

令和 2 年 6 月 12 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：18K16389

研究課題名（和文）Super ECMを用いた新しい移植組織作成

研究課題名（英文）Laminin221 enhances therapeutic effects of hiPS-CMs derived 3-dimensional engineered cardiac tissue transplantation in a rat ischemic cardiomyopathy model

研究代表者

佐村 高明（Samura, Takaaki）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40815510

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）：ラミニン221を付加したヒトiPS由来心筋細胞（hiPS-CM）では、運動機能、ミトコンドリア機能の有意な増強、低酸素条件下での生存細胞数増加や細胞障害性低下を認め、低酸素耐性が向上した。また、低酸素条件下における抗アポトーシス関連遺伝子発現の増強を認めた。心筋梗塞モデルラットへのhiPS由来3次元心筋組織移植では、ラミニン付加群は、移植後早期における移植心筋組織生着の改善、また移植後4週後における心機能の改善、血管新生の促進、線維化の抑制を認めた。ラミニン221を付加した3次元心筋組織はラット心筋梗塞モデルに移植後、生着が改善し、治療効果の向上を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞由来心筋組織移植治療は、心筋補充療法としての再生医療であり、心不全治療において期待が高まっている。しかし、これまでの研究では、ヒトiPS細胞由来心筋組織移植後生着は十分でなく、治療効果を十分に引き出すためにはその生着の改善が必要であった。

本研究では、心筋細胞の生存に必要な細胞外マトリックスであるラミニン221を付加することにより、ラット虚血性心筋症モデルにおいて、移植後心筋組織の生着を改善し、その治療効果を向上することができた。このことは、今後心不全患者における、ヒトiPS細胞由来心筋組織を用いた再生医療に応用することで、治療効果を向上させる可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：In vitro assessment indicated that laminin-221 improves mechanical function and mitochondrial function of hiPS-CMs. Cell viability and LDH production revealed that laminin-221 improved tolerance to hypoxia. Furthermore, anti-apoptotic genes were upregulated in the laminin group under hypoxic conditions. In vivo assessment, heart function of the laminin conjugated engineered cardiac tissue (L-ECT) group was significantly better than that of other groups four weeks after transplantation for ischemic cardiomyopathy model of rat. In early assessments, cell survival was also improved in L-ECTs compared to ECT transplantation without laminin-221. Laminin-221 enhanced mechanical and metabolic function of hiPS-CMs and improved the therapeutic impact of 3D-ECT in a rat ischemic cardiomyopathy model. These findings suggest that adjuvant laminin-221 may provide a clinical benefit to hiPS-CMs constructs.

研究分野：重症心不全

キーワード：細胞外マトリックス ラミニン 心不全 ヒトiPS細胞由来心筋細胞 3次元心筋組織 重症心不全

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

虚血性心筋症に対するヒト iPS 細胞由来心筋細胞シート移植治療は、心筋補充療法としての再生医療であり、期待が高まっている。しかし、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの移植後生着は十分でなく、ヒト iPS 細胞由来心筋シート移植の心筋補充療法としての治療効果を十分に引き出すためには、移植後心筋組織の生着改善が必要である。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの生着改善を達成するためには、移植心筋組織への血液供給の改善、免疫拒絶の抑制、心筋細胞の生存に必要な細胞外マトリックスの付加が重要である。特に心筋細胞に特異的な細胞外マトリックスであるラミニン 221 は、心筋細胞表面に発現しているインテグリン $\alpha 7 \beta 1$ と結合することにより、outside-in シグナル伝達を活性化し、抗アポトーシス作用により、心筋細胞の生存に寄与することが報告されている。

2. 研究の目的

虚血性心筋症モデルラットに対する、ヒト iPS 細胞由来心筋組織移植において、ラミニン 221 を付加し、移植組織の生着と治療効果を評価する。

3. 研究の方法

ラミニン 221 付加の有無による、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞(253G1)の運動機能、代謝機能、低酸素耐性、低酸素条件下におけるアポトーシス関連遺伝子発現の違いを *in vitro* で比較検証した。ラミニンコーティング培養皿の上で培養した iPS 細胞由来心筋細胞をラミニン群、通常の培養皿で培養した iPS 細胞由来心筋細胞をコントロール群とした。運動機能は、心筋細胞の収縮・拡張速度を Cell motion Imaging System を用いて比較した。代謝機能はミトコンドリアにおける最大呼吸速度を比較した。低酸素耐性の評価は、低酸素条件(025%、72 時間)での培養後に、生存細胞数、細胞傷害性を評価した。また、低酸素条件下で培養後に抗アポトーシス関連遺伝子(BCL2, BCL2L1)の発現を比較した。次に、ラミニン付加ヒト iPS 細胞由来心筋組織の有用性を *in vivo* で検証した。レシピエントには F344/NJcl-rnu/rnu T 細胞欠如免疫不全モデルラットを用いて、8 週齢で左前下行枝を結紮し虚血性心筋症モデルを作成し、2 週間後に移植を行った。ラミニン付加心筋組織移植群、心筋組織移植群、フィブリンシート移植群(各 n=10)の 3 群で、移植後生着を Bioluminescence imaging(移植ヒト iPS 細胞由来心筋細胞株:201B7-luc7)を用いて評価し、心機能の推移を心エコー検査で移植後 4 週目まで評価した。また、傍梗塞部位におけるサイトカイン関連遺伝子発現と血管新生の違いも比較検討した。

4. 研究成果

In vitro では、運動機能ではラミニン群で有意に収縮、拡張速度が増強し(収縮速度、ラミニン群:16.4±2.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ vs コントロール群:11.1±3.4 $\mu\text{m}/\text{sec}$, $p<0.001$ 、拡張速度、ラミニン群:9.0±1.8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ vs コントロール群:6.1±2.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$, $p<0.002$)、代謝機能ではラミニン群で有意に最大呼吸速度が増強し(ラミニン群:221±30 pmol/min vs コントロール群:172±19 pmol/min)、低酸素耐性ではラミニン群で有意に生存細胞数が増え、細胞傷害性が低減された。また、低酸素条件下において、ラミニン群で抗アポトーシス関連遺伝子である BCL2、BCL2L1 の発現が有意に増強した。*In vivo* では、心筋組織の生着は、ラミニン付加心筋組織群で移植後 3 日目に有意に増強しており、7 日目においても生着増強傾向を認めた。また、心機能はラミ

ニン群で移植後 4 種目において、その他の 2 群と比較して有意に心機能の改善を認めた(左室駆出率: ラミニン付加心筋組織群: $55.1\% \pm 6.3\%$ vs 心筋組織群: $48.1\% \pm 5.9\%$ vs フィブリンシート群: $34.8\% \pm 2.5\%$, $n=10$; ラミニン付加心筋組織群 vs フィブリンシート群; $p<0.001$, ラミニン付加心筋組織群 vs 心筋組織群; $p=0.016$, 心筋組織群 vs フィブリンシート群; $p<0.001$)。傍梗塞部位におけるサイトカイン関連遺伝子の発現はラミニン群で有意に増強しており、また傍梗塞部位における血管新生も有意にラミニン群で増強を認めた。これらより、ヒト iPS 細胞由来心筋組織にラミニンを付加することにより、心筋細胞の構造機能・ミトコンドリア機能・抗アポトーシス活性は増強し、組織生着は改善され、治療効果を増強した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takaaki Samura, Shigeru Miyagawa, Takuji Kawamura, Satsuki Fukushima, Jun-ya Yokoyama, Maki Takeda, Akima Harada, Fumiya Ohashi, Ryoko Sato-Nishiuchi, Toshihiko Toyofuku, Koichi Toda, Kiyotoshi Sekiguchi, Yoshiki Sawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Laminin221 enhances therapeutic effects of hiPS-CMs derived 3-dimensional engineered cardiac tissue transplantation in a rat ischemic cardiomyopathy model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T. Samura S. Miyagawa K.Toda Y. Yoshikawa H. Hata D. Yoshioka S. Kainuma T. Kawamura A. Kawamura S. Yoshida T. Ueno T. Kuratani Y. Sawa
2. 発表標題 Laminin 221 enhance physiology and functionality in human induced pluripotent stem cell derived three-dimensional engineered cardiac tissue
3. 学会等名 AHA Scientific Session（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐村高明、宮川繁、河村拓史、戸田宏一、西中知博、吉川泰司、秦広樹、吉岡大輔、甲斐沼尚、河村愛、上野高義、倉谷徹、澤芳樹
2. 発表標題 人工的細胞外マトリックスを用いたhiPS細胞由来3次元心筋組織の開発
3. 学会等名 心臓病学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 フィブリンシートの製造方法	発明者 佐村高明、横山淳、 宮川繁、澤芳樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-181395	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----