

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 再生医療の実現化ハイウェイ
(英語) The Highway Program for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) iPS 細胞を用いた再生心筋細胞移植による重症心不全治療法の確立
(英語) Establishment of cell therapy with iPS cells-derived regenerative cardiomyocytes for severe heart failure

研究開発担当者 (日本語) 福田恵一

所属 役職 氏名： (英語) Keiichi Fukuda

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)

開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)

所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究は、ヒト iPS 細胞を用いて心筋細胞を作出し、細胞移植により難治性重症心不全に対する新たな治療法を開発することを目的とする。基盤技術の開発を行い、臨床第 1 例目に対し再生心筋細胞移植を実施する。臨床応用を安全に成功させるために iPS 細胞由来の再生心筋細胞を純化精製した最終製品の安全性評価を行う。また、iPS 細胞大量増殖用培地、心筋細胞分化誘導培地、純化精製培地を開発し、大量培養法の開発、大動物での細胞移植の有効性と安全性の確立を併せて行う。

ヒトの心臓は 1×10^9 から 10^{10} 個の心筋細胞でなりたっているため、心筋梗塞等で失われた心臓機能を回復するためには大量の心筋細胞を必要とする。臨床応用に必要な大量の心筋細胞を準備するには未分化 iPS 細胞を大量に用意することが前提となる。それゆえ、最終的に純化心筋細胞を獲得するまでに大量の未分化 iPS 細胞培養液が必要となる。また、培養液の多くは研究用に開発されたものであり構成成分が生物由来原料基準を満たしていないために臨床用に使用することはできない。本事業において我々は味の素(株)と共同で臨床用未分化 iPS 細胞の大量培養用培地、心筋細胞の分化培地を開発した。

この臨床用培地を用いて京都大学 iPS 細胞研究所で樹立された臨床用 iPS 細胞の Ff-I14 を用いて多能性の維持と分化誘導効率の確認を行なった。FACS と免疫染色により心筋細胞特異的なタンパク質のトロポニン T、アクチニンの発現を確認した。iPS 細胞から心筋細胞への分化効率は 100%ではないため大量の心筋細胞を用いる場合には造腫瘍性細胞が混入する可能性が高い。そこで我々は大量の心筋細胞を効率良く純化精製することが iPS 細胞の臨床応用への鍵になると考え、培養液を交換することによって心筋細胞を純化精製する方法を開発した。具体的にはヒト多能性幹細胞にとってブドウ糖とグルタミンが必須の栄養素であることを発見し、培養液からブドウ糖とグルタミンを除去することでヒト iPS 細胞を死滅させることが可能であることを確認した。iPS 細胞由来の心筋細胞は胎児型であり乳酸を利用することが可能なため、グルコース、グルタミン除去培地に乳酸を添加することで非心筋細胞を死滅させ心筋細胞のみを純化精製することができる。本法によって純化心筋細胞中に残存する未分化 iPS 細胞は 0.001%以下となり、臨床グレードの純化心筋細胞を獲得することに成功した。臨床応用に向けて PMDA と品質管理の事前面談を行ない、PMDA からのコメントを参考に使用する原料の品質規格、マスターファイル登録の有無、生物由来原料基準の確認を行なった。

前臨床試験として心筋梗塞モデルのマウロミニブタを用いたヒト iPS 細胞由来心筋細胞の移植実験を行なった。iPS 細胞由来の心筋細胞を移植した群では心臓 MRI により有意に左室駆出率の改善を認め、大型動物を用いたヒト iPS 細胞由来心筋細胞球移植治療の POC を獲得した。また、心筋細胞移植による催不整脈作用を確認するためにテレモニターを植え込み安全性を確認した。さらに PMDA と非臨床安全性試験の対面助言を行い、一般毒性試験、催不整脈試験、造腫瘍試験を行なった。

First in human に向け CPC 内での業務開始に備えて製造施設 GMP 文書の講習会を実施し、細胞培養士の教育訓練を行なった。同時に CPC 内で臨床用培養液を用いて未分化 iPS 細胞の大量培養、心筋細胞の分化誘導、純化精製の培養工程を確認しながら GMP、SOP 関連文書の作成および整備を行なった。PMDA との品質管理の事前面談をふまえて実際に臨床に使用する機器の選定、試薬および消耗品の選定を行なった。CPC 業務を立ち上げ、地方厚生局に特定細胞加工物製造細胞培養加工施設の申請を行なった。さらに臨床用 iPS 細胞株の培養のためにモニタリングシステムを調整しサニテーションおよび機器のバリデーションを行なった。

This study aims at developing a new therapy for severe heart failure by cell transplantation of regenerative cardiomyocytes (CMs) using human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). We develop the generic technology and carry out cardiac cell therapy for the first clinical case. We evaluate the safety of the purified hiPSCs-derived CMs to make a success of clinical application safely. We also establish the clinical grade culture media, the scalable culture method, and perform preclinical studies in large animal models.

Because a human heart consists of 1×10^9 - 10^{10} CMs, a large number of CMs is necessary to restore a loss of cardiac function in severe heart failure. Therefore, a large quantity of culture media is necessary. Most of current media can not be used for clinical application, because they were developed for basic researches, and their components do not meet Standard for Biological Ingredients. Thus, we developed clinical grade culture media for scalable culture of hiPSCs, cardiac differentiation, and purification in cooperation with Ajinomoto Co., Inc.

The maintenance of pluripotency and the efficiency of differentiation were confirmed using clinical grade hiPSCs, established at Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University. Because the differentiation efficiency from hiPSCs to CMs is not 100%, tumorigenicity cells are more likely to get mixed in large amount of CMs. Because it was critical for the clinical application to purify a large number of CMs efficiently, we developed a purification strategy for CMs by changing culture media. Specifically, we found that glucose and glutamine were essential nutrients for hiPSCs, and confirmed hiPSCs could be eliminated by removing them. Because hiPSCs-derived CMs have fetal phenotype, they can efficiently use lactate. Glucose, glutamine-depleted and lactate-supplemented media eliminated non-CMs and generated purified CMs successfully. The remaining hiPSCs were less than 0.001%, so that the clinical grade regenerative CMs were finally acquired.

hiPSCs-derived CMs were transplanted to myocardial infarction (MI)-induced micromini pigs for preclinical studies. hiPSCs-derived CMs significantly improved the left ventricular ejection fraction by cardiac MRI, and a proof of concept (POC) for the cardiac cell therapy with hiPSCs was established. Cardiac telemonitors were implanted to MI-induced micromini pigs to check arrhythmic events, and the safety of cardiac cell therapies were confirmed. Furthermore, we had a face to face meeting with PMDA for the non-clinical safety examination, and performed general toxicity tests, examinations of proarrhythmic events, and tumorigenicity tests.

We had the classes of the GMP documents for manufacturing facility to start the cell culture in the Cell Processing Center (CPC) toward the first clinical application, and the cell culture technicians also had the educational training. We prepared GMP and SOP documents, while confirming the massive culture of hiPSCs, cardiac differentiation, and purification of CMs using a clinical grade hiPSCs and culture media in the CPC. The apparatus, reagents and expendable supplies were decided on the basis of the prior interview of the quality control with PMDA. The application of Cell Processing facility was submitted to the local public welfare station. Furthermore, we adjusted a monitoring system for the culture of clinical grade hiPSCs and performed the validation and sanitation of the apparatus in the CPC for the first-in-human clinical application.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 4 件、国際誌 5 件）

1. Kunitomi A, Yuasa S, Sugiyama F, Saito Y, Seki T, Kusumoto D, Kashimura S, Takei M, Tohyama S, Hashimoto H, Egashira T, Tanimoto Y, Mizuno S, Tanaka S, Okuno H, Yamazawa K, Watanabe H, Oda M, Kaneda R, Matsuzaki Y, Nagai T, Okano H, Yagami K, Tanaka M, Fukuda K. H1foo Has a Pivotal Role in Qualifying Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2016, 6(6), 825-833.
2. Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K. Glutamine Oxidation is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metabolism* 2016 Apr 12; 23:663-674.
3. Tohyama S, Tanosaki S, Someya S, Fujita J, Fukuda K. Manipulation of Pluripotent Stem Cell Metabolism for Clinical Application. *Current Stem Cell Reports* 2017;3:28-34.
4. Cryoinjury-induced acute myocardial infarction model and ameroid constrictor-induced ischemic heart disease model in adult micro-mini pigs for preclinical studies Hirano A, Fujita J, Kanazawa H, Kawaguchi S, Handa N, Yamada Y, Okuda S, Hishikawa S, Teratani T, Kunita S, Tohyama S, Seki T, Tabei R, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Okamoto K, Shimizu H, Kobayashi E and Fukuda K *Translational Medicine Communications*20172:1 DOI: 10.1186/s41231-017-0011-y
5. Fujita J, Tohyama S, Nakajima K, Seki T, Kanazawa H, Fukuda K. Road to heart regeneration with induced pluripotent stem cells. “**Stem Cells in Clinical Application Vol 3: Liver, Lung and Heart Regeneration**” edited by Phuc Van Pham. 2016 Springer p137-152.
6. 中嶋一晶、福田恵一 『iPS 細胞由来再生心筋細胞の移植による重症心不全治療法の開発』月刊糖尿病 8 巻 6 号 47-52、2016 年
7. 福田恵一 『iPS 細胞を用いた遺伝性不整脈の病態解明』日本内科学会雑誌 105 巻 84-94。2016 年
8. 福田恵一 BRB Medical Salon Report LaVie シリーズ再生医療 『心臓の再生医療』2016 年 7 月 20 日
9. 福田恵一、遠山周吾、関倫久、湯浅慎介、藤田淳。『循環器領域への iPS 細胞の臨床応用の現状』循環器専門医 2016 年 24 巻 2 号 244-251。

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. iPS 細胞由来心筋細胞を用いた重症心不全に対する心筋再生医療における移植デバイスの開発 田部井亮太、金澤英明、藤田淳、遠山周吾、平野敦敬、川口新治、志水秀行、田畑泰彦、小林英司、福田恵一 東京コンベンションホール 2016 年 12 月 16 日 国内
2. 新規クロマチンリモデリング因子 H1foo による高品質 iPS 細胞の樹立 國富晃, 湯浅慎介, 杉山文博, 関倫久, 楠本大, 櫻村晋, 遠山周吾, 岡野栄之, 八神健一, 田中守, 福田恵一 Molecular Cardiovascular Conference II(2016) 東京 2016 年 9 月 3 日 (口頭)

3. 卵母細胞特異的リンカーヒストン H1foo による高品質 iPS 細胞の樹立 國富晃 第 39 回 日本高血圧学会総会 仙台 2016 年 10 月 2 日 (口頭)
4. 卵母細胞特異的リンカーヒストン H1foo による高品質 iPS 細胞の樹立と心筋分化への応用 國富晃, 湯浅慎介, 杉山文博, 岡野栄之, 八神健一, 田中守, 福田恵一 第 20 回 日本適応医学学会学術集会 東京 2016 年 12 月 17 日 (口頭)
5. H1foo has a pivotal role in qualifying induced pluripotent stem cells Kunitomi A 第 5 回 IRG meeting 東京 2017 年 1 月 7 日 (口頭)
6. 卵母細胞特異的リンカーヒストン H1foo を用いた高品質ヒト iPS 細胞の樹立 國富晃 第 22 回 関東ハートセミナー 東京 2017 年 2 月 10 日 (口頭)
7. 卵母細胞特異的リンカーヒストン H1foo による高品質 iPS 細胞の樹立 國富晃 第 16 回 日本再生医療学会総会 仙台 2017 年 3 月 9 日 (口頭)
8. Manipulation of Pluripotent Stem Cell Metabolism for Cardiac Regenerative Medicine シンポジウム(Oral English) Shugo Tohyama 第 94 回日本生理学会 (アクトシティ浜松) 2017/3/29 国内
9. ヒト多能性幹細胞におけるアミノ酸代謝の役割と心臓再生医療への応用 シンポジウム (口頭) 遠山周吾, 藤田淳, 菱木貴子, 末松誠, 福田恵一 第 16 回日本再生医療学会 (仙台国際センター) 2017/3/9
10. ヒト多能性幹細胞におけるグルタミン代謝を利用した心臓再生医療 シンポジウム (口頭) 遠山周吾, 藤田淳, 菱木貴子, 末松誠, 福田恵一 第 39 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜) 2016/12/1
11. ヒト多能性幹細胞におけるアミノ酸代謝の役割と心臓再生医療への応用 シンポジウム (口頭) 遠山周吾 藤田淳 福田恵一 第 20 回日本心不全学会学術総会 (ロイトン札幌 ホテル札幌芸文館) 2016/10/9
12. GLUTAMINE OXIDATION PLAYS A KEY ROLE FOR CELL SURVIVAL OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS Poster Session (English) Shugo Tohyama, Jun Fujita, Takako Hishiki, Sho Tanosaki, Shota Someya, Fumi-yuki Hattori, Makoto Suematsu and Keiichi Fukuda *Cell Symposia 2016* (Place: San Francisco Berkeley) 2016/9 /26
13. ヒト多能性幹細胞におけるユニークな代謝機構と心臓再生医療への応用 シンポジウム (口頭) 遠山周吾 *Molecular Cardiovascular Conference II* (東京ドームホテル) 2016/9/3
14. ヒト多能性幹細胞におけるユニークな代謝機構と心臓再生医療への応用 シンポジウム (口頭) 遠山周吾 第 2 回若手が開く新しい再生医療の世界 (東京医科歯科大学) 2016/7/25
15. GLUTAMINE OXIDATION IS ESSENTIAL FOR CELL SURVIVAL OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS Poster Session (English) Shugo Tohyama, Jun Fujita, Takako Hishiki, Sho Tanosaki, Shota Someya, Fumi-yuki Hattori, Makoto Suematsu and Keiichi Fukuda *The 14th annual scientific meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2016* (Place: San Francisco) 2016/6/22
16. 代謝制御によるヒト iPS 細胞由来純化心筋細胞を用いた心筋球作製法の開発と再生医療への応用 シンポジウム (口頭) 遠山周吾 第 55 回日本生体医工学会 (富山国際会議場、富山市民プラザ) 2016/4/26

17. NKX2-5DsRed/w ヒト iPS 細胞株の確立とその応用 ポスター 大野麗、遠山周吾、藤田淳、福田恵一 第 16 回日本再生医療学会総会 2017 年 3 月 9 日 (木) 仙台国際センター 会議棟・展示棟
18. Novel Pathological Detection System of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Using T-cell Receptor Gene Locus for Cell Transplantation Therapy Yoshikazu Kishino, Tomohisa Seki, Keiichi Fukuda, Keystone Symposia, 2016/4/3-7, 国外
19. Novel Pathological Detection System of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Using T-cell Receptor Gene Locus for Cell Transplantation Therapy Yoshikazu Kishino, Tomohisa Seki, Keiichi Fukuda, ISSCR 2016 San Francisco, 2016/6/22-25, 国外
20. T細胞受容体遺伝子再構成を標的とした細胞移植治療における iPS 細胞由来移植心筋細胞の新規病理学的同定法 岸野喜一, 関倫久, 湯浅慎介, 藤田淳, 福田恵一, Molecular Cardiovascular Conference II, 2016/9/2-3, 国内
21. 第 52 回日本移植学会 臓器横断的ワークショップ 3 再生医療 (代替治療・臓器再生) 福田恵一 『iPS 細胞を用いた心筋再生医療実用化の現状』平成 28 年 10 月 1 日 グランドプリンスホテル高輪 国際会館パミール
22. 第 37 回日本循環制御医学会 ランチョンセミナー 福田恵一 『iPS 細胞を用いた心筋再生医療実用化の現状と SGLT2 阻害薬の使用』平成 28 年 7 月 7 日 東京ステーションカンファレンス
23. 第 64 回日本輸血細胞治療学会総会 細胞治療サイエンスフォーラム 共催セミナー 1 3 福田恵一 『企業と二人三脚で進める心筋再生医療への挑戦』京都国際会議場 平成 28 年 4 月 30 日
24. 第 113 回日本内科学会総会・招請講演 福田恵一 『iPS 細胞を用いた遺伝性心筋疾患の病態解明』平成 28 年 4 月 16 日 東京国際フォーラム A ホール
25. The 9th International Conference on Cell Therapy. Generation of high quality iPS cell (Super iPS cell) using oocyte-specific linker histone H1foo. Keiichi Fukuda. September 29th, 2016 Seoul National University, Seoul, Korea.
26. The 5th Gwangju-Boston Cardiology Sumposium. Keiichi Fukuda. May 20th, 2016. Gwangju, Korea
27. 城北心不全フォーラム 福田恵一 『iPS 細胞の循環器領域への臨床応用』平成 28 年 11 月 18 日 東京都健康長寿医療センター
28. 市川循環管理連携セミナー 福田恵一 『iPS 細胞の循環器領域への臨床応用』平成 28 年 10 月 31 日 千葉県市川市内科医会
29. 第 30 回長崎障害者支援再生医療研究会 福田恵一 『心筋再生医療：前臨床研究から臨床応用へ向けた課題とその克服』平成 28 年 10 月 27 日 長崎大学医学部 良順会館 1F 専斎ホール
30. 第 6 回南紀和歌山循環器カンファレンス 福田恵一 『心筋再生医療：前臨床研究から臨床応用へ向けた課題とその克服』平成 28 年 10 月 22 日 和歌山県立情報交流センター
31. 第 52 回日本赤十字社医学会総会シンポジウム 福田恵一 『iPS 細胞を用いた心筋再生医療実用化の現状』平成 28 年 10 月 21 日 栃木県宇都宮市

32. 第 10 回東葛ハートセミナー 福田恵一 『iPS 細胞を用いた心筋再生医療実用化の現状』 平成 28 年 10 月 19 日 千葉県松戸市新東京病院講堂
33. バイオジャパン 2016 『iPS 細胞研究アップデート』 福田恵一 『心疾患の治療を目指した iPS 細胞の次世代研究』 平成 28 年 10 月 14 日 横浜みなとみらい ANNEX
34. 第 6 回福島心不全研究会 福田恵一 『心筋再生医療：前臨床研究から臨床応用へ向けた課題とその克服』 平成 28 年 9 月 16 日 福島県福島市
35. 第 65 回循環器診療セミナー in 西宮 福田恵一 『心筋再生医療：前臨床研究から臨床応用へ向けた課題とその克服』 平成 28 年 7 月 7 日 ノボテル甲子園
36. 京都大学 iPS 研究所セミナー 福田恵一 『Generation of high quality iPS cells and high grade purification of regenerated cardiomyocytes for cell transplantation therapy』 京都大学 iPS 細胞研究所 平成 28 年 5 月 2 日

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 重症心不全に対する心筋再生医療の現状と展望, 福田恵一, 第 11 回日本心不全学会市民公開講座, 2017/2/5, 国内
2. H1foo を用いた iPS 細胞の品質向上 國富晃, 湯浅慎介, 福田恵一 第 1 回 橋渡し研究加速ネットワークシンポジウム 東京 2016 年 1 月 27 日 (ポスター)
3. H1foo を用いた iPS 細胞の品質向上 國富晃, 湯浅慎介, 福田恵一 第 2 回 橋渡し研究加速ネットワークシンポジウム 東京 2017 年 1 月 13 日 (ポスター)
4. 第 2 回橋渡し研究加速ネットワークプログラムシンポジウム 福田恵一 2017 年 1 月 13 日 慶應義塾大学医学部北里講堂

(4) 特許出願

国際出願：PCT/JP2016/003282