

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15307

研究課題名(和文) 難治性不整脈に対するiPS細胞を用いたバイオリジカルデバイスの開発

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

研究代表者

木村 和広 (KIMURA, Kazuhiro)

信州大学・医学部附属病院・助教(診療)

研究者番号：20744072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、iPS細胞を用いた新たな不整脈治療の開発である。サルiPS細胞由来心筋細胞をサル心筋梗塞モデルに移植したところ、予想外に心室性頻拍の頻度が増加した。この結果から、心筋細胞移植に伴う不整脈抑制技術の開発が今後の課題であることが明らかとなった。次にペースメーカー細胞を得るため、iPS細胞由来心筋細胞からペースメーカーチャネルであるHCN4陽性細胞を選別した。しかしこの細胞はペースメーカー細胞のPhenotypeとは必ずしも一致せず、今後新たなペースメーカー細胞マーカーの樹立が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pluripotent stem cells (PSCs) show great promise in regenerative therapies for advanced organ failure that would otherwise require whole organ transplantation. In the case of heart failure, preclinical studies have provided proof-of-concept evidence on the effectiveness of PSC-derived cardiomyocytes (PSC-CMs). We first transplanted monkey PSC-CMs into monkey model of myocardial infarction and found that transplantation of PSC-CMs increased the incidence of ventricular arrhythmia. Another promising application of PSC-CMs for cardiac repair is as a biological cardiac pacemaker. The adult human heart consists of approximately 4 billion cardiomyocytes, all of which contract in synchrony by the autonomous excitation of roughly 10,000 pacemaker cells. We collected pacemaker channel HCN4 positive PSC-CMs in an attempt to obtain pure pacemaker cells, however, these cells did not necessarily show characteristics of pacemaker cells.

研究分野：循環器内科

キーワード：再生医療 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

人口の高齢化、食生活の欧米化に伴い、心疾患患者は増加している。様々な心疾患の終末像である末期心不全患者において、頻脈性心室性不整脈は患者の予後に関わる重大な問題である。現在、これらの頻脈性不整脈に対して ICD が積極的に使用され、良好な治療成績が示されている。また洞不全症候群や房室ブロックといった徐脈性不整脈も増加しており、恒久的ペースメーカー植え込み術数も増加している。日本全国では 2012 年には恒久型ペースメーカー植え込み術が 59,000 件、ICD の移植術が約 9,000 件行われている(日本不整脈デバイス工業会統計)。しかし、これらのデバイス治療の増加による医療コストは激増しており、今後大きな社会問題となることが想定される。さらに症例数の増加により、デバイス感染の増加という新たな問題も浮き彫りになっている。一旦デバイス感染を起こすと難治性であり、通常デバイスシステムの全除去が必要となるため問題は深刻である。そこで本研究では、これらの人工デバイス治療に代わる新たな治療法として、iPS 細胞を用いたバイオリジカルデバイスの開発を目指すこととした。

心臓は自己再生能が極めて低いことが知られており、いったん傷害された場合には機能回復が困難である。近年、多能性幹細胞(ES 細胞および iPS 細胞)から心筋細胞を作製し、傷害した心臓を再生する新たな再生医療の可能性が注目されている。申請者らは、移植された心筋細胞が、モルモット心筋傷害モデルにおいて、ホストの心筋細胞と電気生理学的に結合し協調して拡張/収縮することにより心機能の改善だけでなく、心室性不整脈を抑制すること(抗不整脈作用)を報告した(Shiba et al. Nature 2012)。多能性幹細胞由来心筋細胞には、心室筋や心房筋といった拡張/収縮に直接関与する心筋細胞(機能心筋細胞)の他に、心臓の電気生理学的調節を行うペースメーカー細胞が存在することが知られている。理想的には、心機能の回復や抗不整脈作用には機能心筋細胞の移植が望ましいが、これまでの前臨床試験においては、ペースメーカー細胞を含む全心筋細胞が用いられている。

申請者らは、ヒトおよびサル iPS 細胞から心筋細胞を作製し、ペースメーカーチャネルである HCN4 を用いて、機能心筋細胞とペースメーカー細胞の選別に成功している。そこで、ヒトに最近種であるサルを用いて、機能心筋細胞による抗不整脈治療と、ペースメーカー細胞を用いた徐脈性不整脈に対するバイオリジカルペースメーカーの開発を目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、iPS 細胞を用いた新たな不整脈治療の開発である。現在、頻脈性不整脈、特に致死性の心室性不整脈に対しては植え

込み型除細動器(ICD) また、徐脈性不整脈に対しては、恒久的ペースメーカー植え込み術が広く普及している。しかし、これらの植え込み型デバイスの適応が広がるにつれ、膨大な医療費の問題に加え、デバイス感染といった重大な問題が浮き彫りになっている。そこで本研究では人工デバイス治療とは異なる治療法として、iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、(1) 頻脈性不整脈に対する抗不整脈治療(2) 徐脈性不整脈に対するバイオリジカルペースメーカーの開発を目指す。

3. 研究の方法

ヒトの心拍数は通常 50-100 bpm であり、小動物と比べ極めて低値である。このためヒト iPS 細胞由来心筋細胞を小動物に移植する実験モデルは電気生理学的特性の評価としては不適切である。本研究ではヒトと類似のサル iPS 細胞から心筋細胞を作製し、HCN4 により機能心筋細胞とペースメーカー細胞に分離し、サル心臓に移植する。細胞移植後の電気生理学的特性について以下の 2 点に着目し検討した。

(1) 頻脈性不整脈に対する抗不整脈治療
カニクイザル皮膚の線維芽細胞に対して、エピゾーマルベクターを用いて、Oct3/4、Sox2、Klf4、L-Myc を遺伝子導入することにより iPS 細胞を作製しさらに iPS 細胞から、マトリゲル®、アクチビン A、BMP-4 を加えることにより、大量心筋細胞の作製を試みた。心筋細胞をカニクイザル心筋梗塞モデルに移植し、移植後不整脈を Holter 心電図で評価した。

(2) 徐脈性不整脈に対するバイオリジカルペースメーカー

カニクイザル心筋細胞からペースメーカー細胞を分離するために HCN4 抗体によって MACS 法で陽性細胞を選別・回収する。徐脈モデルとして、経皮的カテーテル心筋焼却術によるカニクイザル房室ブロックモデルを作製する。房室ブロック作製後、前述と同様の免疫抑制剤を投与し、開胸下で 1×10^7 個のペースメーカー細胞を左室心尖部に直接注射により移植する。移植心筋細胞の電気的活動を評価するために、蛍光 Ca センサー GCaMP を用いた蛍光イメージングシステムを行う。GCaMP は緑色蛍光蛋白(GFP)と Ca 結合蛋白であるカルモデュリンの複合成蛋白であり、Ca と結合することにより GFP が蛍光発色することが知られている。カニクイザル iPS 細胞に GCaMP を遺伝子導入し、心筋細胞(GCaMP+サル iPS-心筋細胞)の作製を試みた。移植後 4 週間モニター心電図を用いて心拍数と異所性ペースメーカーリズムの有無を観察し移植前後での変化を評価する。移植されたペースメーカー細胞が直接ペースメーカーとして機能しているかどうかを確認するために、移植 4 週間後に再度開胸し、in vivo および ex vivo(Langendorff 法)において、

GCaMP のイメージングを行う。実際にペースメーカーとして機能した場合には、心室収縮の直前に GCaMP3 の蛍光発色 (= グラフトペースメーカー細胞の収縮) が確認できる。

4. 研究成果

(1) 頻脈性不整脈に対する抗不整脈治療カニクイザル皮膚線維芽細胞に対して、Oct4、L-Myc、Klf4、Sox2 を遺伝子導入し、カニクイザル iPS 細胞を樹立した。次に、アクチビン A、BMP4 を iPS 細胞に加え、カニクイザル心筋細胞の作製に成功した (図 1)。

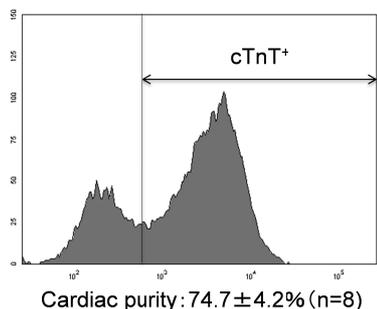
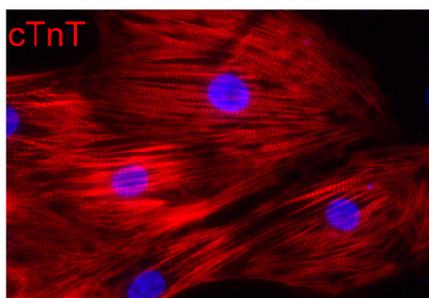
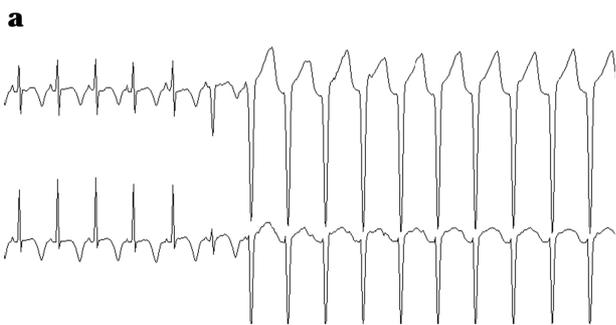


図 1 .iPS 細胞由来心筋細胞 免疫染色およびフローサイトメトリーで心筋トロポニン T (cTnT) 陽性の心筋細胞

作製した 4×10^8 の心筋細胞を、心筋梗塞を発症したカニクイザル心臓に移植したところ、移植後 12 週間経過しても、移植細胞が生着し残存していることが確認できた。次に、心筋細胞移植後の不整脈発生について、Holter 心電図を用いて検討した。図 2a に示すような心室性頻拍が散見された。また心筋細胞移植動物においては持続性の心室性頻拍を認め、その頻度は control (vehicle 移植) 動物に比べ、有意に増加していた (図 2b)。しかし、心室性頻拍の持続時間は移植後 7 日 14 日がピークでその後短縮し、消失した (図 2c)。



1 s

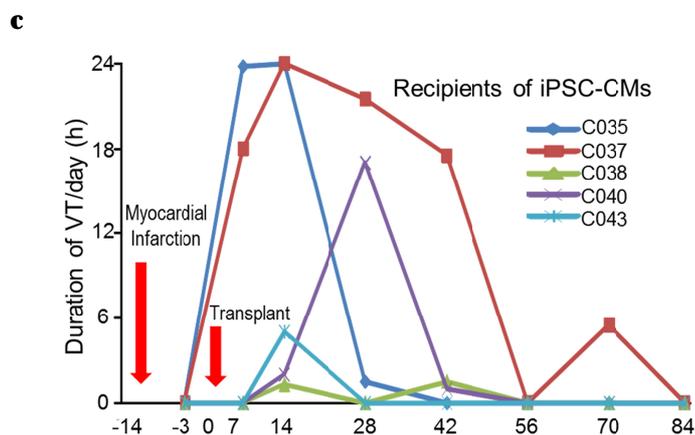
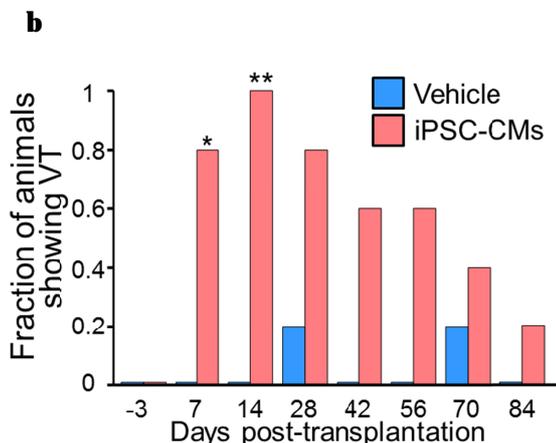


図 2 . 心筋細胞移植後心室性頻拍

a, 代表的心室性頻拍波形 b, 心室性頻拍は vehicle 群に比べ心筋細胞移植群で有意に増加 c, 心室性頻拍持続時間の時系列変化

大動物同種心筋細胞移植モデルにおいては、私たちの当初の仮説とはことなり、細胞移植後の不整脈が増加することが明らかとなった。

(2) 徐脈性不整脈に対するバイオロジカルペースメーカー

カニクイザル iPS 細胞に対して、エレクトポレーション法により GCaMP 遺伝子導入を複数回行い、安定して GCaMP 蛋白が発現する細胞株の樹立に成功した。さらにこの遺伝子改変 iPS 細胞から心筋細胞を作製したところ、収縮の周期と一致して、蛍光発色する心筋細胞の作製に成功した。MACS 法を用いて HCN4 陽性細胞を選別回収したところ、この細胞は実際に HCN4 陽性の細胞であることが確認できた。しかし、HCN4 陽性細胞は自立拍動周期、遺伝子・蛋白発現のパターンが

ペースメーカー細胞の phenotype とは必ずしも一致しなかった。近年ペースメーカー細胞のマーカ―について著しく研究が進み、HCN4 陽性だけでなく、SHOX2 陽性、Nkx2.5 陰性など多くの新しい知見が得られている。

そこで、現在これらの新しいマーカ―による選別について現在検討を進めている。

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6．研究組織

(1)研究代表者

木村 和広 (KIMURA, Kazuhiro)

信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)

研究者番号：20744072