

Review

【分科会特集 〈小児心血管分子医学研究会〉】

重症心不全に対する再生治療： 大阪大学から世界に発信する再生医療の実際

宮川 繁

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科学

The Regenerative Medicine for Heart Failure: From Transplant Therapy to In Vitro Study

Shigeru Miyagawa

Department of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

Heart transplantation, the most critical treatment method for severe heart failure, has an extremely serious shortage of donors. Although a new transplantation bill has been passed, it is expected to be difficult spread as a highly versatile treatment method in Western countries. On the other hand, for the left ventricular assist device (LVAD), since the waiting period for transplantation is long in Japan, complications such as infectious diseases and cerebral thrombosis greatly influence the results. To overcome this situation, expectations for regenerative medicine are increasing worldwide, and there is an urgent need to develop new treatments to replace heart transplantation and LVAD. Therefore, research on cell transplantation, tissue transplantation, and regenerative drug discovery using regenerative medicine methods to treat severe heart failure is progressing, as well as their clinical application. In this paper, along with the translational research of myoblast sheets, we will introduce heart failure treatment using iPS cell-derived cardiomyocyte sheets, introduce disease-specific iPS cells, and outline new heart failure treatment using regenerative medicine technology.

Keywords: cell, heart failure, iPS cell, sheet

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。これらの課題を克服するため、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。このような状況のなか、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進み、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ー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試み、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。

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°C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°C 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°C 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一体化機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、低酸素誘導因子 1 (Hypoxia Inducible Factor-1: 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⁾ (Fig. 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、左室リバーシリモデリング、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⁾。虚血性心筋症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、安全性、有効性が検証される。

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、失った健常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、健常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、組織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実証実験も得られている^{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

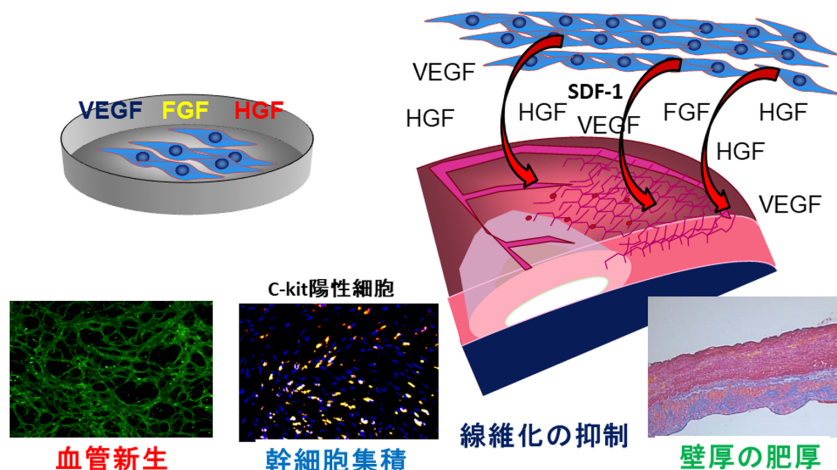


Fig. 1 予測される心筋組織修復のメカニズム

FGF: 線維芽細胞増殖因子, HGF: 肝細胞増殖因子, VEGF: 血管内皮細胞増殖因子

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、血流の改善が起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 (jRCT2053190081) で施行された (Fig. 2)。

循環器疾患における疾患特異的 iPS 細胞およ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、KCNQ1¹⁴⁾、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、刺激伝導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)}。

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

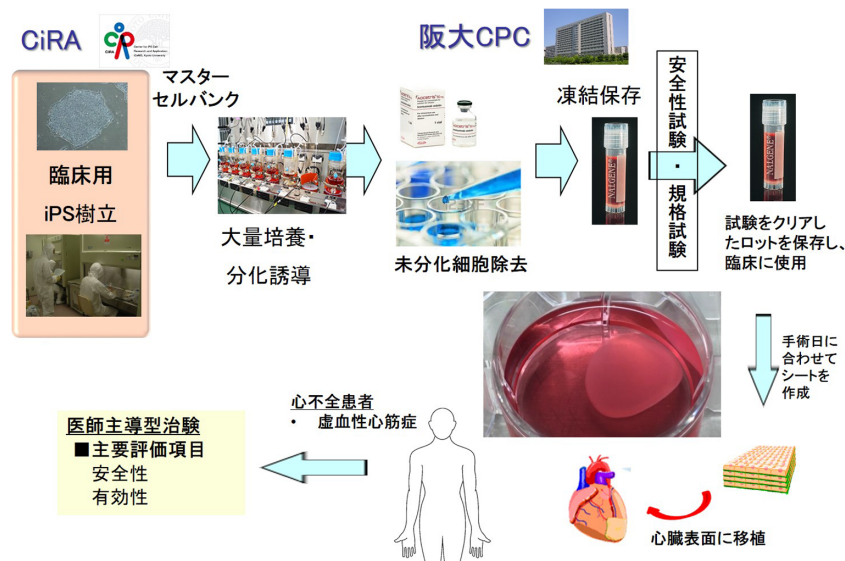


Fig. 2 医師主導型治験の概要

および心筋細胞収縮蛋白、構造蛋白、ひ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 (Fig. 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 (Fig. 3(b))。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、コラーゲンタイプ (collagen type; Col) I, フィブロネクチン, 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

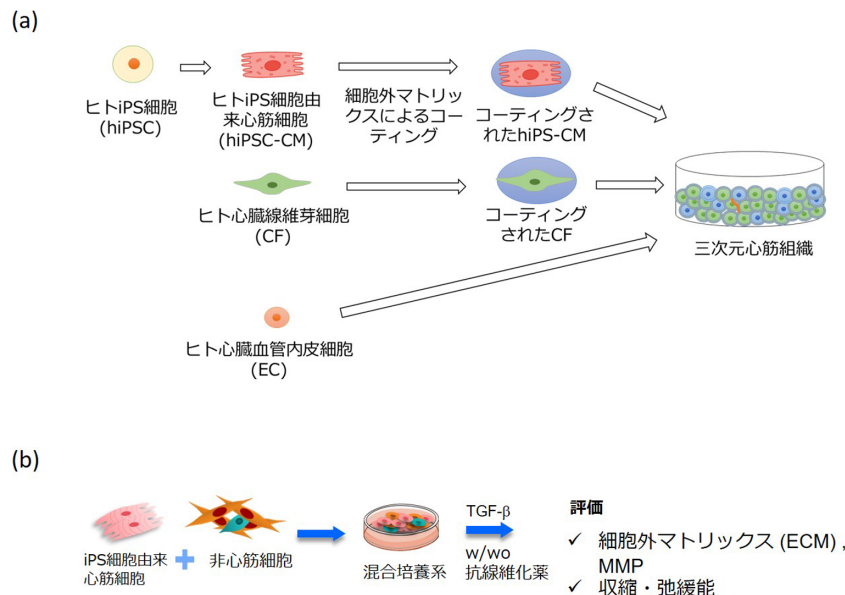


Fig. 3 ヒト iPS 細胞を用いた創薬スクリーニングシステムの開発

(a) ヒト iPS 細胞由来心筋組織の構築

(b) 心筋線維化の in vitro 病態モデルの作製と評価

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²⁶⁾。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。

利益相反

本稿について、開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, et al: Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile amplitude. *Tissue Eng* 2001; **7**: 141–151
- 2) Kobayashi J, Kikuchi A, Aoyagi T, et al: Cell sheet tissue engineering: Cell sheet preparation, harvesting/manipulation, and transplantation. *J Biomed Mater Res A* 2019; **107**: 955–967
- 3) Memon IA, Sawa Y, Fukushima N, et al: Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; **130**: 1333–1341
- 4) Miyagawa S, Roth M, Saito A, et al: Tissue-engineered cardiac constructs for cardiac repair. *Ann Thorac Surg* 2011; **91**: 320–329
- 5) Sawa Y, Yoshikawa Y, Toda K, 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. *Circ J* 2015; **79**: 991–999
- 6) Yu T, Miyagawa S, Miki K, et al: In vivo differentiation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ J* 2013; **77**: 1297–1306
- 7) Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, 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** Suppl 1: S29–S37
- 8) Ishida M, Miyagawa S, Saito A, 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**: 291–298
- 9) 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* 2015; **24**: 2479–2489
- 10) 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* 2018; **24**: 287–300
- 11) Matsuura K, Kodama F, Sugiyama K, et al: Elimination of remaining undifferentiated induced pluripotent stem cells in the process of human cardiac cell sheet fabrication using a methionine-free culture condition. *Tissue Eng Part C Methods* 2015; **21**: 330–338
- 12) Sougawa N, Miyagawa S, Fukushima S, et al: Immunologic targeting of CD30 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells, allowing safer clinical application of hiPSC-based cell therapy. *Sci Rep* 2018; **8**: 8
- 13) Ito E, Miyagawa S, Takeda M, et al: Tumorigenicity assay essential for facilitating safety studies of hiPSC-derived cardiomyocytes for clinical application. *Sci Rep* 2019; **9**: 1881
- 14) Wang Y, Zhang WY, Hu S, et al: Genome editing of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells with zinc finger nucleases for cellular imaging. *Circ Res* 2012; **111**: 1494–1503
- 15) Matsa E, Rajamohan D, Dick E, et al: Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *Eur Heart J* 2011; **32**: 952–962
- 16) Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al: Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; **471**: 225–229
- 17) Lan F, Lee AS, Liang P, et al: Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2013; **12**: 101–113
- 18) Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, et al: Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc* 2014; **3**: e001263
- 19) Ebert AD, Liang P, Wu JC: Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; **60**: 408–416
- 20) Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, et al: Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science* 2015; **349**: 982–986
- 21) Caspi O, Huber I, Gepstein A, et al: Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells. *Circ Cardiovasc Genet* 2013; **6**: 557–568
- 22) Ma D, Wei H, Lu J, et al: Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2013; **34**: 1122–1133
- 23) Takeda M, Miyagawa S, Fukushima S, et al: Development of in vitro drug-induced cardiotoxicity assay by using three-dimensional cardiac tissues derived from human induced pluripotent stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2018; **24**: 56–67
- 24) Amano Y, Nishiguchi A, Matsusaki M, et al: Development of vascularized iPSC derived 3D-cardiomyocyte tissues by filtration Layer-by-Layer technique and their application for pharmaceutical assays. *Acta Biomater* 2016; **33**: 110–121
- 25) Tadano K, Kazusa K, Takamatsu K, 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
- 26) Iseoka H, Miyagawa S, Sakai Y, et al: Cardiac fibrosis models using human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissues allow anti-fibrotic drug screening *in vitro*. *Stem Cell Res* 2021; **54**: 102420