

新規ナノファイバー・iPS 細胞由来心筋組織片を用いた再生医療技術の開発

~安全・配向・3次元心筋組織の構築に成功~

京都大学高等研究院 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) の劉莉 (リュウ・リ) 連携准教授 (兼 京都大学工学研究科 特定准教授)、京都大学工学研究科の李俊君 (リ・ジュンジュン) AMED 特定研究員、大阪大学大学院医学系研究科 組織・細胞設計学共同研究講座の南一成 (みなみ・いつなり) 特任准教授 (常勤)、フランスパリ高等師範学校の陳勇 (チェン・ヨン) 教授、大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科学の澤芳樹 (さわ・よしき) 教授らの研究グループは、新たに開発されたナノファイバー (※1) 材料を用いて、安全性と配向性 (配列の方向がそろった性質)、3次元構造を持ったヒト iPS 細胞由来の心筋細胞の組織構築に世界で初めて成功しました。このナノファイバー心筋組織片を使った新しい心筋再生治療法が期待されています。

生体内の心筋細胞は筋繊維が配列した3次元構造を有していますが、これまでの平面的な細胞培養法で得られた心筋細胞は配列構造を持たないものであったため、筋繊維構造や収縮力、電気生理学的性質について、実際の心臓と性質が異なることが課題でした。

本研究では、生体内の心臓組織の微小環境を模倣し人工的に心筋構造を再生するために、安全性の高い生体分解性素材である乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) を用いて、心筋細胞培養に最適化した配向性ナノファイバーを開発しました。このナノファイバーとヒト iPS 細胞から作成した高純度のヒト心筋細胞を組み合わせ、3次元組織培養を行うことで、実際の心臓組織に近い3次元多層構造と筋繊維の配列構造を伴った、ナノファイバー融合型の心筋組織片を構築することに成功しました。従来の、配列構造を持たない2次元単層の心筋細胞と比較して、このナノファイバー心筋組織片は各心筋関連遺伝子の発現レベル (β -MHC など) の点で成熟度が高く、薬剤応答に関する電気生理学的な機能性に優れていることを示すデータが得られました。創薬分野や薬剤評価の新規手段としての応用が期待できます。

このナノファイバー心筋組織片をラット心筋梗塞モデルに移植し、心筋細胞の生着能と心機能を解析しました。その結果、移植後2ヶ月にわたって厚みのある細胞組織の生着が認められ、同時に梗塞で低下した心機能の有意な改善が見られました。また生体外の培養心筋細胞で作製したリエントリー性不整脈 (※2) モデルに対して、配向性ナノファイバー心筋組織を重ねることで修復できることが確認されました。そしてこのナノファイバー心筋組織片は非常に強度が高く、移植手術等における扱いが容易で搬送にも適している上、材料費も低コストになります。今後、この新たな組織工学 (※3) 技術を用いて、創薬や再生医療分野での実用化を目指し開発を進める予定です。

本成果は、米国東部時間 2017 年 10 月 26 日正午 (日本時間 10 月 27 日午前 1 時) に米科学誌「Stem Cell Reports (ステム・セル・レポート)」で公開されました。

1. 背景

心筋梗塞を始めとする虚血性心疾患の患者は日本で約 80 万人おり、年間約 4 万人が死亡しています。現在のところ心臓移植が唯一の有効な治療法ですが、ドナー不足、免疫反応などの深刻な問題を抱えています。ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞の開発により、幹細胞から分化誘導した心筋細胞による移植治療が心臓移植に代わる治療法になることが期待されています。しかし、幹細胞由来の心筋細胞は、そのままでは厚みのある心筋組織を構築する事が出来ない上に、心筋細胞の向きがバラバラで配向性がないため、筋収縮力や組織強度が弱く、実際の心臓組織に近い構造と機能を作れていないことが課題となっています (図 1)。

そこで京都大学と大阪大学の共同研究チームは、生体内の心筋組織と同じような筋繊維の配向性と 3 次元構造を構築するため、再生医療に適した安全かつ機能性の高い材料を用いて、新規の細胞培養技術、組織工学と移植技術の開発を目指しました (図 1)。

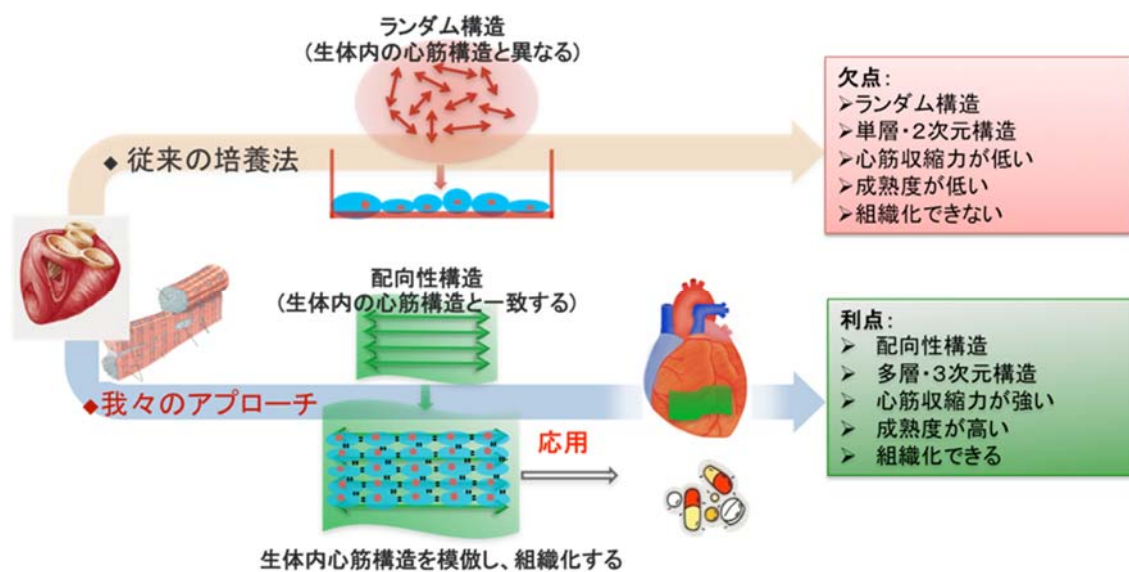


図 1. 安全性と配向性を備えた 3 次元心筋組織の開発

2. 研究内容と成果

1. 安全性と実用性を持つ 3 次元配向ナノファイバー融合型心筋組織片の開発

安全性の高い生体分解性素材である乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) は、既に FDA に認められ臨床現場で使用されている材料です。この材料を用いて、太さや密度、配向性を心筋細胞培養に最適化したナノファイバー (Aligned Nano-Fiber, ANF) を開発しました (図 2a)。このナノファイバーと、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て細胞が配列したヒト心筋組織片を作製できます (図 2b)。さらに、高純度の心筋細胞は 200 μm (マイクロメートル) の厚みのある多層の心筋組織を形成しており (図 2c)、3 次元組織として構築されていました (図 2d)。このナノフ

アイバーはピンセット等を用いて簡単に扱うことが可能で (図 2 e)、また弾力性と強度に富みながらも (図 2 f)、生体内で分解される安全性を備えています (図 2 g)。また、細胞バッグにより輸送も可能です (図 2 h)。このように安全性の高い素材で、弾力性と配向性を持った、実用性の高い 3 次元構造の心筋組織片を作製することに成功しました。

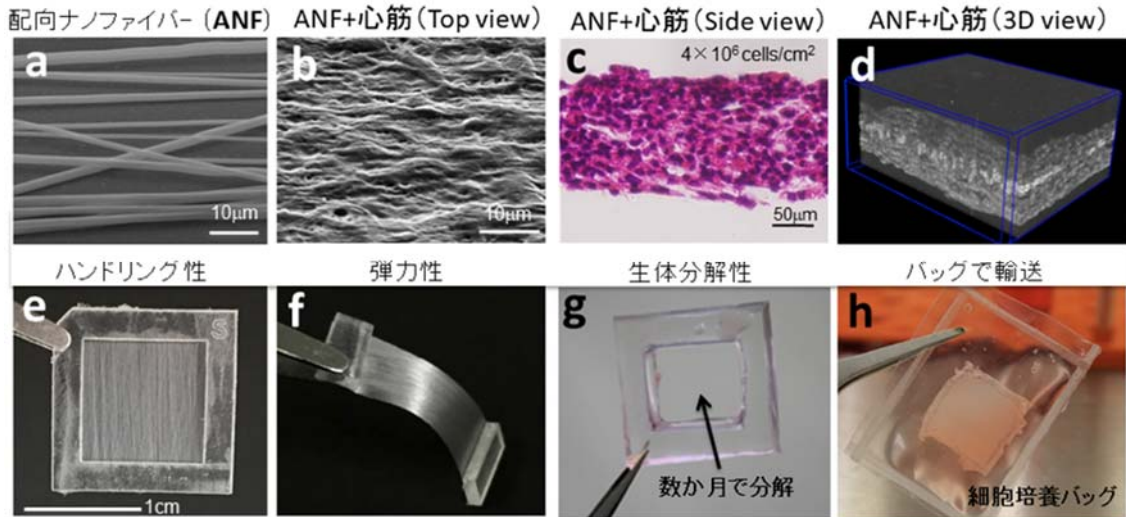


図 2. 配向性ナノファイバーの開発と 3 次元配列構造を持つ心筋組織片の開発

2. ナノファイバー心筋組織片の成熟度と機能性

配向性がなくランダムな 2 次元単層 (Flat、RNF) の心筋細胞と比較して、配向性ナノファイバー (ANF) 心筋組織片は遺伝子発現パターンの成熟度は比較的高く、薬剤応答に対する電気生理学的な機能性に優れていました。成人型的心筋細胞マーカーである β MHC の発現量が高く (図 3 a)、いくつかの成熟関連遺伝子の発現量も増加していました (図 3 b)。心筋細胞に影響を与える薬剤について電気生理学的解析を行った結果、安定に薬剤の応答を評価できることが判明しました (図 3 c)。

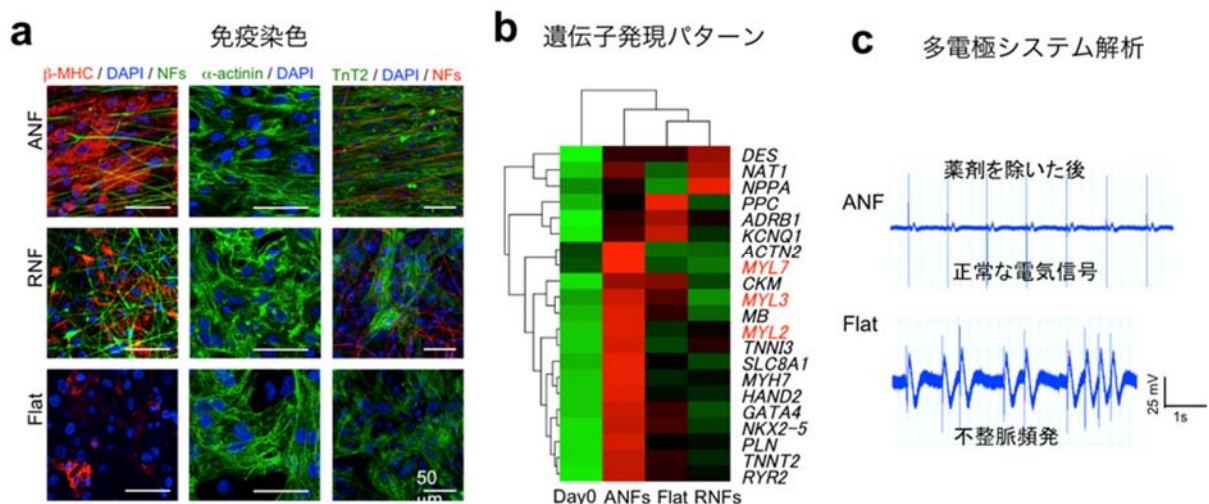


図 3. 配向性ナノファイバー心筋組織における成熟化関連分子の発現と薬剤応答性

3. 生体外不整脈モデルに対するナノファイバー心筋組織片の修復効果

心筋細胞移植の効果を予測するために、まず生体外で心筋細胞シートに物理的なダメージを与えることで、心筋障害によるリエントリー性不整脈モデルを作製し、その上からナノファイバー心筋組織片を張り付けて共培養する実験を行いました (図 4 a)。その結果、配向性構造を持つナノファイバー心筋組織を張り付けることで不整脈を消失させることができました (図 4 b、c)。一方、配向性のない心筋組織を張り付けても不整脈は消失しませんでした。

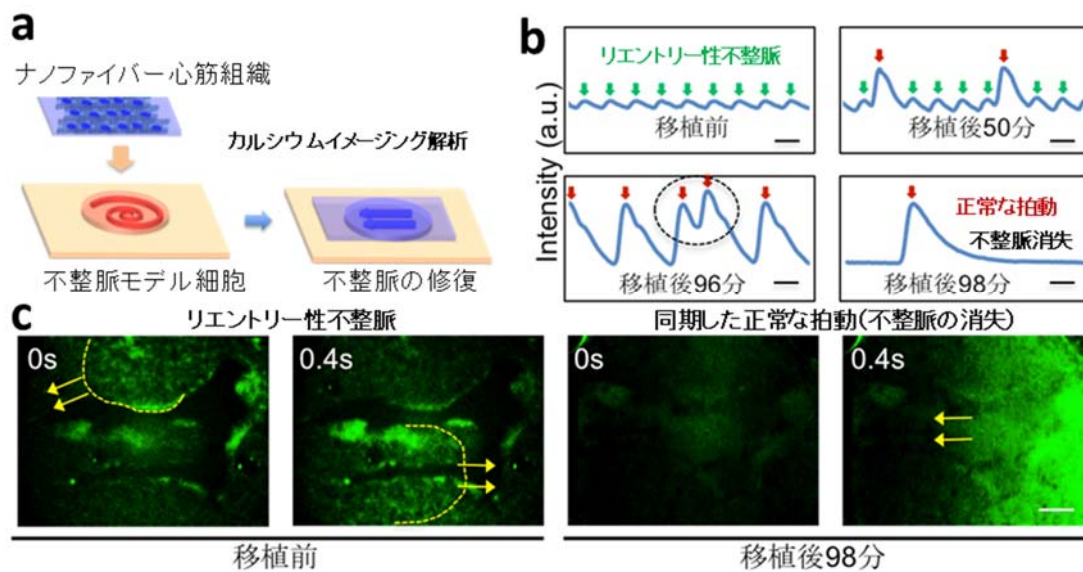


図 4. ナノファイバー心筋組織片との共培養による、生体外リエントリー不整脈の消失

4. 心筋梗塞ラットにおけるナノファイバー心筋組織の生着と心機能の回復

手術によりラット生体内に心筋梗塞 (MI) を作製して、作製の直後 (急性期) と、梗塞作製から 2 週間後のラット (慢性期に近い) にナノファイバー心筋組織片を移植し、心筋細胞の生着と心機能を解析しました。その結果、移植後 2 ヶ月にわたって最大 500 μ m の厚みのある、高密度の心筋細胞組織の生着が認められ (図 5 a、b)、同時に、梗塞で低下した心機能の有意な改善が見られました (図 5 c)。また移植したナノファイバーや細胞による炎症反応についても、移植部位周辺に見られませんでした (図 5 d)。

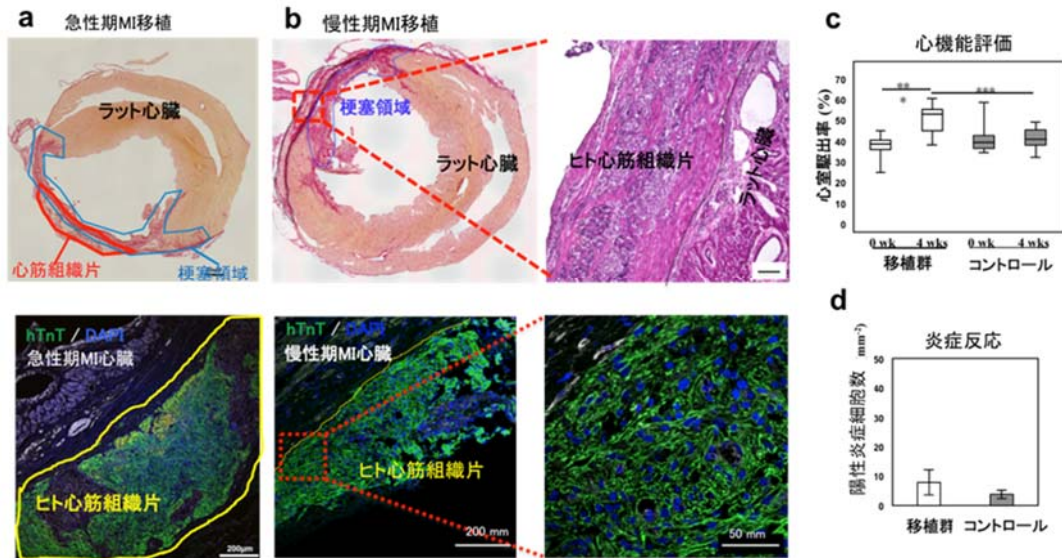


図5. ナノファイバー心筋組織のラット心筋梗塞モデルへの移植

3. 今後の展開

ヒト多能性幹細胞を用いた組織工学による、再生医療および薬剤スクリーニングへの応用が期待されています。本研究ではナノ工学技術を用いて、配向性を持った生体分解性ナノファイバーを開発し、生体心臓の3次元配列構造を模倣したヒト心筋組織の構築に世界で初めて成功しました。生体内と生体外の両方で、障害を受けた心臓や細胞に対し移植した心筋組織の良好な生着が認められ、心機能の改善が見られています。近い将来、大型動物モデルへ適用するための技術改良を行いながら、有効性と安全性を確認し、このナノファイバー心筋組織片を重症心不全の治療や創薬に広く応用することを目指します。また、iPS細胞以外の幹細胞や心筋以外の分化細胞についてもこのナノファイバー技術が応用できると考えており、多種の生体組織を構築していくことで、幅広い組織工学への適用を目指し開発を進めていきます。

4. 用語解説

- ※1 ナノファイバー：直径1ナノ～数マイクロメートル程度の繊維状の構造体。合成ポリマーや生体分子など様々な材料を用いて作製することができる。近年細胞の足場材料として注目されている。
- ※2 リエントリー性不整脈：心筋梗塞などの細胞障害により、心筋組織の電氣的興奮が正常に伝わらず、興奮が旋回して頻脈を生じる不整脈。
- ※3 組織工学：細胞の機能的な集団構造である生体組織を模倣し、それを改善、置換することを目的とした材料工学、バイオテクノロジー。

5. 研究プロジェクトについて

文部科学省 科学研究費補助金

日本医療研究開発機構(AMED)「再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業（再生医療の産業化に向けた細胞製造・加工システムの開発）ヒト多能性幹細胞由来の再生医療製品製造システムの開発(心筋・神経)」

6. 論文タイトル・著者

“Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Tissue-Like Constructs for Repairing of the Infarcted Myocardium”

(新規ナノファイバーによるiPS細胞由来心筋組織片を用いた新しい心筋梗塞治療法の開発)

Junjun Li[†], Itsunari Minami[†], Motoko Shiozaki, Leqian Yu, Shin Yajima, Shigeru Miyagawa, Yuji Shiba, Nobuhiro Morone, Satsuki Fukushima, Momoko Yoshioka, Sisi Li, Jing Qiao, Xin Li, Lin Wang¹, Hidetoshi Kotera, Norio Nakatsuji, Yoshiki Sawa*, Yong Chen*, Li Liu*

Junjun Li: 京都大学高等研究院 物質－細胞統合システム拠点、京都大学工学研究科

Itsunari Minami: 京都大学高等研究院 物質－細胞統合システム拠点、大阪大学大学院医学系研究科 組織・細胞設計学共同研究講座

Yoshiki Sawa: 大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科学

Yong Chen: 京都大学高等研究院 物質－細胞統合システム拠点、フランス パリ高等師範学校

Li Liu: 京都大学高等研究院 物質－細胞統合システム拠点、京都大学工学研究科

† 同等ファーストオーサー、*は本研究に関する責任著者

7. iCeMS について

京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) は、文部科学省「世界トップレベル研究拠点 (WPI) プログラム」に平成19 年度に採択された拠点です。iCeMS では、生物学、物理学、化学の分野を超えて新しい学問を作り、その学問を社会に還元することを目標に活動しています日本で唯一の研究所です。その新しい学問からは、汚水や空気の浄化といった環境問題の解決、脳の若返りといった医療に役立つ可能性を秘めたとてつもないアイデアが次々と生まれています。詳しくはウェブサイトをご覧ください。 <http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/>