

移植免疫寛容型サルを用いた iPS 細胞による心筋再生

信州大学バイオメディカル研究所/医学部附属病院循環器内科
柴 祐司

1. 目的

本研究の目的は、iPS細胞を用いた心筋梗塞治療の開発である。これまでの多能性幹細胞を用いた心臓病治療の研究は、ヒト由来細胞を動物モデルに移植する異種移植モデルにおける検討であったが、有効性と安全性の正確な評価には同種移植による検討が必要である。iPS細胞の大きな利点として、自己細胞移植の可能性のあるものの、品質保証されたiPS細胞作製には時間とコストを要するため、バンク化されたiPS細胞を用いた他家移植が現実的である。他家移植では移植後の免疫拒絶反応を抑制するために、ドナーとレシピエントの主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) 型を一致させやすいMHCホモ接合体個体からiPS細胞を作製することが望まれる (図1)。しかし、実際にMHC型が一致した心筋細胞移植後の免疫応答を評価した報告は皆無であり、この検討が必要である。

申請者らはヒトに最近種であるカニクイザルのゲノムDNAシーケンスから、MHCホモ接合体個体を同定し、この個体からiPS細胞および心筋細胞の作製に成功している。そこで、このiPS由来心筋細胞を同一のMHC型を含むヘテロ接合体動物に移植し、細胞の生着と免疫応答、腫瘍形成について組織学的に評価し、心機能の改善について心エコー、心臓CTを用いて検討する。さらに、移植した心筋細胞とホストの心筋細胞の電気的統合について、申請者らが開発した蛍光CaセンサーGCaMPによるイメージングシステムによって確認する。

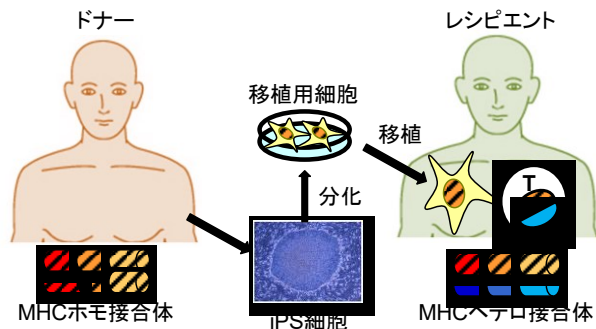
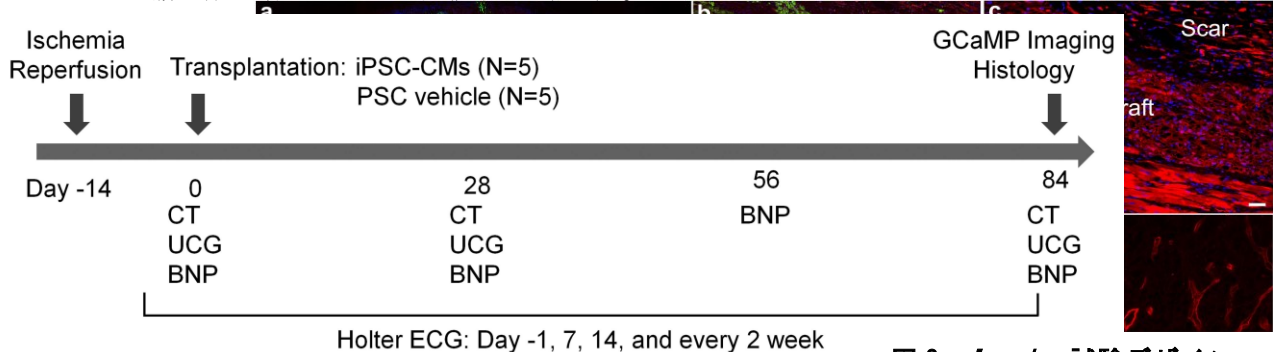


図 1. MHC ホモ接合体を利用した免疫寛容システム

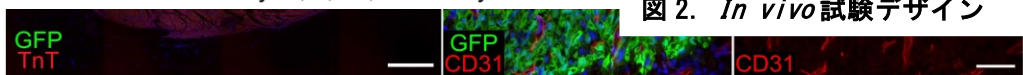
2. 方法

MHC型ホモ接合体カニクイザルの皮膚線維芽細胞より、*OCT4*、*SOX2*、*KLF4*、*L-MYC*をエピゾーマルベクターによって遺伝子導入し、iPS細胞を作製し、さらにアクチビンA、BMP-4を添加し、心筋細胞に分化させ凍結保存する。ドナー細胞と同一のMHC型を含むMHC型ヘテロ接合体動物に対して、虚血再灌流モデルによって心筋梗塞を発症させ、2週間後に 4×10^8 の心筋細胞を心筋内への直接注射によって移植する。移植後12週間経過観察し、心エコー、CTによる心機能評価とHolter心電図による不整脈の評価を行う。12週間後に心臓を摘出し、GCaMPによる蛍光イメージングを行うとともに、病理組織検査により移植細胞の生着、免疫拒絶反応および腫瘍形成の有無について評価する (図2)。



Holter ECG: Day -1, 7, 14, and every 2 week

図 2. *In vivo* 試験デザイン



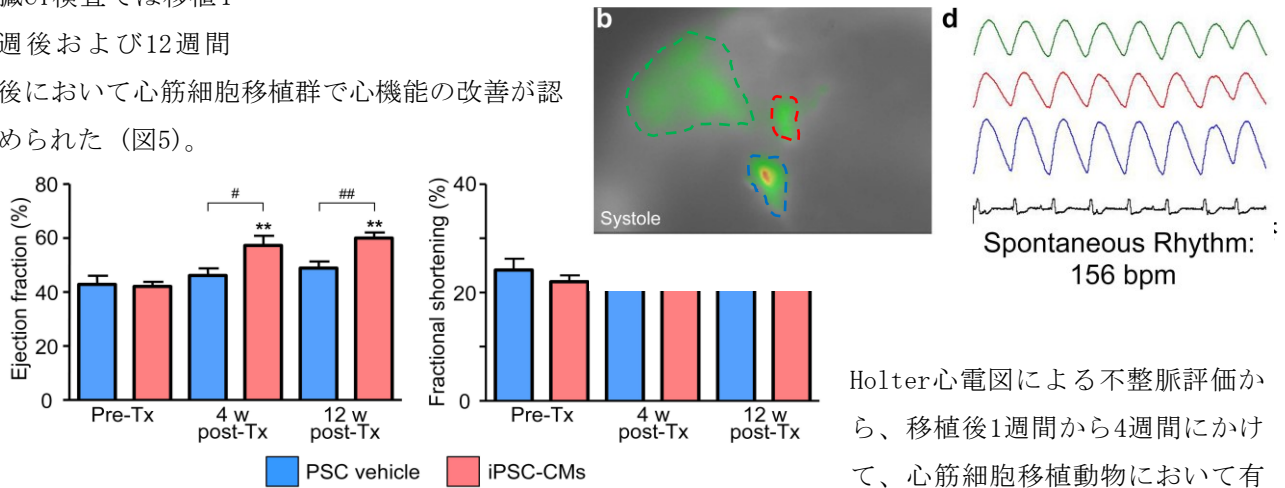
3. 結果

移植12週間後の病理組織検査では、GFP (GCaMP) 標識した移植心筋細胞がホスト由来の血管によって灌流され生着していた (図3)。

GCaMP蛍光イメージングで観察すると、グラフト心筋は収縮時に蛍光発色し、この発色周期は心電図周期と一致していた (図4)。

心エコーおよび心臓CT検査では移植4週間後および12週間後において心筋細胞移植群で心機能の改善が認められた (図5)。

図3. 移植12週間後の病理組織評価 a. GFP 標識したグラフト心筋は拒絶反応なく生着した。b, c. 移植細胞の多くが心筋細胞であった。d, e. グラフト心筋はホスト血管によって灌流されていた。



Holter心電図による不整脈評価から、移植後1週間から4週間にかけて、心筋細胞移植動物において有意に心室性頻拍の発生頻度が増加していた。しかし、心室性頻拍発症中であっても、各個体において特に異常行動は見られなかった。また移植4週目以降は心室性頻拍の有意な増加は見られなかった。

図5. 心機能評価

CT (左) および心エコー (右) による心機能評価。心筋細胞移植によって4週間後および12週間後において心機能の改善が見られた。

4. 考察

MHC型を一致させた同種間移植によって、iPS細胞由来心筋細胞が免疫拒絶反応なく生着することが確認できた。さらに、生着した心筋細胞はホスト心臓と電氣的に結合し、一体となって収縮することにより心機能を改善させることが確認できた。しかし、心筋細胞移植後の心室性頻拍の有意な増加がみられた。この不整脈は一過性で、個体の血行動態には大きな影響を与えていないことが示唆されるものの、今後移植後不整脈に関するメカニズムの解明と予防方法の確立が必要である。