

心不全に対する再生医療



医療と技術

宮川 繁*

The regeneration therapy for heart failure

Key Words : 再生治療、細胞シート、心不全、疾患特異的 iPS 細胞、
薬剤スクリーニング

1. 要約

重症心不全治療として最も重要な治療法である心臓移植は、極めて深刻なドナー不足であり、新しい移植法案が可決されたものの、欧米レベルの汎用性の高い治療法としての普及は困難が予想される。一方、左室補助人工心臓 (LVAD) については、日本では移植待機期間が長期であるため、感染症や脳血栓等の合併症が成績に大きく影響している。このような状況を克服するため、世界的に再生医療への期待が高まっており、心臓移植や LVAD に代わる新しい治療開発が急務である。

このような現状のなか、重症心不全においては、細胞移植、組織移植、また再生医療的手法を用いた再生創薬の研究がすすみ、臨床応用化が進んでいる。本稿では、これまでの筋芽細胞シートのトランスレショナルリサーチとともに、iPS 細胞由来心筋細胞シートを用いた心不全治療のこころみ、さらに疾患特異的 iPS 細胞に関して紹介し、再生医療技術を用いた新しい心不全治療を概説する。

2. 筋芽細胞シート法の臨床応用

細胞支持体を用いずに拍動能を有する心筋組織体を作成する方法は、東京女子医大の岡野教授が開発した細胞シート法である (1, 2)。細胞シートは poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) が塗布された特殊な培養皿を用いて作成される。この培養皿は、37℃の状態では PIPAAm が疎水性であり、細胞との接着性を有するが、21℃に温度を落とすと、PIPAAm は親水性となり、細胞との接着性を有しない。すなわち、37℃の条件下で所定の細胞を培養し、コンフルエントに細胞が増殖し、細胞の組織体となった時点で、培養温度を落とし、細胞間接着、細胞と細胞外基質を壊すことなく、細胞を組織体のまま回収し、この組織体を培養皿外で重ね合わせ、より厚い組織体を作成する方法である。この方法で作成する組織体の大きな利点は、細胞組織体の表面に接着蛋白を維持しているため、生体臓器に移植した際に、移植臓器との良好な integration 能を有することである。

これまでの非臨床研究において、移植した筋芽細胞は移植後半年で組織学的に検出することができないことがわかっており、移植した筋芽細胞シートは移植後急性期に虚血状態に陥り、HIF-1 遺伝子を高率に発現し、その遺伝子発現に誘導されて様々な血管新生因子 (肝細胞増殖因子等)、細胞誘導因子 (Stromal derived factor-1) が分泌され、同サイトカインは移植部位の血管新生、骨髄間葉系幹細胞の誘導を担っていると考えられている (3) (図 1)。移植した筋芽細胞シートは、移植後晩期に脱落するが、移植後初期に形成した新生血管、移植部位に誘導された骨髄間葉系幹細胞により、筋芽細胞消失後も機能維持が行われていると思われる。

また、重症心不全患者に対して、筋芽細胞シート移植治療が行われており、一部の患者において、左室



* Shigeru MIYAGAWA

1994年—大阪大学医学部卒
1998年—大阪大学大学院医学系研究科機能制御外科学大学院

2006年 3月—大阪大学大学院医学系研究科心臓血管・呼吸器外科
非常勤講師

2006年10月—ドイツ連邦共和国 ケルクホッフクリニック心臓血管外科
客員医師

Max Plank研究所 research fellow

2010年 1月—大阪大学大学院医学系研究科 助教

2012年 7月 1日—大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科
講師

2014年 4月 1日—大阪大学大学院医学系研究科免疫再生制御
学講座 特任准教授

2016年 7月 1日—大阪大学大学院医学系研究科先進幹細胞治
療学共同研究講座 特任教授

2018年 4月 1日—大阪大学大学院医学系研究科最先端再生医
療学共同研究講座 特任教授

予測される心筋組織修復のメカニズム -autologous cell induced Drug delivery system-

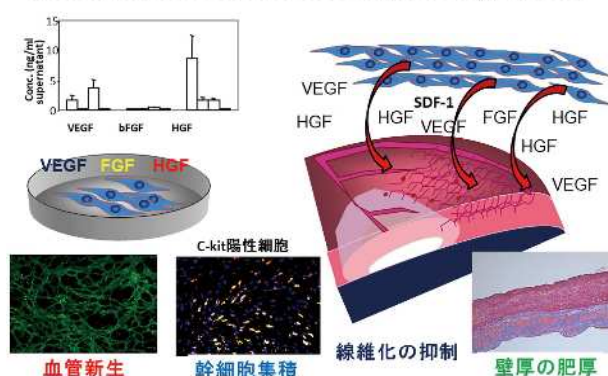


図1

リバーシモデリング、症状の改善効果が認められており、筋芽細胞シート治療が有効である患者群が判明しつつある。一方で、筋芽細胞シートは中等度の心不全に対して効果がある可能性があり、著明な線維化を伴った高度心不全に対する筋芽細胞シートの効果は不明であり、今後十分な検討を要するものと思われる(4)。

近年、虚血性心筋症に対する筋芽細胞シートの企業治験が行われ、経時的な心機能改善、多数の患者での症状の改善、運動耐用能の改善が報告されている(5)。心不全に対する再生医療製品として早期承認を得、世界初の心不全に対する再生医療製品「ハートシート」として市販化された。今後、レジストリー型PMSにより、再度、虚血性心筋症にて安全性、有効性が検証される予定である。

4. iPS細胞由来心筋細胞シートの非臨床研究

著明な線維化を呈し、心筋細胞を多量に失った高度心不全に対しては、失った健全な心筋細胞を補うことが必要であり、心筋細胞移植が、心筋細胞の枯渇した梗塞巣に、健全な心筋細胞を補填する治療になりえるものと思われる。近年、体細胞よりiPS細胞が誘導され、様々な細胞に分化することが報告されたが、同細胞より心筋細胞に生理的、解剖学的に相同性の高い、心筋細胞を誘導することが可能となっている(6)。

同心筋細胞を用いて、心筋細胞シートを作成することが可能であり、大動物心不全モデルを用いた同組織のProof of Conceptも得られている(7, 8)。移植したiPS細胞由来心筋細胞シートはレシピエント

心内で、収縮弛緩を繰り返し、作業心筋として機能する可能性があることが示されると同時に、iPS細胞由来心筋細胞シートは、レシピエント心と同期して挙動しており(9)、同組織の拍動がレシピエント心に対して直接作用する可能性があることが示されている。また、iPS細胞由来心筋細胞シートは作業組織として機能するだけでなく、同組織から肝細胞増殖因子をはじめとしたサイトカインが分泌され、移植した臓器に血管新生を起こさせ、血流の改善がおこることも示されている(7, 8, 10)。

本細胞の心不全治療への応用においては、安全性の検討、細胞の大量培養法の開発が重要である。大量培養法に関しては、すでに基盤技術は開発されており(11)、臨床応用に使用されるレベルまで達している。同時に同細胞の安全性の検証を十分に行うことが重要であり、すでに、未分化細胞のマーカー、およびNOGマウスを用いた造腫瘍性に関わる安全性の検証システムが確立されている(12, 13)。また、造腫瘍性に関する安全性だけではなく、分化誘導後に癌化を促す遺伝子異常が発生していないか検証するシステムも構築されている。臨床用iPS細胞から分化した心筋細胞は、同システムを用いて安全性の検証がすでに終了しており(13)、虚血性心筋症患者に対するiPS細胞由来心筋細胞シート移植が医師主導型治験で施行された(図2)。

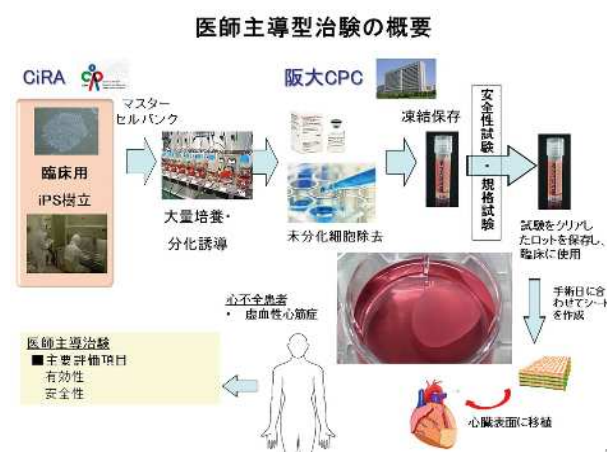


図2

5. 循環器疾患における疾患特異的iPS細胞及び創薬スクリーニング

疾患特異的iPS細胞から分化した細胞は、患者本来のもつ病態を培養皿上で再現している可能性が高いと考えられる。特に遺伝性不整脈疾患に対する研究

は先行しており、QT延長症候群においては、KCNQ1(14)、KCNH2(15, 16)、SCN5A 遺伝子異常をもつ症例から樹立された iPS 分化心筋における活動電位持続時間の延長やチャネル電流の異常から、催不整脈性が再現されている。

心筋症については、肥大型心筋症モデルとして、Myh7 遺伝子異常 (17)、MYBPC3 遺伝子異常 (18) に関する報告がなされており、心筋細胞の肥大、サルコメア構造の異常、細胞内 Ca 代謝異常といった肥大型心筋症において認められる疾患フェノタイプが再現されている。拡張型心筋症の原因遺伝子は多岐にわたり、それぞれに対して疾患 iPS 細胞が樹立され病態解析が行われている。LMNA 遺伝子異常を持つ iPS 分化心筋では細胞老化や細胞死が、TNNT2 遺伝子異常をもつ iPS 分化心筋では、収縮性の低下、細胞内 Ca 動態の異常、サルコメア構成タンパク質分布異常が示されている (19)。TTN 分子途絶型変異に関する報告もあり (20)、iPS 分化心筋において、サルコメア構造の異常、機械的進展や薬剤刺激に対する反応性の低下が示されている。

不整脈源性右室心筋症は、右室特異的な拡大と致死性不整脈を惹起する希少疾患だが、PKP2 遺伝子異常をもつ症例からの疾患 iPS 細胞が樹立されており、刺激電動に関わるタンパク質の発現低下や電気生理学的異常、細胞内脂質沈着が再現されている (21, 22)。

6. iPS 細胞由来心筋細胞組織を用いた創薬スクリーニング

近年、iPS 細胞由来心筋細胞単一細胞を用いた創薬スクリーニングの研究が行われているが、細胞のみのスクリーニングでは、心筋細胞の発現するレセプター及び心筋細胞収縮蛋白、構造蛋白、引いては心筋細胞内細胞伝達シグナルのみをターゲットとした薬剤のスクリーニングしか行うことができない。的確な薬剤応答を検証するためには、単一心筋細胞だけではなく、心筋細胞を構成主体とした心筋組織による創薬スクリーニングが必要であると思われる。当科においては、iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導し、同心筋細胞を用いて、3 次元心筋組織を作成し、同心筋組織は、薬剤の心毒性を検証しうるか検証を行った (23)。一方で、心不全の表現型は、心筋細胞のみではなく、心筋組織の線維化等々心筋細胞以外

の要因に起因する場合が多く、またインテグリン・ラミニン系主体とした心筋細胞と細胞外基質のインタラクションにより、心筋細胞・心筋組織の特性が発揮されることを考えると、的確な薬剤応答を検証するためには、単一心筋細胞だけではなく、心筋細胞を構成主体とした心筋組織による創薬スクリーニングが必要であると思われる (24, 25)。我々は、心臓を主に構成する心筋細胞、線維芽細胞と血管内皮細胞を混合した 3 次元心筋組織体を作製し、様々な薬剤に対する心筋組織の応答性について検討を行った。ヒト iPS 細胞から心筋分化誘導した細胞から心筋細胞のみを分離し、心筋細胞とヒト線維芽細胞の細胞表面に交互積層法を用いて、フィブロネクチンとゼラチン薄膜をコートし、iPS 細胞由来心筋組織を作成した (図 3 (a))。細胞混合モデルは心筋細胞のみの組織体と比較し、3 次元組織内の細胞密度が高く、細胞外マトリクス関連やギャップ結合関連の遺伝子の発現が高いことが示された。また、細胞混合モデルは、全体的に同期した拍動が観察され、高い収縮特性を示した。HERG K チャンネルブロッカーである E-4031 を添加したところ、両モデルにおいて、濃度依存的な薬剤応答が確認されたが、細胞混合モデルは心筋細胞のみの組織体と比較し、低濃度より反応がみとめられた。心筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞から構成された 3 次元心筋組織体は優れた構造的・機能的特性および薬物に対する感受性を示し、新しい創薬スクリーニングツールになりうることをすでに検証している。

また、我々は、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心筋組織 (hiPS-CMT) が抗線維化薬の評価系開発に有用であると仮説を立て検討を行った (図 3 (b))。

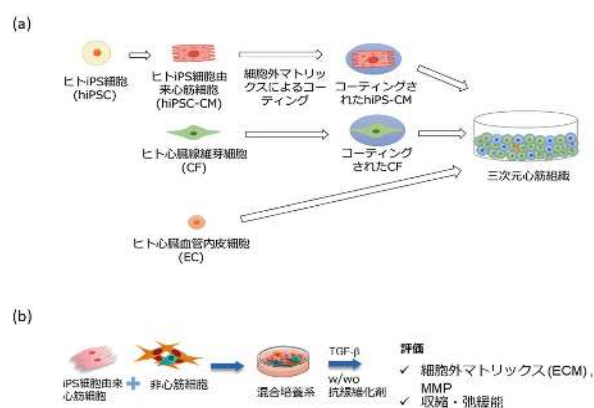


図 3

ヒト iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導した後に得られる心筋細胞、線維芽細胞、平滑筋様の細胞集団からなる組織に対して、線維化刺激因子の一つである TGF- β を添加し、細胞外マトリックス (ECM)、matrix metalloproteinase (MMP) などの発現を解析したところ、collagen type (Col) I、Fibronectin、MMP-2 の発現増加、Col1/Col3 比の増加を認めた。さらに、心筋組織としての機能を解析したところ、TGF- β 刺激により収縮・弛緩速度、収縮・弛緩力の低下が認められた。さらに、TGF- β に加えて抗線維化作用をもつ HGF を添加したところ、TGF- β による ECM 産生増加、収縮・弛緩速度の低下が抑制された。hiPS-CMT は線維化誘導、抑制刺激に対して、ECM 産生の変化だけでなく心筋細胞機能への影響も評価可能であり、心臓線維化モデルとして抗線維化薬の開発に有用な評価システムとなる可能性が示唆された。今後本組織において、拡張型心筋症患者由来心筋細胞を用いることにより、拡張型心筋症と病理学的、機能的により類似した心筋組織を in vitro で構築し、薬効の検証を行っていく必要がある。

参考文献

1. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue engineering*. 2001;7(2):141-51.
2. Kobayashi J, Kikuchi A, Aoyagi T, Okano T. Cell sheet tissue engineering: Cell sheet preparation, harvesting/manipulation, and transplantation. *J Biomed Mater Res A*. 2019;107(5):955-67.
3. Memon IA, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Taketani S, et al. Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2005;130(5):1333-41.
4. Miyagawa S, Roth M, Saito A, Sawa Y, Kostin S. Tissue-engineered cardiac constructs for cardiac repair. *The Annals of thoracic surgery*. 2011;91(1):320-9.
5. Sawa Y, Yoshikawa Y, Toda K, Fukushima S, Yamazaki K, Ono M, et al. Safety and Efficacy of Autologous Skeletal Myoblast Sheets (TCD-51073) for the Treatment of Severe Chronic Heart Failure Due to Ischemic Heart Disease. *Circulation Journal*. 2015;79(5):991-9.
6. Yu T, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, et al. In Vivo Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circulation Journal*. 2013;77(5):1297-306.
7. Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, et al. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation*. 2012;126(11 Suppl 1):S29-37.
8. Ishida M, Miyagawa S, Saito A, Fukushima S, Harada A, Ito E, et al. Transplantation of Human-induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Is Superior to Somatic Stem Cell Therapy for Restoring Cardiac Function and Oxygen Consumption in a Porcine Model of Myocardial Infarction. *Transplantation*. 2019;103(2):291-8.
9. Higuchi T, Miyagawa S, Pearson JT, Fukushima S, Saito A, Tsuchimochi H, et al. Functional and Electrical Integration of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Myocardial Infarction Rat Heart. *Cell transplantation*. 2015;24(12):2479-89.
10. Iseoka H, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Masuda S, Yajima S, et al. Pivotal Role of Non-cardiomyocytes in Electromechanical and Therapeutic Potential of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Cardiac Tissue. *Tissue Engineering Part A*. 2018;24(3-4):287-300.
11. Matsuura K, Kodama F, Sugiyama K, Shimizu T, Hagiwara N, Okano T. Elimination of remaining undifferentiated induced pluripotent stem cells in the process of human cardiac cell sheet

- fabrication using a methionine-free culture condition. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2015;21(3):330-8.
12. Sougawa N, Miyagawa S, Fukushima S, Kawamura A, Yokoyama J, Ito E, et al. Immunologic targeting of CD30 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells, allowing safer clinical application of hiPSC-based cell therapy. *Scientific reports*. 2018;8.
 13. Ito E, Miyagawa S, Takeda M, Kawamura A, Harada A, Iseoka H, et al. Tumorigenicity assay essential for facilitating safety studies of hiPSC-derived cardiomyocytes for clinical application. *Scientific reports*. 2019;9(1):1881.
 14. Wang Y, Zhang WY, Hu S, Lan F, Lee AS, Huber B, et al. Genome editing of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells with zinc finger nucleases for cellular imaging. *Circulation research*. 2012;111(12):1494-503.
 15. Matsa E, Rajamohan D, Dick E, Young L, Mellor I, Staniforth A, et al. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *European heart journal*. 2011;32(8):952-62.
 16. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;471(7337):225-9.
 17. Lan F, Lee AS, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen PK, Wang L, et al. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 2013;12(1):101-13.
 18. Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, et al. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Journal of the American Heart Association*. 2014;3(6):e001263.
 19. Ebert AD, Liang P, Wu JC. Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2012;60(4):408-16.
 20. Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, Polacheck WJ, Benson CC, Swist S, et al. HEART DISEASE. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science (New York, NY)*. 2015;349(6251):982-6.
 21. Caspi O, Huber I, Gepstein A, Arbel G, Maizels L, Boulos M, et al. Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2013;6(6):557-68.
 22. Ma D, Wei H, Lu J, Ho S, Zhang G, Sun X, et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *European heart journal*. 2013;34(15):1122-33.
 23. Takeda M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Ito E, Harada A, et al. Development of In Vitro Drug-Induced Cardiotoxicity Assay by Using Three-Dimensional Cardiac Tissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Tissue Engineering Part C-Methods*. 2018;24(1):56-67.
 24. Amano Y, Nishiguchi A, Matsusaki M, Iseoka H, Miyagawa S, Sawa Y, et al. Development of vascularized iPSC derived 3D-cardiomyocyte tissues by filtration Layer-by-Layer technique and their application for pharmaceutical assays. *Acta Biomaterialia*. 2016;33:110-21.
 25. Tadano K, Kazusa K, Takamatsu K, Naraoka H, Takeda M, Akashi M, et al. Cardiotoxicity evaluation using three-dimensional cardiac tissues consisting of human iPS cell-derived cardiomyocytes and fibroblasts by cell coating technique. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2019;99:106595-.