iPS細胞を用いた循環器領域の再生医療

福田 恵一 遠山 周吾 関 倫久 湯浅 慎介 下地 顕一郎 藤田 淳

要 旨

iPS (induced pluripotent stem) 細胞の発見以来、再生医療への応用が期待されている。難治性重症心不全は心臓移植以外に根本治療がなく、新たな治療法の開発が待たれている。iPS細胞を用いた心臓の再生医療はこの10年で大きく進歩した。ゲノムを損傷せずに効率的に安全なiPS細胞を作出する技術、血清などの動物成分を含有しない培地でiPS細胞を大量増殖させる技術、効率的に心筋細胞を作出する技術、心筋細胞を純化精製する技術、効率的に心筋細胞を移植する技術やデバイスの開発などは大きく発展し、臨床応用直前の段階まで来ている。今後はこれらをフルに活用し、どのような症例に対していかに安全かつ有効な治療法になり得るかを検証し、育て上げていくかが問われている。

〔日内会誌 105 : 1287~1295, 2016〕

Key words iPS細胞, 再生医学, 心筋細胞, 細胞移植, 難治性重症心不全

はじめに

再生医療という言葉が使われ始めて10年以上の期間が経過した。特に2006年に山中伸弥教授がiPS (induced pluripotent stem) 細胞¹⁾を発明して以来、難治性疾患の治療に向けて再生医療は日本の国策として様々な領域で推進されてきた。網膜、角膜、Parkinson病、脊髄損傷、血小板、難治性心不全などの領域では大きな研究の進歩があり、非常に注目されている。iPS細胞を用いた難治性重症心不全に対する心筋再生医療も国の再生医療実現化ハイウェイ事業の支援を受け、この数年間で大幅に研究が進歩し、数年以内に臨床試験が可能な段階まで技術進歩が見られた。本稿ではその最新の状況を報告す

るとともに、今後の展望を述べることとする。

1. 再生医療研究の流れ

1990年代後半に生体内には様々な組織幹細胞が存在し、局所組織の障害の修復に利用されていることが解明された。この頃、骨髄には造血幹細胞以外に骨や軟骨になる幹細胞の存在が報告され、骨髄間葉系幹細胞（あるいは体性幹細胞）と呼ばれるようになった。我々はこの細胞に着目し、*in vitro*で心筋細胞に分化誘導できることを世界で初めて報告した²⁾。この研究をきっかけとして、脂肪組織幹細胞や心筋組織幹細胞などの存在も明らかとなり、組織幹細胞研究の世界的ブームとなった。これらの基礎研究

慶應義塾大学循環器内科

The Cutting-edge of Medicine ; Regenerative therapy of the cardiovascular area using iPS cells.

Keiichi Fukuda, Shugo Tohyama, Tomohisa Seki, Shinsuke Yuasa, Kenichiro Shimoji and Jun Fujita : Department of Cardiology, Keio University School of Medicine, Japan.

図1 心疾患患者からのiPS細胞の樹立とこれを応用した病態解析・創薬・治療法開発

の成果を受け、骨髓細胞全体や間葉系幹細胞を分離したものを心筋梗塞後の心臓に直接移植する臨床研究が盛んに行われた。当初は有効性を報告する論文が目立ったが、ランダム化試験ではほとんど有意差を認めることは困難であった。我々は当初より、心筋分化能を持つ多能性幹細胞を心臓に直接注入しても、心不全（心機能）を改善できる十分量の心筋をつくることは不可能と考えていたため、あえてこれらの風潮には従わなかった。そして、ヒトの重症心不全を治療するためには、十分量の心筋細胞を作出し、移植する以外に根本的な方法はないと考えられるようになった。

一方、1998年にイスラエルの研究者より、ヒトの人工受精の余剰卵からES (embryonic stem) 細胞が樹立された。ES細胞は多分化能を有しながら無尽蔵に増殖できる性質を有している。そして、マウスのES細胞は胎盤を除く全ての細胞

に分化できることから、我々は2001年よりヒトES細胞を用いて心筋細胞の作出に取りかかった。そして、ES細胞から心筋細胞を誘導できる細胞増殖因子の同定などの研究を行ってきた。2006年の山中教授のiPS細胞の発見があり、研究の方向性をES細胞からiPS細胞の方向へシフトしていった。

2. 心筋再生医療を克服するための課題

心筋再生医療を成功させるための必要不可欠な条件は、心臓の収縮に十分貢献できるだけの大量の心筋細胞を製造し、心臓に移植し生着させることにほかならない。これには現在の科学レベルでは体性幹細胞では不可能であり、ES細胞あるいはiPS細胞を用いることが必須となる。iPS細胞は患者本人の遺伝情報を全て持つオーダーメイドの多能性幹細胞である。iPS細胞を用

いて難治性重症心不全症例の治療を行う場合、いかなる課題があるかを考え、我々は以下に掲げた6つの課題を想定した。第一に外来遺伝子の挿入に伴うゲノムの損傷がなく、外来遺伝子の残存発現のない安全性が高いiPS細胞を効率的に樹立する法を確立すること、第二に血清などの動物成分を含まず、iPS細胞を安定して大量に増殖させる培養系を確立すること、第三にiPS細胞から効率的に心筋細胞を樹立する方法を開発すること、第四に分化誘導した心筋細胞をさらに細胞増殖させることで心筋細胞の収量を増やすこと、第五に分化した心筋細胞中に残存する未分化なiPS細胞などを完全に除去し、心筋細胞のみを純化精製すること、第六に心筋細胞を効率的に心臓に移植・生着できる方法を開発することである。我々はこの課題を10年がかりでこれを克服することを想定し、研究を開始した。そして、2015年が10年目であり、ほぼこれらの問題を解決することができた。以下にこれらの方法の概略を紹介する³⁾。

3. 安全性の高いiPS細胞を効率的に作製する

山中伸弥教授がiPS細胞を開発した当初は、細胞への遺伝子導入にレトロウイルスが用いられてきた。この方法では、宿主細胞のゲノムに外来性の遺伝子が挿入され、ゲノムが破壊される可能性と残存遺伝子が活性化されることが問題となり、様々な改善がなされた。現在では、episomal vectorと呼ばれるプラスミドを用いる方法とセンダイウイルスを用いる方法の2つが主として行われるようになった。Episomal vectorはウイルスを用いた遺伝子導入とは異なり、導入遺伝子が宿主ゲノムに組み込まれることがなく、また、通常のプラスミドとは異なり、細胞分裂に伴って導入遺伝子が複製される利点があり、京都大学のCiRA (Center for iPS Cell Research and Application, iPS細胞研究所) では

この方法が用いられている。一方、我々は少量の血液 (0.1 mlでも可能) からTリンパ球を増殖させ、センダイウイルスを用いてiPS細胞を樹立する方法を開発した⁴⁾(図2)。末梢血由来の血球系の細胞は一般的には細胞培養が困難であるが、Tリンパ球は培養液中に抗CD3抗体とIL2を添加することで細胞増殖することが知られている。iPS細胞は細胞増殖する細胞でなければ樹立できないが、活性化Tリンパ球を利用することで皮膚の生検が不要となった。一方、センダイウイルスは日本で発見されたRNA (－) 鎖型のウイルスであり、ウイルス・ゲノムの複製、転写、翻訳が全て細胞質でなされ、一度もDNAに変換されないため、ゲノムに取り込まれることがなく、安全にiPS細胞を樹立することができる。今後の再生医療は、京都大学CiRAで製造された臨床使用のためのiPS細胞を利用するか、患者個人由来のiPS細胞を樹立して利用するか²通りの方法が進められている。

4. iPS細胞大量培養の方法

従来、ES細胞やiPS細胞を培養する際には、その下にフィーダー細胞と呼ばれる栄養細胞を敷き詰めた上に重層培養する必要があった。このフィーダー細胞にはもともとマウスの胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF細胞) が用いられてきたが、臨床応用するには異種細胞を用いることはできない。そこで、このフィーダー細胞に替わる人工の細胞外マトリクスが探索され、マトリゲルなどが用いられるようになった。マトリゲルはマウスの特殊な腫瘍細胞が分泌する細胞外マトリクスで、ラミニン (主成分)、IV型コラーゲン、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン/ニドゲンおよび数々の成長因子を含むものである。マトリゲルは初代培養のMEF細胞が不要になった点では大きな意味があるが、まだ異種動物の成分を含むため、臨床使用することできない。現在用いられるの

図2 末梢血Tリンパ球を利用したiPS細胞の樹立法の確立

図3 選択的な心筋細胞の分化誘導と細胞数増幅法

心筋細胞の発生を疑似した刺激をiPS細胞に与えることで心筋再生が実現する。

は、未分化幹細胞が細胞外マトリックスとして発現するラミニン511を遺伝子改変して作られたリコンビナントのラミニン511E8蛋白である。培養皿上にラミニン511E8蛋白をコーティングすることで、未分化iPS細胞が培養できるようになった⁵⁾。ラミニン511E8は非常に高価で

あるという問題点を残すが、今後の技術開発により、より安価な物になると予測されている。これ以外に、攪拌培養装置による3次元培養法も知られているが、iPS細胞の細胞塊の大きさを制御することが難しいなどの問題もあり、今後のさらなる開発が望まれる。

図4 G-CSFは胎児期の心筋細胞の細胞増殖因子として作用する

5. iPS細胞から心筋細胞への効率的な分化誘導法

iPS細胞はES細胞と同様に、胎盤組織以外の全ての細胞に分化できるとされており、その分化には発生学的な細胞増殖因子などのシグナルを利用することで分化誘導が可能になる。心筋細胞は発生学的には非常に早い段階で出現するため、比較的分化誘導のステップは単純であることが明らかとなった。我々はこれまでBMP (bone morphogenetic protein) インヒビターであるnoggin⁶⁾やWnt⁷⁾が心筋細胞誘導に有用であることを明らかにしてきた。我々以外の研究者もBMP4, Wnt, Wntインヒビターなどのシグナル重要であることを報告した。図3に心筋細胞誘導に有用なシグナルの概念図を示した。これらを組み合わせることで、現在では効率よく心筋細胞を誘導できるようになった。

6. 胎児期心筋細胞の細胞増殖因子の発見

心筋細胞は胎児期には盛んに細胞分裂するが、出生後は細胞分裂を停止する。iPS細胞由来の再生心筋細胞は分化誘導直後には胎児型の表現形を取るため、胎児期に心筋細胞を細胞分裂させる細胞増殖因子はiPS由来再生心筋細胞を細胞分裂させ、細胞収量を増加させることができる。我々は胎児期の心筋細胞がサイトカインであるG-CSF (顆粒球コロニー刺激因子) とその受容体が強く発現することを見出し、G-CSFをiPS細胞由来再生心筋細胞に投与すると、心筋細胞の細胞数が増加することを明らかにした⁸⁾ (図4)。IL6族サイトカイン系のgp130受容体の遺伝子ノックアウトマウスの心臓の解析から予測されるように、サイトカインLIFも心筋細胞の増殖に重要な働きを示すことが明らかとなった。

図5 iPS細胞と心筋細胞のエネルギー代謝の相異

- 1) iPS細胞は高い増殖性があるため、ブドウ糖を大量に取り込み、解糖系を介して核酸、アミノ酸、乳酸を合成する。TCAサイクルにはほとんど入らない。
- 2) 心筋細胞は増殖性が低い一方、少量のブドウ糖を解糖系を介してTCAサイクルに送り、大量のATPを合成する。

7. 再生心筋細胞の純化精製方法の開発

iPS細胞から心筋細胞を分化誘導する場合、現在の技術力では、最も効率がよい場合で90%、最も効率が悪い場合で30%程度の細胞が心筋細胞となる。これは言い換えれば、最大70%最低でも、10%の細胞は心筋細胞以外の細胞が残存することになる。これまでの解析では、これらの細胞の中には必ず残存する未分化iPS細胞が存在することが確認され、再生心筋細胞移植をする際には必ず再生心筋細胞を純化精製し、残存する未分化幹細胞を除去する必要があることがわかる。これまで様々な方法が心筋細胞の純化精製法として開発されてきた。薬剤耐性遺伝子を遺伝子導入する方法、心筋細胞特異的な抗体を用いて精製する方法などが開発された。我々は以前、ミトコンドリア特異的蛍光色素(TMRM)を用いて心筋細胞を純化精製する方法を開発した。これらの方法は基本的にセルソーターを利用することが多く、臨床応用するには

細胞数の面で実用的ではなかった。

そこで、我々は臨床応用を前提とした大規模培養でも、心筋細胞を純化精製できる方法の開発を試みた。まず、iPS細胞(ES細胞)と心筋細胞に対し、DNAマイクロアレイを実施し、両者の間のエネルギー代謝の相異に着目してこれを解析した。さらに、 ^{13}C 標識したグルコースあるいは乳酸を添加した培養液を用いて、これらの培養細胞の解糖系やミトコンドリア代謝の中間代謝産物を解析(メタボローム)し、両細胞間の代謝経路の相異を詳細に解析した。その結果、iPS細胞は心筋細胞に対して、70~100倍程度の大量のブドウ糖を取り込むこと、解糖系代謝経路がエネルギー代謝の中心として働くこと、その中間代謝産物[グルコース6リン酸(G6P)]から大量の核酸(DNA, RNA)が合成されていること、同じく中間代謝産物[3ホスホグリセリン酸(3PG)]から大量のアミノ酸が合成されていること、ミトコンドリアが発達していないため、その中に存在するクエン酸回

図6 ブドウ糖除去・乳酸添加培地による心筋細胞の純化精製

路・電子伝達系の酵素の発現が極めて少ないこと、このため、解糖系最終代謝産物であるピルビン酸は利用されずに乳酸に変換され、細胞外に汲み出されていることなどが明らかとなった。これに対し、心筋細胞ではミトコンドリアが極めて良好に発達しているため、ブドウ糖は少量しか取り込まれないものの、これを解糖系・ミトコンドリアのクエン酸回路・電子伝達系で効率的に使用し、大量のATPが産生されていることが明らかとなった(図5)。

この両細胞のエネルギー代謝の差を利用して、心筋細胞だけを純化精製することを考えた。まず、第一に培養液中のブドウ糖を除去することにより、iPS細胞(ES細胞)が短時間で死滅することを確認した。しかし、このままでは心筋細胞もやがて死滅するため、培養液中に乳酸を添加することを試みた。心筋細胞は乳酸トランスポーターを発現しているため、乳酸を大量に細胞内に取り込むことができ、LDを利用して取り込んだ乳酸をピルビン酸に転換すること、そのピルビン酸はミトコンドリアに取り込まれ、クエン酸回路・酸化的リン酸化を介して大量のATPを産生できるため、この状態で心筋細胞は長期間安定して生存できることが示され

た。また、このブドウ糖除去・乳酸添加培地を利用すると、多くの種類の細胞増殖する細胞を除去できることが明らかとなった⁹⁾(図6)。現在では、この方法をさらに改善させ、得られる心筋細胞の純化度は99.5%以上であり、残る0.5%にも未分化幹細胞は検出されず、免疫不全マウスに移植しても奇形腫などの形成は観察されなかった。

8. 効率的な心筋細胞移植法の開発

心筋細胞は好気的な代謝を必要とし、豊富な血流を必要とする細胞である。このため、心外膜上に細胞をシート状に移植しても短期間の内に細胞は死滅し、消失する。また、心外膜は電気的には絶縁組織であること、ヒトでは心外膜上に厚い脂肪組織があり、生体の心臓と心外膜上に移植した心筋とはGAP結合を介し、直接同期して収縮することはない。一方、心臓は拍動する組織であり、生体の心筋組織内に心筋細胞を移植した際には、細胞が心臓外に絞り出され、逆流してしまうという欠点がある。これらの特徴があるため、他臓器の細胞移植に比して、心筋細胞移植には効率的な細胞移植法が求

A. バラバラに浮遊した心筋細胞を移植

B. 心筋細胞塊（心筋球）を移植

図7 再生心筋細胞の移植法の開発

A: バラバラに浮遊させた心筋細胞を移植した際の組織像
心筋細胞は生着するが、生着率は3%程度。

B: 微小心筋塊（心筋球）による心筋細胞の移植
移植細胞の生着率は著しく向上した。

められる。

我々は当初培養心筋細胞をトリプシン処理してばらばらの状態にし、細胞浮遊液を心臓に直接注入する移植する方法を行った。この方法では図7Aに示すように、移植細胞はホストの心筋の隙間に長期間生着したが、同時に移植した細胞の高々3%程度しか生着しなかった¹⁰⁾。この問題を克服するため、我々は生着率の低さの原因を探求し、心筋微小组織（心筋球）移植法を提案した。約1,000個程度の再生心筋細胞を細胞塊（直径150μ程度）にして移植すると、心筋細胞間の細胞接着、細胞自体の伸展刺激、細胞外マトリックスの形成、パラクリンの細胞増殖因子などの影響により、移植細胞のストレスに対し著しく抵抗性が增強した。また、細胞塊が心臓局所にとどまりやすいことより、生着率が著しく向上させることに成功した⁹⁾ (図7B)。

さらに、心臓局所に再生心筋細胞を効率的に移植するためのデバイスを開発し、心臓全体に再生心筋細胞が移植できるようになった。今後はこうした心筋移植のためのデバイスが様々な

開発されていくものと考えられる。これに伴って、心筋再生はより現実的なものになると考えている。

まとめ

私が心筋再生の研究を始めた20年前は心筋細胞を再生させるという概念や言葉すらなく、現実の医療からは夢物語のようかけ離れていた。しかし、現在では、将来最も望まれる医療の研究領域になったとともに、日本の将来を支える成長産業の1つと考えられるようになった。今後も越えなければならない問題点は多々あるが、これまで通り一つひとつ解決することにより、新たな医療の実現に前進していきたいと考えている。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示: 福田恵一; 講演料 (興和創薬, 持田製薬), 研究費・助成金 (アスピオファーマ, 興和創薬, バイエル薬品), 寄附金 (アステラス製薬, 大塚製薬)

文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663–676, 2006.
- 2) Makino S, et al : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103 : 697–705, 1999.
- 3) 福田恵一 : 21 世紀心臓病学の扉を開く—iPS細胞を用いた心不全治療と心臓病の病態解明. *日本医事新報* 4527 : 41–49, 2011.
- 4) Seki T, et al : Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7 : 11–14, 2010.
- 5) Miyazaki T, et al : Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 3 : 1236, 2012.
- 6) Yuasa S, et al : Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23 : 607–611, 2005.
- 7) Onizuka T, et al : Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway. *J Mol Cell Cardiol* 52 : 650–659, 2012.
- 8) Shimoji K, et al : G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPCs. *Cell Stem Cell* 6 : 227–237, 2010.
- 9) Tohyama S, et al : Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 12 : 127–137, 2013.
- 10) Hattan N, et al : Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res* 65 : 334–344, 2005.