The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ミニブタ虚血性心筋症モデルに対するヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの有効性と安全性の検討
Author(s)	川村, 匡
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/26291
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨

〔論文題名〕ミニブタ虚血性心筋症モデルに対するヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの有効性と安全性の検討

専攻名：外科系臨床医学専攻　　氏名：川村 匡

〔目　的〕

ヒトiPS細胞は心臓再生療法の有望な細胞ソースである。しかし、臨床応用にはiPS由来心筋細胞の大量培養法の確立や奇形腫形成の排除、また有効な細胞移植法など解決すべき課題が多い。我々は分化誘導、純化を含めたヒトiPS由来心筋細胞の大量培養法を開発し、更に細胞投与法として細胞シート法を用いて作成したヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの有効性と安全性をミニブタ虚血性心筋症モデルで検討した。

〔方法ならびに成績〕

(実験1)ヒトiPS細胞10000個/mlで浮遊培養開始し、培養4-6日目でWnt3aとR-Spondin-1を添加し心筋分化誘導を開始し、培養8-10日目でDkk1を添加しWntシグナルを抑制した。培養10日目より接着培養へ変更し、培養20日と25日目に無糖培地を使用し、純化した。純化後、a-Actinin、NKX2.5、cardiac TNTの蛍光免疫染色でそれぞれ約90％の純度でヒトiPS細胞由来心筋細胞（hiPS-CM）を得た。hiPS-CM 4×106個とヒト線維芽細胞 0.8×106個を温度応答性培養皿1枚に混合培養し、1日後、室温としhiPS-CMシートとして回収した。また、hiPS-CM培養上清中にはHGF、LIF、SDF1a、IL-6、MCP-1、MIFといった心筋保護因子の産生を認めた。これらシート8枚を、Ameroid constrictorを左前下行枝に装着し作成したミニブタ（メス、20kg）虚血性心筋症モデルに移植した（iPS群=6、無治療群=6　両群ともタクロリムス10mg/日内服）。移植後2ヵ月でiPS群は無治療群と比較し、心エコー、心臓ＣＴ検査で有意に心機能改善効果を認めた。また、スペックルトラッキング心エコーを用いた局所壁運動評価では、治療後、梗塞境界領域の改善を認めたが、梗塞領域の改善は認めなかった。移植後2ヵ月の組織学的評価ではiPS群は無治療群と比較し、左室reverse remodeling効果（心筋細胞径の減少、間質線維化の減少）を有意に認めた。iPS群では梗塞境界領域において血管新生効果の増強を認め、また、同部位のVEGF、bFGFの発現の増強も認めた。hiPS-CMは移植後8週間で検出可能であったが、生着細胞数は少数と考えられた。また、致死的不整脈、奇形腫形成は認めなかった。

(実験2)実験1にて生着したhiPS-CMが少数であった原因として移植細胞の虚血による早期脱落が考えられたため、豊富な血管網をもつ大網同時移植により、移植後の細胞生存率が向上するかどうか検討した。実験1と同様にヒトiPS細胞から心筋細胞へ分化誘導後、細胞トレーサーとして超常磁性酸化鉄（SPIO）を細胞内へ導入した。SPIOラベル化hiPS-CMと温度応答性培養皿を使用し、hiPS-CMシートを作成した後、ミニブタ心臓表面へ移植した。シート単独群は細胞シートのみ移植、大網同時移植群は細胞シートを大網で覆い、心表面へ移植した。移植後SPIOラベル化細胞をMRI検査にて検出かつ生存率を定量し、2群間で比較した。移植2ヵ月後、大網同時移植群がシート単独群に対し有意に細胞生存率が高かった（90±7% vs 64±9%, P<0.01）。組織学的検査にて移植部位の血管密度を比較したところ大網同時移植群がシート単独群に対し有意に血管密度が高かった(62±10units/mm2 vs 10±7units/mm2, P<0.01)。

〔総　括〕

虚血性心筋症モデルに対するヒトiPS細胞を用いた心筋細胞シートの安全性および有効性が示され、ヒトiPS由来心筋細胞シート移植は心臓再生医療の有効な治療戦略となる可能性が示唆された。一方で、移植後生着したhiPS-CMは少数であり、主な心機能改善効果はparacrine効果と考えられた。移植細胞生着率向上には大網同時移植が有用である可能性が示唆された。移植細胞を多く生着させ心収縮拡張に直接寄与し、心機能を改善させるためには、ヒトiPS細胞の分化誘導を含めた大量培養法や移植方法の更なる改良が必要と考えられた。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　川村　匡

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	澤　芳樹
	副　査	大阪大学教授	高島成二
	副　査	大阪大学教授	中谷　敏

論文審査の結果の要旨

ヒトiPS細胞は心筋再生療法の有望な細胞ソースと考えられているが、臨床応用にはiPS由来心筋細胞の大量培養法の確立や奇形腫形成の排除、また有効な細胞移植法の確立など解決すべき課題が多い。本研究では分化誘導、純化を含めたヒトiPS由来心筋細胞の大量培養法を開発し、更に細胞投与法として細胞シート法を用いて作成したヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの有効性と安全性をミニブタ虚血性心筋症モデルで証明した。しかし、移植細胞の長期生着は少数のみであり、主な心機能改善メカニズムはパラクライン効果と考えられた。更に、移植細胞の長期生存を得るためには移植細胞の虚血を予防することが不可欠と考え、豊富な血管網をもつ大網と細胞シートを同時に移植することにより、移植後の細胞生着率が向上することを証明した。

これらの研究はヒトiPS細胞を用いた心筋再生療法の世界初の概念実証（proof of concept）であり、今後ますます期待される重症心不全に対する再生医療に大きく貢献するものと考えられる。

上記内容から本論文は学位の授与に値すると考えられる。

＊A4で本紙１部，コピー９２部を提出してください。