

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25505004

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来再生心筋細胞を用いた難治性不整脈の治療法の開発

研究課題名(英文) Research for treatment of refractory arrhythmia with induced-pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes

研究代表者

藤田 淳 (Jun, Fujita)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10306706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞を用いた不整脈研究の条件検討には大量の心筋細胞が必要であるため、スピナーフラスコによる回転浮遊培養系を用いた心筋細胞の大量培養法の開発と効率的な心筋細胞純化精製法の開発を行った。人工ヌクレアーゼを用いて心筋細胞特異的転写因子(NKX2-5)と刺激伝導系遺伝子のプロモーター下に蛍光タンパクをノックインした組換えヒトiPS細胞を作製し、心筋細胞刺激伝導細胞への分化および蛍光タンパクの発現を確認した。大型動物への不整脈治療のための心筋細胞移植の基礎実験を行い、ブタにテレメトリー送信機を植え込み不整脈の評価系を確立した。

研究成果の概要(英文)：In order to advance the cell therapy for cardiac arrhythmia, massive amount of iPS Cells-derived cardiomyocytes are necessary. Therefore the massive suspension culture system with a spinner flask and efficient purification strategy of cardiomyocytes were invented. Artificial nucleases were used to insert the fluorescent proteins into the specific locus of cardiac-specific transcription factor (NKX2-5) and conduction system specific gene. These cell lines were specifically differentiated and analyzed. Purified cardiomyocytes were transplanted into pigs and the transplantation strategy was evaluated. Cardiac telemetry transmitters were also implanted into pigs and the evaluation system of arrhythmia was established.

研究分野：循環器内科

キーワード：再生医療 iPS細胞 再生心筋細胞 不整脈治療

## 1. 研究開始当初の背景

万能幹細胞として Embryonic Stem (ES) 細胞がヒトでは 1998 年に報告されている。(Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.) しかし、ES 細胞は胎児の細胞を用いるという倫理的な観点よりヒトの疾患への実用化は長い間疑問視されていた。山中教授のグループより induced Pluripotent Stem (iPS) 細胞が報告され、倫理的問題が克服されることで多能性幹細胞を用いた再生医療がよりいっそう現実的なものになった。(Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72.) iPS 細胞の活用により、免疫抑制剤を用いる必要のない患者自身の細胞を用いた慢性心疾患の根本的治療が現実味を帯びてきたといえる。しかし、成熟した心筋細胞に分化させるには心筋細胞の分化機序を解明する必要がある。ヒト ES 細胞、iPS 細胞から分化した心筋細胞は、ヒトの心筋細胞と同様の電気生理学的特徴を有しており、移植後ホストの心筋細胞と電気的に同期することが報告されている。QT 延長症候群を中心とする疾患 iPS 細胞を用いた不整脈の病態解明および治療法の開発の有用性も近年報告されている。(N Engl J Med 2010; 363:1397-1409)

2000 年代になり生物学的ペースメーカーという概念が現れた。(Nature 2002; 419:132-133) 最初にカテーテルアブレーションによって洞房結節、房室結節を焼却した洞不全症候群モデルや房室ブロックモデルにペースメーカー特異的遺伝子を遺伝子導入する研究が行われてきた。その後、ラットを用いた実験においてヒト ES 細胞由来の心筋細胞が心室頻拍のリエンリーの改善に有用であるという報告がある。(Nat. biotechnology 2004 10 vol22 1282-1289, Nature. 2012 Sep 13;489(7415):322-5) いずれの報告も移植による不整脈の改善効果はある程度は認めているものの、ES 細胞から分化させた心筋細胞は、ペースメーカー細胞、心房筋細胞、心室筋細胞が混在しているため実際の臨床応用にはこれらの細胞を選択的に分化誘導し、純化精製する必要がある。本研究では、各分画の心筋細胞を純化精製することでより均一な性能を持つ細胞を移植することによる不整脈の改善効果を検証する。また、未だにヒト iPS 細胞由来の分化細胞を患者さんに移植した報告はないが、本計画ではヒト iPS 細胞を用いることで今後臨床応用された場合には免疫抑制薬を必要としない長期間の移植効果を期待できる。

## 2. 研究の目的

難治性不整脈患者さんの数は多く、徐脈性不整脈の治療法に機械式の埋め込み型ペースメーカーが根治療法として用いられている。また、心筋梗塞や慢性の重症心不全の患者さんの突然死の原因となる心室性不整脈

には突然死の予防と予後改善のために埋め込み型除細動器 (ICD: Implantable Cardioverter Defibrillator) が適応となる。これらのデバイスにより不整脈患者さんの予後は劇的に改善したが、高齢化に伴いその数は激増している。さらにはデバイスを産生しているのは全て海外の会社であり、結果として健康保険料が海外に流出している。本研究の目的は、ヒト iPS 細胞からペースメーカー細胞および心室筋細胞を作製し、機械式ペースメーカーおよび ICD にかわる生物学的ペースメーカーと心室性不整脈の治療法を開発することである。

## 3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞に心筋細胞、ペースメーカー細胞、プルキンエ細胞をはじめとする刺激伝導系の細胞のマーカーである遺伝子 X のプロモーター化に TALE nuclease、CRISPER/Cas9 等の人工ヌクレアーゼを用いて DsRed 等の蛍光タンパクを挿入した Knock in ヒト iPS 細胞を作製する。人工ヌクレアーゼによる遺伝子導入には目的外の部位への遺伝子導入 (off target site) をさけるためにサザンブロットを用いて遺伝子導入を確認する。この心筋細胞および刺激伝導系特異的 iPS 細胞を心筋細胞および刺激伝導系細胞に分化誘導および純化精製し、DsRed 等の蛍光タンパクを発現した細胞を心筋細胞特異的マーカーによって免疫染色を行い目的細胞への分化効率を確認する。また、同時に Wnt 阻害剤や Bmp、Activin 等の心筋細胞の分化誘導を促進する因子の用量を変えて添加することにより効率よく心筋細胞へと分化誘導可能な大量培養プロトコルを作成する。移植実験を効率よく進めるために未分化 iPS 細胞を効率よく除去する事が可能な心筋細胞の純化精製法を確立する。

さらに、純化ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞を用いてブタへのヒト iPS 細胞由来心筋細胞の移植実験を行い、免疫抑制剤を用いて不整脈治療のための移植条件を検討する。また、心電図テレメトリーを用いて不整脈評価法を確立する。

## 4. 研究成果

(1) 平成 25 年度は、ヒト iPS 細胞からの心筋細胞分化法を検討し、効率の良い分化法を確立した。また、今後心室性不整脈の改善のために心室への心筋細胞移植のためには梗塞巣への失われた組織を補填するための大量の心筋細胞が必要であり、細胞の品質や in vitro と in vivo での研究の条件検討をおこなうためにも大量の心筋細胞が必要であることが明らかになった。そこでスピナーフラスコによる回転浮遊培養系を用いて心筋細胞の大量培養法の開発を行った。

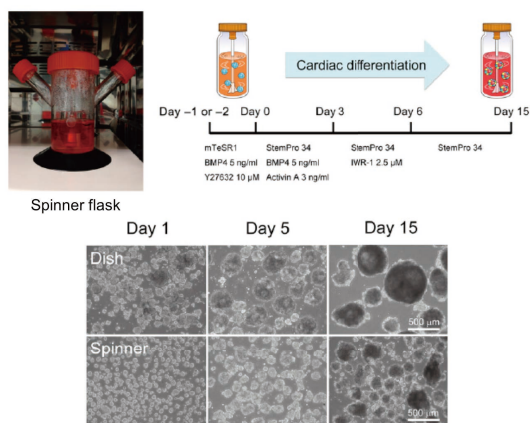


図 1: 回転浮遊培養法により品質の高い大量心筋細胞の培養に成功した。  
Stem Cells Transl Med. 2014 Dec;3(12):1473-83

(2) 刺激伝導系細胞を用いて純化精製するために刺激伝導系特異的遺伝子 X に蛍光蛋白質をノックインしてマーキングするためにTALEN および CRISPR/Cas9 システムを用いて iPS 細胞の遺伝子組換えを開始した。まずは心筋細胞のみが純化精製されていることを確認するために心筋細胞に特異的転写因子(NKX2-5)のプロモーター下に蛍光蛋白のDsRed をノックインしたヒト iPS 細胞を作製し、心筋細胞への分化および蛍光タンパクの発現を確認した。さらに遺伝子 X の 5' アームおよび 3' アームのクローニングに成功し、ドナーベクターの作製はほぼ終了した。

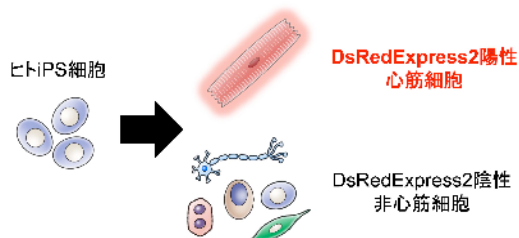


図 2: 心筋細胞マーカーを導入した iPS 細胞ヒト iPS 細胞を心筋細胞へと分化誘導する。

Knock-in 遺伝子はサイレンシング等の影響で必ずしも計算通りに遺伝子発現がおこらないことも想定されるため、遺伝子の 3' 側に 2A 配列を用いて蛍光タンパクを発現する融合タンパクの作製も開始し、アームのクローニングにも成功し、蛍光タンパクおよび 2A 配列を挿入することでドナーベクターを完成させた。さらに、Cell assay により TALEN および CRISPR のヒト iPS 細胞における活性を確認した。

(3) 大型動物への不整脈治療のための心筋細胞移植の基礎実験としてマイクロミニブタを用いて免疫抑制剤のプロトコール(タクロリムス、MMF、プレドニゾロンの三剤併用)を確立した。炎症細胞の浸潤をおさえ、異種移植におけるヒト iPS 細胞由来心筋細胞の生着を確認した。

(4) 平成 26 年度は、さらにヒト iPS 細胞から大型動物移植用に大量の心筋細胞を効率良く分化させて純化精製する系の開発を行い、プロトコールを確定した。大量浮遊培養による心筋分化、純化精製法は論文化し、iPS 細胞移植による最大の懸念である腫瘍化の抑制が国際的に高く評価された。(Stem Cells Transl Med. 2014 Dec;3(12):1473-83, ISSCR 2014 travel award)

(5) また、樹立した Nkx2-5-DsRed ノックイン iPS 細胞に続き、ヒト iPS 細胞に刺激伝導系細胞特異的な遺伝子 X に蛍光タンパクの tdTomato をノックインした組換え iPS 細胞を樹立した。すなわち、遺伝子 X のプロモーター下に tdTomato を挿入した donor vector を完成させ、CRISPR/Cas9 を用いてヒト iPS 細胞にノックインした。薬剤耐性のコロニーをピックアップし、細胞株化した。junction PCR とサザンブロットにより適切に DsRed と tdTomato がノックインされ、かつ off target にノックインされていない細胞株を選択し

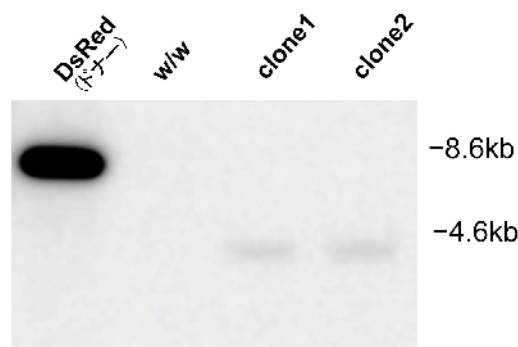


図 3: サザンブロットにより DsRed が目的部位に適切にノックインされていることを確認した。

た。Nkx2-5-DsRed iPS 細胞と遺伝子 X-tdTomato iPS 細胞を心筋細胞に効率よく分化誘導させることにより、表現形を確認した。心筋細胞の分化が進むに従い、Ds-Red と tdTomato 陽性の細胞が増加することを確認した。また、蛍光顕微鏡、FACS により Ds-Red と tdTomato の発現を確認し、他の心筋細胞特異的マーカーと共染色することでそれぞれの性質を確認した。

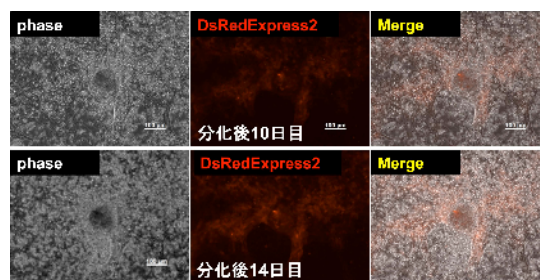


図 4: 分化誘導後 10 日目から DsRedExpress2 陽性の細胞が確認でき、分化後 14 日目にかけて蛍光発現強度が強くなることを観察した。

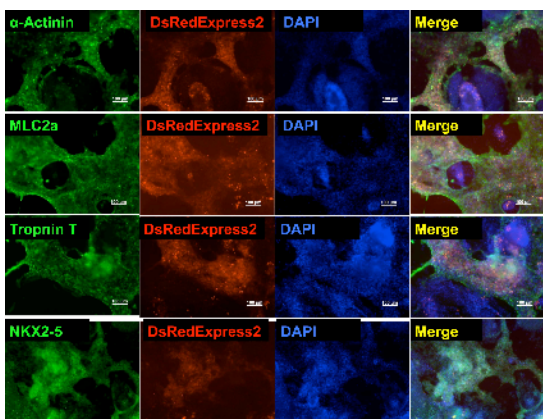


図 5: NKX2-5-DsRed ヒト iPS 細胞は心筋分化と同時に DsRed を発現する。

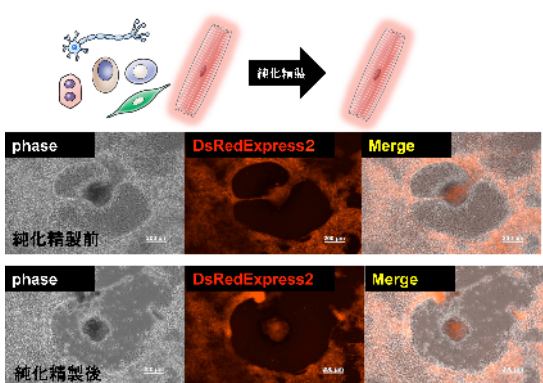


図 6: 純化精製にて DsRed 陽性心筋細胞のみの生存を確認した。

(6) さらに平成 27 年度はブタにテレメトリ一送信機を植え込み、体外での受信ボードでデータを取得、解析することで長期間の不整脈の評価系を確立し、ブタに心筋細胞および刺激伝導系細胞を移植するための基礎実験、特に心臓に心筋細胞を移植した際の安全性の検討を行った。移植に伴う不整脈の発生頻度を確認するために全身麻酔下でマイクロミニブタへの心筋細胞の移植を行った。心筋細胞をブタの心臓に移植する際に発生する不整脈の有無や、種類、不整脈の発生期間等を観察した。研究の過程でブタへの心筋細胞の移植研究を十分に行うには、やはり大量の心筋細胞が必要であることが明らかとなった。

(7) 我々は既にスピナーフラスコを用いた回転浮遊培養法とそれに引き続く純化法を開発したが、大量培養された心筋細胞を移植に最適な状態で用意するには、心筋細胞にダメージを与える事のない、より効率的な心筋細胞の純化精製法が必要であることが明らかになった。また、FACS を用いた心筋細胞とペースメーカー細胞の選別は非心筋細胞の混入があると極めて効率が悪いと、あらかじめ効率よく心筋細胞のみに純化精製しておく必要があることも判明した。未分化 ES/iPS 細胞と心筋細胞の代謝の相違を研究

の結果、多能性幹細胞は解糖系とグルタミン酸化により ATP を合成していることが明らかになった。心筋細胞は乳酸を効率的に利用し ATP を合成していることが明らかになり、新規純化精製法を用いることで心筋細胞中に含まれている未分化細胞の混入率を 0.001% 以下にまで引き下げる事に成功した。この純化精製法は論文化し、iPS 細胞移植による最大の懸念である腫瘍化の抑制が国際的に高く評価された。(Cell Metabolism. 2016 Apr 12;23(4):663-74.)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K. Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. Cell Metab. 2016 Apr 12;23(4):663-74. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.001. 査読有

(2) 藤田 淳 心筋再生医療の現状と展望 BIO Clinica 北隆館 2015 年 5 月号 2015 年 4 月 10 日 p28-31 査読無

(3) Hemmi N, Tohyama S, Nakajima K, Kanazawa H, Suzuki T, Hattori F, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Ohno R, Fujita C, Haruna T, Yuasa S, Sano M, Fujita J, Fukuda K. A massive floating culture system with metabolic purification for human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes Stem Cells Transl Med. 2014 Dec;3(12):1473-83. doi: 10.5966/sctm.2014-0072. 査読有

(4) 藤田淳、福田恵一 iPS 細胞を用いた心臓再生医療の現状と課題 医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 Vol 251 No.3 2014 年 10 月 18 日 p250-255 査読無

(5) Fujita J, Fukuda K. Future prospects for regenerated heart using induced pluripotent stem cells J Pharmacol Sci. 2014;125(1):1-5. Epub 2014 Apr 16 査読有

[学会発表] (計 18 件)

1. 藤田淳 心臓再生への挑戦 慶應義塾大学医工薬コモンズ 第 10 回インキュベーションラウンジ 2015 年 12 月 16 日 慶應義塾大学理工学部(神奈川県・横浜市)

2. 大野 麗、遠山 周吾、藤田 淳、福田 恵一 Generation of NKX2-5 DsRed/w hiPSCs using TALE nucleases. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 3 日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
3. 藤田淳 心臓再生医療への挑戦 第 2 回新・CPC 運用支援セミナー 2015 年 10 月 28 日 メルパルク大阪 (大阪府・大阪市)
4. 藤田淳 iPS 細胞を用いた心筋再生医療 第 2 回 富山大学臓器再生カンファレンス 2015 年 7 月 21 日 富山大学工学部(富山県・富山市)
5. 藤田淳 iPS 細胞を用いた心臓再生医療における課題の克服に向けて 第 14 回日本再生医療学会 2015 年 3 月 19-21 日 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
6. 遠山周吾、藤田淳、服部文幸、菱木貴子、末松誠、福田恵一: 代謝的アプローチによるヒト ES/iPS 細胞を用いた心臓再生医療 第 14 回日本再生医療学会 2015 年 3 月 19-21 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
7. 邊見奈津子、遠山周吾、中嶋一晶、平野暁教、金澤英明、関倫久、岸野喜一、岡田麻里奈、田部井亮太、大野麗、藤田千花、山口美穂、服部文幸、湯浅慎介、佐野元昭、藤田淳、福田恵一 A Massive Suspension Culture System With Metabolic Purification for Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes 第 14 回日本再生医療学会 2015 年 3 月 19-21 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
8. 遠山周吾、藤田淳、邊見奈津子、服部文幸、福田恵一 代謝的アプローチによるヒト ES/iPS 細胞を用いた心臓再生医療 第 18 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム 2015 年 1 月 15-17 日 武田薬品研修所(大阪府・吹田市)
9. 藤田淳 iPS 細胞を用いた心不全治療の現状と展望 第 3 回実験動物科学 シンポジウム 2014 年 12 月 12 日 山形テルサ・アプローズ(山形県・山形市)
10. 遠山周吾、藤田淳、服部文幸、菱木貴子、末松誠、福田恵一 多能性幹細胞の代謝と心臓再生医療 第 18 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2014 年 11 月 21 日横浜市開港記念会館 (神奈川県・横浜市)
11. Jun Fujita Clinical Application of Induced Pluripotent Stem Cells for Heart Failure Treatment: Potentials, Progress, and Obstacles American Heart Association. Scientific Sessions 2014 AHA-JCS Joint Symposium 2014. 11. 15-19, Chicago, USA
12. 藤田淳 Current perspectives on cardiac regenerative therapy with human induced pluripotent stem cells 第 18 回心不全学会学術集会 シンポジウム テーマ: 心不全における先進医療(細胞、iPS、遺伝子治療など) 2014 年 10 月 10-12 日 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
13. 大野 麗、遠山 周吾、福田 恵一、藤田 淳 心臓再生医療のための人工ヌクレアーゼを用いたヒト iPS 細胞におけるゲノム編集 第 4 回ゲノム編集研究会 2014 年 6 月 24 日 広島国際会議場(広島県・広島市)
14. 藤田淳 iPS 細胞を用いた心筋再生医療の現状と展望 2014 年度 富山大学 生命融合科学教育部大学院特別講義 2014 年 6 月 24 日 富山大学(富山県・富山市)
15. Natsuko Hemmi, Shugo Tohyama, Kazuaki Nakajima, Akinori Hirano, Hideaki Kanazawa, Seki Tomohisa, Yoshikazu Kishino, Marina Okada, Ryota Tabei, Rei Ohno, Chihana Fujita, Miho Yamaguchi, Fumiyuki Hattori, Shinsuke Yuasa, Motoaki Sano, Jun Fujita, Keiichi Fukuda A Massive Floating Culture System with Metabolic Purification for Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes International society for stem cell research, 12th annual meeting 2014. 2014. 6. 18-21 Vancouver, Canada
16. 藤田淳 iPS 細胞を用いた心筋再生医療の現状と展望 第 13 回日本再生医療学会 2014 年 3 月 4-6 日 国立京都国際会館(京都府・京都市)
17. 大野 麗、遠山 周吾、平野 暁教、邊見 奈津子、中嶋 一晶、金澤 英明、寺谷 工、小林 英司、藤田 淳、福田 恵一 マイクロミニブタにおける移植細胞同定のための AcGFP 陽性ヒト iPS 細胞の作製 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3-6 日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
18. Jun Fujita 12th Congress of the International Xenotransplantation

Association (IXA)Heart - a Regenerated  
Cardiomyocyte Transplantation method  
using Human ES/iPS Cells: Creation of  
Hearts using iPS/ ES cells  
2013. 11. 10-13 大阪国際会議場(大阪府・  
大阪市)

[図書] (計 0 件)

※学会発表の後に追記してください。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

※図書のあとに追記してください。

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 淳 (FUJITA, Jun)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：10306706

### (2) 連携研究者

福田 恵一 (FUKUDA, Keiichi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20199227