

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 9 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16589

研究課題名(和文)慢性心筋梗塞に対する自家iPS細胞を用いた心筋再生療法の開発

研究課題名(英文)Development of heart regenerative therapy for old myocardial infarction by autologous transplantation with iPSC-derived cardiomyocytes

研究代表者

市村 創 (Ichimura, Hajime)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号：40749115

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文):慢性心筋梗塞に対する自家iPS細胞由来心筋細胞を用いた心筋再生療法の開発に向けて、カニクイザルiPS細胞の作製を行った。自家細胞移植では、移植細胞の同定するための標識遺伝子導入が必要となるため、標識遺伝子として改変GFPであるGCaMPを用いてiPS細胞への遺伝子導入も実施した。遺伝子導入したiPS細胞を用いて、心筋細胞への分化誘導を実施したが、分化誘導効率の低さのため、現在心筋分化誘導効率の改善にむけて実験中である。今後、心筋分化誘導効率の改善が得られ次第、カニクイザル慢性心筋梗塞モデルを作成、細胞移植実験を実施予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞)を用いて、国内外で心筋再生療法の研究が進められており、大動物を用いた移植実験も複数実施されているものの、それらはいずれも我々の発見した多能性幹細胞由来心筋細胞の移植後に生じる不整脈の原因究明、解決に関わるものである。本研究は多能性幹細胞を用いた心筋再生療法を臨床応用するにあたり想定される、最も実臨床に近い実験モデルであり、本研究の結果により大きく臨床応用への道が開けると考えられる。今回の研究成果では、iPS細胞への遺伝子導入終了、心筋細胞への分化誘導までに留まったが、今後準備が整い次第、速やかに動物実験への移行が期待される。

研究成果の概要(英文):We made iPSC cell (iPSC) derived from macaca fascicularis to develop new heart regenerative therapy for old myocardial infarction by autologous transplantation. Gene induction into transplanted cells is needed to detect the grafts in autologous transplantation study. So, we performed GCaMP gene; GFP-modified gene, induction into monkey iPSCs. Now, we have been trying to establish how to make monkey iPSC-derived cardiomyocytes efficiently. We plan to carry out cell transplantation into monkey heart, as soon as required amount of iPSC-derived cardiomyocytes are prepared.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：慢性心筋梗塞 自家移植 心筋細胞 iPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における心筋梗塞患者は近年やや減少傾向にはあるものの、依然として多く(人口10万人あたり50人(男性)程度)過去30年では症例数が倍増している。薬物治療や血行再建治療は病気の進行予防に有効であるが、梗塞により障害された心筋への根本的な治療とはならない。これは、心筋細胞の極めて低い自己再生能に起因している。すなわち、病気によって一旦障害された心機能の改善は困難であり、虚血性心筋症による末期心不全患者においてはいまだに心臓移植が唯一の根本的な治療法である。しかし、本邦だけでなく世界的にもドナー心臓の不足は深刻な状況であり、近年の植え込み型補助人工心臓の普及に伴い、心臓移植待機中の死亡例は減少傾向にあるものの、未だに多くの心不全患者が心臓移植待機中に死亡している。さらに、心臓移植では免疫抑制剤による易感染性、植え込み型補助人工心臓では出血、血栓症、デバイス感染といった合併症を常に考慮する必要がある。

近年、こうした心筋梗塞後心不全に対する新たな治療として、多能性幹細胞(ES細胞/iPS細胞)を用いた心筋再生療法の可能性が注目されている。動物実験においては、我々を始めいくつかの研究室が多能性幹細胞を用いた心筋梗塞治療の有効性を報告している(Shiba et al. Nature 2012)。過去の報告から、同種iPS細胞由来心筋細胞移植は霊長類において急性心筋梗塞後の心臓を再生することが明らかとなったが、我々の研究を含め、これまでの動物実験には心筋再生療法を臨床応用するにあたり、二つの課題がある。

#### ・慢性心筋梗塞モデルにおける検討

過去の前臨床試験のほとんどが急性心筋梗塞モデルを対象としている。

心筋梗塞患者に対する、iPS細胞を用いた心筋再生医療の臨床応用は、様々な治療に抵抗性の慢性心筋梗塞後心不全患者から開始されることが想定される。心筋梗塞の急性期と慢性期では病態が大きく異なることから、臨床応用に向けての研究としては、慢性心筋梗塞モデルにおける治療効果の検討は必須である。

#### ・自家移植モデルでの検討

iPS細胞のES細胞に対する大きな利点として、自家細胞を用いた再生医療の可能性が挙げられる。心筋梗塞発症後急性期においては、自家iPS細胞の利用は不可能であるが、慢性期には理論上自家iPS細胞の利用が可能である。

しかし、これまでの心筋再生療法に関わる動物実験は、ほとんどがヒトiPS細胞を用いた異種移植実験であり、自家iPS細胞移植後の評価はされていない。異種移植による検討では、細胞移植後の免疫応答の評価は不可能であり、臨床応用を想定した場合の治療効果や、安全性の正確な評価も困難である。

またiPS細胞を用いた再生医療では、移植細胞の腫瘍化リスクが大きな問題である。自家移植においては移植後の免疫応答が誘発されないため、腫瘍化リスクが懸念される。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまで明らかとなっていなかった慢性心筋梗塞に対する自家iPS細胞由来心筋細胞移植治療の有効性と安全性を、霊長類モデルにおいて明らかとすることを目的とする。本研究は、霊長類を用いた、考え得る最も臨床に近い動物実験であり、本研究成果によりiPS細胞を用いた心筋梗塞後心不全治療が臨床応用に大きく近づくことが強く期待される。

### 3. 研究の方法

下記の2項目を実施する。

#### (a) in vitro: カニクイザル iPS 細胞由来心筋細胞の作製

すでにフィリピン産カニクイザルをイナリサーチ(株)より購入し、皮膚組織より作製した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系統作製し、未分化能の確認、染色体検査を行った。

単層培養したiPS細胞に対して、マトリゲル®、アクチピンA、BMP4、ベーシックFGFを添加することにより心筋細胞を作製する。これまでの研究において、既に申請者らは上記プロトコールによって、カニクイザルiPS細胞由来心筋細胞を作製できることを確認している。

このプロトコールによって、未分化iPS細胞から約2週間で、効率良く心筋細胞の作製が出来るため、心筋細胞の大量作製が可能である。移植に必要な5頭分のカニクイザルiPS細胞株から $2 \times 10^8$ 個の移植用心筋細胞を作製し凍結保存する予定である。

#### (b) in vivo: 心筋梗塞モデル作成、細胞移植と心機能/不整脈評価と組織検査(図3)

獣医師による全身麻酔下に、胸骨正中切開により開胸し、心膜剥離後、左冠動脈左前下行枝中部を絞扼し、その3時間後に血流を再開させる(虚血再灌流)ことにより心筋梗塞モデルを作製する(図4)。モデル作製12週間後に心筋細胞(n=5)またはvehicle(n=5)を細胞生着因子とともに心筋梗塞部位に直接注射により移植する。細胞移植後12週間の経過観察期間中にHolter心電図による不整脈解析に加え、心エコー、心臓CTによる心機能評価を行う。細胞移植12週間後(心筋梗塞作製24週間)に、心臓を摘出し、組織学的な解析を行う。

### 4. 研究成果

当初より、カニクイザルiPS細胞へのGCaMP遺伝子導入、心筋細胞の作製を継続してきた。助

成年度内に GCaMP 遺伝子導入は成功し、心筋細胞への分化誘導にも成功したものの、in vitro で GCaMP の蛍光が確認できず、また小動物(モルモット)を用いての in vivo 予備実験も実施したが、免疫染色で GFP 蛋白の発現が確認できなかった。その結果から、遺伝子導入部位および導入遺伝子を改変のうえ、再導入の方針とした。

導入遺伝子の再作製を実施した。ホモロジーアームの変更を行い、導入箇所の調整を行った。また、形質転換時に大腸菌内で作用する SV40 プロモーターが、細胞内で GCaMP の翻訳を阻害している可能性があったため、Cre-Loxp での当該配列の除去機構を導入することとし、遺伝子導入に用いるプラスミドの再作製を行った。ヒトでの同様のクローニングは順調行われた経緯があったが、カニクイザル iPS 細胞ではクローニングに難渋し、2019 年度に入りクローニングが終了した。

以後、iPS 細胞への遺伝子導入は比較的スムーズに実施され、続いてマトリゲル®、アクチビン A、BMP4、ベーシック FGF を添加するプロトコルを用いて心筋細胞への分化誘導を実施、現在も継続中である。今後、In vitro において心筋細胞での GCaMP の蛍光が確認出来たところで、本年度中に(2)以降の試験を速やかに実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----