

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10209

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を用いた心臓再生治療に伴う不整脈抑制に関する研究

研究課題名(英文) Investigation for the attenuation of arrhythmia related to human iPS cell-based cardiac regenerative therapy

研究代表者

阪口 仁寿 (Sakaguchi, Hisashi)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40743026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミニブタ心筋梗塞モデルへのヒトiPS細胞由来心臓組織シート移植後のホルター心電図にて、偽手術群では心室頻拍の出現を認めただけに対し、移植群では致死性不整脈の発生は認めなかった。致死性不整脈のマーカーであるQT間隔のばらつきについては、移植後1週でシート移植群での低値を認めた。iPS細胞を用いた心臓再生医療の安全性をヒトに近い心拍数を持つミニブタを用いて示した。またヒトiPS細胞心臓組織シートにおいて、不整脈誘発薬剤投与に伴う致死性不整脈であるTorsade de Pointesの発生を示すことができた。これらの成果は、iPS細胞を用いた心臓再生医療における不整脈発生に関する基礎的知見を与えうる。

研究成果の概要(英文)：The Holter ECG after human iPS cell-derived cardiac tissue transplantation showed no occurrence of lethal arrhythmia whereas there was the occurrence of ventricular tachycardia in sham group pigs after induction of myocardial infarction. The variability of QT interval is known to be a marker of arrhythmia and was lower in cell sheet transplantation group compared to that in sham group. Here we showed the safety of human iPS cell-based cardiac regenerative therapy using pigs with similar heart rate with human. We also showed the occurrence of Torsade de Pointes which is known to be a lethal arrhythmia after administration of already known cardiotoxic drugs. Here we showed a basis of the occurrence of arrhythmia related to human iPS cell-based cardiac regenerative therapy.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：iPS細胞 心筋梗塞 重症心不全 致死性不整脈 ホルター心電図 マイクロミニピッグ

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞を用いた心臓再生治療は拡張型心筋症や虚血性心筋症を背景とした末期心不全患者に対する有効な治療法として期待されるが、この新規治療法を実現するためには、有効性に加えて安全性を示すことが前臨床段階において重要である。本治療において起こりうる問題点として、分化誘導・移植された細胞によって致命的な不整脈を惹起する可能性があることが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生治療における治療後致死性不整脈の発生について、中動物病態モデルおよび心臓安全性評価システムを用いて評価し、安全性のより高いヒト iPS 細胞由来心臓構成細胞の細胞生物学的・組織学的構造について包括的に検討する。

3. 研究の方法

【ミニブタ心筋梗塞モデルを用いた iPS 細胞由来心臓構成細胞移植による不整脈評価実験(in vivo)】

冠動脈左前下行枝結紮によりミニブタ心筋梗塞モデルを作成し、ヒト iPS 細胞由来心臓構成細胞シート(Masumoto, Sci Rep 2014)を梗塞部表面と、梗塞部と非梗塞部との境界域表面にわたって貼付する。移植を行わない sham 群も同数作成する。心機能を心臓超音波検査(2 週毎)および心臓右心カテーテル検査(4 週毎)にて比較する。同時にホルター心電図検査を行い、不整脈の発生の有無、頻度、時期を解析する。一心拍毎の QT 間隔のばらつき (Beat to beat repolarization variability:BVR) を定量化 (Short term variability:STV) し、比較評価する。組織学的に生着したシートの有無 (HNA 染色)、血管新生の有無 (vWF 染色)、電気的結合の有無を評価する。移植後 8 週にてプログラム電気刺激 (Programming Electronic Stimulation:PES) を行い、致命的な不整脈誘発の有無を評価する。

【iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化メカニズム解析(in vitro)】

血管内皮細胞や血管壁細胞の存在と、細胞間電子伝達機構の構築の関連性を検証する。即ち、iPS 細胞由来心筋細胞 (CM) のみで作成したシートと、血管内皮細胞、血管壁細胞 (Vascular cells; VC) を含む iPS 細胞由来心臓構成細胞シートを電気生理学的、分子生理学的に比較検討し、成熟化のメカニズム解析、細胞間相互作用の解析を行う。

【ヒト iPS 細胞由来心臓組織シートにおける不整脈源性に関する検討(in vitro)】

ヒト iPS 細胞から心筋細胞と CD90 陽性間質細胞をそれぞれ分化誘導し、混合ののち温度

感受性培養皿にて培養することで、ヒトの拡張型心筋症の心臓組織を模した心臓組織シートを作製する。このシートに対し、代表的な IKr チャネル阻害剤である E-4031 あるいはその他の既知の不整脈誘導性の薬剤を投与し、不整脈の発生およびそのメカニズムについて検討する。

4. 研究成果

【ミニブタ心筋梗塞モデルを用いた iPS 細胞由来心臓構成細胞移植による不整脈評価実験(in vivo)】

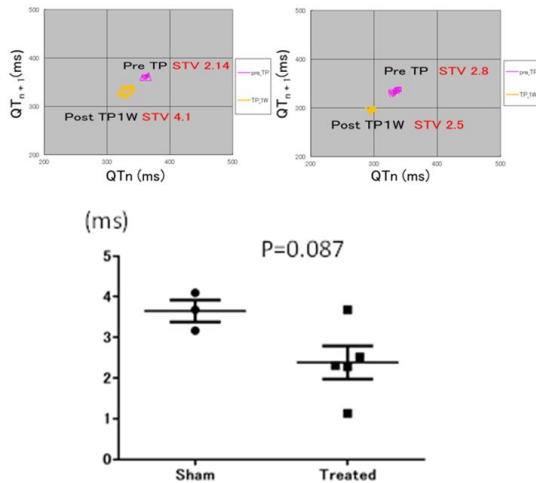
心エコーで移植後 8 週において、左室内径短縮率は偽手術群と比較し、有意に改善を認めた。ホルター心電図にて偽手術群は 2 例の個体で致命的な不整脈の一つである心室頻拍 (VT) の出現を認めたが、シート移植群はすべての個体で VT の出現はなかった。致命的な不整脈発生のサロゲートマーカーである 1 心拍毎の QT 間隔のばらつきを定量化 (STV) し、比較したところ、1 週後の STV は偽手術群と比較し、シート移植群にて低い傾向を認めた (図 1)。またプログラム電気刺激 (心室頻回刺激法) を行い、致命的な不整脈誘発の有無を評価したところ、偽手術群 2 例、シート移植群 2 例にて VT が誘発された (有意差なし)。以上により、ヒト iPS 細胞由来心臓組織シートは、不整脈リスクを増大させることなく、ブタ心筋梗塞モデルの心機能を回復させたことを示した。iPS 細胞を用いた心臓再生治療の安全性をヒトに近い心拍数をもつミニブタの心筋梗塞モデルを用いて電気生理学的評価を行い、安全性の一端を示すことができた。

【iPS 細胞由来心筋細胞の成熟化メカニズム解析(in vitro)】

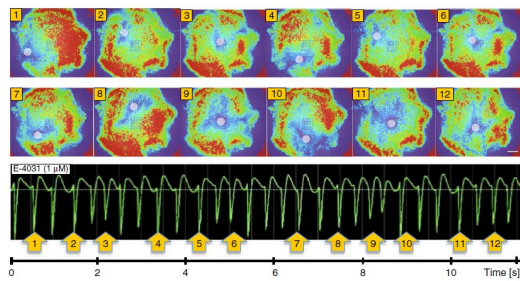
ヒト iPS 細胞から誘導した心筋細胞と間質細胞をそれぞれ混合してシート化したのち、細胞外多電極電位測定装置を用いて不整脈解析を行ったところ、臨床的に QT 延長を示す E-4031 の高濃度負荷にて、一定以下の心筋細胞の割合のシートでよりリエントリー型不整脈が多発することを示した。

【ヒト iPS 細胞由来心臓組織シートにおける不整脈源性に関する検討(in vitro)】

ヒト iPS 細胞から誘導した心筋細胞と間質細胞をそれぞれ混合したシートにおいて、細胞外多電極電位測定装置およびモーションベクターによる二次元細胞動態解析により、不整脈誘発が知られている薬剤投与に伴う、代表的なリエントリー型致死性不整脈である Torsade de Pointes の発生を示すことができた (Kawatou, Nat Commun 2017) (図 2)。これらの成果は、iPS 細胞を用いた心臓再生医療における不整脈発生に関する基礎研究的基盤知見を与えるものであり、不整脈抑制戦略にとって大変重要な成果であるといえる。



(図1: 偽手術群(左上)および治療群(右上)における手術1週後のSTV)



(図2: ヒトiPS細胞由来心臓組織シートによる致死性不整脈; Torsade de Pointesの再現)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Matsuo T, Masumoto H, Tajima S, Ikuno T, Katayama S, Minakata K, Ikeda T, Yamamizu K, Tabata Y, Sakata R, Yamashita JK. Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2015;5:16842.
2. Funamoto M, Masumoto H, Takaori K, Taki T, Setozaki S, Yamazaki K, Minakata K, Ikeda T, Hyon SH, Sakata R. Green Tea Polyphenol Prevents Diabetic Rats From Acute Kidney Injury After Cardiopulmonary Bypass. *Ann Thorac Surg*. 2016;101:1507-1513.
3. Masumoto H, Nakane T, Tinney JP, Yuan F, Ye F, Kowalski WJ, Minakata K, Sakata R, Yamashita JK, Keller BB. The myocardial regenerative potential of three-dimensional engineered cardiac

tissues composed of multiple human iPS cell-derived cardiovascular cell lineages. *Sci Rep* 2016;6:29933.

4. Kawatou M, Masumoto H, Fukushima H, Morinaga G, Sakata R, Ashihara T, Yamashita JK. Modelling Torsade de Pointes arrhythmias in vitro in 3D human iPS cell-engineered heart. *Nat Commun*. 2017;8:1078.

[学会発表](計 10 件)

1. Takayuki Aoki, Hidetoshi Masumoto, Hiroshi Ohara, Yuji Nakamura, Hiroko Izumi-Nakaseko, Kentaro Ando, Takeshi Ikuno, Masahide Kawatou, Masanosuke Ishigami, Kenji Minakata, Tadashi Ikeda. Transplantation of Genomic Integration-free Human iPS Cell-derived Cardiac Tissue Sheets into Porcine Infarct Hearts Produced No Lethal Arrhythmia: A Preclinical Study for a Safer Human iPS Cell Therapy. American Heart Association scientific sessions 2015. 2015-2016年
2. 青木隆之、升本英利、南方謙二、池田 義、坂田隆造. ヒトiPS細胞由来心臓組織シート移植はブタ心筋梗塞モデルにおいて不整脈リスクを増大させることなく心機能を改善する. 第15回日本心臓血管外科再生治療研究会. 2015-2016年
3. 升本 英利, 中根 武一郎, Joseph Tinney, 南方 謙二, 坂田 隆造, 山下 潤, Bradley Keller. ヒトiPS細胞由来心臓構成細胞を含む三次元人工心筋組織移植による心筋再生についての検討. 第37回日本炎症・再生医学会. 2016-2017年
4. 升本 英利, 中根 武一郎, 南方 謙二, 池田 義, 坂田 隆造. ヒトiPS細胞由来心筋細胞および血管構成細胞を含む三次元人工心筋組織による心筋再生についての検討. 第69回日本胸部外科学会定期学術集会. 2016-2017年
5. Masumoto H, Nakane T, J P. Tinney, F Yuan, F Ye, W J. Kowalski, Minakata K, Sakata R, Yamashita JK, B B. Keller. Therapeutic potential of human iPS cell-derived engineered cardiac tissue including cardiomyocytes and multiple vascular lineages for myocardial infarction. International Society for Stem Cell Research(ISSCR). 2016-2017年
6. Masumoto H. Invited Oral session Bioengineered cardiac cell sheets. AHA American Heart Association (招待講演). 2016-2017年
7. Kawatou M, Masumoto H, Sakata R,

- Ashihara T, Yamashita J.K.. Human iPS cell-engineered heart tissue to reproduce drug-induced torsade de pointes in vitro. 第 81 回日本循環器学会学術集会. 2016-2017 年
8. Kawatou M, Masumoto H, Fukushima H, Morinaga G, Sakata R, Ashihara T, Yamashita J.K. Human iPS cell-derived cardiac tissue to reproduce “Torsade de Pointes” arrhythmia in vitro. European Society of Cardiology Congress 2017. 2017-2018 年
9. Hirao S, Masumoto H, Nishio H, Kawatou M, Li Z, Kanemitsu H, Ueyama K, Yamazaki K, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K., Minatoya K. The therapeutic potential of human iPS cell-derived cardiac tissue onto a porcine myocardial infarction model. American Heart Association 2017. 2017-2018 年
10. Kawatou M, Masumoto H, Fukushima H, Morinaga G, Ashihara T, Yamashita J.K. In vitro Torsade de Pointes arrhythmia model with 3D human iPS cell-engineered heart tissue. American Heart Association 2017. 2017-2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://kyoto-cvs.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口仁寿 (SAKAGUCHI HISASHI)

京都大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号：40743026

(2) 研究分担者

池田 義 (IKEDA TADASHI)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40281092

杉山 篤 (SUGIYAMA ATSUSHI)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：60242632

(3) 連携研究者

山下 潤 (YAMASHITA JUN)
京都大学・その他部局等・教授
研究者番号：50335288

(4) 研究協力者

升本英利 (MASUMOTO HIDETOSHI)
京都大学・大学院医学研究科・特定助教
研究者番号：70645754