

# 徐脈性不整脈の革新的細胞移植治療開発

研究代表者：藤田医科大学東京 先端医療研究センター 遠山 周吾

## 【基本構想】

洞不全症候群や房室ブロック等の徐脈性不整脈では、心不全症状や脳虚血症状が生じるため、一般的に人工ペースメーカー植え込み術が行われる。本邦における件数は年間4万件以上(電池交換を除く)にのぼる。しかし、人工ペースメーカー植え込み術は根治治療法ではなく、定期的な電池交換やリードトラブル、感染、自律神経に対する不応答など、さまざまな課題が存在している(図1)。また、人工ペースメーカーの市場は大きく、国内のみで2000億円規模、世界では約70億米ドルと予測されている(世界の心臓ペースメーカー市場に関する調査レポート：予測2023-2035年、SDK.jp)。本邦では、人工ペースメーカーは100%海外からの輸入に依存しており、8000億円に上る医療機器の貿易赤字の多くを占めている。心臓ペースメーカーオルガノイド移植治療の開発は、人工ペースメーカー植え込み術がかかえる医学的な課題を解決するとともに、海外に依存し、貿易赤字の一因となっている人工ペースメーカーからの脱却につながることを期待される。そこで本事業では、ヒトiPS細胞から作製したバイオペースメーカー細胞移植により、従来の課題を解決することを目的として研究を行う。ペースメーカー細胞移植治療を実現するにあたり、①ペースメーカー細胞の大量作製、②腫瘍化の原因となる残存未分化幹細胞の除去、③徐脈性不整脈モデル大型動物の作製、④ヒト細胞を生着可能な大型動物の作製、⑤効率よい移植法の開発、⑥臨床グレード培養法の確立、⑦臨床応用のノウハウ・経験値、といった課題が存在するが(図2)、当研究室ではその課題の多くを克服する技術をこれまでに開発してきた(①関連、iScience 2021, STAR Protocols 2022a, Stem Cell Rep 2017、②関連、Cell Stem Cell 2013, Cell Metab 2016, iScience 2020, STAR Protocols 2022b、④関連、Nat Commun 2019、⑤関連、Nat Methods 2010, J Heart Lung Transplant 2019、⑥関連、Stem Cell Rep 2017)。また、我々は臨床応用が目前に迫った重症心不全患者に対するヒトiPS細胞由来心室筋細胞移植療法における臨床研究の実務責任者および品質管理責任者を務めており、⑦に関しても十分なノウハウと経験値が備わっている。ヒトiPS細胞からペースメーカー細胞を含むオルガノイドという組織塊を効率よく作製し、徐脈性不整脈患者の心臓に移植することで、人工ペースメーカー植え込み治療ではなし得なかった、徐脈性不整脈に対する真の根治治療法を開発することを目指す。

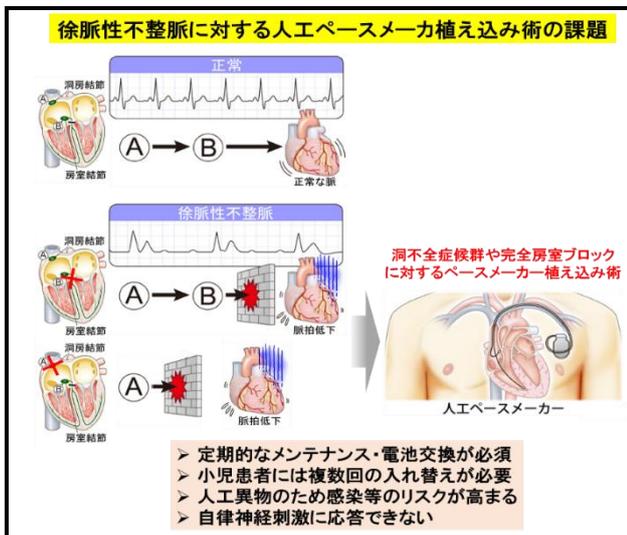


図1：徐脈性不整脈に対する人工ペースメーカー植え込み術の課題

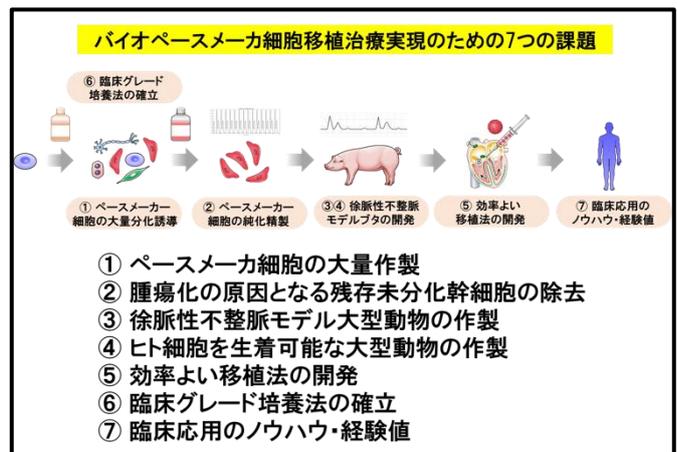


図2：ペースメーカーオルガノイド移植治療実現のための課題

## 1. 研究目的

本事業の目的は、移植後に拒絶反応が起こりにくいように遺伝子改変を行った低免疫原性ヒト iPS 細胞から心臓ペースメーカーオルガノイドを作製し、それを心臓へ移植することで徐脈性不整脈の治療を可能にする新たな治療法を構築することである。上述(図2)にあるような課題を解決するために、具体的にはトリプトファン強化培養液によるヒト iPS 細胞の増殖促進法 (①関連, *iScience* 2021, *STAR Protocols* 2022a)、心筋細胞の大量作製法 (①関連, *Stem Cell Rep* 2017)、培養上清中 miRNA を用いた品質管理法 (②関連, *Stem Cell Rep* 2023, 戦略的研究シーズ育成事業成果)、特殊培養液による超高純度 (99%以上) 心筋作製法 (③関連, *Cell Stem Cell* 2013, *Cell Metab* 2016)、ペースメーカー細胞の純化精製法 (③関連, *unpublished* 特許出願, 戦略的研究シーズ育成事業成果)、脂肪酸合成経路阻害による残存未分化幹細胞除去 (③関連, *iScience* 2020, *STAR Protocols* 2022b)、心筋組織球移植法の開発 (④関連, *Nat methods* 2010, *Cell Reports Methods* 2023, 戦略的研究シーズ育成事業成果)、奇形腫イメージング法の開発 (④関連, *iScience* 2024, 特許出願, 戦略的研究シーズ育成事業成果)、ヒト細胞を生着可能な中大動物への免疫抑制剤投与条件の同定 (⑤関連, *Circulation* 2024, 戦略的研究シーズ育成事業成果)、臨床グレード培養液の開発 (⑥関連, *Stem Cell Rep* 2023) 等である。

戦略的研究シーズ育成事業における期間においては、**①**ペースメーカー細胞の分化誘導法の確立、**②**ペースメーカー細胞の純化精製法の確立、**③**オルガノイド作製法の確立、**④**移植細胞の品質評価システムの構築、**⑤***in vitro* PoC の取得、**⑥***in vivo* 造腫瘍試験および奇形腫のイメージング法の確立、**⑦**ヒト細胞をサルに生着可能な免疫抑制剤投与条件の同定、に関する研究を行った。

## 2. 研究成果

### ① ペースメーカー細胞の分化誘導法の確立

心不全に対する細胞移植治療においては心室筋細胞が、徐脈性不整脈に対する細胞移植治療においてはペースメーカー細胞 (および心筋細胞) が必要である。ヒト iPS 細胞から心室筋細胞への分化誘導に関しては、発生の過程を模倣し、Wnt シグナルや BMP シグナルを調節することで可能となっている。そこで、本プロジェクトにおいて必要となるペースメーカー細胞への分化誘導についても、発生学的な観点から試みることとした結果、心筋細胞とペースメーカー細胞を効率よく分化誘導することに成功した。この条件で分化誘導した細胞集団に対してシングルセル RNA-seq を行ったところ、SHOX2 陽性のペースメーカー細胞が含まれていることを確認した。誘導効率をさらに向上させるため、30 以上の条件を検討し、最終的にペースメーカー細胞の分化効率を増加させることに成功した。ペースメーカー細胞の含有率が高いほど安定した品質のオルガノイドを作製することが可能であり、また移植細胞数を減らすことにも直結する (*unpublished*)。

さらに誘導ペースメーカー細胞の特性を評価するべく、拍動解析を行なった。ヒト iPS 細胞から作製したペースメーカー細胞と比較対象として心室筋細胞における拍動数を評価したところ、心室筋の拍動数は約 45 回/分であったのに対し、ペースメーカー細胞の拍動数は約 90 回/分であり、有意に高いことを確認した。また、未分化コロニー試験を用いることで残存未分化幹細胞の混入が 0.01%未満であることを確認した。現在は、移植細胞から分泌されているタンパクの定量を進めており、分化の安定性評価の指標となるタンパクの探索を行なっている。

### ② ペースメーカー細胞の純化精製法の確立

従来のペースメーカー細胞の選別方法として、ペースメーカー細胞特有の遺伝子座に蛍光タンパクを組み込み、セルソーターを用いて選別する手法が主であるが、移植治療を目的とした本事業に用いることは難しい。我々は、心筋細胞と非心筋細胞の代謝の違いを利用し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞のみを純化精製できることを報告した (*Cell Stem Cell* 2013, *Cell Metab* 2016)。具体的には、グルコースとグルタミンを除き乳酸を添加した培地で培養す

ると、非心筋細胞は生存できず、心筋細胞のみを純化精製することができる。本研究では、代謝の違いを利用して、ヒト iPS 細胞由来の心室筋細胞は生存できず、ペースメーカー細胞（および心房筋細胞）が生存可能な培養条件を開発した。心室筋細胞およびペースメーカー細胞（および心房筋細胞）の代謝を詳細に検討し、その結果に基づいた特殊培地で培養したところ、心室筋細胞は生存できないが、ペースメーカー細胞（および心房筋細胞）は生存できることを明らかにした(*unpublished*, 特許申請中)。ヒト iPS 細胞からペースメーカー細胞へ分化誘導した後に、特殊培地に暴露させることで、ペースメーカー細胞（および心房筋細胞）のみを純化精製することが可能となった。

培養液を用いた細胞選別研究において、我々のグループは世界をリードしてきたが、本研究成果も世界初の研究成果であり、特許出願を行っている（特願 2024-110373）

### ③ オルガノイド作製法の確立

我々は、多孔質のマイクロウェル担体を用いて心筋細胞の懸濁液を下から吸引することで、短期間で大量の均質なオルガノイドを効率よく作製する手法を開発した

([図 3: Cell Reports Methods 2023, STAR Protocols 2025](#))

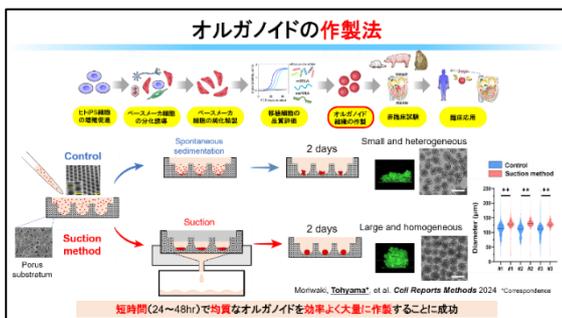


図 3：吸引法による均質なオルガノイド作製法

### ④ 移植細胞の品質評価システムの構築

移植細胞の品質を評価するにあたり、従来は flow cytometry や免疫染色、QPCR を用いていたが、貴重な細胞を多く消費することや途中の段階で順調に分化しているかの判断が困難であった。そこで、我々はシスメックス株式会社との共同研究により、培養上清中の miRNA を用いることで、中胚葉分化や心筋分化が順調に進んでいるかを簡便に評価する手法を構築した (*Stem Cell Reports*

2023)。

### ⑤ in vitro PoC の取得

我々は、心臓コラーゲンを用いてヒト iPS 細胞由来心室筋細胞から心室筋組織を作製することで、成熟した心室筋組織が作製できることを報告し (*Biomaterials* 2023)、その手法を活用することにより、拍動数が 25 回/分程度の in vitro 徐脈性不整脈モデルを構築することに成功した (unpublished)。in vitro 徐脈性不整脈モデルに、ペースメーカーオルガノイドを結合させたときに、徐脈を改善できるかどうかを検討した。まず、ヒト iPS 細胞から、心室筋細胞、心房筋細胞、ペースメーカー細胞を分化誘導し、それぞれのオルガノイドを作製した。オルガノイドの拍動数は、速い順にペースメーカーオルガノイド>心房筋オルガノイド>心室筋オルガノイドであった。これらのオルガノイドを心室筋組織と結合させて、Motion Vector Imaging System (SONY)を用いて拍動解析を行った。その結果、心室筋オルガノイドを結合させた際の拍動数は 25 回/分程度と結合前と変わらなかったが、心房筋オルガノイドを結合させた際の拍動数は 45 回/分程度とやや速くなり、ペースメーカーオルガノイドを結合させた際の拍動数は 70 回/分程度と拍動数が正常化することがわかった。一方で、収縮力はどのオルガノイドを結合させても変化は見られなかった。in vitro 徐脈性不整脈モデルにペースメーカーオルガノイドを結合させることで徐脈を改善させることができ、in vivo において徐脈性不整脈を治療できる可能性が示唆された

### ⑥ in vivo 造腫瘍試験および奇形腫のイメージング法の確立

ヒト iPS 細胞から分化誘導したペースメーカー細胞からペースメーカーオルガノイドを作製し、免疫不全マウス (NOG マウス)の心臓に移植し、in vivo における生着を確認したところ、腫瘍は認めず、ペースメーカーオルガノイドの移植組織がしっかりと生着していることを確認した。移植心筋組織内には、ホストからの微小血管が豊富に入り込んでおり、生着に寄与していると考えられた。ヒト iPS 細胞由来心筋細胞の細胞移植治療において、移植細胞に未分化 iPS 細胞が残存していた場合に、移植部

位もしくは異所性に奇形腫が形成される可能性がある。そのため、移植後に奇形腫が形成された場合に、それを早期に発見できる非侵襲的なイメージング法の開発が求められている。そこで、まず奇形腫の代謝を明らかにするために、奇形腫を含む心臓組織切片に対してイメージング質量分析を行ったところ、奇形腫内にはフェニルアラニンやトリプトファンといった芳香族アミノ酸が豊富に蓄積していることが明らかとなった (図4)。アミノ酸の中で最も蓄積していたのがフェニルアラニンであったことから、 $[^{18}\text{F}]$ フルオロフェニルアラニンを合成し、奇形腫への集積を評価することとした。皮下に未分化iPS細胞を移植して奇形腫を形成させた免疫不全マウスに対して、 $[^{18}\text{F}]$ フルオロフェニルアラニンを投与したところ、奇形腫への集積を認め (図5)、 $[^{18}\text{F}]$ フルオロフェニルアラニンをを用いることで皮下や異所性 (骨格筋内) に形成された奇形腫を検出できることが示唆された (iScience 2024)。

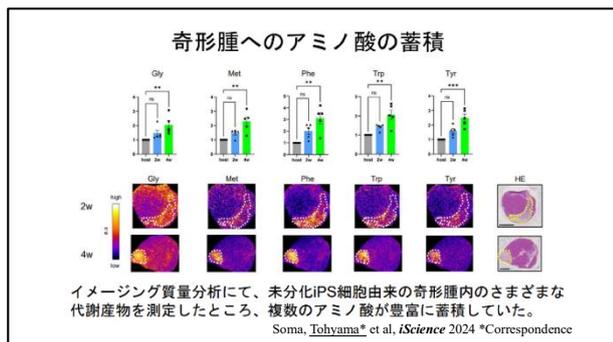


図4：イメージング質量分析による奇形腫に蓄積するアミノ酸の探索

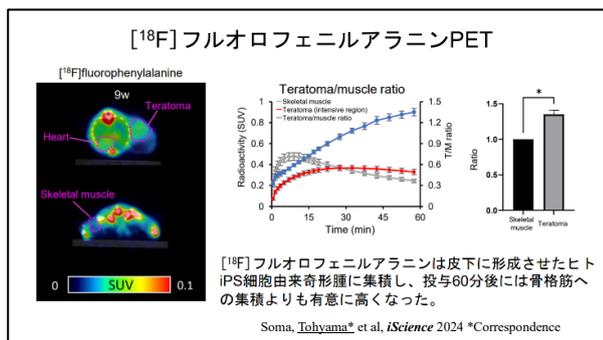


図5：奇形腫を可視化する技術の開発

## ⑦ 異種移植における免疫抑制剤プロトコルの確立

心筋梗塞モデルのカニクイザルの心臓にヒトiPS細胞由来心筋スフェロイドを移植し、生着や心機能を評価する実験を行った (Circulation 2024)。本研究では、ヒト細胞をサルに生着させるために適切な免疫抑制剤を用いる必要があったが、これまでの検討を踏まえて、シクロスポリン、メチルプレドニゾロン、アバタセプト (CTLA4Ig) の3剤を用いることで、良好な生着が得られることを確認した (図6)。



図6：異種移植における免疫抑制剤プロトコルの確立

# 業績

## 【原著論文】

1. Soma Y, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, Kubo A, Yamasaki T, Kabasawa N, Haga K, Tani H, **Morita-Umei Y**, Umei TC, Sekine O, Nakamura M, Moriwaki T, Tanosaki S, Someya S, Kawai Y, Ohno M, Kishino Y, Kanazawa H, Fujita J, Zhang MR, Suematsu M, Fukuda K, Ieda M.  
Metabolic changes of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and teratomas after transplantation  
*iScience* 27(11), 111234, 2024.
2. Masuda A, Kurashina Y, Tani H, Soma Y, Muramatsu J, Itai S, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**, Onoe H\*.  
Maturation of Human iPSC-Derived Cardiac Microfiber with Electrical Stimulation Device.  
*Advanced healthcare materials* 2024,13(27), e2303477, 2024. [Front cover of the issue](#)
3. Kobayashi H, **Tohyama S\*(\*Co-first & Corresponding author)**, Ichimura H, Ohashi N, Chino S, Soma Y, Tani H, Tanaka Y, Yang X, Shiba N, Kadota S, Haga K, Moriwaki T, Morita-Umei Y, Umei TC, Sekine O, Kishino Y, Kanazawa H, Kawagishi H, Yamada M, Narita K, Naito T, Seto T, Kuwahara K, Shiba Y\*, Fukuda K.  
Regeneration of Nonhuman Primate Hearts With Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Spheroids.  
*Circulation* 150(8) 611-621, 2024.

## 【総説】

1. Ohno M, Tani H, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**.  
Development and application of 3D cardiac tissues derived from human pluripotent stem cells.  
*Drug metabolism and pharmacokinetics* 60 101049, 2025.
2. Soma Y, Tani H, Morita-Umei Y, Kishino Y, Fukuda K, **Tohyama S\*(\*Corresponding author)**.  
Pluripotent stem cell-based cardiac regenerative therapy for heart failure.  
*Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 187 90-100, 2024
3. 岸野 喜一, 市原 有起, **遠山 周吾**  
患者まで届いている再生医療 難治性重症心不全患者を対象とした同種 iPSC 細胞由来心筋スフェロイド移植  
再生医療 23(2) 78-83 2024 年 5 月

## 【口頭発表】

1. **遠山 周吾**  
循環器疾患に対するヒト iPSC 心筋組織球移植治療法の開発  
第 89 回 日本循環器学会学術集会  
2025 年 3 月 28 日～30 日
2. **遠山 周吾**  
ヒト iPSC 細胞を用いた心筋再生と疾患研究のための基盤技術開発  
第 34 回 日本循環薬理学会  
2024 年 12 月 20 日
3. **遠山 周吾**  
重症心不全に対するヒト iPSC 細胞を用いた心臓再生医療：基礎から臨床へ  
CVMW2024 国際心臓研究会 日本部会  
2024 年 12 月 8 日
4. **遠山 周吾**  
多能性幹細胞の代謝制御による心筋製造と再生医療への応用  
第 47 回 日本分子生物学会  
2024 年 11 月 30 日
5. **Shugo Tohyama**  
Human iPSC-Based Cardiac Regenerative Therapy: From Bench to Bedside  
KSSCR 2024 Annual Meeting 開催地：ソウル  
2024 年 8 月 30 日
6. **遠山 周吾**  
ヒト iPSC 細胞を用いた心臓再生医療：基礎から応用へ 次世代研究者が挑む再生医療の最前線  
2024 年 7 月 29 日

## 【特許】

- (1)国内特許出願 2 件
- (2)国際特許出願 0 件