



Title	Bioengineered myocardium derived from induced pluripotent stem cells improves cardiac function and attenuates cardiac remodeling following chronic myocardial infarction in rats
Author(s)	三木, 健嗣
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59701">https://hdl.handle.net/11094/59701</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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

氏 名	三 木 健 飼
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	第 2 5 6 7 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 9 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Bioengineered myocardium derived from induced pluripotent stem cells improves cardiac function and attenuates cardiac remodeling following chronic myocardial infarction in rats (iPS細胞由来心筋細胞シートはラット慢性心筋梗塞モデルにおいて心機能を改善しリモデリングを抑制する。)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 澤 芳樹 (副査) 教 授 小室 一成 教 授 金田 安史

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 〔目 的(Purpose)〕

ヒトiPS細胞の作製が可能になり、自己細胞由來のiPS細胞を利用した移植治療が期待されている。特に慢性心不全においては、根治的治療法は心臓移植しかなく、その移植にも様々な問題があり、iPS細胞の分化・移植による再生医療は非常に注目されている。我々は以前、新生仔ラット由來的心筋細胞シートを心筋梗塞モデルラットへ移植したところ、ホスト心筋への生着及び心機能の改善が確認された。本研究では、マウス線維芽細胞由來のiPS細胞を用いて心筋細胞シートを作製し、そのシートを慢性心筋梗塞モデルラットへ移植してiPS細胞由来心筋細胞シートの治療効果を評価した。

## 〔方法(Methods)〕

マウスiPS細胞はフィーダー細胞上で維持し、分化誘導は胚様体(EBs)を形成後、glycogen synthase kinase-3 inhibitor BIOを添加し培養した。その後、無糖培地でセレクションを行い、心筋細胞への分化精製効率を免疫染色により確認した。また、分化細胞の遺伝子発現量はRT-PCR及びreal-time PCRにより検討した。iPS細胞由来心筋細胞シートの作製は、分化誘導5日に24well型の温度感受性培養皿にEBsを40個/wellずつ播種し、毎日培地交換を行った。分化誘導11日に精製用培地交換し、2~3日間培養した後分化用培地に戻した。分化誘導15日に培養皿を室温でインキュベートすることでシートとして回収し、以下の移植に利用した。

心筋梗塞モデルはF344/NJcl-rnu/rnuラット7-8週令の左前下行枝を結紮して作製した。梗塞2週後にエコーにて梗塞を確認後、再開胸を行い、マウスiPS細胞由来心筋細胞シートを移植した群(n=15)と、移植していないSham群(n=15)とに分けた。移植4週後、エコー及びカテーテルにて心機能評価、組織学的評価、RT-PCRによる遺伝子発現量の評価、ELISAによるタンパク質の発現量の評価を行った。

## 〔結果(Results)〕

マウスiPS細胞にBIOを作用させることで、分化誘導11日目には88%のEBsが拍動した。精製を行った後、 $\alpha$ -actinin及びNkx2.5の免疫染色を行ったところ、各陽性率は99.18%と96.45%であった。また、real-time PCRの結果より、精製を

行うことで、有意に未分化マーカーの発現量が低下し、心筋マーカーの発現量の上昇が確認された。

心筋梗塞モデルラットへの移植実験では、エコー評価により移植4週後において、Ejection Fraction (EF), fractional shortening (FS), left ventricular dimension in systolic phase (LVDs), anterior wall dimension (AWD)の項目で、シート移植群の方がSham群に比し、有意に心機能改善効果を認めた。また、カテーテル評価においてもdP/dt max, dP/dt min, Tau, Ees, Eedの項目でシート移植群の方がSham群に比し、有意に心機能改善効果を認めた。さらに、組織学的評価より、移植後にiPS細胞由来心筋細胞シートがhost心筋に生着し、移植4週後においても生存していることが確認された。

#### 〔総 括(Conclusion)〕

マウスiPS細胞から作製された心筋細胞シートは、ラット慢性心筋梗塞モデルにおいて心機能を改善し、リモデリングを抑制した。また、移植後もhost心筋に生着している事が確認された。これらにより、iPS細胞から作製された心筋細胞シートは、慢性心筋梗塞モデルに対する有用な治療法である可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

iPS細胞が開発されて以降、iPS細胞の分化精製・移植による再生医療は非常に注目されている。申請者は、まずマウスiPS細胞から心筋細胞への効率的な分化誘導法を検討し、慢性心筋梗塞モデルラットにおいてiPS細胞由来心筋細胞シートが心機能を改善しリモデリングを抑制するかを検討した。

マウスiPS細胞にBIOを分化誘導2日目～5日目の間作用させることで、分化誘導11日目には88%のEBsが拍動した。無糖培地で心筋細胞の精製を行った後、 $\alpha$ -actinin及びNkx2.5の免疫染色を行ったところ、各陽性率は99.18%と96.45%であった。また、real-time PCRの結果からも、精製を行うことで、有意に未分化マーカーの発現量が低下し、心筋マーカーの発現量の上昇が確認された。

心筋梗塞モデルラットへの移植実験では、エコー評価により移植4週後において、Ejection Fraction (EF), fractional shortening (FS), left ventricular dimension in systolic phase (LVDs), anterior wall dimension (AWD)の項目で、シート移植群の方がSham群に比し、有意に心機能改善効果を認めた。また、カテーテル評価においてもdP/dt max, dP/dt min, Tau, Ees, Eedの項目でシート移植群の方がSham群に比し、有意に心機能改善効果を認めた。また、ELISA解析により、シート移植群において、梗塞領域と非梗塞領域共にHGF、VEGFの発現量がsham群に比して増加していた。さらに、組織学的評価より、移植後にiPS細胞由来心筋細胞シートがhost心筋に生着し、移植4週後においても生存していることが確認された。

以上の結果から、マウスiPS細胞から心筋細胞への効率的な分化誘導を実現し、iPS細胞由来心筋細胞シートがラット慢性心筋梗塞モデルにおいて心機能を改善し、リモデリングを抑制することを示した。これらにより、iPS細胞から作製された心筋細胞シートは、慢性心筋梗塞モデルに対する有用な治療法である可能性が示唆された。

上記の研究成果は、中動物モデルにおいてiPS細胞の有用性を示した初めての成果であり、学位の授与に値すると考えられる。