ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた 心臓病学へのアプローチ

New Approach to the Cardiology Using Human iPS-Cell-Derived Cardiomyocytes

福田恵一

《Abstract》

iPS 細胞は倫理的問題や免疫拒絶がないことから、将来の再生医療のツールとして大きな期待が寄せられている。従来の iPS 細胞樹立法の問題点として皮膚生検の施行、長い樹立期間、挿入遺伝子のゲノムへの残存による腫瘍形成などが指摘されていたが、われわれは血液中 T リンパ球とセンダイウイルスを用いて、1 ヶ月以内にゲノムを損傷しない新規樹立法を開発した。また、マウス胎児胚の心臓予定領域に発現する液性因子をスクリーニングし、心筋細胞分化過程に重要な因子として、未分化幹細胞から前方中胚葉への誘導する noggin、早期心筋の細胞分裂を誘導する因子 G-CSF などを発見した。これらを利用し、ヒトの ES/iPS 細胞から効率的に心筋細胞を誘導した。さらに、ミトコンドリアに特異的に取り込ませる色素 TMRM を利用して心筋細胞と混在する未分化幹・非心筋細胞とを分離する方法、細胞シートを作成する方法、再生心筋細胞を壊死させずに効率的に移植する方法を開発した。また、ヒト iPS 細胞由来心筋を用いて、遺伝性心筋疾患の病態解明を行っている。iPS 細胞技術は循環器領域の発展に重要なツールであり、今後の発展が期待される。

I. はじめに

iPS 細胞は京都大学の Yamanaka らが開発したもの^{1), 2)}で、線維芽細胞に山中 4 因子とよばれる 4 つの遺伝子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-myc*) を導入することにより作製した「ES 細胞と同等の機能をもつ多能性幹細胞」である。近年、ヒトの線維芽細胞をはじめとする多くの細胞からヒト iPS 細胞が樹立できることが明らかとなり、様々な領域で注目を集めている。循環器領域でも、われわれがヒト iPS 細胞から再生心筋細胞を分化誘導できることを明らかにして以来、再生医療・心臓病の病態解明・創薬ツールとして期待が寄せられるようになった。本稿では、われわれが最近開発した iPS 細胞および多能性幹細胞に関する種々の技術、知見を紹介し、近未来における iPS 細胞を用いた再生医療、あるいはヒト疾患 iPS 細胞を用いた再生心筋細胞による心臓病の病態解明に関する最新の研究状況を報告する。読者諸氏の理解を深めることに役立てば幸甚である。

II. 心筋再生による心不全治療法の戦略

心筋細胞を再生させ、心不全治療に応用するには数多くのステップを踏む必要があり、短期間の研究で達成させることは極めて困難といえる。1999 年にヒト ES 細胞樹立が発表されてからしばらくはヒト ES 細胞を、iPS 細胞が開発されてからはヒト iPS 細胞を用いて心筋細胞を再生し、心不全治療を行うことを目標として 10 年計画で研究を進めてきた。必要とされる過程としては、おおそ 6 つのステップがある(図 1)。第 1 ステップはできるだけ非侵襲的かつ効率的に安全な iPS 細胞を樹立する方法の開発、第 2 ステップは ES/iPS 細胞を大量、安価に培養する方法の確立、第 3 ステップはヒト ES/iPS 細胞から効率的に心筋細胞を分化誘導する方法の確立、第 4 ステップは分化誘導直後の心筋細胞は胎児期心筋細胞の表現形をとるため細胞分裂能をまだ有することから、これらの心筋細胞を細胞分裂させ、心筋を大量に増殖する方法の確立、第 5 ステップは増幅させた再生心筋細胞集団のなかには、まだ未分化幹

慶應義塾大学医学部循環器内科 (〒 160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地)

Keiichi Fukuda

● **Keywords** ; iPS 細胞, 心筋細胞, 再生医学, 心不全

図 1 心筋再生医療の戦略

ヒト細胞から iPS 細胞を樹立して心筋細胞を誘導し、さらにこれを細胞増殖させたうえで、心筋細胞と非心筋細胞を純化精製し細胞移植を行うことにより、心筋再生を行う計画をしている。これらの基盤技術はほぼ完成し、特許取得および論文の投稿を行っている。

細胞および非心筋細胞を含有している。特に、この残存する未分化幹細胞が移植後に奇形腫、あるいはその他の悪性腫瘍を形成する可能性が残る。そこで再生心筋細胞と非心筋細胞を精製し、心筋細胞だけを純化する手法の開発である。第 6 ステップは再生心筋細胞を効率的に心臓に移植するための方法である。現在のところ、われわれはこれらのステップをほぼ克服している。以下にその詳細を解説する。

Ⅲ. 非侵襲的に安全な iPS 細胞を作る

山中教授が発表した iPS 細胞の樹立方法はレンチウイルスとレトロウイルスを用いて、レトロウイルス受容体と *Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc* の 4 つのリプログラム遺伝子を線維芽細胞に導入する方法であった。これは優れた方法ではあるものの、問題点として①皮膚の細胞をバイオプシーする必要があること、②線維芽細胞の樹立に時間がかかること (iPS 細胞樹立までに 2 ヶ月半かかる)、③最低 5 個の遺伝子をゲノムに挿入するため、染色体上の既存遺伝子を破壊し遺伝子異常を惹

起する可能性があること、④ iPS 細胞樹立後にマスキングされる *Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2*, *c-Myc* をはじめとする遺伝子がゲノム上に残存しているため、再度活性化して奇形腫などの腫瘍を形成する可能性があること、などがあげられていた。

こうした問題に直面したため、われわれは①線維芽細胞の樹立を必要としない iPS 細胞の樹立ができないか、②患者さんに皮膚のバイオプシーの負担 (疼痛、コスメティックな問題) がない形をとることはできないか、③ゲノム染色体に遺伝子を挿入しない方法はないかを考え、これらを解決する iPS 細胞の樹立方法を考案した。

われわれは患者から得られる 1 滴の血液 (0.1 ml) から、わずか 1 ヶ月足らずでゲノム遺伝子を傷つけずに iPS 細胞を樹立する画期的な方法を開発した (図 2)³⁾。

その方法は血液中 T リンパ球を使うものである。血液から赤血球を遠心分離で取り除き、単核球成分 (リンパ球、単球などを含む) を抗 CD3 抗体と IL2 存在下で培養すると T リンパ球のみが細胞増殖し、5 日目には

図2 Tリンパ球からのiPS細胞の樹立とその特徴

末梢血中のTリンパ球を用いることにより、非侵襲的(女性、小児でも可能)にわずか25日でiPS細胞を樹立できるようになった。

[文献3)より引用改変]

コロニーが形成される。この増殖したTリンパ球に対し、セリダイウイルス(SeV)を用いて4つのリプログラム遺伝子の導入を行うが、SeVはRNA(−)鎖型のウイルスであり、細胞内に取り込まれたSeVはゲノムには取り込まれず、細胞質内で増殖する。このため、4つのリプログラム遺伝子の導入に伴うゲノム遺伝子の破壊や、これらの遺伝子の再活性化に伴う腫瘍化の可能性を大きく低下させることができた。SeVは通常Tリンパ球には遺伝子導入できないが、われわれは活性化したTリンパ球には遺伝子導入できることを見いだし成功につなげた。この方法で樹立したiPS細胞は、*in vitro*でも心筋を含む3胚葉系に分化すること、15継代程度で残存ウイルスは完全に消滅すること、ゲノム染色体形に異常のないこと、免疫不全マウスに移植すると奇形腫を形成し、多分化能をもつことを証明した¹⁾。さらに、この方法によれば採血からiPS細胞の樹立には25日程度しかかからない。その結果、山中原法の残された課題をほぼ解決できたことになり、臨床応用に向けた大きなステップとなった。

IV. 未分化幹細胞から心筋細胞を作る

未分化幹細胞を心筋細胞に効率的に分化誘導するには、心筋細胞分化の発生過程をできるだけ忠実に再現することが最も近道である。そこでわれわれは、受精早期胚において発生段階の心臓予定領域、心臓形成過程期の心筋前駆細胞、発生期幼若心筋細胞などが発現する細胞増殖因子やその受容体を同定し、これをES/iPS細胞に応用することにより心筋細胞の誘導を試みた。

われわれは心臓形成の最早期であるcardiac crescent期の心筋前駆細胞に発現する因子のスクリーニング過程で、細胞増殖因子BMP2、BMP4の内因性阻害因子nogginが同部位に一過性に強発現する現象を見いだした⁴⁾。このnogginをマウスES細胞に投与し、心筋細胞が誘導されるか否かを検討したところ、nogginをある特定の時期に特定の濃度で投与すると、マウスES細胞の90%程度が心筋細胞に分化誘導された^{4), 5)}。この現象はES細胞を前方側板中胚葉に分化誘導することに

図3 nogginは胎生早期の心臓予定領域に発現し、ES/iPS細胞の心筋細胞誘導を行う

A：発生段階における noggin の発現。心臓予定領域にごく早期にて短時間発現する。

B：マウス ES細胞に noggin を投与することにより、心筋細胞を誘導する際の最適条件の検討。noggin により誘導した心筋細胞(緑色部分)。胚様体全体が心筋細胞に変化していることがわかる。

〔文献 4) より引用改変〕

より心筋誘導したものであった(図3)。Nogginには類似蛋白が複数(chordin, follistatin, DANなど)存在し、これらの類似蛋白も同様の作用をもつことが示された。この方法をサル ES細胞⁶⁾、ヒト ES/iPS細胞に応用することにより心筋細胞の誘導が可能であったが、noggin 単独投与ではマウス ES細胞に対する作用ほど効率的ではなかった。このため、さらなる細胞増殖因子のスクリーニングを行った。

V. 心筋細胞の細胞分裂により大量に心筋細胞を作る

心筋細胞は胎児期には盛んに細胞分裂するが、出生後は終息し、以後は個々の細胞が大きくなる肥大現象により成人の心臓が形成される。ES/iPS細胞から分化誘導された再生心筋細胞は胎児期心筋に相当するため、まだ細胞分裂能を有している。したがって、この時期の心筋細胞を細胞分裂させられれば、心筋細胞の収量を格段に増加させることが可能となる。われわれはこ

の心筋細胞の細胞増殖を誘導する因子の同定を行った。マウス ES細胞に対し noggin を用いて心筋誘導を行った際に、心筋細胞が分化誘導される6日目に発現した細胞増殖因子とその受容体をスクリーニングした結果、サイトカインの G-CSF 受容体の発現が再生心筋細胞において著しく増加していた。マウス胎仔を観察すると、G-CSF 受容体および G-CSF は胎生 9～10 日目の胎仔心臓に多量に発現していた⁷⁾。さらに、妊娠 9 日目のマウス子宮中に直接 G-CSF を投与すると、胎仔心筋は盛んに細胞分裂を繰り返し、著しい心筋層の肥厚を認めた(図4)。この現象を再生医学に応用し、マウスおよびヒトの ES/iPS細胞由来の心筋細胞に投与したところ、これらの細胞を効率的に細胞増殖させ、心筋細胞の収量を大幅に増やすことに成功した⁷⁾。この作用の効果はヒト心筋でマウスより強く表れ、胎生期の長さ按比例すると考えられた。

図 4 G-CSF/G-CSF 受容体は autocrine 作用により胎児期心筋の細胞増殖を行う

従来の考えによるとサイトカインの G-CSF は血液系に作用し、造血幹細胞の末梢血中への流出や顆粒球への移動が主な作用であるとされてきた。今回のわれわれの研究により、G-CSF および G-CSF 受容体は胎児期に心筋に最も多量に発現し、心筋細胞の増殖を司っていることが明らかとなった。これを再生医学に応用し、幼若な心筋細胞を細胞増殖し、収量を増加させることができるようになった。

〔文献 7) より引用改変〕

VI. 心筋細胞の純化精製法の開発と未分化細胞の除去

ヒト ES/iPS 細胞から得られた再生心筋は力強く拍動するものの、少量の未分化幹細胞を含有しているため、直接移植医療に用いることはできない。これを心不全治療に用いるには、再生心筋細胞のみを純化精製する必要がある⁸⁾。そこでわれわれは、心筋細胞のみを純化する方法を考えた。心筋細胞は絶えず収縮を繰り返すため、ほかのいかなる臓器よりもエネルギーを多量に消費する。このため、大量のエネルギーを産生するオルガネラであるミトコンドリアが大量に含有されており (心筋細胞はほかの細胞の 50～100 倍のミトコンドリアを含有)、これをヒントに心筋細胞を純化する方法を確立した。すなわち、Mitotracker Red などのミトコンドリア電位依存性色素はミトコンドリア特異的に取り込まれ、特有の蛍光を発する。この性質を利用し、新生仔ラット心臓の初代培養を行い、Mitotracker Red

で染色すると心筋細胞が肉眼的に観察しても赤く蛍光を発し、Cell Sorter で回収すると 99.9% の純度で心筋細胞を回収できた。ミトコンドリア電位依存性色素は多種存在するが、そのなかで心筋回収率、細胞からの消失速度、心筋細胞毒性などを検討したところ、TMRM という色素がすべての項目で優れていた^{9), 10)}。TMRM により、マウス、サル、ヒトの ES/iPS 細胞から誘導した再生心筋細胞を純化した結果、いずれの再生心筋細胞も純度 99.9% で精製できることが証明された (図 5)。これらの純化精製した再生心筋細胞を免疫不全マウスに移植しても、奇形腫などの腫瘍形成は観察されなかった。以上より、心筋細胞の純化精製技術の開発はほぼ完成し、純化された再生心筋細胞を用いた腫瘍形成のない移植が可能となった¹⁰⁾。

VII. 効率的な心筋細胞移植法の開発

これまで心筋細胞移植は、細胞浮遊液を心臓に直接注射する形で行われてきた。この方法による移植成績

図5 ミトコンドリア特異性色素を用いた心筋細胞の純化精製

心筋細胞は、ほかのどの臓器よりもエネルギー消費が高いため、ミトコンドリアを大量に含有する。この性質を利用し、ミトコンドリア特異的に取り込まれる電位依存性色素を用いて心筋細胞を純化精製できる技術を開発した。

〔文献9〕より引用改変〕

をみると細胞生着率は3%以下と低く、移植した細胞のほとんどが壊死あるいは流出していた。われわれは、移植生着率を向上させるため種々の方法を試みた結果、純化精製した再生心筋細胞を再び1,000個程度の細胞凝集塊にし(心筋球と命名)、これを移植することにより飛躍的な生着率の向上をみた。心筋球を形成した再生心筋細胞は、細胞接着・パラクリンによる細胞増殖因子作用・細胞塊が大きくなるため流出しにくくなるなど、種々の理由により生着率が90%程度まで改善した。移植後の組織を観察すると移植心筋細胞は成体の心筋細胞の大きさに比し細胞径も著しく小さいが、移植後3週目、8週目と時間経過とともに大きくなり、次第に成長していくことが観察された¹⁰⁾。

心不全改善を目的とした場合、再生心筋細胞移植により100g程度の心筋が形成されることが望まれるが、

100gの再生心筋細胞を*in vitro*で作製することはコスト面、技術面からみても極めて困難である。しかし、われわれが示したように0.5g程度の再生心筋細胞を*in vitro*で作製することは可能であり、これらの細胞が移植後に200倍程度にまで成長すれば、心筋量を十分確保できることが予想される。これにより、将来の臨床応用の可能性が極めて高いものになったと考えられる。

VIII. 心筋細胞シートの作製と心筋組織移植

心筋細胞が再生された場合、将来的にはさらに高度な移植法が求められると考えられる。岡野らは温度感受性培養皿により細胞をシート状に回収する方法を開発し、これを心筋細胞に応用し、拍動する心筋細胞シートを作製した。われわれは培養皿にフィブリンノーゲン溶液とトロンビン溶液を希釈して添加し、表面をフィブリンポリマーでコートした培養皿を作製した(図6)^{11), 12)}。生体内では、フィブリンポリマーはプラスミンにより分解される。これに対し、心筋細胞は内因性セリプロテアーゼを分泌するためフィブリンは緩徐に分解され、培養4日後にはシート状になった心筋細胞を取り出すことが可能となる。移植前のシートでは心筋細胞は無秩序の方向に配列しているが、移植後1週間目の組織を観察すると、細胞は同一方向を向いて配列し、明らかな横紋を呈し、完全な心筋組織を形成する。これのみでは完全な心筋組織の形成とはいえないが、こうした組織工学の利用が、心臓の再生医学の発展にますます必要なものとなることは間違いないであろう^{13), 14)}。

IX. ヒト心筋細胞を用いた電気生理学的解析

ヒトの心筋細胞を用いた電気生理学的解析は、バイオプシー標本を除いて原則困難であった。そこで、われわれは、iPS細胞由来の心筋細胞を用いてこれらの活動電位を記録した。通常活動電位はガラス微小電極を用いて観察されるが、長期間の観察を可能にするため、多電極法によるfield potentialを記録した。その結果、心筋細胞のNa⁺電流、K⁺電流、Ca²⁺電流を明確に分離して記録することが可能であった。一方、各電流の阻害薬を用いると各電流を選択的に抑制することが可能であった(図7)。これらの方法を用いると、心筋の各イオンチャンネルに作用する種々の薬剤の作用を明確に分離できることが明らかとなった¹⁵⁾。

X. 疾患 iPS 細胞による心臓病の病態解明

iPS細胞は遺伝性QT延長症候群をはじめとする遺伝性疾患をもつ患者から皮膚などの細胞を採取して、疾

図6 フィブリンポリマー法を用いた心筋細胞シートの作製

培養皿上をフィブリンポリマーでコーティングして心筋細胞を培養し、4日目に培養した細胞をシート状に回収した。これを用いて心筋細胞をシート状に移植を行った。

〔文献12〕より引用改変〕

図7 ヒト再生心筋の活動電位と各種薬剤による変化

ヒト iPS 細胞を心筋細胞に分化誘導し、この再生心筋を多電極解析装置上で field potential を測定した。この field potential に対し、各々 Na^+ 電流遮断薬(キニジン)、 Ca^{2+} 電流遮断薬(ベラパミル)、 K^+ 電流遮断薬(E4031)を投与し、記録を行った。

患モデルの細胞を作製できる点で優れている。心筋疾患としては遺伝性QT延長症候群、肥大型心筋症、一部の拡張型心筋症などの遺伝子異常を伴う疾患が知られている。これらの症例の細胞からiPS細胞を樹立し、心筋細胞に誘導することにより、病態解明、治療法の開発につながる可能性がある。われわれはすでに遺伝性QT延長症候群の1型から3型に関し、疾患iPS細胞を樹立することに成功している。現在、その電気生理学的解析を行っているところである。

XI. おわりに

iPS細胞は再生医学の具現化だけでなく、種々の疾患の病態解明、治療法の開発に大きく貢献する可能性を秘めており、研究領域としての潜在能力は高い。広く普及研究されるには技術的に困難な部分が残されているが、徐々に改善している。研究が進み、循環器のみならず様々な領域で応用され、治療を待つ患者に一日も早く恩恵を届けられるよう、われわれを含めた多くの研究者による一層の努力が求められている。

【文 献】

- 1) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006 ; 126 : 663 ~ 676
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007 ; 131 : 861 ~ 872
- 3) Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, Fukuda K : Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, 2010 ; 7 : 11 ~ 14
- 4) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K : Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2005 ; 23 : 607 ~ 611
- 5) Yuasa S, Fukuda K : Multiple roles of BMP signaling in cardiac development. *Drug Discov Today*, 2008 ; 5 : 209 ~ 214
- 6) Chen H, Hattori F, Murata M, Li W, Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K, Ohno Y, Sasaki E, Kimura K, Hakuno D, Sano M, Makino S, Ogawa S, Fukuda K : Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008 ; 369 : 801 ~ 806
- 7) Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, Hattori F, Tanaka T, Hara M, Ohno Y, Chen H, Egashira T, Seki T, Yae K, Koshimizu U, Ogawa S, Fukuda K : G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell*, 2010 ; 6 : 227 ~ 237
- 8) Hattori N, Kawaguchi H, Ando K, Kuwabara E, Fujita J, Murata M, Suematsu M, Mori H, Fukuda K : Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res*, 2005 ; 65 : 334 ~ 344
- 9) Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Satoh YS, Yuasa S, Li W, Yamakawa H, Tanaka T, Onitsuka T, Shimoji K, Ohno Y, Egashira T, Kaneda R, Murata M, Hidaka K, Morisaki T, Sasaki E, Suzuki T, Sano M, Makino S, Oikawa S, Fukuda K : Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods*, 2010 ; 7 : 61 ~ 66
- 10) Hattori F, Fukuda K : Strategies for ensuring that regenerative cardiomyocytes function properly and in cooperation with the host myocardium. *Exp Mol Med*, 2010 ; 42 : 155 ~ 165
- 11) Itabashi Y, Miyoshi S, Kawaguchi H, Yuasa S, Tanimoto K, Furuta A, Shimizu T, Okano T, Fukuda K, Ogawa S : A new method for manufacturing cardiac cell sheets using fibrin-coated dishes and its electrophysiological studies by optical mapping. *Artif Organs*, 2005 ; 29 : 95 ~ 103
- 12) Itabashi Y, Miyoshi S, Yuasa S, Fujita J, Shimizu T, Okano T, Fukuda K, Ogawa S : Analysis of the electrophysiological properties and arrhythmias in directly contacted skeletal and cardiac muscle cell sheets. *Cardiovasc Res*, 2005 ; 67 : 561 ~ 570
- 13) Suzuki R, Hattori F, Itabashi Y, Yoshioka M, Yuasa S, Manabe-Kawaguchi H, Murata M, Makino S, Kokaji K, Yozu R, Fukuda K : Omentopexy enhances graft function in myocardial cell sheet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009 ; 387 : 353 ~ 359
- 14) Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, Shimizu T, Kira S, Hayakawa K, Nishiyama N, Tanimoto K, Hagiwara Y, Satoh T, Fukuda K, Okano T, Ogawa S : Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res*, 2006 ; 98 : 705 ~ 712
- 15) Tanaka T, Tohyama S, Murata M, Nomura F, Kaneko

T, Chen H, Hattori F, Egashira T, Seki T, Ohno Y,
Koshimizu U, Yuasa S, Ogawa S, Yamanaka S, Yasuda
K, Fukuda K : In vitro pharmacologic testing using

human induced pluripotent stem cell-derived
cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun, 2009 ;
385 : 497 ~ 502