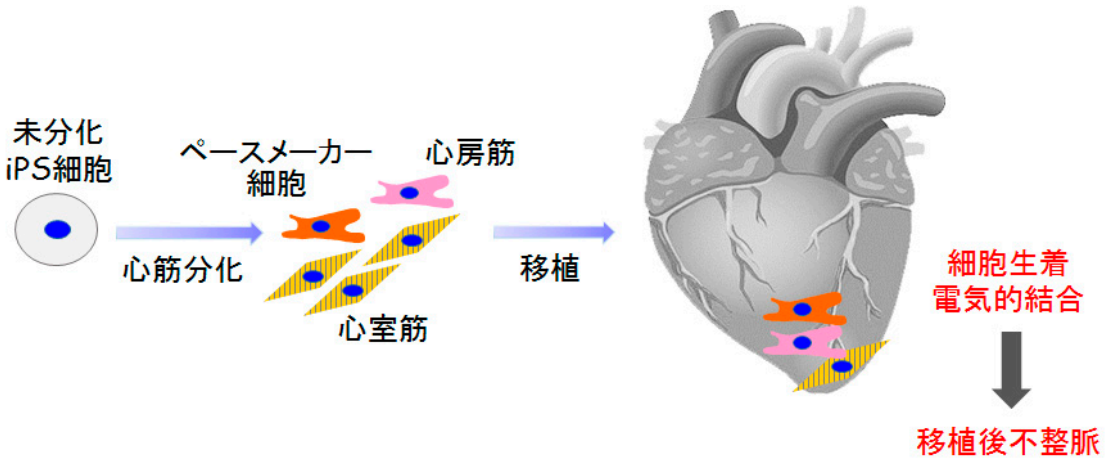
102　霊長類iPS細胞を用いた心筋再生治療実用化研究	柴　祐司

【目的】心不全は罹患率、死亡率ともに高く、新たな治療法の開発が望まれている。近年、心不全に対する新しい治療法として、多能性幹細胞（ES 細胞および iPS 細胞）を用いた心筋再生医療の実用化が期待されている。ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞は種々の動物心筋梗塞モデルにおいて、移植後生着し、心機能を改善することが示されている。しかし、これまでの移植試験は、ヒト由来細胞を動物モデルに移植する異種移植における検討のみであったため、移植試験結果が正しく評価されていない可能性があった。私たちは、霊長類（ヒトおよびカニクイザル）iPS 細胞を樹立し、これらの細胞から分化させた心筋細胞を動物モデルに異種／同種移植することにより、移植後不整脈という新たな知見を得てきている。本研究では、霊長類 iPS 細胞を用いて、移植後不整脈のメカニズムを解明し、不整脈発生を抑制する新たな手法を見出すことを目指した。

【方法】移植後不整脈の基質となる、ペースメーカー細胞が霊長類 iPS 細胞由来心筋細胞に含まれているか、パッチクランプ法及び免疫組織染色で評価した。また、一過性不整脈のメカニズム解明として、免疫不全ラットにヒト iPS 細胞由来心筋細胞（心室筋およびペースメーカー細胞）を移植し、移植後時間経過においてグラフト心筋細胞の組成に変化があるか組織学的に評価した。さらにヒト iPS 細胞からペースメーカー細胞を含まない心室筋細胞を作製し移植することにより移植後不整脈が抑制できるか検討する移植試験に着手した。

【結果】ヒトおよびカニクイザル iPS 細胞由来心筋細胞には約 10%の割合でペースメーカー様細胞が含まれていることが分かり、この細胞は心室筋細胞よりも早い自己拍動 rate を有していることが明らかとなった。ペースメーカー細胞を含む心筋細胞を移植すると、短期的にはペースメーカー細胞は生着するが、長期的には生着しないことが明らかとなった。さらに、ヒト iPS 細胞由来心室筋細胞はカニクイザル心筋梗塞モデルにおいて、適切な免疫抑制プロトコールによって、拒絶反応影響を受けずに生着することが明らかとなった。

iPS 細胞由来心筋細胞移植後の心室性不整脈の発生



102. 霊長類 iPS 細胞を用いた心筋再生治療実用化研究

柴　祐司

信州大学 医学部 再生医科学教室

Key words：再生医療，iPS 細胞，虚血性心疾患

緒　言

虚血性心疾患は世界的に頻度が高くかつ主要な死亡原因である。心臓は自己再生能に乏しく、一旦傷害された心機能は現状の治療法では回復が不可能である。多能性幹細胞（ES 細胞および iPS 細胞）はほぼ無限の増殖能と心筋細胞への分化能を有し、心筋再生治療における理想的な細胞ソースと考えられている。実際に、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を種々の動物の心筋梗塞モデルに移植することにより、移植心筋細胞が生着し、心機能が改善することが示されている［1］。しかし、これまでの検討の多くは、ヒト由来細胞を動物モデルに移植する異種移植モデルを用いた検討であり、移植後の免疫応答など結果の解釈に限界があった。実際に、カニクイザル iPS 細胞由来心筋細胞をカニクイザル心筋梗塞モデルに移植したところ、心機能が改善する一方で、移植後不整脈が発生することが明らかとなった［2］。移植後不整脈は霊長類間の異種移植モデルでも再現され［3］、本治療法の臨床応用において解決されなければならない問題となっている。近年、移植後不整脈の発生原因として移植心筋細胞による異所性ペーシングの関与が明らかとなり［4, 5］、多能性幹細胞由来心筋細胞の自動能のコントロールにより移植後不整脈を解決できる可能性がある。しかし、移植後不整脈のコントロールについて詳細な研究がなされていない。そこで私たちは霊長類（ヒトおよびカニクイザル）iPS 細胞を用いて、移植後不整脈について詳細な検討を行った。

方法および結果

1.　iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性

未分化 iPS 細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性をパッチクランプ法によって解析した。心筋細胞の活動電位を測定すると、ペースメーカー様（nodal-like）細胞と心室筋様（ventricular-like）細胞に分けることが可能で（図 1a）、約 10%がペースメーカー様細胞であった。またペースメーカー様細胞の自己拍動 rate は心室筋様細胞よりも有意に高値であった。次に iPS 細胞から分化させた心筋細胞を *in vitro* において心筋マーカーである cardiac troponin T（cTnT）とペースメーカー細胞マーカーである SHOX2 で 2 重染色したところ、心筋細胞の中に、SHOX2 陽性のペースメーカー細胞と SHOX2 陰性の非ペースメーカー細胞が混在していることが明らかとなった（図 1b）。iPS 細胞由来心筋細胞サブタイプについて、ヒトおよびカニクイザル iPS 細胞において明らかな違いは見られなかった。

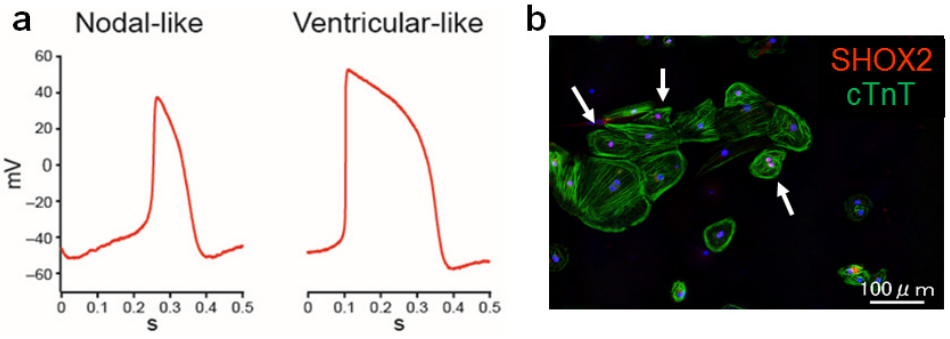


図 1. iPS 細胞由来心筋細胞のサブタイプ

a）パッチクランプ法に活動電位によるペースメーカー細胞、心室筋細胞の分類。

b）心筋マーカー cTnT とペースメーカーマーカーSHOX2 による染色。cTnT 陽性の心筋細胞は SHOX2 陽性ペースメーカー細胞（矢印）と SHOX2 陰性細胞が含まれている。

2. 移植された iPS 細胞由来心筋細胞サブタイプの *in vivo* における変化

多能性幹細胞由来心筋細胞を大動物心筋梗塞モデルに移植する検討において、一過性の心室性頻拍が発生することが報告されている。この不整脈は移植後 2 週間をピークに発生し、4 週間以降は漸減する［2, 5］。iPS 細胞由来心筋細胞には心室筋様細胞だけでなく、より自己拍動 rate の速いペースメーカー様細胞が含まれており、移植後不整脈の原因となっている。しかし、移植後不整脈が一過性である原因は全く分かっていない。私たちは移植後のグラフト心筋の性質が時間経過ともに変化している可能性を考え以下の検討を行った。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を免疫不全ラットに心臓に移植し、2 週間後または 4 週間後、12 週間後に心臓を摘出し、それぞれの詳細な組織学的評価を行った。

図 2 に示したように、SHOX2 陽性細胞は移植後 2 週目、4 週目には移植心筋細胞中 10～20%程度含まれていたが、12 週目には著明に割合が減少していた。

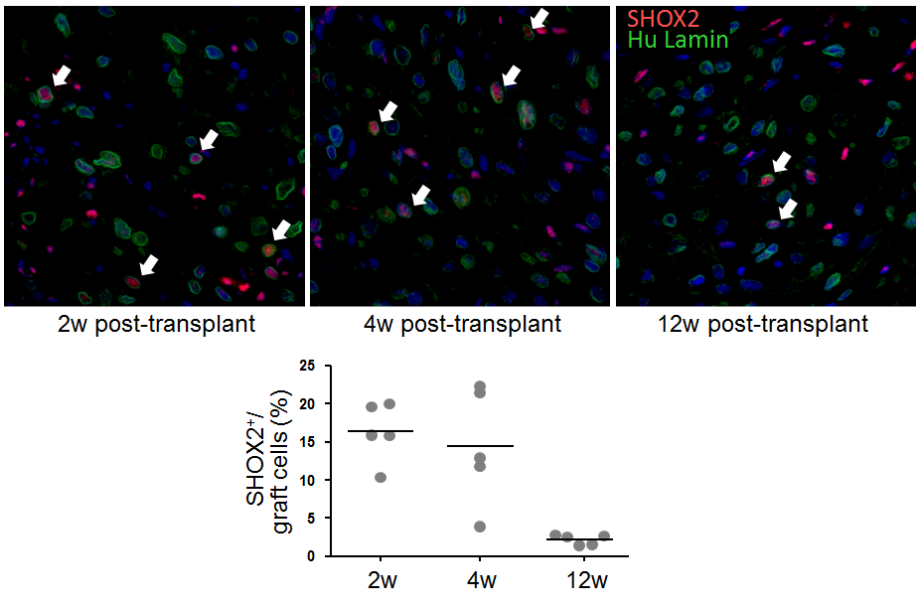


図 2. SHOX2 陽性ペースメーカー細胞の *in vivo* における生着

グラフト細胞（Hu Lamin 陽性）の中の SHOX2 陽性ペースメーカー細胞は移植 12 週間後にはほとんど消失していることが分かる。

3. iPS 細胞由来心室筋細胞を用いた前臨床試験

iPS 細胞由来心筋細胞に含まれるペースメーカー様細胞が移植後一時的に生着することにより一過性の心室性不整脈を誘発していることが示唆された。そこで、ペースメーカー細胞を含まない、心室筋細胞を移植することにより、移植後不整脈を抑制できるか検討することとした。慶應大学循環器内科との共同研究により、ヒト iPS 細胞由来心室筋細胞を入手し、カニクイザル心筋梗塞モデルに移植した。ホスト免疫による拒絶反応を抑制するために、メチルプレドニゾロン、シクロスポリン、アバタセプトを連日投与し移植後 4 週間で心臓を摘出し組織学的評価を行った。図 3 に示すように移植された心室筋細胞は心筋梗塞部位に免疫拒絶の影響を受けずに生着することが確認できた。心室筋細胞移植後不整脈の発生頻度について Holter 心電図を用いて現在解析中である。

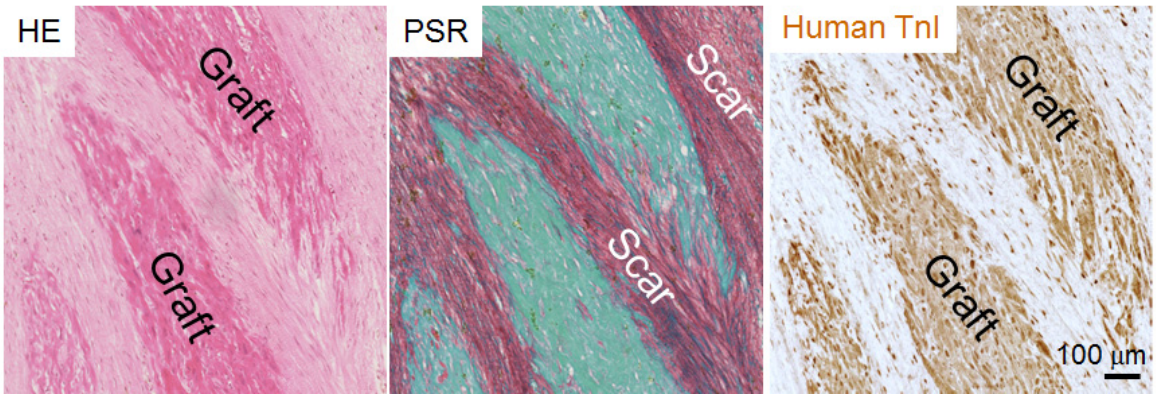


図 3. ヒト心室筋細胞のカニクイザル心筋梗塞部位への生着
ピクロシリウス-レッド染色(PSR)において scar 領域にヒト特異的トロポニン I (Human TnI) 抗体陽性の心室筋細胞の生着が確認できた。HE 染色では Graft 周辺に炎症細胞浸潤はなく、拒絶反応がないことが示された。

考　察

多能性幹細胞を用いた心筋再生治療は、様々な研究がなされ、一部は臨床試験も開始される段階となっている［6］。私たちは、多能性細胞由来心筋細胞が心筋梗塞モデルの心臓内に生着し、かつホスト心臓と電気的に結合することにより、心機能を改善することを示してきた［7］。しかし、電気的に結合する心筋細胞の生着は、移植後不整脈という新たな問題を伴うことも分かってきた。移植後不整脈の発生メカニズムに関しては、ごく最近複数の報告がなされ、移植心筋細胞の自動能が原因であることが示唆されている。しかし、移植後不整脈が一過性であることについて原因が分かっていなかった。本研究において、一過性の心室性不整脈が、ペースメーカー細胞が一時的にホスト心臓に生着することに起因していることが示唆された。さらに、ペースメーカー細胞を含まない心室筋細胞移植によって移植後不整脈が抑制できるか現在霊長類モデルを用いて検討中であり、Holter 心電図の解析結果が待たれる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である慶応義塾大学循環器内科福田恵一先生、藤田淳先生、遠山周吾先生に深謝いたします。

文 献

1) Laflamme M A, Chen K Y, Naumova A V, Muskheli V, Fugate J A, Dupras S K, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill E A, Ueno S, Yuan C, Gold J & Murry C E: Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. Nature biotechnology 25: 1015-1024, 2007. PMID: 17721512

2) 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 538: 388-391, 2016. PMID: 27723741

3) Chong J J, Yang X, Don C W, Minami E, Liu Y W, Weyers J J, Mahoney W M, Van Biber B, Cook S M, Palpant N J, Gantz J A, Fugate J A, Muskheli V, Gough G M, Vogel K W, Astley C A, Hotchkiss C E, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill E A, Nelson V, Kiem H P, Laflamme M A & Murry C E: Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. Nature 510: 273-277, 2014. PMID: 24776797

4) Liu Y W, Chen B, Yang X, Fugate J A, Kalucki F A, Futakuchi-Tsuchida A, Couture L, Vogel K W, Astley C A, Baldessari A, Ogle J, Don C W, Steinberg Z L, Seslar S P, Tuck S A, Tsuchida H, Naumova A V, Dupras S K, Lyu M S, Lee J, Hailey D W, Reinecke H, Pabon L, Fryer B H, MacLellan W R, Thies R S & Murry C E: Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. Nature biotechnology 36: 597-605, 2018. PMID: 30188532

5) Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sanchez A, Qiang B, Barry J, Laskary A, Qi X, Masse S, Magtibay K, Kawajiri H, Wu J, Valdman Sadikov T, Rothberg J, Panchalingam K M, Titus E, Li R K, Zandstra P W, Wright G A, Nanthakumar K, Ghugre N R, Keller G & Laflamme M A: Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias. Stem cell reports, 2019. PMID: 31056479

6) Menasche P, Vanneaux V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, Parouchev A, Benhamouda N, Tachdjian G, Tosca L, Trouvin J H, Fabreguettes J R, Bellamy V, Guillemain R, Suberbielle Boissel C, Tartour E, Desnos M & Larghero J: Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. European heart journal 36: 2011-2017, 2015. PMID: 25990469

7) Shiba Y, Fernandes S, Zhu W Z, Filice D, Muskheli V, Kim J, Palpant N J, Gantz J, Moyes K W, Reinecke H, Van Biber B, Dardas T, Mignone J L, Izawa A, Hanna R, Viswanathan M, Gold J D, Kotlikoff M I, Sarvazyan N, Kay M W, Murry C E & Laflamme M A: Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. Nature 489: 322-325, 2012. PMID: 22864415