

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17710

研究課題名（和文）慢性心筋梗塞に対する自家iPS細胞を用いた新たな心筋再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new myocardial regeneration therapy using autologous iPS cells for chronic myocardial infarction

研究代表者

市村 創（Ichimura, Hajime）

信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・助教

研究者番号：40749115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：カニクイザル8頭からiPS細胞を樹立し、心筋細胞を必要量分化誘導し凍結保存した。研究期間中に計3頭のカニクイザルに自家移植を行い、継続課題（基盤C）につながる成果を得た。（研究内容について特許出願を検討中であり、詳細について後日記載する）

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで明らかになっていなかった、自己の多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた細胞移植に関する免疫反応について大きな発見を行うことができ、またその制御方法についても有用な手段を見つけることができた。本研究課題の発展内容である継続課題が完遂されれば、自家細胞を用いた心筋再生治療にむけての大きな前進となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：iPS cells were established from eight crab-eating macaques, and the required amount of cardiomyocyte differentiation was induced and cryopreserved.

During the research period, three autologous transplantation experiments were carried out, and the results leading to the continuation of the project (Fundamental C) were obtained.

(A patent application for the research is under consideration and details will be provided later.)

研究分野：再生医療

キーワード：心筋細胞 多能性幹細胞 自家移植 細胞移植 心筋再生

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における心筋梗塞患者は近年やや減少傾向にはあるものの、依然として多く(人口10万人あたり50人(男性)程度)、過去30年では症例数が倍増している。薬物治療や血行再建治療は病気の進行予防に有効であるが、梗塞により障害された心筋への根本的な治療とはならない。これは、心筋細胞の極めて低い自己再生能に起因している。すなわち、病気によって一旦障害された心機能の改善は困難であり、虚血性心筋症による末期心不全患者においてはいまだに心臓移植が唯一の根本的な治療法である。しかし、本邦だけでなく世界的にもドナー心臓の不足は深刻な状況であり、近年の植え込み型補助人工心臓の普及に伴い、心臓移植待機中の死亡例は減少傾向にあるものの、未だに多くの心不全患者が心臓移植待機中に死亡している。さらに、心臓移植では免疫抑制剤による易感染性、植え込み型補助人工心臓では出血、血栓症、デバイス感染といった合併症を常に考慮する必要がある。

近年、こうした心筋梗塞後心不全に対する新たな治療として、多能性幹細胞(ES細胞/iPS細胞)を用いた心筋再生療法の可能性が注目されている。動物実験においては、我々を始めいくつかの研究室が多能性幹細胞を用いた心筋梗塞治療の有効性を報告している(Shiba et al. Nature 2016)。過去の報告から、同種iPS細胞由来心筋細胞移植は霊長類において急性心筋梗塞後の心臓を再生することが明らかとなったが、我々の研究を含め、これまでの動物実験には心筋再生療法を臨床応用するにあたり、二つの課題がある。

### ・慢性心筋梗塞モデルにおける検討

過去の前臨床試験のほとんどが急性心筋梗塞モデルを対象としている。

心筋梗塞患者に対する、iPS細胞を用いた心筋再生医療の臨床応用は、様々な治療に抵抗性の慢性心筋梗塞後心不全患者から開始されることが想定される。心筋梗塞の急性期と慢性期では病態が大きく異なることから、臨床応用に向けての研究としては、慢性心筋梗塞モデルにおける治療効果の検討は必須である。

### ・自家移植モデルでの検討

iPS細胞のES細胞に対する大きな利点として、自家細胞を用いた再生医療の可能性が挙げられる。心筋梗塞発症後急性期においては、自家iPS細胞の利用は不可能であるが、慢性期には理論上自家iPS細胞の利用が可能である。

しかし、これまでの心筋再生療法に関わる動物実験は、ほとんどがヒトiPS細胞を用いた異種移植実験であり、自家iPS細胞移植後の評価はされていない。異種移植による検討では、細胞移植後の免疫応答の評価は不可能であり、臨床応用を想定した場合の治療効果や、安全性の正確な評価も困難である。

またiPS細胞を用いた再生医療では、移植細胞の腫瘍化リスクが大きな問題である。自家移植においては移植後の免疫応答が誘発されないため、腫瘍化リスクが懸念される。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、これまで明らかとなっていなかった慢性心筋梗塞に対する自家iPS細胞由来心筋細胞移植治療の有効性と安全性を、霊長類モデルにおいて明らかとすることを目的とする。本研究は、霊長類を用いた、考え得る最も臨床に近い動物実験であり、本研究成果によりiPS細胞を用いた心筋梗塞後心不全治療が臨床応用に大きく近づくことが強く期待される。

## 3. 研究の方法

下記2項目を行った。

### (a) in vitro: カニクイザル iPS 細胞由来心筋細胞の作製

カニクイザルをイナリサーチ(株)より購入し、皮膚組織より作製した線維芽細胞に対して、エピゾーマルベクターを用いてOct3/4、Sox2、Klf4、L-Mycを遺伝子導入することによりiPS細胞を8系統作製し、未分化能の確認、染色体検査を行った。

単層培養したiPS細胞に対して、マトリゲル®、アクチピンA、BMP4、ベーシックFGFを添加することにより心筋細胞を作製した。移植に必要な8頭分のカニクイザルiPS細胞株から $4 \times 10^8$ 個の移植用心筋細胞を作製し凍結保存した。

### (b) in vivo: 心筋梗塞モデル作成、細胞移植と心機能/不整脈評価と組織検査

獣医師による全身麻酔下に、胸骨正中切開により開胸し、心膜剥離後、左冠動脈左前下行枝中部を絞扼し、その3時間後に血流を再開させる(虚血再灌流)ことにより心筋梗塞モデルを作製した。モデル作製12週間後に心筋細胞を細胞生着因子とともに心筋梗塞部位に直接注射により移植した。細胞移植後4週間の経過観察期間中にHolter心電図による不整脈解析に加え、心エコー、心臓CTによる心機能評価を行った。細胞移植4週間後(心筋梗塞作製16週間)に、心臓を摘出し、組織学的な解析を行った。

また、移植したiPS細胞由来心筋細胞の生着評価の目的で細胞標識が必要となるため、これまでの我々の研究では、移植心筋細胞にGFPの一種である蛍光Caセンサー-GCaMPを遺伝子導入

し、生着評価およびホスト心筋との電氣的結合を評価していた。しかし、GFP には免疫原性があることが報告されており、免疫抑制剤を極力使用しない自家移植においては不向きである可能性がある。そこで、本研究課題内で GCaMP を使用した予備実験を行い、免疫応答が確認された場合、細胞標識マーカーとして別の試薬を検討することとした。

#### 4 . 研究成果

カニクイザル計 3 頭の自家細胞移植を行った。1 頭の自家移植実験後、GFP においては懸念通り免疫反応が惹起されることが確認されたため、細胞標識として免疫原性の極めて低い PKH26 を選択、小動物を用いて細胞標識としての有用性を確認した。

残り 2 頭のカニクイザルについては PKH26 を用いて細胞移植を実施し、継続課題につながる成果を得た（同個体の研究成果については、現在特許申請中であり後日公表予定）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hajime Ichimura, Shuji Chino, Yuji Shiba	4. 巻 S1443-9506(23)00108-7
2. 論文標題 Cardiac Regeneration Using Pluripotent Stem Cells and Controlling Immune Responses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heart Lung and Circulation	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hlc.2022.12.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------