

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：15K10210

研究課題名(和文) 心筋再生治療を目指したヒトiPS細胞由来集学的多層組織化移植片の構築

研究課題名(英文) Development of human iPS cell-derived multidisciplinary thick viable organized tissues aiming for myocardial regenerative therapy

研究代表者

中田 朋宏 (Nakata, Tomohiro)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00559685

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)：本研究課題において、ヒトiPS細胞由来多層積層化心臓組織を作製する技術を確立した。積層体をミニブタ亜急性期心筋梗塞モデル、慢性期心筋梗塞ラットモデルおよび拡張型心筋症ハムスターモデルに移植することにより、機能回復を示した。組織学的検討により、線維化抑制・血管新生・アポトーシス抑制・心筋細胞肥大抑制などの治療メカニズムを示した。また、京都大学iPS細胞研究所で確立された医療グレードのiPS細胞を用いて心臓細胞シートを作成する条件および積層化法を最終的に確定した。これらはiPS細胞由来心血管系細胞多層体の治療効果およびメカニズムの一端を示すもので、iPS細胞心臓再生医療における基礎基盤となりうる。

研究成果の概要(英文)：We established a technology to generate human iPS cell-derived thick viable cardiac tissues. We validated the therapeutic potential of the tissues for porcine sub-acute myocardial infarction model, rat chronic myocardial infarction model and hamster dilated cardiomyopathy model. Histological studies revealed the therapeutic mechanisms including the attenuation of fibrosis, angiogenesis, the attenuation of apoptosis and cardiomyocyte hypertrophy. We also established the method to generate cardiac tissue sheets and thick viable tissues from clinical-graded stock human iPS cells from Center for iPS cell Research and Application, Kyoto University. These results including the validation of the therapeutic effects of the bioengineered tissue and the therapeutic mechanism would serve as a basis for 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 バイオエンジニアリング 心臓再生

1. 研究開始当初の背景

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心臓移植に代わる治療法になり得るとして注目を集めているのが細胞移植・各種増殖因子投与などの再生医療である。これまでの臨床試験では、いずれの報告においても単独治療としての効果はまだ十分に示されているとはいえない。

2. 研究の目的

より効果的な細胞移植治療を確立するべく、ヒト iPS 細胞からの心臓構成細胞（心筋細胞・血管内皮細胞・血管壁細胞など）の効率的な多量分化誘導、温度感受性培養皿を用いた細胞シート工学およびゼラチンハイドロゲルを用いた細胞生着促進効果およびサイトカイン徐放効果を併用し、移植に適した集学的な多層組織化移植片を開発し、動物実験により、再生心筋補充による心機能回復を図ることを確認する。

3. 研究の方法

【マウス ES 細胞由来心臓細胞シートを用いた積層化・移植片作成実験】

マウス ES 細胞から心臓構成細胞を分化誘導し、温度感受性培養皿にて4日間培養を行うことにより、自己拍動性心臓細胞シートを作成する。培養皿に細胞シートを静置し、培地吸引・保湿下培養にて接着・固定させる。その後ゼラチンハイドロゲル微粒子をシート上に塗布し、次層の細胞シートを積層、再度培地吸引・保湿下培養にて1・2層シート間を接着・固定させる。これを5層以上50層未満（100～1,000 μm 相当）にて繰り返す。至適ゼラチン微粒子の条件を検討するため、粒子径など条件を変えたものを同時に行う。コントロールとしてゼラチンハイドロゲル微粒子投与を行わない積層化群を作成する。培地下に培養を継続、拍動の有無・シートの厚みおよび細胞成分量（HE 染色）・細胞外マトリクス形成（マッソン・トリクローム染色）・アポトーシス（TUNEL 染色）・血管網形成（vWF 染色）につき評価し、至適ゼラチンハイドロゲルの条件を決定する。免疫不全マウス皮下に、上記にて決定した至適条件による積層化細胞シート（移植片）を移植し、生着しうるかを検討する。

【ヒト iPS 細胞由来心臓細胞シートを用いた積層化・移植片作成実験】

上記と同様の検討を、ヒト iPS 細胞から作成した細胞シートを用いて行う（Masumoto, Sci Rep 2014 の方法により細胞シートを作製する）。

【小動物心疾患モデルへのマウス ES 細胞由来多層組織化移植片の移植実験】

免疫不全ラット左下行枝結紮による虚血性心筋症モデルラットを作製し、マウス ES 細胞

由来多層組織化移植片を梗塞部心臓表面に貼付移植する。移植を行わない Sham 群も同数作製する。移植後4週以降12週までの心機能を心臓超音波検査にて比較する。観察後に犠牲死させ、組織学的に生着した新生心筋層の有無（Hoechst による移植前核染色）、血管新生（vWF 染色）・アポトーシス（TUNEL 染色）等パラクライン効果の程度の有無を評価する。同様の実験を、慢性心筋梗塞モデルラットおよびハムスター拡張型心筋症モデルについても行う。

【中動物疾患モデルへのヒト iPS 細胞由来多層組織化移植片の移植実験】

マイクロミニプタ前下行枝へのアメロイドコンストリクター装着によりプタ心筋梗塞モデルを作製し、上記ラットの実験より大型の（より大きな温度感受性培養皿を用いて作成した）ヒト iPS 細胞由来多層組織化移植片を移植する。実験群はラット実験と同様に設定する。移植前後に十分な免疫抑制を行う。移植後4週までの心機能を心臓超音波検査にて比較する。移植後4週にて犠牲死させ、組織学的に生着した新生心筋層の有無（Ku80 染色）、血管新生（vWF 染色）・アポトーシス（TUNEL 染色）等パラクライン効果の程度の有無を評価する。

4. 研究成果

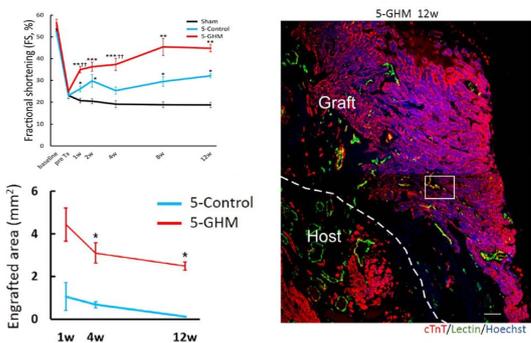
マウス ES 細胞を用いた心臓細胞シートの積層体の条件検討の結果、20-32 μm 径のゼラチン微粒子を使用した際に、最も高い細胞生存効果を示すことがわかった。この積層体をラット亜急性期心筋梗塞モデルに移植したところ、ゼラチン微粒子なしの移植と比較して、著明な心機能改善効果および生着促進効果を示した（図1）。

続いて、ヒト iPS 細胞由来組織化心臓組織シートの慢性期心筋梗塞ラットモデルおよび拡張型心筋症ハムスターモデルへの移植による機能回復効果を調べた。ヒト iPS 細胞から心臓構成細胞（心筋細胞、血管内皮細胞、血管壁細胞）を、心筋及び内皮細胞同時分化誘導方法（Masumoto, Sci Rep 2014）にて分化誘導を行い、誘導から15日目に細胞を回収し、温度感受性培養皿に播種し、心臓組織シート作成を図った。温度感受性培養皿にて4日間培養して完成した心臓組織シートとゼラチンハイドロゲル微粒子を用いて積層化を行った。ラット慢性期心筋梗塞モデルには15層シートを1枚心筋梗塞領域に貼付した。ハムスター心筋症モデルには5層シートを左室全体に貼付した。貼付後は定期的に心臓超音波検査にて心機能をフォローしたが、ラットモデルは梗塞領域の縮小化と心機能の改善を認め、ハムスターにおいては進行性に増悪する心機能低下を抑制することができた（図2）。

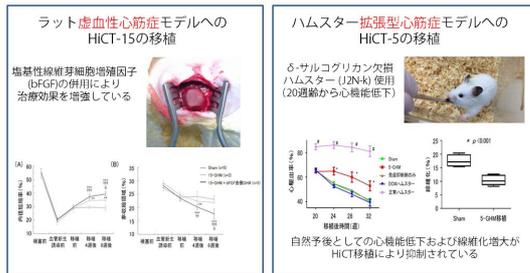
さらに、マイクロミニプタ亜急性期モデルに対する多層体移植実験を行った。プタ亜急性

期心筋梗塞モデルでは 10cm の温度感受性培養皿で作製したシートを 5 層に積層し、4 つの積層体を心筋梗塞領域に貼付した。その結果、梗塞領域の縮小化と心機能の改善を認めた(図 3)。

一方、京都大学 iPS 細胞研究所では HLA (Human Leukocyte Antigen : ヒト白血球型抗原) ホモ接合体ドナーから提供された細胞から iPS 細胞 (HLA ホモ iPS 細胞) を構築しており、それを臨床応用する方向で貯蓄を進めている。上記分化誘導法を用いて HLA ホモ iPS 細胞からも心臓構成細胞を分化誘導し、温度感受性培養皿で心臓組織シートを作製することに成功した。

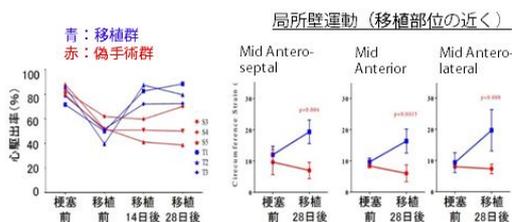


(図 1 : マウス ES 細胞由来積層体の移植による心機能改善効果 (左上 : 赤が積層体) および生着効果 (左下および右))



(図 2 : ラット慢性期心筋梗塞モデル (左) およびハムスター拡張型心筋症モデル (右) へのヒト iPS 細胞由来多層体移植による治療効果)

ミニブタ亜急性期心筋梗塞モデルへの HiCT-5 の移植



(図 3 : マイクロミニブタへの多層体移植による心機能回復効果)

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 5 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. Setozaki S, Minakata K, Masumoto H, Hirao S, Yamazaki K, Kuwahara K, Ikeda T, Sakata R. Prevention of abdominal aortic aneurysm progression by oral administration of green tea polyphenol in a rat model. *J Vasc Surg.* 2017;65:1803-1812.
4. Taki T, Masumoto H, Funamoto M, Minakata K, Yamazaki K, Ikeda T, Sakata R. Fetal mesenchymal stem cells ameliorate acute lung injury in a rat cardiopulmonary bypass model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2107:153:726-734.
5. Nakane T, Masumoto H, Tinney JP, Yuan F, Kowalski WJ, Ye F, LeBlanc AJ, Sakata R, Yamashita JK, Keller BB. Impact of Cell Composition and Geometry on Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Engineered Cardiac Tissue. *Sci Rep.* 2017;7:45641.

(学会発表)(計 21 件)

1. Masumoto H, Ishigami M, Aoki T, Takai F, Ikuno T, Kawatoh M, Minakata K, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK. Cardiac tissue sheet including human iPS cell-derived cardiomyocytes and vascular cells restores impaired left ventricular systolic function of infarcted porcine hearts: a preclinical study. *European Society of Cardiology (ESC) Congress.* 2015-2016 年

2. 南方 謙二, 升本 英利, 池田 義. 心臓血管領域における再生治療の展望. 第 37 回日本炎症・再生医学会. 2016-2017 年
3. 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
4. 瀧本 真也, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 坂田 隆造. 拡張型心筋症ハムスターに対するヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植の有効性. 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2016-2017 年
5. 中根 武一郎, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 坂田 隆造. ヒト iPS 細胞由来心筋・血管系細胞を用いた移植用大型心臓パッチの開発. 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2016-2017 年
6. 李 子澎, 升本 英利, 南方 謙二, 川東 正英, 瀧本 真也, 平間 大介, 平尾 慎吾, 池田 義, 坂田 隆造. Combined transplantation of human iPS cell-derived cardiac tissue sheets and sustained-release of bFGF improved left ventricular function in a rat chronic myocardial infarction model. 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2016-2017 年
7. Nakane T, Masumoto H, Tinney JP, Kowalski WJ, Minakata K, Ikeda T, Sakata R, Yamashita JK, Keller BB. Impact of geometry and cell density on structural and functional maturation in large-format mesh engineered cardiac tissues. American Heart Association. 2016-2017 年
8. Li Z, Masumoto H, Minakata K, Kawatou M, Takimoto S, Hirao S, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita JK, Sakata R. Sequential treatment with sustained-release of basic fibroblast growth factor followed by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue improved left ventricular function in a rat chronic myocardial infarction model. American Heart Association. 2016-2017 年
9. Masumoto H, Yamamizu K, Ikuno T, Takakubo H, Minakata K, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K. A technology for cardiac regeneration using human iPS cell-derived cardiac tissue including multiple cardiovascular lineages. American Heart Association. 2016-2017 年
10. Takimoto S, Masumoto H, Minakata K, Tabata Y, Yamashita J.K. The efficacy of transplantation of human iPS cell derived cardiac tissue for dilated cardiomyopathy hamster model. American Heart Association. 2016-2017 年
11. 平尾 慎吾, 南方 謙司, 升本 英利, 瀧本 真也, 坂本 和久, 中津 太郎, 中田 朋宏, 山崎 和裕, 池田 義, 湊谷 謙司, 坂田 隆造. Spring-8 における位相差 CT による拡張型心筋症ハムスターに対する立体的組織評価の確立. 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会. 2016-2017 年
12. 李 子澎, 升本 英利, 南方 謙二, 川東 正英, 瀧本 真也, 平尾 慎吾, 池田 義, 坂田 隆造, 湊谷 謙司. 慢性期ラット心筋梗塞に対する bFGF 徐放後ヒト iPS 由来心筋組織シート移植の治療効果. 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会. 2016-2017 年
13. 瀧本 真也, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 湊谷 謙司. 拡張型心筋症ハムスターに対するヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植の有効性. 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会. 2016-2017 年
14. 中根 武一郎, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 湊谷 謙司. ヒト iPS 細胞由来心筋・血管系細胞を用いた移植用網目状心臓組織パッチの開発. 第 47 回日本心臓血管外科学会学術総会. 2016-2017 年
15. 中根 武一郎, 升本 英利, 池田 義, 湊谷 謙司, 山下 潤, Bradley B. Keller. ヒト iPS 細胞由来心筋・血管系細胞を用いた移植用網目状心臓組織パッチの開発. 第 16 回日本心臓血管外科再生治療研究会. 2016-2017 年
16. Nakane T, Masumoto H, Minakata K, Ikeda T, Minatoya K, Yamashita JK, Sakata R. Mesh-shaped engineered cardiac tissue generated from human iPS cell for cardiac regeneration. 第 81 回日本循環器学会学術集会. 2016-2017 年
17. 瀧本 真也, 升本 英利, 南方 謙二, 池田 義, 湊谷 謙司, 坂田 隆造, 山下 潤. Transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue ameliorates heart failure in dilated cardiomyopathy of hamster model. 第 81 回日本循環器学会学術集会. 2016-2017 年
18. Hirao S, Minakata K, Masumoto H, Takimoto S, Hoshino M, Yagi N, Shirai M, Minatoya K, Sakata R. Three-dimensional visualization and morphometry of cardiac tissue in a hamster DCM model by synchrotron radiation-based xray phasecontrast imaging at Spring-8. 第 81 回日本循環器学会学術集会. 2016-2017 年
19. Hirao S, Masumoto H, Hoshino M,

Minakata K, Takimoto S, Ikeda T, Yamashita J.K, Yagi N, Minatoya K. Three-dimensional visualization and morphometry of caediac tiddue in a hamster DCM model by synchrotron radiation-based Xray phase-contrast imaging at Spring-8. European Society of Cardiology Congress 2017. 2017-2018 年

20. Hirao S, Masumoto H, Hoshino M, Kanemitsu H, Ueyama K, Yamazaki K, Ikeda T, Yamashita J.K, Yagi N, Minatoya K. Three-dimensional Visualization and Morphometry of Cardiac Tissue in a Hamster DCM Model by Synchrotron Radiation-based Xray Phase-contrast Imaging at Spring-8. American Heart Association 2017. 2017-2018 年

21. 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

〔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

中田朋宏 (NAKATA TOMOHIRO)

京都大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号：00559685

(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

田畑泰彦 (TABATA YASUHIKO)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・
教授
研究者番号：50211371

(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