

Title	血管網を有する微小心筋組織による心不全治療法の開発
Sub Title	Development of heart failure treatment with micro-cardiac tissues with vascular network
Author	藤田, 淳(Fujita, Jun)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>微小心筋組織作製の最適条件を決定し、酸素供給の重要性および成熟度を確認した。良質な心筋細胞獲得のためにヒトiPS細胞由来心筋細胞の二次元大量培養法を確立した。免疫不全マウスの心臓に移植された心筋組織は長期移植後も大量に生着し血管構築が確認された。また、心筋梗塞モデルの免疫不全ラットに移植された心筋組織は長期移植後も大量に生着し、心機能が有意に改善することを確認した。生着した心筋組織はconnexin43を発現し、有意な致死性不整脈は全く確認されなかった。これらの成果より、高純度なヒト心筋細胞を基盤とした移植微小心筋組織は血管構築を有し、安全かつ効率よく心機能を改善させることが明らかになった。</p> <p>The optimal conditions for preparation of micro-cardiac tissues (MCT) were determined. Their maturity and the importance of the oxygen supply were confirmed. We established a massive two-dimensional culture method of human iPS cell-derived cardiomyocytes to obtain high-quality cardiomyocytes. MCT were transplanted to hearts of immunodeficient mice. The transplanted MCT were engrafted in large quantities even in the long term after transplantation, and vascular network was confirmed. MCT was transplanted to myocardial infarction models in immunodeficient rats, as well. A large number of transplanted MCT were engrafted, and their cardiac function significantly improved even in the long term after transplantation. The engrafted MCT expressed connexin 43 and did not induce any lethal arrhythmia. From these results, it has become clear that MCT based on high-quality human cardiomyocytes has vascular network, and safely and efficiently improves cardiac function in heart failure.</p>
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K09507 研究分野：循環器内科
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K09507seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09507

研究課題名(和文)血管網を有する微小心筋組織による心不全治療法の開発

研究課題名(英文)Development of heart failure treatment with micro-cardiac tissues with vascular network

研究代表者

藤田 淳(Fujita, Jun)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授

研究者番号：10306706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：微小心筋組織作製の最適条件を決定し、酸素供給の重要性および成熟度を確認した。良質な心筋細胞獲得のためにヒトiPS細胞由来心筋細胞の二次元大量培養法を確立した。免疫不全マウスの心臓に移植された心筋組織は長期移植後も大量に生着し血管構築が確認された。また、心筋梗塞モデルの免疫不全ラットに移植された心筋組織は長期移植後も大量に生着し、心機能が有意に改善することを確認した。生着した心筋組織はconnexin43を発現し、有意な致死性不整脈は全く確認されなかった。これらの成果より、高純度なヒト心筋細胞を基盤とした移植微小心筋組織は血管構築を有し、安全かつ効率よく心機能を改善させることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトES細胞、iPS細胞由来の再生心筋細胞を用いた心不全治療は、ドナー不足で移植数が伸び悩む心臓移植の代替療法として期待されている。しかし、細胞治療の成功は移植細胞がレシピエントの心臓に長期間生着できるかどうかにかかっている。本研究成果より高品質な心筋細胞を基盤として構築された微小心筋組織は血管網を有し、レシピエントの血流から酸素と栄養が供給されることによって長期生着することが明らかになった。さらに、有意な致死性不整脈を惹起せずに心機能を改善することが確認された。この方法により、再生心筋細胞を用いた重症心不全治療の革新的成果が期待できることより学術的および社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：The optimal conditions for preparation of micro-cardiac tissues (MCT) were determined. Their maturity and the importance of the oxygen supply were confirmed. We established a massive two-dimensional culture method of human iPS cell-derived cardiomyocytes to obtain high-quality cardiomyocytes. MCT were transplanted to hearts of immunodeficient mice. The transplanted MCT were engrafted in large quantities even in the long term after transplantation, and vascular network was confirmed. MCT was transplanted to myocardial infarction models in immunodeficient rats, as well. A large number of transplanted MCT were engrafted, and their cardiac function significantly improved even in the long term after transplantation. The engrafted MCT expressed connexin 43 and did not induce any lethal arrhythmia. From these results, it has become clear that MCT based on high-quality human cardiomyocytes has vascular network, and safely and efficiently improves cardiac function in heart failure.

研究分野：循環器内科

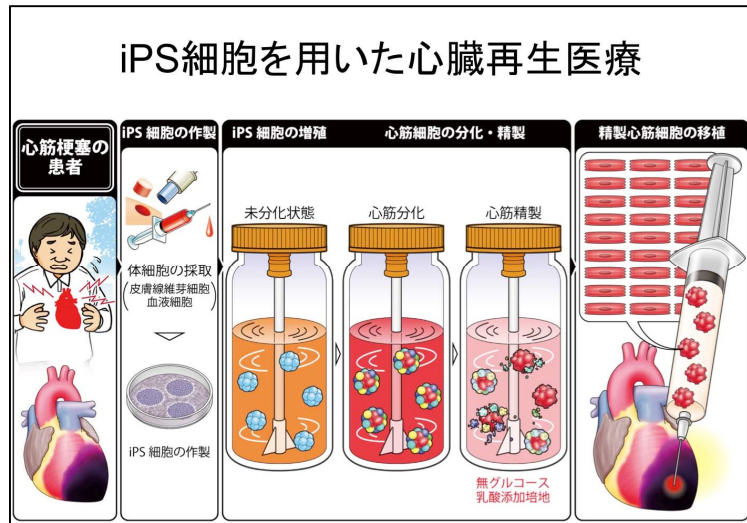
キーワード：心不全 多能性幹細胞 心筋細胞 微小心筋組織 血管構築 iPS細胞 ES細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

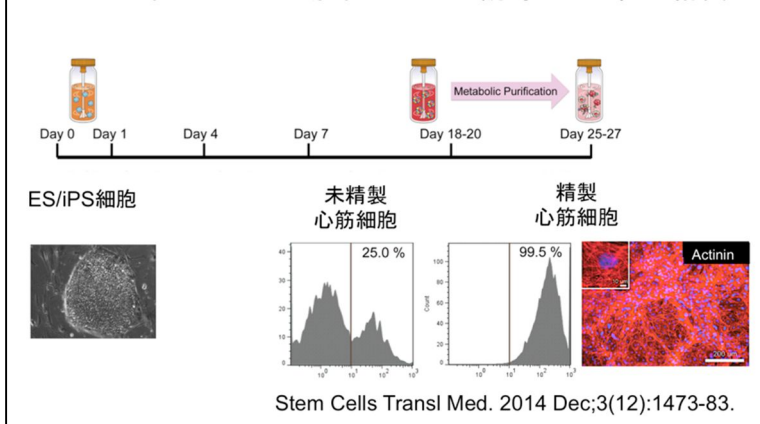
重症心不全の根治療法には心臓移植以外の方法が存在しない。しかし、移植心臓のドナー不足は深刻な問題であり心臓移植の数は全世界で約4000例にすぎず、本邦では100例にも満たない。**心臓移植にかわる重症心不全の根治療法として再生医療が注目されており、Embryonic Stem(ES)細胞、induced Pluripotent Stem (iPS)細胞は再生医療の理想的な細胞源として大きく期待されている。**

ES/iPS細胞はOct4、Nanog等を中心とする転写因子ネットワークにより多能性が維持されている。

研究代表者はヒトES細胞が未分化状態から分化細胞へと向かう機序を解明した。(Jun Fujita, et al. Cell Stem Cell. 2008 Jun 5;2(6):595-601.)しかし、幹細胞から心筋細胞への分化効率細胞株間でばらつきが大きい。我々は浮遊回転培養によって心筋細胞の大量培養法を開発したが、未精製の心筋細胞を移植すると残存した幹細胞により腫瘍を発生する事が明らかになった。我々の研究室では、心筋細胞の代謝特性を利用し心筋細胞だけを純化させる方法を開発しており(Cell Stem Cell. 2013 Jan 3;12(1):127-37.)、**この代謝的心筋純化法を浮遊回転培養法と組み合わせ、純化再生心筋細胞の獲得に成功した。(Stem Cells Transl Med. 2014 Dec;3(12):1473-83.)**さらに、純化精製法を改良し培養液より未分化iPS細胞の生存に必須なアミノ酸であるグルタミンを除去することで純化精製法を改良した(Cell Metabolism 2016 Apr 12;23(4):663-74.)。一方、心筋細胞を移植した際、心筋細胞の生着率は極めて低い。そこで、ゼラチンハイドロゲルを心筋細胞と移植することで生着効率を上げ、心筋梗塞治療法を開発した。(PLoS One. 2015 Jul 17;10(7):e0133308.)しかし、この方法でも移植細胞の生着効率の改善の余地を認めた。**今後、心不全の細胞治療を促進させるには心筋細胞が生体内で機能するために長期生着性をより高める必要がある。そのためには移植された心筋組織が生体内で栄養、酸素の供給を十分受けるために血管構築をもたなくてはならない。**



ヒトES/iPS細胞からの心筋細胞の分化誘導および純化精製法



2. 研究の目的

ES細胞、iPS細胞由来の再生心筋細胞を用いた心不全治療は、心臓移植の代替療法として期待されている。しかし、臓器移植と異なり細胞移植では移植された細胞が心臓内で血液の供給不足のために細胞死に陥りやすく、長期的な生着が困難となっている。それゆえ、細胞治療の成功は移植細胞がレシピエントの心臓に長期間生着できるかどうかにかかっている。本研究の目的は、血管構築を伴った微小心筋組織を開発することである。血管網を有することにより移植心筋組織がレシピエントからの血流によって酸素と栄養を享受することができるため、レシピエントの心臓に長期に生着することが可能になる。この方法により、再生心筋細胞を用いた重症心不全治療の革新的成果が期待できる。

3. 研究の方法

平成28年度

微小心筋組織を作製する最適な諸条件を検討する。

(1) マイクロウェルプレートの深さ、内径、材質等を検討し、球形の微小心筋組織作製に最適なマイクロウェルプレートを決定する。さらに純化心筋細胞の品質や細胞の播種密度を調整することで微小心筋組織作製に最適な条件を決定する。

(2) 形成直後の微小心筋組織、長期培養した微小心筋組織の遺伝子発現をマイクロアレイおよび定量的RT-PCRで解析し、微小心筋組織構築により心筋細胞の分裂、成熟、細胞死にどのよう

な影響を与えるかどうかを検討する。

(3) 微小心筋組織作製の基盤となる高品質な心筋細胞獲得のための大量培養法の改良を行う。

平成 29 年度

微小心筋組織の構築条件を検討する。

(1) 二次元大量培養法と無糖乳酸培地を用いた純化精製法によって高品質な心筋細胞を効率よく大量培養する。微小心筋組織作製時に酸素を供給することによって幼若心筋細胞のマーカーと成熟した心室筋のマーカーの発現や拍動速度を確認し微小心筋組織の成熟度を評価する。

(2) 心筋細胞を血管内皮細胞と線維芽細胞(間葉系幹細胞)とともに混合培養する。心筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞の細胞数、混合比率を変えることにより最適な微小心筋組織形成条件を探索する。

平成 30 年度

免疫不全マウスに微小心筋組織を移植することによってレシピエントの血管と血管網を構築できるかを検討する。さらに、免疫不全ラットにクライオインジャリーによって心筋梗塞モデルを作製して移植することによって心機能改善効果を確認する。

(1) 免疫不全マウスを開胸し心臓に微小心筋組織を移植する。移植効率を高めるために細胞外マトリックスとしてゼラチンハイドロゲルと共に移植する。移植後の心筋組織を蛍光顕微鏡で観察する。血管網の構築を観察することによって移植した微小心筋組織がレシピエントの組織に生着し、血管網をレシピエントの組織と構築することを確認する。

(2) クライオインジャリーを用いて免疫不全ラットに心筋梗塞モデルを作製する。心筋梗塞作製の 1 週間後に微小心筋組織を移植する。移植後に心機能が改善することを心エコーと心臓カテーテルによって確認する。

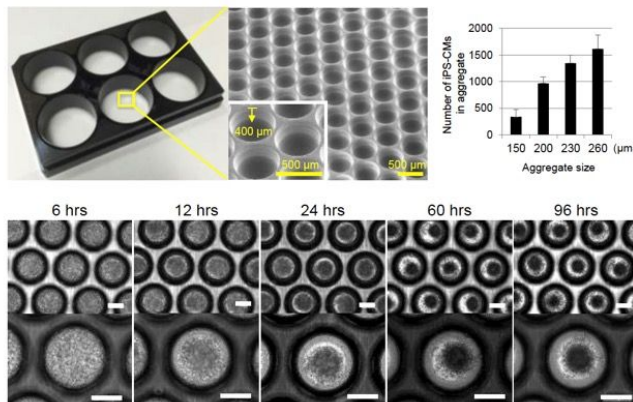
(3) 微小心筋組織の移植により不整脈が惹起されるか否かを植え込み型のホルター心電図で確認する。

(4) 心機能の改善を確認後に移植ラットを犠牲死させ、心臓組織の病理標本を観察する。移植組織のレシピエントの心臓への生着率を解析し、梗塞巣の変化を確認する。connexin43 を染色し移植心筋細胞がレシピエントの心臓と電気的に結合していることを確認する。

4. 研究成果

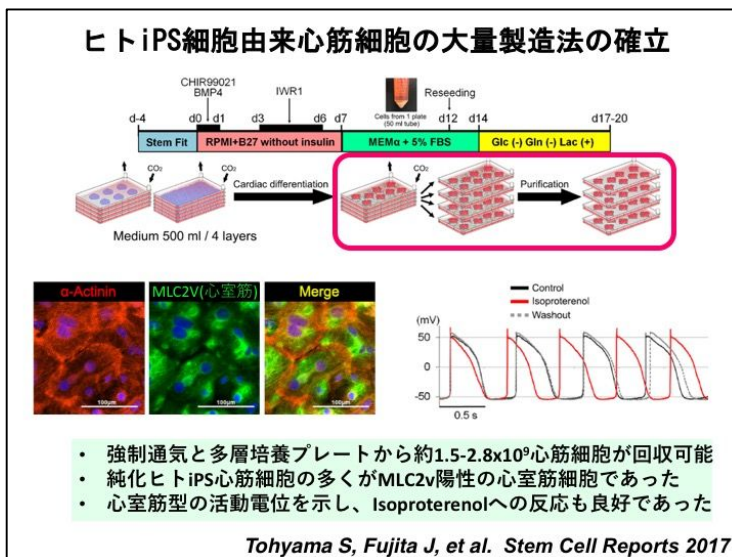
通常微小組織はマイクロウェルプレートを用いて作製するが、心筋組織に最適化されたマイクロウェルプレートは開発されていない。そこで我々は、マイクロウェルプレートの深さ、内径、材質等を検討し、微小心筋組織作製に最適なマイクロウェルプレートの開発を行なった。さらに純化心筋細胞の品質や細胞の播種密度を調整することで微小心筋組織作製に最適な条件を決定した。微小心筋組織の形成過程を経時的に観察することによって多能性幹細胞由来の心筋細胞は、マイクロウェルプレート上にて数日程度で再現性を持って微小心筋組織を形成することが確認された。また、微小心筋組織を形成する細胞数と微小心筋組織の大きさを検討したところ、純化心筋細胞、約 1000 細胞で直径約 200 マイクロメートル程度の微小心筋組織が形成されることが確認された。PI (Propidium Iodide) を用いて死細胞を確認した結果、微小心筋組織の高い viability が確認された (The Journal of Heart and Lung Transplantation 2019 Feb; 38(2): 203-214.)。また、平成 28 年度は浮遊培養法で大量培養したヒト iPS 細胞由来心筋細胞では純化精製後の心筋細胞の品質が微小心筋組織の確立に不十分であることが判明したため、品質の高い心筋細胞を大量に獲得して研究を推進するために二次元培養法を用いた未分化 iPS 細胞の大量培養法と心筋細胞の分化、大量培養法の開発を行なった。二次元培養法では従来広く行われている浮遊培養法と比較して培養液が全ての細胞に均一にいきわたるため未分化 iPS 細胞の維持培養、拡大培養、心筋細胞の分化誘導を効率よく行うことが可能になる。特に我々の開発したグルコース、グルタミンを除去し乳酸を添加した純化精製法では培養液が個々の細胞にあまるところなく浸透し確実に心筋細胞のみに純化精製することが可能になった。本法によって世界に類をみない高品質かつ高純度な心筋細胞で微小心筋組織を作製することに成功した。平成 29 年度はより高品質な微小心筋組織作製のために心筋細胞の二次元大量培養法の詳細な条件検討を行い、細胞の増殖率、分化効率、代謝産物等の解析を行った。本培養法では 4 段、10 段にプレートが重なった多層のスタックプレートを用い

ヒト iPS 細胞由来微小心筋組織



Tabei R, et al. The Journal of Heart and Lung Transplantation 2019

るが、CO₂ のガス交換に時間がかかるため細胞の増殖や品質に多大な影響をおよぼしていた。そこで、強制通気可能なインキュベーターを用いることでガス交換が通常の細胞培養と同様に迅速になり、高品質なヒト iPS 細胞と純化精製心筋細胞を効率よく大量培養することが可能になった (Stem Cell Reports. 2017 Nov 14;9(5):1406-1414.)。また、微小心筋組織を作製し酸素濃度をモニタリングしたところ、チャンバー底部に存在する微小心筋組織周辺は低酸素状態であり、低酸素状態では微小心筋組織に低酸素状態で



発現する遺伝子群が強く発現していた。一方、微小心筋組織に十分量の酸素を供給することで低酸素状態で発現する遺伝子群の発現低下が確認された。そこで微小心筋組織作製時に酸素を供給することによって微小心筋組織がより成熟した微小組織に成長することを確認するために幼若心筋細胞のマーカーである MYL7 と成熟した心室筋のマーカーである MYL2 の発現を比較した。酸素を供給していないコントロール群と比較した結果、酸素供給下での微小心筋組織は、MLC2 の発現が増加し、さらに微小心筋組織の拍動速度も飛躍的に増加することからより成熟した心室筋型の組織に成長していることが明らかになった。一方、分化効率の低い非精製心筋細胞(非心筋細胞を含有)では、成熟化が確認されなかった。さらに血管内皮細胞、線維芽細胞と心筋細胞を混合することによって血管網が構築された心筋組織を作製したが、純化精製心筋細胞と同程度の安定性を持つ微小心筋組織の構築は困難であった。これらの結果より、成熟した微小心筋組織の作製には純化精製心筋細胞の使用が必要であることが示唆された。

平成 30 年度は、in vivo における移植実験を行った。微小心筋組織を免疫不全マウスへ移植することによって微小心筋組織がどの程度生着できるのかを明らかにした。微小心筋組織が長期間虚血にさらされれば、血管構築なしでは長期移植において生着することは不可能と考えられる。高品質な心筋細胞を基盤とした微小心筋組織をゼラチンハイドロゲルとともに心臓に移植した。移植後長期間観察後にマウスを犠牲死させ、病理組織によって生着を確認した。移植した心筋組織は抗ヒト核抗体陽性であり、移植心筋組織が大量に生着していることが確認された。血管内皮のマーカーである CD34 を染色して in vivo における移植微小心筋組織はレシピエント由来の血管によって血管構築されることが確認された。病理組織を詳細に観察することで移植された心筋組織の形態やレシピエントの血管がどのように移植された微小心筋組織内に伸長するのかを確認した。また、クライオインジャリーを用いて免疫不全ラットに心筋梗塞モデルを作製し、一週間後に再開胸して微小心筋組織を移植した。移植後の長期における心機能の改善効果を心エコーとカテーテルを用いて確認した。コントロールとしてゼラチンハイドロゲルのみを移植した群において生着率や心機能を比較した。コントロール群と比較して微小心筋組織移植群では有意に心機能が改善することが明らかになった。さらに移植組織のレシピエントの心臓への生着率を解析した結果、抗ヒト核抗体陽性のヒト iPS 細胞由来心筋細胞が移植後も長期間生着しており、心機能が有意に改善することが明らかになった。また生着した心筋組織はギャップジャンクションのタンパクである connexin43 を発現していた。さらに、心筋梗塞モデルへの微小心筋組織移植により不整脈が惹起されるか否かを植え込み型のホルター心電図で確認した。細胞移植後には一般的に心室頻拍等の不整脈が発生することが報告されている。ところが、微小心筋組織の移植では有意な致死性不整脈は全く確認されなかった。これらの成果より、高純度なヒト心筋細胞を基盤とした移植心筋組織は血管構築を有し、安全かつ効率よく心機能を改善させることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Fujita J, Tohyama S, Kishino Y, Okada M, Morita Y. Genetic and epigenetic regulation of cardiac differentiation from human pluripotent stem cells. Stem Cells. 査読有 2019 Apr 25. doi: 10.1002/stem.3027.
2. 神宿 元、藤田 淳、遠山 周吾、福田 恵一 臨床応用前夜となったヒト iPS 細胞を用いた再生医療 ~ 心臓再生医療でみる産業化への歩み ~ 医工学治療 査読無 in press
3. Tabei R, Kawaguchi S, Kanazawa H, Tohyama S, Hirano A, Handa N, Hishikawa S,

Teratani T, Kunita S, Fukuda J, Mugishima Y, Suzuki T, Nakajima K, Seki T, Kishino Y, Okada M, Yamazaki M, Okamoto K, Shimizu H, Kobayashi E, Tabata Y, Fujita J, and Fukuda K. Development of a transplant injection device for optimal distribution and retention of human iPSC-derived cardiomyocytes. The Journal of Heart and Lung Transplantation 査読有 2019;38(2):203-214.

4. 岸野 喜一、遠山周吾、藤田 淳、福田 恵一 臨床応用前夜となった iPSC 細胞による心筋再生医療の今後の展開 循環制御 査読無 2018 年 39 巻 3 号 p.152-154
5. 岡田 麻里奈、藤田 淳、福田 恵一 心筋再生と iPSC 細胞 月刊 臨床と研究 査読無 2018 年 6 月号
6. 田野崎翔、藤田淳、福田恵一 心筋再生医療の現状と展望
内分泌・糖尿病・代謝内科 査読無 2017年12月号
7. Tohyama S, Fujita J, Fujita C, Yamaguchi M, Kanaami S, Ohno R, Sakamoto K, Kodama M, Kurokawa J, Kanazawa H, Seki T, Kishino Y, Okada M, Nakajima K, Tanosaki S, Someya S, Hirano A, Kawaguchi S, Kobayashi E, Fukuda K. Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes. Stem Cell Reports. 査読有 2017;9(5):1406-1414.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 藤田淳 心筋スフェロイド移植法を用いた心臓再生医療の開発 第 19 回京大病院 iPSC 細胞・再生医学研究会 2019 年
2. 藤田淳 iPSC 細胞を用いた心臓再生医療の開発 Collaborative Evolution Laboratories Leading the acceleration of bioengineering: CELLab セミナー 2018 年
3. 藤田淳 心臓再生医療の実現に向けて 第 39 回日本炎症・再生医学会 シンポジウム 2018 年
4. 藤田淳 拡張型心筋症に対する再生心筋細胞移植療法 第 22 回日本心不全学会学術集会 シンポジウム 2018 年
5. Fujita J Regenerative therapy for heart failure with iPSC-derived cardiac spheroid Keio University International Symposium on Advanced Technologies for Mechano-biology and Regenerative Medicine 2018
6. Tohyama S, Fujita J, Kanazawa H, Tabei R, Kawaguchi S, Kobayashi E, Fukuda K. Development of a Massive Cardiac Spheroids Production and Transplantation System in Human Pluripotent Stem Cells. The 16th annual scientific meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR). 2018
7. Tohyama S, Fujita J, Fujita C, Yamaguchi M, Ohno R, Fukuda K. Metabolic Selection System for Large Numbers of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. Weinstein 2018 (Cardiovascular Developmental and Regeneration Conference) 2018
8. Tohyama S, Fujita J, Fujita C, Yamaguchi M, Ohno R, Fukuda K. Metabolic Selection System for Large Numbers of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. Keystone Symposia (Kyoto) 2018
9. 藤田淳 iPSC 細胞を用いた心臓再生医療の開発 第 17 回日本再生医療学会学術集会 シンポジウム 2018 年
10. 藤田淳 iPSC 細胞を用いた再生心筋細胞移植による心不全治療法の開発 第 21 回心不全学会学術集会 シンポジウム 2017 年
11. Tabei R, Kanazawa H, Fujita J, Tohyama S, Hirano A, Kawaguchi S, Nakajima K, Seki T, Kishino Y, Okada M, Shimizu H, Kobayashi E, Tabata Y, Fukuda K. Development of a Transplant Injection Device for the Optimal Distribution and Retention of iPSC

12. 藤田淳 多能性幹細胞の代謝システム 第9回泌尿器抗加齢医学研究会 2017年
13. Tohyama S, Fujita J, Fujita C, Yamaguchi M, Kanaami S, Ohno R, Fukuda K The 15th annual scientific meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2017 Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes 2017
14. 田部井亮太、金澤英明、藤田淳、他 iPS由来心筋細胞を用いた重症心不全に対する心筋再生医療における移植デバイスの開発、第20回日本適応医学会学術集会、2016年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：細胞培養装置及びその使用

発明者：藤田淳、福田恵一、遠山周吾

権利者：Heartseed株式会社

種類：特許

番号：特願 2017-193600

出願年：2017

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。