

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

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.

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.

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.

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.

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.

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]

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]
- Tanabe Y, Oe H, Miyoshi A, Toh N, Ugawa S, Watanabe N, Takagaki M, Sano S, Ito H: Combined Subaortic and Mid-ventricular Obstruction With Significant Aortic Stenosis Diagnosed by Triphasic Doppler Flow Pattern: Multiple Levels of Left Ventricular Outflow Tract Obstruction. *J Am Coll Cardiol.* 2012 Nov 20;60(21):2252.
- Saito Y, Nakamura K, Miyaji K, Akagi S, Mizoguchi H, Ogawa A, Fuke S, Fujio H, Kiyooka T, Nagase S, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Matsubara H, Ohe T, Ito H: Acute vasoreactivity testing with nicardipine in patients with pulmonary arterial hypertension. *J Pharmacol Sci.* 2012 Nov 16;120(3):206-12.
- Osawa K, Miyoshi T, Sato S, Akagi N, Morimitsu Y, Nakamura K, Kohno K, Kusano K, Kanazawa S, Ito H: Safety and Efficacy of a Bolus Injection of Landiolol Hydrochloride as a Premedication for Multidetector-Row Computed Tomography Coronary Angiography. *Circ J.* 2012 Oct 3. [Epub ahead of print]
- Toh N, Nishii N, Nakamura K, Tada T, Oe H, Nagase S, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Ito H: Cardiac dysfunction and prolonged hemodynamic deterioration after implantable cardioverter-defibrillator shock in patients with systolic heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012 Oct 1;5(5):898-905.
- Dan K, Miyoshi T, Ueeda M, Ohtsuka H, Ugawa S, Ohnishi N, Takaishi A, Nakamura K, Kusano K, Ito H: Impact of chronic kidney disease on left main coronary artery disease and prognosis in Japanese patients. *Circ J.* 2012;76(9):2266-72.
- Iwamoto M, Miyoshi T, Doi M, Takeda K, Kajiyama M, Nosaka K, Nakayama R, Hirohata S, Usui S, Kusachi S, Sakane K, Nakamura K, Ito H: Elevated serum adipocyte fatty acid-binding protein concentrations are independently associated with renal dysfunction in patients with stable angina pectoris. *Cardiovasc Diabetol.* 2012 Mar 21;11:26.
- Takaya Y, Taniguchi M, Sugawara M, Nobusada S, Kusano K, Akagi T, Ito H: Evaluation of exercise capacity using wave intensity in chronic heart failure with normal ejection fraction. *Heart Vessels.* 2012 Feb 4. [Epub ahead of print]
- 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. *J Am Soc Echocardiogr.* 2012 Apr;25(4):376-82.
- Taniguchi M, Akagi T, Kijima Y, Ito H, Sano S: Transcatheter closure of a large atrial septal defect under microprobe transesophageal echocardiographic guidance. *Echocardiography.* 2012

Apr;29(4):E94-6.

Take Y, Morita H, Toh N, Nishii N, Nagase S, Nakamura K, Kusano KF, Ohe T, Ito H: Identification of high-risk syncope related to ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. Heart Rhythm. 2012 May;9(5):752-9.

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: Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. Int J Cardiol. 2012 Aug 23;159(2):100-6.

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: Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. Int J Cardiol. 2012 Aug 23;159(2):100-6.

#### 学会発表

1. 草野研吾, 永瀬 聡, 森田 宏, 中村一文, 西井伸洋, 田中正道, 中川晃志, 三浦大治, 伊藤 浩: 電氣的ストームの実態と対処。Brugada 症候群における植込み型除細動器頻回作動に対する抗不整脈薬の長期的効果。第 27 回日本不整脈学会シンポジウム, 横浜, 2012
2. 草野研吾, 永瀬 聡, 森田 宏, 中村一文, 伊

藤 浩, 大江 透: 器質的心疾患に伴う心室性不整脈の特徴と対策。第 60 回日本心臓病学会学術集会シンポジウム, 金沢, 2012

3. 久保元基, 西井伸洋, 永瀬 聡, 草野研吾, 伊藤 浩, 竹中祐樹, 森田 宏: チームで運用するリモートモニタリングの利点、問題点について。第 27 回日本不整脈学会パネルディスカッション, 横浜, 2012
4. Miyoshi T, Nakamura K, Morita H, Kusano K, Ito H: Significance of imidapril in the direct inhibition of matrix metalloproteases in experimental abdominal aortic aneurysm; comparison with losartan. 61th Annual Meeting of American College of Cardiology, Chicago, 2012
5. Nakagawa K, Kijima Y, Kusano K, Ito H, Akagi T: Balloon occlusion test overestimates the risk of acute pulmonary congestion after the transcatheter closure of atrial septal defect in adults. 61th Annual Meeting of American College of Cardiology, Chicago, 2012
6. Morita H, Take Y, Nagase S, Nishii N, Kusano KF, Ohe T, Ito H: Risk stratification by point scoring system based on 12-lead ECG in patients with Brugada syndrome. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
7. Takenaka Y, Nishii N, Kubo M, Nakagawa K, Tanaka M, Nagase S, Morita H, Kusano KF, Ito H: A case of induced ventricular tachycardia by ventricular pacing on T wave due to unusual double blanking. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
8. Kusano KF, Morita H, Nagase S,

- Nakamura K, Ito H: Clinical characteristics and efficacy of oral pharmacological therapy in Brugada syndrome with repeated episodes of ventricular fibrillation. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
9. Nagase S, Tanaka M, Nakagawa K, Morita H, Nishii N, Nakamura K, Kohno K, Kusano KF, Ohe T, Ito H: Prominent J wave or ST-segment elevation in left ventricular epicardium in patients with Brugada syndrome. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
  10. Tokioka K, Kusano K, Morita H, Miyoshi T, Nishii N, Hashimoto K, Nagase S, Nakamura K, Kohno K, Ito H: Inferolateral J wave and fragmented QRS are the independent predictors of ventricular fibrillation in patients with Brugada syndrome. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
  11. Nakagawa K, Nagase S, Tanaka M, Nishii N, Nakamura K, Kohno K, Morita H, Kusano KF, Ohe T, Ito H: Amelioration of inter-ventricular conduction delay of right ventricle improves electrocardiogram from type-1 to type-2 in patients with Brugada syndrome. 33rd Annual Scientific Session of Heart Rhythm Society, Boston, 2012
  12. Nosaka, K, Nakamura K, Kusano KF, Tada, T, Miyoshi, I, Doi, M, Kohno K, Ito H: Serum cystatin C as a biomaker of cardiac diastolic dysfunction in patients with cardiac disease and preserved ejection fraction, European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  13. Osawa K, Miyoshi T, Sato WS, Morita H, Hashimoto K, Nagase S, Kohno K, Nakamura K, Kusano K, Ito H: Impact of visceral abdominal adipose tissue on unstable coronary plaque formation detected by multidetector computed tomography in non-diabetic patients. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  14. Akagi S, Matsubara H, Miyaji K, Ogawa A, Kusano K, Ito H: Impact of dopamine and dobutamine support at the initiation of epoprostenol on short and long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  15. Kubo M, Miyoshi T, Nishii N, Nagase S, Nakamura K, Morita H, Kohno K, Kusano K, Ito H: Endothelial dysfunction in the brachial artery predicts clinical outcome in patients with coronary artery disease undergoing successful percutaneous coronary intervention. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  16. Miyoshi T, Yonezawa T, Doi M, Aoki A, Nakamura K, Hirohata S, Kusachi S, Ninomiya Y, Kusano, K, Ito H: Hyaluronic acid metabolism is increased in human abdominal aortic aneurysm. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  17. Tanaka M, Nakamura K, Miura D, Nakagawa K, Nishii N, Nagase S, Morita H, Kusano K, Yutani C, Ito H: Lymphocytic cell infiltration of myocardium is associated with the episode of ventricular fibrillation in patients with brugada syndrome. European Society of Cardiology Congress,

Munich, 2012

18. Noda Y, Miyoshi T, Oe H, Nakamura K, Morita H, Kohno K, Toh N, Kusano K, Ito H: A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, alogliptin, improves postprandial triglycfemia and postprandial endothelial dysfunction. European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  19. Fuke S, Kusano KF, Akagi S, Tanaka M, Ogawa A, Nagase S, Nakamura K, Sato T, Ito H: Assessment of right ventriculo-pulmonary arterial coupling in patients with pulmonary hypertension, European Society of Cardiology Congress, Munich, 2012
  20. Tanaka M, Nagase S, Nishii N, Nakamura K, Morita H, Kohno K, Kusano K, Yutani C, Ito H: Autopsy case of a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy after failed endo-and epicardial radiofrequency ablation of ventricular arrhythmias originated in RV epicardium. 5th Scientific Session of Asia Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, 2012
  21. Kubo M, Nishii N, Wada T, Tanaka M, Nakagawa K, Nagase S, Morita H, Kusano K, Ito H: Observation of extracellular water excess in woman with PMS by using implantable device. A case report. 5th Scientific Session of Asia Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, 2012
  22. Nishii N, Miyoshi A, Kubo M, Nakagawa K, Tanaka M, Nagase S, Morita H, Kusano K, Ito H: Rising upper limit of ventricular tachycardia zone is useful to avoid inappropriate therapy due to rapid atrial fibrillation, but not due to paroxysmal supra ventricular tachycardia. 5th Scientific Session of Asia Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, 2012
  23. Nagase S, Tanaka M, Nakagawa K, Morita H, Nishii N, Nakamura K, Kohno K, Kusano KF, Ito H: Left ventricular epicardial recordings in patients with J wave syndrome-substrate of arrhythmogenic early repolarization. 5th Scientific Session of Asia Pacific Heart Rhythm Society, Taipei, 2012
- 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。