

令和 4 年 9 月 13 日現在

機関番号：16101  
 研究種目：若手研究  
 研究期間：2020～2021  
 課題番号：20K17716  
 研究課題名(和文) Super ECMを用いた新しい心筋再生療法の開発

研究課題名(英文) Laminin 221 enhance physiology and functionality in human induced pluripotent stem cell derived three-dimensional engineered cardiac tissue

## 研究代表者

佐村 高明 (SAMURA, Takaaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

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)：iPS由来心筋組織の心不全心への移植では、移植直後の低酸素状態への耐性が必要となる。ラミニン付加によってヒトiPS細胞由来心筋細胞は、低酸素条件下においてpFAKの活性化、下流に位置するSTAT3の活性化が起こり、抗アポトーシス関連遺伝子であるBCL2、BCL2L1の有意な発現増強を認めた。ラミニン付加ヒトiPS由来3次元心筋組織移植では、虚血性心筋症モデルラットに対する移植において、移植4週間後に心機能改善の向上や、傍梗塞部位におけるサイトカイン発現増強や線維化抑制を認めた。direct effectの可能性を評価では、移植後3週目にホストの心臓と同期するiPS由来心筋組織を認めた。

## 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、心不全に対する再生治療として期待が高まっている。以前の研究では、ヒトiPS細胞由来心筋組織移植後生着は十分でなく、また心筋補充療法に関わらず、ヒトiPS細胞由来心筋組織によるパラクライン効果が中心となっていた。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ける移植心筋組織の生着を改善し、治療効果の向上を認めた。また、移植心筋組織がホストの心臓と同期することも認められた。この高機能心筋組織移植は今後心不全患者における、ヒトiPS細胞由来心筋組織移植の治療効果向上の可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Extracellular matrix, especially laminin-221, may play crucial roles in viability and survival of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPS-CMs) after in vivo transplant. Left ventricular ejection fraction of the laminin-conjugated engineered cardiac tissue (ECT) group was significantly better than that of other groups 4 weeks after transplantation. Laminin-conjugated ECT transplantation was associated with significant improvements in expression levels of rat vascular endothelial growth factor. In addition, we investigated the possibility of a synchronized beating effect of 3D-ECT by assessing the electrical coupling of transplanted 3D-ECT and rat heart using in vivo imaging. In vivo imaging using gCaMP3 revealed spontaneous beating of 3D-ECT on the recipient rat heart and they are synchronized.

研究分野：再生医療

キーワード：ラミニン 重症心不全 細胞外マトリックス iPS由来心筋細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞由来心筋組織移植による治療効果を向上させる為には、移植心筋組織の生着改善が必要である。また、移植した心筋組織が、ホストの心臓と同期することで直接的に収縮能をサポートする可能性がある。心筋組織において、細胞外マトリックスであるラミニン 221 は心筋細胞の成熟の足場となるだけでなく、インテグリン 7 を介した outside-in シグナルを心筋細胞に伝え、成熟・生存を促進することが報告されている。

### 2. 研究の目的

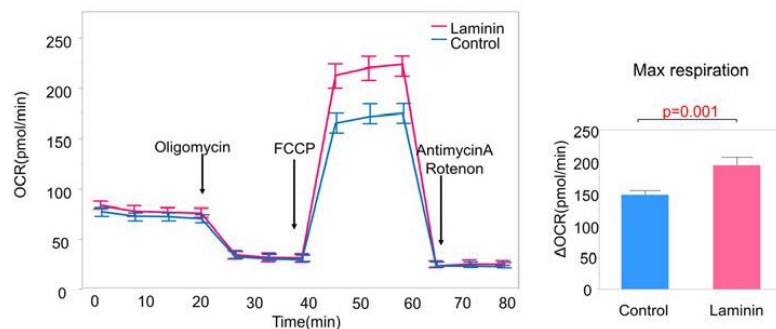
本研究では心筋細胞にラミニンを付加し、高機能化したヒト iPS 細胞由来心筋組織を心不全心に移植することで移植組織の生着の向上と、パラクライン効果のみならず直接収縮をサポートする direct effect の可能性を評価した。

### 3. 研究の方法

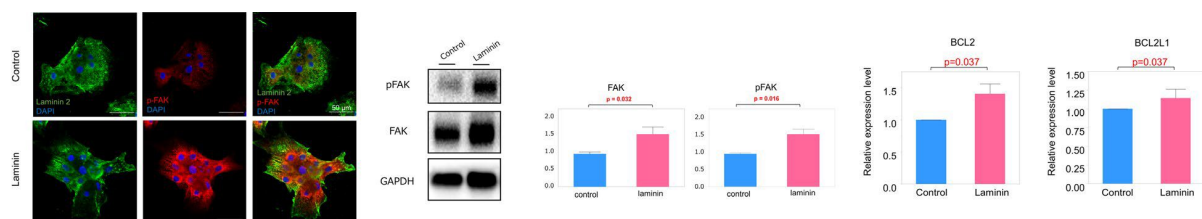
ラミニン 221 が iPS 由来心筋細胞に与える効果については、ラミニン 221 を加えて培養した iPS 由来心筋細胞を用いて、ミトコンドリア機能、また心筋構造、機能、ミトコンドリア関連遺伝子の発現について RT-PCR で検討した。ラミニン 221 が低酸素条件下でアポトーシスを抑制することが分かっており、関連遺伝子の発現を調べた。また、ラミニン 221 を付加した iPS 由来心筋組織の評価については免疫不全ラットの梗塞心(8週齢のヌードラットの心臓前下行枝を結紮し心筋梗塞モデル)に移植し、心エコー検査による心機能評価、移植4週後に梗塞心におけるサイトカイン遺伝子発現の調査を行った。また、direct effect の可能性を評価するため、gCaMP3 組み込み移植心筋組織とホスト心臓における、電気的同期の評価を行った。

### 4. 研究成果

ラミニン付加のヒト iPS 細胞由来心筋細胞への影響評価では、ミトコンドリアにおける最大呼吸速度が増強した。また、MYL2、TNNT3、MYH7 といった心筋細胞の構造関連遺伝子の発現の増強を認めた。心筋組織移植直後は低酸素条件下にさらされるため、低酸素条件下における移植心筋組織の生存細胞数、細胞傷害性を評価したところ、それぞれラミニン付加によって向上を認めた。また低酸素条件下においてラミニン付加によって、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の pFAK の活性化、下流に位置する STAT3 の活性化が起こり、抗アポトーシス関連遺伝子である BCL2、BCL2L1 の有意な発現増強を認めることが判明した。

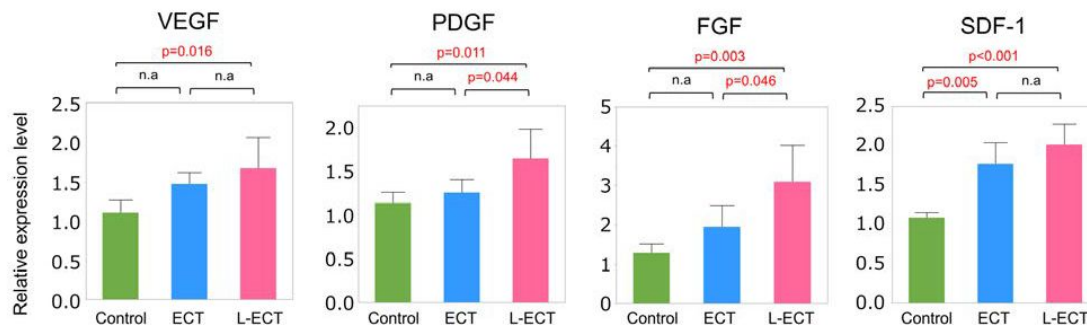


ラミニン群 vs コントロール: ミトコンドリア機能 (最大呼吸速度)



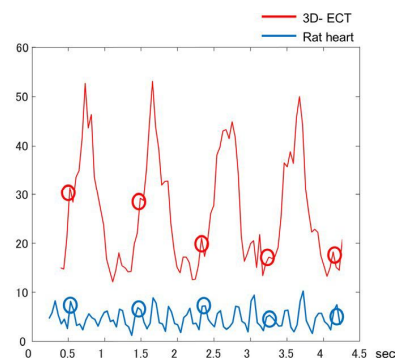
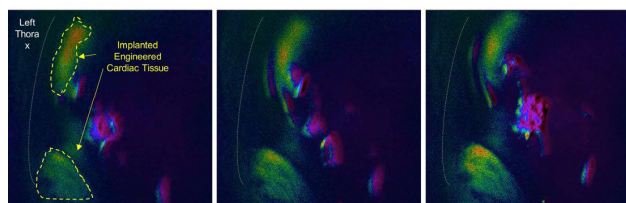
ラミニン群 vs コントロール (FAK 発現、BCL2、BCL2L1 発現)

フィブリンを用いてヒト iPS 由来心筋細胞 (hiPS-CM) にラミニンを付加する 3 次元心筋組織を開発した。虚血性心筋症モデルラットに対する、ラミニン付加心筋組織移植では移植 4 週間後に治療効果を評価するために、傍梗塞部位におけるサイトカイン発現を調べたところ、ラミニンを加えることによって VEGF、PDGF、FGF、SDF-1 の発現増強を認め、虚血に伴う線維化の抑制を認めた。



傍梗塞部位でのサイトカイン発現

加えて direct effect の可能性を評価するため、gCaMP3 組み込み移植心筋組織と宿主心臓における、電氣的同期の評価では、移植後 3 週目に宿主の心臓と 4:1 で同期する移植心筋組織を認めた。



移植心筋組織の宿主心臓との同期拍動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐村高明
2. 発表標題 細胞外マトリックス負荷によるiPS細胞由来心筋組織移植の心不全治療効果検討
3. 学会等名 徳島外科医会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 フィブリンシートの製造方法、METHOD FOR PRODUCING FIBRIN SHEET	発明者 佐村高明	権利者 大阪大学
産業財産権の種類、番号 特許、17/765637	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 フィブリンシートの製造方法、METHOD FOR PRODUCING FIBRIN SHEET	発明者 佐村高明	権利者 大阪大学
産業財産権の種類、番号 特許、20870789.3	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------