

201117007A

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性  
幹(iPS)細胞の樹立による次世代心筋再生医療法の開  
発に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 王 英正

平成24(2012)年 5月10日

厚生労働科学研究費補助金

成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性  
幹(iPS)細胞の樹立による次世代心筋再生医療法の開  
発に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 王 英正

平成24(2012)年 5月10日

# 目 次

## I. 総括研究報告

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性幹(iPS)細胞の樹立による次世代心筋再生医療法の開発に関する研究

王 英正----- 3

## II. 分担研究報告

### 1. 先天性心疾患特異的ヒトiPS細胞樹立に関する研究

佐野 俊二 ----- 7

### 2. ヒト心筋細胞へのリプログラミング因子群に関する研究

伊藤 浩 ----- 12

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 20

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 28

厚生労働科学研究費補助金  
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業  
(総括) 研究報告書

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性幹(iPS)細胞  
の樹立による次世代心筋再生医療法の開発に関する研究

研究代表者 王 英正 岡山大学病院教授

研究要旨

複雑心奇形である機能的単心室症に対する修復術後遠隔期における循環不全は、従来の治療法では救命が期待できない重篤な心疾患である。ヒト心臓内幹細胞は成人より小児の心臓内に多く存在し、かつ自己複製能が高いことから、小児心不全に対する心臓内幹細胞自家移植療法を確立することを本研究事業目的とする。

研究分担者：

佐野 俊二

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
心臓血管外科教授

伊藤 浩

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科  
循環器内科教授

る心臓内幹細胞自家移植療法を行うことで、世界初の小児心不全に対する細胞治療法を実用化することを目的とする。

B. 研究方法

1. 小児心不全への細胞移植療法の第I相臨床試験の実施とデータ解析

世界初となる小児心不全への細胞治療法の第I相臨床試験は、平成23年1月に「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に則り、厚生科学審議会にて実施承認後、同年3月より岡山大学病院で臨床実施した。プロトコルの主要エンドポイントに従い、有害事象の発生有無に最大限の注意と経過観察を行った。(岡山大学病院)

2. 右心負荷モデルへの細胞治療の前臨床試験

第I相臨床試験の成果検証とともに、有効性試験への準備を行う。第II相臨床試験においては、冠動脈内に注入する自己幹細胞数を決定することが

A. 研究目的

研究代表者らがこれまでに開発してきた心臓内幹細胞を用いた自家細胞治療法は、平成23年1月に厚生科学審議会科学技術部会より実施承認された、冠動脈内注入法を用いた「機能的単心室症に対する自己心臓内幹細胞移植療法」の第I相臨床試験を遂行する。TICAP試験として臨床試験登録し、合計7症例を対象に行う。本研究事業では、欧米では小児心臓移植適応例の50%以上を占める単心室症由来の小児心不全に対して、冠動脈内注入法によ

重要である。このため、中型動物であるラットモデルを用いて、以下のような前臨床試験を行った。

小児心不全の主たる病態である右心室負荷はラットの肺動脈を絞扼せることで動物実験モデルとして作成し、大量培養した心臓内幹細胞を冠動脈内に直接注入する。自家細胞移植に必要な細胞数として、30万個/kgと60万個/kgの2つの細胞数を2群に分けて注入し、無移植群に比べ心機能の改善度を検証し、移植に必要な最小細胞数を決定する。

(岡山大学病院、岡山大学医歯薬学総合研究科心臓血管外科)

### 3. 先天性心疾患由来のヒトiPS細胞の樹立によるヒト心臓自己再生プログラムの解明

心臓手術時に精製したヒト心臓内幹細胞用いてiPS細胞樹立に必須であるヒトOct3/4/Klf4/Sox2/c-mycのレンチウイルスベクターをそれぞれ作成し、ヒト心臓内幹細胞内に遺伝子導入させることでヒトiPS細胞を樹立する。

単心室及び二心室より樹立したヒトiPS細胞の包括的遺伝子解析を行い、かつ心筋障害時高い自己修復能力を持つzebrafishとの自己再生因子群との比較検証することで、ヒト心筋細胞特異的自己複製因子群を同定する。(岡山大学病院、岡山大学医歯薬学総合研究科心臓血管外科)

### 4. ヒト心臓内幹細胞における直接心筋細胞誘導法の開発

マウス心臓内の繊維芽細胞はTbx5, Mef2C, GATA4といった心臓の発生に必須な3つの転写因子群によって直接心筋細胞に変換されることが明らかとなったが、ヒト心筋細胞への直接分化誘導法はいまだ不明である。

本研究では、ヒト心臓内幹細胞にレンチウイルスベクター用いて、上記の3転写因子群を幹細胞内導入することで、機能的ヒト心筋細胞の作成と再

生医療への応用を試みる。

(岡山大学病院、岡山大学医歯薬学総合研究科循環器内科)

(倫理面への配慮)

1. ヒト心臓組織の心筋生検による採取は、岡山大学医学部の倫理委員会にて審査承認された臨床研究プロトコル(承認番号766)に従順して行い、“手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について(平成10年厚生科学審議会答申)”を遵守する。
2. 臨床研究プロトコルはヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年告示第425号)を遵守して作成し、外部倫理委員会を含めた体制で審査される。
3. 各関係者は臨床研究を遂行にあたり、“臨床研究に関する倫理指針”(平成20年厚生労働省告示第415号)を遵守して行う。
4. 臨床研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、危険性の説明と研究内容に関する理解を得る。同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して岡山大学病院で保管する。

## C. 研究結果

### 1. 第I相臨床試験の実施完了

平成23年度内に予定の全7症例に細胞移植を実施し、冠動脈内注入法による急性虚血の惹起や致死性不整脈の発症は認められなかった。細胞移植後1週間前後にて、全7症例とも軽快退院となり、3か月目における中間期での心機能評価では、程度の違いはあるものの、全症例において一定値以上の機能改善と実質的な心筋重量の増加を認めた。

今後、移植後1年目までの長期経過を検証する。

#### D. 考察

本第I相臨床試験で実施した全7症例において冠動脈内注入法による細胞治療法の安全性を確認した。治療有効性に関しては、より大規模のランダム化された第II相臨床試験において検証する必要がある。

#### E. 結論

小児心不全における心臓内自己幹細胞を用いた冠動脈内注入による移植法の安全性を確認した。体重が3キロ以上で、年齢が生後6か月以降なら、カテーテル操作を伴う冠動脈造影や細胞注入は技術的に充分実施可能でかつ安全である。今後、有効性検証のためのランダム割り振りの第II相臨床試験を行い、心機能改善の程度について詳細に検討する。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Rodriguez G, Ueyama T, Ogata T, Czernuszewicz G, Tan Y, Dorn GW 2nd, Bogaev R, Amano K, Oh H, Matsubara H, Willerson JT, Marian AJ. Molecular genetic and functional characterization implicate muscle-restricted coiled-coil gene (MURC) as a causal gene for familial dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4(4):349-58.
- ② 樽井 俊、佐野俊二、王 英正 小児心不全への細胞治療 *Medical Science Digest* 特

集;37:439-442 (2011)

- ③ 王 英正 小児心不全への細胞治療の現状と展望 *呼吸と循環* 60;S14-S16 (2012)
- ④ 王 英正 テロメア生物学から心筋再生医療の実用化へ *岡山医学会雑誌* 124;27-34(2012)
2. 学会発表
- ① 王 英正 小児心不全への細胞治療の現状と展望 *重症心不全治療フォーラム* 岡山 2011. 10. 22
- ② 王 英正 心不全の心筋再生医療 *岡二会* 岡山 2012. 1. 28
- ③ Oh H. Cardiac progenitor-based therapy and reprogramming in patients with congenital heart disease, *Cardiac Development Symposium*, Munich (2012.3)
- ④ Direct induction of human cardiac progenitor cells to functional cardiomyocytes by defined factors. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. *American Heart Association Suppl.* (2011).
- ⑤ Insulin-like growth factor-2 receptor controls human cardiac progenitor proliferation and differentiation in children with congenital heart malformation. Yoshida M, Kobayashi, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H. *American Heart Association Suppl.* (2011).
- ⑥ Direct reprogramming of human cardiac progenitor cells towards functional cardiomyocytes. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. *Gen Thorac Cardiovasc Surg. Suppl.* p213 (2011).
- ⑦ Generation and functional analysis of induced

- pluripotent stem cells in patients with congenital heart disease. Kobayashi J, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. *Gen Thorac Cardiovasc Surg. Suppl.* p172 (2011).
- ⑧ Heterokaryon-based reprogramming of human cardiac progenitor cells into functional cardiomyocytes. Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. *Gen Thorac Cardiovasc Surg. Suppl.* p352 (2011).
- ⑨ Mechanical stretch promotes reprogramming of human cardiac progenitors into functional cardiomyocytes by defined factors. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H 第75回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal*
- ⑩ Reprogramming of human cardiac progenitors into pluripotency in patients with congenital heart disease. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H 第75回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal*
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
該当なし。
  2. 実用新案登録  
該当なし。
  3. その他  
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金  
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業  
(分担) 研究報告書

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性幹(iPS)細胞  
の樹立による次世代心筋再生医療法の開発に関する研究

研究分担者 佐野俊二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

2009年7月に成立した改正臓器移植法により、国内での小児心臓移植の実施が可能となったが、小児における慢性的な心臓提供者不足は世界規模で深刻であり、新たな治療法の開発が注目されている。本研究事業では、左室低形成症候群をはじめとする機能的単心室症由来の小児心不全に対し、従来の外科的修復手術に加え、自己組織幹細胞移植によって心機能を向上させる新たな再生医療法を開発することを目的とする。

A. 研究目的

これまで多くの臨床研究の報告により、機能的単心室症に対する心臓シャント手術における予後予測因子が検討されたが、術前ハイリスク群や手術後も心機能が回復しない症例は、最終的に心臓移植に頼らざるを得ないのが現状である。特に第3期であるFontan手術を施行できなかった小児心不全や術後に心機能が改善しなかった症例において、心臓移植を行った症例についての長期成績を見ると、先天性心奇形を伴わない心臓移植群に比べ、有意に予後不良であることが明らかになった。

すなわち、小児心臓移植の実績がほとんどないわが国にとって、機能的単心室症に対する標準

外科的治療以外に、中長期における生命予後を改善させる新たな治療法を開発することは、極めて重要な研究課題であると考えられる。

本研究では、単心室症及び二心室の心疾患患者さんより、心臓手術中に入手した余剰組織を用いて心臓内幹細胞を精製し、Oct4/Klf4/Sox2/c-mycを直接遺伝子導入することで疾患特異的ヒトiPS細胞を樹立する。特に単心室系の循環動態をもつヒトiPS細胞より分化させたヒト心筋細胞と心室切除後において極めて高い自己再生能をもつzebrafish心の自己再生プログラムと比較検討することで、次世代心筋再生医療法につながる新たなヒト心筋細胞誘導因子群を同定する。



## B. 研究方法

### 1. 心臓手術時の余剰組織採取と心臓内幹細胞の初期化

各種先天性心疾患の心臓手術に際し、患者さんのご両親より余剰組織の採取に関する同意書を得る。採取組織量としては100-250mgの心臓組織を右心房より採取後培養に用いる。約10日から2週間の細胞培養で、患者特異的心臓内幹細胞の純化精製と大量培養を行う。

レトロウイルスベクターを用いて、胚性幹(ES)細胞に初期化する転写因子群であるOct4, Klf4, Sox2, c-mycを細胞内に導入し、約3週間の培養でES様コロニーを得る。形成されたES細胞コロニーを機械的に採取し、継代培養することで真のヒトiPS細胞をクローン化する。

樹立したヒトiPS細胞に対して、免疫組織染色、アルカリフォスファターゼ染色、DNAメチル化解析、網羅的遺伝子発現解析を行った。また、疾患特異的iPS細胞をNOD/SCIDマウスの精巣に移植し、奇形腫形成を確認した。さらに、樹立した疾患特異的ヒトiPS細胞に心筋分化誘導を行い、各種転写因子群の推移を検討した。

(倫理面への配慮)

1. ヒト心臓組織の心筋生検による採取は、岡山大学医学部の倫理委員会にて審査承認された臨床研究プロトコル(承認番号766)に従順して行い、“手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について(平成10年厚生科学審議会答申)”を遵守する。
2. 臨床研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、危険性の説明と研究内容に関する理解を得る。同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して岡

山大学病院で保管する。

## C. 研究結果

### 1. 各種先天性心疾患由来のiPS細胞の樹立

単心室心疾患患者由来のCPCsは二心室心疾患と比較し、心臓一次領域形成に重要な転写因子であるNkx2.5とHand1の発現が有意に低下したが、細胞培養による検討では分裂複製能が高く増殖速度が速かった。この現象に伴って、CPCの初期化に伴う胚性幹(ES)細胞様コロニーの形成率は、二心室心疾患患者に比べ、単心室心疾患患者由来CPCsの方が有意に高率であった(70% vs 20%)。

樹立した疾患特異的iPS細胞はES細胞に特異的な未分化転写因子群であるNanog、Oct4、TRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-3/4を発現し、アルカリフォスファターゼ染色陽性であった。

### 2. 左心低形成症候群の心臓内幹細胞とiPS細胞の特徴

網羅的遺伝子解析では左心低形成症候群由来のCPCsは二心室心に比較し、心臓の初期発生に重要な転写因子群であるBMP2、Sema3A、Isl1、Bop1、Wnt3a、Tbx5、Hand1/2の発現が著明に低下し、一方、心臓の二次領域形成に関与する転写因子群であるNotch1、Foxh1の発現が増加した。

また樹立した疾患特異的iPS細胞を用いた心筋細胞分化誘導の検討では、二心室心由来のiPS細胞は左心低形成症候群由来に比し、Hand2、Isl1、Tbx5の発現上昇が著明であった。一方、GATA4は、分化誘導中の左心低形成症候群由来iPS細胞で有意に増加した。

## D. 考察

先天性心疾患患者の心臓組織より精製した

CPCsは、疾患特異的ヒトiPS細胞の樹立に有効な細胞源である。左心低形成症候群由来のiPS細胞は、その基本転写因子群の特性ならびに心筋細胞分化過程において異なった特徴を呈した。

#### E. 結論

今後、左心低形成症候群由来 iPS 細胞を詳細に解析することで、心臓発生初期における心室形成異常の病態解明と新たなヒト心臓再生医療法の開発につながる可能性がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① 藤井泰宏、赤木禎治、谷口 学、中川晃志、木島康文、大月審一、富井奉子、岩崎達雄、五藤恵次、戸田雄一郎、岡本吉生、新井禎彦、笠原真悟、佐野俊二 成人期心房中隔欠損に対するカテーテル閉鎖術と外科的閉鎖術の臨床成績比較：単一施設における後方視的非ランダム化検討 日本小児循環器学会雑誌 27(1) :23-30 (2011).
- ② 樽井 俊、佐野俊二、王 英正 小児心不全に対する心筋再生療法 *Medical Science Digest* 37(11):439-442(2011)
- ③ 笠原真悟、佐野俊二 先天性心疾患患者における導管による右室流出路再建術の検討 日本循環器学会専門医誌 19(2):291-295(2011)
- ④ Tomii T, Honjo O, Matsumoto T, Tachibana H, Fujii Y, Ishino K, Ogasawara Y, Sano S. Impact of chronic cyanosis and reoxygenation on the microheterogeneity of the myocardial blood flow: digital radiographic study in neonatal rats. *General Thoracic and Cardiovascular*

*Surgery*. 59(10):672-680(2011).

- ⑤ Shimizu K, Toda Y, Iwasaki T, Takeuchi M, Morimatsu H, Egi M, Suemori T, Suzuki S, Morita K, Sano S Effect of tranexamic acid on blood loss in pediatric cardiac surgery: a randomized trial. *Journal of Anesthesia* 25(6):823-830(2011).
  - ⑥ Kawabata T, Kasahara S, Arai S, Sano S Right ventricular exclusion for a neonatal patient with Ebstein anomaly: A free wall resection of the right ventricle. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 142(6):1582-1584(2011).
  - ⑦ Shimizu S, Une D, Shishido T, Kamiya A, Kawada T, Sano S, Sugimachi M. Norwood procedure with non-valved right ventricle to pulmonary artery shunt improves ventricular energetics despite the presence of diastolic regurgitation: a theoretical analysis. *J Physiol Sci*. 61:457-465(2011).
  - ⑧ Sano S Invited commentary *Annals of Thoracic Surgery*. 92(5):1740-1741(2011).
- ##### 2. 学会発表
- ① 佐野俊二 成人期Fontan手術の注意点（姑息術にとどまっていた成人症例にFontan手術を行うための工夫）第4回成人先天性心疾患セミナー（平成23年5月14-15日 東京）
  - ② Sano S Surgical management of DORV Joint Meeting of 19th ASCVTS and 21st ATCSA（平成23年5月26-29日 Phuket, Thailand）
  - ③ Sano S Hypoplastic left heart syndrome Joint Meeting of 19th ASCVTS and 21st ATCSA（平成23年5月26-29日 Phuket, Thailand）
  - ④ Sano S Norwood Procedure. Joint Meeting

- of 19th ASCVTS and 21st ATCSA(平成23年5月26-29日 Phuket, Thailand)
- ⑤ Sano S, Kasahara S, Arai S, Fujii Y Pitfall of right ventricle-pulmonary artery shunt in first-stage palliation of hypoplastic left heart syndrome. Joint Meeting of 19th ASCVTS and 21st ATCSA(平成23年5月26-29日 Phuket, Thailand)
- ⑥ Sano S, Kasahara S, Arai S, Fujii Y Recent surgical management of hypoplastic left heart syndrome. Joint Meeting of 19th ASCVTS and 21st ATCSA(平成23年5月26-29日 Phuket, Thailand).
- ⑦ Sano S Small circuit cardiopulmonary bypass. Why? Birmingham Paediatric Cardiac Workshop 2011 (平成23年6月2-3日 Birmingham)
- ⑧ Sano S Evolution and application of the right ventricle to pulmonary artery shunt. Birmingham Paediatric Cardiac Workshop 2011 (平成23年6月2-3日 Birmingham)
- ⑨ Sano S The Sano: How I do it. The 5th Cardiac Symposium: Hypoplastic Left Heart Syndrome and Other Functionally Univentricular Heart Disease. (平成23年6月5-7日 Toronto)
- ⑩ Sano S HLHS, Norwood-Sano Experience. 50th Anniversary of The Pediatric Cardiology Department. (平成23年7月1-2日 Giessen, Germany)
- ⑪ 佐野俊二 複雑心奇形外科治療と小児心移植 第4回先天性シンポジウムイン岡山 (平成23年7月24日 岡山)
- ⑫ Sano S The strategy of plasty of atrioventricular valves in the treatment of the single ventricular anomalies. China Heart Congress and International Forum Beijing 2011. (平成23年8月11-14日 Beijing)
- ⑬ 佐野俊二 心不全治療の進歩—小児から成人まで—神戸市医師会学術講演会 (平成23年9月10日 神戸)
- ⑭ Itoh H, Ichiba S, Ujike Y, Arai S, Kasahara S, Sano S Development of simple pulsatile flow ECMO System. 22nd Annual ELSO conference. (平成23年9月16-18日 Scottsdale)
- ⑮ 笠原真悟、佐野俊二 Ebstein奇形に対する cone reconstruction手術 第59回日本心臓病学会学術集会 (平成23年9月23-25日 神戸)
- ⑯ 佐野俊二 日本と欧米の小児心臓外科の違い—我々はどこを目指すべきか?—Two Hands Club (平成23年10月11日 名古屋)
- ⑰ 佐野俊二 小児の心臓再生医療 シンポジウム 再生医療の新展開 (平成23年12月17日 東京)
- ⑱ Sano S Surgical repair of DORV 2nd International Conongenital Heart Forum. (平成24年2月10-11日 Hanoi)
- ⑲ Sano S Hybrid procedure in the management of CHD. 2nd International Conongenital Heart Forum. (平成24年2月10-11日 Hanoi)
- ⑳ Sano S Arterial switch associated with CoA/IAA. 2nd International Conongenital Heart Forum. (平成24年2月10-11日 Hanoi)
- G. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金  
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業  
(分担) 研究報告書

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性幹(iPS)細胞  
の樹立による次世代心筋再生医療法の開発に関する研究

研究分担者 伊藤 浩 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

近年報告された特定諸因子群による線維芽細胞の人工多能性幹(iPS)細胞及び人工心筋(iCM)細胞への直接再プログラム化の研究成果から、次世代の心筋再生医療法として、未分化な前駆・幹細胞からさらに細胞分化系統を制御した高純度の成熟心血管細胞の移植法や複数遺伝子群の導入による心筋再生医療が可能となった。本研究目的は、自己複製能の高いヒト単心室症由来 iPS 細胞を用いた新規心臓自己再生プログラムを解明することで、ヒト心筋再生誘導因子群を同定し、新たな心筋再生医療を開発することである。

A. 研究目的

左室形成症候群(HLHS)における術前ハイリスク群やシャント手術後も心機能が回復しない症例は、最終的に心臓移植に頼らざるを得ないのが現状であるが、わが国では小児心臓移植の実績が少なく、また海外での HLHS における心臓移植の成績が予後不良であることから、中長期的な生命予後を改善させるための新たな治療法を開発することは、臨床上極めて重要な研究課題である。

一定した心筋再生医療の臨床治療成績をあげるには、効率よく大量のヒト成熟心筋細胞を作成する技術開発が必須不可欠である。そのため、GATA4/Tbx5/Mef2Cを用いたヒト心臓内幹細胞のヒトiCM細胞誘導化の試みとこれら3因子群以

外の新たな変換因子群の探索が重要である。

さらに、心筋再生医療の実用化は、より高率的な心血管細胞への分化誘導技術を開発することが重要で、これまでにiPS細胞の樹立法以外に、核移植や核融合を介さない異核共存体形成を利用した体組織細胞の初期化が報告されている。なかでも、異核共存体形成法を用いた細胞形質変換法は、最も短時間で標的細胞に変えることができ、かつ異種間での異核共存体形成によって、種特異的遺伝子情報の読み出しで、形質変換に関わる諸因子群を特定できる利点がある。

B. 研究方法

1. ヒト心筋細胞への直接リプログラミング

心臓手術を要する HLHS25 症例と比較対照群の二心室 40 症例から、インフォームドコンセントを得て心臓手術時の余剰組織を採取した。平均 100mg の心臓組織内からヒト心臓内幹細胞を分離培養し、各幹細胞株における心臓の発生に重要な各種転写因子群を RT-PCR 法で検討した。

また、レンチウイルスベクターを用いて、ヒト GATA4、Tbx5、Mef2c の 3 因子の発現ウイルスを作製し、ヒト心臓内幹細胞へ遺伝子導入することで、人工的ヒト心筋細胞への直接再プログラム化を行った。

ヒト心筋細胞への分化に対する経時的評価法として、心筋特異的構造蛋白であるアルファ型ミオシン重鎖プロモーターで制御されている緑色蛍光蛋白(eGFP)をリポーター因子とし、さらにミトコンドリア標識色素である tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate(TMRM)を心臓内幹細胞内にそれぞれ導入し可視化した。

## 2. 異核共存体形成による新規心筋分化誘導因子群の同定

異種間での遺伝子情報の変化を解析するため、生後 1 日目の ICR マウスから心筋細胞を分離後培養した。混合した異種細胞は、polyethylene glycol(PEG)を用いて 1 分間処理後、継続培養することで細胞間融合を図った。

異種間の細胞をそれぞれ経時的に観察するため、全細胞を標識する phosphoglycerate kinase promoter で制御されている緑色蛍光蛋白(eGFP)もしくは赤色蛍光蛋白(mCherry)のリポーター因子をレンチウイルスシステムを用いて、マウス新生児心筋細胞ならびにヒト心臓内幹細胞の核内にそれぞれ遺伝子導入した。

核内の eGFP 及び mCherry の発現様式により、

異核共存体または核融合を介するハイブリッド細胞の判定を行い、フローサイトメトリーによって経時的に定量した。

(倫理面への配慮)

1. ヒト心臓組織の心筋生検による採取は、岡山大学医学部の倫理委員会にて審査承認された臨床研究プロトコル(承認番号 766)に従順して行い、“手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について(平成 10 年厚生科学審議会答申)”を遵守する。
2. 臨床研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、危険性の説明と研究内容に関する理解を得る。同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して岡山大学病院で保管する。

## C. 研究結果

1. 伸展刺激培養による心筋リプログラミングの促進効果

HLHS 由来の心臓内幹細胞は、ヒト GATA4、Tbx5、Mef2c の 3 因子を導入後 10 日目に、心筋細胞特異的構造蛋白である心筋トロポニン-T とミオシン軽鎖を発現し、フローサイトメトリーを用いた TMRM 色素量の定量的解析により、ミトコンドリア含有量は 3 因子導入後 7 日目に 45%以上と有意に増加した。ヒト心筋細胞への成熟度はサルコメアアクチンの免疫組織染色にて分化誘導後 20 日目に確認した。

このような一連の心臓内幹細胞からヒト心筋細胞への再プログラム化は、分化誘導過程において、10Hz の継続的伸展刺激により、心筋細胞の特異的構造蛋白の発現が 3 因子導入後 5 日目から著明に上昇し、有意に心筋細胞の成熟段階が促進

された。

## 2. PEG処理による異核共存体形成

PEG 処理後 24 時間目をピークに、ヒト心臓内幹細胞とマウス新生児心筋細胞間において、約 1%前後の異核共存体形成を認めた。しかしながら、核融合を介さない異核共存体自身は自己複製能がなく、継続培養によってさらなる増殖は認めなかった。

一方、PEG 処理後 24 時間以降では、ハイブリッド細胞が有意に増殖し始め、7 日目までの継続培養で、全細胞の 5-10%を占めた。いずれも細胞融合形態においても、拍動性心筋細胞への分化誘導が観察されたが、異核共存体形成によって分化誘導された心筋細胞は細胞周期が停止するが、ハイブリッド細胞と比べ、心筋細胞への分化度が有意に高率であった。

## D. 考察

1. ヒト心筋細胞の分化誘導は、継続的伸展刺激による生理的環境下で促進され、人工的ヒト心筋細胞を用いた次世代再生医療法への応用の可能性が示唆された。
2. 異核共存体形成による細胞のリプログラミング法はその効率の改良により、従来の iPS 細胞作製技術を凌駕しうる極めて短時間で細胞の形質変換と遺伝子の網羅的探索が可能な新技術であり、今後、細胞融合や精製技術の刷新とともに大きく発展できると期待される。

## E. 結論

1. HLHS由来の心臓組織を用いてヒト心臓内幹細胞を樹立し、ヒトGATA4、Tbx5、Mef2cの3因子をレンチウイルスシステムで遺伝子導入することで、ヒト心筋細胞へ直接分化誘

導できることを確認した。

2. 従来のiPS細胞作製技術による体組織細胞の初期化以外に、異核共存体形成法は短時間で細胞の性質変換が可能で、異種間の細胞融合を組み合わせることで、標的細胞への再プログラム化に関わる諸因子群を同定できる可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(著書)

- ① 循環器専門医研修テキスト a. 虚血性心疾患 総論 河野晋久、伊藤 浩 監修 吉川純一 編集 渡辺弘之・大門雅夫 p194-195 2011/3/14
- ② 循環器専門医研修テキスト b. 急性虚血性心疾患（急性冠症候群）村上正人、伊藤 浩 監修 吉川純一 編集 渡辺弘之・大門雅夫 p195-208, 2011/3/14
- ③ 循環器専門医研修テキスト c. 慢性虚血性心疾患（狭心症）櫻木 悟、伊藤 浩 監修 吉川純一 編集 渡辺弘之・大門雅夫 p208-214, 2011/3/14
- ④ 循環器専門医研修テキスト 使用頻度の高い循環器治療薬 柚木 佳、伊藤 浩 監修 吉川純一 編集 渡辺弘之・大門雅夫 p400-403, 2011/3/14
- ⑤ 心不全 日常診療 Q&A 第3章 心不全をどう治療するか？ 三好 亨、伊藤 浩 主編集 野出孝一 編集協力 佐々木達哉 河野宏明 南山堂 P188-189 P195-196 p204-205 2011/4/1
- ⑥ 新・心臓病診療プラクティス 動脈硬化の内科治療に迫る－薬物治療とインターベンション－ 「序文」「総説 動脈硬化の内科治療に迫る」

- 伊藤 浩 編集 伊藤 浩 責任編集 吉川純一、笠貫 宏、土師一夫、別府慎太郎、松崎益徳 文光堂 p2-6, 2011/3/3
- ⑦ 新しい診断と治療のABC 4 急性心筋梗塞 心エコー図法による診断 (ポータブルエコーを含む) 麻植浩樹、伊藤 浩 編集 高野照夫 最新医学社 2011/2
- ⑧ 心エコー図 知ってるつもりの基本と知識 大動脈弁逆流 谷口 学、伊藤 浩 監修 吉川純一 編集 渡辺弘之 メディカルレビュー社、p102-107, 2011/1/28
- ⑨ 心エコー図 知ってるつもりの基本と知識 高血圧と心不全 杜 徳尚、伊藤 浩 監修 吉川純一 編集 渡辺弘之 メディカルレビュー社、p129-136, 2011/1/28
- ⑩ 心エコー図 知ってるつもりの基本と知識 viable/nonviable の境界線 麻植浩樹、伊藤 浩 監修 吉川純一 編集 渡辺弘之 メディカルレビュー社、p350-357, 2011/1/28
- ⑪ 心臓移植 3. 適応判定に必要な臨床検査 (非侵襲的診断を含む) 齋藤幸弘、河野晋久、伊藤 浩 監修 松田 暉 編/布田伸一、福寫教偉 Springer p121-124, 2011/5
- ⑫ 今日の心臓手術の適応と至適時期 総説 内科医からの提言 伊藤 浩 吉川純一監修 伊藤浩、高梨秀一郎、松富護郎、渡辺弘之、大門雅夫編集 文光堂 p2-3, 2011/9/19  
(原著論文)  
冠動脈疾患(上)―診断と治療の進歩―
- ① III. 冠循環の病理・病態 虚血心筋の病理・病態 再灌流障害と no reflow 現象 伊藤 浩 日本臨床 69(7); 142-146, 2011
- ② The no-reflow phenomenon associated with percutaneous coronary intervention: its mechanisms and treatment. Hiroshi Ito Cardiovasc Interv and Ther 26; 2-11, 2011
- ③ Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. Nakamura K, Akagi S, Ogawa A, Kusano KF, Matsubara H, Miura D, Fuke S, Nishii N, Nagase S, Kohno K, Morita H, Oto T, Yamanaka R, Otsuka F, Miura A, Yutani C, Ohe T, Ito H. *Int J Cardiol*. 2011 Mar 3. [Epub ahead of print]
- ④ Prednisolone ameliorates idiopathic pulmonary arterial hypertension. Ogawa A, Nakamura K, Mizoguchi H, Fujii N, Fujio H, Kusano KF, Ohe T, Ito H. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jan 1;183(1):139-40.
- ⑤ Elevated oxidative stress is associated with ventricular fibrillation episodes in patients with Brugada-type electrocardiogram without SCN5A mutation. Tanaka M, Nakamura K, Kusano KF, Morita H, Ohta-Ogo K, Miura D, Miura A, Nakagawa K, Tada T, Murakami M, Nishii N, Nagase S, Hata Y, Kohno K, Ouchida M, Shimizu K, Yutani C, Ohe T, Ito H. *Cardiovasc Pathol*. 2011 Jan-Feb;20(1):e37-42. Epub 2010 Mar 12.
- ⑥ Circulating KCNH2 Current-Activating Factor in Patients with Heart Failure and Ventricular Tachyarrhythmia. Sugiyama H, Nakamura K, Morita H, Akagi S, Tani Y, Katayama Y, Nishii N, Miyoshi T, Nagase S, Kohno K, Kusano KF, Ohe T, Kurokawa J, Furukawa T, Ito H. *PLoS One*. 2011;6(5):e19897. Epub 2011 May 19.
- ⑦ Association of increased plasma adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in non-elderly men. Doi M, Miyoshi T, Hirohata S, Nakamura K, Usui S, Takeda K, Iwamoto M, Kusachi S, Kusano K,



- Ito H. *Cardiovasc Diabetol.* 2011 May 23;10:44.
- ⑧ Ezetimibe improves postprandial hyperlipemia and its induced endothelial dysfunction. Yunoki K, Nakamura K, Miyoshi T, Enko K, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Ito H. *Atherosclerosis.* 2011 Apr 22. [Epub ahead of print]
- ⑨ Impact of hypertriglyceridemia on endothelial dysfunction during statin ± ezetimibe therapy in patients with coronary heart disease. Yunoki K, Nakamura K, Miyoshi T, Enko K, Kubo M, Murakami M, Hata Y, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Ito H. *Am J Cardiol.* 2011 Aug 1;108(3):333-9. Epub 2011 May 3.
- ⑩ Optimal treatment for coronary artery disease in patients with diabetes: percutaneous coronary intervention, coronary artery bypass graft, and medications. Ito H. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Jan;59(1):6-13. Epub 2011 Jan 12. Review.
- ⑪ The Role of Echocardiography in Predicting Responders to Cardiac Resynchronization Therapy -Results From the Japan Cardiac Resynchronization Therapy Registry Trial (J-CRT)-Yoshihiro Seo, Hiroshi Ito, Satoshi Nakatani, Mitsuaki Takami, Shigeto Naito, Tsuyoshi Shiga, Kenji Ando, Yuji Wakayama, Kazutaka Aonuma, the J-CRT in vestigators *Circulation Journal* 75(5); 1156-1163, 2011
- ⑫ Adding thiazide to a renin-angiotensin blocker improves left ventricular relaxation and improves heart failure in patients with hypertension Hiroshi Ito, Katsuhisa Ishii, Hajime Kihara, Noriaki Kasayuki, Fumiaki Nakamura, Kenei Shimada, Shota Fukuda, Katsuomi Iwakura, Junichi Yoshikawa for Effect of ARB/Diuretics on Diastolic Function in Patients with Hypertension (EDEN) trial investigators Hypertension Research 2011
- ⑬ Intermittent arm ischemia induces vasodilatation of the contralateral upper limb Kenki Enko, Kazufumi Nakamura, Kei Yunoki, Toru Miyoshi, Satoshi Akagi, Masashi Yoshida, Norihisa Toh, Mutsuko Sangawa, Nobuhiro Nishii, Satoshi Nagase, Kunihisa Kohno, Hiroshi Morita, Kengo F. Kusano, Hiroshi Ito *J Physiol Sci* 61; 507-513, 2011
- ⑭ Transcatheter Closure of a Large Atrial Septal Defect under Microprobe Transesophageal Echocardiographic Guidance. Taniguchi M, Akagi T, Kijima Y, Ito H, Sano S. *Echocardiography.* 2011 Dec 9. doi: 10.1111/j.1540-8175.2011.01600.x. [Epub ahead of print]
- ⑮ Gender Differences in Age-Related Changes in Left and Right Ventricular Geometries and Functions. Daimon M, Watanabe H, Abe Y, Hirata K, Hozumi T, Ishii K, Ito H, Iwakura K, Izumi C, Matsuzaki M, Minagoe S, Abe H, Murata K, Nakatani S, Negishi K, Yoshida K, Tanabe K, Tanaka N, Tokai K, Yoshikawa J; The Japanese Normal Values for Echocardiographic Measurements Project (JAMP) Study Investigators. *Circ J.* 2011 Nov 25;75(12):2840-2846. Epub 2011 Sep 23.
- ⑯ Four-year clinical outcomes of the OLIVUS-Ex (impact of Olmesartan on progression of coronary atherosclerosis: Evaluation by intravascular ultrasound) extension trial. Hirohata A, Yamamoto K, Miyoshi T, Hatanaka K, Hirohata S, Yamawaki H, Komatsubara I, Hirose E, Kobayashi Y, Ohkawa K, Ohara M, Takafuji H, Sano F, Toyama Y, Kusachi S, Ohe T, Ito H.

- Atherosclerosis*. 2012 Jan;220(1):134-8. Epub 2011 Nov 9.  
(総説)
- ① STEMI におけるニコランジルの心筋保護効果についての検討 河合勇介、中濱 一、橋本克史、渡邊敦之、戸田洋伸、伊藤 浩 *Therapeutic Research* 32(3); 289-290, 2011
- ② FMD の測定方法と冠動脈疾患との関連 麻植浩樹、伊藤 浩 *心エコー* 12(4):326-334, 2011
- ③ 心エコーが果たす役割 谷口 学、伊藤 浩 *心エコー*, 12(6) : 502-511, 2011.
- ④ 虚血再灌流時の微小循環保護:現状と展望 伊藤 浩 *CARDIAC PRACTICE*, 22(2) : 161-165, 2011.
- ⑤ メタボサルタンの臨床的意義はどこにあるか? 小室一成、伊藤 浩、坂田泰史、中村一文 *Pharma Medica*, 29(4) : 121-127, 2011.
- ⑥ 心腎連関からみた糖尿病性腎症の治療 伊藤 浩 *月刊糖尿病* 3(7); 59-68, 2011
- ⑦ 高血圧治療と心エコー 杜 徳尚、伊藤 浩 *心エコー* 12(8); 696-702, 2011
- ⑧ 糖尿病治療と心エコー 麻植浩樹、伊藤 浩 *心エコー* 12(8); 712-723, 2011
- ⑨ 循環器診療 14 動脈硬化をみすえた糖尿病の治療戦略 伊藤 浩 *臨床医のための循環器診療* 14; 54-56, 2011
- ⑩ 慢性心不全の病態と治療戦略 伊藤 浩 *日本循環器看護学会誌* 7(1); 12-14, 2011
- ⑪ II度以上の房室ブロックを伴う筋緊張性ジストロフィに対する予防的植込み型除細動器(ICD)植え込みの必要性 武 寛、森田 宏、西井伸洋、永瀬 聡、中村一文、河野晋久、草野研吾、伊藤 浩 *心臓* 43(SUPPL2); 39-45, 2011
- ⑫ 周術期の管理の進め方 心血管リスク軽減のために 橋本克史、伊藤 浩 *Heart View* 15(11); 71-76, 2011
- ⑬ 心エコーの最前線 麻植浩樹、伊藤 浩 *CIRCULATION Up-to-Date* 6(5); 34-47, 2011
- ⑭ インターベンションを活かす:ST上昇型急性冠症候群 no reflow の予測とその対策 伊藤 浩 *Heart View* 15(13); 87-92, 2011
2. 学会発表
- ① Catheter Closure of Atrial Septal Defect in Patients with Multiple Rim Deficiencies Yasufumi Kijima, Manabu Taniguchi, Koji Nakagawa, Kengo Kusano, Hiroshi Ito, Shunji Sano, Teiji Akagi, *American College of Cardiology*, 2011
- ② Impact of Increased Arterial Stiffness and Wave Reflection on the Prevalence of Paroxysmal Atrial Fibrillation Toru Miyoshi, Masayuki Doi, Satoshi Hirohata, Shozo Kusachi, Kazufumi Nakamura, Satoshi Nagase, Kunihisa Kono, Hiroshi Morita, Kengo Kusano, Hiroshi Ito, *American College of Cardiology*, 2011
- ③ Defibrillation Threshold Testing During Implantable Cardioverter-Defibrillator Implantation Impairs Cardiac Systolic and Diastolic Function and Prolongs Blood Pressure Recovery in Patients With Heart Failure Norihisa Toh, Nobuhiro Nishii, Kazufumi Nakamura, Satoshi Nagase, Kunihisa Kohno, Hiroshi Morita, Kengo F. Kusano, Hiroshi Ito *American College of Cardiology*, 2011
- ④ Impact of Hybrid Approach Involving Pulmonary Vein Isolation and Transcatheter Device Closure for Patients with Atrial Septal Defect Having

- Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation. Manabu Taniguchi, Satoshi Nagase, Teiji Akagi, Koji Nakagawa, Yasufumi Kijima, Yoshihito Hata, Kengo Kusano, Hiroshi Ito, Shunji Sano. *American College of Cardiology*, 2011
- ⑤ Anti-inflammatory Effect of Olmesartan on Coronary Plaque Progression, Finding from the Impact of Olmesartan on Progression of Coronary Atherosclerosis: Evaluation By Intravascular Ultrasound (OLIVUS) Trial. Toru Miyoshi, Atsushi Hirohata, Shozo Kusachi, Satoshi Hirohata, Kazufumi Nakamura, Hiroshi Morita, Kengo Kusano, Hiroshi Ito *American College of Cardiology*, 2011
- ⑥ Impact of Chronic Kidney Disease on Left Main Coronary Artery Disease in Patients with Stable Angina Pectoris. Kazuhiro Dan, Toru Miyoshi, Kengo Kusano, Hiroshi Ito, Masayuki Ueada. *American College of Cardiology*, 2011
- ⑦ Nicorandil Further Improve Microvascular Function in Patients With STEMI Undergoing Anti-embolic Therapy Yusuke Kawai, Hironobu Toda, Atsuyuki Watanabe, Katsushi Hashimoto, Makoto Nakahama, Hiroshi Ito *American College of Cardiology*, 2011
- ⑧ Pro-apoptotic Effects of Imatinib on Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension -Role of Akt-中村一文、赤木 達、小川愛子、三浦 綾、三浦大志、西井伸洋、永瀬 聡、森田 宏、河野晋久、松原広己、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- ⑨ Tachycardia Zone Setting to Avoid Inappropriate Shock in Brugada Syndrome Patients with Implantable Cardioverter Defibrillator 西井伸洋、久保元基、中川晃志、田中正道、杜 徳尚、吉田賢司、村上正人、三好 亨、永瀬 聡、中村一文、河野晋久、森田 宏、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- ⑩ Transient Impaired Calcium Handling Induced by Defibrillation Shock Causes Diastolic Dysfunction of Left Ventricle in Patients with Fatal Ventricular Arrhythmias 杜 徳尚、中村一文、西井伸洋、永瀬 聡、河野晋久、森田 宏、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- ⑪ Circulating KCNH2 Current Activating Factor in Patients with Heart Failure and Ventricular Tachyarrhythmia 杉山洋樹、中村一文、森田 宏、赤木 達、草野研吾、大江 透、黒川詢子、古川哲史、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- ⑫ Clinical Aspects of Unsuccessful Device Closure in Patients with Atrial Septal Defect 木島康文、赤木禎治、谷口 学、中川晃志、岡本吉生、大月審一、草野研吾、伊藤 浩、佐野俊二 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- ⑬ Influence of Adiposity on Carotid Wave Reflection and Arterial Stiffness: a Longitudinal Study in Healthy Children 櫻木 悟、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)

- ⑭ Impact of Infero/Lateral Early Repolarization Pattern in Patients with Brugada Syndrome 時岡浩二、草野研吾、森田 宏、永瀬 聡、河野晋久、中村一文、西井伸洋、谷山真規子、三浦大志、大江 透、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- ⑮ Fragmented QRS is Associated with Torsades de Pointes in Patients with Acquired Long QT Syndrome 原岡佳代、森田 宏、杜 徳尚、三好 亨、西井伸洋、永瀬 聡、中村一文、河野晋久、草野研吾、大江 透、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- ⑯ Prostaglandin I2 induces Apoptosis via Upregulation of Fas Ligand in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension 赤木 達、中村一文、松原広己、三浦 綾、小川愛子、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- ⑰ Depression in Patients with Cardiovascular Disease: Evaluation with the Patient the 9 item Patient Health Questionnaire (PHQ-9) 久保元基、三好 亨、西井伸洋、森田 宏、中村一文、河野晋久、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- ⑱ The Risk of ECG Type Alterations and Appearance of Type-0 ECG for the Occurrence of Ventricular Fibrillation in Brugada Syndrome 森田 宏、武 寛、Douglas Zipes, 杜 徳尚、吉田賢司、西井伸洋、永瀬 聡、中村一文、河野晋久、草野研吾、大江 透, Jiashin Wu、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- ⑲ Delayed Gadolinium-Enhancement with Cardiac Magnetic Resonance and Early Repolarization of Inferolateral Leads in Patients with Brugada Syndrome 村上正人、永瀬 聡、田中正道、中川晃志、西井伸洋、中村一文、河野晋久、森田 宏、草野研吾、伊藤 浩 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 (横浜市)
- G. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許取得  
該当なし。
  2. 実用新案登録  
該当なし。
  3. その他  
該当なし。