

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 マウスの精巢に移植し、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 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)やレトロ口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

Itoh H, Sano S, Pouard P. Pediatric perfusion in Japan: 2010 practice survey. *Perfusion*27(1):72-77, 2012.

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.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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

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.

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

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

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.

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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.

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

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

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。