

重症心不全に対する ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シート治療の現状

齋藤 充弘*・宮川 繁・澤 芳樹

はじめに

わが国は、現在、急速な高齢化社会を迎えるとともに、食生活をはじめとした生活習慣の欧米化とあいまって、疾病構造が変化してきている。循環器領域においても、虚血性心疾患に代表される動脈硬化性疾患が年々増加し、しかも、さまざまな合併症を伴うようになってきた。そして、重症心不全をはじめとする難治性循環器疾患はわが国の3大国民病のうちの一つであるが、世界に類を見ない高齢化社会を迎えたわが国においては、今後さらに心不全患者数の増大および治療費の増加が予想され、医療費の高騰に拍車をかけるものと推測される。また、高度のドナー不足から移植医療に閉塞感の強いわが国では、年々増加する患者数に対応すべく、心臓移植に代わるような治療法の開発も急務となっている。

わが国における心疾患の現状

虚血性心疾患、心不全、不整脈、脳血管障害などの循環器系疾患は、主な死因となる疾患であるだけでなく、患者数においても増加の一途をたどっており、循環器系疾患に対する予防と治療は、わが国の重要な問題となっている。さらに、最近の心疾患に対する治療の進歩にかかわらず、重症心不全に対する治療体系は確立されていないのが現状である。心不全に対する治療法として、βブロッカーやアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤による内科治療が行われるが、それらも奏功しないほど重症化した場合には、外科治療が有効である。しかし、これら重症心不全に対する置換型治療はドナー不足や免疫抑制、合併症など解決すべき問題が多く、すべての重症心不全患者に対する普遍的な治療法とは言い難い。実際に、心臓移植希望者の日本臓器移植ネットワークへの登録は、「臓器移植に関する法律」が施行された1997年10月から開始され、その1年4か月後の1999年2月28日に日本で初めての心臓移植が大阪大学で実施された。2018年4月30日現在、600人以上が移植登録を行っており、累計登録者は約1500人にものぼるが、これまで実施された心臓移植の累計は311人に留まっているのが現状で、深刻なドナー不足に直面しているわが国では、

心臓移植に代わるような重症心不全治療の解決策として、新しい再生型治療法の開発が不可欠であると考えられる。

心筋再生治療の現状と課題

内科治療でも奏功しない重症心不全に対する治療法として、補助人工心臓や心臓移植などの置換型治療が有効である。しかし、これら重症心不全に対する置換型治療はドナー不足や免疫抑制、合併症など解決すべき問題が多く、すべての重症心不全患者に対する普遍的な治療法とは言い難い。そこで、重症心不全治療の解決策として新しい再生型治療法の展開が期待されている。近年、重症心不全患者に対する心機能回復戦略として、細胞移植法が有用であることが報告されており、すでに自己骨格筋筋芽細胞による臨床応用が欧米で開始されている。筆者らも、自己骨格筋筋芽細胞と骨髄単核球細胞移植を併用すると、単独より心機能改善効果が高いことを証明し、大阪大学医学部附属病院未来医療センターにおいて臨床研究を行った。さらに、筆者らは、温度感応性培養皿を用いた細胞シート工学により、細胞間接合を保持した細胞シート作製技術を開発し、従来法である注射針法と比較して、組織、心機能改善効果が高いことを証明した¹⁾。この細胞シートは、2015年、テルモ社によって虚血性心筋症患者への新たな治療に用いるものとして製品化された（製品名：ハートシート）。しかし、これまでに行ってきた心筋再生治療は、骨格筋筋芽細胞を用いたものであり、治療効果のメカニズムには、あくまでも筋芽細胞から分泌される成長因子などの影響が大きく、自己の組織修復能を賦活化することで、心機能が改善したと推測される。また、より重症な虚血性心筋症患者に対して筋芽細胞では治療効果が認められないという課題もあった。失われた心筋組織を修復・再生するためには、やはり心筋細胞を補充することが必要で、これこそ“真の”心筋再生治療と呼べるのではないかと考え、研究グループでは、より治療効果の高い心不全治療の開発を目指して、iPS細胞から作った心筋細胞に着目した。その後動物実験において、iPS細胞から作った心筋細胞も筋芽細胞と同様に心機能改善効果を示すことを確認した。さら

*著者紹介 大学大学院医学系研究科未来細胞医療学、外科学講座心臓血管外科学
E-mail: saito@tissue.med.osaka-u.ac.jp

に心筋細胞の作製に用いる試薬や作製方法を改良することで、ヒトに移植可能な安全性の高い心筋細胞を大量に作製することに成功し、ヒトでの安全性を検証する臨床研究を実施する段階まで進んできた²⁾。

ES/iPS細胞から心筋細胞への分化誘導と純化

心臓は発生の比較的初期段階から観察される臓器で、ES細胞を浮遊状態で培養し球状の細胞塊を形成させたのち付着培養を行うと、細胞塊の内部に高率に自立拍動する心筋細胞の集団が観察できる。胎仔期の心臓発生とES細胞の心筋細胞分化に作用する因子は類似性が高いことが知られており、ES細胞から心筋細胞への分化誘導方法に関する研究もこれらの因子を参考に行われている。具体的には、レチノイン酸、TGF- β 、FGF、BMP、Wntなどが知られているが、これら分化誘導因子の分化機序の解明と、因子を作用させる順番、期間、タイミングなどについて詳細な検討が必要となる。

Yamashitaらは、Flk1陽性細胞を共通の前駆細胞として、内皮細胞、壁細胞、血球細胞および心筋細胞を系統的に分化誘導できる新しいES細胞分化システムを構築している³⁾。これらES細胞での技術は、iPS細胞でも同様であることが確認されており⁴⁾、心筋細胞のみならず血管系も含めた心筋組織構築の方法として有望と考えられる。

さらに、いかに分化・誘導の高率が高い方法が確立されても、未分化な細胞の混在は腫瘍化などの危険性があるため、未分化な細胞を排除し、心筋細胞のみを純粋に単離することも、非常に重要な技術となる。比重遠心法や表面抗原などで分離する方法や、心臓特異的プロモーターを用いて抗生物質耐性遺伝子を発現させて、心筋に分化した細胞を純化する方法なども報告されている。Tohyamaらは、ES/iPS細胞においてグルコースやグルタミンの代謝が活発であり、心筋細胞は乳酸をエネルギー源とすることを明らかにした。その結果を応用し、培養液に含まれているグルコースやグルタミンを除去し、乳酸を添加することで腫瘍化の原因となるES/iPS細胞を除去し、同時に心筋細胞のみを選別・純化する方法を見いだしている⁵⁾。さらにSougawaらは、ES/iPS細胞の表面抗原にはCD30の発現が高く、心筋細胞には発現が低いことを明らかにした。CD30をターゲットにした抗体結合薬剤Adcetrisは、CD30陽性リンパ腫を適応疾患としてすでに我が国の臨床で使われている。この薬剤により心筋分化誘導後の細胞集団から未分化iPS細胞を除去する新たな方法を用いて臨床利用を目指している⁶⁾。

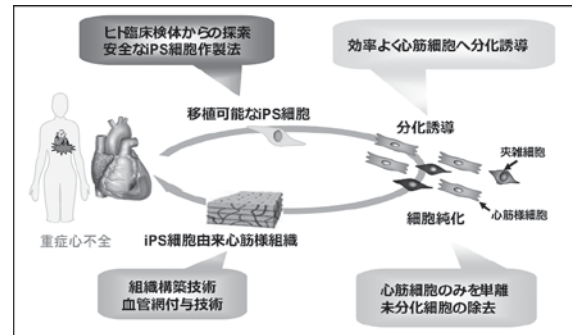


図1. 臨床応用を目指した、iPS細胞からの心筋分化・移植までの流れ



図2. ヒトiPS細胞用3次元浮遊攪拌懸濁培養装（8連装置）

一方で、左心室の一部に生じた梗塞部に、失われた心筋細胞を補充することを考えると、 10^8 個以上の新たな細胞を移植する必要がある。心筋細胞を用いて“真の”心筋再生治療を目指した場合、効率よく安全に、大量の心筋細胞を確保するための技術開発が重要な課題となる（図1）。

心筋細胞大量培養技術

上述のように、ヒトiPS細胞を用いた再生医療では、 10^8 個から 10^9 個程度の細胞を安定的に供給することが必要となる。Matsuuraらは、3次元浮遊攪拌懸濁培養技術をiPS細胞の大量培養に応用し、新たな形状の攪拌翼を開発し、また培養液内のpHおよび酸素濃度を経時的にモニタリングし制御することで、単一細胞浮遊状態から細胞凝集塊形成を介して4日で約5倍、100 mlの培養槽あたり 10^8 個までの未分化細胞増幅を可能とした（図2）。3次元浮遊攪拌培養は、上記のように細胞凝集塊形成を介することから、分化誘導にも応用が可能である。3次元浮遊攪拌培養により得られたiPS細胞凝集塊に、時期特異的な増殖因子および低分子化合物を添加することにより、高効率に心筋細胞へ分化誘導することが出来、

ヒト心筋細胞の大量培養を可能とした⁷⁾。

3次元浮遊攪拌培養とは異なるアプローチとして、平面接着培養系を用いたヒトiPS細胞および心筋細胞の大量培養技術の開発も進んでいる。平面接着培養系は3次元浮遊攪拌培養系よりも高密度化しにくく広大な培養面積を必要とする。分化誘導効率や収率にもよるが、 10^9 個の細胞を培養するために2–3 m²の培養面積を必要とする場合もある。Tohyamaらは、多層化された接着培養プレートに酸素や二酸化炭素を強制的に通気させることにより、ヒトiPS細胞を安定して増殖させることを可能にし、さらに時期特異的な増殖因子および低分子化合物を添加することにより、効率よく大量に心筋細胞を複製することを可能とした⁸⁾。

細胞シート技術による心筋再生治療

現在も多くの研究機関で行われている細胞移植の主な方法として、心筋に直接細胞を注入する方法があるが、この移植方法では、移植細胞の70–80%の細胞が失われ、臨床的に心機能を十分に向上させるためにその効果が十分に発揮できない点や、大量の細胞源の確保、不整脈等の副作用など、種々の問題の解決が不可欠である。世界的には、骨・軟骨と同様に、生体吸収性支持体に細胞を播種する組織工学的的手法により、心筋組織再生を試みる研究が主流となっているが^{9,10)}、細胞密度の高い心筋組織の再生は未だ実現していないのが現状である。

Shimizuらは、温度感受性培養皿から温度降下処理のみで回収した細胞シートを積層化することで、スキャホールドを用いないで3次元組織を構築することを可能にした¹¹⁾。積層化した心筋細胞シートは、*in vitro*で一年以上拍動を維持し¹²⁾、心筋梗塞部に移植すると心機能を改善することも報告している¹³⁾。上述のように筆者らは、既存の細胞移植法の問題を解決し、組織工学的手法によ

る心筋再生治療を実現すべく、温度感応性培養皿を用いた細胞シート工学技術の心筋再生治療への応用を実現している。細胞を懸濁液として扱うのは、医薬品を扱うような内科的センスで、細胞をシートとして扱うのは、医療機器を扱うような外科的センスと言える。再生医療等製品は、医薬品でも医療機器でもない新しいカテゴリーに位置づけられ、これまでの既成概念にとらわれない新しい発想で研究開発を進めていくことが重要である。

おわりに

iPS細胞の出現によって、ES細胞が抱える倫理的、免疫の問題がない、多能性幹細胞を得られる手段を獲得したことは、科学史に残る偉大な成果である。そして、世界中で幹細胞研究が活性化されたことにより、再生医療の実用化が現実的なものとなった。我々と、病気で苦しんでおられる患者さまでは、一日一日の重みが異なる。再生医療を一日でも早く、夢の医療から汎用的な医療として実現化させることは、患者さまにとって大きな福音となることは言うまでもない。

文 献

- 1) Sawa, Y. *et al.*: *Circ. J.*, **79**, 991 (2015).
- 2) Kawamura, M. *et al.*: *Circulation*, **126**, S29 (2012).
- 3) Yamashita, J. K. *et al.*: *FASEB J.*, **19**, 1534 (2005).
- 4) Narazaki, G. *et al.*: *Circulation.*, **118**, 498 (2008).
- 5) Tohyama, S. *et al.*: *Cell Stem Cell*, **12**, 127 (2013).
- 6) Sougawa, N. *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**, 3726 (2018).
- 7) Matsuura, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **425**, 321 (2012).
- 8) Tohyama, S. *et al.*: *Stem Cell Rep.*, **9**, 1406 (2017).
- 9) Li, R. K. *et al.*: *Circulation*, **100**, 1163 (1999).
- 10) Dar, A. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **80**, 305 (2002).
- 11) Shimizu, T. *et al.*: *Tissue Eng.*, **7**, 141 (2001).
- 12) Shimizu, T. *et al.*: *Circ. Res.*, **90**, e40 (2002).
- 13) Miyagawa, S. *et al.*: *Transplantation*, **80**, 1586 (2005).