

201231064B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ヒトiPS細胞を用いた致死的循環器疾患の病態解明と
治療方法の開発に関する研究

平成23年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 湯浅 慎介

平成25（2013）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

ヒトiPS細胞を用いた致命的循環器疾患の病態解明と
治療方法の開発に関する研究

平成23年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 湯浅 慎介

平成25（2013）年 5月

目次

I. 総合研究報告	1
ヒトiPS細胞を用いた致死性循環器疾患の病態解明と 治療方法の開発に関する研究 湯浅慎介	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	5
III. 研究成果の刊行物・別刷	9

ヒトiPS細胞を用いた致死的循環器疾患の病態解明と
治療方法の開発に関する研究

研究代表者 湯浅慎介 慶應義塾大学医学部 講師

研究要旨

我が国における心臓突然死は年間3万～5万人とされ、致死的循環器疾患を早期に診断し、適切な治療方法を開発することが急務である。近年、本邦においてiPS（人工多能性幹細胞）細胞が開発され、疾患解析・新規治療方法の開発が期待されている。iPS細胞は、患者のゲノムに記録されている全ての遺伝情報を受け継いだ多能性幹細胞であり、分化誘導することにより患者の病気表現型を引き継いだ生きたヒト心筋細胞を作製することが可能である。ヒトiPS細胞の一般的な作成方法は皮膚生検を行い、皮膚線維芽細胞を樹立し、レンチウイルスおよびレトロウイルスによりES細胞特異的転写因子の遺伝子導入を行いiPS細胞の樹立を行う。我々は非侵襲的で簡単なヒトiPS細胞の樹立方法を開発する必要があると考え、ヒト末梢血を用いた非侵襲的で簡便なiPS細胞樹立方法を開発し報告してきた。同方法を用いて多くの致死的循環器疾患患者からiPS細胞を樹立し、同iPS細胞由来心筋細胞を用いて、疾患解析系を開発する。また同疾患解析系を用いて、疾患表現型の解析、薬剤への反応を確認することで、多くの致死的循環器疾患を対照にした病態解明と新規治療方法の開発とその臨床応用を行っていく。

A. 研究目的

iPS細胞を用いた致死的循環器疾患の病態解明と新規治療方法の開発は、理論上は既に可能な研究と考えられている。しかしながら、実際は患者の侵襲度の高い皮膚生検の必要性などの点で解決されていない問題があり、当初思われていたように研究は進んでいない。我々の開発したヒト末梢血からのiPS細胞樹立方法の開発により、患者の侵襲度とiPS細胞樹立にかかわる煩雑さは解決された。

iPS細胞を用いた致死的循環器疾患の病態解明と新規治療方法の開発は、世界中で開始されている。致死的循環器疾患としては突然死症候群として知られている心筋イオンチャンネル遺伝子の突然変異による遺伝性QT延長症候群患者およびブルガダ症候群患者よりiPS細胞を樹立し疾患解析を行っている。これらの疾患は根本的な治療方法はなく対処療法を行うことしかできず、突然死を防ぐ根本的な手立てがない。これまでの、これらの疾患解析は遺伝子改変マウスなどの実験動物や変異遺伝子をCHO細胞などに過剰発現させた細胞などを用いた疾患解析が中心であった。患者の心筋細胞で本当に起こっていることが、これらのモデルで本当に再現されているかも不明であった。すなわち適切なヒトの疾患モデルが存在せず、解析手法が無く新規治療方法の開発も期待はされていなかった。しかしながら、これらの患者からiPS

細胞を作製し心筋細胞に分化することで、ヒトの生きた心筋細胞を用いた致死的循環器疾患モデルの構築が可能となり、疾患解析と新規治療方法の開発が可能となる。すなわち疾患特異的iPS細胞を原因遺伝子と表現型の関連を解明するための新たなツールとして用いることで、これまで明らかではなかった病態の発見や創薬につなげることが可能となる。

B. 研究方法

iPS細胞樹立に関して、患者の負担軽減のために我々の開発した末梢血を用いた方法を全例で用いる。ヒト末梢血から分離した単核球細胞を培養皿上でCD3抗体とIL2にてT細胞を刺激し、3～5日間ほど培養するとT細胞は選択的に増殖しコロニーを形成してくる。センダイウイルスは活性化された細胞に選択的に感染・遺伝子導入されるために、同条件ではT細胞に選択的に感染する。患者から採血後、単核球細胞の培養からのT細胞活性化を行い、センダイウイルス感染を経てiPS細胞樹立を行う。本法は手技が単純であり、高い再現性を備えた方法となり、確実に患者iPS細胞を樹立することが可能である。

心筋細胞分化誘導に関しては、ヒトES細胞と同様にヒトiPS細胞も浮遊培養させることで胚様体を形成し、胚様体のまま培養を続けることで1～3週間

で自己拍動を呈する細胞塊が得られる。我々は、これまでに胚様体に機能的な心筋細胞が存在することを証明してきた。拍動する細胞塊を選別し、RT-PCR、免疫染色等により各種心筋マーカー、イオンチャネルの発現と心筋細胞として典型的な形態を有するを確認する。

心筋活動電位の解析としては、拍動する胚様体を*in vitro*多点電位記録システムであるMEAシステムのマルチ電極アレーディッシュに乗せると、1~2日で接着し、底面の電極で細胞外電位を記録することが可能となる。この実験系を用いて、最初に基準状態での細胞外電位を計測し健常コントロールと比較し、患者に存在する疾患が*in vitro*において再現されているかを解析する。また長時間記録する際にはEADの出現なども観察され、患者ごとに*in vitro*で疾患表現系が再現されるか、あるいはどのような刺激が悪影響を及ぼすかが予測可能であるかを検討していく。

各種薬剤のスクリーニングとして、健常者と遺伝性QT症候群患者由来等の心筋細胞に対して、現在臨床的に用いられている各種薬剤を用いる。MEAシステムを用いて、電気的活動の変化を解析し、有害な変化を起こす薬剤に対して、スクリーニングとなりえるかを確認する。同様に疾患表現形の改善が図れるかを検討し、新薬開発の可能性を探る。続いて、各種抗不整脈薬(Na, Ca, Kチャネルブロッカー)に対する心筋細胞の応答性を解析する。各種抗不整脈薬の反応性により、原因遺伝子の判明していない遺伝性QT延長症候群の原因遺伝子が予想されるために、原因不明の患者に対して用いることにより変異の部位が予想可能かを検討する。遺伝性QT延長症候群1型(LQT1) iPS細胞由来心筋細胞に対してLQT1の原因遺伝子Iksのブロッカーを投与し、同薬剤に対して反応を示していないことを示され、同電流は本患者では機能していないことが確認されている。

C. 研究結果

我々は先天性QT延長症候群1, 2, 3, 7型等の患者からiPS細胞を作製した。各疾患を対象に数人以上、一人の患者当たり10細胞株程度のiPS細胞株を作製し、凍結保存の上で、解析を行っている。これまでに行ってきた研究結果としては、『①患者由来iPS細胞の作製；各細胞株における幹細胞マーカーの発現を免疫染色、RT-PCRにおいて確認。多分化能を奇形腫形成と*in vitro*における三胚葉分化を確認。②患者由来iPS細胞からの心筋細胞分化誘導；分化細胞における各種心筋細胞マーカー

の発現を免疫染色とRT-PCRにおいて確認。③患者由来iPS細胞由来心筋細胞を用いた電気生理学的検討；MEA(Multi-Electrode Array), Patch Clamp法により患者固有の病態(QT延長に相当するMEA上のFPD(Field potential duration)延長、疾患原因のチャネル機能異常の確認)が再現されていることを確認。④同心筋細胞に各種薬剤(カテコラミン、イオンチャネル阻害剤等)を添加し電気生理学的解析を行うことにより、患者固有の病態発症の原因解明(カテコラミンに対する心筋細胞の電気的不安定性の出現または消失、イオンチャネル阻害剤による病態(MEAにより心室性不整脈様の不整脈出現)の改善や増悪)と、新規治療方法の開発』を順次行っている。

D. 考察

ヒトiPS細胞は、様々な致死性循環器疾患を有する患者より、少量末梢血を用いて樹立可能であることが確認できた。また同iPS細胞は心筋細胞に分化誘導可能であり、様々な不整脈疾患の病態表現系が培養皿上で再現され、薬効評価などの各種解析が可能であることを確認した。これまではスクリーニング系構築のための基盤技術の構築を行っており、疾患iPS細胞を用いたドラッグスクリーニングを行い、今後は未知の病態や新規治療法の開発を行っていく。

E. 結論

本研究により、各種遺伝性致死性不整脈疾患の病態はiPS細胞を用いることにより再現可能であることが確認された。また同細胞を用いて、様々な薬剤評価も可能であることが確認された。今後はiPS細胞を用いた評価系により革新的治療方法の開発が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表
(2011年度)
1. Seki T, Yuasa S, Fukuda K, Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. *Nature Protocols*. 2012 Mar 15;7(4):718-28.
2. Maekawa Y, Kawamura A, Yuasa S, Ohno Y, Arai T, Fukuda K. Acute coronary syndrome or apical ballooning syndrome? *Heart Vessels*. 2012 Mar 6.
3. Maekawa Y, Kawamura A, Yuasa S, Nesto R W, Fukuda K. Direct comparison of Takotsubo cardiomyopathy between Japan and USA: 3-year follow-up study. *Intern Med*. 2012;51(3):257-62.
4. Onizuka T, Yuasa S, Kusumoto D, Shimoji K,

- Egashira T, Ohno Y, Kageyama T, Tanaka T, Hattori F, Fujita J, Ieda M, Kimura K, Makino S, Sano M, Kudo A, Fukuda K. Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Mar;52(3):650-9.
5. Maekawa Y, Kawamura A, Furuta A, Yuasa S, Fukuda K. A case of severe aortic stenosis with severe coronary artery disease that was successfully treated by balloon aortic valvuloplasty and percutaneous coronary intervention. *Heart Vessels.* 2011 Nov 11.
 6. Egashira T, Yuasa S, Fukuda K. Induced pluripotent stem cells in cardiovascular medicine. *Stem Cells Int.* 2011;2011:348960. Epub 2011 Oct 2.
 7. Seki T, Yuasa S, Fukuda K. Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral circulating T cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2011 Sep;Chapter 4:Unit4A.3.
 8. Numasawa Y, Kawamura A, Hashimoto S, Endo A, Yuasa S, Maekawa Y, Kuribayashi S, Fukuda K. Successful percutaneous coil embolization of coronary-pulmonary, -carotid, and -internal mammary artery fistulas. *Heart Vessels.* 2011 Jul 7.
 9. Arai T, Kawamura A, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K. Successful coronary intervention of chronic total occlusion of the right coronary artery by ipsilateral injection via an isolated conus artery. *Heart Vessels.* 2011 Jul 2.
 10. Maekawa Y, Kawamura A, Yuasa S, Ohno Y, Arai T, Numasawa Y, Endo A, Fukuda K. Outcomes of Intravascular Ultrasound-Guided Percutaneous Coronary Intervention With Drug-Eluting Stents Versus Bare Metal Stents for Acute Coronary Syndrome in Octogenarians. *Angiology.* 2011 Apr 20.
 11. Hara M, Yuasa S, Shimoji K, Onizuka T, Hayashi N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sano M, Fukuda K. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *J Exp Med.* 2011 Apr 11;208(4):715-27. Hara and Yuasa are equally contributed.
- (2012年度)
1. Okata S, Yuasa S, Yamane T, Furukawa T, Fukuda K. The generation of induced pluripotent stem cells from a patient with KCNH2 G603D, without LQT2 disease associated symptom. *J Med Dent Sci.* 2013 ; 60 : 17-22.
 2. Numasawa Y, Kawamura A, Kohsaka S, Takahashi M, Endo A, Arai T, Ohno Y, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K. Anatomical variations affect radial artery spasm and procedural achievement of transradial cardiac catheterization. *Heart Vessels.* 2013 Feb 21.
 3. Egashira T, Yuasa S, Fukuda K. Novel insights into disease modeling using induced pluripotent stem cells. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(2):182-8.
 4. Arai T, Yuasa S, Miyata H, Kawamura A, Maekawa Y, Ishikawa S, Noma S, Inoue S, Sato Y, Kohsaka S, Fukuda K. Incidence of periprocedural myocardial infarction and cardiac biomarker testing after percutaneous coronary intervention in Japan: results from a multicenter registry. *Heart Vessels.* 2012 Dec 29.
 5. Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Stem Cell.* 12, 1–11, January 3, 2013.
 6. Nishiyama T, Kaneda R, Ono T, Tohyama S, Hashimoto H, Endo J, Tsuruta H, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Fukuda K. miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Sep 7;425(4):755-61.
 7. Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y, Yamakawa H, Matsuhashi T, Ohno Y, Tohyama S, Okata S, Seki T, Kuroda Y, Yae K, Hashimoto H, Tanaka T, Hattori F, Sato T, Miyoshi S, Takatsuki S, Murata M, Kurokawa J, Furukawa T, Makita N, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K. Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res.* 2012 Sep 1;95(4):419-29.
2. 学会発表
(2011年度)
1. Yuasa S: Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. Kuopio Stem cell Workshop, Kuopio, Finland, September 28, 2011
 2. Yuasa S: Generation of induced pluripotent stem cells from human peripheral blood: less invasive and clinically applicable technique. The 41th Taiwan Society of Cardiology (TSOC) Annual Convention and Scientific Session. Taipei, Taiwan. May 14, 2011
 3. Yuasa S: The establishment of analysis methods and novel therapies for cardiovascular diseases syndrome using human iPS cells. The Japanese Circulation Society. Symposium. Fukuoka. Mar 17, 2012.
 4. Yuasa S: The establishment of analysis methods for cardiovascular genetic diseases using human iPS cells. Symposium. 第85回日本薬理学会年会. 京都. 2012年3月15日
 5. Yuasa S: Drug evaluation for personalized medicine by using human iPS cells. The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research

Japanese Section. Symposium. Tokyo. December 2, 2011

6. 湯浅 慎介：末梢血最終分化 T 細胞からの iPS 細胞樹立方法の開発、日本臨床免疫学会総会 モーニング教育講演. 東京. Sep 7, 2011
7. Yuasa S: Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Peripheral Blood: Less Invasive and Clinically Applicable Technique. The Japanese Circulation Society. Symposium. Yokohama. August 4, 2011.
8. 湯浅 慎介：iPS 細胞時代に向けた心筋再生の現状と展望. 日本動物細胞工学会 2011 年度大会. 東京. 2011 年 7 月 22 日

(2012年度)

1. Yuasa S: iPS 細胞を用いた心臓病疾患モデルの構築と病態解明 Symposium. The 12th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine. Yokohama. Mar 22, 2013.

2. Yuasa S: The Cardiovascular Disease Modeling by using iPS cells. The Japanese Circulation Society. JCS/ISHR joint symposium. Yokohama. Mar 16, 2013.
3. Yuasa S: The cardiovascular Disease modeling by using iPS cells. The 29th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese section. Fukuoka. Symposium. Oct 27, 2012.
4. Yuasa S: Disease modeling using iPS cells. The 60th annual scientific session of the Japanese college of cardiology. Kanazawa. Panel discussion. Sep 16, 2012.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
湯浅慎介	臨床応用へ向けたiPS細胞樹立方法の開発	呼吸と循環	Vol.60, No.5	459-463	2012年
湯浅慎介	AHA2011学会聴講記	International Review of Thrombosis	Vol.7, No.1	74-76	2012年
湯浅慎介	患者特異的iPS細胞による疾患メカニズムの解明	Annual Review of Circulation		49-53	2012年
湯浅慎介、福田恵一	炎症細胞が作り出すニッチと筋肉再生	実験医学増刊号	Vol.29 No.10	198-203	2011年
Seki T, <u>Yuasa S</u> , Fukuda K	Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus.	Nature Protocols	7(4)	718-28	2012年
Maekawa Y, Kawamura A, <u>Yuasa S</u> , Ohno Y, Arai T, Fukuda K.	Acute coronary syndrome or apical ballooning syndrome?	Heart Vessels	2012 Mar 6		2012年
Maekawa Y, Kawamura A, <u>Yuasa S</u> , Neakotsubo RW, Fukuda K.	Direct comparison of Thrombotic cardiomyopathy between Japan and USA	Intern Med.	51(3)	257-62.	2012年
Onizuka T, <u>Yuasa S</u> , Kusumoto D, Shimizuji K, Egashira T, Ohno Y, Kageyama T, Tanaka T, Hattori F, Fujita J, Ieda M, Kimura K, Makino S, Sano M, Kudo A, Fukuda K.	Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway.	J Mol Cell Cardiol.	52(3)	650-9.	2012年

Maekawa Y, Kawamura A, Furuta A, <u>Yuasa S</u> , Fukuda K.	A case of severe aortic stenosis with severe coronary artery disease that was successfully treated by balloon aortic valvuloplasty and percutaneous coronary intervention.	Heart Vessels.	2011 Nov 11.		2011年
Egashira T, <u>Yuasa S</u> , Fukuda K.	Induced pluripotent stem cells in cardiovascular medicine.	Stem Cells Int.	2011:3489-60.		2011年
Seki T, <u>Yuasa S</u> , Fukuda K.	Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral circulating T cells.	Curr Protoc Stem Cell Biol.	Chapter 4: Unit4A.3.		2011年
Numasawa Y, Kawamura A, Hashimoto S, Endo A, <u>Yuasa S</u> , Maekawa Y, Kuriyama S, Fukuda K.	Successful percutaneous coil embolization of coronary-pulmonary, -carotid, and -internal mammary artery fistulas.	Heart Vessels.	2011 Jul 7		2011年
Arai T, Kawamura A, <u>Yuasa S</u> , Maekawa Y, Fukuda K.	Successful coronary intervention of chronic total occlusion of the right coronary artery by ipsilateral injection via an isolated conus artery.	Heart Vessels.	2011 Jul 2		2011年
Maekawa Y, Kawamura A, <u>Yuasa S</u> , Ohnishi Y, Arai T, Numasawa Y, Endo A, Fukuda K.	Outcomes of Intravascular Ultrasound-Guided Percutaneous Coronary Intervention With Drug-Eluting Stents Versus Bare Metal Stents for Acute Coronary Syndrome in Octogenarians.	Angiology.	2011 Apr 20.		2011年
Hara M, Yuasa S, Shimizu K, Onizuka T, Hayashiji N, Ohno Y, Arai T, Hattori F, Kaneda R, Kimura K, Makino S, Sanjo M, Fukuda K.	IG-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation.	J Exp Med.	208(4)	715-27	2011年
湯浅慎介	iPS細胞を用いた心臓再生医療の現状と未来	血管医学	Vol.14 No.1.	71-74	2013年
湯浅慎介	iPS細胞を用いた循環器疾患モデル構築とその応用	週刊医学の歩み		In press	2013年
湯浅慎介	iPS細胞を用いた循環器疾患モデル構築	最新医学	68巻7号	In press	2013年

湯浅慎介	iPS細胞を用いた循環器診療はどこまで進んだか？	CIRCULATION Up-to-Dat	Vol.8 No.2.	76(188)-81(193)	2013年
Okata S, Yuasa S, Yamane T, Furukawa T, Fukuda K.	The generation of induced pluripotent stem cells from a patient with KCNH2 G603D, without LQT2 disease associated symptom.	J Med Dent Sci.	60	17-22	2013年
Numasawa Y, Kawamura A, Kohsaka S, Takahashi M, Endo A, Arai T, Ohno Y, Yuasa S, Maekawa Y, Fukuda K.	Anatomical variations affect radial artery spasm and procedural achievement of transradial cardiac catheterization.	Heart Vessels	2013 Feb 21.		2013年
Egashira T, Yuasa S, Fukuda K.	Novel insights into disease modeling using induced pluripotent stem cells.	Biol Pharm Bull.	36(2)	182-8	2013年
Arai T, Yuasa S, Miyata H, Kawamura A, Maekawa Y, Ishikawa S, Nomura S, Inoue S, Satou Y, Kohsaka S, Fukuda K.	Incidence of periprocedural myocardial infarction and cardiac biomarker testing after percutaneous coronary intervention in Japan: results from a multicenter registry.	Heart Vessels	2012 Dec 29.		2012年
Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hisahiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Murakawa N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K.	Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes.	Cell Stem Cell	12	1-11	2013年
Nishiyama T, Kaneda R, Ono T, Tohyama S, Hashimoto H, Endo J, Tsuruta H, Yuasa S, Iweda M, Makino S, Fukuda K.	miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish.	Biochem Biophys Res Commun	425(4)	755-61	2012年

<p>Egashira T, Yuasa S, Suzuki T, Aizawa Y, Yamakawa H, Matsuhashi T, Ohno Y, Tohyama S, Okata S, Seki T, Kuroda Y, Yae K, Hashimoto H, Tanaka T, Hattori F, Sato T, Miyoshi S, Takatsuki S, Murata M, Kurokawa J, Furukawa T, Makita N, Aiba T, Shimizu W, Horie M, Kamiya K, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K.</p>	<p>Disease characterization using LQTS-specific induced pluripotent stem cells.</p>	<p>Cardiovasc Res</p>	<p>95(4)</p>	<p>419-29</p>	<p>2012年</p>
---	---	-----------------------	--------------	---------------	--------------

特集

iPS 細胞を用いた心臓病の診断と治療

臨床応用へ向けた iPS 細胞樹立方法の開発

湯浅 慎介

呼吸と循環

第60巻 第5号 別刷

2012年5月15日 発行

医学書院

臨床応用へ向けた iPS細胞樹立方法の開発*

湯浅 慎介^{1,2}

はじめに

2006年に人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS cell)の樹立が初めて報告された¹⁾。最初の報告はマウスを用いたものであり、ヒトiPS細胞の樹立が可能となるまでにはかなりの時間が必要なのではないかと考えられていた。しかしながら、翌2007年にはヒトiPS細胞の樹立が報告され²⁾、間もなく世界中で爆発的にヒトiPS細胞研究が進み始めた。iPS細胞が発明されるまでは、再生医療を目的とした幹細胞利用という点では胚性幹(embryonic stem; ES)細胞や様々な成体幹細胞があった³⁾。成体幹細胞は大人の体内にある幹細胞であり、再生医療目的に用いる際には自分の体から採取可能であり倫理的問題が少ない。しかしながら、成体幹細胞は存在する細胞数が少ないこと、増殖能が低いこと、分化能が限られていることなどにより思うように臨床応用が進んでいなかった。一方でES細胞は、増殖能や多分化能は非常に優れているが、ヒトES細胞を採取するにはヒトの初期胚を使う必要があることなどによる倫理的問題に加えて、移植した際には免疫学的拒絶という大きな問題がつきまどっていた。しかしながら、ES細胞が持つ多くの可

能性から、心筋細胞分化などの基礎研究が着実に進んでいた^{4,5)}。また、幹細胞としての能力はiPS細胞はES細胞とほぼ同様とされているために、これらのES細胞を用いた研究の知見はiPS細胞研究に応用可能である。

当初のiPS細胞研究の世界的な流れは、基礎的なiPS細胞の解析や新規樹立方法の開発に重点が置かれていた。現在iPS細胞の臨床応用として最も期待されているものは、再生医療への応用である⁶⁾。様々な疾患によって臓器障害に陥った際には、各臓器で機能細胞が減ってくるのが知られている。そのような傷害された臓器に対してiPS細胞由来の元気な分化成熟細胞を移植することにより再生医療を開発しようとする試みがなされている。現在のヒトiPS細胞を用いた再生医療開発の取り組みとしては、効果的な細胞移植医療の開発と移植細胞の長期的な安全性の検証などが活発に試みられている。すなわち、通常の薬剤開発と同様に安全性と効果を確認している段階である。

一方で、遺伝性疾患の病態解明と新規治療方法の開発に向けた、疾患モデル作製としてのiPS細胞研究は既に広く使われ始めている。すなわち、遺伝性疾患の患者に皮膚生検を行うことにより得られた皮膚組織より線維芽細胞の樹立を行い、

* The Development of iPS Cell Generation Methods for Clinical Application

¹ 慶應義塾大学医学部循環器内科(〒160-8582 東京都新宿区信濃町35) Shinsuke Yuasa: Department of Cardiology, Keio University School of Medicine

² 同 総合医科学研究センター Center for Integrated Medical Research, Keio University School of Medicine

iPS細胞樹立に向けてリプログラミング因子の遺伝子導入を行うことでiPS細胞樹立を行う。このようにして樹立されたiPS細胞は患者のゲノムにコードされた全ての遺伝情報を受け継いでいるために、遺伝性疾患の原因遺伝子も受け継いでいる。このiPS細胞を用いることにより、心筋症などの患者からiPS細胞を樹立し心筋細胞を分化誘導することにより、病気のヒト心筋細胞が*in vitro*で容易に作れるようになる。さらに、この病気のヒト心筋細胞を分子生物学的、生理学的に解析することにより、未解決だった病気の原因解明や、同細胞を用いたドラッグスクリーニングなどにより新規治療方法の開発ができるのではないかと考えられ、活発に研究が行われている。

臨床応用へ向けた 新規iPS細胞樹立方法の確立の必要性

このように様々な可能性を有するiPS細胞であるが、実際に臨床応用を念頭に研究を始めると、問題点が幾つか残されていることに気が付く。その一つは、ヒトiPS細胞樹立方法として最初に開発された方法であり、現在世界中で最も一般的となっている方法であるが、iPS細胞を樹立する際に皮膚生検から線維芽細胞を樹立することである。当初、われわれは皮膚生検をすることに抵抗を覚え、実際に広く臨床に応用していくためには皮膚生検を含む問題点を解決する必要があるということを考えさせられた。

ヒトiPS細胞の一般的な作り方を概説する。①皮膚生検を行い、同組織から線維芽細胞を樹立する。②線維芽細胞に対して、レトロウイルスを初めとした遺伝子の運び屋を用いてOct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycという山中教授が発見した幹細胞リプログラミング因子の遺伝子導入を行う。③ヒトES細胞の生存の条件(feeder細胞上でbFGFなどを含む培地)で、培養を続ける。④皮膚生検をしてから約2カ月で最初のiPS細胞コロニーが出現し、同単一コロニーを分離し増やして用いる。非常に再現性が高い方法であり世界中の標準的な方法となりつつあるものである。ここでわれわれが考えた解決すべき問題点を上記の順番に沿って説明していく。

1. 皮膚生検

皮膚生検は一般的に手術などに比べると極めて侵襲性が低いものであるとされている。消毒、麻酔、生検、縫糸、感染予防、抜糸が順次行われていく。皮膚生検といえども手術に準じたものであり、患者の痛み、僅かながらのリスクそして傷跡の問題などがある。特に子供や女性では痛みや傷跡の問題は避けなければならないものであると考えられる。再生医療や疾患解析などのいかなる目的であっても、iPS細胞を広く臨床応用するためには侵襲性が低く採取できる患者検体からiPS細胞を樹立する方法を開発する必要があると考えられる。

2. 遺伝子の運び屋

iPS細胞を作るためには元の細胞(線維芽細胞など)に対して遺伝子導入を行う必要がある。最も一般的な遺伝子導入方法としてレトロウイルスを用いる方法がある。レトロウイルスは宿主細胞に感染し、ゲノムへ挿入をし外来遺伝子を安定発現することが知られている。その安定した外来遺伝子の発現調節から、様々な基礎研究で非常に有益なツールとなっており、また一部の臨床研究でも使われてきた。しかしながら、外来遺伝子がゲノムへ挿入されてしまうこと自体に臨床応用へ向けては不安が残る材料となってしまう。iPS細胞を作るために用いる遺伝子の一部にはoncogeneとして知られているものを用い、将来的に移植する可能性がある細胞のゲノムへ挿入されることは気が進まない。また、oncogeneなどのように有害であることが知られていない遺伝子であったとしても、ゲノムへ挿入されること自体が、内在性の遺伝子発現調節を狂わせる可能性もあり、再生医療による移植後の長期的な安全性を担保するためには避けるべきであろう。すなわち、遺伝子がゲノムへ挿入される方法は回避するべきであると考えられる。

3. iPS細胞培養条件

ヒトiPS細胞の培養条件はヒトES細胞の培養条件と同様であり、ヒトiPS細胞を維持するためにはfeeder細胞が必要である。feeder細胞は、一部の細胞株やMEF(マウス胎仔線維芽細胞)を用いる。いくつかの報告では、feeder細胞の代

替条件があるが、代替条件の多くは培養にかかる費用が顕著に高くなる。現実的に誰でも気楽に用いるためには技術革新が望まれる分野である。

4. 樹立にかかる期間

ヒト iPS 細胞を作るには皮膚生検から約 2 カ月を要す。実際そのうち数週間を線維芽細胞の樹立に充てて、残りの期間で遺伝子導入から、iPS 細胞樹立を行っている。2 カ月という期間は決して短い期間とは言えず、短縮していく必要がある。

ヒト iPS 細胞は可能性を多く含むものであるが、当初に開発された方法は、実臨床で日常的に、容易に行えるものではない。無限の可能性のある iPS 細胞を、より広い目的で使用するために、より非侵襲的で簡便な iPS 細胞樹立方法を開発する必要があると考えた。

非侵襲的な iPS 細胞樹立方法の開発に向けて

われわれは、まず非侵襲的に採取できる組織を探索することとした。様々な細胞が iPS 細胞になり得ることが報告されていたが、その多くの細胞が決して非侵襲的に採取できるという細胞ではなかった。そのなかで非侵襲的な組織として、毛包に存在するケラチノサイトから iPS 細胞が樹立できることも報告されていた。われわれは、これらの報告を含めて様々な細胞種でヒト iPS 細胞を樹立しようと試みたが、非侵襲的に採取できる細胞種からの iPS 細胞樹立は困難であった。次に、われわれはヒトの末梢血に着目した。末梢血は日常的に血液検査で得ることが可能であり、最も侵襲性が少なく患者検体を得る方法の一つであると考えられる。iPS 細胞を樹立するために用いる細胞としては、ある程度増殖能を有する必要がある。また、様々な基礎的な検討の結果、ヒト末梢血中に存在する T リンパ球に着目することとした。末梢血中の最終分化 T 細胞は抗 CD3 抗体、インターロイキン 2 (IL2) の存在下で容易に活性化し、増殖させることが可能であることが知られていた。

次にわれわれは遺伝子の運び屋として、様々な方法を検討した。当初は最も一般的な方法としてレンチウイルスとレトロウイルスを用いる方法を検討していた。しかしながら、これらのウイルス

はゲノムへ挿入するために、ゲノムを傷つけてしまい、長期的安全性が担保されない。そこでわれわれは別の運び屋としてセンダイウイルスを用いることとした。センダイウイルスは(-)鎖 RNA ウイルスであり、感染効率が比較的高く、ゲノムへの挿入がないウイルスとして知られている。

ヒト末梢血からの iPS 細胞樹立方法の開発⁷⁾

当初の検討からヒト末梢血 T 細胞は従来の iPS 樹立法で用いるレトロウイルスでは感染効率も不十分であり、iPS 細胞樹立が困難であった。そこでわれわれは、センダイウイルスと末梢血から得られる活性化 T 細胞を組み合わせることにした。その結果、活性化 T 細胞に対して green fluorescent protein (GFP) を運ぶセンダイウイルスは極めて高効率で感染することが確認された。続いて iPS 細胞を作るためのリプログラミング因子を運ぶセンダイウイルスを活性化 T 細胞へ感染させると約数週間でヒト ES 細胞様コロニー、すなわち T 細胞由来 iPS 細胞が出現してくることが観察された(図 1)。さらにこの方法で樹立された iPS 細胞では qRT-PCR 法によって、細胞内にセンダイウイルス由来の導入因子の残存がないことが確認された。

われわれが樹立した末梢血 T 細胞由来 iPS 細胞は ES 細胞、従来の線維芽細胞由来 iPS 細胞と同様に未分化マーカーの発現が認められた。また、奇形腫形成能および、*in vitro* (培養皿上)での三胚葉由来組織へ分化することを免疫染色にて確認し、末梢血 T 細胞由来 iPS 細胞の多分化能を確認した。

また、末梢血 T 細胞由来 iPS 細胞が本当に T 細胞由来であることの検討をした。末梢血中に存在する T 細胞は最終分化 T 細胞であり、抗原認識をして免疫を担当している細胞である。すなわち、成熟 T 細胞の細胞膜上に存在する T 細胞受容体により様々な抗原を認識して、各種免疫反応を来している。個々の T 細胞は様々な抗原に対応するように、B 細胞の抗体産生と同様に T 細胞受容体がゲノムレベルで再構成をして、その多様性を獲得している。すなわち、発生・分化に伴いゲノムでの T 細胞受容体の遺伝子内に再構成

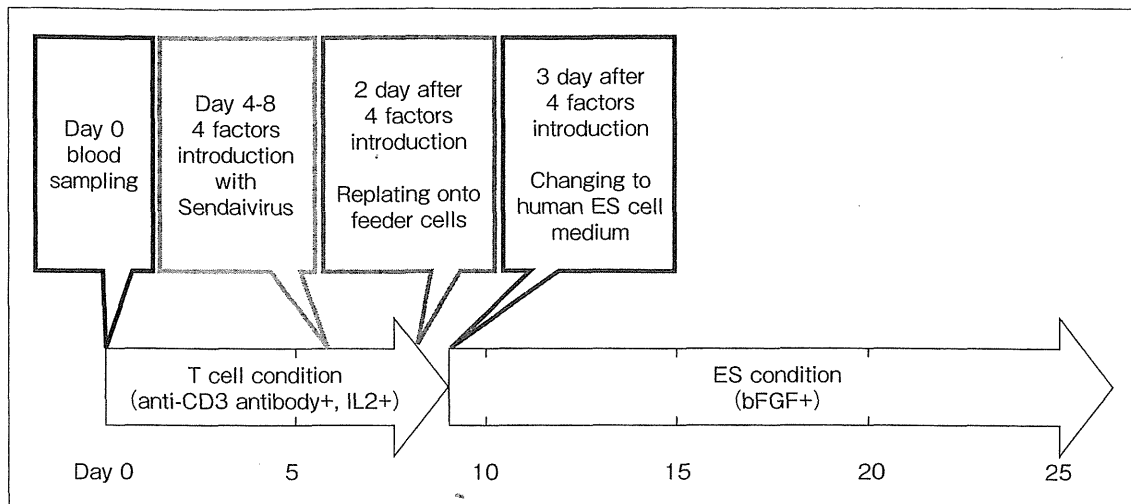


図1 ヒト末梢血採取からiPS細胞作製までの時間経過

が行われ胸腺で教育されることにより，その結果一つのT細胞あたり，ある特定の抗原に反応する一つのT細胞受容体が発現するようになる．T細胞受容体の再構成の有無はT細胞由来iPS細胞のゲノムを調べることで判明する．T細胞受容体遺伝子のゲノムでの再構成が行われていた場合には，そのiPS細胞は成熟T細胞由来であると言える．しかしながら，T細胞受容体の再構成が認められなければ，T細胞由来ではないということが分かる．われわれはT細胞由来iPS細胞におけるT細胞受容体のゲノム再構成を調べた結果，全てのT細胞由来iPS細胞においてT細胞受容体のゲノム再構成が認められ，T細胞由来iPS細胞がT細胞由来であることが確認された．また，将来的にiPS細胞由来成熟細胞を用いて細胞移植を行う際に，移植細胞が腫瘍などを形成した際の判別として，レシピエントの細胞と区別できるようにする必要がある．従来のレトロウイルスを用いたiPS細胞の樹立方法ではゲノムへの遺伝子挿入がこの役割を果たすと考えられるが，逆にゲノムへの遺伝子挿入自体が癌化リスクとなることが危惧されるため，現実的ではない．また，動物実験ではGFPなどの蛍光蛋白を移植前に遺伝子導入しておいて，移植後に観察する方法がよくとられる．しかしながら，遺伝子導入そのものが好ましくないのは前述のとおりであり，ヒトへの応用の際には用いることができない．しかしわれわれの方法では，成熟T細胞は

分化の過程でT細胞受容体領域に遺伝子再構成が起きるため，これを用いてiPS細胞由来の移植細胞をレシピエントの細胞から区別することが可能である．実際にわれわれは，T細胞由来iPS細胞を免疫不全マウスに移植し奇形腫を形成し，数カ月後に採取してゲノムの再構成を検討した．その結果，奇形腫のゲノムにおいて，元のT細胞由来iPS細胞と同様のパターンの，T細胞受容体領域にモノクローナルな遺伝子再構成を認めることを明らかにした．また，従来の方法で線維芽細胞の遊出に1カ月ほどの期間を要したが，T細胞の活性化は数日で可能であるため，この期間を狭めることにより，ヒトiPS細胞の樹立にかかる期間を大幅に短縮することに成功した．

おわりに

われわれは，センダイウイルスと末梢血から得られる活性化T細胞を組み合わせることで，ごく少量の血液サンプルからも，ゲノムに外来遺伝子が挿入されずにヒトiPS細胞を効率的に樹立する方法を開発した⁸⁾．非侵襲的な簡便・迅速・高効率なiPS細胞樹立方法を開発することにより，様々な目的での臨床応用を強く推進できると考えている．

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) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872, 2007
 - 3) Fukuda K, Yuasa S: Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res* 98:1002-1013, 2006
 - 4) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, et al: Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotech* 23:607-611, 2005
 - 5) Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T, et al: G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes *in vivo* and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell* 6:227-237, 2010
 - 6) Yuasa S, Fukuda K: Recent advances in cardiovascular regenerative medicine: the induced pluripotent stem cell era. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6:803-810, 2008
 - 7) Seki T, Yuasa S, Oda M, et al: Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7:11-14, 2010
 - 8) Seki T, Yuasa S, Fukuda K: Unit 4A.3 Derivation of induced pluripotent stem cells from human peripheral circulating T cells. In: *Current Protocols in Stem Cell Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2011

学会聴講記

AHA Scientific Sessions 2011

湯浅慎介 Shinsuke Yuasa

慶應義塾大学医学部 循環器内科・総合医科学研究センター

2011年11月にアメリカ合衆国フロリダ州オーランドにて開催された米国心臓協会年次集会に参加してきた。同学会は米国の異なった場所で毎年開催され、循環器の臨床・研究における世界で最も大きな学会である。同学会においては世界中より多くの臨床医ならびに研究者が集まり、大規模臨床試験の最新結果や、個々の最新の研究結果などが発表され、それらの結果を聞くことは循環器内科医にとって最大の関心事である。



写真1 学会場正面玄関

(→ p.7 カラーグラフィック PHOTO 9参照)

米国心臓協会 (AHA, American Heart Association) 年次集会は、最近10年間はオーランド、シカゴ、ダラス、ニューオーリンズで順繰りに開催されている。2011年のAHA年次集会は、米国南東部に位置するフロリダ州オーランドにて開催された。オーランドは日本からの直行便がなく、ダラスやシカゴなどでの乗り継ぎを経て約18時間かかる遠方であるが、温暖な気候とウォルト・ディズニー・リゾートやユニバーサル・スタジオといったアミューズメントパークも多数あり、数ある学会場の中でも人気のある場所である。年次集会は、オーランド国際空港から西に約20 km離れた場所にあるOrange County Convention Centerにて11月12日～16日まで開催された。ちなみに同会場はディズニー・リゾートがある地域まで約15 kmである。

学会の全体的な印象

米国心臓協会年次集会は、冒頭でも述べたように世界で最も大きい循環器領域の学会として知られている。年によって異なるが、総参加人数が30,000人

以上に及ぶこともあり、演題採択率が20%を切る年もあることが知られている。

しかしながら、近年は米国の不況の影響もあり、学会場自体の雰囲気も以前のような華やかさが陰ってきていることが実感されていた。実際に参加人数も年々減ってきており、本年は総参加人数20,000人弱、演題採択率50%弱であった。総発表数がそれほど変わっていないことを考えると、純粋に演題応募が半数以下に減っていると考えられる。

米国医療業界は不況で苦しんでおり、同様に米国の研究者も研究費の獲得に苦しんでいるという話も聞くことから、米国の臨床医および研究者の参加人数自体も減ってきていることが想定される。その一方で、参加人数減少による学会収益の減少や、医療業界の景気悪化による寄付の減少などによるものと考えられるが、米国心臓協会自体も不況に苦しんでいるようである。

年次集会の参加費が年々上昇しており、演題応募に際して課金されるようになり、また以前は演題が採択された参加者には参加費が免除されていたが、現

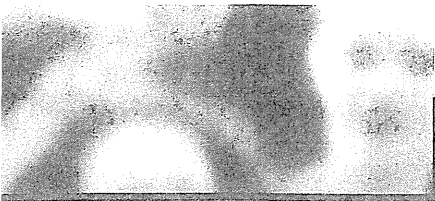


写真2 学会場メインホール

(→ p.7 カラーグラビア PHOTO 10参照)



写真3 学会場の西コンコース前

(→ p.7 カラーグラビア PHOTO 11参照)

在は演題採択者にも参加費が徴収されるようになって
いる。参加費も日本の学会参加費に比べるとかなり高
額であり、お金を払うに値する、より魅力あるものにし
て欲しいものである。

一方で近年は欧州の好景気に押されて欧州心臓
学会議 (ESC, European Society of Cardiology) に人
気が集まっており、総参加者も米国心臓協会年次集
会を上回るようになったが、これも2012年度にはどう
なることか分からない。欧州心臓学会議は米国心臓
協会年次集會に比べると臨床寄りの学会で、基礎研
究に割く時間や場所が少なく、多少趣の異なる学会
であると言える。

大規模臨床試験から

注目の臨床試験としては、メイン会場で発表される数々
のLate-Breaking Clinical Trialsであろう。特に日本で
はまだ使用できない新規薬剤の効果と安全性を大規
模臨床試験で検証している最先端の欧米型医療の
創出は、日本で一般診療に従事していると接する機
会がないため、非常に興味深いものである。以下に
そのいくつかを紹介する。

abciximabは抗血小板薬として開発された血小板
の糖蛋白GP IIb/IIIaの拮抗薬として働くモノクローナ
ル抗体である。本薬剤をST上昇型心筋梗塞に対し



て標準的治療とPCIを施行する際に、冠動脈注射を静脈注射と比較したAIDA STEMI試験が発表された。その結果は、安全ではあるが優位性も示されなかったという発表であった。

また、PCIを施行する非ST上昇型心筋梗塞に対して、abciximabに加えて未分画ヘパリンもしくは直接的トロンビン阻害薬であるbivalirudinの併用による効果を比較したISAR-REACT 4試験が発表された。結果は30日の追跡期間の中で効果には差がないが、出血においてabciximabに加えて未分画ヘパリンを使用した群においてリスクを増大させた。

急性冠症候群において、標準治療としてaspirinとclopidogrel服用下での、新規経口プロテアーゼ活性化受容体1拮抗薬であるvorapaxar追加による効果と安全性を検証したTRACER試験が発表された。追跡期間2年間において、効果に差は認めなかったものの、vorapaxar追加により出血頻度が増すことが示された。また急性冠症候群において、従来の治療法に加えて直接的第Xa因子阻害薬であるrivaroxabanを低容量で追加投与することによる効果と安全性を検証するATLAS ACS 2-TIMI 51が発表された。その結果は、いくつかのエンドポイントでは優位性を示したが、出血のリスクはやはり増すという結果であった。

これらの新規薬剤を用いた大規模臨床試験の結果は、未来の標準治療を決めるものであり、欧米の学会の醍醐味ともいえるものであろう。しかしながら実際には、これらの試験の多くは発表直後に論文発表されることが多く、あえて会場に足を運んで聞く必要

性があるか否かに多少の疑問も残る。また日本においては、新規薬剤の導入にかなり時間がかかるため、たとえ最新の知見を入手しても、日本における実際の医療に応用されるまでの間に新規薬剤の効果や安全性に関する新たな臨床試験の結果が出ることで二転三転してしまうようなことがよくある。

また欧米の薬剤を早期に導入することに関しては賛否両論であり、効果や安全性は多数の臨床試験を経てからでなければわからないということがはっきりしており、また効果が確かでもないのに関わらず欧米の製薬会社の新薬を導入すると、日本の医療費の多くが欧米に流れるようになる。これらのことを考えると、早期に導入し過ぎるよりも、安全性と効果がよりはっきりしてから導入する方が全体としての恩恵は多いのかもしれない。

おわりに

世界的な不況もあり、やや暗い雰囲気のある学会であったため、全体的に否定的な見解を述べてしまったが、現在の我々の置かれている立場を知り、世界の趨勢を知る上で、世界に出ることは必須であり、学会に参加し世界と交流していくことが必要であることは間違いない。今後も米国が世界の中心であり続けることは間違いなく、学ぶ点は多々あるが、まず日本の科学を着実に進歩させるとともに、今後の新興国である中国、インドやブラジル等の今後の動向にも注視していきたい。