

多能性幹細胞における代謝機構に基づく 心筋再生治療法の開発

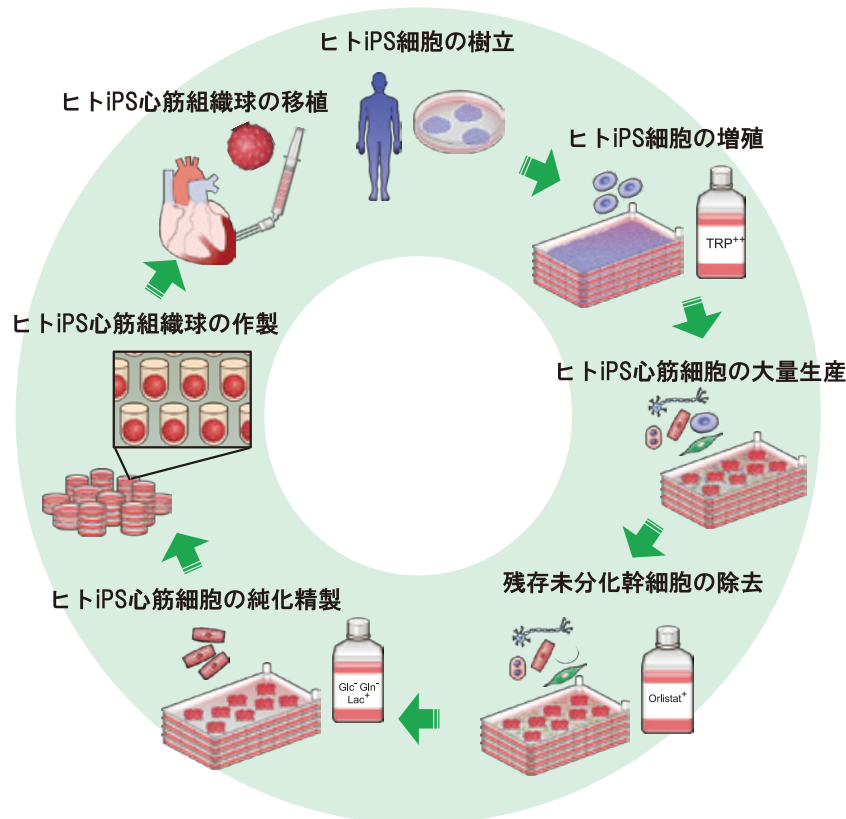
遠山 周吾

慶應義塾大学医学部循環器内科

はじめに

心臓移植は重症心不全に対する唯一の根本的治療法であるが、ドナーの不足が深刻であり、標準的な治療法となり得ていない。そこで心臓移植に代わる治療法の開発が求められている。2007年に京都大山中教授らにより樹立されたヒト人工多能性幹(iPS)細胞は、無限増殖能および分化能を有する万能細胞であり、ヒト胚性幹細胞における倫理的問題等を克服することができるため、重

症心不全に対する心筋再生治療法への期待が高まっている。しかしながら、臨床応用に際しては、ヒトiPS細胞およびヒトiPS細胞由来心筋細胞(ヒトiPS心筋細胞)の大量生産、残存未分化幹細胞の除去、ヒトiPS心筋細胞の純化精製、ヒトiPS心筋細胞の効率的な移植システム等、多くの課題を克服しなければならない(図)。筆者らは、ヒトiPS細胞およびヒトiPS心筋細胞における代謝機構を解明することで、上述の課題を克服する技術を開発して



図：ヒトiPS細胞を用いた心筋再生治療法の流れ

ヒトiPS細胞を用いた心筋再生治療法の具現化に際しては、ヒトiPS細胞の増殖、ヒトiPS心筋細胞の大量生産、残存未分化幹細胞の除去、ヒトiPS心筋細胞の純化精製、ヒトiPS心筋細胞の効率的な移植システム等、多くの課題を克服しなければならない

きた。本稿では、重症心不全に対するヒトiPS心筋細胞移植を具現化するための課題を克服する方法および今後の展望を紹介する。

ヒトiPS細胞の大量作製

心不全患者1人を治療するには数億個の心筋細胞が必要であることが想定されているため、ヒトiPS細胞を大量に作製する必要があるが、臨床用の培養液は高価かつ増殖に不適であった。そこで、ヒトiPS細胞を効率的に増殖させる方法の確立を目指した。詳細なアミノ酸プロファイリングを行ったところ、トリプトファン (TRP) がヒトiPS細胞の増殖と維持に重要な役割を果たしていることがわかった。さらに、メタボローム解析により、TRP添加条件下で細胞内および細胞外キヌレニン (KYN) が減少するのに対し、KYNの上流代謝物であるN-ホルミルキヌレニン (NFK) が増加し、それによってヒトiPS細胞の増殖の促進に寄与することが明らかになった。したがって、TRP強化培地により大量のヒトiPS細胞を効率的に作製できることが示された¹⁻²⁾。

ヒトiPS細胞から心筋細胞への分化誘導

ヒトiPS細胞から心筋細胞を作製する方法は、正常な胚の心臓発生のメカニズムに基づいている。近年の研究では、Bone morphogenetic protein (BMP) やActivin A、Wnt、BMP阻害剤、Wnt阻害剤等が心筋細胞の誘導において用いられる³⁻⁶⁾。特に、Wntシグナルの活性化には、Glycogen synthase kinase3の阻害剤であるCHIR99021が、Wntシグナルの抑制にはIWR-1やIWP-2などのWnt阻害剤が用いられることが多い⁷⁻⁸⁾。

ヒトiPS心筋細胞の純化精製

臨床使用のために克服すべき最も重要な障壁の1つは、移植時の非心筋細胞および未分化幹細胞の混入によって引き起こされる腫瘍形成である。筆者あるいは他のグループにより、ミトコンドリア色素または心筋特異的タンパク質に対する抗体を使用した心筋純化精製法を報告してきた⁹⁻¹⁰⁾。ただし、これらの方法は、セルソータを用いるため、無菌性を担保しつつ、大量の心筋細胞を回収することが困難であった。そこで、

より実用的な方法を開発するために、各細胞におけるエネルギー源の違いを利用することで、心筋細胞のみを効率的に選別することのできる培養液の開発を目指した。その結果、ヒトiPS細胞や非心筋細胞は酸素の有無に関わらず、グルコースおよびグルタミンをエネルギー源にしていることがわかった。したがって、グルコースおよびグルタミンを除去した培養液に暴露させると、ATPが不足し、ヒトiPS細胞や非心筋細胞は速やかに死滅することを確認した。一方で、ヒトiPS心筋細胞は、グルコースおよびグルタミンを除去した培養液に暴露しても、乳酸が存在すれば長期間生存できることがわかった¹¹⁻¹²⁾。これらの性質を利用することにより、グルコースおよびグルタミン除去乳酸添加培養液により、成熟した心筋細胞のみを大量に選別することが可能となった¹²⁻¹³⁾。また、筆者はヒトiPS細胞において脂肪酸合成経路が活性化している性質を利用し、脂肪酸合成酵素阻害薬であるオルリスタットを用いることで、他領域でも応用可能な未分化幹細胞除去法を開発することに成功した¹⁴⁻¹⁵⁾。

ヒトiPS心筋細胞の大量培養

上述の通り、心不全患者1人を治療するには数億個の心筋細胞が必要であることが想定されているため、一度に数億個の心筋細胞を作製するシステムの開発が必要である。従来の3次元(3D)大量培養システムは、スケールアップ等が可能であるが、非心筋細胞が内部に分布する場合には、純化精製が不十分になることがわかった。一方で、2次元(2D)培養システムは、多能性と増殖能、さらには分化能をいずれも高いレベルで維持できるため、高純度心筋細胞の作製が可能である¹⁶⁾。しかしながら、2Dの大量培養システムは存在しなかった。そこで、筆者らはアクティブガス換気を搭載した多層(10層)培養プレートを使用することにより、一度に約10億個の心筋細胞を作製することに成功した¹⁶⁾。

ヒトiPS心筋細胞の移植

単離した心筋細胞を心筋内に直接注入した際には、ほとんどの移植細胞が流出あるいは細胞死を引き起こすため、細胞の生着率が極めて低いことが知られていた¹⁷⁾。そこで、高純度のヒトiPS心筋細胞から構成される直径

150 μ m程度の組織球を作製し、移植を行ったところ、移植後の生着率を大幅に改善することを見出した^{9,18)}。また、筆者らは、移植後のホスト心臓のダメージを最小限かつ移植心筋細胞を均一に分布させるために、ヒトiPS細胞由来心筋組織球の直接心筋内移植用デバイスを開発した¹⁸⁾。さらに、前臨床心不全モデルにおいて、これらのヒトiPS細胞由来心筋組織球をマイクロニブタのクライオインジャリーモデル心臓に移植し、心機能が有意に改善することを示した¹⁹⁾。また、他のグループからも、心筋梗塞または虚血再灌流後のアプローチの心機能の改善と良好な安全性プロファイルが報告されている¹⁹⁻²²⁾。

ヒトiPS心筋細胞移植における課題

ヒトiPS心筋細胞移植における最も重要なリスクは腫瘍形成である。移植細胞における非心筋細胞および未分化幹細胞の混入を限りなくゼロに近づけることにより腫瘍形成のリスクを低減することができる。また、腫瘍形成と並んで重要なリスクは催不整脈作用である。腫瘍化は全ての再生医療に共通するリスクであるが、催不整脈作用はヒトiPS心筋細胞移植に特有のリスクといえる。筆者らと他のグループは、レシピエント心臓への移植後最初の2週間から1か月以内に心室性不整脈が発生し、細胞移植後1か月で消失したことを報告している^{19,22)}。この一過性の移植後心室性不整脈は、移植されたヒトiPS心筋細胞における高い自動能に関連している可能性がある²¹⁾。また最近、ヒトiPS心筋細胞移植後の催不整脈リスクは、アミオダロンとイバブラジンの併用治療によって大幅に減少する可能性があることが示された²³⁾。

今後の展望

ヒトiPS細胞を用いた心筋再生治療における具現化・産業化を展開するためには、大量のヒトiPS心筋細胞を安価かつ安定して作製できるようにする必要がある。また、腫瘍化を来たさないようにするためには、残存未分化幹細胞およびヒトiPS細胞由来の非心筋細胞の混入を回避することは不可欠である。筆者らはヒトiPS細胞とヒトiPS心筋細胞の代謝機構に焦点を当てることにより、再生医療に適した大量の高品質心筋細胞を回収する革新的方法を確立してきた^{1,2,11-15)}。大阪大の宮川教

授らはヒトiPS細胞から心筋シートを作製し、虚血性心筋症患者へ移植することに成功しており、循環器領域においてもヒトiPS細胞を用いた心筋再生治療の臨床応用が開始されている²⁴⁾。今後は、腫瘍化に限らず、不整脈や免疫学的拒絶等の多くの安全性に関わる課題を克服し、有効性を検証することにより、ヒトiPS心筋移植を心臓移植の代替治療法へと発展させることができるだろう。

謝辞

本研究成果は、共同研究者の先生方やご協力いただいている企業の皆様、再生医療グループメンバーによって得られたものであり、この場を借りて感謝申し上げます。また、私のメンターである福田恵一教授に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Someya S, Tohyama S, Kameda K, Tanosaki S, Morita Y, Sasaki K, et al., Tryptophan metabolism regulates proliferative capacity of human pluripotent stem cells, *iScience* 24(2) (2021) 102090.
- 2) Kameda K, Someya S, Fujita J, Fukuda K, Tohyama S. *STAR Protocols* 3(2) (2022) 101341.
- 3) Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, et al., Stage-Specific Optimization of Activin/Nodal and BMP Signaling Promotes Cardiac Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell Lines, *Cell Stem Cell* 8 (2) (2011) 228-240.
- 4) Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, et al., Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells, *Nature Biotechnology* 23(5) (2005) 607-611.
- 5) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al., Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts, *Nature Biotechnology* 25(9) (2007) 1015-1024.
- 6) Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, et al., Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(52) (2006) 19812-19817.
- 7) Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, et al., A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions, *Cell Rep* 2(5) (2012) 1448-60.
- 8) BurrIDGE PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, et al., Chemically defined generation of human cardiomyocytes, *Nature Methods* 11(8) (2014) 855-860.
- 9) Hattori F, Chen H, Yamashita H, Tohyama S, Satoh YS, Yuasa S, et al., Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes, *Nature Methods* 7(1) (2010) 61-66.
- 10) Dubois NC, Craft AM, Sharma P, Elliott DA, Stanley EG, Elefanty AG, et al., SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells, *Nature Biotechnology* 29(11) (2011) 1011-1018.
- 11) Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, et al., Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes, *Cell Stem Cell* 12(1) (2013) 127-137.
- 12) Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, et al., Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells, *Cell Metabolism* 23(4) (2016) 663-674.
- 13) Tohyama S, Fukuda K, Safe and Effective Cardiac Regenerative Therapy With Human-Induced Pluripotent Stem Cells: How Should We Prepare Pure Cardiac Myocytes?, *Circ Res* 120(10) (2017) 1558-1560.
- 14) Tanosaki S, Tohyama S, Fujita J, Someya S, Hishiki T, Matsuura T, et al., Fatty Acid Synthesis Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells, *iScience* 23(9) (2020) 101535.
- 15) Tanosaki S, Akiyama T, Kanaami S, Fujita J, Ko MSH, Fukuda K, Tohyama S. *STAR Protocols* 3(2) (2022) 101360.
- 16) Tohyama S, Fujita J, Fujita C, Yamaguchi M, Kanaami S, Ohno R, et al., Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes, *Stem Cell Reports* 9(5) (2017) 1406-1414.
- 17) Hattan N, Kawaguchi H, Ando K, Kuwabara E, Fujita J, Murata M, et al., Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice, *Cardiovascular Research* 65(2) (2005) 334-344.
- 18) Tabei R, Kawaguchi S, Kanazawa H, Tohyama S, Hirano A, Handa N, et al., Development of a transplant injection device for optimal distribution and retention of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *J Heart Lung*

Transplant 38(2) (2019) 203-214.

- 19) Kawaguchi S, Soma Y, Nakajima K, Kanazawa H, Tohyama S, Tabei R, et al., Intramyocardial Transplantation of Human iPS Cell-Derived Cardiac Spheroids Improves Cardiac Function in Heart Failure Animals, *JACC Basic Transl Sci* 6(3) (2021) 239-254.
- 20) Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, et al., Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts, *Nature* 538(7625) (2016) 388-391.
- 21) Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, et al., Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates, *Nature Biotechnology* 36(7) (2018) 597-605.
- 22) Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sanchez A, Qiang B, Barry J, Laskary A, et al., Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias, *Stem Cell Reports* 12 (5) (2019) 967-981.
- 23) Nakamura K, Neidig LE, Yang X, Weber GJ, El-Nachef D, Tsuchida H, et al., Pharmacologic therapy for engraftment arrhythmia induced by transplantation of human cardiomyocytes, *Stem Cell Reports* 16(10) (2021) 2473-2687.
- 24) Miyagawa, S, Kainuma S, Kawamura T, Suzuki K, Ito Y, Iseoka H, Ito E, Takeda M, Sasai M, Mochizuki-Oda N, et al. Transplantation of iPSC-derived cardiomyocyte patches for ischemic cardiomyopathy. *BMJ* 12 (2022) 2021.