

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659669

研究課題名（和文）iPS細胞由来心筋細胞移植の臨床応用を目指した基盤技術の開発

研究課題名（英文）Development of new treatment of heart failure using induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes

研究代表者

西 宏之 (NISHI HIROYUKI)

大阪大学・医学系研究科 助教

研究者番号：00529208

研究成果の概要（和文）：

ヒト iPS 細胞を培養し、新しく開発した方法にて心筋細胞への分化を誘導し、温度感応性培養皿を用いて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、心機能が改善した。また、移植後 2 週間目に、Spring8 にて放射光を照射することにより、移植した iPS 細胞由来心筋細胞シートが、梗塞心筋への移植後、自己拍動を続けこれが心機能の向上に寄与していることが示唆された。つづいて、心筋細胞シートのブタ心筋梗塞モデルへの移植を行ったところ、同様に心機能が向上した。

研究成果の概要（英文）：

Induced pluripotent stem cells (iPS cells) of human origin were cultivated and differentiated to cardiomyocytes by originally developed protocol. Cardiomyocyte cell-sheet was then generated from the cardiomyocytes derived from the iPS cells. Transplantation of cardiomyocyte cell-sheets into the infarct heart induced functional integration of the iPS cells-derived cardiomyocytes into the cardiac tissue, contributing to functional recovery, in a rat and a porcine model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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・心筋細胞シート・心筋梗塞・心不全

1. 研究開始当初の背景

現在、重症心不全に対する最終的な治療法としては補助人工心臓や心臓移植などの置換型治療などの置換型治療が行われており、その有用性が報告されてきたが、前者は耐久性や合併症など、後者はドナーの確保や免疫抑制剤の使用などの問題がある。近年、こういった重症心不全に対し、遺伝子工学や細胞

組織工学、再生医学を駆使した再生型治療が新規治療法として注目されている。本研究者はこれら再生型治療の実現に向け研究を行ってきた。実際に、これら重症心不全症例に対し、自己骨格筋芽細胞移植を臨床応用しており、有効な結果を得ている。この自己骨格筋芽細胞移植は、それが分泌するサイトカインが自己の残存心筋に働くことによって、

血管新生や線維化抑制を引き起こし、心機能を改善すると考えられる。しかし、より重症の末期心不全症例では、残存する心筋細胞自体が少ないため、この機序による心機能改善効果は限定的であることが予想される。このような症例に対しては、心筋細胞自体を移植することにより、心機能を改善することが必要であるため、心筋幹細胞や体性幹細胞、さらには胚性幹細胞を分化誘導することにより、心筋細胞を獲得する手段が構築されてきた。しかし、前者は細胞源の採取や培養効率などの問題があり、後者は胚を用いることによる倫理的問題がある。このような状況の中、この問題を解決し得る細胞源として、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が開発され注目されている。本研究者らは iPS 細胞から分化誘導して得られた心筋細胞を、小動物に移植し、その心機能改善効果を確認しているが、この iPS 細胞由来の心筋細胞が生着し、自己の心筋と機械的、電気的に接続することで、心機能回復に寄与しているかは未だ解明されていない。

2. 研究の目的

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は心筋細胞へ分化することが知られているが、本細胞を臨床応用するための前段階として、細胞を安定的に培養し、分化した心筋細胞の電気的、組織学的特性を十分に評価することが必要である。そこで、本研究では iPS 細胞を大量かつ効率的に心筋細胞に分化させ、細胞レベルでの微細構造および電気生理学的特性を評価すると共に、細胞シート作製技術を用いて、重症心不全モデルラットに移植し、生体内での機械的、電気的接続と、その心機能改善効果について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞由来心筋細胞シートの作成と評価

ヒトあるいはマウス由来の iPS 細胞を培養し、主に Wnt を用いて心筋細胞への分化誘導を行った。続いて、この心筋細胞を温度感応性培養皿を用いてシート化することにより、心筋細胞シートを作成した。この心筋細胞シート中の心筋細胞の比率や、心筋細胞シートの電気生理的機能を MED System により評価した。

(2) 心筋細胞シートの梗塞心への移植

ヌードラットおよびミニブタの梗塞心モデルを作成し、開胸下に左心室表面に iPS 細胞由来心筋細胞を移植した。

(3) 移植された心筋細胞の機能評価

iPS 細胞由来心筋細胞シートを移植されたラットにおいては、心機能を心臓超音波検査にて、また心表面の電位を MED システムを用いて経時的に観察した。また、Sping8 において放射光を移植部位に照射することにより、Actin-Myosin の重合を観察した。また、iPS 細胞由来心筋細胞シートを移植されたブタにおいては、心機能の詳細を Speckle Tracking Echo 法や CT scan を用いて経時的に検討した。

(4) 移植された心筋細胞の形態的評価

iPS 細胞由来心筋細胞シートを移植されたラットおよびブタの心筋組織から、切片を作成し、免疫組織学的に検討した。

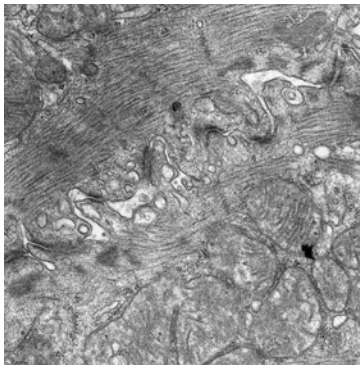
4. 研究成果

(1) iPS 細胞の心筋分化効率

ヒト iPS 細胞を培養し、新しく開発した方法にて心筋細胞への分化を誘導したところ、90%程度の細胞が自己拍動し、心筋細胞に特異的な表面抗原を発現していた（論文業績1、2）。これら iPS 細胞由来心筋細胞は幼弱な心筋細胞の Phenotype を発現していたが、これを Ex vivo にて収縮弛緩あるいは、心臓に移植することにより、成熟型に変化することが示された（論文業績1）。

(2) 心筋細胞シートの小動物への移植

iPS 細胞由来心筋細胞より温度感応性培養皿を用いて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。比較対照群として、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気的統合は起こらず、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（図1）（学会発表4）。



(図1：心臓への移植後のiPS細胞由来心筋細胞の電子顕微鏡像)

また、同様の方法を用いてマウスiPS由来心筋細胞シートを慢性梗塞ヌードラットの梗塞領域に移植した。移植後2週間目の個体をSpring8に搬入し、移植したiPS細胞由来心筋細胞シートに放射光を照射し、actin/myosinの構造体の有無、in vivoにてactin/myosinが重合し、iPS由来心筋細胞がin vivoで機能しているか観察したiPS由来心筋細胞シート移植群では、全ての個体でteratomaの形成を認めたが、BL40XUにおけるdiffraction解析では、このteratomaと梗塞部位の境界領域に心筋回折像が確認できた。標本の免疫組織染色では、teratomaの部位は全てiPS細胞由来であり、心筋回折像が確認できた部位に一致して、心筋骨格蛋白の発現および横紋構造を示す細胞群の存在が確認された。これらの結果より、得られた心筋回折像は移植されたiPS細胞由来であることが証明された。

(3) iPS細胞由来心筋細胞のブタ梗塞心モデルへの移植

ヒトiPS細胞由来心筋細胞シートを、免疫抑制ミニブタの梗塞心に移植したところ、移植部位に一致して心機能が向上することが示された。心機能向上のメカニズムは、移植された心筋細胞の機械的な直接効果に加えて、パラクライン効果も寄与していることが視された(論文業績3)。これは、iPS細胞由来心筋細胞を用いた心不全治療の大動物を用いて世界で初めてのPOC試験である。

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3件)

- ① Yu T, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura M, Kawamura T, Ito E, Kawaguchi N, Sawa Y, Matsuura N. In vivo differentiation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ J*. 2013 Apr 25;77(5):1297-306. Epub 2013 Feb 8. <http://dx.doi.org/10.1253/circj.CJ-12-0977> 査読有
- ② Miki K, Uenaka H, Saito A, Miyagawa S, Sakaguchi T, Higuchi T, Shimizu T, Okano T, Yamanaka S, Sawa Y. Bioengineered myocardium derived from induced pluripotent stem cells improves cardiac function and attenuates cardiac remodeling following chronic myocardial infarction in rats. *Stem Cells Transl Med*. 2012 May;1(5):430-7. doi: 10.5966/sctm.2011-0038. Epub 2012 May 14. 査読有
- ③ Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura T, Kuratani T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation* 2012; 126:S29-37. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084343 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① Masashi Kawamura. Development of Vascular-Rich Tissue Containing Cardiomyocytes Derived from Human iPS Cells in vivo. American Heart Association Scientific Meeting 2012. 2012年11月3-7. ロサンゼルス・コンベンションセンター. 米国
- ② 福嶋五月. iPS細胞由来心筋前駆細胞シートによる重症心不全治療の縦断的開

- 発. 第11回日本再生医療学会総会. 2012年6月12-14. パシフィコ横浜
- ③ 川村 匡. ミニブタ虚血性心筋症モデルに対するヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの治療効果の検討. 第11回日本再生医療学会総会. 2012年6月12-14. パシフィコ横浜
- ④ Takahiro Higuchi. In Vivo Functional Evaluation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Implanted into the Rat Chronic Infarction Model. American Heart Association Scientific Meeting 2011. 2011年11月12-16. オーランドコンベンションセンター 米国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 宏之 (NISHI HIROYUKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00529208

(2) 研究分担者

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

倉谷 徹
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号：90448035

宮川 繁
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70544237

吉川 泰司
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40570594

福嶋 五月
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80596867