

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15903

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた重症心不全治療法の有効性と安全性の確立

研究課題名（英文）Establishment of efficacy and safety for the treatment of severe heart failure using human induced pluripotent stem cells

研究代表者

中嶋 一晶（Nakajima, Kazuaki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：30594569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：純化精製したヒトiPS細胞由来心筋細胞を免疫不全マウスとラットに移植したところ血管新生を認めレシビエントの心臓に大量に生着し、腫瘍形成を認めなかった。また、移植心筋細胞はconnexin 43を発現していた。一方、純化精製せずに移植を行った群では腫瘍形成が確認された。これらの成果より純化精製によって心筋細胞を安全に長期生着可能なことが確認された。また、心不全ラットへの移植によって心筋球移植群では心機能の改善が明らかになり、移植心筋細胞はより成熟したサルコメアを有することが確認された。さらにサルスの虚血再灌流モデルを用いて心筋細胞を移植することによって心機能改善効果と催不整脈性を評価している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞由来の心筋細胞は未熟な心筋細胞であり、分化誘導後には非心筋細胞が多く含有されている。未精製あるいは純化精製後の心筋細胞が移植後長期経過観察後に腫瘍化するかどうかは明らかではなかった。本研究の成果によって、ヒトiPS細胞由来心筋細胞は移植後に長期生着し機能することが明らかになった。また、造腫瘍性と催不整脈の有無も評価しており本研究によってヒトiPS細胞由来心筋細胞の安全性と有効性が確認される。今後の臨床応用にむけて社会的インパクトは非常に大きい。今後はヒトへの臨床応用によって再生心筋細胞を用いた心不全治療が重症心不全患者の希望となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：When purified human iPS cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) were transplanted to the hearts of immunodeficient mice and rats as cardiac spheroids, the recipient-derived angiogenesis was observed in the transplanted cells, and a large amount of hiPSC-CMs were engrafted. No teratoma formation was observed. The transplanted hiPSC-CMs expressed connexin 43, which indicated they could form gap junctions for electrophysiological activity. On the other hand, tumor formation was confirmed in the non-purified hiPSC-CMs group. From these results, it was confirmed that the metabolic purification enables the safe long-term engraftment of hiPSC-CMs. Further, the improvement of cardiac function was clarified by transplantation to heart failure model of rats. It was pathologically confirmed that the hiPSC-CMs have more mature sarcomere. Moreover, effectiveness and arrhythmogenicity were evaluated by transplanting hiPSC-CMs to the ischemia-reperfusion model of monkeys.

研究分野：循環器内科

キーワード：再生医療 iPS細胞 重症心不全 心筋細胞移植 催不整脈

1. 研究開始当初の背景

内服加療によって治療困難な重症心不全は、デバイス治療を経て心臓移植の適応となる。しかし、世界中のドナー数は限られており、日本では心臓移植の数は年間 100 例にも満たない。また、移植待機期間は 3 年を超えており、待機中に命を落とすことも少なくない。それゆえ、心臓移植の代替療法として再生医療を用いた細胞移植療法が注目されている。

再生医療技術は 1998 年に米国の James A. Thomson 等が報告した Embryonic Stem(ES)細胞を含めた多能性幹細胞の発見 (Thomson JA, et al. Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.) により飛躍的に進化を遂げ、様々な組織と臓器再生を可能にした。ただし ES 細胞はヒト受精卵から得られるものであり、倫理的な問題が存在した。一方、京都大学の山中伸弥教授等は線維芽細胞から ES 細胞様の多分化能と自己増殖能をもつ細胞を誘導することに成功し、これを induced pluripotent stem cell (iPS 細胞)と命名した (Takahashi K et al. Cell. 2007;131:861-872.)。この発見により、再生医療が現実味を帯びようになり、網膜色素変性症に対してはすでに日本において iPS 細胞を使用した再生医療が臨床応用されている (Mandai M, et al. N Engl J Med. 2017 Mar 16;376(11):1038-1046.)。また、パーキンソン病等への応用も報告されている。

再生心筋細胞移植の観点からは、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を移植し長期の生着と心機能の改善、および安全性を評価した報告は極めて少ない。その一因としては iPS 細胞の分化効率が不安定であり、分化誘導後にも未分化幹細胞が残存することによって、移植後に腫瘍形成をきたしうることが考えられる。これに対して我々は心筋細胞と未分化幹細胞の代謝の違いから、グルコース、グルタミン除去、乳酸添加培地により造腫瘍性の増殖細胞と未分化幹細胞を除去して心筋細胞のみに純化精製する方法を報告した (Tohyama S, et al. Cell Metabolism 2016 Apr 12;23(4):663-74.)。分化誘導後の心筋細胞はペースメーカー細胞、心房筋細胞、心室筋細胞等で構成されているが、純化精製後の心筋細胞は主に心室筋細胞の形質を持つ。純化精製後の心筋細胞の純度は 0.001%以下であり、現在の最も精度の高い純化効率測定法であるスパイク法の検出限界以下である。さらに、ヒト心臓への細胞移植の際には 1×10^8 から 1×10^9 の心筋細胞が必要と想定されているため、大量の心筋細胞を必要とするが、我々の研究室では強制通気と多層性プレートを用いた二次元大量培養法によって臨床品質の iPS 細胞由来心筋細胞を大量培養する方法を確立した (Tohyama S, et al. Stem Cell Reports. 2017 Nov 14;9(5):1406-1414.)。これらの高効率な心筋細胞の大量培養法と純化精製法により残存未分化細胞と非心筋細胞の混入を防ぎ、腫瘍形成をきたすことなく細胞移植が可能である。さらに心臓は拍動する臓器であり、移植後に細胞が容易に拍出され生着することなく脱落してしまうことが知られている。それに対して我々の研究室では心筋細胞を 200 μ m 程度の心筋球として移植し、またゼラチンハイドロゲルを移植の媒体として用いることによって移植心筋細胞の脱落を防ぎ、生着効率を改善させることが可能であることを報告している。(Hattori, F, et al. Nature Method. 2010;7:61-66, Nakajima K, et al. PLoS One. 2015 Jul 17;10(7).)

2. 研究の目的

これまでの研究成果より、我々にはヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を純化精製し、効率よく移植し生着させる独自の方法が確立されている。純化精製された iPS 細胞由来の心筋細胞を移植することによって腫瘍性や生着効率低下といった問題を解決しうると予想される。

本研究の目的は、その仮説を証明するために、純化精製された再生心筋細胞を心筋梗塞作成後の免疫不全マウスとラットに移植することで移植後 3 ヶ月以上の長期間にわたって心機能や移植細胞の生着効率が改善されるかを評価する。さらに安全性評価として純化精製された心筋細胞の移植によって腫瘍形成と致死性不整脈の有無を評価することである。世界的にみてもヒト ES、iPS 細胞から分化させた高純度の心筋細胞を大量に培養し移植することができるのは我々の研究室のみであり、本研究によってヒト iPS 細胞由来心筋細胞移植による有効性と安全性を確立することができる。

3. 研究の方法

(1) 純化精製心筋球の移植による長期における有効性と生着性評価

心筋球を使用した細胞移植による有効性の証明のためには免疫不全ラットに心筋梗塞を作成し、その 1 週間後に再生心筋球を移植して経時的に心エコーで心機能評価を行う。最終的には圧カテーテルを使用して左室圧の評価を行う。さらに移植細胞の生着評価として移植前にレンチウイルスを使用し細胞にルシフェラーゼ活性をもたせたとうえで移植する。ルシフェラーゼ活性の評価により経時的な細胞生着の確認を行う。また最終的には組織切片を用いて免疫染色により移植細胞の生着を評価することでも複合的に細胞移植による有効性を評価する計画としている。これまでの基礎実験では、移植 2 か月の時点では心筋球で移植した群では、細胞を球とせず移植した群あるいは溶媒のみを移植した群と比較して心エコーで左室収縮機能が改善され、左室カテー

テル検査では収縮能の指標である max dp/dt、拡張機能の指標である min dp/dt も改善を認めた (European Society of Cardiology congress 2017)。再生心筋球移植による心機能の改善がサイトカイン効果等による一時的なものではないことを確認するために観察期間を延長し 3 か月以上での心機能の改善を評価し、再生心筋球移植の長期での心機能への寄与を確認する。

(2) 純化再生心筋細胞の造腫瘍性評価

安全性の評価として、腫瘍形成の有無および不整脈の解析の評価を行う。腫瘍形成の評価については、免疫不全マウス (NOG マウス) の皮下に移植最大量の 3×10^7 の純化心筋細胞を移植し経時的に評価することで安全性を証明する計画としている。これまでに行なった基礎実験では、実験群および対照群に対して 3 か月の観察を行っているがいずれも腫瘍形成は認めていない。今後、観察期間は可能な限り長期観察必要と考えられ、少なくとも移植後 4 ヶ月は観察し、さらに 6 ヶ月、1 年の観察を計画している。また腫瘍形成に対する独自の精製法による安全性の証明として、非精製心筋と精製心筋を免疫不全マウスの心臓に移植し腫瘍形成について比較を行う。純化精製前の心筋細胞の分化効率は心筋マーカーである Troponin T を使用するとおよそ 80%前後であるが、 1×10^6 個の非精製心筋細胞を精製心筋細胞と比較することによって純化精製法の有用性が確立されると予想される。本研究によって腫瘍形成の危険のない安全な再生心筋細胞の品質が評価可能である。

(3) 催不整脈性の評価

不整脈の解析として移植心筋細胞の催不整脈作用を評価するために免疫不全ラットに心筋梗塞を作製後に心電計を植込み、細胞移植の実験群 (心筋球) を溶媒のみ移植の対象群と心室性の不整脈に関して 1 か月間比較を行い観察したが結果、移植後短期間では単発の心室性期外収縮は認めるものの数は少なく、心室頻拍や心室細動などの危険性の強い不整脈の出現は全く認められなかった (ESC congress 2017)。これにより再生心筋細胞移植の急性期における不整脈に関する安全性が予想された。さらに、ラットの心拍数 400-500/分とヒトより速いため、よりヒトの心拍数に近いサルを用いたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の移植により、不整脈発現の解析を行う。

4. 研究成果

研究の主な成果

2018 度は免疫不全マウス (NOG マウス) とラット (XSCID ラット) の心臓に純化精製したヒト iPS 細胞由来心筋細胞を心筋球として移植をおこなった。免疫不全マウスへの移植後 4 ヶ月では移植されたヒト iPS 細胞由来の心筋細胞がレシピエントの心臓に大量に生着し、腫瘍形成を認めなかった。また、移植心筋組織は血管内皮細胞のマーカーである CD34 が陽性であり、移植された心筋組織はレシピエント心臓から血流を受け生着することが明らかになった。さらに移植された心筋細胞はギャップジャンクションの connexin 43 を発現しており電気生理学的活性を有することが明らかになった。一方、心筋細胞への分化誘導後に純化精製せずに移植を行った群では腫瘍形成することが明らかになった。この結果より、ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞移植には残存未分化 iPS 細胞と非心筋細胞を除去するための純化精製が必須であることが明らかになった。また、移植された iPS 細胞由来の心筋細胞がどのように生着するのかを経時的に確認するために移植前の心筋球にレンチウイルスを使用してルシフェラーゼ活性をもたせたいうで移植を行った。コントロールとして未分化 iPS 細胞を移植した実験では腫瘍形成に伴い経時的にルシフェラーゼ活性の増加を認めたが、純化精製した心筋細胞の移植では移植後に安定したルシフェラーゼ活性を認め移植部位に心筋細胞が 3 ヶ月間生着することが明らかになった。最終的に組織切片を用いた免疫染色により移植細胞の生着を評価することで複合的に細胞生着の評価を行った。抗ヒト核抗体によって同定された移植心筋細胞は移植直後よりも成熟したサルコメアを有することが確認された。さらに、クライオインジャリーを用いて心不全モデルを作製し、心筋球の移植を行った。移植後経時的に心エコーで心機能の評価を行い、心筋細胞移植群において心機能の改善を認めた。病理組織では抗ヒト核抗体陽性の心筋細胞がレシピエントの心臓に大量に生着していることが確認された。これらの成果よりヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を純化精製することによって、造腫瘍性を惹起することなく安全に長期生着させることが可能であり、心機能の改善に寄与することが確認された。

心筋再生医療の合併症として移植後の不整脈の発現が懸念されている。これまでの我々の研究成果では、免疫不全ラットの心臓へのヒト心筋細胞においては有意な不整脈を認めていない。一方、サルにサル iPS 細胞由来心筋細胞やヒト ES 細胞由来心筋細胞を移植したこれまでの研究報告では、移植後 1 ヶ月の間に心室性頻拍や促進型心室固有調律が一過性に頻発することが報告されている。それゆえ、2019 年度はカニクイザルの虚血再灌流モデルを用いてヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を移植することによって心機能改善効果と催不整脈性を評価した。移植後にサルを犠牲死させヒト心筋トロポニン特異的抗体で染色したところ、ヒト iPS 細胞由来の心筋球は心筋梗

塞後のサル心臓に長期生着することが明らかになった。また、心臓超音波検査による左室機能、ホルター心電図によって催不整脈性の有無を評価している。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞は未熟な心筋細胞であり、分化誘導後には非心筋細胞が多く含有されている。未精製あるいは純化精製後の心筋細胞が移植後長期経過観察後に腫瘍化するかどうかは明らかではなかった。また、移植された心筋細胞がレシピエントの心臓内でどのように血管新生するのか、ギャップジャンクション(コネキシン 43)の発現について長期観察後の解析が得られた。これらの結果によって、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞は移植後に長期生着し機能することが明らかになった。また、造腫瘍性と催不整脈の有無も評価しており本研究によってヒト iPS 細胞由来心筋細胞の安全性と有効性が確認される。今後の臨床応用にむけてインパクトは非常に大きい。

今後の展望

ヒト多能性幹細胞(ES 細胞、iPS 細胞)を用いた心臓再生医療は世界的に注目を集めている。米国と欧州では主に ES 細胞を用いた臨床研究が計画され、本邦では iPS 細胞を用いた臨床研究が推進されている。これまで報告されてきた動物への移植研究に用いられてきた心筋細胞はほとんどが純化精製されておらず、心機能の改善が心筋細胞そのものによるものか、trophic effect によるものなのかは明らかにされていない。また、ヒト ES/iPS 細胞由来心筋細胞の安全性の懸念として特に未分化幹細胞残存による造腫瘍性と催不整脈性がある。我々が行なったこれまでの基礎実験では、非精製の心筋細胞では高率に腫瘍が形成されることが確認されている。今後はヒトへの臨床応用によって 100%純化精製された心室筋型的心筋細胞を移植することによって造腫瘍性と催不整脈性の有無を確認し安全性を確立することが必要になる。本臨床研究により再生心筋細胞を用いた心不全治療が重症心不全患者の希望となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中嶋一晶
2. 発表標題 ヒト由来幹細胞からの治療細胞のIn vivoにおける安全性、有効性評価法の確立
3. 学会等名 第45回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 相馬雄輔, 中嶋一晶, 遠山周吾, 藤田淳, 岸野喜一, 岡田麻里奈, 田野崎翔, 染谷将太, 森田唯加, 谷英典, 金澤英明, 福田恵一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来微小心筋組織球を用いた細胞移植治療の安全性と有効性
3. 学会等名 日本循環制御医学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬雄輔, 遠山周吾, 藤田淳, 中嶋一晶, 福田恵一
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来微小心筋組織球を用いた細胞移植治療の安全性と有効性
3. 学会等名 iHFフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相馬雄輔, 遠山周吾, 藤田淳, 中嶋一晶, 岸野喜一, 岡田麻里奈, 田野崎翔, 染谷将太, 森田唯加, 谷英典, 金澤英明, 福田恵一
2. 発表標題 Large-scale production of purified human iPSC-derived cardiomyocytes for cardiac regenerative therapy
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2019年

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