

201219002A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 王 英正

平成25(2013)年5月

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 王 英正

平成25(2013)年 5月

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 ----- 10

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 ----- 16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 24

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 31

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

る有効性の検証を細胞移植後1年目まで観察し、TICAP第1相臨床試験の研究成果の総括を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 小児心不全への細胞移植療法の第1相臨床試験のデータ解析

世界初となる小児心不全への細胞治療法の第1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2年間かけて登録実施してきた。プロトコルの主要エンドポイントに従い、心不全、致死性不整脈、蛋白漏出性腸症、感染症、造腫瘍作用などを含む重篤な有害事象の発生有無に最大限の注意と経過観察を行う。(岡山大学病院)

2. 第2相臨床試験のプロトコル作成と承認申請

第1相臨床試験の安全性確認を踏まえ、有効性検証目的となる第2相臨床試験では、第1相臨床試

A. 研究目的

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。

平成24年度では、平成22年度から平成23年度にかけて実施してきた左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞自家移植の連続全7症例の安全性確認と非移植群である7症例との心機能改善度に関する

験の成果を踏まえ、細胞治療の有効性を検出する必要最小限の症例数を算出する必要がある。7対7症例の第1相臨床試験において得られた細胞移植後の心機能改善度を解析し、同群間のみならず異群間での心機能改善度を統計学的に有意に検出できる実施症例数を算出する。

作成した第2相臨床試験プロトコルは学内の倫理委員会での審議承認を経て、厚生科学審議会に提出し、承認申請を行う。第2相臨床試験はより科学的な有効性の判定を行うため、試験設計は無作為割り付けによる比較対照試験とする。また、有害事象に関するデータモニタリングを実施するため、eClinical/Electronic Data Capture (EDC) による登録症例の適応基準の判定、コンピューターによる無作為の群別割り付けや細胞治療前後の臨床経過の追跡を行う内容にする。(岡山大学病院)

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、単心室症の病態発生機序に関して、流出路、房室弁や心室内腔の形成に関わる各種転写因子群の発現様式について網羅的に探索し、二心室心疾患との比較により単心室症の発症規定因子群を同定する。(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, G

ATA4, Myocardin, Hand2といった心臓の発生に必須な5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を用いて、上記の5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。心筋細胞への系統誘導を定量的に評価する指標として、心筋構造タンパクであるアルファアクチンのプロモーター制御下でEGFPのリポーター遺伝子を用いて心筋分化度を経時的に追跡可視化した。定量法として、免疫組織染色、FACS解析、細胞内カルシウムの取り込み解析やリアルタイムRT-PCR法を用いる。(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. 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。
3. 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。
4. 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。ヒト心臓内幹細胞は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成 22 年告示第 380 号) を遵守して、岡山大学病院内に整備した GMP 基準の細胞調節施設内で精製する。

5. 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。
6. 有害事象発生時には、試験責任/分担医師は「重篤な有害事象発生時対応マニュアル」に沿って対応し、一次、二次と最終報告を行う。

C. 研究結果

1. 実施終了の第 1 相臨床試験のデータ解析(安全性検証)

平成24年度は平成23年度内に移植実施した全7症例の安全性検証について、移植直後から1年間にかけて長期にわたって観察し各種評価法により定量化した。移植後急性期より、冠動脈内注入法による細胞移植で虚血や不整脈の惹起を認めず、移植後1年間を通じて、死亡、心不全発症や感染症の併発などの事象は起こらなかった。もっとも重要なこととして、細胞移植した全7症例において、移植した心臓部位を含め腫瘍形成作用を認められなかった。

2. 第1相臨床試験の有効性検証

本臨床研究では、7症例の細胞移植群と7症例の標準治療群(非細胞移植群)の比較試験を行い、心臓内幹細胞自家移植の有効性について検証した。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か月目および1年目での心機能評価を各種パラメーター用いて解析した。

細胞治療の有効性について、細胞移植後3か月目より1年目にかけて、心エコー、心臓カテーテル、心臓MRI検査によって評価し、心室駆出率と心係数の継続的改善を示した。興味深いことに、細胞治療群は移植後心収縮能のみならず、拡張能の改善ならびに三尖弁の弁輪径の縮小を認めた。

D. 考察

本第1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、今後34人から構成される無作為割り付けした第2相臨床試験において平成25年度より検証していく。

E. 結論

左心低形成症候群7症例を対象に、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。具体的には、細胞移植後1年目までの観察期間において、細胞注入による急性心筋虚血、催不整脈作用はなく、心不全や死亡事例も生じなかった。長期的観察期間における細胞起因性の腫瘍形成や感染症の発症も認めなかった。

また、細胞治療群の7症例は非細胞治療群の7症例に比し、心室収縮能および拡張能の改善を有意に認め、移植後1年目まで継続したこれらの有効性を示唆する所見は、今後合計34人まで症例数を増やしたランダム化対照比較試験を登録実施することによって注意深く検証していく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

① 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 医学書院 60;S1-S4 (2012)

② 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)

③ 小林純子、佐野俊二、王 英正 先天性心疾患に対する心筋再生医療 循環器内科 71(4):360-368 科学評論社 (2012)

2. 学会発表

I. 王 英正 心不全の心筋再生医療 岡二会 岡山 (2012.1.28)

II. 王 英正 小児心不全と細胞治療 先天性心疾患シンポジウム 岡山 (2012.5.27)

III. 王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞自家移植療法 第7回 岡山心移植心不全研究会 岡山 (2012.9.4)

IV. 王 英正 第15回遺伝子治療推進産学懇話会 小児心不全への再生医療の可能性 京都大学東京オフィス (2012.9.25)

V. 王 英正 Mending and Modeling the Congenital Heart Diseases by Patient-Specific Cardiac Progenitors 東京女子医科大学 第3回最先端研究開発支援プログラム(FIRST)セミナー 東京 (2012.10.05)

VI. 王 英正 重度心臓病に対する心筋再生医療 オープンフォーラム 2012 岡山

(2012.10.27)

VII. 王 英正 心筋再生医療の臨床試験と研究開発状況 技術情報協会セミナー 東京 (2012.11.20)

VIII. 王 英正 疾患特異的幹細胞およびiPS細胞を駆使した希少小児心疾患に対する細胞治療と病態解明 消化器研究セミナー 岡山大学 (2013.1.10)

IX. 王 英正 橋渡し研究加速推進ネットワークシンポジウム 小児心不全に対する細胞治療の中間報告と疾患特異的iPS細胞の樹立による次世代心臓再生法の開発 岡山 (2012.7.7)

X. 王 英正 岡山心臓血管外科カンファレンス 小児心不全への細胞治療法の可能性 岡山 (2012.7.21)

XI. Oh H. Mending and Modeling the Congenital Heart Diseases by Patient-Specific Cardiac Progenitors. Symposium at Texas Heart Institute (2012.11.4)

XII. Oh H., Tarui S, Ohtsuki S, Sano S. Cardiac progenitor cell infusion in patients with hypoplastic left heart syndrome: a prospective phase 1 clinical trial. Japanese Heart Failure Society (2012,12.2)

XIII. Oh H. iPS細胞を用いた心疾患の新たな診断法と治療開発 岡山大学サイエンスカフェ (2013.2.8)

XIV. 王 英正 希少難治性心不全に対するヒト幹細胞移植療法の長期的エビデンス 第12回日本再生医療学会 (2013.3.21)

XV. Oh H. Cardiac progenitor-based therapy and reprogramming in patients with congenital heart disease, *Cardiac*

- Development Symposium*, Munich (2012.3)
- XVI. Patient-specific induced pluripotent stem cells from cardiac progenitors recapitulate the models for cardiac chamber disorder. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H *International Society of Stem Cell Research* (2012)
- XVII. Mechanical stretch modulates calcium handling during direct cardiac reprogramming of resident progenitor cells in human heart. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H *International Society of Stem Cell Research* (2012)
- XVIII. Transition of cardiogenic to angiogenic potential of human cardiac progenitor cells occurs with age. Yoshida M, Tarui M, Kobayashi J, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H. *International Society of Stem Cell Research* (2012)
- XIX. Mechanical stretch modulates calcium handling during direct cardiac reprogramming of resident progenitor cells in human heart. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H *European Society of Cardiology* (2012)
- XX. Patient-specific induced pluripotent stem cells from cardiac progenitors recapitulate the models for cardiac chamber disorder. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H *European Society of Cardiology* (2012)
- XXI. Hedgehog interacting protein controls age-dependent angiogenic activity in human cardiac progenitor cells through insulin-like growth factor-1 receptor signaling Yoshida M, Kobayashi, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H. *American Heart Association Suppl.* (2012).
- XXII. Patient-specific induced pluripotent stem cells for modeling hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H *American Heart Association Suppl.* (2012).
- XXIII. Factors-based human cardiomyocytes differentiation exhibits defective maturation and excitation through aberrant calcium handling proteins. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H *American Heart Association Suppl.* (2012).
- XXIV. 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76回日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2012)
- XXV. 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 76 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2012)
- XXVI. 先天性心疾患患者由来の心臓内幹細胞を用いた疾患特異的ヒト iPS 細胞の樹立と機能解析. 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 小児循環器学会 (2012)
- XXVII. 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. 小児循環器学会 (2012)
- XXVIII. 疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた左心低形成症候群の実験モデル化と病態解析 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 日本胸部外科学会 *Gen Thorac Cardiovasc Surg. Suppl.* 439 (2012)
- XXIX. 人工ヒト心筋細胞の成熟化におけるカルシウムイオンポンプの重要な役割 樽井俊、小林純子、平田昌敬、高橋賢、入部玄太郎、成瀬恵治、笠原真悟、佐野俊二、王 英正 日本胸部外科学会 *Gen Thorac Cardiovasc Surg. Suppl.* 440 (2012)
- XXX. Aberrant calcium handling inhibits functional maturation and excitation in factors-based human cardiomyocytes differentiation. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H 日本心不全学会 YIA (2012).
- XXXI. 先天性心疾患の疾患特異的 iPS 細胞の樹立と左心低形成症候群の心臓発生異常の解明 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 日本心臓血管外科学会 (2013)
- XXXII. Modeling and dissecting hypoplastic left heart syndrome by patient-specific induced pluripotent stem cells Kobayashi J, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. 第 77 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2013)
- XXXIII. Engineering human bioartificial heart with three-dimensional extracellular matrix materials. Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. 第 77 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2013)
- XXXIV. 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. 日本心臓血管外科学会 (2013)
- XXXV. ハーフクリップ法によるラット右心圧負荷モデルの作製 Okuyama M, Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, Oh H. 日本心臓血管外科学会 (2013).
- XXXVI. 疾患特異的 iPS 細胞の樹立と左心低形成症候群の心臓発生異常の解明 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 日本外科学会 Young

Researcher Award (2013)

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

本研究事業では、希少難治性小児心不全由来の心臓内幹細胞を用いて、疾患特異的iPS細胞を樹立する。樹立した先天性心疾患固有のiPS細胞を経時的に心筋系統誘導し、網羅的に遺伝子発現解析を行うことで、心臓発生段階における各種心筋転写因子の発現異常パターンを同定する。また、心臓自己再生能がきわめて高い下等動物心固有の単心室形態に類似したヒト単心室症由来のiPS細胞を解析することで、新たな心臓再生プログラムを探索検証する。

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

外科的治療後において、中長期における生命予後規定する心筋転写因子群の同定は、極めて重要な研究課題であると考えられる。

本研究では、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、レトロウイルスベクターを用いて、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。樹立した各種先天性心疾患由来のiPS細胞を心筋細胞に直接系統誘導する各段階において、経時的に遺伝子発現様式を調べることで、疾患発症にかかわる規定因子群を同定する。

さら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、奇形腫形成を確認する。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、免疫組織染色で確認後、各種転写因子群の推移をリアルタイムRT-PCRを用いて解析する。

(倫理面への配慮)

1. ヒト心臓組織の採取は、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。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、患者さんの同意のもと不要となった余剰組織を研究開発に使用する。

2. 遺伝子組み換え実験(承認9068号)やレトロ及びレンチウイルスの感染はP2レベルの実験室で行い、移植された動物は隔離した遺伝子操作動物管理施設にて飼育を行う。
3. 動物実験計画書(承認389号)に従い、動物施設への実験動物の導入に当たっては、必要に応じて適切な検疫、隔離飼育等を行うことにより、実験実施者、飼養者及び他の実験動物の健康を損ねることのないように講じる。
4. 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。
5. 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

開心手術時に採取した心臓組織から心臓内幹細胞を精製純化し、疾患特異的iPS細胞の樹立に用いた。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。

また、胚性幹細胞特異的転写因子であるOct4やNanogのプロモーター領域におけるDNAメチル化について検討したところ、樹立したiPS細胞は初期化前に比べ有意に脱メチル化が観察され

た。マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析においても、初期化されたiPS細胞においてOct4とNanogの遺伝子発現が約1,000倍発現上昇していた。

2. 左心低形成症候群由来のiPS細胞の機能解析による複雑心奇形の病態解明

左心低形成症候群と二心室心疾患である肺静脈還流異常症ならびに理研より購入したcontrolとなるiPS細胞である201B7を用いて、心筋細胞に分化誘導し、各種心筋転写因子群について定量的にRT-PCRを行い比較検討した。

まず、左心低形成症候群由来のiPS細胞は上記の2つの比較iPS細胞に比べ、心筋分化過程における初期転写因子であるNkx2.5の発現低下を認め、心臓発生一次領域を司る前駆細胞の増殖および心筋系統誘導が障害されていることが示唆された。

また、左心低形成症候群の解剖学的特徴の一つである房室弁や中隔形成に関わるNotch1やHey1/2の転写発現異常を認めた。集約的に左右心室形成に重要なHand1/2の発現様式に異常が確認され、複雑心奇形である左心低形成症候群の基幹病態像として、上記の一連となる心臓の発生過程の異常によってもたらされた疾患であることが明らかとなり、従来の疾患ゲノム解析法では解明しえない、複雑な先天性疾患の病態を疾患固有のiPS細胞を樹立することで、心筋細胞分化誘導早期から病態進展過程を詳細にかつ連続的に再構築できることが示唆された。

D. 考察

先天性心疾患患者の心臓組織より精製した心臓内幹細胞は、血液細胞や皮膚生検と異なり、術中に入手できるきわめて侵襲性が低い方法であ

り、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発現様式に疾患病態像を反映した特性があり、複雑心奇形の発症に関わる分子生物学的な機序解明に有用な研究ツールであった。

今後、候補となる各種遺伝子操作動物の作成と表現型解析により、より特異的な疾患関与遺伝子群の同定について詳細な解析を進めたい。

E. 結論

左心低形成症候群由来のiPS細胞の樹立により、心臓発生初期段階における複合的な転写活性異常を包括的に解析しえた。

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、単心室心固有の遺伝子プログラムと自己再生能がきわめて高い下等動物であるzebrafishとの対比比較により、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 Itoh H, Sano S, Pouard P. Pediatric perfusion in Japan: 2010 practice survey. *Perfusion*27(1):72-77, 2012.
- ② Fujii Y, Ishino K, Tomii T, Kanamitsu H, Fujita Y, Mitsui H, Sano S. Atrionatriuretic Peptide improves left ventricular function after myocardial global ischemia-reperfusion in hypoxic hearts. *Artificial Organs* 36(4):379-386, 2012.
- ③ Taniguchi M, Akagi T, Kijima Y, Ito H, Sano S. Transcatheter Closure of a Large Atrial Septal Defect under Microprobe Transesophageal Echocardiographic

- Guidance. *Echocardiography* 29(4):E94-96, 2012.
- ④ Nakagawa K, Akagi T, Taniguchi M, Kijima Y, Goto K, Kusano KF, Itoh H, Sano S. Transcatheter closure of atrial septal defect in a geriatric population. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 80(1):84-90, 2012.
- ⑤ Itoh H, Ichiba S, Ujike Y, Kasahara S, Arai S, Sano S. Extracorporeal membrane oxygenation following pediatric cardiac surgery: development and outcomes from a single-center experience. *Perfusion* 27(3):225-229, 2012.
- ⑥ Watanabe N, Taniguchi M, Akagi T, Tanabe Y, Toh N, Kusano K, Ito H, Koide N, Sano S. Usefulness of the right parasternal approach to evaluate the morphology of atrial septal defect for transcatheter closure using two-dimensional and three-dimensional transthoracic echocardiography. *Journal of the American Society of Echocardiography* 25(4):376-382, 2012.
- ⑦ Sano S, Fujii Y, Arai S, Kasahara S, Tateishi A. Atrioventricular valve repair for patient with heterotaxy syndrome and a functional single ventricle. *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery, Pediatric cardiac surgery annual* 15(1):88-95, 2012.
- ⑧ Sano S. Editorial Comment: Does the shunt type determine midterm outcomes after a Norwood operation? *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 42(2):216-217, 2012.
- ⑨ Fujii Y, Sano S, Asou T, Imoto Y, Oshima Y, Kawasaki S, Kishimoto H, Sakamoto K, Maeda M, Yamagishi M, Matsuo K. Outcomes of one-lung fontan operation: a retrospective multicenter study in Japan. *Annals of Thoracic Surgery* 94(4):1275-1280, 2012.
- ⑩ Sano S. Japanese congenital heart surgery is almost the same level of Europe and North America. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* 113(3):288-291, 2012.
- ⑪ Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sata Y, Mizuno M, Kamiya A, Shishido T, Inagaki M, Shirai M, Sano S, Sugimachi M. Medetomidine, an α 2-adrenergic agonist, activates cardiac vagal nerve through modulation of baroreflex control. *Circulation Journal* 76(1):152-159, 2012.
- ⑫ Fujii Y, Kasahara S, Kotani Y, Takagaki M, Arai S, Otsuki S, Sano S. Double-barrel Damus-Kaye-Stansel operation is better than end-to-side Damus-Kaye-Stansel operation for preserving the pulmonary valve function: the importance of preserving the shape of the pulmonary sinus. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Jan;141(1):193-9.
- ⑬ Kotani Y, Ishino K, Honjo O, Sano S. Fontan completion in patient with pulmonary artery sling associated with hypoplastic left heart syndrome. Kotani Y, Ishino K, Honjo O, Sano S. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010 Jul;140(1):e12-3.
- ⑭ Miyahara Y, Kasahara S, Ishino K, Sakurai S, Sano S. Successful Fontan completion in a patient with noncompaction myocardium. *J Thorac*

Cardiovasc Surg. 2010 Apr;139(4):e85-7.

- ⑮ 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.* 2011 Aug 10

- ⑯ 佐野俊二、笠原真悟、新井禎彦、岩崎達雄、森田 潔、伊藤英史 心臓手術の実際 第22回 大動脈縮窄症・大動脈弓離断症に対する手術と体外循環法 - Clinical Engineering23(2):151-159, 2012.

- ⑰ 佐野俊二 日本の心臓・大血管外科レベルは欧米を超えているか? 5. 先天性心疾患 日本外科学会雑誌 113(3):288-291,2012

- ⑱ 佐野俊二、笠原真悟、藤井泰宏 第9章 先天性心疾患の最新治療 3. Ebstein 奇形の外科治療 先端医療シリーズ 43 循環器疾患の最新医療 pp137-139, 2012

- ⑲ 佐野俊二 世界における循環器専門医 オーストラリアの循環器医の現状 循環器専門医 20(1):162-166, 2012.

- ⑳ 佐野俊二 IV. 成人期の先天性心疾患の治療 2.手術 (2) 再手術の時期と問題点 新・心臓病診療プラクティス 18 大人になった先天性心疾患, 2012

2. 学会発表

- ① Sano S. Imagination and innovation cross the ocean -from Sano Operation to stem cell therapy. The 22nd Annual Robert E. Gross Memorial Lecture.

- ② Sano S. Hybrid procedure in congenital heart disease. China Heart Congress 2012.

- ③ Sano S. RV-PA shunt as a first stage palliation for hypoplastic left heart syndrome -Recent Evolution-. The 4th Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society.

- ④ Sano S. Hypoplastic Left Heart Syndrome: from stem cell therapy to new clinical pathways. Grand Rounds UW Pediatric Cardiac Surgery.

- ⑤ Sano S. Repair of ebstein's anomaly in neonates and small infants: impact of right ventricle exclusion. 26th EACTS Annual Meeting.

- ⑥ Sano S. Management of atrioventricular valve regurgitation in single ventricle repair. 22nd Annual Congress of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of ASIA.

- ⑦ Sano S. Recent development of neonatal heart surgery. The 4th National Congress of Cardiovascular and Thoracic Surgery.

- ⑧ Sano S. Hypoplastic Left Heart Syndrome: from stem cell therapy to new clinical pathways. Seminar at Wisconsin Pediatric Hospital.

- ⑨ Sano S. My concept in postoperative care for pediatric cardiac surgical patient: Milrinone as a sole cardiac drug. The Society of Thoracic Surgeons of Thailand 27th Annual Meeting.

- ⑩ Sano S. Sano Operation. The 9th International Congress of Update in Cardiology and Cardiovascular Surgery.

- ⑪ Sano S. Surgical treatment of congenital mitral valve disease. 2012 AATS MITRAL CONCLALVE WORK SHOP.

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし。

1. 特許取得

3. その他

該当なし。

該当なし。

2. 実用新案登録

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、心臓内幹細胞から直接リプログラミング法を用いてヒト成熟心筋細胞を作製することで新たな心筋再生医療を開発することである。

A. 研究目的

心不全死は成人および小児にかかわらず、常に上位を占める死因である。重症度が高い症例においては、人工心臓ならびに心臓移植が集約的な選択枝となるが、医療コストと臓器提供者などの複合的な要因で、すべての適応症例にこれらの治療法が行き届くわけではない。

心筋再生医療法の研究開発は、このような社会背景のもとに、次世代の治療法として開発が進められ、大きな期待もされている。一方、多くの基礎研究の成果から、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ことが明らかにされてきた。

2010年にマウスの心臓内線維芽細胞に対し、

GATA4, Tbx5, Mef2C の遺伝子導入によるマウス人工心筋細胞 (iCM) に向けた直接分化誘導法が報告され、複数の心筋に必須な転写因子群の細胞内導入によって、異なった細胞系統から直接心筋細胞にリプログラミングできることが明らかにされた。しかしながら、再生医療に用いることが可能な人工ヒト心筋細胞の作成はいまだ報告がない。

本研究では、最も心筋細胞への系統譜に近いヒト心臓幹細胞を用いて、上記の3因子に加え、成熟心筋細胞の作製に必要な不可欠な直接心筋リプログラミング法の確立をめざす。

B. 研究方法

1. ヒト心臓内幹細胞から成熟心筋細胞への直接リプログラミング

成熟心筋細胞への直接リプログラミング法は、従来報告されたGATA4, Tbx5, Mef2Cの遺伝子導入法を用いて検討し、対象とする細胞をより心筋細胞の系譜に近い心臓内幹細胞を用いる。導入前の幹細胞を経時的に可視化するためリポーター遺伝子として、eGFPをレンチウイルスシステムにて細胞内に導入する。細胞の分化後の特性判定に対応して、リポーター遺伝子を制御するプロモーターとして、全細胞を可視化するPGKと心筋細胞のみを選択的に判別するalpha-MHCプロモーターの2種類を使い分ける。

心筋細胞への分化誘導の効率を向上させるため、ラット新生児心筋細胞との共培養実験も同時に進める。また、共培養後の細胞間融合による心筋分化の判定を容易にするため、ラット心筋細胞培養液を10%に希釈した培養血清で、3因子導入した心臓内幹細胞を一定期間培養し効果判定を行う。

人工心筋細胞の分化および成熟性については、各種心筋構造タンパクの定量的RT-PCRや免疫組織染色で判定し、さらに細胞機能評価として、カルシウムの取り込みや各種イオンチャンネルの遺伝子発現形態について定量的に検証する。

2. 複合多因子群の遺伝子導入による系統誘導の効率化

GATA4, Tbx5, Mef2C以外の直接リプログラミング因子群の候補として、近年マウスの実験や本研究室での疾患特異的iPS細胞用いた網羅的遺伝子解析として、Myocardin, Hand2, mir-1, mir-133が挙げられている。当初3因子法による心筋系統誘導実験が進まないときには、上記の4因子群を併用した合計7因子群を用いた細胞性質改変法に切り替えて実験を進めていく。

(倫理面への配慮)

1. ヒト心臓組織の入手は、外部委員を含めた岡山大学倫理委員会にて審査承認されたプロトコル（承認 766 号）に従順し、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、患者さんの同意のもと不要となった余剰組織を研究開発に使用する。同意した文書は体組織の採取直前まで患者さんの意思によって任意撤回できるよう、患者さんの人権尊重を第一とする。
2. 個人情報の保護を最優先し、ヒト組織の取り扱いに関する資料の提出及び調査には積極的に協力する。また、提供していただいたヒト組織は幹細胞の分離のみに全て使用し、遺伝子解析等をはじめとする倫理委員会で承認されていない研究目的には一切使用しない。
3. 遺伝子組み換え実験（承認 9068 号）やレトロ及びレンチウイルスの感染は P2 レベルの実験室で行い、移植された動物は隔離した遺伝子操作動物管理施設にて飼育を行う。
4. 動物実験計画書（承認 389 号）に従い、動物施設への実験動物の導入に当たっては、必要に応じて適切な検疫、隔離飼育等を行うことにより、実験実施者、飼養者及び他の実験動物の健康を損ねることのないように講じる。
5. マウス及びラットの使用実験は、動物愛護の条約精神に則り、動物を適切な麻酔下で手術及び移植行為を行う。心標本の取り出し等の状況においても、動物の安楽死を最重要事項として守り、動物の虐待を避ける。
6. 実験動物の生理、生態、習性等に応じ、かつ、実験等の目的の達成に支障を及ぼさない範囲で、適切に給餌及び給水を行うこと。

C. 研究結果

最もヒト成熟心筋細胞の系譜に近いヒト心臓内幹細胞にGATA4, Tbx5, Mef2Cの3因子を遺伝子導入後、2~4週目にかけて細胞の心筋分化形態について心筋構造タンパクであるalpha-MHCプロモーター制御下でのeGFPの蛍光発色度に関してFACSで定量した。3因子導入後2週目より約5%のヒト心筋細胞分化が観察され、この現象は4週目にかけて徐々に増加し、最大で10%前後のヒト心筋細胞分化を確認した。

マイクロアレイによる包括的遺伝子解析では、3因子による直接リプログラミング法では、心筋分化過程においてMyH6, actinin, MyL7, NPPA, TPM1, TNNTといった心筋構造タンパクの発現上昇を有意に認めた。一方、心筋収縮に重要なカルシウムの取り込みの指標であるPLN, CASQ2, ATP2A2, RYR2といったカルシウム動態に関する調節タンパクは成熟心筋細胞に比べ、基準レベルまで到達していないことが明らかとなった。

また、心臓組織由来の全細胞のうち、成熟心筋細胞は酵素消化により死滅するが、初期培養のうち、生存しうる細胞種として、心臓内幹細胞と心臓内線維芽細胞でその多くを占めていた。そこで、心臓内幹細胞を幹細胞特異的認識抗原であるSIRPA、心臓内線維芽細胞を線維芽細胞固有の表面抗原であるDDR2でそれぞれFACSを用いて純化精製し、3因子の遺伝子導入後における心筋細胞分化度について比較検討した。

ヒト心臓内幹細胞はDDR2陰性でSIRPA陽性細胞であり、心臓内のDDR2陽性細胞はすべて線維芽細胞で構成され、心筋前駆細胞の特徴である各種心筋固有の転写因子（Nkx2.5, GATA4, Hand1, Hand2, Tbx5, Mef2C）はDDR2陰性で

かつSIRPA陽性の心臓内幹細胞において、強く発現していることを確認した。

このように心筋細胞に分化しうるエリート細胞である心臓内幹細胞は心臓内線維芽細胞に比べ、3因子導入後における心筋細胞分化効率において、約5倍高く心筋細胞へ分化するポテンシャルを持っていることが判明した。

D. 考察

従来マウスで報告されたきた心臓内線維芽細胞への複合遺伝子導入法による直接心筋リプログラミングに比べ、より心筋細胞に近い系譜を持つ心臓内幹細胞に同一遺伝子群を導入した方が、高率に人工的ヒト心筋細胞を作製することができることが明らかとなった。

一方、ヒト心臓内幹細胞に対して、GATA4, Tbx5, Mef2Cの3因子導入により、マウスに見られた機能的な作業心筋細胞までの直接再プログラム化まで完全には至っていないものの、複数の成熟心筋細胞で発現がみられる構造タンパクの遺伝子プロファイルが上昇していることから、前駆細胞から心筋細胞に系統誘導が進んでいることが確実である。

しかし、成熟心筋細胞として機能するために必須なカルシウム調節タンパクの発現量は十分でなく、今後、ヒト心臓内幹細胞に対して、Myocardin, Hand2, mir-1, mir-133を取り入れた合計7因子群を用いたヒト心筋細胞への直接リプログラミング法に取り組んでいく予定である。

E. 結論

マウスでは心臓内線維芽細胞にGATA4, Tbx5, Mef2Cの3因子を導入するにより、機能的な心筋細胞に誘導することは可能であるが、ヒト組織では、

心臓内線維芽細胞よりは心筋前駆細胞の方が、同一の3因子群導入法において、高率に心筋細胞への誘導が可能であった。

しかしながら、人工的ヒト心筋細胞の誘導過程は、マウスより制御機構が複雑で、Myocardin, Hand2, mir-1, mir-133といった候補因子群の追加によるより成熟度の高い心筋細胞に誘導する必要性があることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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: Four-year clinical outcomes of the OLIVUS-Ex (impact of Olmesartan on progression of coronary atherosclerosis: evaluation by intravascular ultrasound) extension trial. *Atherosclerosis*. 2012 Jan;220(1):134-8.
- ② Ohta-Ogo K, Hao H, Ishibashi-Ueda H, Hirota S, Nakamura K, Ohe T, Ito H: CD44 expression in plexiform lesions of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pathology International*. 2012 Apr;62(4):219-25.
- ③ Ogawa A, Miyaji K, Yamadori I, Shinno Y, Miura A, Kusano KF, Ito H, Date H, Matsubara H: Safety and efficacy of epoprostenol therapy in pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis. *Circulation Journal*. 2012 Jun 25;76(7):1729-36.
- ④ Fukuda S, Watanabe H, Daimon M, Abe Y, Hirashiki A, Hirata K, Ito H, Iwai-Takano M, Iwakura K, Izumi C, Hidaka T, Yuasa T, Murata K, Nakatani S, Negishi K, Nishigami K, Nishikage T, Ota T, Hayashida A, Sakata K, Tanaka N, Yamada S, Yamamoto K, Yoshikawa J: Normal values of real-time 3-dimensional echocardiographic parameters in a healthy Japanese population: the JAMP-3D Study. *Circulation Journal*. 2012 Apr 25;76(5):1177-81.
- ⑤ Watanabe N, Taniguchi M, Akagi T, Tanabe Y, Toh N, Kusano K, Ito H, Koide N, Sano S: Usefulness of the right parasternal approach to evaluate the morphology of atrial septal defect for transcatheter closure using two-dimensional and three-dimensional transthoracic echocardiography. *Journal of the American Society Echocardiography*. 2012 Apr;25(4):376-82.
- ⑥ Mizoguchi H, Ogawa A, Munemasa M, Mikouchi H, Ito H, Matsubara H: Refined Balloon Pulmonary Angioplasty for Inoperable Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012 Nov 27. [Epub ahead of print]
- ⑦ Takaya Y, Taniguchi M, Akagi T, Nobusada S, Kusano K, Ito H, Sano S: Long-Term Effects of Transcatheter Closure of Atrial Septal Defect on Cardiac Remodeling and Exercise Capacity in Patients Older than 40 Years with a Reduction in Cardiopulmonary Function. *J Interv Cardiol*. 2012 Nov 19. [Epub ahead of print]