

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) iPS細胞を用いた心筋再生治療創成拠点
(英語) Center for the development of myocardial regenerative treatments using iPS cells

研究開発実施期間: 平成25年4月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 澤 芳樹
(英語) Yoshiki Sawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 大阪大学大学院 医学系研究科 特任教授
(英語) Specially Appointed Professor, Osaka University Graduate School of Medicine

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

1. 研究の背景

わが国の心不全による年間死亡数は約4万3千人、特に末期的重症心不全にあっては1年死亡率が75%とされる。これら致死的な重症心不全に対する虚血性心筋症や拡張型心筋症の根本的治療法は、心臓移植や補助人工心臓などの置換型治療が中心である。我が国において、脳死移植法案改正に伴いドナー数は増加しつつあるが、重症心不全患者総数からみた相対的ドナー不足は否めず、補助人工心臓の血栓塞栓や出血、感染などの合併症によりこれら置換型治療は普遍的な治療とは言いがたい。従って、重症心不全に対する根本的治療として心筋再生治療法の研究開発の加速は、国民の健康福祉において急務な最重要課題である。

我々は、これまでに150例以上の心臓移植と200例を超える補助人工心臓治療を経験する国内有数の重症心不全治療の拠点である。再生医療では、自己骨格筋由来の筋芽細胞シートによる心筋再生治療法を開発し、2015年、世界初の心不全治療用再生医療等製品「ハートシート」の製造販売承認を取得し、テルモ

より販売されている。しかし、筋芽細胞シートの作用機序は HGF 等によるパラクライン効果で、残存心筋細胞が少ない症例に対する有効性は低かった。かかる重症心不全例に対しては、心筋と電氣的に結合し直接心機能を向上しうる心筋細胞の大量補充が根治的治療につながると考え、我々はその細胞源として iPS 細胞を選択し、ヒト iPS 由来心筋細胞の高率分化誘導法を開発した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CiRAより出荷の臨床グレードのHLAホモドナー由来iPS細胞から心筋細胞を高率分化大量培養し、免疫抑制法や造腫瘍性等のRegulatory Scienceなど、臨床応用化において問題となりうる課題を解決しつつ、iPS細胞由来心筋細胞シート治療法を確立し、「ハートシート」の臨床開発で培った経験を発揮して、虚血性心筋症に対するiPS細胞由来心筋細胞シートのFirst in Manを安全に行い、治験へと展開する。さらに高機能化を目指して組織工学技術を駆使したiPS細胞由来心筋グラフトの開発や、拡張型心筋症への適応拡大を行う。また、確立した技術を企業にアウトソーシングし、我が国の産業界の育成に資する。

3. 研究概要

当拠点では、京都大学 iPS 細胞研究所にて樹立された健常ヒト末梢血単核球細胞由来 iPS 細胞から、HLA が日本人の最頻度 6 座においてホモであり、心筋細胞への分化効率の高い株を選択し、マスターセルバンク (MCB) を構築した。

未分化 iPS 細胞を拡大培養したのち、心筋細胞への分化誘導を行う工程を確立した。分化誘導試薬の最適化を行いつつ、心機能回復に有効な十分量の細胞を得るため、東京女子医科大学で開発された大量培養装置の技術移転を行い、心筋細胞純度の高い 10^8 個オーダーの細胞を得ることに成功した。分化誘導した心筋細胞から細胞シートを作製し、シートの拍動性や物理的強度、細胞内活動電位、血管新生や心筋細胞保護にかかわるサイトカイン産生等、機能的・構造的に安定した細胞シートを形成するための最適な細胞構成も見出した。

有効性については、ラット、ブタ、サル等の心筋梗塞モデルに、iPS 細胞由来心筋細胞シートを移植すると、左室駆出率をはじめとする心機能の回復が認められることを示した。心臓の壁応力等の局所機能において、iPS 心筋シートは、骨髄間葉系細胞シート、あるいは筋芽細胞シートに比べ、より高い有効性を示した。また、in vitro で培養した iPS 心筋は、未熟なフェノタイプを示すが、移植後の体内環境で成熟化が進むことも示された。

さらに、移植後の細胞シート内の心筋細胞サルコメアのミオシンとアクチンの収縮弛緩に伴う相互作用は、ホスト心筋の収縮弛緩と同期していることが、高輝度放射光 Spring-8 による測定によって確認された。

本研究は同種他家移植となるため、MHC のマッチングの有無が移植された細胞の生着に及ぼす影響、並びに免疫抑制剤投与の効果、ヒトに近い免疫機構を持つカニクイザルを用いて検証した。皮下移植したカニクイザル iPS 細胞由来心筋細胞シートは、MHC が一致しない場合、免疫抑制剤 3 剤投与下でも移植後 2 か月で大幅に減少したが、MHC が一致する場合は、2 か月で有意に細胞の残存が見られた。ただし MHC 一致でも、免疫抑制剤 1 剤、あるいは非投与の場合は、2 か月で消失した。よって、MHC 一致であっても、細胞の残存には免疫抑制剤の投与が必要であることが示された。

腫瘍形成の原因となる未分化 iPS 細胞の残存を可能な限り抑えるため、未分化 iPS 細胞と成熟心筋における表面抗原の発現量の違いに着目し、抗体医薬によって分化心筋細胞を処理することで、未分化 iPS 細胞を特異的に除く方法を開発した。さらに無糖培地での培養、温度変化を加える培養工程を加えることで、未分化 iPS 細胞の残存を検出感度以下に抑えることに成功した。非臨床安全性試験として、軟寒天コ

ロニー形成試験、増殖特性解析、NOG マウスへの移植による一般毒性試験、同じく造腫瘍性試験を行った結果、本心筋細胞シートによる腫瘍化のリスクは懸念すべきものではないと判断された。

心筋梗塞動物モデルへの投与において、心筋組織への細胞懸濁液注入は不整脈を誘発することが報告されているが、細胞シート移植はブタ心筋梗塞モデルでのホルター心電図測定で、移植直後、あるいは長期にわたり、致死的不整脈は発生しないことが確認された。

これらの非臨床試験に基づき、臨床研究計画書を大阪大学第一種特定認定再生医療等委員会に申請、実施に関する了承を受けたのち、厚生労働省再生医療等評価部会でも審議され、2018年5月16日に了承された。これを受けて大阪大学医学部附属病院 CPC にて臨床研究用の iPS 心筋細胞の製造を開始したが、2018年6月18日の大阪府北部地震により、CPC 施設が損害を受けたため、製造に遅延が生じた。一方並行して、医師主導治験の準備も進めており、有効性・安全性について PMDA とも対面助言を進め iPS 細胞由来心筋細胞の製造方法、品質規格、安全性評価、臨床プロトコル等について、合意に至った。2019年10月に、虚血性心筋症を対象として医師主導治験届を提出し、11月より治験実施が可能となった。次いで、大阪大学治験審査委員会に PMDA との照会回答により修正した治験実施計画書を提出して承認を得た。

患者リクルートを進め、2020年1月に最初のヒト（同種）iPS 細胞由来心筋細胞シートの移植手術を実施した。2020年11月までに、医師主導治験の前半のコホートで予定されていた3名への移植手術が終了し、評価スケジュールに従ってフォローアップを行っている。

令和3年8月に効果安全性評価委員会の評価を経て、コホート B-I へ進み、5施設での多施設共同治験として、治験を遂行した。なお、コホート A の1症例について、効果安全性評価委員会から免疫抑制剤の服薬状況より有効性の評価は慎重に行うべきとの意見が述べられたため、コホート B-I において、4例の予定を5例として、より多くの臨床情報を得る変更を行った。令和4年8月～令和5年3月にかけて、順天堂大学医学部附属順天堂医院（2例）、九州大学病院、大阪大学医学部附属病院および東京女子医科大学病院で、それぞれ移植が実施され、予定していた症例数の移植が完了し、フォローアップを継続中である。また、コホート A の3症例については、既定の12か月のフォローアップが完了し、さらに長期フォローアップを継続中である。

さらに、拡張型心筋症への適応拡大を目指し、病因の異なるモデルにおいて非臨床 PoC の取得を行った。すなわち、ブタ高頻度ペーシングモデル、自然発生拡張型心筋症モデルハムスター、およびカニクイザルについてはアドリアマイシン長期投与による拡張型心筋症モデルを確立し、これら大小動物モデルに対して iPS 細胞由来心筋細胞シート移植を行い、心機能の改善および安全性データを取得した。これらのデータを踏まえ、拡張型心筋症を対象とした医師主導治験の実施を目指し、治験プロトコルに関して PMDA との対面助言を行っている。

また、移植した iPS 心筋細胞が宿主心筋収縮に力学的寄与を及ぼす効果について、心臓シミュレータによる予測を踏まえつつ、組織工学を駆使した重厚な iPS 心筋細胞グラフトの開発も実施し、厚さ1mm以上の組織構築を実現した。in vitro、in vivo 実験で、力学的・電気生理学的・組織化学的特性解析データを取得している。さらに、より高機能の移植組織として、マイクロナノファイバーに再生誘導作用を持つ低分子化合物を浸潤させ、これに iPS 心筋細胞を播種した移植デバイスを開発し、虚血性心筋症の小動物モデルへの移植による in vivo における有効性を示した。

分担機関の京都大学（CiRA）においては、iPS 細胞株の心筋分化効率とエピゲノム状態の相関について評価を行い、分化効率と DNA メチル化の相関の強い遺伝子群を抽出した。また、重厚な心筋シートの作製に関して心筋細胞の成熟化を誘導する化合物の探索を行い、ERR γ 作動薬および SKP2 阻害薬の処理により心筋細胞を成熟化させる方法を開発した。心筋細胞の選別純化法に関して miRNA スイッチ法と磁気ビーズを用いた MACS ソーティング法を組み合わせることにより短時間で大量の心筋細胞を高純度で選別する方法を確立した。

並行して、免疫拒絶を抑制する移植法の開発に向け、CiRA 堀田秋津博士、吉田善紀博士と共同して、免疫拒絶応答が減弱する HLA ノックアウト iPS 細胞株の免疫反応制御の解析を実施した。また、順天堂大学・奥村康教授と共同で誘導型抑制性 T 細胞 (anergy T 細胞) による免疫寛容を誘導する in vitro, in vivo 実験を実施している。カニクイザル虚血性心筋梗塞モデルに対し、抗 CD80/CD86 抗体を直接静脈内に投与し生体内で anergy T 細胞を誘導する方法で、他家 iPS 心筋細胞シートの生着延長が確認された。

以上、虚血性心筋症に対しては、医師主導治験による臨床応用が実現しており、さらに拡張型心筋症を対象とした治験実施の準備が完了した。さらに、免疫応答の制御、有効性の高い成熟した iPS 心筋や移植デバイスの開発、商用生産に向けた培養技術の改良など、有効性・安全性・汎用性・経済性を高める新たな知見が得られた。

【英文概要】

Severe heart failure is a lethal disease with high mortality, and patients' quality of life is significantly reduced despite the development of medical treatments. To overcome the problems in replacement medicine such as heart transplantation and ventricular assist devices, and to provide a new treatment option, we have developed regenerative medicine using human iPS cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM). The transplantable cell patch we have developed is composed of hiPSC-CMs with autonomous beating properties and releases various cytokines that induce tissue repair, such as angiogenesis. Since this is an allogeneic transplant, the results of analyzing the immune response using mouse and cynomolgus monkey allogeneic transplant models were reflected in the immunosuppressive drug administration protocol. After conducting efficacy studies using large and small animal disease models and various in vitro and in vivo safety studies, including the denial of tumorigenicity, we applied for a physician-led clinical trial for the transplantation of allogeneic hiPSC-CM patches for ischemic cardiomyopathy. With institutional review board and PMDA (Pharmaceutical and Medical Devices Agency) approval, the world's first transplant operation was performed in January 2020 (Miyagawa S, et al. *Front Cardiovasc Med.* 2022, 16; 9:950829.), and the clinical trial is currently ongoing.

In parallel, we conducted a preclinical study to expand the indication of iPSC-CM patch implantation to patients with dilated cardiomyopathy (DCM) and obtained a Proof-of-Concept (POC). Considering that DCM occurs in a variety of etiologies, we have demonstrated that iPSC-CM patch transplantation can improve cardiac function in several types of animal models, including a porcine high frequency pacing model, a spontaneous DCM model in δ -sarcoglycan deficient hamsters, and a doxorubicin-induced DCM model in cynomolgus macaques. Based on these results, we have agreed with PMDA to conduct a clinical trial, which will be conducted in 2023 for DCM.

In addition, we have examined multiple methods to attenuate or control the immune response in allogeneic transplantation. For example, in collaboration with CiRA (Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University), we are developing a transplantation method using HLA knockout iPS cell lines. In collaboration with Juntendo University, a method of inducing anergy T cells that specifically express immune tolerance in iPS cells was shown to prolong the engraftment of transplanted allogeneic cells and restore cardiac function in an ischemic cardiomyopathy model in cynomolgus monkeys.

On the other hand, in order to develop a transplantation method for more highly functional iPSC-CM, we selected cell lines with high differentiation potential for cardiac function,

developed methods to enhance maturation of iPS-CM, and developed a device for transplantation of thick cellular tissue, and also acquired POC in vitro and in vivo.

These results will contribute to further efficiency, safety and versatility in the future clinical application of iPS-CM.