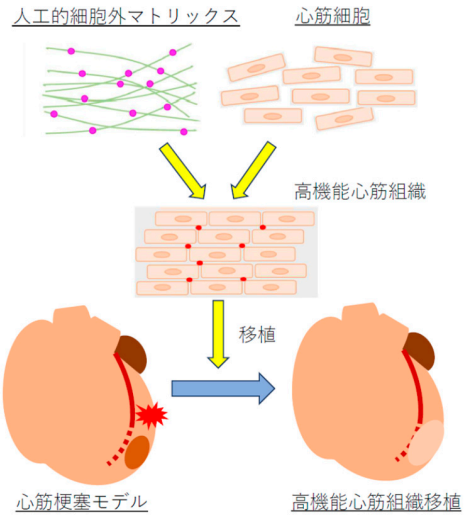
83　心筋組織を構築する人工細胞外マトリックスの開発	福嶌　五月

【目的】iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心筋組織による重症心不全に対する心筋再生治療が行われようとしているが、その有効性をあげるためには、心筋組織内の心筋細胞のバイアビリティーを向上させ、移植心筋組織の機能を向上させることが必要である。これまで、心筋組織において、細胞外マトリックス（Extracellular Matrix: ECM）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 α7 を介した刺激を心筋細胞に与え、成熟・生存を促進することが報告されている。本研究では、ラミニン 221 を用いて心筋細胞と特異的に結合し、心筋細胞の活性を向上させるような人工 ECM を作製し、心筋組織に付加することで高機能な iPS 細胞由来心筋組織を開発することを目的としている。

【方法】ラミニン221が心筋細胞に与える影響については、ラミニン221を加えて培養した心筋細胞を用いて、モーションアナライザーによる収縮弛緩機能の評価、ミトコンドリア機能の評価、低酸素ストレスに対する耐性、免疫染色の評価、心筋関連・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。また、人工細胞外マトリックスを付加した心筋組織の機能の評価については、人工胞外マトリックス付き高機能心筋組織を免疫不全ラットの梗塞心に移植する。心機能評価を心エコー検査で評価を行った。

【結果】ラミニン 221 を加えて、心筋細胞を培養した群においてはモーションアナライザーにて iPS 由来心筋細胞の収縮速度、拡張速度有意な増加を認めた。またミトコンドリア機能テストにおいては最大呼吸量の有意な増加を認めた。また、低酸素条件下における生存細胞数や細胞障害性の評価においてもそれぞれ有意に低酸素条件に耐性を持つことが示された。また RT－PCR においては成熟心筋を示唆する構造遺伝子の発現増加、その他カルシウムチャネル関連遺伝子、ミトコンドリア増殖関連遺伝子の発現増加を認めた。一方で、ラミニン 221 を用いた人工的 ECM はフィブリンにラミニン 221 を加えることで作製しその中に iPS 由来心筋細胞を加え、人工的 ECM 付加 iPS 由来心筋組織を作製した。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を作製、10 週齢時に作製した iPS 由来心筋組織を移植した。人工的 ECM 付加 iPS 由来心筋組織を移植群は、コントロール群である、フィブリン移植群に比べて有意に左室駆出率の改善を認め、また人工的 ECM を付加しない iPS 由来心筋組織のみを移植した群に比べて左室駆出率の改善が良い傾向を認めた。ラミニン 221 は iPS 由来心筋細胞の機能成熟を向上しうることを示唆し、またフィブリンを用いた ECM 付加 3 次元心筋組織をヌードラット心筋梗塞モデルに移植することでその心機能を向上させ得る可能性が示唆された。

心不全に対する人工細胞外マトリックスを用いた心筋細胞移植



83. 心筋組織を構築する人工細胞外マトリックスの開発

福嶌　五月

*大阪大学 医学部 心臓血管外科学講座

Key words：iPS 細胞由来心筋組織，細胞外マトリックス，ラミニン 221，心不全

緒　言

重症心不全は予後不良な疾病であり、これに対する心筋補充療法への期待は大きい。これまでも iPS 細胞よりシート化した人工心筋組織を作製し重症心不全の左室表面に貼付移植するという治療開発の報告がある［1］。しかしながら、人工心筋組織の心臓への移植においては、移植後の人工心筋組織の機能と生存をさらに向上させる研究開発が求められている。現在、人工心筋組織の心臓への移植においては、移植後の人工心筋組織の機能と生存をさらに向上させる研究開発では、血管内皮細胞などの心筋以外の細胞同時移植、移植組織の免疫原性からのアプローチ、移植する心筋細胞の型、細胞外マトリックスの付加といった方法が考えられている［2］。

細胞外マトリックスについては、ラミニンを付加することで心筋細胞の機能を向上させ得ることがこれまでも報告されているが［3］、心筋細胞に特異的に作用するラミニンを選択し、同ラミニンを加えることは必須であると考えられる。ラミニン 221 は心筋細胞表面に特異的に発現しているインテグリンα7 と特異的に結合することが知られている細胞外マトリックス蛋白であるラミニン 221 は心筋細胞にとって生育しやすい微小環境であるニッチェを形成する［4］。その中で、ラミニン 221 は心筋細胞の足場となることだけでなく、インテグリンα7 と結合することにより、アウトサイドインのシグナルを増強することで成熟や生存を促進すると考えられている［5］。これらのことから、ラミニン 221 を用いた人工的細胞外マトリックスは hiPS 由来 3 次元心筋組織の移植後生着・移植組織機能を向上させ得る、また移植後心不全心の心機能を向上する可能性があると考えた。また、これまでにラミニン 221 を用いて心筋細胞特異的人工的細胞外マトリックスを作った報告はない。

本研究ではラミニン 221 の iPS 由来心筋細胞への影響を解明するため、*in vitro* においては、ラミニン 221 が iPS 由来心筋細胞に与える影響の評価を、運動機能、ミトコンドリア機能、低酸素条件への耐性について、また *in vivo* では人工細胞外マトリックスを付加した心筋組織をヌードラット心筋梗塞モデル心に移植し、その心機能を評価した。

方　法

1.　ラミニン 221 が iPS 由来心筋細胞に与える影響の評価

ラミニン 221 にてコーティングした培養皿上で培養した iPS 由来心筋細胞と、通常通り培養した iPS 由来心筋細胞において収縮・弛緩機能、ミトコンドリア機能、低酸素ストレスへの耐性、また構造、成熟などにかかわる遺伝子の発現、免疫染色を評価した。

2.　ヌードラットを用いた心筋梗塞モデルへの人工的 ECM 付加心筋組織移植による影響評価

ヌードラットを用いて左前下行枝を結紮することで心筋梗塞モデルを作製、その 2 週間後にラミニン 221 付加を iPS 由来心筋組織を梗塞心に移植し、心機能の評価を心エコー検査にて移植後 1、2、3、4 週に行った。

*現在の所属：国立循環器病研究センター 心臓外科

結　果

1. ラミニン 221 が iPS 由来心筋細胞に与える影響の評価

1)　iPS 由来心筋細胞運動能の検討

ラミニン 221 にてコーティングした培養皿上で培養した iPS 由来心筋細胞をラミニン 221 群、通常通り培養した iPS 由来心筋細胞を Control 群とする。ラミニン 221 群では iPS 由来心筋細胞の脈拍数の有意な低下、収縮速度と拡張速度の有意な上昇が認められた（図 1）。

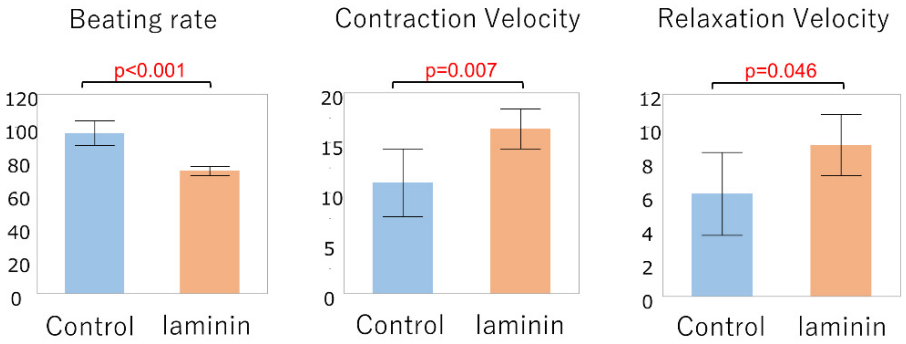


図 1.　iPS 由来心筋細胞運動能の検討

laminin 群では有意に脈拍数低下し、収縮速度、拡張速度が有意に上昇している。

2 群間の比較は Wilcoxon signed-rank test で行った。

2)　ミトコンドリア機能への影響の検討

ラミニン 221 群では最大呼吸機能が有意な増加を認めた（図 2）。

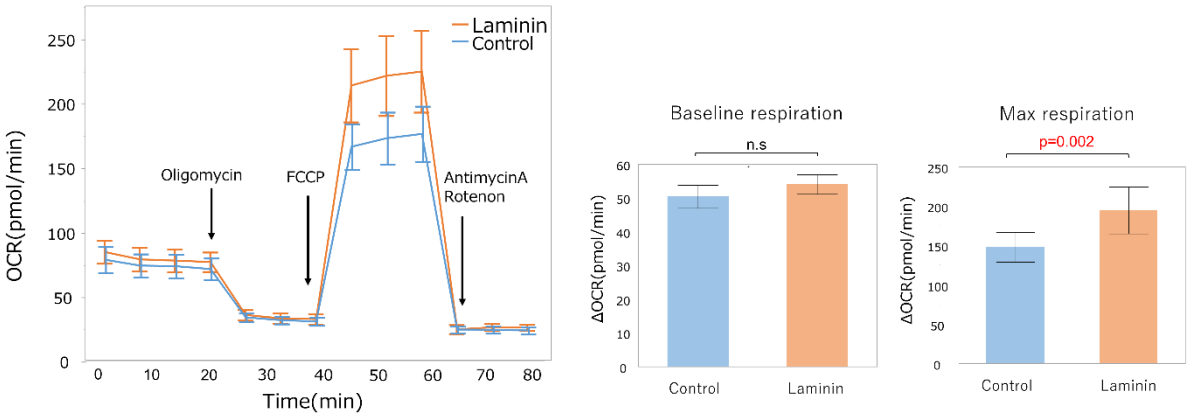


図 2.　iPS 由来心筋細胞におけるミトコンドリア機能の検討

laminin 群では有意に最大呼吸能が上昇している。

2 群間の比較は Wilcoxon signed-rank test で行った。

3)　低酸素負荷への耐性の検討

ラミニン群・Control 群を iPS 由来心筋細胞播種後に 2 日目から 4 日目まで低酸素条件負荷を加え、5 日目に細胞障害性、生存細胞の評価を行った。ラミニン 221 群で生存細胞数は有意に多く、細胞障害性（LDH 産生）は有意に低かった。低酸素負荷における iPS 由来心筋細胞の免疫染色では laminin 群で laminin の染色が強くなっており、laminin が結合する integrin からシグナルを受ける FAK の活性化を認めた（図 3）。

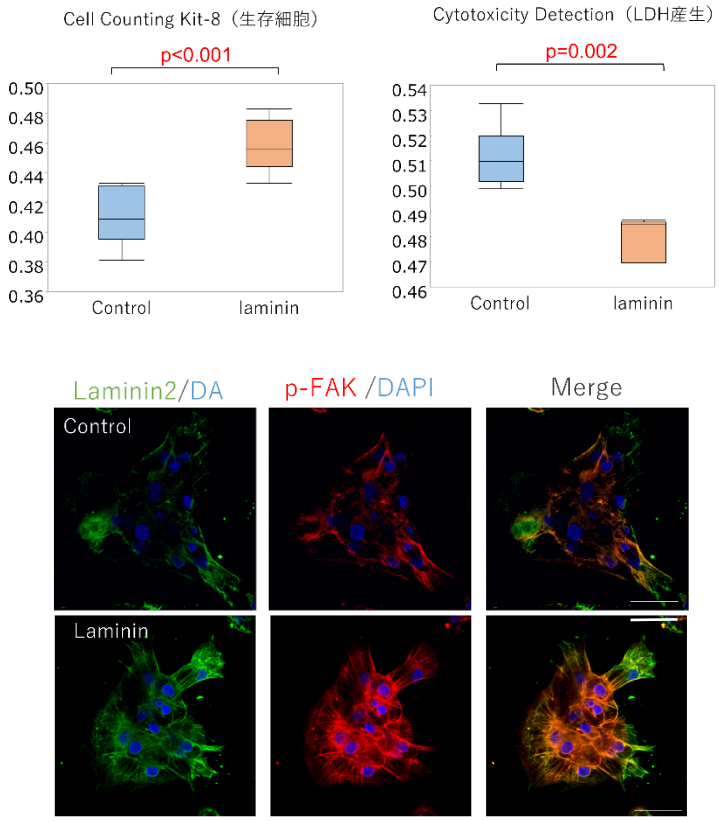


図 3.　低酸素負荷への耐性の検討

laminin 群では生存細胞が多く、細胞障害性が有意に低かった。

2 群間の比較は Wilcoxon signed-rank test で行った。

免疫染色では laminin 群で p-FAK の活性がより染色されていた。

スケールバー　＝　5 μm

4)　遺伝子発現の検討

ラミニン 221 にてコーティングした培養皿上で培養した iPS 由来心筋細胞と、通常通り培養した iPS 由来心筋細胞において構造・成熟などにかかわる遺伝子の発現、免疫染色を評価した（図 4）。

成熟した心筋構造タンパク質である MYH7 の発現増加、Ca チャネル遺伝子である RYR2 と CACNA1C の発現増加、またミトコンドリア増殖促進遺伝子である PPARGC1 の発現増加を認めた。

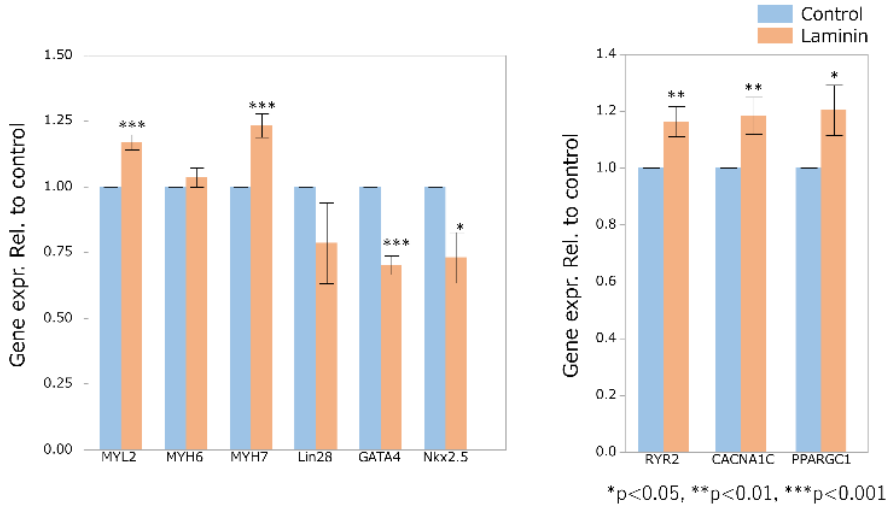


図 4. laminin による iPS 由来心筋細胞の遺伝子発現の解析

laminin 群では構造に関連する遺伝子、Ca チャネル、ミトコンドリア関連遺伝子の発現が増加

2 群間の比較は Wilcoxon signed-rank test で行った。

2. ヌードラットを用いた心筋梗塞モデルへの人工的 ECM 付加心筋組織移植による影響評価

人工的 ECM 付加心筋組織の作製は、ラミニン 221 にフィブリンと iPS 由来心筋細胞を加えることで行った。ヌードラットを用いて左前下行枝を結紮することで心筋梗塞モデルを作製、その 2 週間後にラミニン 221 付加を iPS 由来心筋組織を梗塞心に移植したラミニン群と iPS 由来心筋組織のみを移植した心筋組織移植群とフィブリンシートを移植した Control 群における心機能を心エコー検査にて比較した。移植後 4 週間目においては ECM 付加心筋組織群が有意に心機能の改善を認めた。(図 5)

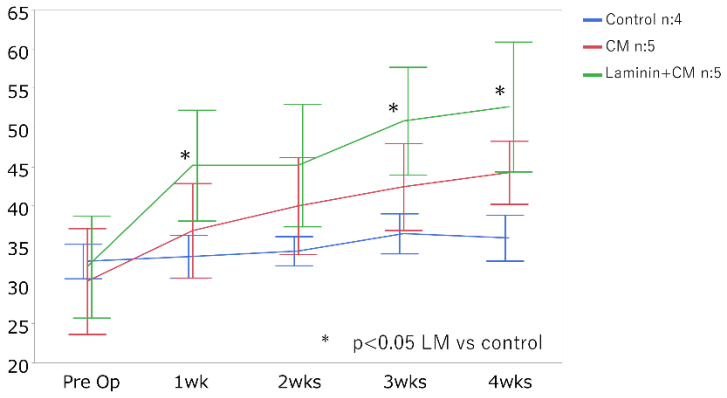


図 5. 心筋梗塞モデルにおけるラミニン付加 iPS 由来心筋組織移植群とコントロール群の左室駆出率

ラミニン群では Control 群と比較して有意に左室駆出率の改善を認めた。

統計解析は Tukey-Kramer HSD 解析を使用。

考　察

本研究の結果からは、ラミニン 221 により iPS 由来心筋細胞は、運動機能、ミトコンドリア機能、低酸素条件への耐性が向上する可能性が示唆された。また、ラミニン 221 により心筋細胞の成熟・ミトコンドリア、Ca チャネル関連遺伝子発現が増加した。一方、ラミニン 221 とフィブリンを用いて作製した人工的 ECM を付加した iPS 由来心筋組織による心筋梗塞モデルヌードラットの移植後心機能の改善を認めた。

ECM がインテグリンに結合することにより、Focal adhesion（FA）蛋白複合体を形成、アクチン重合を引き起こし、最終的にアクチンミオシンストレスファイバーの形成することで ECM と細胞内環境の繋がりが形成される。その過程で、ECM とインテグリンが結合することで生じる細胞の変形が細胞の成熟、成長、生存に寄与する可能性が報告されている［6］。今回の研究においてもラミニン群において、構造、成熟遺伝子の発現の増加を認めており、また iPS 由来心筋細胞の運動能の向上も認めている。ラミニンとインテグリンの結合による細胞内環境への変化がこれらの誘因になったと考えられる、今後はこのラミニンを付加した後、ラミニンの作用を阻害する物質を加えることでこれらの作用を抑えられるか評価を考慮している。

また、今回の研究ではラミニンの付加により低酸素への耐性が上がることが示された。これまでの報告では、FAK の活性化が虚血心筋でのアポトーシスの抑制を引き起こし、虚血への耐性を得ることが示されている［7］。本研究では低酸素負荷後の免疫染色において、ラミニン群で FAK のリン酸化が増強されており、さらに生存細胞の増加、細胞障害性の低下を認めたことは、ラミニンがインテグリンに結合し、FAK を活性化させたと考えられ、これまでの報告に一致する。低酸素負荷において、ラミニンがアポトーシス関連遺伝子の発現への影響を及ぼすかについて現在追加実験を行っているところである。

また、ラミニン 221 とフィブリンを用いて作製した人工的 ECM を付加した iPS 由来心筋組織を、心筋梗塞モデルヌードラットへの移植実験においては、コントロール群（フィブリンのみ移植群）と比べて移植後有意に心機能改善を認めてる。ラミニンを付加していない iPS 由来心筋細胞のみ移植した群と比較するとラミニン群で有意差は認めないものの、心機能の改善がより良くなる傾向を認めている。ラミニン付加群でより強いパラクライン効果を引き起こした可能性も考えられ、傍梗塞部位や遠隔部位での発現遺伝子の差について検討を予定している。また、ECM 付 iPS 由来心筋組織がより移植後生着しやすかった可能性も考え、生着に関する追加研究を予定している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学蛋白質研究所細胞外マトリックス研究室の関口清俊である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, et al. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. Circulation. 2012;126(11 Suppl 1):S29-37. Epub 2012/09/22. doi: 10.1161/circulationaha.111.084343. PubMed PMID: 22965990.

2） Miyagawa S, Fukushima S, Imanishi Y, Kawamura T, Mochizuki-Oda N, Masuda S, et al. Building A New Treatment For Heart Failure-Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cells into the Heart. Curr Gene Ther. 2016;16(1):5-13. Epub 2016/01/21. PubMed PMID: 26785736.

3） Papadaki M, Bursac N, Langer R, Merok J, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001;280(1):H168-78. Epub 2000/12/21. doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.1.H168. PubMed PMID: 11123231.

4) Nishiuchi R, Takagi J, Hayashi M, Ido H, Yagi Y, Sanzen N, et al. Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. Matrix Biol. 2006;25(3):189-97. Epub 2006/01/18. doi: 10.1016/j.matbio.2005.12.001. PubMed PMID: 16413178.

5) Israeli-Rosenberg S, Manso AM, Okada H, Ross RS. Integrins and integrin-associated proteins in the cardiac myocyte. Circ Res. 2014;114(3):572-86. Epub 2014/02/01. doi: 10.1161/circresaha.114.301275. PubMed PMID: 24481847; PubMed Central PMCID: PMCPMC3975046.

6) Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(1):75-82. Epub 2009/02/07. doi: 10.1038/nrm2594. PubMed PMID: 19197334.

7) Cheng Z, DiMichele LA, Hakim ZS, Rojas M, Mack CP, Taylor JM. Targeted focal adhesion kinase activation in cardiomyocytes protects the heart from ischemia/reperfusion injury. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32(4):924-33. Epub 2012/03/03. doi: 10.1161/atvbaha.112.245134. PubMed PMID: 22383703; PubMed Central PMCID: PMCPMC4237311.