

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	升 本 英 利
論文題目	Pluripotent stem cell-engineered cell sheets re-assembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte-mediated neovascularization （多能性幹細胞由来心臓構成細胞による心臓組織シートは心筋細胞を介する血管新生により梗塞心の機能増悪を寛解させる）		
（論文内容の要旨）			
【背景】 幹細胞を用いた心臓再生は不全心に対する有望な治療手段になりうると考えられるが、現行の心臓に対する幹細胞移植においては様々な分化段階および系統の細胞群が制御されずに多様に含まれており、そのことが幹細胞移植における細胞および分子メカニズムの正確な理解を困難にしている。今回マウス多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）から共通前駆細胞である Flk1 陽性中胚葉細胞を介して心臓構成細胞（心筋細胞 [CM]、血管内皮細胞 [EC]、血管壁細胞 [MC]）を系統的に分化誘導・純化する方法と、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、虚血心への移植効果を調べた。さらに構成細胞の種々の組み合わせにより予見的に作用機構の解析を行った。 【方法と結果】 マウス ES 細胞由来心臓構成細胞を誘導・純化した後、温度感受性培養皿上に播種することにより自己拍動性の心臓組織シートを作製した。フローサイトメトリーによりシートの細胞組成を評価した（CM: 40.2±8.5%, EC: 8.4±5.7%, MC: 51.4±9.2%, n=24）。同シートを in vitro で 3 層に積層化し、無胸腺ラット亜急性期心筋梗塞モデル（梗塞後 1 週間）に移植した。移植 4 週後の心臓超音波検査において、治療群での有意な心収縮能改善（短径駆出率[対照群対治療群]: 22.4±8.0 vs 36.2±7.6%, p<0.01, n=9）と無収縮域縮小（無収縮領域率[対照群対治療群]: 18.1±6.6 vs 1.9±4.6%, p<0.001, n=9）を認めた。心臓カテーテル検査で治療群での収縮末期左室弾性率の有意な高値を認めた（対照群対治療群: 8.8±2.2 vs 15.4±1.5 mmHg/μl, p<0.001, n=8）。組織学的検討により、治療群の線維化範囲縮小と梗塞壁菲薄化減少を認めた。移植 3 ヶ月後においてもこれらの効果は持続しており、シート移植が心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制した。種特異的 in situ hybridization により移植細胞を追跡したところ、比較的早期（移植後 4 週以内）に大部分のグラフトが失われていることが示され、この心機能回復には移植心筋の直接的貢献よりも、パラクライン効果などの間接的効果が寄与していると考えられた。虚血部位の血管新生は治療群において有意に促進されており、特に移植心筋細胞周囲に著明であった。種々の血管新生促進因子のうち血管内皮細胞増殖因子が主に心臓組織シート内の CM から産生されており、その産生は EC の共存により促進された。CM が含まれない組織シート(EC/MC シート) 移植では、CM を含む組織シート移植で認められた血管新生促進効果および心機能回復が失われ、心臓組織シート移植の治療効果には CM が必須であった。CM を含む組織シートでは、抗アポトーシス・細胞外マトリクス調節など様々な役割を担う種々のサイトカイン mRNA 発現が EC/MC シートに比し増加していた。 【結語】 多能性幹細胞由来心臓組織シート移植は心臓再生治療、特に亜急性期心筋梗塞治療において効果的な手段になりうる。CM は血管新生を主とした種々のパラクライン効果により、心臓細胞治療において中心的な役割を果たす。CM を心臓組織として虚血部位に供給するというコンセプトは、今後の心臓細胞治療において重要な戦略基盤となりうる。			

（論文審査の結果の要旨） 現行の心臓幹細胞移植では様々な分化段階及び系統の細胞群が制御されずに多様に含まれており、幹細胞移植におけるメカニズムの理解を困難にしている。本研究では、マウス多能性幹細胞から心臓構成細胞（心筋細胞[CM]、血管内皮細胞[EC]、血管壁細胞[MC]）を系統のかつ制御下に分化誘導・純化する方法と、温度感受性培養皿による細胞シート技術の併用により、上記3種細胞の再構成による心臓組織シートを作製し、虚血心への移植効果を調べた。さらに構成細胞の種々の組み合わせにより予見的に作用機構解析を行った。 シートを無胸腺ラット亜急性期心筋梗塞モデルに移植した結果、治療群で心収縮能改善を認めた。移植細胞は早期に大部分が失われ、心機能回復にはパラクラインなどの間接的効果の寄与が考えられた。虚血部位の血管新生は治療群で促進された。種々の血管新生促進因子のうち血管内皮細胞増殖因子が主に心臓組織シート内の CM から産生された。CM が含まれないシート(EC/MC シート) 移植では、CM を含むシート移植で認められた血管新生促進および心機能回復が失われ、心臓組織シート移植の治療効果には CM が必須であった。CM を心臓組織として虚血部位に供給するというコンセプトは、今後の心臓細胞治療において重要な戦略基盤となりうる。 以上の研究は心臓幹細胞治療メカニズムの解明に貢献し、幹細胞移植による心臓再生医療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 24 年 7 月 17 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。
--