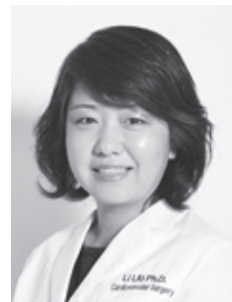


iPS 由来心筋組織構築技術の現状

大阪大学医学系研究科心臓血管外科最先端再生医療学共同研究講座

劉 莉

Li LIU



1. はじめに

世界中で心不全の患者数は約3,000万人、年間死亡者数は約890万人で死因の第1位であり、2030年には心臓病による死亡率が46%まで上昇すると推定されている¹⁾。また、日本国内においては、心筋梗塞をはじめとする重症心不全患者は約80万人で、年間約18万人が死亡している。これまで、致死的な重症心不全患者に対しては心臓移植が唯一の有効な治療法であったが、日本では極めて深刻なドナー不足であり、また免疫拒絶反応などの問題で免疫抑制薬を使用しなければならない。心臓移植までの橋渡しとして、完全埋め込み型人工心臓、補助人工心臓による治療も行われているが、移植後の感染症や脳血栓発生の問題を克服しなければならない²⁾。心臓移植および人工心臓の代わりとなる新たな重症心不全の治療法の開発が急務である。

成人の左心室には20~40億ほどの心筋細胞が存在する。心筋梗塞に陥った際、数時間以内に10億ほどの心筋細胞が死滅するが、成人の心筋細胞は増殖能力が低いことが知られている。新たな心筋細胞が再生せずに失われていくということは、時間の経過とともに心臓としての機能が低下することとなり、心不全を進行させることに繋がる³⁾。

2. ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた再生医療

多能性幹細胞(例:胚性多能性幹細胞)は心筋細胞を含む様々な細胞に分化することが可能であり、有望な細胞供

給源の1つであるが、倫理的問題が回避できない⁴⁾。2006年に京都大学の山中伸弥教授が4つの転写因子を用いて体細胞から人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立に成功して以来、iPS細胞はその無限増殖能と体細胞への分化能により、創薬、再生医療、病気の病態解明のツールとして注目されている⁵⁾。特に、心筋細胞のような増殖能が低い細胞に対して、iPS由来心筋細胞を用いた再生医療への応用が非常に期待されている。再生医療に使用するiPS細胞の安全性問題は今まで懸念されていたが、近年、安全性が高いiPS細胞の非侵襲的な作製法が確立され、免疫拒否反応が弱い、HLA(human leukocyte antigen)ハプロタイプのホモiPS細胞株が既に臨床に応用されている⁶⁾。

一方で、ヒトiPS細胞に由来する心筋細胞の分化誘導方法が次々に報告されている⁷⁾。心筋細胞の純度と品質の問題はほぼ解決しているが、心筋移植に億単位の細胞数が必要なため、大量かつ低コストな細胞提供、心筋細胞の精製、未分化細胞の除去、発がんリスクの回避、免疫抑制効果などの様々な問題はまだ改善途中である。

3. 心筋細胞を用いた移植法

従来のiPS細胞由来心筋細胞の移植法は、主に①心不全の病変部に細胞を直接注射する方法(直接注射法)、②生体外で心筋細胞をシート状に成形し、病変部の表面に貼り付ける方法(細胞シート法)。

①直接注射法は、単細胞懸濁液を心臓の表面から注射器で心臓壁に直接注射する方法である。ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を直接注射することで、サル的心筋梗塞の状態改善に成功したとの報告がある。しかしながら、この方法では使用する細胞数が多く、注入した細胞溶液が心筋組織から流出する、血流によって全身に散布される、細胞の生着率がわずか数%である、移植後不整脈が発生するなどの

■ 著者連絡先

大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科最先端再生医療学共同研究講座
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1フォートニクスセンターP3棟511室)
Email. li-liu@surgl.med.osaka-u.ac.jp

問題が指摘されている⁸⁾。移植後細胞の生着率を向上させるために、単細胞にゲルを混ぜて投与する方法も報告されているが、著しい改善はみられてない⁹⁾。

近年、生体外で細胞の凝集体を形成させた後に移植する方法が報告されている。単細胞の移植よりも大幅に細胞の生着率を向上させることが検証された。形成された凝集体の中で細胞同士が密に結合し、接着因子が壊れずに投与されることで、細胞の生存率が向上したと考えられる。さらに、凝集体のサイズは単細胞よりも大きいため、流出しにくいことも想定される。この凝集体を用いて、心不全モデル小動物および大動物に移植して、proof of conceptが得られている^{10),11)}。現在、医師主導の臨床試験が進行中である。

②細胞シート法は、高分子材料であるpoly(N-isopropylacrylamide, PIPAAm)がコーティングされた特殊な培養皿で作製した細胞シートを用いる方法である。37℃の環境下ではPIPAAmは疎水性の特徴を持ち、細胞と接着することができるため、細胞シート状に接着・増殖する。温度が低下するとPIPAAmは親水性により、細胞をシート状のまま剥離、回収できる¹²⁾。この方法では組織体が崩壊せず、接着タンパク質や細胞間結合タンパク質などの機能が維持されているため、移植後に生体内での生着率が上昇すると考えられる。また、単細胞の場合よりも組織の機能性が高められるため、パラクライン効果が向上すると予想される。さらに、細胞シートを用いて、心筋梗塞部位、心外膜の外側に張り付け、細胞を心筋壁に直接投与しないため、移植後不整脈が発生しにくく、注射法より極めて安全であると考えられる。

我々の研究チームでは、患者自身の骨格筋由来の筋芽細胞を用いてシートを作製する技術を開発し、心不全の患者に移植をした。多数の患者で心機能状態と運動耐用能の改善が報告されている¹³⁾。2015年には世界初の心不全治療用再生医療等製品「ハートシート®」(テルモ)の製造販売承認を取得し、企業販売が開始された。しかし、拍動できない筋芽細胞シートの治療効果には限界がある。一部の重症心不全患者に対しては状態改善効果が認められているが、線維化を伴う高度心不全患者に対しては、筋芽細胞シートの効果は不明である。心筋梗塞の部位に、線維化した細胞の代わりに健常の心筋細胞を補強する必要がある。そこで、我々は、筋芽細胞シートと同様に、iPS細胞に由来した心筋細胞シートの作製方法の最適化を行った。作製された心筋細胞シートを虚血性心筋症の小動物・大動物モデルに移植し、proof of conceptが得られている^{14),15)}。2020年からは虚血性心筋症の患者を対象としてfrist in humanの臨床展開が開始され、これまで4例の臨床試験を実施し、3例が良好に

回復していると報告され、1例治療経過を観察中である¹⁶⁾。iPS心筋シートの移植による心機能改善のメカニズムとしては、移植心筋から分泌されるサイトカインによる血管新生などのパラクライン効果、移植心筋を介した梗塞領域の電氣的同期性の向上、移植心筋の拍動収縮による心臓ポンプ機能の補助が考えられる。

移植細胞数が増加すると、心機能もより改善するという報告もあり¹⁷⁾、特に拡張型心筋症の治療に期待されている。ヒトの心室壁の厚みは約1 cmで、筋の構造が配向性を有するのが特徴である。生体内の微小環境を模倣して、移植心筋組織は配向性構造を持ち、さらに厚みも1 mm以上であることが望ましい。しかし、既存の心筋細胞シート技術ではランダムな構造であり、重厚なグラフトを作製することは困難である。一方で、ゲル材料などを用いて多層化する技術も報告されているが、心筋組織中に大きな隙間が生じ、心筋細胞密度が低く、また拍動が同期せず、配向性もない分断された組織で、1 mm以上の厚みのある組織を構築するには限界がある¹⁸⁾。既に臨床応用されている、安全性の高い生体分解素材である乳酸-グリコール酸共重合体(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)は米国食品医薬品局(FDA)に認可された徐放性医薬品基材である。PLGAを用いた配向性ナノファイバーの作製技術は同研究室で開発された。このPLGAナノファイバー上にヒトiPS細胞由来心筋細胞を播種すると、細胞はナノファイバーの表面に接着し、さらにファイバーの方向に配列することが確認された。配向性ナノファイバーで構築した心筋組織は、心筋細胞の構造に関連する遺伝子であるTnT-2(troponin T 2)、 α -actinin、MYL-2(myosin light chain 2)以外に、成人成熟心筋マーカーである β -MHC(myosin heavy chain)の発現も著しく上昇させることが明らかとなった。

注目すべきことは、この技術で作製されたiPS由来心筋組織が配向性を有するとともに、0.2 mm以上の厚みを持つ心筋組織シートの構築に成功した¹⁹⁾ことである。足場を有するため、従来の細胞シートと比較して、強い物理的強度を持ち、良好な操作性、運搬性、保存性を示した。また、ファイバーが組織内に適度な微細間隙を作ることで、十分な栄養と酸素を供給することができた。さらに、作られた組織は配向性を持つため、ファイバーの方向性に沿って、電氣的に同期し、拍動時の組織収縮力向上も確認された。これを、小動物・大動物の虚血性心筋症モデルへ移植した結果、著明な心機能改善効果、大量かつ重厚な組織の心臓表面への生着が確認された。心臓の線維化状態が回復し、不整脈と炎症反応は全く確認されなかった(図1, 図2)^{19),20)}。最近では、この技術に基づき、さらに3次元回転培養装置

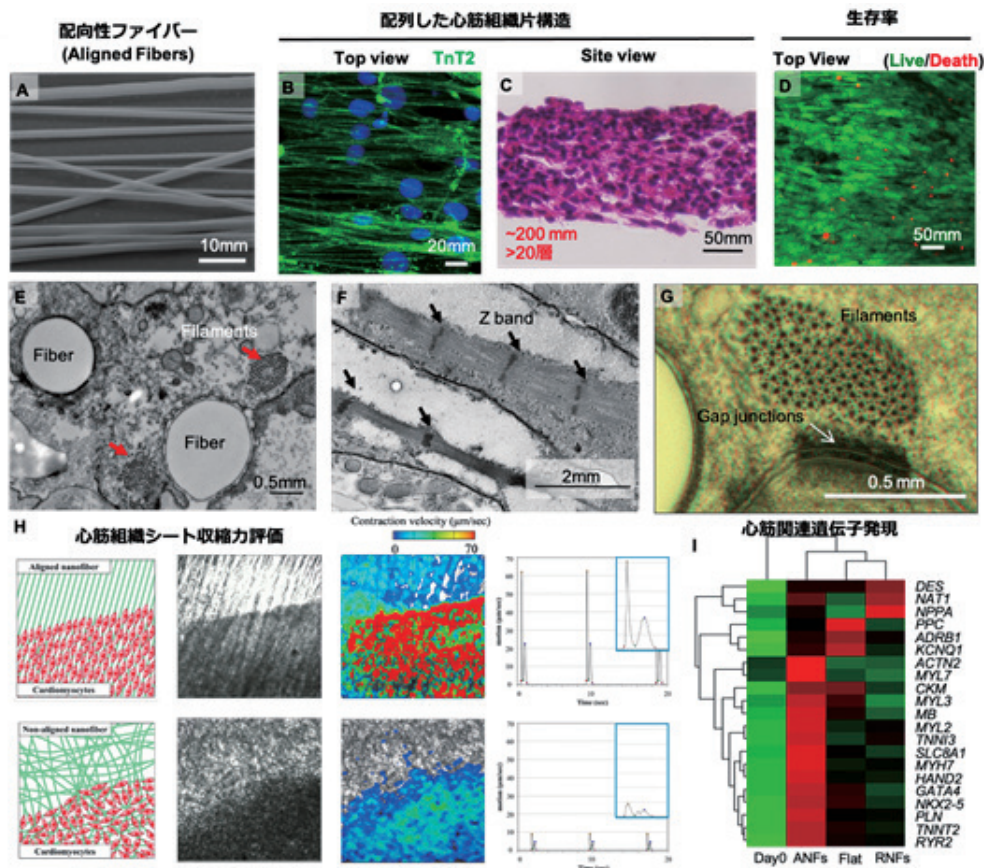


図1 配向性ファイバーを用いた心筋組織の構築および有効性評価

(A) 配向性ファイバー構造 (SEM), (B) 配向性ファイバーで構築した心筋組織の配向性構造 (TnT2 染色), (C) 配向性ファイバーで構築した心筋組織の3次元構造 (HE 染色), (D) 3次元・配向性心筋組織の生存状態, (E~G) 3次元・配向性心筋組織内部の構造 (TEM), (H) 配向性構造心筋組織とランダム構造心筋組織の力学評価, (I) 心筋と関係する遺伝子発現レベルの比較 (Day0: 心筋細胞分化誘導前, ANFs: 3次元・配向性構造心筋組織, Flat: 従来の培養皿で培養した2D・ランダム構造心筋細胞, RNFs: 3次元・ランダム構造心筋組織 HE, hematoxylin-eosin; SEM, scanning electron microscope; TEM, transmission electron microscopy.

と融合して工学的工夫を加えることで、さらに重厚かつ高機能な組織の構築技術を発展させてきた²¹⁾。2022年3月現在、厚み1 mmの重厚な組織の構築に成功し、虚血性心筋症小動物モデルの有効性を検証した。

4. 最後に

本稿では、心不全治療を目的とした再生医療技術をまとめた(表1)。将来的には、これら複数分野の独創的技術およびアイデアにより、実際の心臓の心室壁に近い組織を構築する(図3)。最終的には、組織工学技術を駆使した高機能化心筋組織による次世代心不全根治法の開発を目指す。

本稿の著者には規定されたCOIはない。

文献

1) Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, et al; American Heart Association Advocacy Coordinating Committee; Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiovascular Radiology and

Intervention; et al: Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail* **6**: 606-19, 2013

2) Vis A, Arfaee M, Khambati H, et al: The ongoing quest for the first total artificial heart as destination therapy. *Nat Rev Cardiol* **6**, 2022

3) Nelson VL, Brunt KR: Cutting the molecular brakes to achieve cardiac regeneration. *Cell Death Differ* **28**: 1126-9, 2021

4) Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* **108**: 407-14, 2001

5) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**: 663-76, 2006

6) Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, et al: An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* **31**: 458-66, 2013

7) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al: Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* **104**: e30-41, 2009

8) Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, et al: Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes

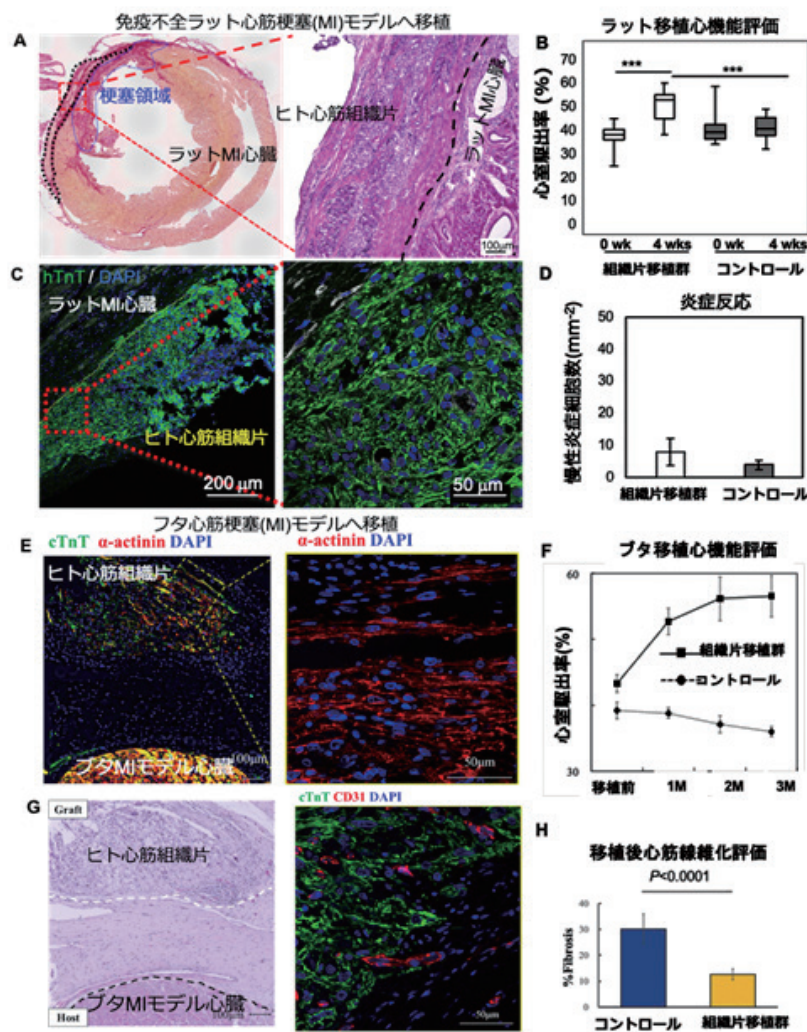


図2 配向性ファイバーで構築した心筋組織を用いて、心不全小・大動物モデルに移植の有効性評価 (A~D) 免疫不全ラット心筋梗塞(MI)モデルへ移植 (E~H) フタ心筋梗塞モデルの移植前後の心機能評価, 移植細胞の生着能, 線維化状態, 血管新生状態および炎症反応の比較 (組織片: 配向性ファイバーで構築した3次元・配向性心筋組織, コントロール: 配向性ファイバーのみ) DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; MI, myocardial infarction.

regenerates primate hearts. *Nature* **538**: 388-91, 2016

- 9) Funakoshi S, Fernandes I, Mastikhina O, et al: Generation of mature compact ventricular cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Commun* **12**: 3155, 2021
- 10) Kawaguchi S, Soma Y, Nakajima K, et al: Intramyocardial Transplantation of Human iPSC Cell-Derived Cardiac Spheroids Improves Cardiac Function in Heart Failure Animals. *JACC Basic Transl Sci* **6**: 239-54, 2021
- 11) Monsanto MM, Wang BJ, Ehrenberg ZR, et al: Enhancing myocardial repair with CardioClusters. *Nat Commun* **11**: 3955, 2020
- 12) Iseoka H, Miyagawa S, Fukushima S, et al: Pivotal Role of Non-cardiomyocytes in Electromechanical and Therapeutic Potential of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Cardiac Tissue. *Tissue Eng Part A* **24**: 287-300, 2018
- 13) Kainuma S, Miyagawa S, Toda K, et al: Long-term outcomes of autologous skeletal myoblast cell-sheet transplantation for end-stage ischemic cardiomyopathy. *Mol Ther* **29**: 1425-38, 2021
- 14) Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, et al: Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart. *Circulation* **128**: S87-94, 2013
- 15) Higuchi T, Miyagawa S, Pearson JT, et al: Functional and Electrical Integration of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Myocardial Infarction Rat Heart. *Cell Transplant* **24**: 2479-89, 2015
- 16) Miyagawa S, Kainuma S, Kawamura T, et al: Transplantation of iPSC-Derived Cardiomyocyte Patches for Ischemic Cardiomyopathy. *Cardiovascular Medicine (medRxiv.org)*, 2022
- 17) Querdel E, Reinsch M, Castro L, et al: Human Engineered Heart Tissue Patches Remuscularize the Injured Heart in a Dose-Dependent Manner. *Circulation* **143**: 1991-2006, 2021
- 18) Matsuo T, Masumoto H, Tajima S, et al: Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells. *Sci Rep* **5**: 16842, 2015

表1 移植方法および効果の比較

移植方法	注射法		組織シート法		
	単細胞	スフィア	スカフォードフリー	スカフォード	
			Cell sheet	Hydrogel sponge など	Aligned fiber など
細胞種類	自己心筋細胞, iPS/ES 由来心筋前駆細胞・線維化細胞・間葉系幹細胞 など				
配向性構造	-	-	-	+ 23)	+ 19),20)
ECM	-	+	+	+	+
電気統合	+ 8)	No report	+ 14),15)	No report	+ 19)
移植細胞生着率	+ 8)	+ 10),11)	+ 14)	+ 18),23)	+ + 19),20)
移植後不整脈の発生	+ 8)	+ 10),11)	- 14)	- 18),23)	- 19),20)
小動物	+ 9)	+ 11)	+ 15)	+ 18),24)	+ 19),21)
大動物	+ 8)	+ 10),11)	+ 14)	+ 23),25)	+ 20)
前臨床有効性	+			+	
ヒト	autologous cardiosphere-derived cells CDC ²²⁾	Not yet	+ hiPS-CMs ¹⁶⁾	hES-cardiac progenitors cell ²⁶⁾	Not yet

CDC, cardiosphere-derived cell; ECM, extracellular matrix; ES, embryonic stem; iPS, induced pluripotent stem.

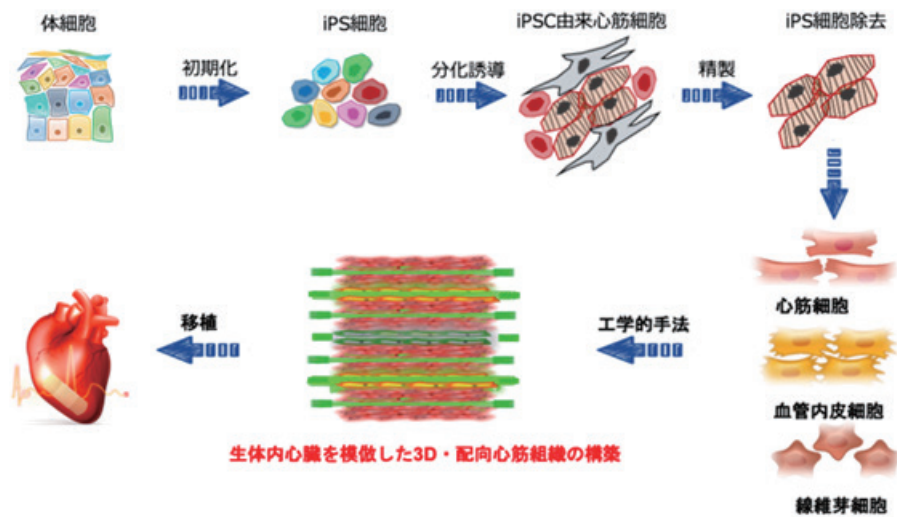


図3 組織工学技術を駆使した高機能化心筋組織の構築を目指す
iPSC, induced pluripotent stem cell.

- 19) Li J, Minami I, Shiozaki M, et al: Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Tissue-like Constructs for Repairing the Infarcted Myocardium. *Stem Cell Reports* **9**: 1546-59, 2017
- 20) Suzuki K, Miyagawa S, Liu L, et al: Therapeutic efficacy of large aligned cardiac tissue derived from induced pluripotent stem cell in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *J Heart Lung Transplant* **40**: 767-77, 2021
- 21) Nakazato T, Kawamura T, Uemura T, et al: Engineered three-dimensional cardiac tissues maturing in a rotating wall vessel bioreactor remodel diseased hearts in rats with myocardial infarction. *Stem Cell Reports* **17**: 1170-82, 2022
- 22) Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al: Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* **379**: 895-904, 2012
- 23) Weinberger F, Breckwoldt K, Pecha S, et al: Cardiac repair in guinea pigs with human engineered heart tissue from induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* **8**: 363ra148, 2016
- 24) Bellamy V, Vanneau V, Bel A, et al: Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *J Heart Lung Transplant* **34**: 1198-207, 2015
- 25) Menasché P, Vanneau V, Fabreguettes JR, et al: Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J* **36**: 743-50, 2015
- 26) Menasché P, Vanneau V, Hagege A, et al: Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J* **36**: 2011-7, 2015