

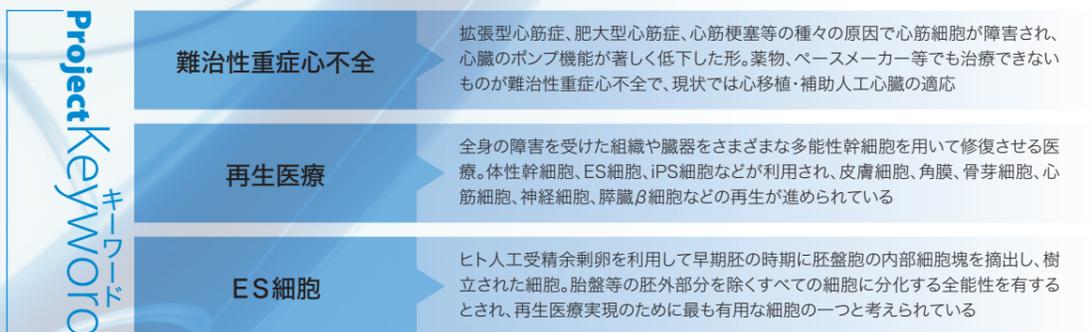
サルおよびヒト胚性幹細胞を用いた 心筋細胞の再生と移植法の開発

研究期間 平成17年度～平成21年度(予定)



※平成21年度における研究体制

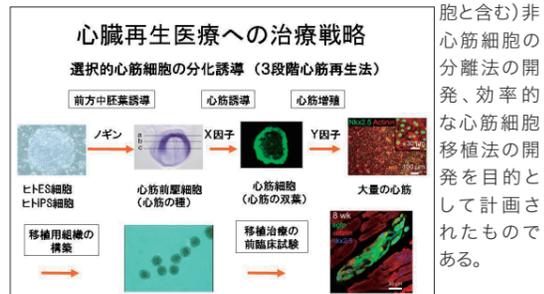
心筋再生医療の具現化に大きく前進



1 研究の背景・意義

再生心筋細胞移植実現に向けて

生活習慣の欧米化に伴い疾患構造も大きく変化し、心疾患による死亡は現在死因の第2位を占めるに至っている。心筋梗塞等の冠動脈疾患は心カテーテル治療の改善により急性期死亡を大きく減少させたが、逆に慢性心不全症例の増加をもたらした。従来からの拡張型・肥大型心筋症を含めた慢性心不全は増加の一途をたどり、特に薬物・ペースメーカー治療に反応しない難治性重症心不全例では、心臓移植しか根本治療がないとされている。しかし、ドナー不足は各国共通の課題であり、海外渡航移植が加速度的に困難になっている現状を考えると、新規治療法の開発は急務の問題である。1999年に我々が、骨髄間葉系幹細胞が心筋細胞に分化する能力を有することを報告して以来、心筋の再生とこれを用いた再生心筋細胞移植の医療応用が叫ばれている。しかし、これを現実の医療にするには充分量の心筋細胞を確保すること、未分化幹細胞と心筋細胞を分離する必要のあること、効率的な移植方法を開発することなど、超えなければならない幾つかの課題がある。本研究では、大量培養可能なサル及びヒトの胚性幹細胞(ES細胞)を用いて、これを効率的に心筋細胞に分化誘導する方法、心筋細胞と(未分化幹細胞を含む)非心筋細胞の分離法の開発、効率的な心筋細胞移植法の開発を目的として計画されたものである。

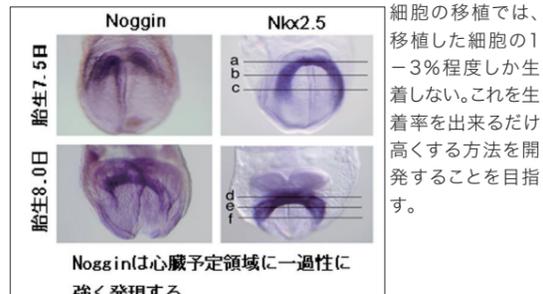


▲ヒトES細胞を用いた再生心筋細胞の作出と細胞移植による心不全治療法の戦略

2 研究プロジェクトの目標

効率的な心筋分化誘導法と移植法の開発

本研究プロジェクトの目標はヒトES細胞を用いて心筋細胞を再生し、これを安全かつ効率的に移植するための基盤技術を開発することである。このためには3つのステップが必要となる。また、ヒトES細胞への準備と前臨床試験を行うためのサルES細胞を使用する必要がある。第一段階の目標はヒトES細胞から効率的に心筋細胞を分化誘導する方法を開発することである。このためには受精後の早期胚の段階で心臓を形成する領域に発現している細胞増殖因子等を同定し、これを利用して心筋細胞を分化誘導する方法を確立することである。さらには、胎児期の心筋は盛んに細胞分裂する能力を有していることから、分化誘導早期の心筋細胞に細胞分裂を惹起する方法あるいは因子を同定し、これを心筋再生に応用することである。第二段階の目標は再生心筋細胞とそれ以外の非心筋細胞(未分化幹細胞を含む)を完全に分離する技術を開発することである。これにより、再生心筋細胞の移植後に奇形腫等の悪性腫瘍の形成を完全に予防できるものとなる。そして、第3の目標は再生心筋細胞を効率的に移植する方法を開発することである。これまで報告されている初代培養心筋細胞あるいは再生心筋細胞の移植では、移植した細胞の1-3%程度しか生着しない。これを生着率を出来るだけ高くする方法を開発することを目指す。

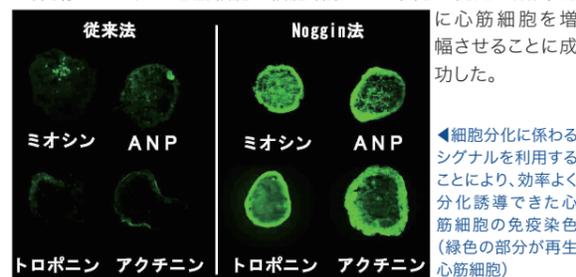


▲発生シグナルを用いたヒトES細胞からの心筋再生。図は早期胚に発現するNogginの発現部位を示す。

3 研究プロジェクトの成果

Nogginによる効率的な心筋細胞誘導

我々はマウス早期胚を用いて心筋予定領域に発現する液性因子をスクリーニングした結果、胎生7.5日の心臓予定領域にBMP2、4の内因性阻害因子のNogginが過性に強発現する現象を見出した。類似現象がニワトリ胚、アフリカツメガエル胚でも観察されることより、心筋形成に必要な因子と推測した。マウスES細胞にNogginを作用させた結果、効率的に心筋細胞に分化誘導された。この現象を利用し、サル及びヒトES細胞を効率的に心筋細胞に分化誘導させることに成功した。同様にサル、ヒト心筋細胞を細胞増殖させる因子を同定し、効率的に心筋細胞を増幅させることに成功した。



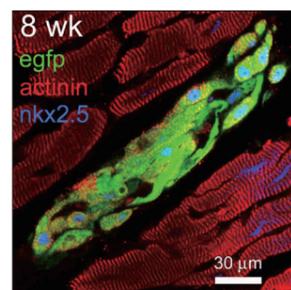
ミトコンドリア法による再生心筋細胞の精製

心筋細胞はすべての細胞の中で最もエネルギー消費の激しい細胞であり、同時にエネルギー産生を必要とする細胞です。このことは心筋細胞が他の細胞に比して、著しく多いミトコンドリアを含有していることとなる。我々は心筋細胞のこの性質を利用し、ミトコンドリアに特異的に取り込まれる蛍光色素を利用し、サルおよびヒトES細胞由来の再生心筋細胞と残存多能性幹細胞を含有する非心筋細胞を分離することに成功した。この方法により分離精製した再生心筋細胞の純度は99.5%以上を達成することが出来、移植により奇形腫等の形成は認められなかった。

▶ミトコンドリア法により精製したヒトES細胞由来再生心筋細胞を示した。純度99.5%以上で奇形腫の形成は認めない。

再凝集法による効率的な心筋細胞移植

これまで動物実験レベルで行われていた胎仔期・新生仔期心筋細胞を成体心臓に移植した実験では長期間生着出来る細胞はごく一部であること(1-3%程度)が知られている。生着率を向上させるため、我々は移植細胞が失われる機序を解明することから始めた。その結果、再生心筋細胞をバラバラに培養液に浮遊させたまま移植することがその原因であることが判明した。我々は高度に純化した後の再生心筋細胞を用いて、再度凝集塊を作製することにより、効率よく細胞移植できることを解明し、90%程度の生着率を誇る非常に効率的な移植方法を開発することに成功した。

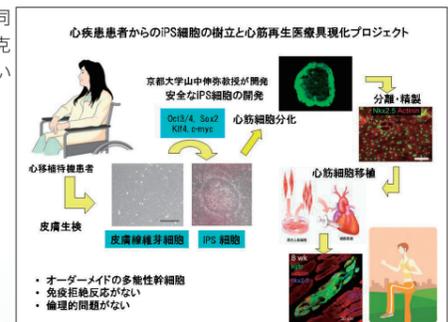


◀再凝集した再生心筋細胞を免疫不全マウスに移植した組織像(移植後8週)。生着率は90%以上の効率的な移植が可能になった。

4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

大量培養技術の開発により臨床応用実用化

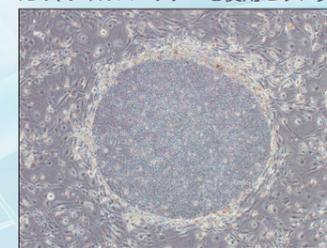
これまでの技術開発により、再生心筋細胞の作製は実験室レベルではほぼ完成レベルに近い状況になってきている。今後の課題としては、ES細胞を安定して大量培養出来る方法を確立することが求められる。ES細胞は培養法が安定しないと未分化性が維持できないことが知られている。また、ヒトES細胞では、(1)マウスES細胞と異なり、MEF細胞(マウス胎仔線維芽細胞)等のフィーダー細胞がないと未分化性が喪失する、(2)未分化性を維持するサイトカインLIFを用いても、マウスES細胞と異なり分化してしまう等の問題が指摘されている。また、(3)ウシ胎児血清が培養に必須であり、既知物質だけ混合培養液では未分化性の維持が出来ない等の問題も指摘されている。しかし、これらの問題はヒトES細胞共通の問題であり、(3)に関しては優れた代替物が多く企業の現存開発されつつある。(1)、(2)に関しては、我々はフィーダー細胞を用いない新たな方法を開発中であり、今後更なる研究で解決できる問題であると考えている。さらに、人手の係らない培養法を確立し、工業的生産ラインを樹立するためには、多くの技術的問題を克服する必要がある。これらに関しても今後企業と共同開発を進め、克服してゆきたいと考えている。



▲患者由来線維芽細胞を用いたiPS細胞の作出と、これを用いた再生心筋細胞による地位不全治療の概念

iPS細胞技術により拒絶反応回避も可能

我々は京都大学の山中伸弥教授との共同研究により、患者さんの皮膚線維芽細胞を採取し、この細胞より誘導性多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立する技術を開発した。iPS細胞はES細胞と共通の性格を持つことにより、我々が開発した方法を応用し、ヒト患者さん由来の心筋細胞を分化誘導することに成功している。また、ヒトiPS細胞由来の再生心筋細胞もES細胞由来のものと同様に分離精製することが可能になっている。したがって、患者本人の細胞から免疫拒絶反応が全く起こらない再生心筋細胞を作出する技術のすべてが完成したことになり、臨床応用が待ち望まれる。今後の課題としては、安全度の高いiPS細胞の樹立が何より重要となっている。現状のiPS細胞の作製法では線維芽細胞に4つの遺伝子を、ウイルスベクターを用いて導入することにより作られる。この方法では外来遺伝子挿入部位の遺伝子破壊や外来遺伝子のマスキングが出来ない場合に腫瘍形成の可能性が考えられる。このため、ウイルスベクターを使用せずに安全にiPS細胞を作製することが求められています。この問題を解決すべく我々は種々の方法を用いてiPS細胞の作出を行っており、既にウイルスベクターを用いない方法でもiPS細胞の作出に成功しており、更なる安全性の確認を進めて研究を推進している。



▲患者さんの皮膚細胞より樹立したiPS細胞

参考文献

Yuasa S, Fukuda K, et al. Transient and strong inhibition of BMP signals by Noggin induces cardiomyocyte differentiation in murine embryonic stem cells. Nature Biotech 23: 607-611, 2005.
Chen H, Fukuda K, et al. Common marmoset embryonic stem cell can differentiate into Cardiomyocytes. Biophys Biochem Res Comm. 369:801-6, 2008.
Tanaka T, Tohyama S, Fukuda K, et al. In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun. 385:497-502, 2009.