

## 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 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591540

研究課題名（和文）細胞シート工学を応用した幹細胞移植と増殖因子徐放を併用した心不全治療

研究課題名（英文） Treatment for heart failure with combination of stem cell sheet technology and sustained release of growth factors

研究代表者 池田 義（IKEDA TADASHI）

京都大学・医学系研・准教授

研究者番号：40281092

研究成果の概要（和文）：

末期心不全に対する治療として、多能性幹細胞（ES/iPS細胞）を用いた幹細胞治療を確立するべく、疾患動物モデル（虚血性心筋症モデル）を用いて前臨床段階の移植実験を行った。まず初めに、ラット亜急性期心筋梗塞モデルに対し、フローサイトメトリーの手法により分化誘導・分離したマウス ES 細胞由来心筋細胞の注入による移植を行ったが、効果は限定的であり、注入移植による生着効率の不良がその原因と考えられた。その後移植効率を高めるため、温度感受性培養皿（UpCell, セルシード社）を用いた ES 細胞由来心筋細胞シート移植実験を行った。その結果、心機能増悪を抑える効果を認め、さらにその血管新生を中心とした左室リモデリング抑制メカニズムを解析した結果、終末分化した心筋細胞が著明な血管新生その他のパラクライン効果を有することがわかった（Masumoto H, Ikeda T et al, Stem Cells, 2012）。さらにヒト iPS 細胞を用いた心筋細胞シートのラット亜急性期モデルへの移植を行い、同様に血管新生を中心としたメカニズムによる心機能回復効果を認めた（AHA 2012 abstract #11848）。多能性幹細胞(ES/iPS)細胞を用いた心臓再生治療において、治療効率を上げうるひとつの方法として細胞シートを用いた方法が有用である可能性があることを今回明瞭に示すことができた。さらにヒト iPS 細胞由来心臓組織シートを用いて良好な心機能回復効果を得られたことから、iPS 細胞を用いた心臓再生研究を、さらに臨床応用に近づけることができたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We performed a pre-clinical research to establish pluripotent stem cell (ES/iPS cell)-based therapy for terminal heart failure using ischemic cardiomyopathy animal model. First we injected mouse ES cell-derived and FACS-purified cardiomyocytes (CMs) for rat subacute myocardial infarction (MI) model. However, the therapeutic effect was limited because of low efficiency of engraftment. Next we employed cell sheet technology using temperature-responsive culture dishes (UpCell, CellSeed Inc.) to improve the efficiency, and performed ESC-derived cardiac cell sheet transplantation. We showed that transplantation of the cell sheets ameliorates cardiac dysfunction after MI due to attenuated left ventricular remodeling through various paracrine effects, mainly neovascularization. We also indicated that the paracrine effects are mainly mediated by differentiated CMs (Masumoto H, Ikeda T et al, Stem Cells, 2012). Furthermore, we showed that human iPSC-derived cardiac cell sheet transplantation to rat subacute MI model also showed functional improvement through neovascularization (AHA 2012 abstract #11848). We clearly showed that cell sheet transplantation is one of the promising methods to improve therapeutic effects on pluripotent stem cell-based cardiac regeneration. We also showed excellent therapeutic potential of human iPSC-derived cardiac cell sheets. This result helps to realize iPSC-based cardiac regenerative therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
24年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：胸部外科学、心臓血管外科学

キーワード：細胞シート学、幹細胞、細胞増殖因子、ドラッグデリバリーシステム(DDS)、心不全治療

1. 研究開始当初の背景

末期心不全患者に対する現状での最も有効な治療法は心臓移植療法であるが、ドナー不足という深刻な問題があるため、一般的な治療法とはなり得ていない。一方、重症心不全に対する心臓移植に代わる治療法になり得る可能性を秘めたものとして近年注目を集めているのが各種増殖因子の投与や細胞移植を中心とした再生医療である。重度の不全心に対して血管新生や組織の線維化およびアポトーシスの抑制を目的とする増殖因子の徐放と新たな動力源としての心筋そのものの再生を目的とする細胞移植を施すことによって心臓移植に匹敵するような高い治療効果を得られる可能性があると考えられる。

細胞移植治療におけるもうひとつの大きな問題として、心筋再生効果を現すポテンシャルをもつ移植細胞を十分量得るのが困難であることが挙げられる。人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、皮膚線維芽細胞など生体のあらゆる組織細胞への遺伝子導入により多能性および自己増殖能を獲得させるもので、大変注目されている。また例えば、重症心疾患患者の皮膚から採取した細胞をiPS化し、増殖および心筋細胞への分化誘導を行った上で細胞移植を行えば、免疫拒絶もなく移植細胞不足の心配もない、まさに究極の心筋再生治療と言える。

われわれはこれまで、ゼラチン水和ゲルを用いた生体内での蛋白徐放システムを用いて、細胞移植に塩基性線維芽細胞増殖因子や肝細胞増殖因子の徐放を併用すると移植細胞の生着率が向上すること(J Thorac Cardiovasc Surg, 2002 / Circulation, 2005)を示してきた。これらの知見を併用することにより、効果的な心臓再生医療が実現可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究ではまず増殖因子の徐放と細胞移植の最適かつ現実に利用可能な組み合わせを探り、心臓移植に代わり得るような新しい心臓再生療法を確立することを目的とした。さらに移植細胞としてES/iPS細胞の分化誘導による心筋細胞が有用であるか、どの分化段階で用いるのが最適かを探り、さらにiPS細胞の心筋分化誘導およびその移植実験により、最終的にiPS細胞を用いた心筋再生療法を確立することを目的とした。また、我々は東京女子医科大学の岡野らが開発した温度感受性培養皿を用いた細胞シート技術にも着目した。この細胞シート移植法を併用することで、心筋再生効果を上昇させ得ることも併せて検討することとした。

3. 研究の方法

1. ラットMIモデルの作製：ヌードラット(F344/N-rnu/rnu、♂ 9週齢)を麻酔挿管下に左開胸し、冠動脈(前下行枝)を結紮した後閉胸。術前、術後6日に心エコーを行い、左室前壁に中等度の梗塞巣が形成されたものを使用した。
2. マウスES細胞(GFP-transgenic)を以前報告された方法(Yamashita JK et al. FASEB J, 19: 1534-1536, 2005.)に従い分化誘導し、フローサイトメトリーの手法により心筋細胞(CM)を分離し、注入移植できるよう調整した。細胞シートについては、心筋細胞に加え、血管内皮細胞および壁細胞についても以前報告された方法(Yamashita, Nature 2000)を用いて分化誘導し、それらを再構成した細胞シートを作製した。シートの作製のため、回収細胞を温度感受性培養皿(UpCell, セルシード社)に播種し直し、37℃下に培養し、

4日後温度を20°Cに下げ、シートを回収した。また、ヒト iPS 細胞を以前報告された方法 (Uosaki H, PLoS One. 2011) に従い心筋細胞を中心に分化誘導し、同様に細胞シートを作製した。

3. 心筋細胞注入移植あるいは心筋細胞シートの移植: 心筋梗塞作製から4日後に再度麻酔挿管下に左開胸し、左室梗塞部に心筋細胞を注入、あるいは細胞シートを貼付移植。実験群は以下の2群とした。

A. 移植群

B. 開胸、心膜切開のみにて閉鎖 (Sham 手術)

4. 心機能評価: 治療後1週目に心エコー、4週目に心エコー検査およびミラカテールを用いた左室内圧測定を行い心機能を評価した。

5. 組織学的検討: カテール検査後に安楽死させ心臓組織を摘出し梗塞部および周辺部、健常部の組織学的評価を行った。また免疫染色により移植細胞の生着を評価した。

#### 4. 研究成果

心筋細胞注入移植: 移植4週後において、心機能に両群にて差はなく、移植心筋細胞生着も認められなかった。

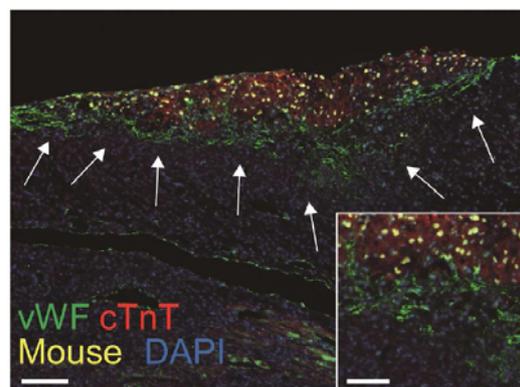
マウス ES 細胞由来心筋細胞シート移植: 移植後4週において、治療群での有意な心収縮能改善と無収縮域縮小を認めた。移植3ヶ月後においてもこれらの効果は持続しており、シート移植が心筋梗塞後の左室リモデリングを抑制した。種特異的 in situ hybridization により移植細胞を追跡したところ、比較的早期 (移植後4週以内) に大部分のグラフトが失われていることが示され、この心機能回復には移植心筋の直接的貢献よりも、パラクライン効果などの間接的効果が寄与していると考えられた。虚血部位の血管新生は治療群において有意に促進されており、特に移植心筋細胞周囲に著明であった (図1)。種々の血管新生促進因子のうち血管内皮細胞増殖因子が主にシート内の CM から産生されていた。CM が含まれないシート (EC/MC シート) 移植では、CM を含むシート移植で認められた血管新生促進効果および心機能回復が失われ、心臓組織シート移植の治療効果には CM が必須であった。CM を含む組織シートでは、抗アポトーシスなど様々な役割を担う種々のサイトカイン mRNA 発現が EC/MC シートに比し増加していた (Masumoto, Stem Cells 2012)。

ヒト iPS 細胞由来心筋シート移植: ラット亜急性期心筋梗塞モデル (梗塞1週) に移植したところ、移植4週後において有意な心収縮能回復と非収縮域縮小を認めた。移植後早期において、ヒト由来心筋細胞 (ヒト核抗原および心筋トロポニン T 共陽性) の周囲に宿主

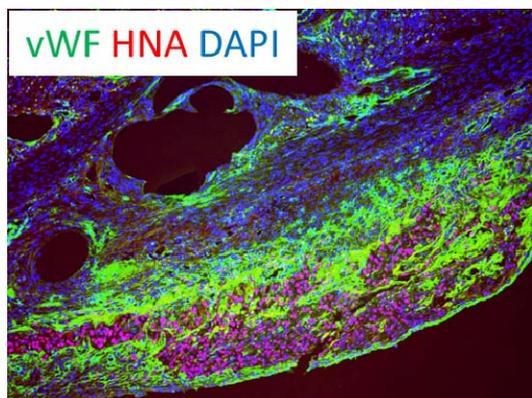
由来新生血管内皮細胞が集積しており (図2)、マウス細胞シート移植同様、血管新生による心機能回復が考えられた (AHA 2012 abstract #11848)。

これらの結果からの考察であるが、本研究では種特異的 in situ hybridization 法を用いて、移植細胞が移植後減少していくことを明確にした。このことは細胞移植後心機能回復が、パラクライン効果等の間接的効果によるものであることを示している。心筋梗塞後の左室リモデリングは、初回虚血後に梗塞境界領域で増加する血流への需要に対して生体が反応できず、持続的圧負荷のかかる状態もあいまって、梗塞が拡大していき (infarction expansion)、その梗塞範囲が生体が代償できる範囲を上回った場合に、慢性期心不全に陥るとされるが、この初回梗塞時後比較的早期 (亜急性期) に血管新生効果を示すような治療 (この場合では細胞シート移植) を施すことにより、梗塞範囲拡大が抑えられ、結果的に心機能増悪抑制を示したものと考えられる。その間接的効果の中心的役割を果たすのが CM であることを本研究では明確かつ予見的に、シート構成細胞の種々の組み合わせにより示した。このことは多能性幹細胞を用いて種々の心臓構成細胞をそれぞれ分化誘導して用いるシステムがないと困難であり、本研究ではそれを十分活用して、この細胞移植での心機能回復の細胞レベルでのメカニズムについて、初めて明らかにしたものと見える。

さらにヒト iPS 細胞由来心臓組織シートを用いて良好な心機能回復効果を得られたことから、iPS 細胞を用いた心臓再生研究を、さらに臨床応用に近づけることができたと考えられる。今後この効果を、ブタ等の大動物モデルを用いて検証することにより、より臨床応用に近づけるものとする。また、本研究によりパラクライン因子による治療効果が明らかになった。これらの知見をふまえ、各種増殖因子の併用を効果的に行うことで、治療効果を増幅させることが示されたと考える。



(図1) マウス ES 細胞由来心臓細胞シート移植 3 日後における生着心筋細胞周囲の著名な血管新生黄色のマウス核 (種特異的 in situ hybridization) を伴うトロポニン T (cTnT、赤) 陽性のグラフト由来心筋細胞の周囲に von Willebrand Factor (vWF、緑) 陽性の新生血管内皮細胞が著明に集積している (矢印)。DAPI: 4, 6 diamidino-2-phenylindole. Scale bars: 100  $\mu$  m (主図)、50  $\mu$  m (挿入図)。



(図2) ヒト iPS 細胞由来心臓細胞シート移植 3 日後における生着心筋細胞周囲の著名な血管新生 HNA, ヒト核抗原。

#### 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 2 件)

1. Masumoto H, Matsuo T, Yamamizu K, Uosaki H, Narazaki G, Katayama S, Marui A, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK. Pluripotent stem cell-engineered cell sheets re-assembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte-mediated neovascularization. *Stem Cells*. 2012. 30(6):1196-205

2. Fujiwara M, Yan P, Otsuji TG, Narazaki G, Uosaki H, Fukushima H, Kuwahara K, Harada M, Matsuda H, Matsuoka S, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Ikeda T, Sakata R, Mummery CL, Nakatsuji N, Yamanaka S, Nakao K, Yamashita JK. Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A. *PLoS One*. 2011;6(2):e16734.

[学会発表] (計 10 件)

1. 升本英利、池田義、清水達也、岡野光夫、坂田隆造、山下潤. Generation of Cardiac Tissue Sheets Fully Engineered with Human

Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiovascular Cell Populations. 第 76 回日本循環器学会学術集会 (福岡). 2012/3/16.

2. 升本英利, 池田 義, 坂田隆造. 多能性幹細胞由来心臓構成細胞の再構成による心臓組織シート -治療効果と機能回復メカニズム解析-. 第 64 回日本胸部外科学会定期学術集会 (名古屋). 2011/10/11.

3. Hidetoshi Masumoto, Tatsuya Shimizu, Tadashi Ikeda, Teruo Okano, Ryuzo Sakata, Jun K Yamashita. Central Role of Cardiomyocytes in Cell Therapy: Transplantation of Cardiac Tissue Sheets with Defined Cell Populations from Pluripotent Stem Cells. European Society of Cardiology (ESC) Congress 2011 (Paris). 2011/8/30.

4. 升本英利、清水達也、池田義、岡野光夫、坂田隆造、山下潤. Embryonic Stem (ES) Cell-engineered Tissue Sheets with Defined Cardiac Cell Populations Ameliorate Function after Myocardial Infarction. 第 75 回日本循環器学会学術集会 (横浜). 2011/8/3.

5. Hidetoshi Masumoto, Tadashi Ikeda, Ryuzo Sakata, Jun K Yamashita. Mouse embryonic stem cell-engineered tissue sheets with defined cardiac cell populations ameliorate function after myocardial infarction. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2011 Annual Meeting (Toronto). 2011/6/17.

6. 升本英利、池田義、清水達也、岡野光夫、坂田隆造、山下潤. マウス多能性幹細胞由来心臓組織シートの心筋梗塞後リモデリング抑制効果. 第 32 回日本炎症・再生医学会 (京都). 2011/6/2. (優秀演題賞受賞)

7. Masumoto H, Ikeda T, Shimizu T, Okano M, Sakata R, Yamashita J. Generation of cardiac tissue sheets fully engineered with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cell populations. 第 76 回日本循環器学会学術集会 2012. 3. 16-18 福岡市

8. 升本英利、池田 義、清水達也、丸井晃、岡野光夫、坂田隆造、山下潤. Mouse and human pluripotent stem cell-engineered cell sheets re-assembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte-mediated neovascularization. 第 4 回日本再生医療学会 YIA 受賞講演 2012. 6. 12 横浜市 (YIA 最優秀賞受賞)

9. 升本英利、池田 義、清水達也、岡野光夫、坂田隆造、山下潤. ヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植による亜急性期虚

血性心疾患治療の可能性についての基礎的検討. 第 33 回日本炎症・再生医学会 2012.7.5-6 福岡市 (最優秀ポスター賞受賞)

10. Masumoto H, Ikeda T et al. Transplantation of cell sheets with human iPS Cell - derived cardiomyocytes and vascular cells for infarcted hearts: a basic study. American Heart Association, Scientific Sessions 2012 (AHA 84th) 2012.11.3-7 Los Angeles, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 胚性幹細胞から心筋シートを製造する方法

発明者: 学校法人東京女子医科大学/国立大学法人京都大学

権利者: 岡野光夫/清水達也/山下潤/升本英利

種類: 特願

番号: 2011-076235

出願年月日: 2011/3/30

国内外の別: 国内

名称: The method of producing the group of cells containing cardiomyocytes and vascular tissue cells

発明者: 国立大学法人京都大学

権利者: 山下潤/升本英利

種類:

番号: 61/611,340

出願年月日: 2012/3/152011/3/30

国内外の別: 国外 (米国)

○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://www.kyoto-cvs.jp/study/03/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号:

