

京都大学	博士（医学）	氏名	松尾 武彦
論文題目	Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells. (多能性幹細胞由来積層化心臓組織による梗塞心における細胞移植片の効率的な長期生着)		
(論文内容の要旨)			
<p>多能性幹細胞を用いた心筋再生治療は末期不全心に対する有望な治療手段になりうる多くの基礎研究により示されてきた。これまでマウス多能性幹細胞からの心臓構成細胞（心筋細胞、血管内皮細胞、血管壁細胞）の系統的分化誘導・純化法（<i>Nature</i> 2000; <i>FASEB J.</i> 2005）と温度感受性培養皿による細胞シート技術の併用により、心臓細胞を再構成した心臓組織シートを作製し、ラット亜急性期梗塞心への移植による心機能回復効果を示してきた（<i>Stem Cells</i> 2012）。</p> <p>一方、心臓領域でのシート移植を含めた細胞移植治療においては、移植細胞の長期生着効率は低く、移植後の心機能回復は主に血管新生などの間接的パラクライン効果によるものであるとされている。これらの課題の克服のために組織工学等の集学的技術融合が必要と考えられた。</p> <p>ゼラチンハイドロゲルは細胞培養基質や足場材料としての優れた特質を備えた生分解可能な生体材料であり、培養細胞凝集体に十分な量の酸素や栄養を補給し、細胞寿命を改善するとされる（<i>Acta Biomater.</i> 2011）。</p> <p>本研究では、より長期に生着可能かつ作業心筋としての直接効果が期待できる積層化心臓組織シートを効率的に作成するために、この生体材料に基づく技術を応用した。まず、マウス胚性幹細胞由来心臓組織シートにゼラチンハイドロゲル微粒子（GHM）を添加し、5層に積層化した。積層化シートの壁厚および生存細胞領域面積は（従来型の）GHM 添加なしシートに比し有意に大きかった。また最大 15 層（&gt;1mm）のシートが数時間で積層化可能となり、培養 1 週間後も <i>in vitro</i> で拍動継続が確認できた。</p> <p>次に、この GHM 添加 5 層積層化シートをラット亜急性期心筋梗塞モデルに移植（<math>2 \times 10^6</math> 細胞）したが、1 週間後の生着効率は GHM 添加なしシートに比し有意に改善した。シート移植 4 週間後の心臓超音波検査では左室収縮能が有意に改善し、無収縮領域長は有意に減少した。摘出標本の Masson trichrome 染色では、GHM 添加なしシートに比し、GHM 添加ありシートでは梗塞壁菲薄化軽減および線維化領域長減少が認められた。これらから GHM 添加積層化シートによる移植治療は、心筋梗塞後リモデリングの抑制に対して、従来型 GHM 添加なしシートに比べてより効果的であると考えられた。</p> <p>次に、摘出標本の蛍光免疫染色では多層化された移植片（0.8mm 厚、40 細胞層以上）が移植 3 か月後においても生着していることが確認できた。更にこの移植片は機能性毛細血管を保持していることも示すことができた。</p>			

最後に、移植片と宿主の電氣的結合を検討したが、移植前には個別の調律であった移植片である心臓組織シートと宿主であるラット心臓の心電図が移植後早期には同期していることが確認できた。

以上、ゼラチンハイドロゲル微粒子を添加することで、多能性幹細胞由来細胞シートの *in vitro* での多層積層化・組織化が可能となり、またラット亜急性期梗塞心への移植後の心機能回復、およびより効率的な移植細胞生着を実現した。更にこの機能回復がパラクラインによる間接的効果だけではなく移植心筋による直接的効果によるものである可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

心臓に対する細胞移植治療においては移植細胞の生着効率の低さの克服が課題である。

本研究では、より長期に生着可能な積層化心臓組織シートを作成するために、生体材料であるゼラチンハイドロゲル微粒子（GHM）に基づく技術を応用し、従来は達成困難であった多層積層化を目指した。マウス胚性幹細胞由来心臓組織シートに GHM を添加し、5 層に積層化した。積層化シートの壁厚および生存細胞領域面積は従来型の GHM 添加なしシートに比し有意に大きかった。また最大 15 層（>1mm）のシートが数時間で積層化可能となった。

この GHM 添加 5 層積層化シートをラット亜急性期心筋梗塞モデルに移植したところ、生着は有意に改善した。心臓超音波検査では左室収縮能が有意に改善し、無収縮領域長は有意に減少した。GHM 添加積層化シートは、心筋梗塞後リモデリングの抑制に対してより効果的であると考えられた。

摘出標本の蛍光免疫染色では多層化された移植片が移植 3 か月後においても生着していることが確認できた。さらに、宿主循環から移植片内新生血管へ血液供給があることも示すことができた。移植片と宿主の電氣的結合では、移植前には個別の調律であった移植片である心臓組織シートと宿主であるラット心臓の心電図が移植後早期には同期していることが確認できた。

以上の研究は心臓組織シート積層化法の開発および移植細胞生着効率向上に貢献し細胞移植による心筋再生医療の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 11 月 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降