

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19521

研究課題名（和文）自己細胞を用いた心臓再生への挑戦

研究課題名（英文）Cardiac repair using autologous iPS cells

研究代表者

柴 祐司（Shiba, Yuji）

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：70613503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、霊長類iPS細胞由来心筋細胞を心筋梗塞発症後3か月経過した慢性心筋梗塞モデルに自家移植し、他家移植との比較を通じて優位性を検証し、免疫抑制剤を使用せずに細胞が長期生着するかを確認した。1）iPS細胞由来心筋細胞の作製：カニクイザルのiPS細胞を5系統作製した。さらに未分化iPS細胞から心筋細胞を作製し、凍結保存した。2）前臨床移植試験：全身麻酔下でカニクイザル心筋梗塞モデルを作製した。心筋梗塞作製12週間後に、自家移植、他家移植、およびvehicle移植を行った。自家移植ではグラフト心筋細胞の生着が確認されたが、他家移植では著明な免疫応答が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己細胞を用いた心臓再生は、ドナー不足だけでなく、免疫抑制剤の長期使用を解決するための理想的なストラテジーであるが、実現するためには、自家移植の免疫学的優位性の証明と慢性心不全に対する治療効果の検証が必要である。

本研究ではアカデミアにおいて、これらの課題を解決し、理論的に自己細胞を用いた心臓再生が可能であることを証明できた。研究成果をきっかけとして、産学官が一体となって、安価な培養試薬の開発、効率的な細胞製造プロトコルの確立、実効性の高い品質規制などの課題に取り組み、自己細胞を用いた再生医療の普及を目指す。

研究成果の概要（英文）：This study compared autologous and allogeneic transplantation of cardiomyocytes derived from primate iPS cells in a chronic myocardial infarction model. Five lines of cynomolgus monkey iPS cells were created. These were differentiated cardiomyocytes, which were cryopreserved. Five monkeys were used for autologous transplantation and ten for allogeneic. In preclinical trials, monkeys underwent surgery to induce myocardial infarction. Twelve weeks later, they received autologous, allogeneic, or vehicle transplantation. Four weeks post-transplantation, the hearts were analyzed for graft survival, immune rejection, and tumor formation. Autologous transplants showed graft cardiomyocyte survival, while allogeneic transplants exhibited significant immune rejection. No tumors were detected in either group. This indicates autologous iPS cell-derived cardiomyocytes can survive without immunosuppressants, highlighting their potential for treating chronic myocardial infarction.

研究分野：循環器内科

キーワード：心不全 再生医療 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

日本における心不全患者数は約 120 万人と推定され、今後も更に増加することが確実である。心不全に対する内科的・外科的治療は、病気の進行抑制には有効であるが、病気を根本的に治癒させることは出来ない。重症心不全に対する唯一根本的な治療法は心臓移植であるが、ドナー不足は深刻である。そこで、心臓移植に代わる新たな治療法として、多能性幹細胞を用いた再生医療が注目され、臨床応用が開始されつつある。現在計画されている臨床研究では、バンク化された ES 細胞または iPS 細胞から事前に心筋細胞を作製し、病気を発症した患者に他家移植する。この手法では、品質管理された細胞が比較的安価で迅速に供給できる利点がある一方、レシピエント患者は生涯にわたる免疫抑制剤治療を受ける必要がある。自家 iPS 細胞を用いた心筋再生が理想的であるが、これまで自家 iPS 細胞由来心筋細胞移植において、免疫抑制剤を使用せずに移植細胞が長期生着するか証明されていない。また、これまでの前臨床試験では心不全発症 1 か月以内に移植治療が行われ、有効性が示されてきたが、慢性期の心不全に対する心筋細胞移植の有効性は示されていない。自家 iPS 細胞由来心筋細胞作製には時間を要し、急性期に移植治療は出来ないことから、慢性心不全に対する有効性の検証が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、霊長類 iPS 細胞由来心筋細胞を心筋梗塞発症後 3 か月経過した慢性心筋梗塞モデルに自家移植し、他家移植に対する優位性を検証するとともに、免疫抑制剤を使用せずに細胞が長期生着するか確認する。さらに慢性心筋梗塞モデルにおける心機能改善効果や移植後不整脈の発生頻度についても検討する。

3. 研究の方法

1) カニクイザル iPS 細胞由来心筋細胞の作製とレシピエントカニクイザルの同定

フィリピン産カニクイザル 5 頭から、皮膚組織由来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 5 系統作製する。未分化 iPS 細胞に対して、アクチビン A、BMP 4 を加えることにより、レシピエント 1 頭当たり 4×10^8 個の心筋細胞を作製し、凍結保存する。レシピエント動物として、自家移植用の 5 個体とは別に 10 個体を用意し、他家移植および vehicle 用とする。他家移植用個体はドナー細胞と主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 型が異なる個体であることを確認する。

2) 霊長類前臨床移植試験

全 15 個体に対して、全身麻酔下で開胸し、左冠動脈前下行枝中部で血流を遮断し、3 時間後に再灌流することにより心筋梗塞モデル (ischemia/reperfusion injury) を作製する。心筋梗塞作製 12 週間後の慢性期に、自家移植 (N=5) または他家移植 (N=5)、vehicle 移植 (N=5) を行う。移植前後で Holter 心電図による不整脈発生の評価と、心エコー、心臓 CT による心機能評価を行う。移植 4 週間後に心臓を摘出し、移植心筋の

生着と拒絶反応の評価、腫瘍形成の有無について組織学的に評価する。自家移植群中の2頭に関しては、12週間経過観察し、長期的な移植細胞の生着と腫瘍形成の有無を評価する。

4. 研究成果

本研究では、霊長類 iPS 細胞由来心筋細胞を心筋梗塞発症後 3 か月経過した慢性心筋梗塞モデルに自家移植し、他家移植との比較を通じて優位性を検証し、免疫抑制剤を使用せずに細胞が長期生着するかを確認した。1) iPS 細胞由来心筋細胞の作製: カニクイザルの iPS 細胞を 5 系統作製した。さらに未分化 iPS 細胞から心筋細胞を作製し、凍結保存した。2) 前臨床移植試験: 全身麻酔下でカニクイザル心筋梗塞モデルを作製した。心筋梗塞作製 12 週間後に、自家移植、他家移植、および vehicle 移植を行った。自家移植ではグラフト心筋細胞の生着が確認されたが、他家移植では著明な免疫応答が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi Hideki, Tohyama Shugo, Ichimura Hajime, Kadota Shin, Haga Kotaro, Moriwaki Taijun, Morita-Umei Yuika, Umei Tomohiko C., Sekine Otoy, Kishino Yoshikazu, Kanazawa Hideaki, Kawagishi Hiroyuki, Yamada Mitsuhiro, Narita Kazumasa, Naito Takafumi, Seto Tatsuichiro, Kuwahara Koichiro, Shiba Yuji, Fukuda Keiichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Regeneration of Nonhuman Primate Hearts With Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Spheroids	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.123.064876	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 -

1. 著者名 Shiba Naoko, Yang Xiao, Sato Mitsuto, Kadota Shin, Suzuki Yota, Agata Masahiro, Nagamine Kohei, Izumi Masaki, Honda Yusuke, Koganehira Tomoya, Kobayashi Hideki, Ichimura Hajime, Chuma Shinichiro, Nakai Junichi, Tohyama Shugo, Fukuda Keiichi, Miyazaki Daigo, Nakamura Akinori, Shiba Yuji	4. 巻 34
2. 論文標題 Efficacy of exon-skipping therapy for DMD cardiomyopathy with mutations in actin binding domain 1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 102060 ~ 102060
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtn.2023.102060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Yuki, Kadota Shin, Zhao Jian, Kobayashi Hideki, Okano Satomi, Izumi Masaki, Honda Yusuke, Ichimura Hajime, Shiba Naoko, Uemura Takeshi, Wada Yuko, Chuma Shinichiro, Nakada Tsutomu, Tohyama Shugo, Fukuda Keiichi, Yamada Mitsuhiro, Seto Tatsuichiro, Kuwahara Koichiro, Shiba Yuji	4. 巻 14
2. 論文標題 Mature human?induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes promote angiogenesis through alpha-B crystallin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-023-03468-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Hideki, Tohyama Shugo, Kanazawa Hideaki, Ichimura Hajime, Chino Shuji, Tanaka Yuki, Suzuki Yota, Zhao Jian, Shiba Naoko, Kadota Shin, Narita Kazumasa, Naito Takafumi, Seto Tatsuichiro, Kuwahara Koichiro, Shiba Yuji, Fukuda Keiichi	4. 巻 174
2. 論文標題 Intracoronary transplantation of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Inefficient procedure for cardiac regeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 77 ~ 87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2022.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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
---------	---------