

重症心不全の新規治療法の開発 ～ iPS 細胞を用いた橋渡し研究と臨床応用～

執筆者所属：

- 1 大阪大学大学院医学系研究科最先端再生医療学共同研究講座
- 2 大阪大学医学部附属病院未来医療開発部
- 3 大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科学講座

執筆者氏名：

笹井 雅夫^{1,2}，河村 拓史³，宮川 繁^{2,3}



再生医療は、有効な治療法のない疾患に対して新たな治療法となりうることを期待されている。大阪大学では様々な領域で再生医療につながる技術開発が進められており、基礎研究、橋渡し研究を経て臨床応用された技術が多く存在している。大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科では、重症心不全の新規治療法の開発として、虚血性心筋症患者を対象とし、他人の細胞を移植（同種移植）する、ヒト（同種）人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem Cells：iPSC）由来心筋細胞を用いた医師主導治験を実施している。本稿では、iPSC 由来心筋細胞を用いた再生医療等技術の基礎検討段階から、橋渡し研究を経て臨床試験にステージアップする時の留意点を含め、本研究開発の進捗を紹介したい。

1 はじめに (日本におけるアカデミア医療開発について)

2015年、日本における医療分野の研究開発の中核的な役割を担う機関として、日本医療研究開発機構（AMED）が設立された。その理念は「医療分野の研究成果を一刻も早く実用化し、患者さんやご家族の元にお届けすること」と

掲げられており、アカデミアもその理念に賛同して、日々新たな治療法の開発に取り組んでいる。大阪大学では、AMED 設立以前より産官学連携による様々な支援を受けながら大学での基礎研究を効率的・効果的に実用化すべく、開発の「死の谷」を超えるための「橋渡し」を行う橋渡し研究(Translational research:TR)を推進してきた(図1)。

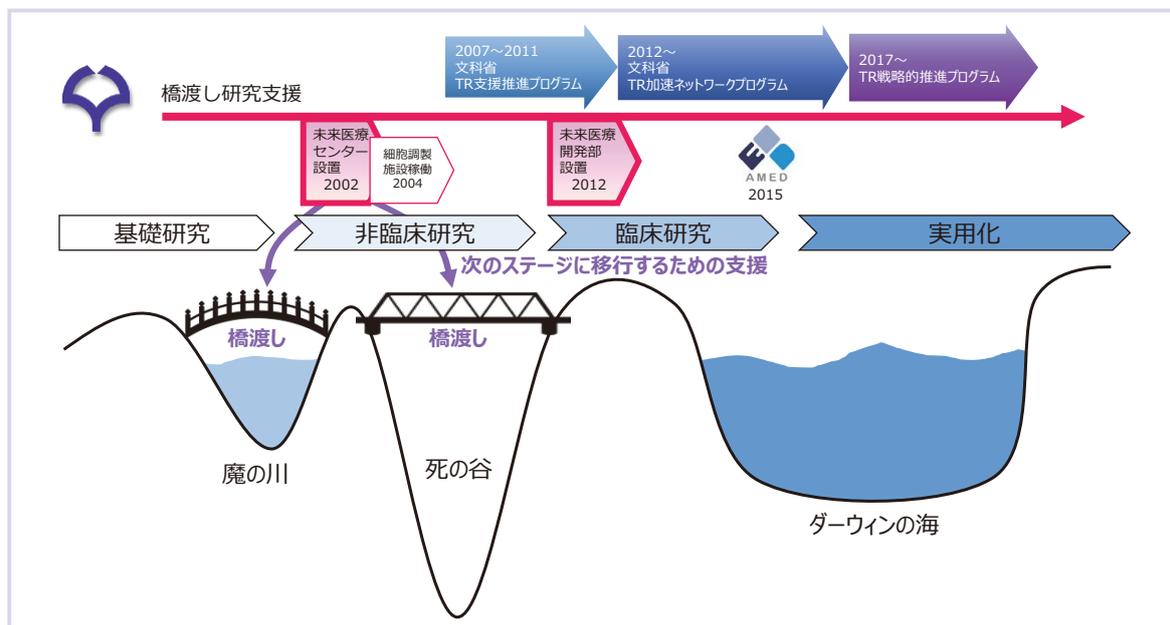


図1 製品開発のステージと橋渡し研究の位置付け

2 心不全に対する新規治療法の開発背景

心不全は、動脈硬化による虚血性心筋症、心筋の遺伝的、環境的因子による機能低下が主因となる拡張型心筋症などの原因により生じる。治療方法については、発症予防、進行抑制などを目的とした薬物療法、形態的異常に対する外科的治療介入などが考慮されるが、あらゆる既存の治療方法を行っても心不全の進行を来たす重症心不全に対しては、補助人工心臓、心臓移植などの心機能の代替療法が考慮される。心臓移植は、我が国ではドナー不足により5年以上の待機期間が必要な状況¹⁾となっており、その間植込み型左室補助人工心臓(LVAD)による治療も検討される。しかしながら、長期間のLVAD治療により、感染、脳血管合併症などの発生が課題となっており、これらを解決する新たな治療方法の開発が急務となっている。

心不全患者に対する心機能改善を目標とした再生医療において、細胞移植はこれまでに数多くの基礎研究が行われ、臨床研究へと進んでいる。最初に報告された心不全への細胞移植治療は、フランスで行われた患者自身の下腿から骨格筋を採取し、得られた筋芽細胞を開胸下で心筋組織に注射で移植する臨床研究(The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial)である。残念ながら本臨床研究では、心不全患者に

対する有効性を示すに至らず、致死性不整脈が発生する可能性が報告された²⁾。その後、細胞種(骨髄間葉系幹細胞³⁾、胚性幹細胞(ES細胞)由来心筋細胞⁴⁾や移植細胞の形状(細胞シート)の検討が進められてきたが、残念ながら、臨床において心不全に対する有効性を示し、普及する治療法として定着したものは現時点で存在していない。心不全領域の製品開発は厳しい状況にあるが、大阪大学心臓血管外科では、iPSCを新たな細胞源として、iPSC由来心筋細胞をシート状にした「iPS心筋細胞シート」を用いて虚血性心筋症患者に対する安全性および有効性を評価する医師主導の治験を実施する等、新規治療法の開発を進めている。

3 重症心不全に対するヒト(同種)iPS心筋細胞シートの基礎的検討

iPSCは2007年に京都大学の山中伸弥教授らによって発表され⁵⁾、その後、2012年に山中教授はノーベル医学生理学賞を受賞している⁶⁾。大阪大学心臓血管外科では、2007年の発表後に山中教授と共同研究を開始し、2012年に「ヒトiPS心筋細胞シート」を虚血性心筋症モデル動物に移植し、心機能が改善することを世界で初めて報告した(図2)⁷⁾。その後、心筋細胞移植後にレシピエント

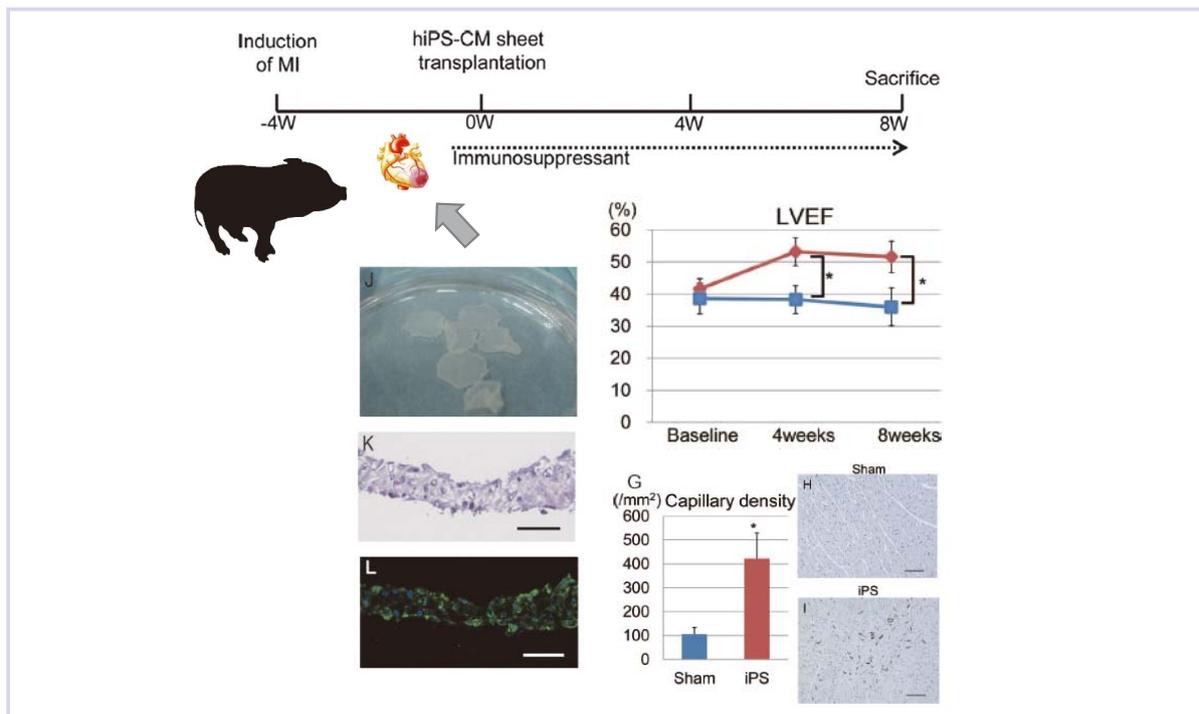


図2 虚血性心筋症モデル動物に対し、iPS心筋細胞シート(hiPS-CM)を移植することで心機能を改善⁷⁾

- ・上: 実験プロトコル (MI: Myocardial Infarction)
- ・左写真: J: hiPS-CMの概観, K: ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色像, L: 心筋トロポニンT (緑) 染色像
- ・右上グラフ: 左室駆出率(LVEF: Left Ventricle Ejection Fraction)の推移(赤: iPSC移植群, 青: シャムオベ群(コントロール群))
- ・右下グラフおよび写真: 毛細血管密度(Capillary density) (赤: iPSC移植群, 青: シャムオベ群(コントロール群)), H, Iはそれぞれ心筋の顕微鏡写真

心臓と同期拍動すること⁸⁾、これまで検討されてきた細胞源よりも iPS 心筋細胞シートは高い有効性が期待できることを示してきた⁹⁾。また、他人の細胞を移植（同種移植）することから、移植後の免疫反応を評価する非臨床試験を、マウス、カニクイザル等を用いて実施し、臨床応用を見据えて想定される状況に対する情報の取得を進めてきた¹⁰⁻¹²⁾（図3）。

4 臨床研究に移行するための橋渡し研究

非臨床 Proof of Concept (PoC) の取得後、我々は臨床応用を目指し、治験の実施および臨床使用可能な品質を備えた細胞加工製品を提供できる体制を構築する必要があった。具体的には、産官学連携による橋渡し研究支援を

受けて、細胞培養加工施設での製造方法の確立、非臨床安全性試験の実施、治験開始前に必要な規制当局相談（レギュラトリーサイエンス戦略相談（旧薬事戦略相談））、実施医療機関での治験審査等に対応してきた。細胞加工製品（治験製品）の製造は、研究室での製造から、清浄度を高度に管理した細胞培養加工施設での製造へ、単純に作業手順の移管のみでなく、ヒトへの投与のために必要な品質を確保するための品質管理戦略を立てた（表1）。また、心機能改善につながる作用機序も継続して究明し、iPS 心筋細胞シートが移植後に分泌する液性因子が、心臓の障害部位および正常部位との境界領域の微小環境を改善することで、心機能改善につながることを見出した（図4）。

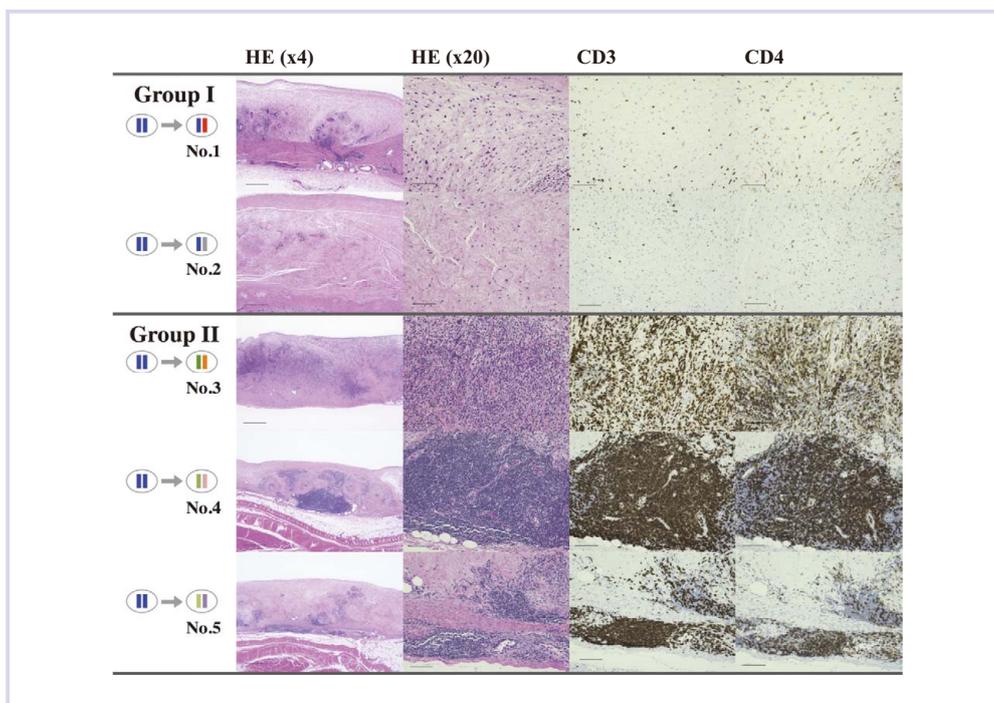


図3 カニクイザルを用いた iPS 細胞由来心筋細胞の免疫拒絶反応の検討の一例¹¹⁾

- Group I (No.1, No.2) は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC: Major histocompatibility complex) がホモ (1種類) であるカニクイザル iPSC 由来心筋細胞を、MHC 型を一致させて移植したときの写真 (左から、HE 染色 (広角像)、HE 染色 (拡大像)、CD3 陽性細胞免疫染色像、CD4 陽性細胞免疫染色像)。
- Group II (No.3, No.4, No.5) は、MHC 型の不一致の移植であり、組織中に免疫担当細胞である CD3 陽性細胞や CD4 陽性細胞の浸潤 (細胞が血管から組織内に移動する現象で、拒絶反応時は、異物として認識された細胞が攻撃を受ける) が多く認められている。

表1 細胞加工製品（治験製品）の製造移管について

	基礎研究	→	治験
製造場所	研究室		細胞培養加工施設（清浄度を高度に管理）
製造方法	実験計画書（作業者の経験）	➤ 手順書の整備	手順書に基づく製造
原料	卸売業者から購入	➤ 原料変更により製造条件を変更	卸売業者から購入（開発者自らが品質を確認）
品質管理項目	未確立の場合が多い	➤ 品質管理項目の設定による作業の複雑化	開発者による設定（規制当局と合意）
分析法	未確立の場合が多い		手順書に基づく分析法
記録	実験ノート		手順書に基づく指図記録書

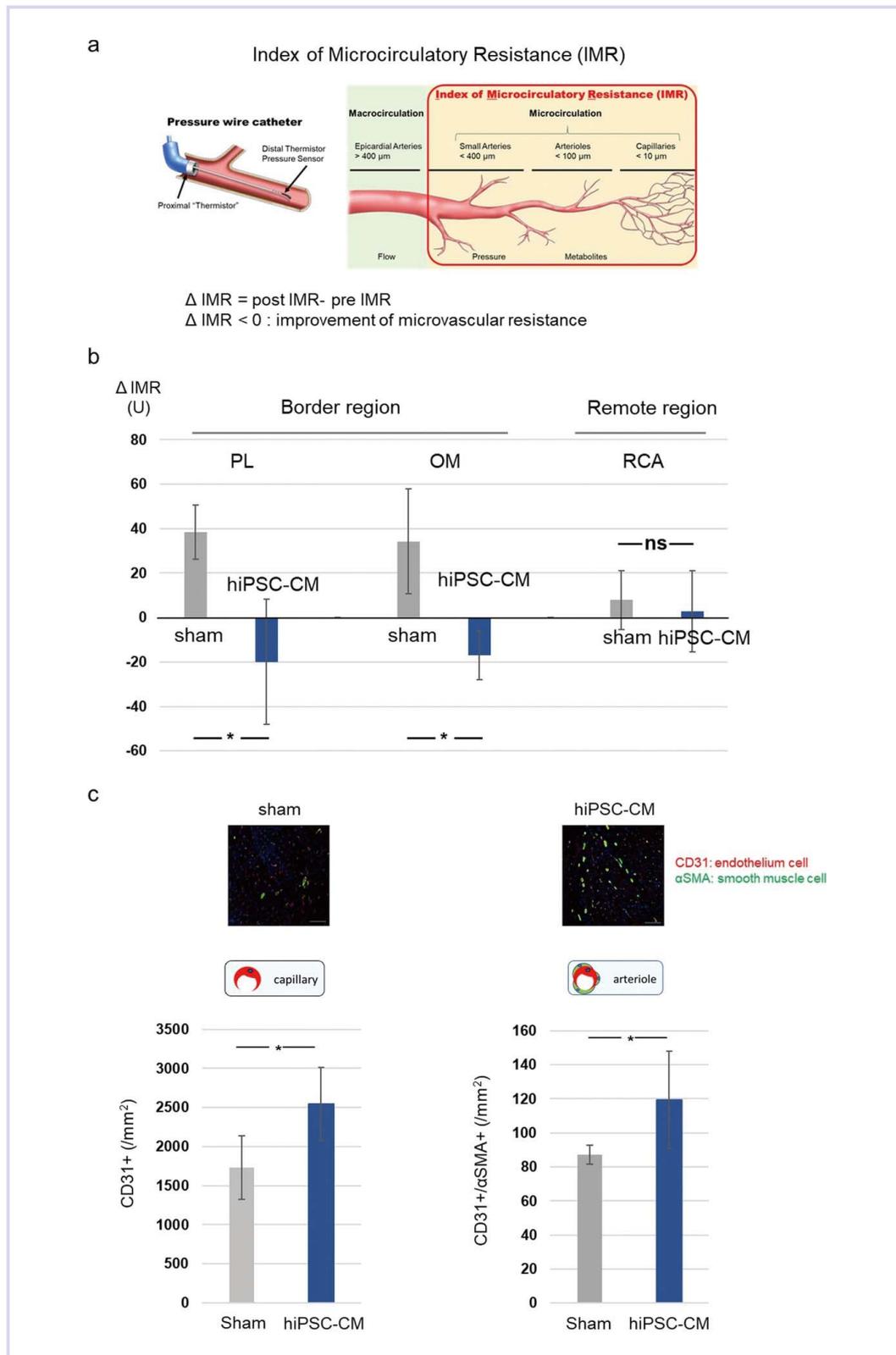


図4 iPS 心筋細胞シートによる微小環境の改善と血管成熟¹³⁾

- a: 微小循環抵抗に関する模式図, 微小循環抵抗 (IMR) が小さくなると微小循環が改善されたと判断できる。
- b: IMRがhiPSC-CMの移植により低下した (ΔIMRが0よりも低い値となった) ことから, 心筋の微小環境が改善したと評価された。Border regionは正常心筋と心筋梗塞部位の境界領域, Remote regionは心筋梗塞部位から遠位での評価を示す。
- c: 心臓組織における内皮細胞 (CD31陽性細胞) と平滑筋細胞 (αSMA陽性細胞) の蛍光染色像を示す。左図は内皮細胞のみで構成された毛細血管 (capillary), 右図は内皮細胞と平滑筋細胞で構成された細動脈 (arteriole) を示す。下のグラフは単位面積あたりに占めるCD31陽性細胞と, CD31陽性かつαSMA陽性細胞の割合を示す。hiPSC-CMを移植した方が, CD31陽性かつαSMA陽性細胞の割合が多い, つまりの成熟血管の割合が多くなったことを示す。

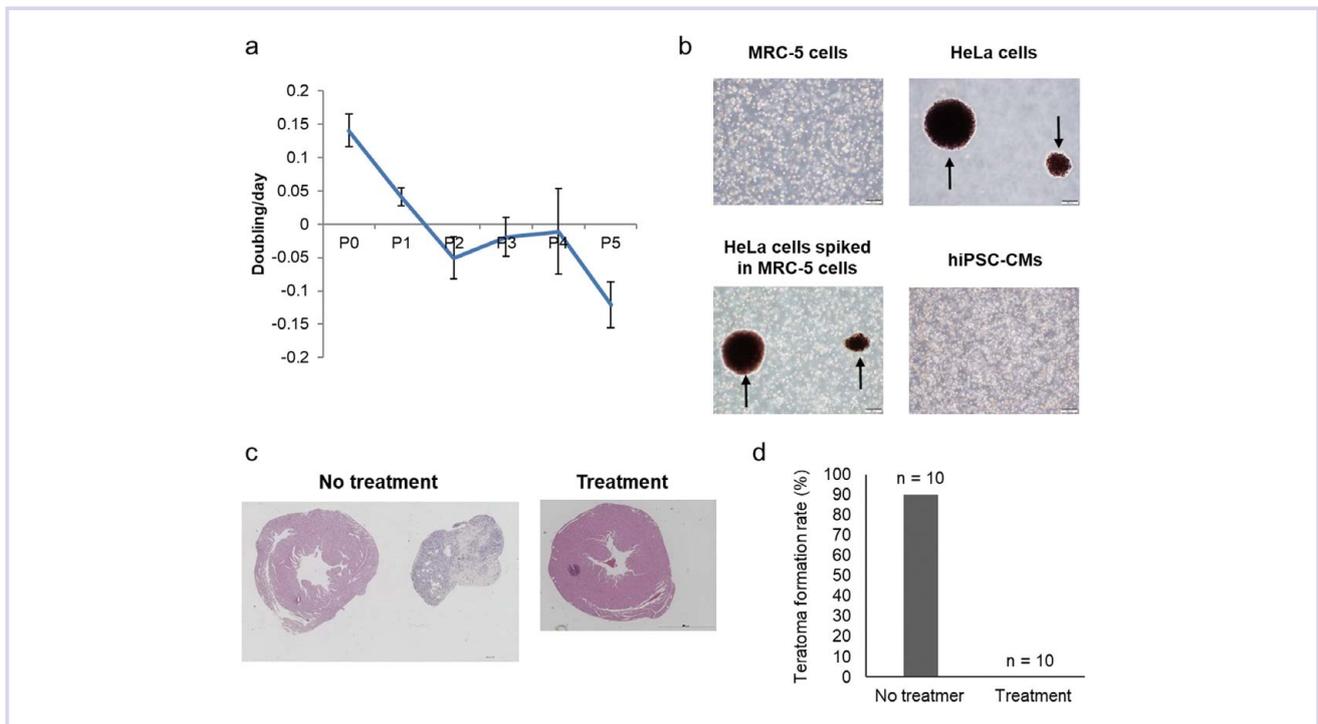


図5 iPSC 心筋細胞の細胞増殖特性、足場非依存性増殖評価、造腫瘍性評価¹³⁾

- a: 細胞増殖特性の評価: 継代培養時 (P0~P5) に細胞増殖率を算出し、増殖速度を計測した。その結果、継代を重ねることで増殖速度は低下した (異常な増殖は認めなかった)。
- b: 足場非依存性増殖の評価: 軟寒天上に培養し、足場のない状況での増殖の可否を評価した結果、hiPSC-CMsは軟寒天上 (足場のない環境) では、増殖を示さなかった (MRC-5 cells: 陰性対照, HeLa cells: 陽性対照)。心筋細胞シートの製造中に形質転換が生じて、足場がない状況でも増殖する形質を獲得すると腫瘍形成のリスクがあるものと判断される。
- c: 造腫瘍性の評価: 免疫不全マウス (NOGマウス) の心臓表面にヒト心筋細胞シートを貼付し、腫瘍形成の有無を評価した。No treatmentは、未分化iPSCを除去する工程を行っていないもの (陽性対照) で、Treatmentは未分化iPSCを除去する工程を加えたものの評価である。
- d: 未分化iPSCによる奇形種形成能の評価: 未分化iPSCを除去する工程を経たもの (Treatment) では、奇形種形成が認められなかった。

その後、非臨床安全性試験 (図5)、効力を裏付ける試験、特性解析試験 (図6) を実施する等、臨床応用に必要なデータを積み重ねてきた¹³⁾。その間、規制当局との相談を適時に実施し、治験開始までに必要なデータの合意を得つつ、治験プロトコルについても議論を重ね、2019年に初回治験計画届の提出に至った。

5 臨床試験

我々は上述した基礎的検討、橋渡し研究を基に2019年から虚血性心筋症に対するiPS細胞由来心筋細胞移植の医師主導治験 (臨床研究実施計画番号 JRCT2053190081) を開始した (図7)。

第1症例目についてiPS心筋細胞シート移植術が実施され (図8)、その後観察期間を通じて詳細な検討が行われ、安全性の確認と、iPS細胞を移植した左心室での収縮能の改善が観察された (図9: 四次元CTで観察した左室収縮。収縮能が高い領域を赤色で表現している。下図の点線は、iPS細胞由来心筋細胞を移植した領域) ことから、治療効果の期待が持てる結果を得られている¹⁴⁾。2024年10月現在、

8症例への移植、移植後1年間の観察期間は全例で終了し、全例に対して長期観察試験を実施している (臨床研究実施計画番号 JRCT2053220055)。

6 細胞加工製品の開発における留意点

細胞加工製品は、その複雑性から、最終製品の規格試験のみで品質を担保することは困難と考えられており、製造場所、製造方法、原材料等の変更があった際の最終製品の同等性評価では、規格試験のみならず、特性解析試験で幅広く評価することが求められる。工程内管理試験成績を用いて一貫性を示すことも手段として採り得るものと言える。そのために、特性解析 (例えば、目的外細胞の特定、液性因子産生能、細胞増殖、遺伝子発現等) をはじめ、試験方法が確立されていること (ものさしが確固としたものであること) は、非常に重要であることは言うまでもなく、開発の初期段階において、試験方法の操作手順を確立し、何をどこまで計測・評価できるのかといった試験方法の性能を確認し、記録を残しておくことは技術移管を円滑に進めるための方策の一つと考えられる。しかしながら、細胞加工製品の品質

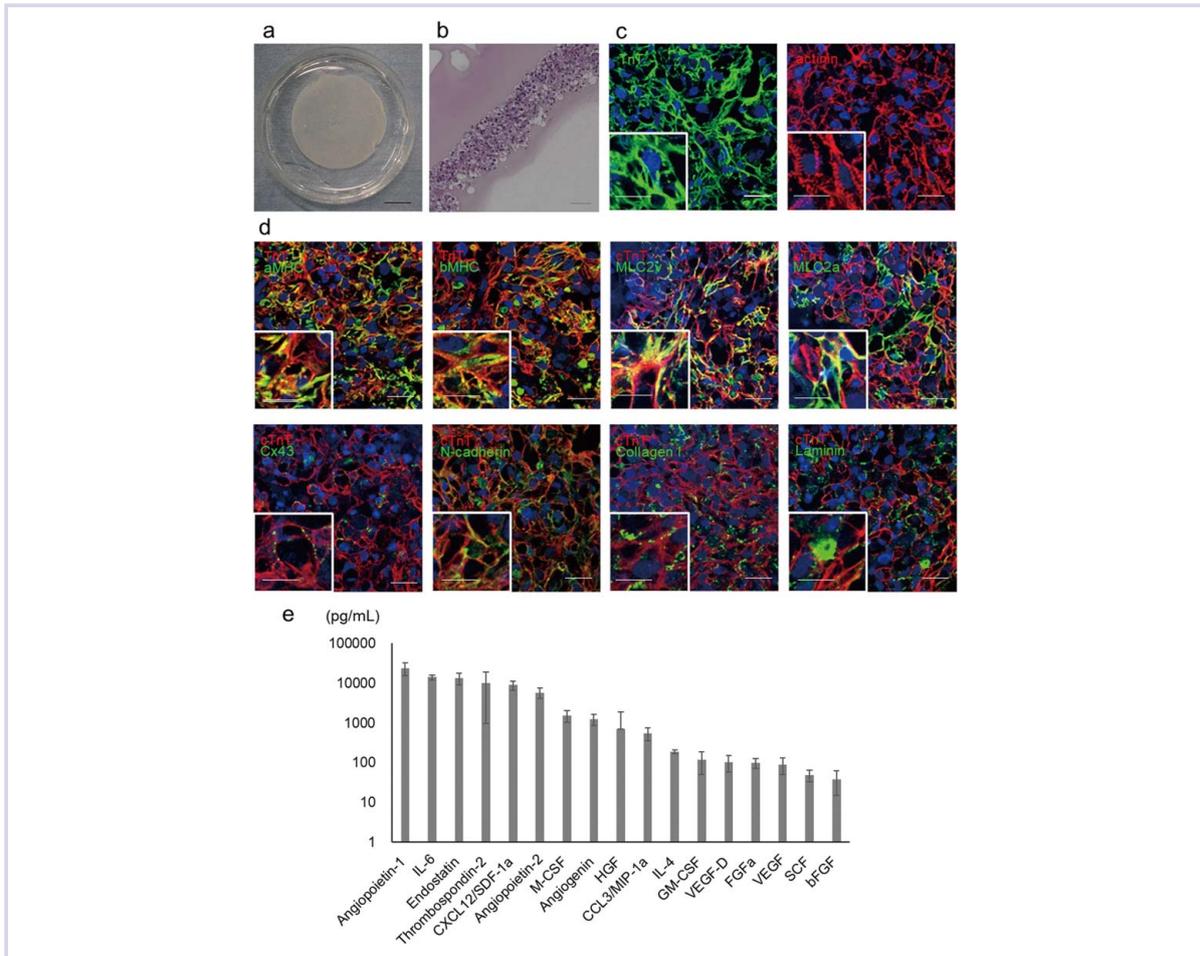


図6 iPS 心筋細胞シートの構造及び液性因子の解析¹³⁾

a-d : a: iPS 心筋細胞シートの概観, b: HE 染色像, c: 心筋トロポニン (緑), アクチニン (赤) の蛍光染色像, d: 心筋トロポニン (赤) を共通として, 左上から, aMHC, bMHC, MLC2v, MLC2a, Cx43, N-cadherin, Collagen I, Laminin の共染色像, 染色像を重ね合わせて重なると黄色で示されることになる。
 e : iPS 心筋細胞シートから産生される液性因子の種類および量が示されている。血管新生(VEGF),血管成熟(Angiopoietin-1, 2), 幹細胞誘因 (CXCL12/SDF-1a) といった心機能の改善に寄与すると考えられる液性因子が安定的に産生されている。

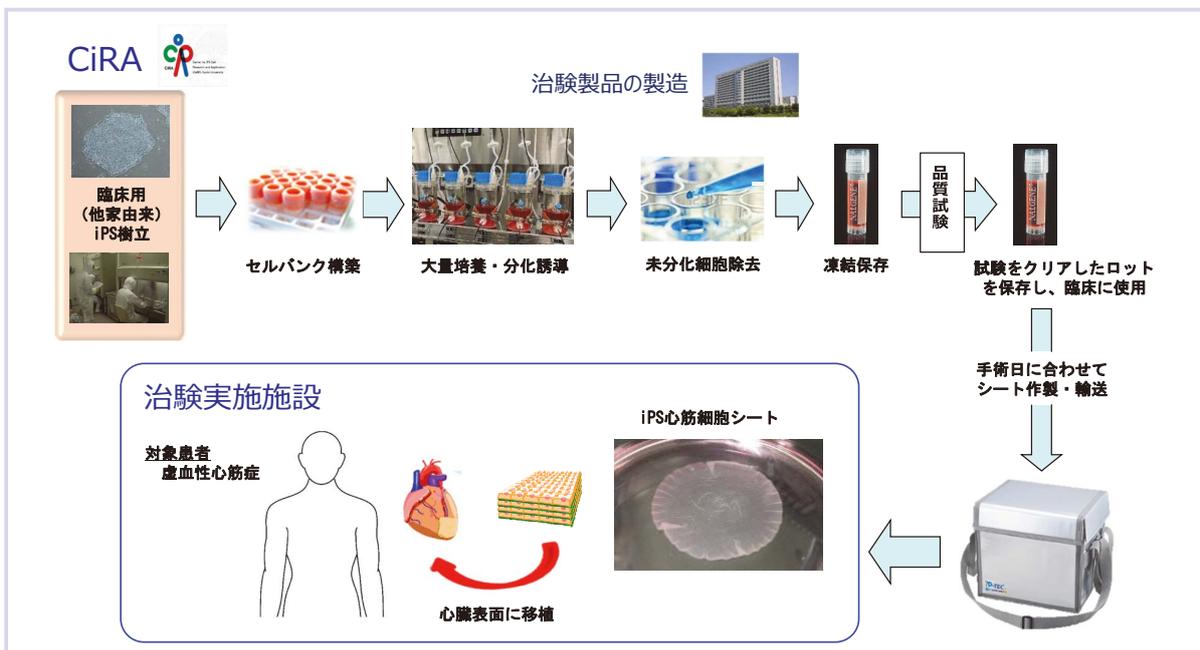


図7 医師主導治験における治験製品の製造および提供スキーム

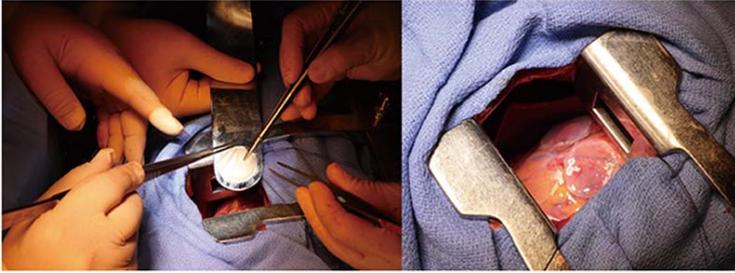


図8 虚血性心筋症に対するiPS細胞由来心筋細胞シート移植¹⁴⁾
 左の写真：心臓表面に1枚目のiPS心筋細胞シートを貼付する直前
 右の写真：iPS心筋細胞シートを3枚貼付した後の写真

試験に用いられる試験方法の多くは標準品がなく、一つの測定結果のみでは解釈が難しくなる場合が多い(図10)。そのため、様々な側面から品質を評価する手法の開発も製品開発と併行する必要がある、特に非破壊で細胞の特性を評価できる試験系の開発が望ましいと考えられる。

7 おわりに

大阪大学では、現在の治療法では救命できない患者に対して、臨床現場で使用される想定を常に持って新規治療法の開発を行ってきた。特に再生医療に関しては、実際に手術により細胞移植を行うことができる外科学講座(学)として、新規治療法の制度設計を行う政府や地方公共団体等(官)、最終的に臨床現場に製品を届ける企業(産)と連携し一貫した開発を行うことで、一定の成果を挙げることができたと考えている。

今後、新規治療法が真に普及する医療として受け入れられるためには、さらなる開発を続けるとともに、得られた知見を基礎研究の手法で検討する、いわゆるリバース・トランスレーショナル・リサーチにも注力し、常に科学的根拠に基づいた医療を行なっていくことが重要と考えられる。

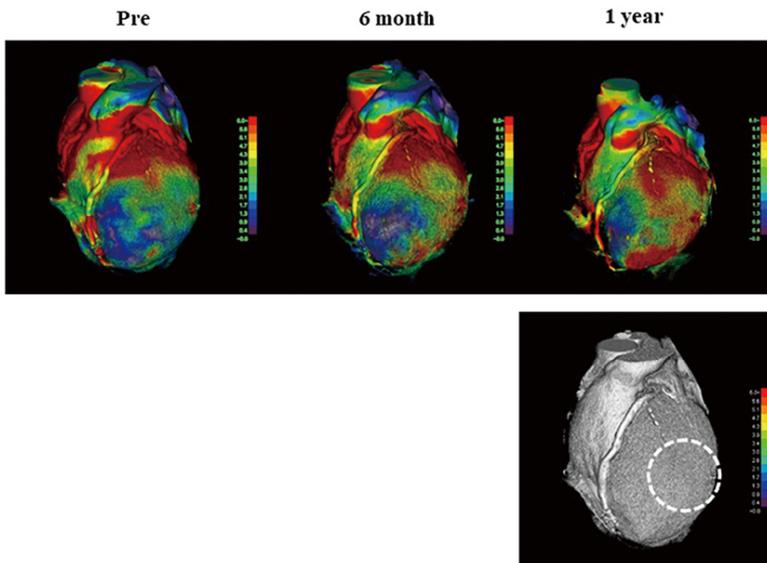
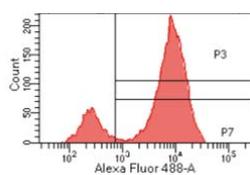


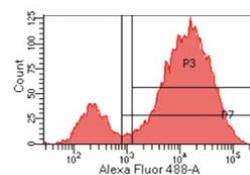
図9 iPS細胞由来心筋細胞移植後の左室収縮能の改善¹⁴⁾
 4D CTの解析結果：iPS心筋細胞シートを移植する前(Pre)、移植6か月後(6 month)、移植1年後(1 year)での解析結果を示す。右下の白丸点線部位がiPS心筋細胞シートを移植した箇所を示す。時間経過に応じて寒色から暖色となった箇所が多くなり、動きの悪かった部分が、良く動くようになったことを示す。

【特定の抗原に対するフローサイトメトリーの測定結果】



陽性率：81.0%

数値上は類似しているが、ピーク形状に違いが見られるため、細胞集団として類似しているとは言い難い



陽性率：81.4%

図10 特定の抗原に対するフローサイトメトリーの測定結果の一例

謝 辞

本稿で提示した研究開発は、文部科学省、厚生労働省、AMED から手厚い支援を受けて、多くの共同研究者の協力のもとに進められたものであり、医師主導治験は、大阪大学医学部附属病院をはじめ、治験実施機関である国立循環器病研究センター、順天堂大学医学部附属順天堂医院、九州大学病院、東京女子医科大学病院の各施設の担当者、スタッフの多大な支援を得て達成されたものである。この場を借りて深く御礼申し上げる。

文 献

- 1) 日本心臓移植研究会: 移植, **58** (3), 209 (2023) .
- 2) Philippe Menasché, Ottavio Alfieri, Stefan Janssens, William McKenna, Hermann Reichenspurner, Ludovic Trinquart, Jean-Thomas Vilquin, Jean-Pierre Marolleau, Barbara Seymour, BS, Jérôme Larghero, Stephen Lake, Gilles Chatellier, Scott Solomon, Michel Desnos, Albert A. Hagège: *Circulation*, **117** (9), 1189 (2008) .
- 3) Amit N Patel, Timothy D Henry, Arshed A Quyyumi, Gary L Schaer, R David Anderson, Catalin Toma, Cara East, Ann E Remmers, James Goodrich, Akshay S Desai, David Recker, Anthony DeMaria: *Lancet*, **387** (10036), 2412 (2016) .
- 4) Philippe Menasché, Valérie Vanneaux, Albert Hagège, Alain Bel, Bernard Cholley, Alexandre Parouchev, Isabelle Cacciapuoti, Reem Al-Daccak, Nadine Benhamouda, Hélène Blons, Onnik Agbulut, Lucie Tosca, Jean-Hugues Trouvin, Jean-Roch Fabreguettes, Valérie Bellamy, Dominique Charron, Eric Tartour, Gérard Tachdjian, Michel Desnos, Jérôme Larghero: *Journal of the American College of Cardiology*, **71** (4), 429 (2018) .
- 5) Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, Shinya Yamanaka: *Cell*, **131** (5), 861 (2007) .
- 6) The Nobel Foundation: "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012, Shinya Yamanaka Facts" <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/yamanaka/facts/>>. (accessed 2024.10.9) .
- 7) Masashi Kawamura, Shigeru Miyagawa, Kenji Miki, Atsuhiko Saito, Satsuki Fukushima, Takahiro Higuchi, Takuji Kawamura, Toru Kuratani, Takashi Daimon, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Yoshiki Sawa: *Circulation*, **126** (11 Suppl 1), S29 (2012) .
- 8) Takahiro Higuchi, Shigeru Miyagawa, James T. Pearson, Satsuki Fukushima, Atsuhiko Saito, Hirotsugu Tsuchimochi, Takashi Sonobe, Yutaka Fujii, Naoto Yagi, Alberto Astolfo, Mikiyasu Shirai, Yoshiki Sawa: *Cell transplantation*, Published online January 1 (2015) .
- 9) Masaru Ishida, Shigeru Miyagawa, Atsuhiko Saito, Satsuki Fukushima, Akima Harada, Emiko Ito, Fumiya Ohashi, Tadashi Watabe, Jun Hatazawa, Katsuhisa Matsuura, Yoshiki Sawa: *Transplantation*, **103** (2), 291 (2019) .
- 10) Ai Kawamura, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, Takuji Kawamura, Noriyuki Kashiyama, Emiko Ito, Tadashi Watabe, Shigeo Masuda, Koichi Toda, Jun Hatazawa, Eiichi Morii, Yoshiki Sawa: *Scientific reports*, **14** (6), 19464 (2016) .
- 11) Takuji Kawamura, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, Akira Maeda, Noriyuki Kashiyama, Ai Kawamura, Kenji Miki, Keisuke Okita, Yoshinori Yoshida, Takashi Shiina, Kazumasa Ogasawara, Shuji Miyagawa, Koichi Toda, Hiroomi Okuyama, Yoshiki Sawa: *Stem Cell Reports*, **6** (3), 312 (2016) .
- 12) Noriyuki Kashiyama, Shigeru Miyagawa, Satsuki Fukushima, Takuji Kawamura, Ai Kawamura, Shohei Yoshida, Seiko Eiraku, Akima Harada, Keiko Matsunaga, Tadashi Watabe, Koichi Toda, Jun Hatazawa, Yoshiki Sawa: *Transplantation*, **103** (8), 1582 (2019) .
- 13) Shigeru Miyagawa, Takuji Kawamura, Emiko Ito, Maki Takeda, Hiroko Iseoka, Junya Yokoyama, Akima Harada, Noriko Mochizuki-Oda, Yukiko Imanishi-Ochi, Junjun Li, Masao Sasai, Fumiyo Kitaoka, Masaki Nomura, Naoki Amano, Tomoko Takahashi, Hiromi Dohi, Eiichi Morii, Yoshiki Sawa: *Stem Cell Research & Therapy*, **15** (1), 73 (2024) .
- 14) Shigeru Miyagawa, Satoshi Kainuma, Takuji Kawamura, Kota Suzuki, Yoshito Ito, Hiroko Iseoka, Emiko Ito, Maki Takeda, Masao Sasai, Noriko Mochizuki-Oda, Tomomi Shimamoto, Yukako Nitta, Hiromi Dohi, Tadashi Watabe, Yasushi Sakata, Koichi Toda, Yoshiki Sawa: *Front Cardiovasc Med*, 9:950829, (2022) .

著者略歴

【笹井雅夫】(写真左)

2007年3月 名古屋市立大学薬学部 卒業
 2009年3月 名古屋市立大学大学院薬学研究科博士前期課程 修了
 2009年4月 大阪大学医学部附属病院 特任研究員(常勤)
 2011年10月 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 生物系審査第二部 審査専門員
 2012年10月 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 再生医療製品等審査部 審査専門員
 2014年8月 厚生労働省 近畿厚生局 再生医療等推進専門官
 2017年4月 大阪大学大学院医学系研究科 特任講師(常勤) 現職
 <研究領域>
 レギュラトリーサイエンス, 再生医療

【河村拓史】(写真中)

2005年3月 大阪大学医学部医学科 卒業
 2005年4月 国家公務員共済組合連合会 大手前病院 初期臨床研修医
 2007年4月 大阪警察病院 外科 シニアレジデント
 2008年4月 大阪警察病院 心臓血管外科 シニアレジデント
 2010年4月 大阪大学医学部附属病院 心臓血管外科 医員
 2011年4月 大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科博士課程
 2015年9月 ドイツ マックス・プランク心臓研究所 ポスドク研究員
 2016年4月 ドイツ ケルクホッフクリニック心臓外科 客員医師
 2018年7月 大阪大学医学部附属病院 心臓血管外科 助教 現職
 <研究領域>
 心臓血管外科

【宮川繁】(写真右)

1996年3月 大阪大学医学部医学科 卒業
 1994年4月 大阪大学医学部附属病院 心臓血管外科 医員
 1995年6月 大手前病院 外科 医員
 1997年6月 大阪労災病院 心臓血管外科
 1998年6月 大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 博士課程
 2002年4月 大阪大学医学部附属病院 未来医療センター 研究員
 2004年4月 桜橋渡辺病院心臓血管外科
 2006年3月 大阪大学医学系研究科心臓血管外科 非常勤講師
 2006年11月 ドイツ・ケルクホッフクリニック心臓外科
 2009年1月 大阪大学医学系研究科 心臓血管外科 助教
 2009年6月 大阪大学医学部附属病院院内 講師
 2012年7月 大阪大学医学部医学系研究科 心臓血管外科 講師
 2014年4月 大阪大学医学系研究科 免疫再生制御学講座 特任准教授
 2016年8月 大阪大学医学系研究科 先進幹細胞治療学共同研究講座 特任教授
 2018年4月 大阪大学医学系研究科 最先端再生医療学共同研究講座 特任教授
 2021年7月 大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 教授
 <受賞歴>
 2001年 日本人工臓器学会オリジナル賞受賞
 2002年 日本心臓病学会 young investigator award受賞
 2003年 日本人工臓器学会 JSAO-Grant受賞
 2004年 アメリカ人工臓器学会 (ASAIO) Medforte Innovation Award受賞
 2015年 第9回上原財団特定研究助成金
 2016年 産官学連携功労者表彰 厚生労働大臣賞
 2019年 第18回日本再生医療学会 功績賞
 2022年 日本人工臓器学会論文賞(広領域)
 <研究領域>
 心臓血管外科