

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19402

研究課題名(和文)新規心筋特異的前駆細胞(CCP)移植法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the strategy of transplantation with cardiomyocyte-committed progenitors

研究代表者

武田 匡史(MASAFUMI, TAKEDA)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：40547501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はCD82を特異的な細胞表面マーカーとし、*in vitro*のみならず*in vivo*においてほぼ心筋に分化するiPS細胞由来心筋特異的前駆細胞の同定に成功した。CD82陽性心筋特異的前駆細胞を用いてラットの心筋梗塞心に移植を行ったところ、梗塞心内でほぼ心筋細胞に分化し、結果心機能が改善する結果を得た。さらに、今までに報告されている心血管前駆細胞を維持、増殖させる成長因子や阻害因子を用いて維持、増殖させることができるが検討した。残念ながら、CD82陽性心筋特異的前駆細胞を維持、増殖させることはできなかったが、今後の心筋再生療法にとって有望な移植細胞源となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We successfully found that human-induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived cardiomyocyte (CM)-committed progenitors (CCPs) that express CD82, almost exclusively differentiate into CMs both *in vitro* and *in vivo*. We examined the effect of transplanted CD82+ CCPs to rat MI model. As a result, we observed transplanted CD82+ CCPs exclusively differentiated into CMs within injured hearts and the beneficial effect on improving cardiac function. Although, unfortunately, we could not maintain and expand the CD82+ CCPs with the combination of growth factors and signal inhibitors for maintaining and expanding cardiovascular progenitors reported elsewhere, CD82+ CCPs should serve as a promising cells source for cardiac regeneration.

研究分野：循環器

キーワード：心筋前駆細胞 心筋再生

## 1. 研究開始当初の背景

我が国において心筋梗塞は年間約 8 万例、心不全による死亡は年間約 7 万例であり、心臓血管の疾患は日本人死因の第 2 位である。また心臓移植におけるドナー不足問題は根本的解決の見通しはなく、心臓移植以外の方法による心筋再生治療法の開発が期待されている。

現在行われている幹細胞移植治療の現状としては、種々の組織幹細胞を用いて検討されている。心機能改善効果に対して、一部良好な結果をもたらしている治療もあるが、基本的には心筋分化能の低さのため、真に心筋を再生しての心機能改善につながる治療とはいえないのが問題である。例えば、

A. 骨髄幹細胞移植 骨髄細胞中に心血管系の前駆細胞となりうる間葉系幹細胞の存在が明らかとなっており、実際ヒトに対して移植が行われたが、効果がないか、わずかな心機能改善にとどまり、十分な治療法には至っていない。

B. 骨格筋芽細胞移植 ヒト心不全症例への移植がなされ、一部良好な結果が得られている。しかし、心機能改善効果は移植シートから分泌される液性因子によるパラクライン効果と考えられており、移植細胞による真の心筋再生とは異なる。

C. 心臓幹・前駆細胞移植 心臓組織中に心臓幹細胞や前駆細胞が存在すると報告されており、それらを、浮遊培養等により増幅し、心臓に移植する試みがなされている。ヒト右心耳組織から単離増幅させた c-kit 陽性細胞を虚血性心筋症患者の冠動脈バイパス手術後にバイパス血管から注入させる Phase I study (SCIPIO trial) が行われている。心機能改善と梗塞巣の縮小が報告されるものの、バイパス手術のみの患者群との比較ではなく、現時点で効果があるかは不明である。(Chugh

A.R. et.al.Circulation. 2012;126:S54-64.) また、c-kit 陽性細胞の心筋分化能や移植後の心筋細胞としての生着が低いとの報告 (Kamata S., et.al. Cell Transplant. 2014; 23:1305-1319.) もなされ、心筋再生の可能性は現段階では低いと考えられる。

そこで、現段階において、真に心筋を再生する細胞源としては、多能性幹細胞から誘導した心筋細胞もしくは心筋前駆細胞が候補として挙げられる。動物モデルを用いた多能性幹細胞由来心筋細胞移植の現状は、心機能改善効果を期待したヒト ES 細胞由来心筋細胞移植において、心外膜からの直接投与で、Rat:  $1 \times 10^7$  個 (Lafflame M.A. et.al. Nat Biotechnol. 2007; 25: 1015-1024), Guinea Pig:  $1 \times 10^8$  個 (Shiba Y., et.al. Nature 2012;489:322-325.), Monkey  $1 \times 10^9$  個 (Chong J. J., et. al. Nature 2014;510: 273-277.) の数を用意して検討がなされている。

上記実験を基に、ヒトスケールで移植する細胞数を算出すると、 $1 \times 10^{10}$  を超える膨大な心筋細胞を用意する必要があり、理論上は現在の培養の技術で採取可能であるが、莫大な労力や費用等がかかると想定され、非現実的と考えられる。そこで、増殖かつ分化する能力を有すると考えられる前駆細胞を用いることで、実現できないかを検討することとした。

心筋前駆細胞を治療として使用する際には、細胞表面マーカーを用いて細胞を純化する必要があるが、心臓では、広く中胚葉系に分化する細胞群が同定されているのみで、心筋特異的な前駆細胞表面マーカーの報告はされていなかった。(Burridge PW et al, Cell Stem Cell, 2012)。そこで、近年我々のグループは世界に先駆けて Cardiomyocyte-committed progenitor:CCP と称する表面マーカーの同定に成功した。(特願 2014-94775 号) その前駆細胞の特徴は、純化した分化 6 日目の CCP 陽性細胞を心筋

分化条件下で再培養すると最高 98%以上、平均90%以上という極めて高い効率で心筋細胞に分化し、また、CCP 陽性細胞 1 個から平均約 6 個の心筋細胞に分化する能力を有していることが分かった。更には、in vivo での心筋分化能・生着能に関して、ヒト iPS 由来心筋細胞、早期の中胚葉細胞と CCP 陽性心筋前駆細胞を比較し NOD/SCID マウス腎被膜下への移植実験を行ったところ、CCP 陽性前駆細胞のみ生着し移植細胞の大部分(>90%)が心筋細胞へ分化するという結果で、in vivo において CCP 陽性前駆細胞は心筋細胞にコミットした前駆細胞でありかつ、極めて高い心筋分化能ならびに生着能を有していることを明らかにした。この CCP 陽性心筋前駆細胞は、現在行われている組織幹細胞治療において問題となる心筋分化能の低さや多能性幹細胞由来心筋細胞を移植するうえで問題となる数の点を十分克服しうる可能性があると考えられる。そこで CCP 陽性心筋前駆細胞を用いた新しい心筋再生療法を開発・実現しようと考えた。

## 2. 研究の目的

A. 亜急性期心筋梗塞モデルを用いた、心外膜下投与による至適 CCP 陽性心筋前駆細胞の検討ならびに心筋再生心機能改善効果の検討を行う。

B. ヒトスケールでの CCP 陽性心筋前駆細胞移植を実現するために、効率的な前駆細胞調製法(特に前駆細胞自己増幅法)を検討する。

## 3. 研究の方法

A. 亜急性期心筋梗塞モデルラットを用いて、心外膜下からの投与による至適 CCP 陽性心筋前駆細胞数の検討ならびに心機能改善効果の検討として、FACS または MACS を用いて CCP 陽性心筋前駆細胞を純化した後、専用の注射器を用いて心外膜下から移植投与を行う。その際に移植細胞数を調整し、

心機能改善効果の得られる至適な細胞数を検討する。

B. ヒトスケールでの CCP 陽性心筋前駆細胞移植を実現するための、前駆細胞調整法(前駆細胞自己増幅法)の検討・・・移植に向け大量の CCP 陽性心筋前駆細胞を用意できるように、前駆細胞を増幅できないか、液性成長因子等を用いて検討を行う。

## 4. 研究成果

A. 亜急性期心筋梗塞モデルを用いた CCP 陽性前駆細胞移植の検討においては、 $2 \times 10^6$  個の前駆細胞を FACS にて純化し移植をおこなった。1 か月後の観察にて、心臓超音波エコーでの検討では、左室短縮率の改善ならびに無収縮領域の減少を sham 群に比べて優位に認めた。今回用いた  $2 \times 10^6$  個は、今までに心筋細胞の移植で用いられた  $1 \times 10^7$  個(Lafflame M.A. et.al. Nat Biotechnol. 2007; 25: 1015-1024)より少ない移植細胞数で効果があり、有望な移植細胞源と考えられた。

B. 今まで心血管前駆細胞に対しての各種液性成長因子を用いての増幅法の報告がなされており、本件、CCP 陽性心筋特異的前駆細胞を用いて検討を行ったが、増幅される結果は得られず、他の化合物等を検討する必要がある。

## 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 1 件)

[学会発表](計 8 件)

2016 年 第 80 回日本循環器病学会  
Poster Presentation \*Masafumi Takeda,  
Jun K. Yamashita

Identification of hiPS-derived cardiomyocyte-committed progenitor (CCP) population as a promising cell source for cardiac regeneration.

2016 年第 15 回再生医療学会 (口頭発表)

\*武田 匡史 山下 潤

ヒト iPS 細胞由来新規心筋特異的前駆細胞表面マーカーの同定

2017 年 第 38 回炎症・再生医学会 (ポスター発表)\*武田 匡史 山下 潤

ヒト iPS 細胞由来 CD82 陽性心筋特異的前駆細胞の同定

2017 年 International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2017 13th Annual Meeting.

\*Masafumi Takeda, Jun K. Yamashita

Identification of CD82-positive human cardiomyocyte-fated progenitors.

2017 年第 16 回再生医療学会

\*武田 匡史 山下 潤

ヒト iPS 細胞由来 CD82 陽性心筋特異的前駆細胞の同定

2017 年第 81 回日本循環器病学会

\*Masafumi Takeda, Jun K. Yamashita

Identification of CD82-positive human cardiomyocyte-committed progenitors.

2017 年 American Heart Association 2017 Scientific Sessions

\*Masafumi Takeda, Jun K. Yamashita

Identification of CD82-positive human cardiomyocyte-fated progenitors in human pluripotent stem cell-derived cells

2018 年 The 1st JCS Council Forum on Basic CardioVascular Reserch (BCVR)

\*Masafumi Takeda, Jun K. Yamashita

Identification of CD82-positive human cardiomyocyte-fated progenitors in human pluripotent stem cell-derived cells

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：CD82 陽性心筋前駆細胞  
発明者：山下 潤、武田 匡史  
権利者：iHeart Japan 株式会社

種類：特許

番号：特許第 5924750 号

取得年月日：2016 年 5 月 25 日

国内外の別： 国外

取得状況(計 1 件)

名称：CD82 陽性心筋前駆細胞

発明者：山下 潤、武田 匡史

権利者：iHeart Japan 株式会社

種類：特許

番号：特許第 5924750 号

取得年月日：2016 年 5 月 25 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武田 匡史 (TAKEDA, MASAFUMI)

京都大学 iPS 細胞研究所・研究員

京都大学医学部附属病院 臨床研究総合

センター 特定病院助教

研究者番号 40547501