

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

### 【背景】

重症心不全を根治できる唯一の方法は心臓移植のみである。2010年7月から改正臓器移植法が全面施行されてからは、臓器提供件数・移植件数は増加しているが心臓移植の待機登録患者数はそれ以上のペースで増えており、ドナー心臓数は絶対的に不足している。そのため重症心不全患者は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くるまで長期間の待機を強いられている。半数以上の患者は1年以上待機しており、5年以上待機している患者は10%を超える。この待機期間中に原病の悪化や合併症で多くの命が失われているのが現状である。そこで新たな治療法として再生医療による心筋再生が注目されている。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・心臓を移植できれば、より多くの重症心不全患者を救命できると期待されている。

1980年代から組織再生工学の概念が提唱されてから人工的に様々な組織を再生する研究が進められてきた。しかし、入手困難な細胞からなる組織の再生に関する研究はなかなか進まなかった。その一方で近年、ES細胞・iPS細胞といった多能性幹細胞の研究がめざましく発展して幹細胞から様々な細胞への分化誘導方法も確立し、入手困難だった細胞を入手できるようになった。その結果、ほとんど分裂せず、入手困難な細胞の一つであったヒト心筋細胞も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。

ヒトに対する心筋再生治療としては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、あるいは障害された心筋組織に直接注入する細胞注入法や、重症心不全患者への骨格筋芽細胞シート移植などが既に臨床に持ち込まれている。それらの治療法の効果の大半は移植した細胞から分泌される因子によるパラクライン効果によるものであり、その有効性には限界があると考えられる。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。

組織再生の手法の一つとして東京女子医科大学のグループでは、独自に開発した温度応答性培養皿から作製される細胞シートを用いてスキャフォールドを用いずに様々な組織を再生することを目指している。心筋再生分野では、新生児ラット心筋から心筋細胞を抽出して新生児ラット心筋細胞シートを作製し、生体内で1日おきに3層ずつの新生児ラット心筋細胞シートを重ねて移植する「段階的積層化法」を用いることで拍動する厚いラット心筋組織の構築を報告している。

何層にも積層化した細胞シートを一度に移植しても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ため内部が壊死してしまい、単純拡散で栄養される 80~100 $\mu\text{m}$  程度の厚さにしか生着しない。しかし細胞シートを移植してから時間をあけることで内部にホストからの血液灌流所ある機能的な毛細血管が新生する。その上に新たに細胞シートを移植し時間をあけると、同様に毛細血管新生が起こって生着するのである。これが段階的積層化法の原理である。

ヒト心筋細胞を用いてヒト心筋細胞シートを作製し生体内で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た。そこで本研究はヒト iPS 細胞から分化誘導させたヒト心筋細胞からヒト心筋細胞シートを作製し、段階的積層化法を用いて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、また作製した心筋組織は異所性に移植できるかの評価を行うことで移植可能なヒト心筋組織となるかを検討した。

### 【方法・結果】

ヒト iPS 細胞より分化誘導させたヒト iPS 心筋細胞を温度応答性培養皿で培養してヒト iPS 心筋細胞シートを作製した。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背部皮下に移植し 3 層のヒト iPS 心筋グラフトとしたところ、移植 2 週後に肉眼的拍動と全体的に同期した周期的な電気的活動を計測できた。組織学的に移植したヒト iPS 心筋細胞グラフトは心筋組織でありサルコメアによる横紋構造が観察された。その中に毛細血管網が形成されており、ホストからの血液灌流を受けるヒト心筋組織として生着していることがわかった。さらに長期的には移植後 13 か月まで肉眼的に拍動し、全体的に同期した周期的な電気的活動を計測できる心筋組織として生着していることが確認できた。

蛍光免疫染色による組織学的解析から移植 2 週後では盛んに心筋細胞が分裂しているが移植 6 か月後では分裂が停止していることが分かった。電子顕微鏡で観察したところ、移植する前のヒト iPS 心筋細胞シートでは幼弱な筋原線維が散見される程度であったが、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で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。移植 6 か月以降ではデスモゾームや筋小胞体、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。

次に段階的積層化法を用いて 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートを 1 日おきに同じ部位に 3 日間連続して重ねて移植し、計 9 層のヒト心筋グラフトとした。移植 2 週後に観察すると、肉眼的拍動と全体的に同期した周期的な電気的活動を計測でき、組織学的には、積層したヒト iPS 心筋細胞シート内に機能的な毛細血管網が形成されていた。また、3 層のヒト iPS 心筋グラフトは厚さ  $165 \pm 40 \mu\text{m}$  ( $n=5$ ) だったのに対し、9 層のヒト iPS 心筋グラフトは  $359 \pm 161 \mu\text{m}$  ( $n=4$ ) と有意に厚いヒト心筋組織を構築できていた。 ( $p < 0.05$ )

次に大腿動静脈が灌流する鼠径部の皮下組織上で段階的積層化法を用いて 3 層のヒト iPS 心筋細胞シートを同じ部位に重ねて 2 日間連続して移植して計 6 層のヒト心筋グラフトとし、背部皮下と同様に心筋組織を構築した。2 週間後に大腿動静脈とともに血管付きグラフ

トとして摘出し、別個体の頸部の動静脈と血管吻合することで異所性に移植した。さらに1週間後に観察したところ、肉眼的拍動と全体が同期した周期的な電氣的活動を観測でき、組織学的にも毛細血管網伴うヒト心筋組織として残存していた。つまり、作製したヒト iPS 心筋グラフトを血管付きグラフトとして作製した上で、血管吻合することで異所移植できることが確かめられた。

#### 【考察・結論】

3層のヒト iPS 心筋細胞シートの移植を3回繰り返して、計9層のヒト iPS 心筋グラフトを作製できたことで段階的積層化法はヒト iPS 心筋細胞シートでも有効であることを証明した。段階的積層化法を繰り返せば、実際のヒト心筋のように厚さ1cmを超えるヒト iPS 心筋組織を帰納的に構築できると考えられる。

また、移植2週後のヒト iPS 心筋細胞は分裂していたが移植6か月後は停止していた。細胞分裂がある時期で止まることは移植したヒト iPS 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。幼弱な時期は分裂し、ある時期以降は分裂が止まるのはヒトの胎児心筋細胞の特徴と一致する。さらにヒト iPS 心筋細胞の生体内に移植後の成熟過程もおおよそ胎児ヒト心筋細胞に一致するが、ヒト心筋細胞の成熟に比べて不十分であった。ヒト iPS 心筋細胞をより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。

本実験で作製したヒト iPS 心筋グラフトは配向性が揃っていなかった。これは、実際のヒト心筋組織の細胞組成とは異なっているため、細胞集合や接着が弱く、配向性が揃いにくくなっていたことや、通常的心筋組織のように方向性のある力学的仕事を常時求められる環境になかったことなどが原因と考えている。

将来的にこのヒト iPS グラフトを用いる場合、心臓表面で段階的積層化を行うことになるが侵襲が大きく現実的ではない。血管付きヒト iPS 心筋グラフトを侵襲の少ない部位において段階的積層法で作製し、遊離皮弁法を用いて異所性に移植すれば大きな侵襲は避けられるし意図した場所に機能を維持したまま移植できる。本実験では異所移植したヒト心筋グラフトが心筋組織としての機能を維持することを確認できた。

血管付きヒト iPS 心筋グラフトを作製する部位は、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く、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、前腕皮下などが候補になるだろう。心臓表面に血管付きヒト iPS 心筋グラフトを血管吻合して移植すると仮定すると、流入血管は内胸動脈や右胃大網動脈と吻合、血管付きグラフトの血管が十分に長ければ大動脈と直接吻合することも可能だろう。流出血管は、シャントにならないように流入血管と吻合した動脈の伴走静脈、もしくは冠静脈や右心房と吻すれば良いのではないかと考えている。

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、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明らかにした。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ようになるためにはヒト iPS 細胞の大量培養法や心筋細胞への分化効率の向上、未分化細胞の除去法などの多くの解決すべき問題点がある。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。