

## 次世代心筋再生治療の開発

柴 祐司

信州大学医学部

### 【研究の背景】

心不全に対する内科的・外科的治療は発展しているが、根本的治療は心臓移植のみである。しかし、ドナー心臓は極めて不足しており、新しい治療法開発が必要である。そこで、多能性幹細胞を用いた心筋再生研究が活発に行われ、すでに臨床試験が開始されている。しかし、現状の臨床試験は、移植心筋細胞の生着不良、移植後不整脈という二つの課題が未解決のまま行われている。

### 【目 的】

本研究では、移植心筋細胞の生着不良、移植後不整脈という二つの課題を解決した「次世代の心筋再生治療」を確立する。次世代心筋再生治療は、より有効性と安全性が高く、さらに低コストで提供が可能である。

### 【方 法】

#### (1) 移植心筋細胞の生着効率

ヒト生体心臓には約 40 億 ( $4 \times 10^9$ ) 個の心筋細胞が存在し、心筋梗塞により約  $1 \times 10^9$  個の心筋細胞が壊死すると考えられている。インパクトのある心筋再生治療を行うためには、 $10^9$  個程度の生着心筋細胞が必要と考えられる。しかし、移植心筋の生着効率が極めて低いことが知られ、多大な細胞作製費用が心筋再生実用化の妨げとなっている。私たちは、心筋グラフト内に、新生血管網が形成され、血管新生亢進がグラフト心筋の生着効率を改善させることを報告した。さらに、ヒートショックプロテインの一種である CRYAB が、血管新生能の指標として有用であることを見出した。本研究では、心筋移植後の血管新生および生着効率改善を目指し、有効な刺激因子を見出す。CRYAB 発現を簡便に評価するため、CRISPR/Cas9 により CRYAB 遺伝子下流に蛍光レポーター遺伝子を組み込んだ CRYAB レポーター iPS 細胞株を作製した。心筋細胞生着効率改善を目指して、①レポーター iPS 心筋細胞における CRYAB 発現を亢進させる因子を同定する。さらに、②in vitro における、刺激因子添加後心筋細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の共培養による migration assay、tube formation assay を経て、③最終的に in vivo で、免疫不全ラットにおける血管新生・心筋生着効率を確認する。

#### (2) 移植後不整脈の管理

私たちは心筋細胞移植が不整脈発症頻度を有意に増加させることを世界で初めて報告した。この移植後不整脈は、大動物モデルにおいてのみ観察できる現象である。移植後不整脈発症の原因は、高い自動能をもつグラフト心筋による異所性ペーシングと考えられ、遺伝子操作による自動能抑制が試みられている。Murry グループは 4 つの遺伝子修飾によって移植後不整脈が抑制できることを明らかとした (Cell Stem Cell 2023)。しかし、遺伝子変異細胞には安全性の懸念があり、臨床応用は困難である。そこで、本研究では、様々な抗不整脈薬の組み合わせで、移植後不整脈を制御できるか検討する。in vitro における Multi-Electrode Array (MEA) システムにおいて、iPS 心筋に対して様々な抗不整脈薬およびそれらの組み合わせを投与し、効率よく不整脈原性を抑制できる薬剤を見出し、この薬剤 (またはその組み合わせ) を移植後不整脈が再現できるカニクイザル同種心筋細胞移植モデルに用いて検証する。

## 【結 果】

### (1) 移植心筋細胞の生着効率

In vitro において CRYAB レポーター iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、二つのヒット化合物(化合物 A および化合物 B)を同定した。二つの化合物を用いてヒト iPS 細胞由来心筋細胞と HUVEC の共培養による血管新生能の評価を行ったところ、化合物 A において血管新生能増加が確認出来た。さらに化合物 A で処理したヒト iPS 細胞由来心筋細胞を心筋梗モデル免疫不全ラットに移植したところ、無処理のヒト iPS 細胞由来心筋細胞と比較して、有意にグラフト生着が向上した。細胞生着向上のメカニズムとして、細胞老化抑制、ストレス耐性、アポトーシス抑制の関与も証明した。

### (2) 移植後不整脈の管理

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を MEA 上で培養し、抗不整脈薬の効果を in vitro で検証した。カリウムチャンネルブロッカーであるアミオダロン投与によって、濃度依存性に活動電位持続時間の延長を認め、HCN チャンネルブロッカーであるイバブラジンによって濃度依存性に拍動数の低下が認められた。これまでイオンチャンネルの遺伝子改変による抗不整脈作用の検討では、単独イオンチャンネルの改変では十分な抗不整脈作用が示されていないことから、本研究では作用機序の異なる二つの抗不整脈薬を併用し、in vivo で検証することとした。

心筋梗塞モデルカニクイザルに  $2 \times 10^8$  の同種他家 iPS 細胞由来心筋細胞を移植し、移植後不整脈を Holter 心電図で評価した。動物はアミオダロン+イバブラジン移植後 4 週間投与群と非投与群と比較した。非投与群では、ほぼ全例で移植後不整脈が長時間観察されたが、投与群では移植後不整脈の著明な減少が確認できた。さらに投与群においては、移植 4 週後にアミオダロン/イバブラジンを中止した直後から、移植後不整脈が観察された。本結果から、アミオダロン/イバブラジン併用が移植後不整脈抑制に有効であることが証明された。

## 【考 察】

心筋再生治療の実用化において、移植細胞の生着効率の向上と移植後不整脈の管理は大きな課題である。私たちは、心筋細胞移植後のグラフト組織への血管新生が生着効率向上に寄与することを見出し、スクリーニングの結果、血管新生の更新とグラフト生着効率向上を来たす化合物を見出した。本化合物について現在特許出願を目指して、追加検討を行っている。また、移植後不整脈に対してアミオダロン/イバブラジン併用が有効であることを見出した。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

現在臨床試験が行われている心筋再生治療において、移植細胞の生着効率の向上と移植後不整脈の管理に関する新しい知見を得た。