

平成 30 年 8 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10212

研究課題名(和文) iPSバンクにおける三座ホモ由来他家iPS細胞由来心筋細胞シートの有用性の検討

研究課題名(英文) The impact of transplantation of cardiomyocyte sheet derived from MHC homozygous induced pluripotent stem cells

研究代表者

斎藤 俊輔 (Saito, Shunsuke)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30600126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：HLAホモ接合体を有するiPS細胞由来MHC適合移植ではMHC非適合移植と比較して有意な移植後の拒絶反応の軽減や移植細胞の生着延長を認めた。しかしMHC適合移植において免疫抑制剤なしまたは単剤では移植後の拒絶反応を十分に抑制することはできなかった。そのためMHC適合移植により移植細胞の免疫原性は軽減できるものの、より良い移植細胞の生着には免疫抑制剤が必要であることが示唆された。またMHC非適合移植においても移植後2ヶ月以降も非治療群と比較して有意な心機能改善効果を認めた。このことからMHC非適合移植も臨床における心不全治療となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：MHC-matched transplantation using homozygous MHC haplotype iPSC-CMs displayed better engraftment and less immune-cell infiltration in the graft in MHC-mismatched transplantation. However, MHC-matched transplantation with single or no immune-suppressive drugs still induced a substantial host immune response to the graft. Thus, the immunogenicity of allogeneic iPSC-CMs was reduced by MHC-matched transplantation although a requirement for appropriate immune suppression was retained for successful engraftment. Although MHC-homo-iPSCs are preferred to avoid immune rejection, MHC-mismatched iPSC-CMs can also induce comparable cardiac functional recovery at late follow-up, suggesting that MHC-mismatched iPSC-based cardiac regenerative therapy with immunosuppressants may be a feasible option for treating heart failure in clinical setting.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：心不全治療 再生医療 移植後拒絶反応 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

うっ血性心不全は、多くの先進国の中で主要死亡原因のひとつとなっており、日本においても高齢化社会を迎えるにあたってその患者は増え続けることが予想されている。心不全に対する効果的な治療法は限られており、末期的心不全という状況に陥った場合には、心臓移植あるいは人工心臓の永久的使用以外には証明された効果的な治療がない。しかしながら心臓移植におけるドナー不足や免疫抑制剤の副作用、人工心臓装着後の合併症など乗り越えるべき問題は大きい。これら治療は限られた患者しか受けることが出来ず、より汎用性・安全性の高い治療法の開発が急務である。自己組織から得られた体性幹細胞を増殖させて心臓に投与するという細胞移植療法は、基礎実験に始まり、一定の治療効果が数々の臨床試験を通じて証明されつつある。我々はこれまで細胞をシート化する技術を用いてより効果的な細胞移植の方法を開発してきた。重症心不全に対する自己骨格筋由来筋芽細胞シート移植治療はすでに臨床応用が開始されている。

しかしながら、その治療効果の主なメカニズムは、移植された細胞が様々な内因性修復因子を放出することにより、自己心の修復機転を向上させるという“パラクライン効果”であり、心筋細胞が極限まで減少していることが病態の主体となっている末期的心不全においては、治療効果が十分でないものと理論づけられる。これに対して、iPS細胞はその増殖能及び多分化能から、増殖させて心筋細胞にまで分化させてから心臓に投与することにより、心筋細胞数を増加させるという、末期的心不全に対する心筋再生治療を可能にすることが期待されている。

iPS細胞由来心筋細胞移植療法を臨床応用するまでには、腫瘍形成、大量培養、生着など様々な克服すべき問題がある。現在のところ、iPS細胞由来心筋細胞を末期的心不全治療に使用する際には、iPS細胞作成および分化誘導の安定性、迅速な治療の必要性から、あらかじめ樹立し、安全性、分化誘導効率などの検討がなされたiPS細胞株を複数用意した、細胞バンクからの同種他家移植が現実的と考えられている。その際に問題になるのは、他家iPS細胞由来心筋細胞の抗原性に対する宿主免疫反応である。そこで考えられる解決策の一つが、細胞バンクから可能な限り主要組織適合抗原 (Major Histocompatibility Complex: MHC) のマッチしたiPS細胞を選択して移植する方法である。これまでの臨床における臓器移植の知見から、移植ドナーとレシピエントの間で、ヒトのMHCであるHLA (Human Leukocyte Antigen) のA,B,DRB1の3座の一致率が高ければ高いほど移植後の拒絶反応が起きにくいことが

知られている。さらに、日本人を対象とした研究で、HLA-A, B, DR 3座の頻度の高い型のホモ接合の株を50株用意すれば、日本人口の90%でHLAの3座が一致するiPS細胞株を選択できることが報告されており (Nakatsuji N, et al. Nat Biotechnol 2008;26:739-40)、ほとんどの患者のHLAタイプに適合するiPS細胞を細胞バンクに用意することは現実的に不可能ではないことも分かってきた。

しかしながら、他家iPS細胞由来の心筋細胞移植における免疫反応の重要性はこれまで十分に検討されておらず、さらには霊長類においてMHCのマッチングの程度が移植後の効果、治療成績にどのような影響を及ぼすかはいまだに研究されていない。本研究ではMHC 3座ホモ接合iPS細胞由来の他家心筋細胞移植を行い、MHC適合性が治療効果に及ぼす影響を検討する。

さらに本研究においては、この治療法の臨床応用を念頭に置き、細胞種、免疫系統ともによりヒトに近い条件での研究を行う。フィリピン産のカニクイザルにはMHCをホモ接合で有する個体が複数確認されており (図3)、それらの個体からすでにiPS細胞株が樹立されている。今回はこのカニクイザルおよびこのカニクイザルから樹立されたiPS細胞株を用いることで、ヒトにより近い免疫条件での治療効果を検討する。

2. 研究の目的

本研究では、霊長類を用いてMHCの3座がホモ接合であるiPS細胞由来の他家心筋細胞移植を行い、ドナー・レシピエント間のMHC適合性が治療効果に及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

MHCホモカニクイザル (HT1ホモ) より樹立したiPS細胞株 (1123C1-G) をHT1ヘテロカニクイザル、HT1を有しないコントロールカニクイザルへ皮下移植することにより、MHC一致他家移植における免疫抑制剤の至適投与量を検討した。免疫抑制剤の種類は、心臓移植で通常用いられているカルシニューリン阻害剤、代謝拮抗薬、ステロイドの3剤を併用した。移植細胞とレシピエントのMHC (主要組織適合遺伝子複合体) の組み合わせを、完全一致、部分一致、不一致に分類し、2か月以上の長期の生着に対する効果を評価した。

また移植細胞の生着と拒絶反応の評価については、1123C1-Gに導入されたGFPの蛍光を観察することで評価した。観察終了時 (移植後2か月) に組織化学的検討によりリンパ球の移植組織への浸潤を比較検討を行った。(図表1)

また心臓におけるMHC適合移植の有用性と心機能に与える影響を調べるため、カニクイザル心筋梗塞モデルにおけるMHC適合iPS細胞由来心筋シート移植による心機能改善効果を検討した。移植後6か月にわたり、継続的にMulti Detector CTを用いて、心機能

を解析した。また観察期間中に GFP 蛍光を開胸にて測定し、iPS 細胞の生着を評価した。観察終了時(移植後 6 か月)に組織化学的検討により細胞残存の詳細、血管新生の定量的評価、線維化の比較検討を行った。(図表 2)

4. 研究成果

(1) 3 剤投与下の MHC 非適合移植では、CD3 陽性リンパ球の浸潤を伴う拒絶反応を生じ、2 ヶ月以降の生着は見られなかったのに対し、MHC 適合移植では 2 ヶ月以上の移植細胞の生着を認めた。(図表 3、4) また、MHC 適合移植であっても、タクロリムス単独投与や免疫抑制剤を投与しない群では 2 ヶ月以内に拒絶され、生着が見られなかったため、MHC 適合移植であっても免疫抑制剤は 3 剤必要であることがわかった。

(2) 心臓へのシート移植において MHC 適合 iPS 細胞由来心筋シート移植群では移植後 28 日までは Sham 群と比較し、有意な蛍光強度の上昇を認めていたが、6 ヶ月の時点では消失していた。(図表 5)

(3) MDCT (Multi-Detector CT) にて心機能を評価したところ、iPS 細胞非移植群においては左室リモデリングの進行により、左室容積は拡大傾向を示し、左室駆出率は低下していくのに対し、iPS 細胞移植群では左室リモデリングの進行が抑制され、左室駆出率の改善を認め、3 ヶ月後も維持されていた(図表 5)。また、左室壁応力を表す Global wall stress も iPS 細胞移植群において改善を認めた。

(4) MHC 適合群と非適合群の両群において、無治療群と比較し、移植後 1 カ月で、左室体積 (LVEDV および LVESV) は減少し左室駆出率 (LVEF) は上昇し、6 カ月後まで心機能は維持された。しかし、非適合群では、移植細胞消失後の 4 か月目にはやや心機能の悪化傾向を認めた。非適合群において、免疫抑制剤中止群と連続群で、移植細胞の生着期間や心機能に差はなかった。(図表 6)

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 1 件)

Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Maeda A, Kashiya N, Kawamura A, Miki K, Okita K, Yoshida Y, Shiina T, Ogasawara K, Miyagawa S, Toda K, Okuyama H, Sawa Y. Cardiomyocytes Derived from MHC-Homozygous Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Reduced Allogeneic Immunogenicity in MHC-Matched Non-human Primates. Stem Cell Reports. 2016 Mar 8;6(3):312-20.

〔学会発表〕(計 1 件)

Kashiya N. Immunogenic Verification of MHC-homo iPS Cell-derived Cardiomyocytes Transplantation to an MHC-matched

Non-human Primate Ischemic Cardiomyopathy Model: Pre-clinical Study for Allogeneic Therapy Using iPS Cells (AHA 2015)

など

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 俊輔 (SAITO, Syunsuke)
大阪大学医学系研究科助教
研究者番号：30600126

(2) 研究分担者

宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)
大阪大学医学系研究科寄附講座特任教授
研究者番号：70544237

福嶋 五月 (FUKUSHIMA, Satsuki)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター病院院長
研究者番号：80596867

秦 広樹 (HATA, Hiroki)
大阪大学医学系研究科寄附講座講師
研究者番号：80638198

(3) 連携研究者

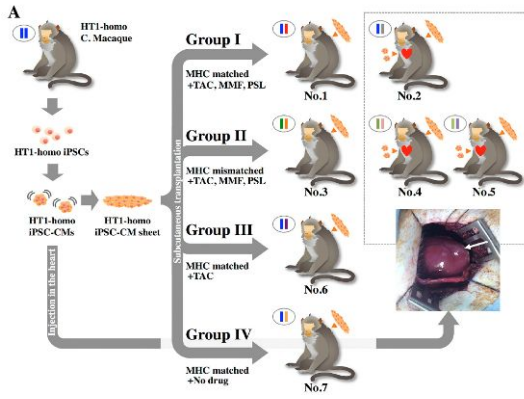
()

研究者番号：

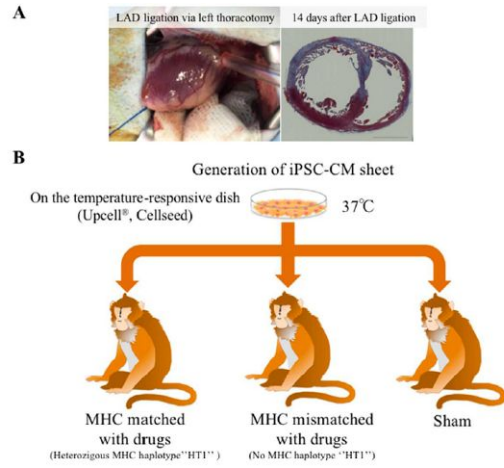
(4) 研究協力者

()

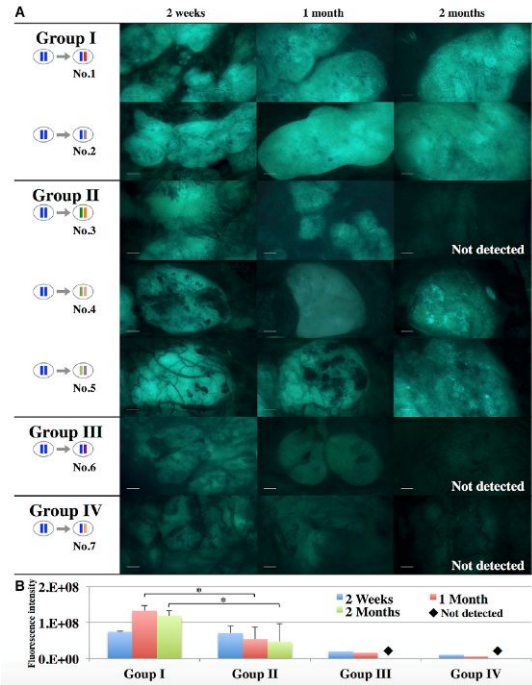
图表 1



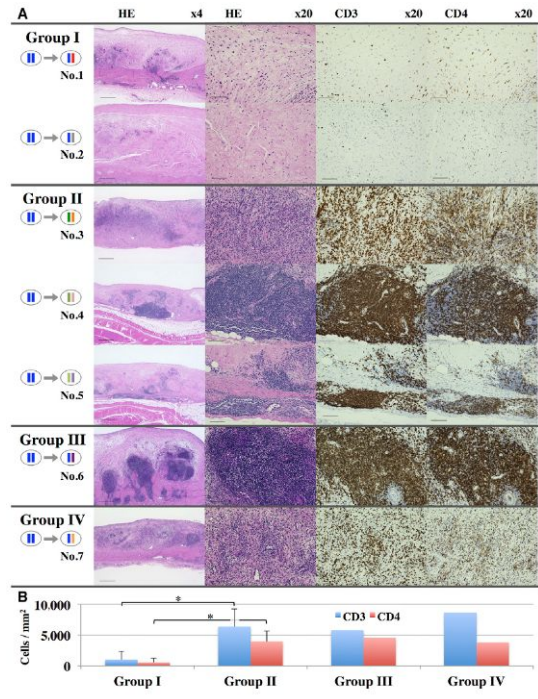
图表 2



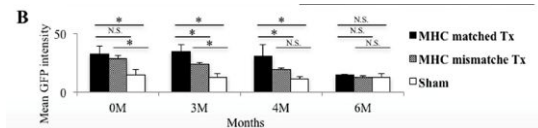
图表 3



图表 4



图表 5



图表 6

