

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390387

研究課題名（和文） iPS細胞を応用した自己心筋組織による心不全に対する新しい再生療法の開発

研究課題名（英文） Developing a novel regenerative treatment for cardiac failure by using iPS cell-derived self-cardiac tissue

研究代表者

松宮 護郎 (MATSUMIYA GORO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20314312

研究成果の概要（和文）：iPS細胞由来心筋細胞シートを作成し、ヌードラット心筋梗塞モデルに移植したところ、iPS細胞由来心筋細胞シートはラット梗塞心に生着し、電氣的に結合するとともに、心機能の改善がみられた。続いて、ヒトiPS細胞を*in vitro*で心筋細胞に分化誘導し、大量培養した心筋細胞を用いて、温度応答性培養皿にてシートを作成した。iPS由来心筋細胞シートを慢性梗塞ブタの梗塞領域に移植したところ、左室収縮能の向上、左室容量の減少を認め、電位の低下した梗塞巣の電気ポテンシャルを向上させた。

研究成果の概要（英文）：iPS cell-derived cardiomyocyte cell-sheet was successfully generated by iPS cells of mouse and human origin by means of thermoresponsive dishes. Transplantation of this iPS cell-sheet into the heart having ischemic pathology was feasible, safe and therapeutically effective in both rodent and porcine model, warranting clinical study of this strategy.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,400,000 | 1,920,000 | 8,320,000 |
| 2010年度 | 5,100,000 | 1,530,000 | 6,630,000 |
| 2011年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,700,000 | 4,110,000 | 17,810,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：iPS細胞、心筋細胞、細胞シート、心不全

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症や虚血性心筋症などの重症心不全に対する治療は、これまで臨床上的治療限界との闘いでもあった。当院も認定施設である心臓移植は、重症心不全に対する最終的な治療手段であるが、本邦での広い普及には至っておらず、移植登録から平均約3年の期間

の待機を余儀なくされる状態にあり、事実上、有効な治療手段として確立されたとは言い難い。多くの場合でブリッジとして長い待機期間を補助人工心臓（特に左室補助人工心臓；Left ventricular assist system LVAS）を装着のうえ待機することがほとんどとなるが、長期のLVAS装着には血栓症、感染の問題、

Deviceの耐久性の問題等があり、国内の保険適応のLVAS装着下の待機においては1年生存率50%以下と成績不良である。一方で、LVAS装着後に重症心不全患者の自己心機能が改善し、LVASからの離脱が成功する報告、いわゆる”Bridge to recovery”が報告されている。しかし、回復の機序やその予測についてはいまだ未知の状態であり、離脱の確率も2割程度と少ない。たとえ、離脱してもその後の再装着や心臓移植を要する症例も認められ、治療としては確立されたものとはいえない。

このような現状の中、我々はVASに代わる新たな治療法として、心筋再生療法を研究開発してきた。動物実験では、犬心筋梗塞モデルに対するHGF遺伝子導入、さらに、自己筋芽細胞と骨髄細胞の心筋内への針移植により、心機能改善およびリモデリング抑制効果を有することを証明してきた。そして、2004年から本学倫理委員会の承認のもと、臨床試験として自己筋芽細胞を単離・培養し、骨髄単核球とLVAS装着下での移植を試みてきた。しかし針移植では細胞生着の効率が悪く、さらなる効果的な治療を探索し、動物実験で温度応答性培養皿を使った細胞シート移植を手がけ、ラット心筋梗塞モデルに対して胎仔心筋細胞シートを移植し、心機能改善効果および電気的結合を証明した。さらにラット心筋梗塞モデルに対して筋芽細胞シートを移植し、針移植よりも心機能改善効果、リモデリング抑制効果を有することを証明した。また、DCMハスターやrapid pacing心不全モデル犬に対して筋芽細胞シートを移植し、心機能改善効果、抗アポトーシス効果、リモデリング抑制効果を証明した。これらの実験において、筋芽細胞シートを移植することで針移植よりも広範囲の病変をカバーでき、host心筋に対しての障害も軽減できるという利点を証明し、実際に大学病院にて治験を開始している。

しかし、これらの治療では移植細胞の心筋への分化はなく、世界的にはさらに高機能化した再生治療として、心筋細胞へと分化する可能性のある間葉系細胞、心幹細胞、胚性幹細胞を利用する研究が行われている。その中で胚性幹細胞はヒトでは臨床応用するには受精卵より取り出すという倫理的な問題、自己の細胞ではないため免疫拒絶反応の問題などがある。それらの問題を解決するために、ヒトの分化細胞(線維芽細胞)より、遺伝子導入により多能性を有するES細胞類似の人工多能性幹細胞(Induced pluripotent cell; iPS細胞)の作成が報告された。

また、マウスではiPS細胞を利用した再生不良性貧血モデルの治療の報告がされており、さらに最近、遺伝子導入にウイルスを用いないiPS細胞の作成の報告もされた。ヒトでも

ES細胞における倫理的問題、拒絶反応の問題が解決されるため、今後は安全性の高いiPS細胞が作成され臨床応用することができる細胞源となると考えられる。そこで、我々は人工多能性幹細胞より心筋細胞シートを作成し、筋芽細胞シートで得られた技術を応用し、より効果的な再生治療を行うことを目的として、本研究を計画した。

2. 研究の目的

iPS細胞から心筋細胞を分化誘導し、我々が開発してきた組織工学技術で再生心筋組織を構築、重症心不全に対する心筋再生療法を開発し、将来的に実際の医療に発展させる。

3. 研究の方法

(1) 心筋細胞誘導を目指した分化培養技術の確立

まずマウス由来人工多能性幹細胞を用いて心筋への分化誘導法とその効率、未分化細胞の残存、腫瘍形成等の安全性、遺伝子的問題点の検索等をおこない、人工性多能性幹細胞由来の心筋細胞シートによる心筋再生能について検討する。大動物モデルにて人工性多能性幹細胞の作成、および再生治療効果の再現性、その再生機構を確認し、安全性についても検討し、人への応用への準備を行う。人由来の人工性多能性幹細胞の作成を行い、動物モデルへの移植による再生能力の評価を行う。また将来的には重症心不全患者由来の細胞を材料とした人工性多能性幹細胞の作成により、再生治療法とすることとともに、病態の解明に向けた基盤を作ることを目的とする。そのため、心筋細胞誘導を目指した培養技術確立については、最適と考えられるサイトカインあるいは薬剤の組み合わせ、共培養系等の選択を行なう。50%以上のiPS細胞が心筋細胞に分化することを目指す。

(2) iPS細胞由来心筋細胞ソーティング手技の確立

iPS細胞由来心筋細胞を効率よく単離し、未分化iPS細胞を除外することで安全かつ有効な重症心不全治療用細胞を得る。当該細胞については、免疫不全マウスの皮下に 1×10^8 個移植し、EAMAの求める水準で腫瘍源性試験を行なう。

(3) マウスモデルにおける人工性多能性幹細胞を用いた心筋再生

マウス線維芽細胞由来の多能性幹細胞を用

いて行った移植実験では、多能性幹細胞自体を用いた場合には再生能力を確認する以前に腫瘍形成することを確認しており、分化誘導および細胞選択が必須である。胚性幹細胞で報告されている各種分化誘導法を応用して、分化効率の高い方法を検討し、また細胞選択法を検索し、分化細胞の純度の高い、安全性の高い細胞群により心筋細胞シートを作成する方法を検討する。また人工多能性幹細胞由来の心筋細胞シートをマウス心筋梗塞モデルに移植することにより心筋再生能の評価を行うと同時に分化誘導および純化した細胞での安全性の確認を行う。

(4) ヒト細胞由来人工多能性幹細胞の作成および心筋シート作成

現在報告されている方法を応用し、ヒト細胞由来の人工多能性幹細胞を作成する。当初ヒト人工多能性幹細胞はレトロウイルスおよびレンチウイルスを使用しており、臨床応用するには多くの問題があったが、導入遺伝子数の縮小をはじめ、ウイルスを使用せずにプラスミドでの導入も報告された。これらの技術を応用し安全性の高い人工多能性幹細胞の作成法を模索する。

将来的には重症心不全患者とくに拡張型心筋症などの遺伝的要因があるとされる疾患群に由来する人工多能性幹細胞を作成することにより病因の解明への基盤を作成する。またヒト細胞での人工多能性幹細胞より心筋細胞への分化誘導法および分化効率の高い方法、細胞選択法を検討し、大量の心筋細胞を確保しシート作成する方法を検討する。

(5) 大動物モデルにおける人工多能性幹細胞由来心筋シート移植

ヒト人工多能性幹細胞由来の心筋シートを大動物モデルに移植し実際の心筋再生能を評価する。ブタ（体重50-60kg）を用いて虚血性心筋症モデルを作成する。全身麻酔下、胸骨正中切開にてブタ心の左前下行枝にアメロイドリングを装着し、4週間後に経胸壁心エコーにて前壁、中隔のasynergyを確認する。また、Color kinesisにて収縮能および拡張能の評価を行う。さらに、大動物用のMillar社製カテーテルを頸動脈から左室内へと導入し、左室内圧（収縮期、拡張期末期）および左室容積からPV-loopを作成し、心収縮能、拡張能を評価する。

①心機能評価

心エコーにて移植後4週、8週に左室収縮率(LVEF)、左室断面積(EDA, ESA)、左

室前壁厚を計測。また、8週後にはMillar社製カテーテルを用いて、左室圧および容積を測定しPV-loopを作成し、心収縮能、拡張能を測定する。

②組織学的検討

移植後8週後に犠牲死せしめ、標本の免疫染色にて各因子発現(HGF, SDF-1)を評価。移植部位への集積細胞の表面マーカーからその種類を同定する。また、線維化、アポトーシスの抑制効果を特殊染色により評価する。

③分子生物学的検討

host心筋内の構造蛋白、サイトカイン等の発現についてRT-PCR法を用いて測定する。

④電子顕微鏡での評価

心筋と細胞シートの接着面を中心に、人工多能性幹細胞の基底膜や細胞の接着の様子を電子顕微鏡レベルで検証する。

4. 研究成果

iPS細胞由来心筋細胞シートを作成し、ヌードラット心筋梗塞モデルに移植し、経時的な電気生理学的検討、心機能の推移を観察した。iPS細胞由来心筋細胞シートと新生仔心筋細胞シートは移植後3日にて、電気生理活性の認められなかった梗塞巣に、生理活性が観察されるようになり、その同時期に、心機能が改善した。比較対象群として、線維芽細胞シート、筋芽細胞シートを同ラットに移植したが、レシピエント心との電氣的統合は起こらず、心筋細胞シートと比較して、心機能改善率も低値であった。iPS細胞由来心筋細胞シートはラット梗塞心に生着し、in vivoにおいて同細胞はサルコメア構造を有しており、デスモゾームを介して細胞同士が接着し、生着しているのが観察された。

また、hiPS細胞をin vitroで心筋細胞に分化誘導し、 10^7 個のiPS細胞由来心筋細胞を獲得し、大量培養した心筋細胞を用いて、温度応答性培養皿にてシートを作成した。iPS由来心筋細胞シートを慢性梗塞ブタの梗塞領域に移植した。心臓超音波検査、CT検査にて、左室収縮能の向上、左室容量の減少を認め、電位の低下した梗塞巣の電気ポテンシャルを向上させることができた。また、iPS由来心筋細胞シート移植群では、HGF等のサイトカインの発現向上を認め、本細胞シートはパラクライン効果を有することが証明された。組織学的に、iPS細胞由来心筋細胞の残存を確認したが、細胞数としては少量であり、細胞をいかにして残すかが重要な課題であるものと思われた。

移植された iPS 細胞を残す手法として、大網を同時に移植する手法を開発した。ブタモデルで開胸と同時に開腹し、大網を充分授動した上で、iPS 細胞移植部位を覆うように大網を移植した。移植前に鉄でラベルした iPS 細胞の残存率を MRI を用いて測定したところ、大網同時移植群で有意に iPS 細胞の残存が見られ、また心機能改善効果も高かった。

これらの結果をもとに、臨床研究プロトコルを作成するべく、研究を進めている。

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 5 件)

① Shudo Y, Sawa Y(11). Novel regenerative therapy using cell-sheet covered with omentum flap delivers a huge number of cells in a porcine myocardial infarction model. J Thorac Cardiovasc Surg. 2011 Sep 14. [Epub ahead of print] PMID:21924436[PubMed - as supplied by publisher] 査読有

② Imanishi Y, Sawa Y(7). Induced adipocyte cell-sheet ameliorates cardiac dysfunction in a mouse myocardial infarction model: a novel drug delivery system for heart failure. Circulation. 2011 Sep 13;124(11 Suppl):S10-7. 査読有

③ Fujita T, Sawa Y(7). Clinical impact of combined transplantation of autologous skeletal myoblasts and bone marrow mononuclear cells in patients with severely deteriorated ischemic cardiomyopathy. Surg Today. 2011 Aug;41(8):1029-36. 査読有

④ Imanishi Y, Miyagawa S(2), Saito A(3), Sawa Y(5). Allogenic skeletal myoblast transplantation in acute myocardial infarction model rats. Transplantation. 2011 Feb 27;91(4):425-31. 査読有

⑤ Miyagawa S, Sawa Y(3). Tissue-engineered cardiac constructs for cardiac repair. Ann Thorac Surg. 2011 Jan;91(1):320-9. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松宮 護郎 (MATSUMIYA GORO)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20314312

(2) 研究分担者

澤 芳樹 (SAWA YOSHIKI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00243220

倉谷 徹 (KURATANI TORU)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90448035

上野 高義 (UENO TAKAYOSHI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：60437316

坂口 太一 (SAKAGUCHI TAICHI)
大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授
研究者番号：10467574

白川 幸俊 (SHIRAKAWA YUKITOSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20457013

松山 晃文 (MATSUYAMA AKIFUMI)
大阪大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：10423170

宮川 繁 (MIYAGAWA SHIGERU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70544237

石坂 透 (ISHIZAKA TORU)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10372616

黄野 皓木 (KOHNO HIROKI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40375803

石田 敬一 (ISHIDA KEIICHI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40375671