

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293182

研究課題名(和文) 移植免疫寛容霊長類モデルにおけるiPS細胞を用いた心筋再生療法の開発

研究課題名(英文) MHC-matched allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes

研究代表者

柴 祐司 (SHIBA, Yuji)

信州大学・医学部附属病院・准教授(特定雇用)

研究者番号：70613503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：カニクイザルiPS由来心筋細胞をMHC型の一致したカニクイザル心筋梗塞モデルに移植し、組織学的、電気生理学的評価を行った。

MHC型を一致させた同種間移植によって、iPS細胞由来心筋細胞が免疫拒絶反応なく生着することが確認できた。さらに、生着した心筋細胞はホスト心臓と電気的に結合し、一体となって収縮することにより心機能を改善させることが確認できた。しかし、心筋細胞移植後の心室性頻拍の有意な増加がみられた。この不整脈は一過性で、個体の血行動態には大きな影響を与えていないことが示唆されるものの、今後移植後不整脈に関するメカニズムの解明と予防方法の確立が必要である。

研究成果の概要(英文)：iPS cells were generated from fibroblasts from an animal with a homozygous MHC haplotype (HT4), and the cells were differentiated into cardiomyocytes (iPSC-CMs). Five HT4 heterozygous monkeys were subjected to myocardial infarction followed by direct intramyocardial injection of the iPSC-CMs. The grafted cardiomyocytes survived for 12 weeks with no evidence of immune rejection, and they showed indisputable electrical integration with host cardiomyocytes. In addition, transplantation of the iPSC-CMs improved cardiac contractile function; however, the incidence of VT was transiently but significantly increased when compared to the vehicle-treated control. MHC-matched allogeneic transplantation of iPSC-CMs regenerates infarcted non-human primate heart. Further research to control post-transplant arrhythmias is warranted.

研究分野：再生医学

キーワード：循環器内科学 再生医学

### 1. 研究開始当初の背景

近年、心筋梗塞後心不全に対する新たな治療法として、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。これまでの研究はヒト由来細胞を動物モデルに移植する異種移植モデルにおける検討であった。また多くの研究において、移植後長期の経過観察がなされておらず、今後、ヒトへの臨床応用のためには、大動物を用いた同種移植モデルにおける長期間の観察検討が必要である。

iPS 細胞は無限の増殖能と万能性を有し、ES 細胞における倫理的問題だけでなく、自己細胞移植により免疫拒絶反応を回避できる可能性があるため、再生医療の新たな細胞源として期待されている。しかし、iPS 細胞の作製と様々な細胞への分化には長期間かかるため、この細胞を用いた効率的な再生医療実現には、自己 iPS 細胞移植だけでなく、細胞のバンク化による同種移植療法の開発が望まれている。一対の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) が同一である MHC ホモ接合体をドナーとして iPS 細胞を作製することにより、この細胞は MHC ヘテロ接合体であるレシピエントに対して免疫寛容を示すため、バンク化細胞はホモ接合体個体から作製することが理想的である。しかし、これまでに MHC 型が一致したドナー/レシピエントによる iPS 細胞移植後の免疫応答を評価した報告は皆無であり、今後の臨床応用に向けた前臨床試験が不可欠である。

### 2. 研究の目的

本研究では、MHC ホモ接合体カニクイザルから iPS 細胞由来心筋細胞を事前に作製・凍結保存し、同一の MHC 型を含むヘテロ接合体カニクイザルに心筋梗塞を発症させ、梗塞部位に細胞移植を行い、治療効果と安全性について検討する。また、治療効果のメカニズムを解明するために蛍光 Ca センサー GCaMP を用いてグラフト心筋細胞の収縮/拡張の蛍光イメージングを行う。具体的には、以下の3つの実験を同時進行で行う。

*in vitro*: GCaMP 陽性カニクイザル iPS 細胞由来心筋細胞の作製

*in vivo*: 心筋梗塞モデルカニクイザルへの細胞移植と心機能/不整脈評価と組織検査

*ex vivo*: Langendorff 法を用いた GCaMP 陽性細胞のイメージング検査

MHC 型一致霊長類モデルを用いた細胞移植研究はこれまでに皆無であり、再生医療の推進に莫大な波及効果をもたらす。

### 3. 研究の方法

MHC 型ホモ接合体カニクイザルの皮膚線維芽細胞より、OCT4、SOX2、KLF4、L-MYC をエピゾーマルベクターによって遺伝子導入し、iPS 細胞を作製し、さらにアクチビン A、BMP-4 を添加し、心筋細胞に分化させ凍結保存する。ドナー細胞と同一の MHC 型を含む MHC 型ヘテロ

接合体動物に対して、虚血再灌流モデルによって心筋梗塞を発症させ、2週間後に  $4 \times 10^8$  の心筋細胞を心筋内への直接注射によって移植する。移植後 12 週間経過観察し、心エコー、CT による心機能評価と Holter 心電図による不整脈の評価を行う。12 週間後に心臓を摘出し、GCaMP による蛍光イメージングを行うとともに、病理組織検査により移植細胞の生着、免疫拒絶反応および腫瘍形成の有無について評価する。

### 4. 研究成果

移植 12 週間後の病理組織検査では、GFP (GCaMP) 標識した移植心筋細胞がホスト由来の血管によって灌流され生着していた (図 1)。

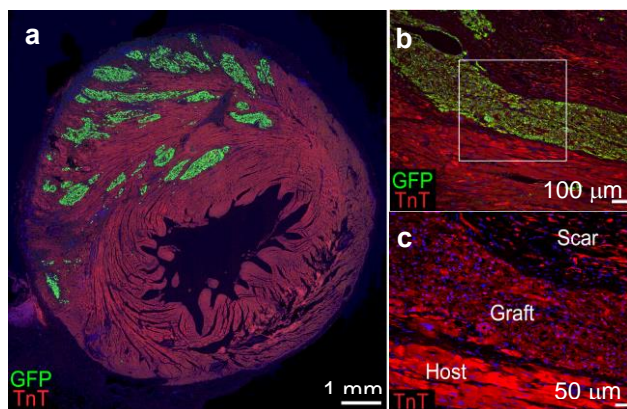


図 1. 移植 12 週間後の病理組織評価

a. GFP 標識したグラフト心筋は拒絶反応なく生着した。b. 移植細胞の多くが心筋細胞であった。c. グラフト心筋はホスト血管によって灌流されていた。

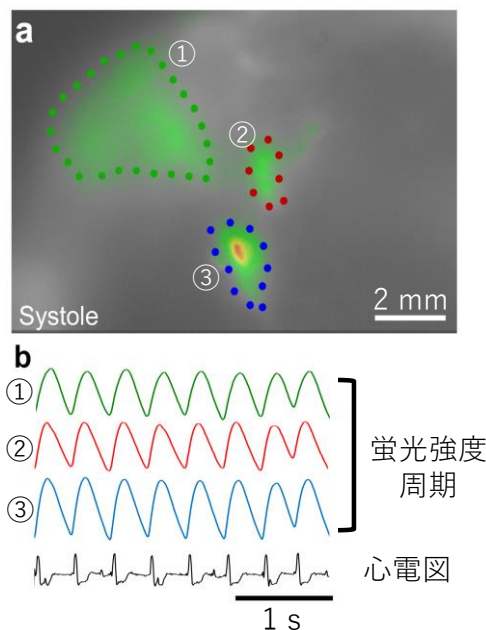


図 2. GCaMP 蛍光イメージング

a. 心臓表面に収縮期に蛍光発色するグラフトが見られた。b. さらにこの蛍光発色周期は心電図と一致していた。

GCaMP 蛍光イメージングで観察すると、グラフト心筋は収縮期に蛍光発色し、この発色周期は心電図周期と一致していた (図 2)。心エコーおよび心臓 CT 検査では移植 4 週間後および 12 週間後において心筋細胞移植群で心機能の改善が認められた。Holter 心電図による不整脈評価から、移植後 1 週間から 4 週間にかけて、心筋細胞移植動物において有意に心室性頻拍の発生頻度が増加していた (図 3)。しかし、心室性頻拍発症中であっても、各個体において特に異常行動は見られなかった。また移植 4 週目以降は心室性頻拍の有意な増加は見られなかった。

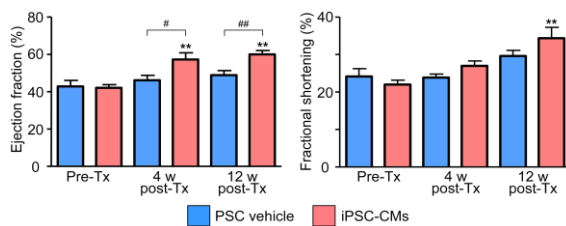


図 3. 心機能評価

CT (左) および心エコー (右) による心機能評価。心筋細胞移植によって 4 週間後および 12 週間後において心機能の改善が見られた。

## 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)

- ① Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I & Ikeda U: Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*, 査読有 538: 388-391, 2016 DOI:10.1038/nature19815

[学会発表] (計 9 件)

- ① 柴 祐司. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates non-human primate hearts. 第 81 回日本循環器学会学術集会. 2017.3.19; 石川県・金沢
- ② Shiba Y. Therapeutic Application of Adipose-derived Stem Cell for Acute Myocardial Infarction: Pro-survival Cocktail. *MIS Korea* 2017. 2017.3.2; ソウル (韓国)
- ③ Shiba Y. Preclinical transplantation study of iPS cell-derived cardiomyocytes for cardiac repair.

WSCS 2016. 2016.12.8; フロリダ (アメリカ合衆国)

- ④ Shiba Y. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates non-human primate hearts. WSCS 2016. 2016.12.7; フロリダ (アメリカ合衆国)
- ⑤ Shiba Y. Allogeneic Transplantation of iPS Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerates Non Human Primate Hearts. 第 80 回日本循環器学会学術集会. 2016.3.19; 宮城県・仙台
- ⑥ Shiba Y. Therapeutic Angiogenesis by Adipose-Derived Stem Cell Transplantation: Promising Results from Preclinical and Initial Clinical Studies. 第 80 回日本循環器学会学術集会. 2016.3.18; 宮城県・仙台
- ⑦ 柴 祐司. 霊長類同種移植モデルを用いた幹細胞由来心筋細胞移植後の電気生理学的特性解析. 第 15 回日本再生医療学会総会. 2016.3.17; 大阪
- ⑧ Shiba Y. Preclinical transplantation study for pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in non-human primates: Assessment of electrophysiological and contractile functions. 第 30 回日本不整脈学会学術大会/第 32 回日本心電学会学術集会合同学術大会. 2015.7.31; 京都

- ⑨ 柴 祐司. Preclinical transplantation study for pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in non-human primates. 第 31 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会. 2014.11.28; 名古屋

[図書] (計 5 件)

- ① 岡野怜己、柴 祐司. 多能性幹細胞を用いた心筋再生治療の開発. *化学工業* 68(5): 8-12, 2017
- ② 柴 祐司. iPS 細胞の安全・高品質な作成技術. *技術情報協会*: 54-60, 2016
- ③ 市村 創、柴 祐司. ES・iPS 細胞を用いた心臓再生. *心臓* 48(12): 2-7, 2016
- ④ 小笠原達樹、柴 祐司. iPS 細胞由来心筋再生療法. *日本臨牀* 74: 287-291, 2016
- ⑤ 柴 祐司. 心臓病に対する再生医療の現状と課題. *信州医学雑誌* 63(3): 173-175, 2015

[その他]

2016年10月7日、本研究成果についてプレスリリースの上、記者会見を行った。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴 祐司 (SHIBA, Yuji)

信州大学・医学部附属病院・准教授 (特定雇用)

研究者番号 : 70613503

(2) 研究分担者

瀬戸 達一郎 (SETO, Tatsuichiro)

信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属病院)・講師

研究者番号 : 70362118