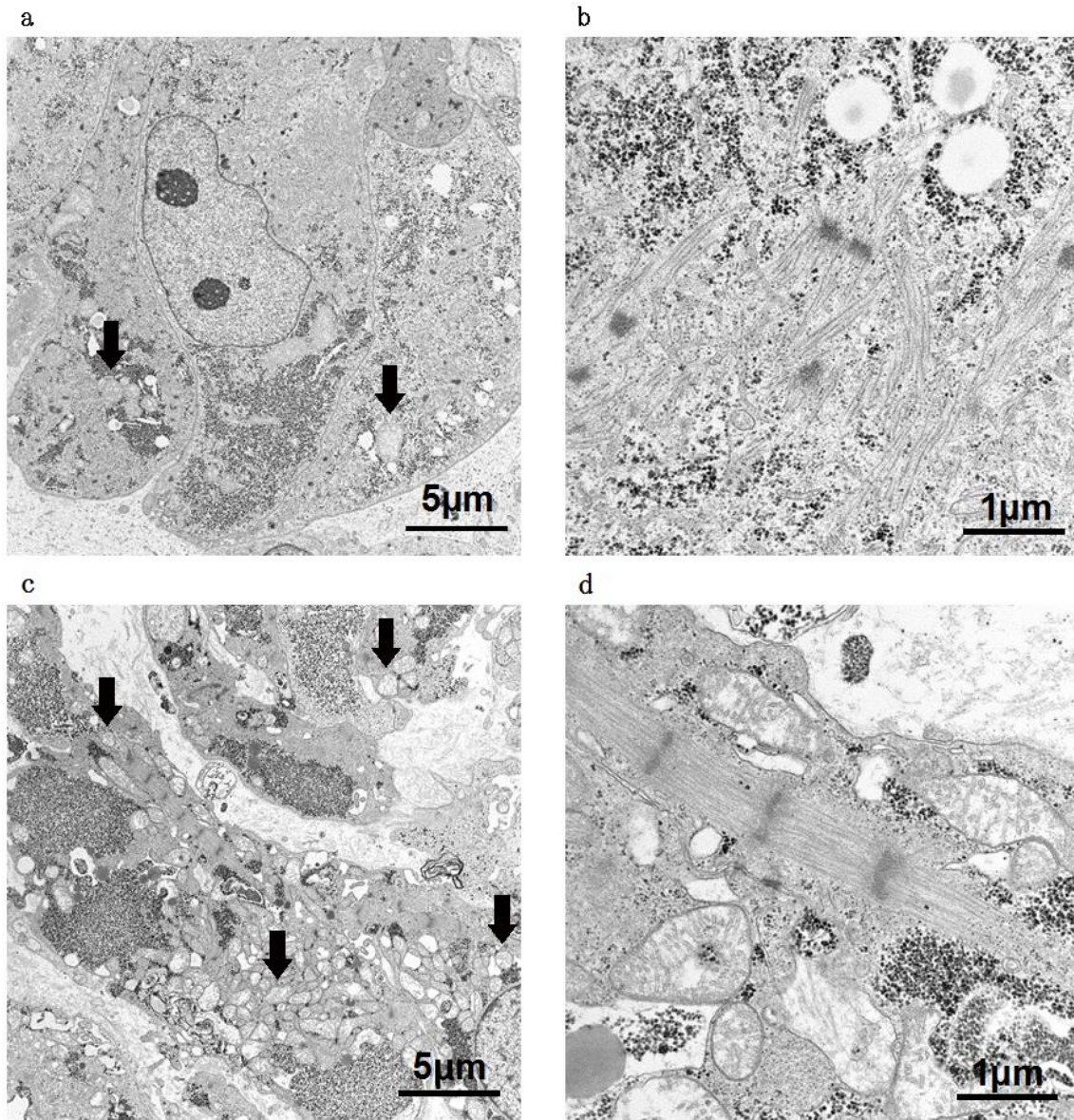
図 13 ヒト iPS 心筋細胞の分裂

12-a, b : 移植 2 週後のヒト iPS 心筋グラフト。Ki67, PHH3 が心筋細胞核に一致して陽性になっている。 12-c, d : 移植 6 か月後のヒト iPS 心筋グラフト。分裂している心筋細胞は認められない。

4.5 生体に移植されたヒト iPS 心筋細胞の成熟

電子顕微鏡像の結果、移植する前のヒト iPS 心筋細胞シート中の心筋細胞には幼弱な筋原線維が散見される程度であった(図 14-a, b)。しかし、ヒト心筋グラフトとして生体内に移植されたのちは時間経過とともに心筋細胞中の筋原線維同士が癒合して太く、長くなり、ミトコンドリアの数は時間経過とともに増え、

クリステの構造も複雑になっていた(図 14 ➡)。移植 6 か月以降ではデスモゾーム(図 14 ⇨)や筋小胞体、T 管などの成熟した心筋細胞に認められる構造が形成されていた(図 14 ▼)。



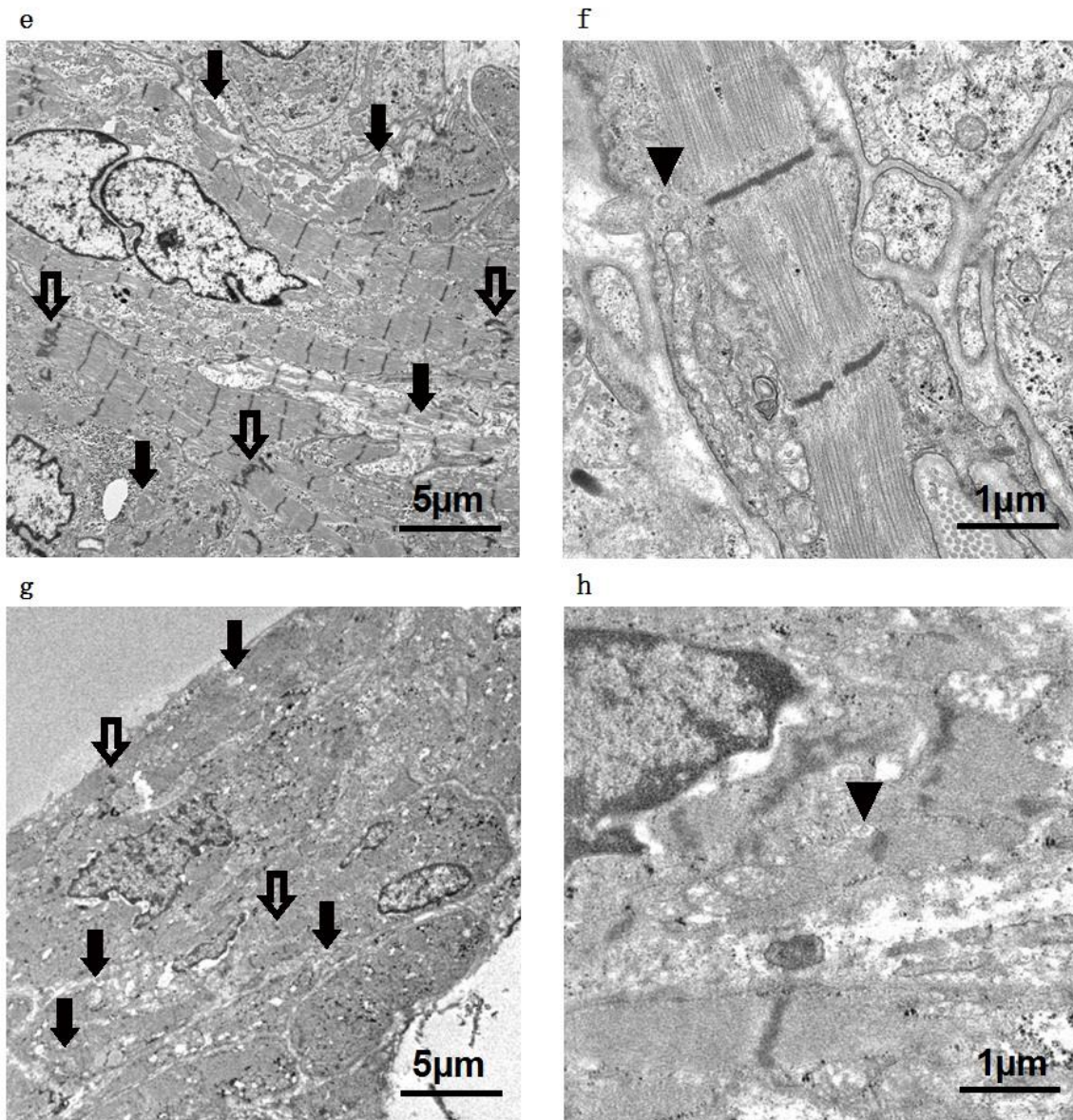


図 14 ヒト iPS 心筋細胞の成熟

14-a, b : ヒト iPS 心筋細胞シート 14-c, d : 移植 2 週後のヒト iPS 心筋グラフト 14-e, f : 移植 6 か月後のヒト iPS 心筋グラフト 14-g, h : 移植 13 か月後のヒト iPS 心筋グラフト

時間経過とともに筋原線維は太く、長く発達しており、6 か月以降のものにはデスモゾーム(⇔)が認められる。ミトコンドリア(→)の数は時間経過とともに増えており、内部のクリステも複雑になっている。6 か月以降のものにはサルコメア構造のそばに筋小胞体、もしくは T 管とみられる構造物を認めた(▼)。

4.6 血管付きヒト iPS 心筋グラフトの異所移植

鼠径部で作製された 6 層のヒト iPS 心筋グラフトは、背部皮下に移植したグラフトと同様に肉眼的に拍動しており、全体的に同期した電位変化が計測できた。大腿動静脈とともにグラフトを摘出し、血管付きヒト iPS 心筋グラフトとして、別個体の頸部に血管吻合して移植した。その 1 週後に観察したところ肉眼的な拍動と全体的に同期した周期的な電位変化を認めた (図 15-a)。

頸部に移植したグラフトを摘出して切片を作製し、組織学的に評価したところ、ホストの血流から灌流を受ける毛細血管網をともなった心筋組織として生着していた (図 15-b, c)。

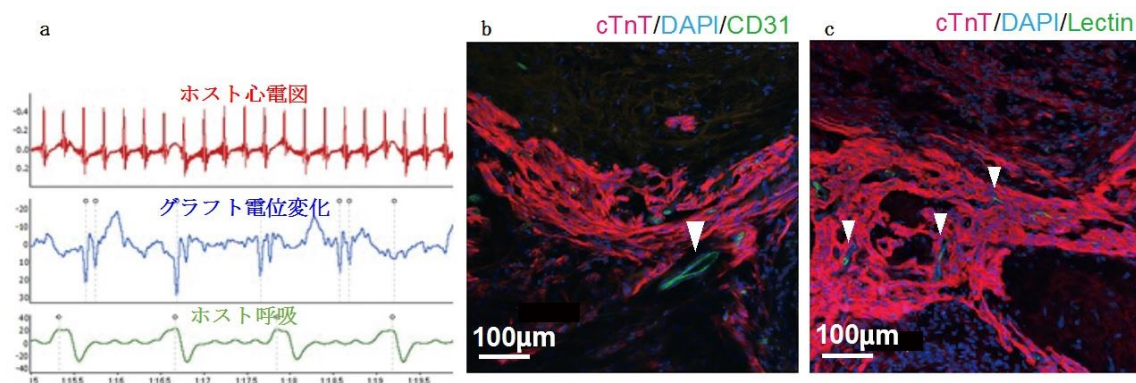


図 15 ヒト iPS 心筋グラフト異所移植

15-a: 異所移植 1 週後も全体に同期した周期的な電位変化 (青線) を認めた。 15-b: 毛細血管を伴ったヒト iPS 心筋組織。ホスト側から貫くように毛細血管が入っている (▼)。 15-c: ホストの血管から注入したレクチンでヒト iPS 心筋グラフトが染色されている (▼)。

5 考察

5.1 厚いヒト心筋組織の構築

厚い心筋組織を構築するためには、組織内に機能的な血管網を付与することが必須である。積層した新生児ラット心筋細胞シートを生体へ移植する場合、4層以上に積層した心筋細胞シートを一度に移植しても中心部は壊死してしまい、結局は構築した心筋組織は 80-100 μm 以上の厚さにはならない。これを「積層限界」と呼ぶ。しかし、残存した心筋組織には発達した毛細血管網の形成が確認でき、ホストからの血液灌流があることが予想された。それゆえに厚さ 80 μm 程度の 3 層に積層した新生児ラット心筋細胞シートを毛細血管網のある組織の上に段階的に移植すれば、移植した細胞シート内に毛細血管網が形成されることでさらに厚いラット心筋組織が構築できるのではないかという仮説を立て、それは実証された²³。移植後 1 日で 3 層の新生児ラット心筋細胞シート内に毛細血管網が形成される。その毛細血管網が形成されたグラフトの上に別の 3 層の新生児ラット心筋細胞シートを移植すると、後から移植した 3 層の新生児ラット心筋細胞シート内にも毛細血管網が形成されて、壊死せずに 6 層の新生児ラット心筋グラフトとして生着することが分かった。さらにこの 6 層の新生児ラット心筋グラフトの上に 1 日後に新たな 3 層の心筋細胞シートを同じように移植できた。このようにして、1 日おきに 3 層に積層した新生児ラット心筋細胞シー

トを繰り返して移植する段階的積層化法を用いることで、直近に移植された心筋細胞シート内に毛細血管新生が起こり、ホストからの血液灌流を受けることで生着し、厚さ 100 μ m を超える心筋組織を作製することに成功したのである。

ヒトと同じ厚さの心筋組織を作製するためには膨大なヒト心筋細胞シートを段階的積層化法により積層すれば理論的には可能である。これを実証するためにはヒト iPS 心筋細胞シートがヒト心筋組織として生着するのか、そして新生児ラット心筋細胞シートの場合と同様に、段階的積層化がヒト iPS 心筋細胞シートにも適用できるかどうかを明らかにする必要がある。

まず 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートをグラフトとして移植したところ、グラフトは肉眼的に全体が同期した一定のリズムで自発的に拍動した。ヒト iPS 心筋グラフト内にはホストから灌流される毛細血管網が形成されていた。さらに移植したヒト iPS 心筋グラフトはヒト心筋と同じように電位は一定方向に変化しており、機能的にも組織学的にもヒト心筋組織として生着していることが分かった。次に、3 層に積層したヒト iPS 心筋細胞シートを移植し、その上に 1 日おきに別の 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートを移植することを繰り返すことで、新しく移植されたヒト iPS 心筋グラフト内にホスト側とつながる機能的な毛細血管網が新生し、内部が壊死することなく生着した。本研究では移植を 3 回繰り返すことで、計 9 層のヒト iPS 心筋グラフトの作製に成功し、段階的積層化

法による心筋組織構築はヒト iPS 心筋シートでも有効であることを証明した。

段階的積層化法を用いれば、帰納的に構築するヒト心筋組織はどんどん厚くできる。つまり、実際のヒト心筋のように厚さ 1cm を超えるような iPS 心筋組織を構築することが可能となる。

5.2 移植後のヒト iPS 心筋グラフトの考察

本実験では厚いヒト心筋組織の構築には成功したが、一部の結果は先行実験での検証や報告とは異なっている。3 層のヒト iPS 心筋グラフトは移植 2 週後で厚さ 165 μ m だったが、これは一度に移植できる積層化心筋細胞シートの積層限界 (80 μ m) を超えている。また、本実験で作製したヒト iPS 心筋グラフトは新生児ラット心筋グラフトに比べると細胞密度が低く、細胞の配向性も整っていない

²¹。

5.2.1 ヒト iPS 心筋細胞の分裂

ヒトの胎児の心臓は胎生 5 週程度で形成されはじめ、心筋細胞は出生後 2-3 週までは分裂・増殖し、それ以降は分裂が止まる²⁶⁻²⁹。さらに、分裂している細胞の割合は胎生 12-28 週で高く、それ以降は漸減することが過去の胎児剖検の結果より報告されている²⁷。出生以降の心臓の大きさの成長は心筋細胞の分裂によ

るものではなく、心筋細胞の肥大によるものであることが知られている。

今回の実験結果ではヒト iPS 細胞は移植 2 週間までは盛んに分裂しており、移植 6 か月後には分裂が止まっていた。ヒト iPS 心筋細胞がヒト胎生初期の心筋細胞と同程度の未熟さであると仮定すると、ヒト iPS 心筋グラフト移植 2 週後に含まれるヒト iPS 心筋細胞は盛んに分裂している時期の胎児ヒト心筋細胞に相当すると考えて矛盾しない。さらにヒト iPS 心筋グラフト移植 6 か月後に含まれるヒト iPS 心筋細胞は分裂が止まってくる、もしくは止まってしまった時期の胎生 30 週以降のヒト心筋細胞に相当するので、分裂するヒト iPS 心筋細胞が観察できなかった事実を説明できる。これらよりヒト iPS 心筋細胞は生体内に移植すると胎児ヒト心筋細胞と同様に当初は分裂するが、ある時期には分裂が止まるということが言える。

3 層のヒト iPS 心筋細胞シートは新生児ラット心筋細胞シートと同様、移植時には積層限界以下のせいぜい 80 μ m 程度の厚さであるため生着でき、ヒト iPS 心筋グラフト内にホストとつながる毛細血管網が新生する。そしてホストから血液灌流を受けることでヒト iPS 心筋細胞が継続して分裂増殖できる環境が確保されることで、3 層のヒト iPS 心筋グラフトの厚さが積層限界以上の 165 μ m になり、移植 6 か月後には細胞密度が高い心筋組織となっていたと考えられる。移植後のどの時期にヒト iPS 心筋細胞の分裂が止まるかは本実験では明らかにで

きなかったが、細胞分裂が止まることは移植したグラフトが腫瘍化しないという点で非常に重要なことである。

5.2.2 ヒト iPS 心筋細胞の成熟

生体に移植されたヒト iPS 心筋細胞の構造を時間経過で比較すると、移植する前のヒト iPS 心筋細胞シートに含まれる心筋細胞の筋原線維は未熟だが、移植後から筋原線維は太く、長くなる。ミトコンドリアの数は増え、内部のクリステの構造も複雑になる。さらに、移植 6 か月以降では、移植 2 週間後には観察できなかった T 管や筋小胞体などの成熟した心筋細胞で存在する細胞内構造物が認められる。ヒト心筋細胞は、筋原線維やデスモゾーム、分泌顆粒が胎生 2 か月までに形成され、胎生 3 か月でミトコンドリアの数が増え、胎生 7 か月で成人と同程度の成熟した構造物を持つ心筋細胞になると報告されている³⁰⁻³³。

ヒト iPS 心筋細胞は生体内に移植した後に成熟するが、その成熟過程もおおよそ胎児ヒト心筋細胞に一致する。しかしながらヒト心筋細胞と比較するとヒト iPS 心筋グラフト移植 1 年後に含まれるヒト iPS 心筋細胞の成熟は十分ではない。本実験の目標は移植可能なヒト心筋組織を作製することであり、そのためには成熟した心筋組織を構築する必要がある。今回の結果よりもヒト iPS 心筋細胞を成熟させるためには、何らかの因子を添加する、張力や電気刺激などを加

えて物理的仕事をさせるなどの新しい手法が必要と考えられる。

5.2.3 ヒト iPS 心筋グラフトの配向性

心筋組織として細胞の配向性がそろっていることは強い張力を生み出すために重要であるが、本実験では新生児ラット心筋の実験とは異なり、配向性はあまりそろわなかった。新生児ラット心筋細胞シートはある程度成熟した心筋細胞で構成された新生児ラット心筋組織を酵素処理分解して作製する。そのため、新生児ラット心筋細胞シートには、ラット心筋組織を構成するのに必要な繊維芽細胞やその他の因子がラット心筋細胞に近い割合、分量で含まれると予想される。それゆえに新生児ラット心筋細胞はもとのように接着し、配向性がある程度整った心筋組織が作製できる可能性がある。一方、本実験で使用したヒト iPS 心筋細胞シートには心筋細胞が 80-90%含まれており、これは実際の心筋組織の割合よりも高い。そして、ヒト iPS 心筋細胞シートに含まれるヒト心筋細胞は、心室心筋細胞、心房心筋細胞や刺激伝導細胞が様々な割合で混ざり合っている状態であり、実際のヒト心筋組織の組成とは異なる。そのために細胞集合や接着が弱く、ヒト iPS 心筋細胞シートを積層化しても配向性がそろいにくくなっている可能性がある。

また、通常的心筋組織は血流を拍出するために常に一定の方向に力学的仕事

を行っているのに対し、本実験では背部皮下に移植されたヒト iPS 心筋グラフトが自発的に拍動するのみで、力学的仕事を求められる環境にない。一定の方向に力学的仕事を加えられる状況下ならばヒト iPS 心筋グラフトの配向性がより整う可能性がある。

5.3 ヒト iPS 心筋グラフト異所移植

段階的積層化法でヒト iPS 心筋細胞シートを積層することで厚いヒト心筋組織を構築することに成功したが、将来的に臨床応用するためには心臓表面に使用することになる。しかし、心臓表面でヒト iPS 心筋グラフトを段階的に積層するためには何度も外科的手術が必要となり、侵襲が大きすぎるため現実的ではない。ヒト iPS 心筋グラフトをより侵襲の少ない部位で段階的に積層し、できたグラフトを異所性に移植できれば度重なる手術侵襲は避けられる。実際に、形成外科領域の臨床では遊離皮弁法というものがあり、先天性欠損や外科的切除、外傷などが原因で欠損した組織や臓器を再建するために、欠損した組織や臓器の近くを走行している血管と遊離皮弁の血管を吻合して移植している³⁴⁻³⁷。この遊離皮弁法の手法を用いることができれば、ヒト iPS 心筋グラフトを意図した場所に、機能を維持したまま移植できるはずである。本実験において、異所移植後したヒト心筋グラフトは心筋組織としての機能を維持していた。

心臓表面に血管付きヒト iPS 心筋グラフトを遊離皮弁として移植するならば、解剖学的に近い位置を走行する血管と吻合することになる。吻合する動脈としては心臓外科で行われる冠動脈バイパス術でグラフト血管として使用される内胸動脈や右胃大網動脈が候補となるだろう。血管付きヒト iPS 心筋グラフトの血管が十分に長ければ大伏在静脈をグラフト血管として用いた冠動脈バイパス術のように大動脈に直接吻合することも可能だろう。静脈は、吻合する動脈の伴走静脈、もしくは冠静脈や右心房と吻合できれば動静脈シャントにならない。

血管付きヒト iPS 心筋グラフトを作製する部位を考えると、侵襲を抑えるために体表近くで、血管付きグラフトの吻合血管内径が 1mm 程度である部位が望ましい。そのような条件を満たす部分としては、腹部や鼠径部のある程度太い動静脈で灌流される脂肪組織や、透析用の動静脈シャントが作製される前腕皮下などが候補になるだろう。技術的には十分に可能だと考えられる。(図 16)

生体への手術侵襲をさらに軽減するための研究も行われている。バイオリアクターシステムを用いて、血管床に相当する摘出した血管付きの生体組織や培地流路付きのコラーゲンゲルを持続的に培地で灌流し、その上でヒト iPS 心筋細胞シートの積層化を行うことで心筋組織を作製する研究も行われている^{38, 39}。

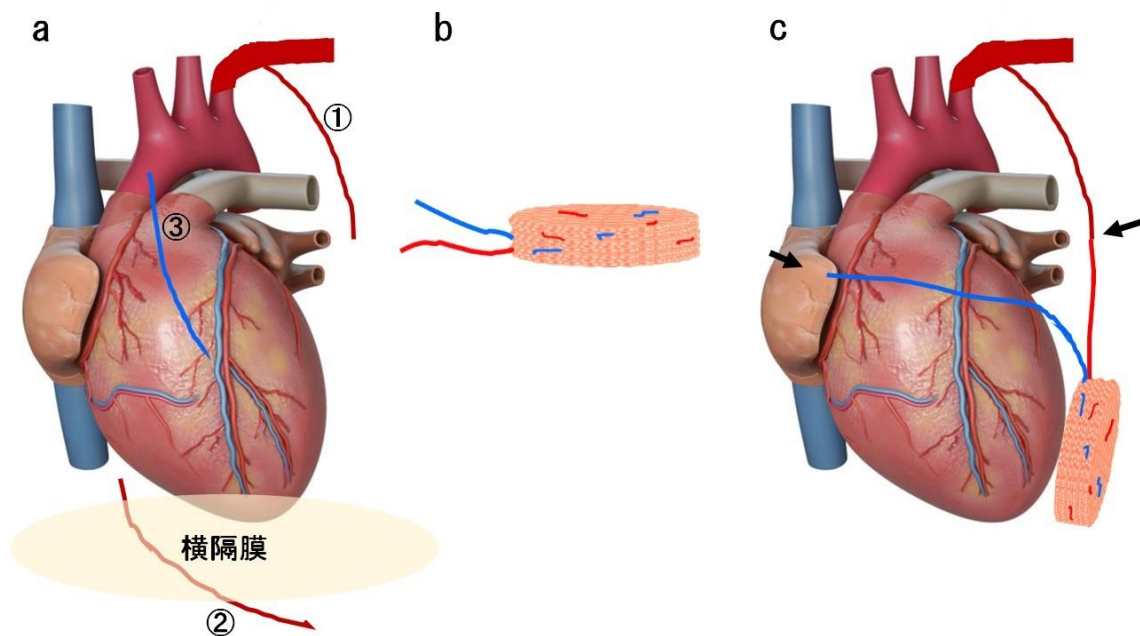


図 16 ヒト iPS 心筋グラフトの臨床応用案

16-a: 冠動脈バイパス術で選択される血管グラフト ①(左)内胸動脈; 上肢を灌流する左鎖骨下動脈の分枝で胸骨の内側を胸郭に沿って下に走行する。手術に用いる時は胸骨の裏から剥離して主に心臓前面の冠動脈に吻合する。 ②右胃大網動脈; 胃を大弯側から栄養する動脈の一つ。胃への分枝を処理した後に、横隔膜を貫いて心臓内に移動させ、主に心臓の下面、裏面の冠動脈に吻合する。 ③大伏在静脈; 両下肢の内側を内顆から鼠径部まで走行する静脈。必要な長さ分を採取し、中枢側吻合は主に上行大動脈で行い、目的とする冠動脈と末梢側吻合を行う。 16-b: 生体内で作製された血管付きヒト iPS 心筋グラフト。吻合血管内径が 1mm 程度である部位で作製されるのが望ましい。 16-c: ヒト iPS 心筋グラフトを流入血管を左内胸動脈、流出血管を右心房として異所性に移植したイメージ図。矢印の部分がそれぞれの血管の吻合部。動静脈シャントにならないよう吻合している。

5.4 問題と今後の展望

本研究ではヒト iPS 細胞シートを生体内で積層することで厚いヒト心筋組織を作製することに成功した。しかし、これを実際にヒト臨床で実用化するにはまだ多くの解決すべき問題点がある。

まず、ヒトの組織へスケールアップするためには莫大な数のヒト心筋細胞が必要となる。そのためには iPS 細胞を安定して大量に培養する必要がある。その方法の一つとして東京女子医科大学のグループでは、先述のバイオリアクターシステムを用いた浮遊培養系で、大量のヒト iPS 細胞の培養を維持することに成功している²⁴。

次にヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化効率の低さの問題が挙げられるが、これに対しては、京都大学のグループが動物由来成分ではない小分子化合物を用いて最大 98%の純度の心筋分化効率を得られると報告しており⁴⁰、また京都大学の別のグループは、VEGF 受容体の一つである Flk-1 陽性中胚葉細胞にシクロスポリン A を作用させることで心筋分化を促進できたことを報告している⁴¹など研究が進んでいる。他にもこれらの問題の解決に向けて現在さまざまなグループにより新しい細胞培養システムや細胞の培養法が模索されている⁴²。

また、iPS 細胞を用いた研究では未分化な細胞の除去が必要になる。未熟な細胞が残存したまま移植すると奇形腫をはじめとした未分化な腫瘍が発生するリスクがあり、ヒト臨床では大きな問題となる。日本では iPS 細胞を用いたヒトに対する世界初の臨床治験として滲出型加齢黄斑変性患者に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植が開始されている⁴³。移植する iPS 細胞由来網膜色素上皮シートを作製する際には腫瘍化が起こらないよう、未熟な細胞を除去

している⁴⁴。治療効果はもちろんであるが、腫瘍の発生などの重篤な問題が起こらないかなどの安全面も注目される。仮に腫瘍が発生しなくとも、未熟な細胞をどの程度除去できれば腫瘍化しないかを解明するのも今後の課題となるだろう。

さらに、本実験ではヒト iPS 細胞から分化させた心筋細胞を使用した。細胞ソースとして心臓繊維芽細胞を iPS 化せずに、直接心筋細胞に誘導する方法が慶応大学のグループにより研究されている⁴⁵。この方法では iPS 細胞よりも腫瘍化のリスクが少ないと言われているが、障害部位の組織の細胞に効率よく必要な因子を導入できるかなどの問題がある。

心筋再生の分野は多くの手法が試されており、その発展は著しい。将来的には有望な治療としてヒトの臨床に実用化されることは間違いないだろう。しかしそのためには倫理性・安全性が第一に担保されていなければならない。その上でより効果のある効率の良い普遍的な方法に改良され、より多くの患者が救われることを期待したい。

6. 結論

本実験ではヒト 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スキヤフォールドを必要としない 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。また、生体内に移植されたヒト iPS 心筋細胞は、胎児期のヒト心筋細胞と同様に分裂、増殖、成熟することも判明した。

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るためには解決すべき問題はまだ多い。しかし、実用化でき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。

7. 引用文献

1. 日本心臓移植研究会. 心臓移植レジストリ.2014/10/20 閲覧
2. 公益社団法人日本臓器移植ネットワーク. 移植に関するデータ.2014/10/20 閲覧
3. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*. 1993;260:920-926
4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861-872
5. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation*. 1999;100:II63-69
6. Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nature medicine*. 2006;12:452-458
7. Ceccaldi C, Fullana SG, Alfarano C, Lairez O, Calise D, Cussac D, Parini A, Sallerin B. Alginate scaffolds for mesenchymal stem cell cardiac therapy: Influence of alginate composition. *Cell transplantation*. 2012;21:1969-1984
8. Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen

- S. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium?
Circulation. 2000;102:III56-61
9. Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, Ogata T, Tanaka H, Ueyama T, Takahashi T, Takamatsu T, Fukushima M, Komeda M, Yamagishi M, Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Oh H. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52:1858-1865
 10. Wang B, Borazjani A, Tahai M, Curry AL, Simionescu DT, Guan J, To F, Elder SH, Liao J. Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells. *Journal of biomedical materials research. Part A*. 2010;94:1100-1110
 11. Uchida K, Sakai K, Ito E, Kwon OH, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. Temperature-dependent modulation of blood platelet movement and morphology on poly(n-isopropylacrylamide)-grafted surfaces. *Biomaterials*. 2000;21:923-929
 12. Yang J, Yamato M, Kohno C, Nishimoto A, Sekine H, Fukai F, Okano T. Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26:6415-6422

13. Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(n-isopropylacrylamide). *Journal of biomedical materials research*. 1993;27:1243-1251

14. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ, Henry TD, Ellis SG, Zhao DX, Silva GV, Lai D, Thomas JD, Kronenberg MW, Martin AD, Anderson RD, Traverse JH, Penn MS, Anwaruddin S, Hatzopoulos AK, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Smith D, Westbrook L, Chen J, Handberg E, Olson RE, Geither C, Bowman S, Francescon J, Baraniuk S, Piller LB, Simpson LM, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moye LA, Simari RD. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: The focus-cctrn trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2012;307:1717-1726

15. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, Pappas P, Tatroles A, Stoddard MF, Lima JA, Slaughter MS, Anversa P, Bolli R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: The scipio trial: Surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*. 2012;126:S54-64

16. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, Tracy M, Gherlin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, Davis-Sproul J, Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman P, Wong Po Foo C, Ruiz P, Amador A, Da Silva J, McNiece IK, Heldman AW, George R, Lardo A. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: The poseidon randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2012;308:2369-2379
17. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marban L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marban E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (caduceus): A prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379:895-904
18. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, N.Y.)*. 2009;324:98-102
19. Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, Fujita T, Matsuyama A, Saito A, Shimizu T, Okano T. Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently

- to discontinue lvas in a patient with dcm: Report of a case. *Surgery today*. 2012;42:181-184
20. Shimizu T, Sekine H, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets. *Tissue engineering*. 2006;12:499-507
 21. Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezu M, Okano T. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circulation research*. 2002;90:e40
 22. Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation. *Biomaterials*. 2006;27:4765-4774
 23. Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Kobayashi E, Okano T. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20:708-710
 24. Matsuura K, Wada M, Shimizu T, Haraguchi Y, Sato F, Sugiyama K, Konishi K, Shiba Y, Ichikawa H, Tachibana A, Ikeda U, Yamato M, Hagiwara N, Okano T. Creation of

- human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;425:321-327
25. Choi BR, Salama G. Simultaneous maps of optical action potentials and calcium transients in guinea-pig hearts: Mechanisms underlying concordant alternans. *The Journal of physiology*. 2000;529 Pt 1:171-188
 26. Austin A, Fagan DG, Mayhew TM. A stereological method for estimating the total number of ventricular myocyte nuclei in fetal and postnatal hearts. *Journal of anatomy*. 1995;187 (Pt 3):641-647
 27. Huttenbach Y, Ostrowski ML, Thaller D, Kim HS. Cell proliferation in the growing human heart: Mib-1 immunostaining in preterm and term infants at autopsy. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2001;10:119-123
 28. Mayhew TM, Pharaoh A, Austin A, Fagan DG. Stereological estimates of nuclear number in human ventricular cardiomyocytes before and after birth obtained using physical disectors. *Journal of anatomy*. 1997;191 (Pt 1):107-115
 29. Mayhew TM, Gregson C, Pharaoh A, Fagan DG. Numbers of nuclei in different tissue compartments of fetal ventricular myocardium from 16 to 35 weeks of gestation. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 1998;433:167-172

30. Sako Y. [electron microscopic studies on the development of the human embryonic myocardium. 1. Myofibrils]. *Japanese circulation journal*. 1971;35:1491-1496
31. Sako Y. [electron microscopic studies on the development of the human embryonic myocardium. 2. Mitochondria and glycogen]. *Japanese circulation journal*. 1971;35:1497-1500
32. Sako Y. [electron microscopic studies on the development of the human embryonic myocardium. 3. Granules]. *Japanese circulation journal*. 1971;35:1501-1503
33. Sako Y. [electron microscopic studies on the development of the human embryonic myocardium. 4. Cell junction]. *Japanese circulation journal*. 1971;35:1504-1508
34. Brown JS, Shaw RJ. Reconstruction of the maxilla and midface: Introducing a new classification. *The Lancet. Oncology*. 2010;11:1001-1008
35. Cannon TY, Strub GM, Yawn RJ, Day TA. Oromandibular reconstruction. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*. 2012;25:108-119
36. Mohan AT, Al-Ajam Y, Mosahebi A. Trends in tertiary breast reconstruction: Literature review and single centre experience. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2013;22:173-178
37. Wong CH, Wei FC. Microsurgical free flap in head and neck reconstruction. *Head & neck*. 2010;32:1236-1245

38. Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, Dobashi I, Wada M, Yamato M, Kobayashi E, Umezu M, Okano T. In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nature communications*. 2013;4:1399
39. Sakaguchi K, Shimizu T, Horaguchi S, Sekine H, Yamato M, Umezu M, Okano T. In vitro engineering of vascularized tissue surrogates. *Scientific reports*. 2013;3:1316
40. Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, Kadota S, Morone N, Barve M, Asai Y, Tenkova-Heuser T, Heuser JE, Uesugi M, Aiba K, Nakatsuji N. A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions. *Cell reports*. 2012;2:1448-1460
41. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-a. *PloS one*. 2011;6:e16734
42. Chen KG, Mallon BS, McKay RD, Robey PG. Human pluripotent stem cell culture: Considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell stem cell*. 2014;14:13-26

43. Kamao H, Mandai M, Okamoto S, Sakai N, Suga A, Sugita S, Kiryu J, Takahashi M. Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem cell reports*. 2014;2:205-218
44. Kuroda T, Yasuda S, Kusakawa S, Hirata N, Kanda Y, Suzuki K, Takahashi M, Nishikawa S, Kawamata S, Sato Y. Highly sensitive in vitro methods for detection of residual undifferentiated cells in retinal pigment epithelial cells derived from human ips cells. *PloS one*. 2012;7:e37342
45. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 2010;142:375-386

8. 謝辞

本研究は科学技術政策委員会 (CSTP) により発足した最先端研究開発支援プログラム (FIRST プログラム) を通し、日本学術振興会 (JSPS) からの科研費により行われました。

本研究を遂行する機会及び終始近接なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科外科学専攻心臓外科・小野稔教授、東京女子医科大学先端生命医科学研究所・清水達也教授、関根秀一講師に深く感謝いたします。

本研究を遂行する際、技術的なご指導を賜りました、東京女子医科大学先端生命医科学研究所・土橋泉氏、およびヒト iPS 細胞を培養し、ヒト心筋細胞に分化誘導させて供給してくださった、東京女子医科大学先端生命医科学研究所・松浦勝久准教授には厚く御礼申し上げます

また、本研究を遂行する上でご尽力くださった、東京女子医科大学先端生命医科学研究所の皆様方、東京大学医学部附属病院心臓外科、呼吸器外科の諸先生方には心から感謝いたします。

付．発表リスト

1. 総説・著書

- 1) 小前兵衛，清水達也．組織工学の再生医学への応用．*血管医学*，
14(3):2013. 9
- 2) 小前兵衛，清水達也．再生医療の研究の最前線．*先進医療 NAVIGATOR*
II，p74-77:2014. 3
- 3) 小前兵衛，清水達也．心血管再生医療のための組織工学技術の進歩．
循環器内科，76(5):2014. 11 刊行予定

2. 学会発表

1) 国内学会 ポスター発表

- (1) 小前兵衛，関根秀一，土橋泉，松浦勝久，清水達也，岡野光夫，小野
稔
「iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生」
第 12 回日本再生医療学会総会，横浜，2013 年 3 月
- (2) 小前兵衛，関根秀一，土橋泉，松浦勝久，清水達也，小野稔，岡野光
夫
「iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生」

第4回 Molecular Cardiovascular Conference II, キロロ, 2013年8月

- (3) 小前兵衛, 関根秀一, 土橋泉, 松浦勝久, 清水達也, 小野稔, 岡野光夫

「iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生と移植の可能性」

第17回循環器再生医療研究会, 東京, 2013年11月

- (4) 小前兵衛, 関根秀一, 土橋泉, 松浦勝久, 清水達也, 小野稔, 岡野光夫

「iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生と移植の可能性」

第13回日本再生医療学会総会, 京都, 2014年3月

- (5) 小前兵衛, 関根秀一, 土橋泉, 松浦勝久, 清水達也, 小野稔, 岡野光夫

「iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いたヒト三次元心筋組織の再生と移植の可能性」

第114回日本外科学会定期学術集会 2014, 京都, 2014年4月

2) 国内学会 口頭発表

- (1) 小前兵衛, 松浦勝久, 清水達也, 小野稔, 岡野光夫

「 Three-dimensional Functional Human Myocardial Tissues
Fabricated from Human Induced Pluripotent Stem Cells and
Foresight for Clinical Application」

第 78 回日本循環器学会総会, 東京, 2014 年 3 月

3) 国際学会 ポスター発表

- (1) Komae H, Sekine H, Dobashi I, Matsuura K, Ono M, Shimizu T, Okano
T

“Three-Dimensional Beating Human Myocardial Tissues Fabricated
From Induced Pluripotent Stem Cells and Cell Sheet Technology”
American Heart Association 2013 (Dallas, USA, Nov. 2013)

- (2) Komae H, Sekine H, Dobashi I, Matsuura K, Ono M, Shimizu T, Okano
T

“Successful Transplantation Of Three-Dimensional Human
Myocardial Tissues Fabricated From Induced Pluripotent Stem Cells
With Cell Sheet Technology”

American Thoracic Society 2014 (San Diego, USA, May 2014)