

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に対して、一般的に人工ペースメーカ植え込み術が行われており、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。しかしながら、人工ペースメーカ植え込み術は根治治療ではなく、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等、さまざまな課題が存在している。そこで本研究では、ヒトiPS細胞からペースメーカオルガノイドを作製し、移植することにより、従来の全ての課題を解決することを目的として研究を行う。

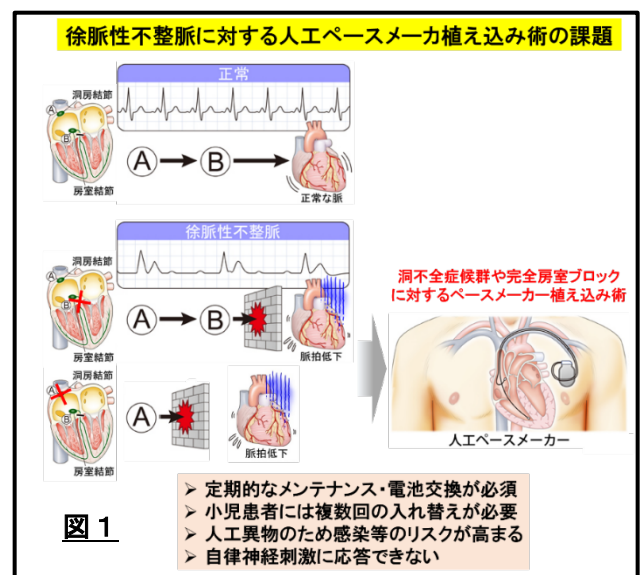
ペースメーカオルガノイド移植治療を実現するにあたり、① ペースメーカ細胞の大量作製、② 細胞の品質評価法、③ 心筋細胞の純化精製法、④ オルガノイド作製法、⑤ ヒト細胞を生着可能なモデル動物の作製、⑥ 臨床グレード培養法の確立、⑦ 臨床応用の経験値、といった課題が存在するが、我々は、ヒトiPS細胞の増殖促進法（①関連, *iScience* 2021, *STAR Protocols* 2022a）、心筋細胞の大量作製法（①関連, *Stem Cell Rep* 2017）、培養上清中miRNAを用いた品質管理法（②関連, *Stem Cell Rep* 2023）、特殊培養液による超高純度心筋分離培養法（③関連, *Cell Stem Cell* 2013, *Cell Metab* 2016）、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）、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）、臨床グレード培養液の開発（⑥関連, *Stem Cell Rep* 2023）等、その課題の多くを克服する技術を開発してきた。また、ヒトiPS細胞由来心室筋スフェロイド移植治療において臨床応用を主導した実績があり、⑦に関しても十分な経験値が備わっている。

上述の技術を駆使することで、徐脈性不整脈に対するペースメーカオルガノイド移植治療を確立するための基盤技術を構築する。

1. 研究目的

洞不全症候群や房室ブロック等の徐脈性不整脈に対して、一般的に人工ペースメーカ植え込み術が行われており、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。しかしながら、人工ペースメーカ植え込み術は根治治療ではなく、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等、さまざまな課題が存在している（**図1**）。また、産業的側面においても、人工ペースメーカは100%海外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。

また、我々はヒトiPS細胞を用いた再生医療におけるさまざまな技術を開発してきた。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

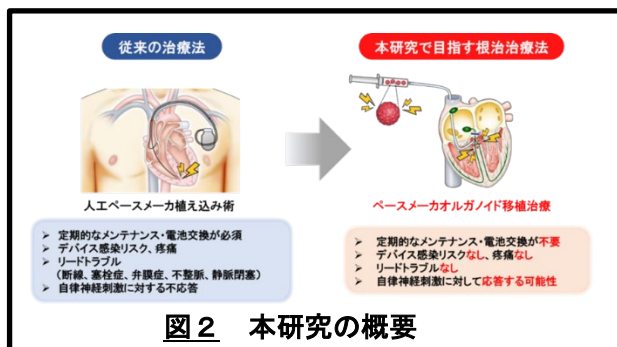


いた品質管理法（②関連, *Stem Cell Rep* 2023）、特殊培養液による超高純度（99%以上）心筋作製法（③関連, *Cell Stem*

Cell 2013, Cell Metab 2016)、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 2019)、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)、臨床グレード培養液の開発 (⑥関連, Stem Cell Rep 2023) 等である。また、ヒト iPS 細胞由来心室筋スフェロイド移植治療において臨床応用の実績があり、⑦に関しても十分な経験値が備わっている。

本研究では、ヒト iPS 細胞から作製したペースメーカーオルガノイドを移植することにより、従来の全ての課題を解決することを目的として研究を行う (図2)。

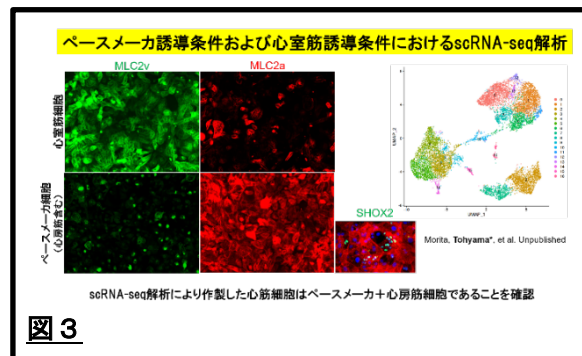
ヒト iPS 細胞は再生医療における有用な細胞源ペースメーカーオルガノイド移植治療を実現するにあたり、① ペースメーカー細胞の大量作製、② 細胞の品質評価法、③ 心筋細胞の純化精製法、④ オルガノイド作製法、⑤ ヒト細胞を生着可能なモデル動物の作製、⑥ 臨床グレード培養法の確立、⑦ 臨床応用の経験値、といった課題が存在するが、上述の通り我々はそれらの課題を克服する技術を開発してきた。そこで、上述の技術およびこれまでの経験値を総動員し、本研究を遂行する。



2. 研究成果

研究成果1：ペースメーカー細胞の製造と特性解析

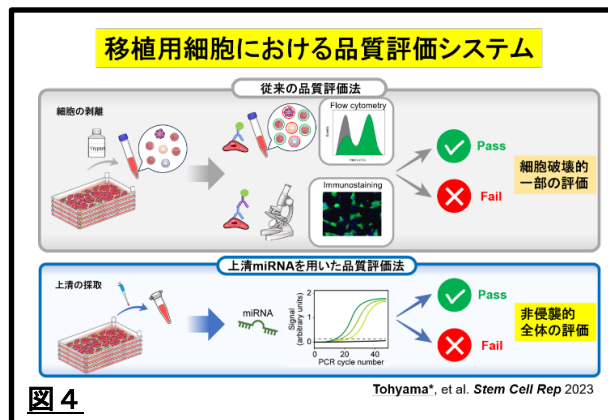
我々は、これまでの検討により、ヒト iPS 細胞から高純度の心室筋細胞と、ペースメーカー細胞（心房筋を含む）を作り分けることに成功した (unpublished, 図3)。また、ペースメーカー細胞においては、長期培養を行っても拍動数 90-100 回/分が維持されることを確認した。さらに、東京大・野村先生との共同研究により single-cell RNA-seq 解析を実施し、ペースメーカー細胞の存在を確認した。



研究成果2：ペースメーカー細胞の品質評価

従来の品質評価法は、製造している接着細胞を剥離・単離し、flow cytometry や免疫染色、QPCR による評価が主であったが、貴重な細胞を破壊する必要があること、全体の評価ではなく一部の評価であること、分化の途中の段階の品質が評価できないこと、等といった課題があった、

そこで我々は、心筋分化過程において培養液中に分泌される miRNA を網羅的に解析し、培養上清中の miRNA を検出することで、中胚葉分化効率、心筋分化効率、未分化幹細胞の残存率等を定量化する方法を開発した (Stem Cell Rep 2023, 図4)。



研究成果3：ペースメーカーオルガノイドの作製

心臓オルガノイドの作製において、従来は細胞の懸濁液をマイクロウェルプレートに播種することで、細胞が沈降し、凝集塊を形成させることにより、作製していたが、細胞死等によりロスする細胞が多く、オルガノイドの形成に約 1 週間を要するといった課題があった (JACC Basic to Cell Reports Methods 2023)。

そこで、我々は、多孔質のプレートを用いて、プレート下面から陰圧をかけることにより、効率よく細胞を凝集させることで、短期間で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 (*Cell Reports Methods* 2023、**図5**)。

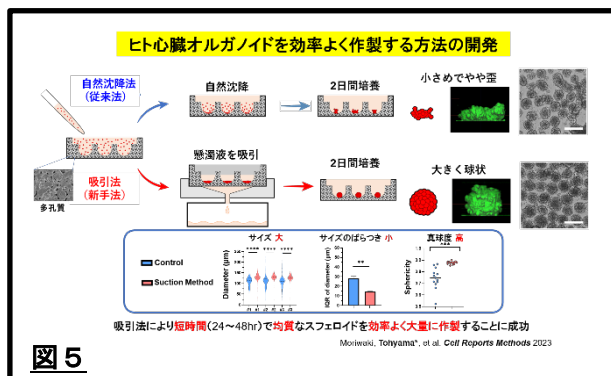


図5

研究成果4 : *in vitro* における有効性評価 (*in vitro* PoC)

我々は、ヒト iPS 細胞から作製した心拍数 20-40 程度の心室筋オルガノイド (*in vitro* 徐脈モデル) に、心拍数 100 程度のペースメーカーオルガノイドを結合することで心拍数が正常化することを確認した (*in vitro* PoC、**図6**)。

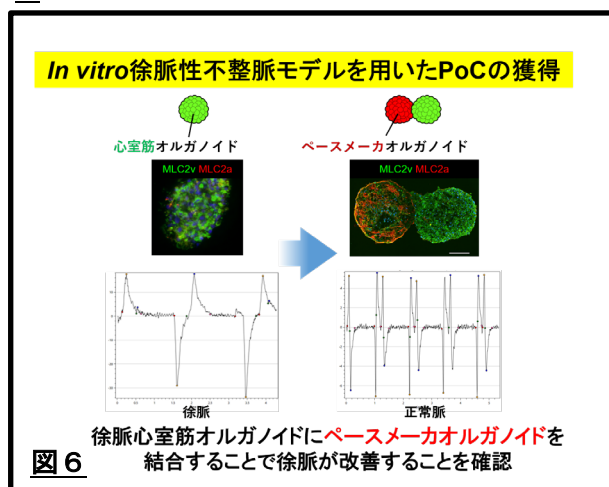


図6

研究成果5 : ヒト細胞をサルに生着させる条件

一方で、我々らは、ヒト細胞を生着する観点において、ブタに比べてサルにおいて有利であり、信州大・柴先生との共同研究により、ヒト細胞がサル心臓内に免疫拒絶なく効率よく生着することに成功した (*Circulation* 2024、**図7**)

また、シングルセルの移植する場合に比べて、オルガノイドを移植することにより、効率よく生着させることが可能であることを示した。

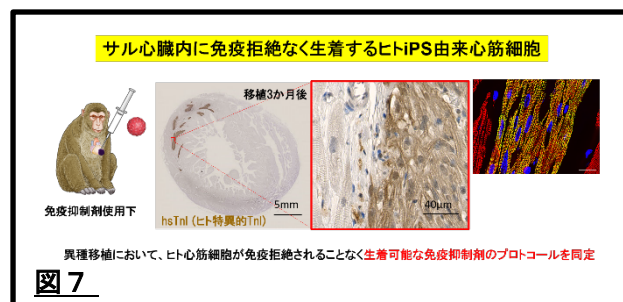


図7

以上の通り、本プロジェクトでは当初掲げていた目標を順調に達成しており、*Cell Press* 発刊の学術誌や循環器領域の最高峰の雑誌である *Circulation* 等にも成果を発表しており、国内外に大きなインパクトを発信している。今後は、本プロジェクトをさらに発展させ、産業応用の基盤を構築していきたいと考えている。

業績

【原著論文】

1. Kobayashi H[#], **Tohyama S[#]**(***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 S, Kishino Y, Kanazawa H, Kawagishi H, Yamada M, Narita K, Naito T, Seto T, Kuwahara K, Shiba Y*, Fukuda K.
Circulation 150(8), 611-621(2024)
Regeneration of Nonhuman Primate Hearts With Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Spheroids.
2. Moriwaki T, Tani H, Haga K, **Morita-Umei Y**, Soma Y, Umei T, Sekine O, Takatsuna K, Kishino Y, Kanazawa H, Fujita J, Fukuda K, **Tohyama S^{*}**(***Corresponding author**), Ieda M,
Cell Reports Methods, 3(12), 100666(2023)
Scalable production of homogeneous cardiac organoids derived from human pluripotent stem cells.
3. Kurashina Y, Fukada K, Itai S, Akizuki S, Sato R, Masuda A, Tani H, Fujita J, Fukuda K, **Tohyama S^{*}**(***Corresponding author**), Onoe H*,
Advanced Science, e2301831(2023)
Hydrogel-sheathed hiPSC-derived heart microtissue enables anchor-free contractile force measurement
4. Sekine O, Kanaami S, Masumoto K, Aihara Y, **Morita-Umei Y**, Tani H, Soma Y, Umei T, Haga K, Moriwaki T, Kawai Y, Ohno M, Kishino Y, Kanazawa H, Fukuda K, Ieda M, **Tohyama S^{*}** (***Corresponding & last author**),
Stem Cell Reports, 18(10)1, 1925-1939(2023)
Seamless and Non-Destructive Monitoring of Extracellular MicroRNAs during Cardiac Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells.
5. Tani H, Kobayashi E, Yagi S, Tanaka K, Kameda-Haga K, Shibata S, Moritoki N, Takatsuna K, Moriwaki T, Sekine O, Umei T, **Morita Y**, Soma Y, Kishino Y, Kanazawa H, Fujita J, Hattori S, Fukuda K, **Tohyama S^{*}** (***Corresponding & Last author**),
Biomaterials, 299, 122174(2023)
Heart-derived collagen promotes maturation of engineered heart tissue.

【総説】

1. 谷 英典, **遠山 周吾**
実験医学, 42(5), 728-735 (2024)
三次元新組織の開発とその応用
2. 谷 英典, **遠山 周吾**, 小林 英司

Organ Biology, 31(1), 12-16(2024)

成熟度の高いオルガノイドを試験管内でいかに作り上げるか? ブタ臓器特異的細胞外基質の特性と心臓由来コラーゲンの利用

3. Yusuke Soma Y, Tani H, Morita-Umei Y, Kishino Y, Fukuda K, **Tohyama S^{*}** (***Corresponding author & last author**),
J Mol Cell Cardiol, 187, 90-100(2024)
Pluripotent stem cell-based cardiac regenerative therapy for heart failure.
4. 梅井 智彦, 森田 唯加, **遠山 周吾**
カレントセラピー, 42(1), 20-15(2024)
培養液を利用したヒト iPS 細胞由来心筋細胞の大量選別法と品質評価法の開発
5. Kishino Y, **Tohyama S^{*}**(***Corresponding author**), Morita Y, Soma Y, Tani H, Okada M, Kanazawa H, Fukuda K,
Journal of cardiac failure, 29(4),503-513(2023)
Cardiac Regenerative Therapy Using Human Pluripotent Stem Cells for Heart Failure: A State-of-the-Art Review.
6. 遠山周吾.
味の素グループ ASV レポート(2023)
再生医療用培地における味の素グループの優位性

【口頭発表】

1. **遠山 周吾**
重症心不全に対するヒト iPS 由来高純度心筋細胞移植：基礎から臨床へ
第 23 回日本再生医療学会総会、2024 年 3 月 23 日、新潟 招待
2. **Shugo Tohyama**
Metabolism-based production of cardiomyocytes from human PSCs for regenerative therapy
Cardiovascular Bioengineering (NIH 主催) 2023、2023 年 5 月 29、京都 招待
3. **遠山 周吾**
重症心不全に対する心筋再生治療法の開発
第 9 回日本心筋症研究会、2023 年 5 月 13 日、大阪 招待
4. **遠山 周吾**
重症心不全に対する心筋再生治療法の開発
第 31 回日本医学会総会 2023 東京、2023 年 4 月 22 日、東京 招待

【特許】

- (1)国内特許出願 0 件
- (2)国際特許出願 0 件

