

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390072

研究課題名(和文) 霊長類同種移植モデルによる心臓再生治療効果の確認

研究課題名(英文) Validation of therapeutic efficacy of allogenic transplantation therapy using pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for myocardial infarction in non-human primate: common marmoset.

研究代表者

服部 文幸 (Hattori, Fumiyuki)

慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)

研究者番号：50398624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円、(間接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：コモンマーモセット心筋梗塞モデルコントロール群5匹、 $1 \times 10^6$ の6乗マーモセットES細胞由来心筋細胞塊の移植治療群5匹を作製した。心臓機能評価を術前、術後1ヵ月ごと3ヶ月まで実施した。移植1ヵ月後のみ、移植群は、有意に心臓機能が維持された。3ヵ月後GFP、アクチニン共陽性であるグラフト細胞の生着が確認された。梗塞体積を求めたところ、Sham群、移植群共に差が無かった。以上、移植した心筋細胞は、体積として不十分であるものの、梗塞作製および移植1ヵ月後においては、グラフト心筋細胞塊からホスト心筋細胞にとって有益なパラクリン因子が放出されたことによって、一時的な保護効果を発揮したものと推察された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated myocardial infarctions in common marmoset and simultaneously transplanted saline (Sham group: n=5) and  $1 \times 10^6$  purified cardiomyocyte-balls (Treated group: n=5) into their myocardium. We performed monthly echocardiographic analyses before and after the surgeries until three months of them, which revealed that only after one month of the surgery, heart functions of the treated group were significantly sustained compared with sham group. After three month of the transplantation, histological analyses showed good survival of GFP-positive graft cardiomyocytes in the infarcted area and border zone. The infarct/total heart volume was no significant difference between sham and treated groups. In conclusion, allogenic transplant of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes served a significant but transient beneficial effect to the heart infarcted model developed in a non-human primate, common marmoset.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：再生医学 心筋細胞 多能性幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

オランダ、ライデン大学のMummery のグループは、ヒトES 由来心筋細胞のラット心筋梗塞に対する移植治療効果が短期的であり、長期的には非心筋細胞を移植した場合と区別できないことを示した(Stem Cell Res.2007:9-24)。米国ワシントン大学・Murry のグループは、ヒトES 細胞由来心筋細胞のラット心筋梗塞モデルへの移植で、心リモデリングが抑制されないとの報告を行った(J Mol Cell Cardiol. 2010 Sep 18.)。しかしながら、これらの報告は、ヒト心筋細胞の齧歯類への異種移植という制限がある。さらに、invitro の試験系において、ヒトES 心筋と、齧歯類心筋との電気的な脱共役が報告されている(Cell Physiol Biochem. 2009;23:65-74)。以上のことから、同種間移植による機能改善効果を評価する必要がある。ところが、精製した多能性幹細胞由来の心筋細胞を効率的に移植生着させるための技術開発が遅れたために、齧歯類での同種移植治療効果の検討が実施されないまま、研究対象が齧歯類からヒト幹細胞由来心筋細胞に移行してしまった現状がある。加えて、ヒト多能性幹細胞を用いたヒトの治療効果を予測するには、よりヒトに近い霊長類を用いることが有意義であると考えられる。以上を踏まえて本研究は、霊長類マーマセットES 細胞およびiPS 細胞に由来する精製心筋細胞のマーマセット心筋梗塞モデルに対する同種移植治療効果の検討を目的とした。

### 2. 研究の目的

ヒトES 心筋を齧歯類心筋梗塞モデルに異種移植した場合、長期的機能改善効果が得られないことが示唆された。電氣的、機能的な種差により、共役効果が得られない可能性がある。そこで、研究は、霊長類心不全モデルにおいて、同種の誘導性多能性幹(iPS)細胞および胚性幹(ES)細胞に由来する精製心筋細胞の再生治療効果を検証することを目的とする。このために、(1) 霊長類コモン・マーマセット心筋梗塞後心不全モデルを構築、(2) 24時

間連続的な左室圧計測による客観的心機能評価系の構築、(3) マーマセットiPS 細胞の心筋分化と性状解明、(4) 大量の心筋細胞の調製と多段階精製を実施する。これら新技術・新知見を結集して、目的を達成する。本目的は、多能性幹細胞によるヒト心臓再生医療の実現に向けた重要な意義を持つ。

### 3. 研究の方法

(1) マーマセットES 細胞の高密度平面大量培養、効率的な大量分化方法の構築。

ヒトの左心室は、 $6 \times 10^9$  乗の心筋細胞から成ると言われる(Circ Res.

2003;92(2):139-50)。マーマセット心臓はヒトに比べて約100分の1の重量を持つ。従

ってマーマセットの左心室は、約 $6 \times 10^7$  乗の心筋細胞から成ると予想した。この約

1.7%である $1 \times 10^6$  乗の心筋細胞心筋細胞を移植細胞数と設定した。この調製を可能とする効率的な心筋細胞調製方法の構築を目指して検討を開始した。先ず我々は、種々の

大量培養方法を比較検討し、マーマセットES 細胞の大量培養に最適な方法としてコーニング社のHyperflask を選択した。Hyperflask

では、T175 フラスコの容積で、約10 倍の培養表面積1720cm<sup>2</sup> が得られる。この方法では、1 つのHyperflask で約 $1 \times 10^8$  乗の細胞の

マーマセットES 細胞が作製できた。この未分化細胞をスピナーフラスコにより浮遊培養し、心筋細胞へと分化誘導を行った。胚様態を単細胞に分散し、ミトコンドリア法で精製を行

った結果、Hyperflask 1 個から $1 \sim 5 \times 10^5$  乗の心筋細胞が得られた。23 年度は、Noggin 法、Wnt 法、G-CSF法の最適な応用条件を見出すことにより、心筋細胞の収率を10 倍に向上

させたいと考えている。本研究期間継続して心筋細胞の生産を実施し、詳細なノウハウの蓄積を行い、最終的にGMP に則った生産系の構築を目指し、将来的なヒト細胞への応用に向けたノウハウとする。

(2) 多段階的、高純度心筋細胞精製方法の

構築。

最近我々は、心筋細胞が他の細胞に比べて極めて多くのミトコンドリアを含有する性質を利用した心筋細胞精製方法を報告した。このミトコンドリア法は、遺伝子改変を必要としないため、種差の影響を受け難く他の方法との組み合わせも容易である。ミトコンドリア法の弱点は、心筋細胞の含有量が低いサンプルでは時間効率が低いことであった。そこで、新規心筋細胞精製方法である乳酸法を開発した。乳酸法は、心筋細胞の代謝的な特徴である高い乳酸代謝能力を応用し、培養メディアウムから糖を完全に除去し生理的濃度の乳酸を含有することを特徴とする“心筋細胞選択培地”により、心筋細胞を含有する胚様態を1週間選択培養する方法である。最初に乳酸法で心筋細胞を90%以上に濃縮した後、ミトコンドリア法を適用したところ、10の8乗細胞をわずかに数時間で迅速に処理できることが分かった。我々は、さらに高い安全性を担保することを目標として、さらに組み合わせ可能な未分化幹細胞の除去方法の開発を行った。この方法は、未分化幹細胞が有するある脆弱性に着目したものである。この方法では、処理開始後最初に未分化幹細胞が死滅し、心筋細胞は最も長く生存するため、処理時間の最適化により未分化細胞や非心筋細胞を除去可能である。ヒト治療において一人に用いる心筋細胞数は、約 $6 \times 10^8$ 乗細胞と概算される。この場合、仮に純度99.99%の心筋細胞精製方法であっても、60,000個の非心筋細胞の混入がある。この非心筋細胞の混入をゼロとすることは単独の方法では難しい。しかし、純度99.5%の精製方法を3種類連続して多段階実施した場合、最終的な非心筋細胞の混入数は、75細胞となる。これが多段階精製の意義である。また、我々の構築した3つの心筋細胞精製方法は、いずれも未分化細胞が、他の細胞よりも効率的に除去できる利点を有している。例えば未分化細胞は非常に少数の未発達なミ

トコンドリアを含有することから、ミトコンドリアの含有量で種々の細胞を分類した場合、心筋細胞と未分化幹細胞は対極に位置する。この為、ミトコンドリア法は純度99.5%の精製方法であるが、未分化幹細胞の混入率は、さらに低いのである。これらの安全性に対して有利な特徴を持つ、3つの心筋細胞精製方法を多段階的に用いることによって、高い安全性を担保した再生心筋細胞を生産できると考えている。しかしながら、多段階的な精製方法には、収率の低下という問題も懸念されることから、23年度の課題は、収率と純度の両立した最適な組み合わせ条件をマーマセットで見出すことである。

### (3) マーマセットiPS細胞の心筋細胞分化と性状の解析

iPS細胞は臨床的価値として自己体細胞を元に多能性幹細胞を得られるメリットがある。マーマセット同種移植治療モデルを検討するにあたり、将来的に自己体細胞由来iPS細胞を用いた再生医療の治療モデルとしたい。我々は既にマーマセットES細胞を世界で初めて心筋細胞に分化させることに成功し、その性質を詳細に解析して報告済みである(BBRC. 008;369(3):801-6)。さらにこのマーマセットES細胞由来心筋細胞をミトコンドリア法、乳酸法、未分化幹細胞除去方法の全てにおいて有効性を確認している。23年度の課題として、実中研の佐々木らの作製したマーマセットiPS細胞を得て、これを心筋細胞に分化誘導する。続いて24年度は、この性状を明らかとする。

### (4) マーマセット心筋梗塞モデルの構築

既にマーマセット心筋梗塞の作製を実施しつつある。心エコーによる心機能評価、ミラールカテーテルによる血行動態調査、さらには血中ANP濃度測定、心肥大・不全関連遺伝子の発現解析を行い、心不全モデルとして詳細な調査を行う。

### (5) マーマセット左心室内圧連続測定方法

の開発

心臓再生医療を目指した小動物研究では、心機能評価方法として専らエコーが用いられてきた。本研究でも最新鋭機器を用いたエコー評価も並行して実施する。しかし、エコー評価の弱点は、データの主観性に対する疑念が払拭できないこと、および心臓の形態的情報から類推した評価であること、麻酔による影響である。そこで我々は、より客観的な評価方法として24時間連続して左心室圧を測定する新しい機能評価系(テレメトリーシステム)を構築する。このシステムは、左心室圧プローブを心尖部から左室に留置し、その情報を腹腔内に留置する小型の送信機から外部の受信機に送り続けるものである。圧に加えて、同時に心電図および体温も測定できる。これら3つのデータを同時計測送信する埋め込み式送信機の電源は3ヶ月間連続送信可能な容量を持つ。このシステムの導入により、無麻酔で、24時間の左室内圧の測定が可能である。圧波形をもとに詳細な解析することにより、心筋細胞の収縮速度、拡張速度の評価が可能である。今後は、心筋梗塞モデルにおける心機能評価の検討を行う。

(6) マーモセット心筋梗塞モデルに対する治療効果の確認複数回の開胸を避けるために、テレメトリーシステムの埋め込み、及び心筋梗塞の作製、及び心筋細胞移植を同時に行う。一匹あたり $2 \times 10^7$ の高純度心筋細胞を移植する。コントロールとして、同数のマーモセットES細胞由来の線維芽細胞を移植する。平成24年度中から25年度に渡って、コントロール群4、治療群4の試験実施を行い、必要に応じて適宜検討数を増加させる。同種異系移植であるため、免疫抑制剤の投与が必要である。既に事前検討により、最適な濃度設定が終了しており、移植4週間後において生着した心筋細胞が確認された。術前1日前から免疫抑制剤サイクロスポリンの投与を開始し、実験終了日まで毎日連続投与を実施する。2

週間に一度心エコーによる心機能評価、血液サンプルの採取を実施する。最後にミラーカテテルによる血行動態データを取得する。採取した心臓の免疫組織化学的な解析および、遺伝子発現解析も合わせて実施する。

#### 4. 研究成果

(1) 同種移植安全性についての成果。

コモンマーモセット心筋梗塞モデルに対し、 $5 \times 10^6$ の6乗のコモンマーモセットES細胞由来心筋細胞をミトコンドリア法にて精製し、移植を実施した。免疫抑制は、サイクロスポリン8mg/kgを術前1日から毎日筋肉内に投与を実施した。移植後2ヶ月においてマーモセットの体調不良を生じたため、解剖を実施したところ、心臓移植部位周辺に腫瘍の形成が見られた。このことから、単一の精製方法による安全性の確保には限界が存在する可能性が強く示唆された。そこで、新たに開発した乳酸法を応用し、ミトコンドリア法とタンデムに用いることを考案した。さらに、移植によらず高感度に造腫瘍性を検出するシステムの開発も必要と考えた。精製した心筋細胞を幹細胞が増殖するための培養条件へと戻し、長期に接着培養することによって、混入残存する幹細胞を高感度に検出可能であることがわかった。このシステムでスクリーニングを行い、前述の複合的精製システムの条件最適化を行い、最終的にコモンマーモセット心筋梗塞モデルへの移植を実施した。移植後3ヶ月の後、解剖により各臓器を調査したが、腫瘍は見出されず、心臓組織の切片による詳細解析においても、移植した心筋細胞以外の細胞は見出されなかった。以上のことから、2つの心筋細胞精製方法をタンデムに組み合わせることによって、コモンマーモセットES細胞由来心筋細胞を高度に精製し、造腫瘍性を消失させることに成功した。

(2) 移植治療効果の検証。

(結果)

コモンマーモセット心筋梗塞モデル Sham 群 5 匹、1×10<sup>6</sup>の6乗細胞の移植治療群5匹を作製した。免疫抑制は、サイクロスポリン 8mg/kg を術前1日から毎日筋肉内に投与を実施した。心筋梗塞は、左冠動脈前下降枝の特定部位を4-0 ナイロン糸付針にて完全結紮して作製した。心筋梗塞の作製の成否は、モニター心電図におけるS-T上昇変化をもって判断した。心筋細胞は、心筋梗塞作製時に3箇所に分けて注入した。心エコーによる心臓機能評価を術前、術後1ヵ月ごと3ヶ月まで実施した。短軸内腔短縮率(%FS)を指標とした心機能評価において、移植1ヵ月後、移植群は、Sham 群に比べて有意に心臓機能が維持されていた。しかし、2ヵ月後、3ヵ月後共に、有意差を消失した。3ヵ月後の心臓切片を作製し観察したところ、移植群では、追跡マーカーである GFP 陽性、免疫染色でアクチニン陽性である、マーモセット ES 細胞由来心筋細胞塊(グラフト細胞)が残存していた。心臓切片のアザン染色から、心臓体積に対する梗塞体積の比を求めたところ、Sham 群、移植群共に差が無かった。

(考察)

同種移植による長期生着の確認

ヒト iPS 細胞をラットやブタに移植した場合、殆どの報告では、短期に移植細胞は消失してしまう。これは、異種移植における免疫拒絶作用、液性因子のミスマッチによる死滅などが原因として考えられた。そこで、本研究では、同種移植に着目して移植実験を実施すると共に、対象動物をよりヒトに近い霊長類とすることで、ヒト細胞によるヒト治療により近いシステムとすることを目指した。この結果、移植3ヶ月、最長4ヶ月においても、マーモセット ES 細胞由来心筋細胞の生着を認めた。これは、予想したとおりに、同種間の細胞移植治療では、免疫抑制方法における技術的なボトルネックは回避可能であることが示唆できた。

移植治療効果の確認

移植1ヵ月後、移植群は、Sham 群に比べて有意に心臓機能が維持されていた。しかし、2ヵ月後、3ヵ月後共に、有意差を消失した。移植細胞の生着は確認されたが、梗塞サイズの縮小には寄与できなかった。以上のことから、移植した心筋細胞は、体積として梗塞を十分に補うだけの量は生着していなかった。以上のことから、梗塞サイズの縮小に寄与するだけの大量の心筋細胞を移植することによって、さらなる治療効果を得られるかどうかについての検証課題は残された。しかし、移植細胞の生着は確認された上で治療効果が短期的であったことから、パラクラインによる治療効果は長期的には期待できないことが示唆された。

以上のことから、今後の課題としては、より多くの心筋細胞を移植すること、およびパラクラインにとどまらず、収縮機能を補い得る心筋細胞の移植治療方法の確立を目指す必要があることが分かった。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

服部文幸、山下裕美、Progress of a heart cell-therapy model system in Common Marmoset

using Embryonic stem cells

日本マーモセット研究会 2012年2月22日~24日 東京医科歯科大学 鈴木章夫記念講堂

〔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〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

服部 文幸 (HATTORI Fumiyuki)  
慶應義塾大学・医学部・循環器内科  
講師 (非常勤)  
研究者番号：50398624

### (2) 研究分担者

山下 裕美 (YAMASHITA Hiromi)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号：30594890

扇野 泰行 (OUGINO Yasuyuki)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20598916

### (3) 連携研究者

佐々木 えりか (SASAKI Erika)  
公益財団法人 実験動物中央研究所  
応用発生学研究部・部長  
研究者番号：70390739

伊藤 豊志雄 (ITO Toshio)  
公益財団法人 実験動物中央研究所  
マーマセット研究部・部長  
研究者番号：20106644