

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16392

研究課題名（和文）xeno-free iPS細胞由来心筋細胞の臨床応用

研究課題名（英文）Clinical application of xeno-free iPS cell-derived cardiomyocytes

研究代表者

鈴木 康太（Suzuki, Kota）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70816850

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生体由来成分を含まない方法でiPS細胞から心筋細胞への分化誘導（xeno-free）を行うことに成功した。また、ナノファイバーを足場とした機能的な心筋組織の大型化が可能であった。この心筋組織を大動物の慢性虚血性心筋症モデルに移植し、移植効果（収縮能の改善）および早期における移植組織の生着を確認できた。これらの結果は、将来的なiPS細胞を用いた再生医療の発展に貢献するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

将来的なiPS細胞の臨床応用においては、将来的に安定した安価な心筋細胞作成法と、移植組織の機能向上が必要である。心筋組織の機能をより向上させるには、組織に内在する心筋細胞の配向性に留意する必要がある。また、心筋細胞の作成においてはより安価で生体由来成分を含まない分化誘導法が必須である。本研究においては、xeno-free分化誘導法を用いた心筋細胞の作製を行うと同時に、生体分解性配向性ナノファイバーをscaffoldとして心筋細胞の配向性を有する心筋組織を作成し、同心筋組織のin vitroでの電気生理学的検証および、動物心不全モデル移植による有効性、安全性の検証を行うことである。

研究成果の概要（英文）：Induction of differentiation from iPS cells to cardiomyocytes was successfully performed using a xeno-free method. In addition, we were able to create large-scale functional cardiac tissue using nanofiber as a scaffold. This cardiac tissue was transplanted into a large animal model of chronic ischemic cardiomyopathy, and the therapeutic potential (improved contractility) and early engraftment of the transplanted tissue was confirmed. We believe that these results will contribute to the future development of regenerative therapy using iPS cells.

研究分野：循環器

キーワード：iPS細胞 配向性 分化誘導 心筋細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年重症心不全に対する iPS 細胞由来心筋細胞組織臨床応用が行われようとしている。しかし臨床応用を行う際、より臨床的有効性の向上、及び心筋組織の製品化に関して依然解決されていない問題を有している。心筋組織の機能をより向上させるためには、組織に内在する心筋細胞の配向性に留意することが必要であり、また、より優れた再生医療等製品を開発するためには、より安価で、新規低分子化合物を用いて生体由来成分を含まない(xeno-free)分化誘導法を用いて作成した心筋細胞からなる心筋組織の作成が必須である。本研究においては、xeno-free 分化誘導法を用いた心筋細胞の作製を行うと同時に、生体分解性配向性ナノファイバーを scaffold として心筋細胞の配向性を有する心筋組織を作成し、同心筋組織の in vitro での電気生理学的検証および、動物心不全モデル移植による有効性、安全性の検証を行うことである。

## 2. 研究の目的

zeno-free iPS 細胞由来心筋細胞移植の臨床効果を評価するための段階的な研究として、まずは In vitro でナノファイバーを使用して作成した配向性のある心筋組織片の電気生理学的検証、力学的検証、組織学的検証を行う。その後、大動物慢性心筋梗塞モデルへの移植を行いその有効性及び安全性について検討する。

## 3. 研究の方法

### 心筋組織の作成について

安全性の高い生体分解性素材である PLGA から 10kV 程度の高電圧をノズルに加えエレクトロスピニング法を用いてナノファイバーを作成し、回転式ドラムを用いて回転させることで太さや密度、配向性を心筋細胞に最適化したナノファイバー (Aligned Nano-Fiber: ANF)を作成する。作成したナノファイバー (ANF)と新規低分子化合物を用いて生体由来成分を含まない(xeno-free)分化誘導法を用いて作成したヒト iPS 細胞由来の高純度心筋細胞を組み合わせることで、ナノファイバーに沿った細胞が配列したヒト心筋組織片を作成する。

### 大動物への移植実験について

全身麻酔下に清潔操作で左肋間開胸を行い、冠動脈左前下行枝を結紮し(アメリロイドコンストラクターを使用)心筋梗塞モデルを作成し、約 4 週間飼育して慢性心筋梗塞モデルを作成する。作成した慢性心筋梗塞モデルの心機能を評価し再度全身麻酔下に左室壁に配向性 PLGA ナノファイバー心筋組織片の移植手術を施行する。その後、餌とともに免疫抑制剤の経口投与を行う。移植手術後 3 ヶ月間にわたって心臓超音波検査・心臓 MRI 検査などを用いて心機能の評価を行い、小動物に比べてより実臨床的な項目での心機能の改善効果を評価する。また、組織染色を行い移植された細胞の宿主細胞との接着性や融合性、ナノファイバーの生体内分解程度、炎症反応についても評価を行う。また、現在は移植するナノファイバーの形状は正方形型をしているが今後の臨床応用に向けてよりハンドリングの良い移植しやすい形態(円形や三角形など)についても検討する。

## 4. 研究成果

### (1) iPS 細胞から心筋細胞への誘導について

生体由来成分を含まない xeno-free な分化誘導法を行い、iPS 細胞から誘導された心筋細胞について評価した。誘導された心筋細胞は、フローサイトメトリーにおいてトロポニン T 陽性率が安定して 90%程度であり、十分に純度の高い心筋細胞の誘導が可能であった。また、この分化誘導方法の特徴として、MLC2v single positive の比較的成熟した心室筋タイプの細胞が 70%程度と多く確認された。また構造的にも免疫染色においてサルコメア構造のはっきりと確認できた。以上より、この分化誘導法において安定した心筋細胞の供給が可能であった。

### (2) ナノファイバーを用いた配向性心筋組織の作成について

ナノファイバーの作成方法自体は以前の報告(Junjun Li, et al. Stem Cell Reports 2017; 9:1-14)と同様であるがこの報告では 1cm x 1cm 程度の大きさで、大動物移植用に新たに 2.5cm x 2.5cm 程度の大きさの心筋組織を作成した。作成した心筋組織は 100-150 μm 程度の厚みがあり、配向性を有した心筋組織の作成が可能であった。またこれらの組織は免疫染色において -MHC によく染まっており作成した心筋組織の成熟が確認できた。電気生理学的にも以前の報告

と同様に心筋組織全体における同期を示せていた。以上より、ナノファイバーを足場とした大型の心筋組織の作成が可能であった。

### (3) 大動物虚血性心筋症モデルへの移植について

上記の方法で作成した心筋細胞および心筋組織を用いて、大動物（ブタ）虚血性心筋症モデルを用いて移植実験を行なった。心筋梗塞の作成については上記の通りであり、モデル作成日から1ヶ月後に移植実験を行なった。controlとしてnanofiberのみの移植（nanofiber群）を行い、心筋組織を移植した群（iPS-CM群）と比較した。心臓超音波検査上、移植後早期（術後1ヶ月程度）から心機能の回復が確認でき3ヶ月後のMRIでも収縮能の指標である ejection fraction（EF）の有意な改善と収縮末期容積（Left ventricular end systolic volume: LVESV）の有意な縮小を認めた。また、組織においてはiPS-CM群において繊維化範囲は有意に少なく、新生血管（CD31陽性）をより多く認めた。また、移植後比較的早期の個体においては内部に血管構造を有する心筋組織の生着を認めた。また、RT-PCR検査において移植周辺組織での血管新生に関わる遺伝子（b-FGF, SDF-1）の有意な上昇を認めた。以上より、大動物（ブタ）虚血性心筋症モデルへの移植は治療効果があったと判断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木康太・宮川繁・劉莉・南一成・李俊君・河村拓史・河村愛・原田明希摩・上野高義・戸田宏一・倉谷徹・澤芳樹
2. 発表標題 ブタ虚血性心筋症モデルに対するxeno-free iPS細胞由来心筋細胞移植の有効性の検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木康太・宮川繁・劉莉・南一成・李俊君・河村拓史・河村愛・原田明希摩・上野高義・戸田宏一・倉谷徹・澤芳樹
2. 発表標題 ブタ虚血性心筋症モデルに対するナノファイバーを用いたxeno free心筋配向組織の移植効果の検討
3. 学会等名 第67回心臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kota Suzuki, Shigeru Miyagawa, Liu Li, Itsunari Minami, Junjun Li, Akima Harada, Takuji Kawamura, Ai Kawamura, and Yoshiki Sawa
2. 発表標題 Therapeutic Efficacy of Large Aligned Cardiac Tissue Derived from Xeno-free Induced Pluripotent Stem Cell in a Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model
3. 学会等名 IFAO 2019 The 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs, Osaka, Japan (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----