

iPS 由来再生心筋細胞移植の安全性評価

実施予定期間：平成 22 年度～平成 26 年度
総括責任者：清家 篤（慶應義塾 学長）
研究代表者：福田 恵一（慶應義塾大学・医学部・循環器内科 教授）

I. 概要

本研究はヒト iPS 細胞から分化誘導した再生心筋細胞を心不全患者に移植する新規治療法を開発するものである。既に確立したゲノムに損傷を与えない iPS 細胞の樹立法、効率的な心筋細胞の分化誘導法、分化誘導した心筋細胞増殖の誘導、心筋細胞と非心筋細胞の分離法、効率的な移植法等の手法を活用し、これを臨床に移すための安全性・有効性を小型霊長類のコモンマーモセットサルやミニブタを利用した動物実験で明らかにするものである。奇形腫等の腫瘍形成性の有無の確認、心不全改善への有効性、催不整脈性等を明らかにし、臨床応用への直前の段階までを完成させる。これらを通じ、世界初の iPS 細胞の臨床応用を目指す。

1. 機関の現状

「iPS 細胞」スーパー特区に於いては京都大学、慶應義塾大学、理化学研究所 CDB、東京大学医科学研究所を中心に神経、心筋、肝臓、膵β細胞、網膜、角膜、血小板等の再生医学・再生医療研究が進められている。このうち、心筋細胞の再生医学・再生医療研究は慶應義塾大学医学部循環器内科を中心に研究が進められ、実際の医療に最も近い段階まで研究が進められている。ゲノム遺伝子破壊を伴わないヒト iPS 細胞の樹立、ヒト iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導、分化した心筋細胞の増殖、心筋細胞の純化・精製法の確立、効率的な細胞移植法の開発等のすべての基盤技術は既に完成し、残された課題は大量培養法の確立と安全性の評価のみである。本邦で開発された「iPS 細胞」技術の臨床応用への展開は、患者のみならず本邦全国民の悲願でもある。本研究プロジェクトはヒト iPS 細胞から再生心筋細胞の大量培養法の確立と移植時の安全性評価を行うことを目的としている。

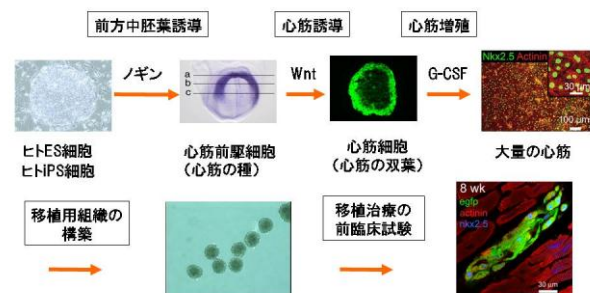
これまで我々はヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞を心筋細胞に分化させ、医療、創薬に利用するための研究を行ってきた。具体的には、先行研究として、①内因性 BMP 阻害因子 Noggin を用いて効率的に前方中胚葉心臓予定領域に分化誘導する方法、②Wnt を用いて前方中胚葉から心筋細胞に分化誘導する方法、③細胞分裂能がまだ保たれている段階の早期の心筋細胞に対し、G-CSF を用いて特異的に細胞分裂を誘導し、心筋細胞数を増加させる方法、④心筋細胞が他の細胞に比してエネルギー代謝に富みミトコンドリアを多量に含有することを利用して、ミトコンドリアに特異的に取り込まれる蛍光色素（マイトトラッカー、TMRM 等）を用いて心筋細胞と非心筋細胞を分離し、心筋を純化精製する方法、⑤メタボローム解析により、心筋細胞と ES 細胞・iPS 細胞の代謝機構が大きく異なること、そして ES 細胞・iPS 細胞が解糖系を主たるエネルギー源としているのに対し、心筋細胞が乳酸・脂肪酸をエネルギーとすることより、細胞培養液を変えるだけで未分化幹細胞を細胞死させ、心筋細胞だけを選別することが出来る方法、⑥細胞の浸透圧耐性の差により、ES 細胞、iPS 細胞を選別的に死滅させる方法、⑦ES 細胞、iPS 細胞をフィーダー細胞な

しに大量培養する方法、⑧培養皿に付着した ES 細胞、iPS 細胞を非酵素的に一定の大きさに分離し、継代・胚様体形成を行う方法、⑨純化精製した再生心筋細胞を生着率 90% 程度の効率的に心臓内に移植し、かつ奇形腫等の腫瘍形成させない方法等を開発し、論文化・特許化を行ってきた。

また、京都大学の山中研究室からレトロウイルスベクターを早い段階で入手し、種々の心疾患患者から疾患 iPS 細胞の樹立を行ってきた。2009 年に入ってからでは DNAVEC 社

心臓再生医療への治療戦略

選択的心筋細胞の分化誘導（3段階心筋再生法）



との共同研究により、センダイウイルスベクターを用いて、ゲノムに傷をつけない形での iPS 細胞の樹立を行ってきた。既に、心疾患のない健常者、遺伝子性 QT 延長症候群（LQT1, LQT3 等）、肥大型心筋症、家族性心房中隔欠損症、ミトコンドリア脳筋症等からの iPS 細胞の樹立に成功し、表現形を解析している。

[1] シーズ 1: Noggin 法による iPS 細胞からの心筋分化誘導:

論文: Yuasa S, Fukuda K, et al. Nature Biotechnology 23: 607-611, 2005.

特許: 幹細胞から心筋細胞を分化誘導する方法 (特願 2003-346248, PCT/JP2004/014598)

[2] シーズ 2: Wnt を用いた心筋細胞の誘導

特許: 多能性幹細胞から心筋細胞を分化誘導する方法 (PCT/JP2007・059242)

論文: Onizuka T, Fukuda K, et al. J Mol Cell Cardiol 52:650-659 2012

[3] シーズ 3: 幼若期の心筋細胞を細胞分裂させることにより心筋細胞を増殖させる方法

論文: Shimoji K, Fukuda K, et al. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. Cell Stem Cell 2010;6:227-237.

特許: G-CSF を用いた心筋細胞への分化誘導法 (特願 2007-151170)

[4] シーズ 4: ミトコンドリア法による心筋細胞の純化
論文: Hattori F, Fukuda K, et al. Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. Nature Methods 2009;7:61-6.

特許: 細胞内ミトコンドリアを指標とした心筋細胞の選択

方法 (特願 2005-207799, PCT/JP 2005/015553)

[5] シーズ 5: 乳酸法による心筋細胞の純化精製法
特許: 幹細胞及び胎児由来の心筋細胞及び予定心筋細胞の精製方法 (特願 2006-23770)
論文: 投稿中

[6] シーズ 6: 再凝集法による効率的な心筋細胞の移植法の確立
特許: 心筋細胞の細胞塊作成方法および心筋細胞塊の用途 (特願 2007-200246)
論文: Hattori F, Fukuda K, et al. Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. Nature Methods 2009;7:61-6.

[7] シーズ 1: 浸透圧法による未分化幹細胞及び非心筋細胞の除去法の開発
特許: 多能性幹細胞および心筋以外の分化細胞に対する細胞死誘導方法 (特願 2009-083553)
論文: 論文準備中

[8] 細胞シート作出技術の開発
特許: 細胞シートを作製するための支持体をコーティングするための組成物、細胞シート作製用支持体及び細胞シートの製造方法 (特願 2003-328340 PCT・JP2004/004161 特許番号 第 4284563 号)
論文: Itabashi Y, Fukuda K, et al. Artifi Organs 29:95-103, 2005.

[9] センダイウイルスを用いた iPS 細胞の樹立
特許: ヒト末梢血液細胞からの iPS 細胞分化誘導方法の開発
論文: Seki T, Fukuda K, et al. Cell Stem Cell. 2010;7:11-4.

2. 計画構想の内容

- ① 大量培養したヒト iPS 細胞由来再生心筋細胞を分化誘導後に純化精製し、移植した際に奇形腫等の悪性腫瘍を形成するか否かの検討

我々のこれまでの研究により、ヒト再生心筋細胞は移植後に生理的肥大を形成するため、生体内に移植した際には細胞の大きさが数ヶ月で 100 倍程度になることが判明している。一方、純化したヒト iPS 細胞由来再生心筋細胞に iPS 細胞が混入していた場合にはさらに速い速度で奇形腫を形成することが推測される。ヒト iPS 細胞由来再生心筋細胞移植の際の未分化幹細胞の混入による奇形腫、分化した心筋が脱分化して腫瘍形成するか否か等を解析する。これにはセンダイウイルスを用いて作出したゲノムに損傷を伴わない健康者ヒト iPS 細胞 10 株程度を用いて再生心筋細胞を純化精製した後、1 株当たり 100 匹程度の免疫不全 NOG マウスの皮下に移植し、腫瘍形成能を評価する。

- ② 心筋梗塞モデルサルに対するヒト再生心筋細胞移植の有効性・安全性に関する検討

実験動物中央研究所においてコモンマーモセットサルを用い、心筋梗塞モデルサルを作出する。ヒト iPS 細胞由来再生心筋細胞を心筋梗塞モデルサルに移植する。免疫抑制剤を投与し、移植心筋の拒絶を回避する。移植前および移植後の心機能を心エコー図にて経時的に評価する。同時に皮下に移植した植

え込み型ホルター心電図により不整脈の発生状況を観察する。半年後に心臓を摘出し、病理組織を詳細に観察する。

- ③ 自己ブタ iPS 細胞を用いた再生心筋細胞の梗塞後心臓への移植と心機能・腫瘍形成・催不整脈性の検討
ミニブタ (n=3) の皮膚をバイオプシーし、センダイウイルスを利用して iPS 細胞を樹立する。樹立した iPS 細胞より再生心筋細胞を大量培養し、さらに再生心筋細胞を純化精製する。これらの再生心筋細胞を心筋梗塞を作成したミニブタに対し移植し、その後の心機能の回復程度、催不整脈作用の有無等を詳細に解析し、近未来におけるヒトへの心筋細胞移植療法の全行程をシミュレーションする行程を行う。

- ④ ヒト iPS 細胞加工製品の安全性・品質確保に関する研究

ヒト iPS 細胞加工医薬品等および心不全治療を目的とした細胞・組織加工医薬品等に関して国内外の開発・規制動向を調査し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を利用した医薬品・医療機器の安全性・品質確保のあり方を検討する。原材料、製造方法および最終製品の態様がほぼ固まった段階で、最終製品(または中間製品)の非臨床安全性試験を実施する。

3. 実施期間終了時における具体的な目標

第一に純化精製したヒト再生心筋細胞 (10 株程度) を免疫不全マウスに移植し、長期間観察することにより、奇形腫を含む種々の悪性腫瘍の形成能を明らかにする。第二に純化精製したヒト再生心筋細胞を心筋梗塞モデルサルの心臓に移植することにより、心不全改善に対する有効性、腫瘍形成や催不整脈作用に関する安全性を検討する。第三にミニブタの皮膚より iPS 細胞を作出し、これを心筋細胞に分化誘導し、純化精製後に心筋梗塞を生じさせた自己心臓に移植し、心機能の回復と腫瘍形成や催不整脈作用に関する安全性を検討する。

4. 実施期間終了後の取組

第一三共製薬子会社のアスピオファーマ株式会社との共同開発により、心筋再生医療の産業化を目指す。GMP 施設の建設を行い、再生心筋細胞生産工場の設立、医師主導治験から高度先進医療への向けた取り組みを行うと共に、海外での臨床治験も検討する。

5. 期待される波及効果

心疾患は欧米諸国に於いて死因の第一位、本邦に於いては死因の第 2 位を占める極めて重要な疾患である。食生活の変化により心筋梗塞等の疾患は増加の一途をたどっている。近年のカテーテル治療の普及により急性期の死亡は減少したが、逆に慢性心不全は増加の一途をたどっている。これまで、拡張型心筋症や肥大型心筋症の一部の症例では心臓移植が行われてきたが、ドナー不足は深刻であり、本邦のみならず世界的にも危機的状態にある。これに現時点では心臓移植の適応外とされている高齢者の慢性心不全例を加えると、心不全により死亡する患者は年間数十万例に及ぶと考えられている。市場を世界に求めた場合年間数百万から数千万例の患者が心不全で死亡している。心筋細胞移植によりこれらの心不全症例を救命あるいは QOL の改善が出来れば、その恩恵は計り知れない。上記のように市場性は極めて大きく、種々の神経が求められる神経疾患・眼疾患等に比して事業性は高いと考えられる。

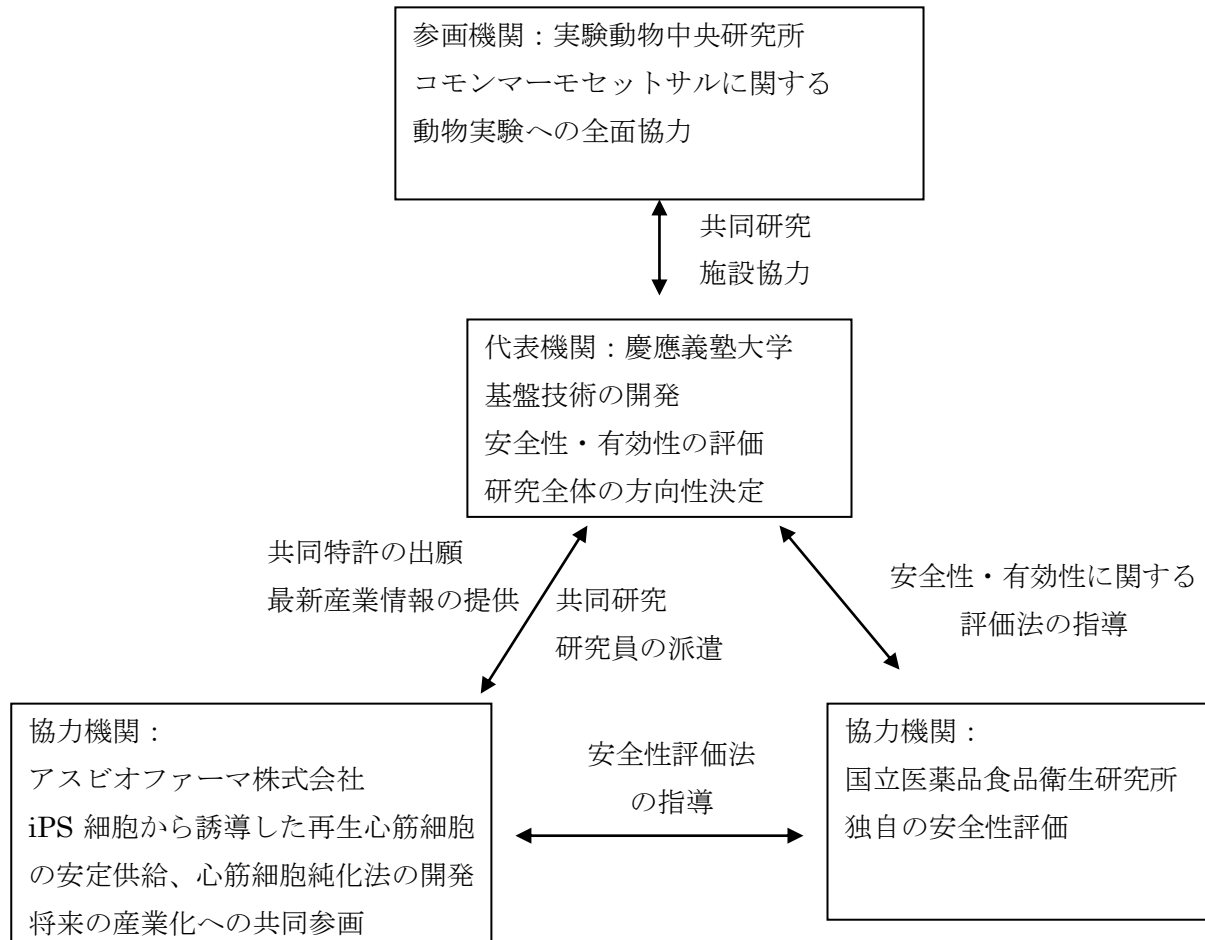
6. 生命倫理・安全面への配慮について

本研究においてヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に基づいて実験を行う。ヒト ES 細胞は iPS 細胞の対照群として使用するが、この点に関してはヒト ES 細胞使用に関する文部科学省の倫理審査委員会の承認を受けており、特に問題ない。遺伝子組み換え実験はすべて大学の遺伝子組換え実験に関する監査委員会に申請書を提出し、認可を得た後に実験を行う。遺伝子組み換えベクターはウ

イルスベクターを使用するが、P2 レベルで行えるものであり、特に支障はない。臨床試験を行う場合には事前に、学内倫理委員会の了解をとり、厚生労働省の医師主導治験倫理委員会にプロトコルを提出し、承認を得た段階で初めて開始するものとする。動物実験を行う場合は大学の動物実験委員会に申請し、同規則および NIH のガイドラインに従うものとする。また、本申請時点において、動物実験はすべて承認を得ており、すべて認可されている。

7. 実施体制

「実施体制図」



氏名	所属部局・職名	当該構想における役割
清家 篤	慶應義塾大学・大学長	総括責任者
福田 恵一	慶應義塾大学医学部循環器内科・教授	研究代表者
村田 光繁	慶應義塾大学医学部循環器内科・講師	不整脈解析
藤田 淳	慶應義塾大学医学部循環器内科・特任助教	再生心筋細胞移植に関する検討
関 倫久	慶應義塾大学医学部循環器内科・助教	再生心筋細胞移植に関する検討
小平 真幸	慶應義塾大学医学部循環器内科・助教	再生心筋細胞移植に関する検討
橋本 寿之	慶應義塾大学医学部循環器内科・助教	再生心筋細胞移植に関する検討
楠本 大	慶應義塾大学医学部循環器内科・大学院	再生心筋細胞移植に関する検討

江頭 徹	慶應義塾大学医学部循環器内科・大学院	再生心筋細胞移植に関する検討
大野 洋平	慶應義塾大学医学部循環器内科・共同研究員	再生心筋細胞移植に関する検討
小清水右一	アスビオファーマ株式会社・研究員	特許戦略の構築
服部 文幸	アスビオファーマ株式会社・研究員	心筋純化法の開発、移植実験
田中 智文	アスビオファーマ株式会社・研究員	再生心筋細胞の安定的供給
佐藤 陽治	国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部・部長	安全性評価へのアドバイス
伊藤 豊志雄	実験動物中央研究所 マーモセット研究部・部長	コモンマーモセットサル実験への協力
佐々木えりか	実験動物中央研究所 応用発生学研究部・部長	コモンマーモセットサル実験への協力

8. 各年度の計画と実績

a. 平成 22 年度

・計画

ヒト iPS 細胞から再生心筋細胞を誘導し、純化精製した後に免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成能を評価する。サルに対するヒト再生心筋細胞移植の有効性・安全性を評価する。ヒト iPS 細胞加工製品の安全性・品質確保に関する研究を行う。

・実績

iPS 細胞由来の再生心筋細胞を FACS を用いずに効率的に純化精製する新技术を開発した。純化精製したヒト iPS 細胞由来の再生心筋細胞を免疫不全マウス (NOG マウス) の精巢に移植したところ、腫瘍形成は観察されなかった。

財団法人実験動物中央研究所と共に、心筋梗塞モデルマーモセットを用い、対照群とヒト iPS 細胞由来再生心筋細胞移植群を作出し、長期観察を行った。心エコーによる血行動態、植え込み型ホルター心電図による不整脈解析、病理組織検査を行った。

国立医薬品食品衛生研究所と共同で、ヒト iPS 細胞加工医薬品等および心不全治療を目的とした細胞・組織加工医薬品等に関して国内外の開発・規制動向を調査した。また、同研究所のアドバイス下にヒト iPS 細胞由来心筋細胞を利用した医薬品・医療機器の安全性・品質確保のあり方を検討した。これをもとにして、製品の製造方法 (原材料となるヒト体細胞・組織の採取方法からヒト iPS 細胞株の樹立及び分化段階の進んだ細胞を経て最終製品まで) および各製造工程に必要な試験項目を検討した。

b. 平成 23 年度

・計画

ヒト iPS 細胞から再生心筋細胞を誘導し、純化精製した後に免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成能を評価する。サルに対するサル再生心筋細胞移植の有効性・安全性を評価する。ミニブタの細胞から iPS 細胞の樹立を開始する。ヒト iPS 細胞加工製品の安全性・品質確保に関する研究を行う。

・実績

未分化幹細胞と心筋細胞の代謝特性を利用して、乳酸法により未分化細胞の効率的な排除および心筋細胞の純化に成功した。この方法で、未分化のヒト ES、iPS 細胞と比べて、乳酸法で純化した ES、iPS 細胞由

来の心筋細胞は全く奇形腫を形成しないことを確認した。

健常および心筋梗塞モデルコモンマーモセットへのヒト ES 細胞由来心筋細胞の移植による短期間の生着を確認した。

自治医大からブタ iPS 細胞の供給を受け、心筋細胞への分化を試みた。ブタ iPS 細胞は、ヒト型 (prime) / マウス型 (naive) の両方で培養可能であったが、心筋細胞への分化誘導には至らなかった。理由として、iPS 細胞としての多分化能の未成熟性と染色体上に強く残る 4 因子による分化の阻害が考えられた。心筋細胞への分化能を有するブタ iPS 細胞を樹立するため、クラウンミニブタからの抹消血液の採血を行い、染色体に組み込まれないセンダイウイルスを用いて T 細胞から iPS 細胞を樹立する試みを開始した。

国立医薬品食品衛生研究所と共同で、引き続き、ヒト iPS 細胞加工医薬品等および心不全治療を目的とした細胞・組織加工医薬品等に関して国内外の開発・規制動向を調査した。また、同研究所のアドバイス下にヒト iPS 細胞由来心筋細胞を利用した医薬品・医療機器の安全性・品質確保のあり方を検討し、これをもとにして、製品の製造方法および各製造工程に必要な試験項目を検討した。

c. 平成 24 年度

・計画

ヒト iPS 細胞から再生心筋細胞を誘導し、純化精製した後に免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成能を評価する。サルに対するヒト再生心筋細胞移植の有効性・安全性を評価する。ミニブタの細胞から樹立した iPS 細胞から心筋細胞を誘導する。ヒト iPS 細胞加工製品の安全性・品質確保に関する研究を行う。

・実績

メタボローム解析から明らかとなった未分化幹細胞と心筋細胞の代謝特性を利用して、無糖乳酸培地による未分化細胞および非心筋細胞の効率的な排除、心筋細胞の純化精製に成功した。無糖乳酸培地で純化した ES、iPS 細胞由来の心筋細胞は全く奇形腫を形成しないことを確認した。さらに、非心筋分化細胞も排除することに成功した。(Cell Stem Cell 誌(2013)に掲載)

健常および心筋梗塞モデルコモンマーモセットへのヒト iPS 細胞由来心筋細胞の移植による長期間の生

着を確認した。

心筋細胞への分化能を有するブタ iPS 細胞を樹立するため複数の系の実験を試みたが、至適なブタ iPS 細胞は山中 4 因子が高レベルで発現し、分化とともに急速に発現が消失することが必要と推測された。これに対応するため、テトラサイクリンで遺伝子発現が誘導されるベクターを利用した iPS 細胞の樹立に着手した。

国立医薬品食品衛生研究所と共同で、ヒト iPS 細胞加工製品の原材料ないし中間製品としてのヒト iPS 細胞の品質を検討する目的で、生物薬品の品質に関する国際ガイドラインである日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) ガイドライン Q5 シリーズおよび国内外の関連ガイドライン等を調査し、ヒト iPS 細胞加工製品への適用の妥当性を検討した。また、製造上の一注意点として、感染因子混入などの汚染の検出と排除について検討した。

- d. 平成 25 年度
- ・計画

平成 24 年度に引き続きヒト iPS 細胞から再生心筋細胞を誘導し、純化精製した後に免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成能を評価する。サルに対するヒト再生心筋細胞移植の有効性・安全性を評価する。特に心筋梗塞モデルでの有効性・安全性を評価する。ヒト iPS 細胞加工製品の安全性・品質確保に関する研究を行う。ミニブタ iPS 細胞から心筋細胞を誘導し、ブタに移植し、安全性を評価する。

- e. 平成 26 年度

- ・計画
- ヒト iPS 細胞から再生心筋細胞を誘導し、純化精製した後に免疫不全マウスに移植し、長期間での腫瘍形成能を評価する。平成 25 年度に引き続き心筋梗塞モデルでのサルに対するヒト再生心筋細胞移植の有効性・安全性を評価する。ヒト iPS 細胞加工製品の安全性・品質確保に関する研究を行う。ミニブタ iPS 細胞から心筋細胞を誘導し、ブタに移植し、安全性を評価する。

9. 年次計画

取組内容	1 年度目	2 年度目	3 年度目	4 年度目	5 年度目	実施期間終了後
移植再生心筋細胞の腫瘍形成能評価		移植再生心筋細胞の腫瘍形成能評価				ヒト再生心筋細胞移植 医師主導治験
ミニブタを用いた再生心筋細胞移植		ミニブタを用いた再生心筋細胞移植				
サルに対するヒト再生心筋細胞移植の有効性・安全性評価		サルに対するヒト再生心筋細胞移植の有効性・安全性評価				
ヒト iPS 細胞加工製品の安全性・品質確保に関する研究		ヒト iPS 細胞加工製品の安全性・品質確保に関する研究				