

## 100. 新しいヒト心筋前駆細胞の同定と心臓再生治療応用

山下 潤

Key words : iPS 細胞, 心筋前駆細胞, 再生医療,  
細胞移植

京都大学 iPS 細胞研究所  
増殖分化機構研究部門

### 緒 言

原則として成体において再生能を示さない心臓は再生医療の重要なターゲットである。心臓血管の疾患は日本人死因の第2位である。また心臓移植におけるドナー不足問題は根本的解決の見通しはなく、移植以外の方法による真の心臓再生治療法の開発が期待されている。そうした状況の中、iPS細胞を用いた心筋再生に対する試みも盛んになされているが、移植後の細胞生着効率が悪い、血流の限界により移植組織の大型化に限界があるなどの問題により、ヒト心臓サイズで心拍出力をサポートしうる移植心筋の生着を長期にわたり達成できている報告はない。したがって、現在の単純な戦略に続く二の矢、三の矢に相当する新規心臓再生戦略を開発・推進しておくことが今後10年の心臓再生医療における重要課題と考えられる。特に真の再生が必要であり、再生治療が最も期待されている重症心不全において、従来とは異なる新規アプローチの開拓が必須である。

これまで細胞治療において最も成功し実績があるのは、白血病などに対する造血幹細胞移植による造血機能の再構成である。心臓においては心臓幹細胞生物学自体が未熟であることや、骨髄と異なり実質臓器である心臓を一旦なくしてしまうことができないことより、造血幹細胞と同様の戦略を採ることは不可能である。そこで幹細胞ではなく、前駆細胞を用いて心臓組織構築プログラムの「部分再構築」を行うことが次善の策と考えられる。近年、従来は生後不変であると考えられていた心筋細胞もターンオーバーしていることが数々報告され、幹細胞→前駆細胞→心筋細胞に至る心臓組織構築プログラムが成体内でも働いていると考えられる。前駆細胞を外的に供給し、成体の持つ心臓組織構築プログラムの増強・強化を図り、同プログラムに沿って心筋細胞を大量に組織内に誘導することにより、現在の分化心筋細胞の外的供給という単純な戦略の限界をクリアできると考えられる。心筋前駆細胞は、移植後の細胞間組織間相互作用の下、より生理的な形で組織形成を進めることにより、広範な心臓組織の再構築も可能な質的に全く異なる新しい治療戦略となり得る。

心臓に関しては、心筋特異的な前駆細胞は報告されておらず、その発見が重要な研究ターゲットとされていた<sup>1)</sup>。研究代表者らは多能性幹細胞を用いた心血管分化再生研究を行ってきた<sup>2)</sup> (FASEB J, 2005; Circulation, 2008; Blood, 2009, 2011; J Cell Biol, 2010; Cell Stem Cell, 2012 他)。これら技術基盤をベースにヒト iPS 細胞の段階的心筋分化法を開発し心筋特異的な前駆細胞を探索し、高度に心筋細胞選択的分化能を示す細胞群を世界に先駆けて見いだしている。本研究は、この新しいヒト心筋前駆細胞を用いて、新規心臓再生治療法を開発を試みた。

### 方 法

研究代表者らは、ヒト iPS 細胞からの効率的な心筋分化誘導法を開発し報告してきた<sup>3)</sup> (図1)。

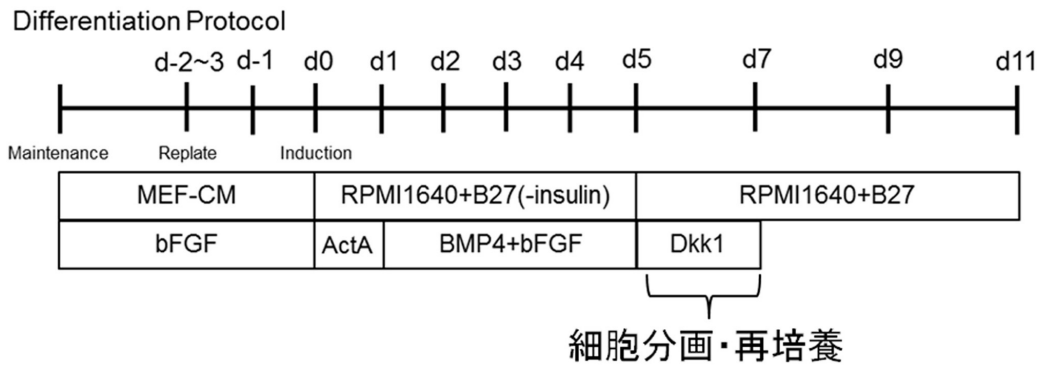


図1. ヒト iPS 細胞心筋分化誘導法.

研究代表者らが開発したヒト iPS 細胞心筋分化誘導法を用いて、心筋分化誘導途上において、様々な中間段階の細胞を純化・再培養することにより、心筋分化誘導能を検討した。

1) 同方法による心筋分化誘導途上において、様々な中間段階の細胞を純化・再培養することにより、心筋分化誘導能を検討した。

上記検討により同定された心筋前駆細胞に関して、

2) *in vitro*における心筋分化能の検討、

3) *in vivo*における生着と心筋分化能の検討を行った。

ラット慢性期心筋梗塞モデルに対して、心筋前駆細胞の移植1を行った(図2)。

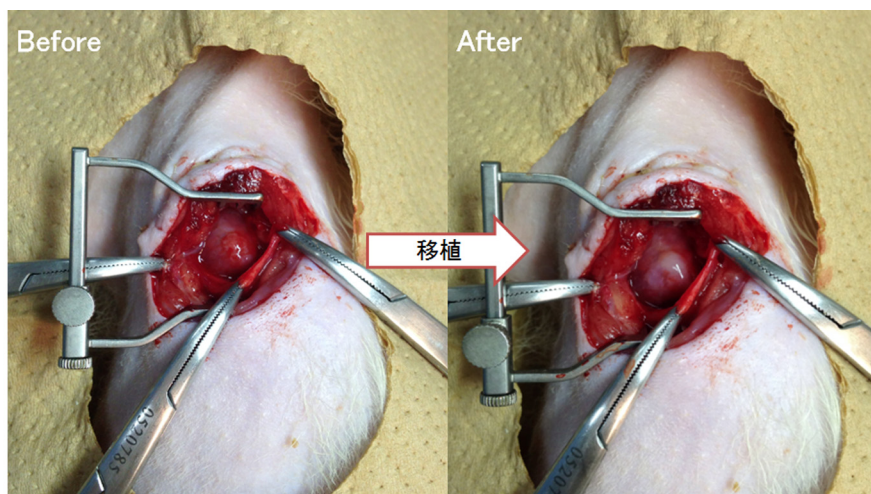


図2. CCP 陽性細胞のラット慢性期心筋梗塞モデルへの移植.  
心筋梗塞巣に対して CCP 陽性細胞の移植を行った。

## 結果

1) 種々の細胞表面マーカーを用いて心筋分化途上の細胞を分画し、検討した結果、ある特定の表面マーカー (CCP とする) 陽性細胞が特異的に心筋に分化することを見出した。

2) 純化した CCP 陽性細胞を再培養し、心筋への分化能を検討したところ、90%以上の高効率で心筋に分化しうる能力を有していることが確認された。

3) CCP 陽性細胞を免疫不全マウス NOD/SCID マウスの腎被膜下に移植したところ、移植2週間後において細胞が効率よく残存し(図3)、ほぼすべての生着細胞が心筋トロポニン陽性の心筋細胞に分化していることが確認された。

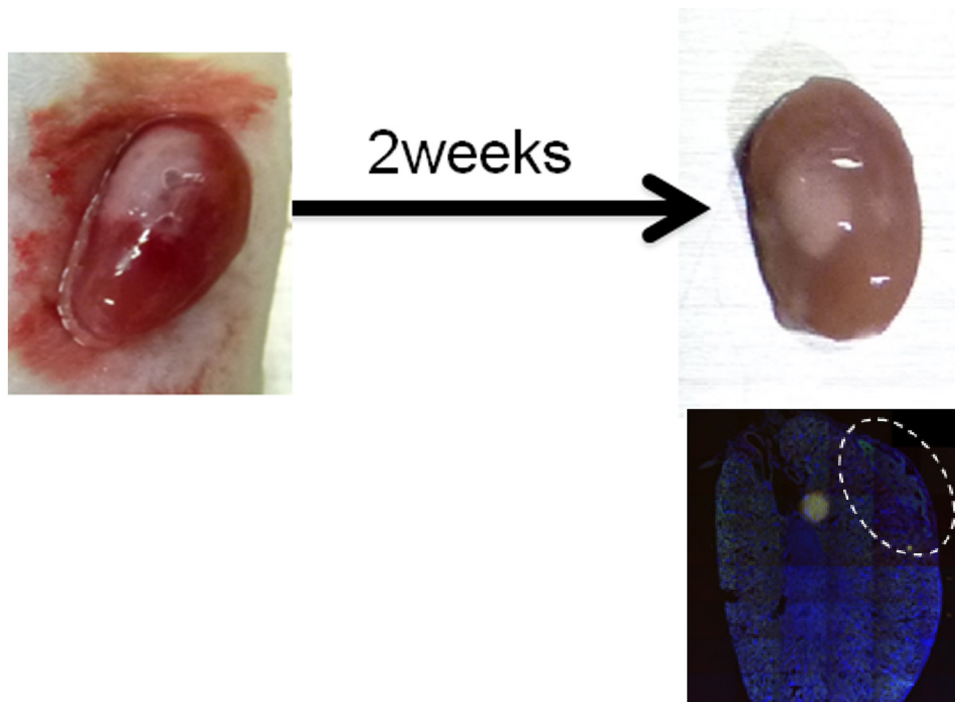


図3. マウス腎被膜下での移植細胞の残存.

上) ラット腎被膜下への CCP 陽性細胞移植後2週間においても, 移植細胞が腎被膜下に効率的に残存していた.  
 下) 腎切片. DAPI 染色. 残存移植細胞を認める (点線内).

さらに, CCP 陽性細胞のラット心筋梗塞モデルへの移植実験も行い, 移植後一ヶ月においても移植細胞が効率よく相乗に生着・残存していることが確認された (図4).



図4. ヒト iPS 細胞由来心筋前駆細胞のラット心筋梗塞モデルへの移植.

HE 染色. 移植後1ヶ月において, 梗塞巣の外側に移植細胞に由来する細胞層の生着を認める. スケールバー: 300  $\mu$  m.

## 考 察

新しく同定された心筋前駆細胞が、高い心筋選択性と高効率の心筋分化誘導能を有することが確認された。また、動物モデルへの移植実験においても高い生着効率を認め、新しい再生治療へ応用可能であることが示された。

再生医学勃興時から心臓、神経は再生医療の2大ターゲットと考えられてきた。実際患者数や医療費の多さも含め、心臓の再生医療への期待は非常に大きい。さらに心筋症や種々の心疾患の終末像である重症心不全は、がんよりも予後が悪く NYHA-IV 度の心不全は1年生存率ですら30%程度である。現時点では心臓移植以外に根治療法はないが、国内外における心臓移植がそれを満たすことは全く不可能であり、再生医療以外に状況の改善が期待される治療法はない。しかし多能性幹細胞を用いた現時点までの心臓再生細胞移植では、移植細胞の生着は一過性であり、心機能回復は移植された心筋細胞そのものによるのではなく、移植細胞からの分泌因子によるパラクライン効果である。慢性期心筋梗塞や重症心不全等のより重症な病態に対しても有効な治療を開発するには、それを改善する技術革新が必要であるが、現在そこに対してとられている対策は、「移植心筋細胞を増やす」「移植後の血流を改善する」「移植心筋細胞の細胞死を抑制する」などであり、いずれも「(終末分化して増殖しない)心筋細胞を手にできたので、何とかうまく移植して生かそう」というアイデアの範疇である。本研究は、そうした既存のアイデアの限界を打ち破る新技術であり、世界的にも全く例がない先進的で独自の意義を有している。世界的に発見が渴望されていた心筋特異的前駆細胞をヒトiPS細胞において同定・誘導・純化することにいち早く成功したことを生かし、本研究を発展させ可及的速やかに実用に移すことは、心臓移植に替わる新たな治療法の開発により多くの患者の福音となりうる。さらには心臓再生のみならず、再生医学全体及びiPS細胞を中心とする日本の医学及び科学と産業界の発展に多大な貢献をもたらすことが期待される。

## 文 献

- 1) Burridge, P. W., Keller, G., Gold, J. D. & Wu, J. C. : Production of *de novo* cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell*, **10** : 16-28, 2012.
- 2) Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K. & Nishikawa, S. I. : Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, **408** : 92-96, 2000.
- 3) Uosaki, H., Fukushima, H., Takeuchi, A., Matsuoka, S., Nakatsuji, N., Yamanaka, S. & Yamashita, J. K. : Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. *PLoS One*, **6** : e23657, 2011.