

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19539

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた心臓電気機能再生研究

研究課題名(英文) iPS cells for cardiac electrical regeneration

研究代表者

柴 祐司 (SHIBA, YUJI)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：70613503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトES細胞由来心筋細胞の活動電位をパッチクランプ法で測定したところ、心筋細胞は約10%のペースメーカー様細胞と約90%の心室筋様細胞から構成されていることが判明した。この心筋細胞をラット心臓に移植したところ、ペースメーカー様細胞比率は時間経過とともに有意に低下した。これらの結果から、移植後不整脈は移植後に短期的に生着したペースメーカー細胞が原因であることが強く示唆された。次に、バイオペースメーカーの開発を目指して、ペースメーカーチャネルHCN4遺伝子下流に蛍光蛋白・抗生剤耐性遺伝子を導入し、純度の高いペースメーカー細胞の抽出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

激増する心不全に対する新たな治療法として、多能性幹細胞を用いた再生治療の実用化が期待されている。しかし、前臨床試験において、心筋細胞移植後不整脈が報告され、この副作用の解決が必要である。本研究において、移植後不整脈のメカニズムが解明され、今後の解決方法の開発が期待される。一方、移植後不整脈の原因となる、ペースメーカー細胞を用いた、バイオペースメーカーの開発は、機械式ペースメーカーに代わる新たな治療選択肢となる可能性がある。本研究において作製されたペースメーカー細胞を用いたPOC試験が期待される。

研究成果の概要(英文)：We patch-clamped human ES cell-derived cardiomyocytes (hESC-CMs) to analyze action potential pattern and found that hESC-CMs consisted of 10% of nodal-like CMs and 90% of ventricular-like CMs. When we transplanted these hESC-CMs into rat hearts, the fraction of nodal-like CMs was significantly decreased over-time, suggesting that the post-transplant ventricular arrhythmia attributes to this temporal engraftment of nodal-like CMs. We next tried to develop a biological pacemaker and generated human iPS cell (iPSC) line expressing fluorescent protein and antibiotic resistance gene under HCN4 gene. With this genetically modified iPSCs, we were able to obtain high-purified nodal CMs.

研究分野：循環器内科学

キーワード：再生医療 心不全 徐脈性不整脈 多能性幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞を始めとする多くの心疾患の終末像である重症心不全に対する新たな治療法として、多能性幹細胞を用いた心筋再生治療の開発が期待されている。私たちはヒト ES 細胞から作製した心筋細胞を心筋梗塞モデル動物に移植したところ細胞の生着と心機能の改善を報告した (Shiba et al. Nature 2012)。さらにカニクイザル iPS 細胞由来心筋細胞をカニクイザル心筋梗塞モデルに同種移植したところ、傷害心臓が再生することを世界で初めて証明した (Shiba et al. Nature 2016)。一方でこの治療の副作用として、心筋細胞移植後に一過性心室性不整脈が増加することも明らかとなり、今後臨床応用に向けて移植後不整脈の解決が極めて重要である。

### 2. 研究の目的

これまでの前臨床試験で使用されてきた心筋細胞は、心室筋細胞、心房筋細胞といった作業心筋とペースメーカー細胞が混在した細胞集団である。

移植後不整脈の原因として、心筋細胞に混在するペースメーカー細胞の関与が指摘されているが、詳細なメカニズムは不明である。本研究の第一の目的は多能性幹細胞由来心筋細胞移植後の不整脈発生のメカニズム解明である。

本研究のもう一つの目的は、徐脈性不整脈に対する iPS 細胞を用いたバイオペースメーカーの開発である。現在、徐脈性不整脈の治療として機械式ペースメーカー植込みが行われている。デバイス性能の向上とともに症例数が増加しているが、機械式ペースメーカーは、定期的な電池交換術が必要であり高額な医療費が医療経済を圧迫している。さらに植込み手術後のペースメーカー感染の増加が大きな問題となっている。バイオペースメーカーに必要な細胞数は少数であり、機械的ペースメーカーで問題となる様々な問題を、より低コストで根本的に解決できる。バイオペースメーカーの機能評価には、従来からの異種移植による検討は不適切であることから、ヒトに近い霊長類間の同種移植によって治療効果と安全性を評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 移植後不整脈発生のメカニズム解明

未分化ヒト iPS 細胞に対して、アクチビン A、BMP4、Wnt シグナル調節薬を投与し心筋細胞を作製する。心筋細胞のサブタイプ (心室筋、心房筋、ペースメーカー細胞) の比率についてパッチクランプ法および免疫染色法で確認する。また各サブタイプに特徴的な遺伝子について RT-PCR 法で mRNA 量を測定する。サブタイプが同定された心筋細胞を免疫不全ラットに移植する。これまでの心筋細胞移植実験では、細胞移植後 2-4 週間で不整脈発生頻度はピークとなり、以後漸減し 12 週間後には消失していた。そこで、本実験ではラットへの移植後、2 週間、4 週間および 12 週間後に心臓を摘出し、組織学的に評価する。サブタイプの評価として、MLC2v (心室筋) MLC2a (心房または心室筋) SLN (心房筋) SHOX2 (ペースメーカー) HCN4 (ペースメーカー) Nkx2.5 (非ペースメーカー) に対する免疫染色を行う。また、各タイムポイントでグラフト心筋組織部位をレーザーマイクロダイセクション法で切り出し、RT-PCR 法で mRNA 量を測定する。これらの因子について、移植前の心筋細胞と移植 2 週後、4 週後および 12 週後で比較することにより違いを見出し、移植後不整脈のメカニズムを明らかとする。

#### (2) バイオペースメーカーの開発

iPS 細胞由来心筋細胞に含まれるペースメーカー細胞を用いてバイオペースメーカーを開発する。In vivo においてペースメーカー機能を評価するためには、ヒト由来細胞を動物モデルに移植する異種移植はホストとグラフト細胞の電気生理学的特性の違いがあり不適切である。そこで本研究では、カニクイザル iPS 細胞からペースメーカー細胞を作製し、カニクイザル房室ブロックモデルに移植し、ペースメーカー機能を評価する。心筋細胞からペースメーカー細胞を選別するために、ペースメーカーチャネルである HCN4 遺伝子領域下流に蛍光蛋白遺伝子および抗生物質耐性遺伝子を CRISPR-Cas9 を用いて導入する。遺伝子導入 iPS 細胞から心筋細胞を作製し、抗生物質を投与することにより純化したペースメーカー細胞を作製する。

カニクイザル房室ブロックモデルは、右内頸静脈から右心房にアプローチし、His 側電位を確認しカテーテルアブレーションにより作製する。房室ブロック作製 8 週間後に  $1 \times 10^7$  のペースメーカー細胞を心尖部に直接注射で移植する。移植前後で 12 誘導心電図、Holter 心電図を行い異所性心室調律と心拍数の変化を確認する。さらに移植 8 週間後に開胸し、膜電位感受性蛋白を用いた蛍光イメージングを行い、移植ペースメーカー細胞が再早期興奮部位であることを確認する。

### 4. 研究成果

まず、ヒト ES 細胞由来心筋細胞の電気生理学的特性を確認するために、パッチクランプ法で活動電位を測定した。この結果、心筋細胞は約 10%のペースメーカー様細胞と約 90%の心室筋様細胞から構成されていることが判明した。in vitro において、心筋細胞を 12 週間長期培養し

たが、ペースメーカー様細胞と心室筋様細胞の構成比率は変化しなかった。次にこの心筋細胞をラット心臓に移植したところ、ペースメーカー様細胞は移植後 4 週間まで生着したが、移植 12 週間後には有意に構成比率が低下した。移植 12 週間後の心筋グラフトは比較的成熟化した心室筋様細胞で構成されていた。これらの結果から、移植後不整脈は移植後に短期的に生着したペースメーカー細胞が原因であることが強く示唆された。

次に、バイオペースメーカーの開発目的で、ペースメーカー細胞を心筋細胞から分離するために、ペースメーカーチャネル HCN4 遺伝子下流に蛍光蛋白・抗生剤耐性遺伝子を導入し、純度の高いペースメーカー細胞の抽出に成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----