

綜 説

多能性幹細胞を用いた心筋再生治療

門田 真* 柴 祐司

信州大学医学部再生医科学教室
信州大学医学部附属病院循環器内科
信州大学バイオメディカル研究所

Cardiac Regeneration Using Pluripotent Stem Cells

Shin KADOTA and Yuji SHIBA

*Regenerative Science and Medicine, Cardiovascular Medicine,
Institute for Biomedical Sciences, Shinshu University***Key words**: cardiac regeneration, pluripotent stem cell, heart disease

心筋再生, 多能性幹細胞, 心疾患

I はじめに

筆頭著者は平成15年に京都大学医学部を卒業後、循環器内科医として研修したのち、平成21年より京都大学医学研究科に大学院生として入学し、主にヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた不整病態モデル作製を行った¹⁾。平成25年からは博士研究員として米国シアトル University of Washington に留学し、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞の小動物への移植後成熟化などについて研究した²⁾。平成28年12月より信州大学医学部附属病院循環器内科、平成29年5月以降は医学部再生医科学教室に所属し、移植応用に向けた研究を続けている。多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた研究を約8年行っており、これまでの経験を踏まえて、この細胞を用いた治療応用実現に向けての現状と取り組むべき課題について述べたいと思う。

II 心疾患

現在、心疾患は世界での死亡原因の第1位であり³⁾、日本でも悪性新生物に次いで第2位である(平成27年度厚生労働省人口動態統計)。その原因の多くは、動脈硬化などのために心臓への栄養血管である冠動脈の血流が遮断されて起こる心筋梗塞や狭心症といった虚血性心疾患であり、薬物治療および血行再建術(カ

テーテルインターベンション、バイパス手術)が主な治療法である。そのような虚血性心疾患においては、数時間以上血流が途絶した虚血部位は不可逆的な障害を受け、心筋細胞が壊死して瘢痕化する。つまり収縮能のある心筋細胞の一部が死滅し、炎症細胞が浸潤したのち、約2カ月で線維化した組織に置き換わってしまう⁴⁾。そのため、全身へ血流を送り出すポンプとしての能力は減弱し、いわゆる心不全となる。上述の治療などにより、死亡率は改善してきたが⁵⁾、不可逆的な慢性心不全に対する根本的な治療法は現在のところ心移植のみである。日本を含む先進国においては、今後高齢化に伴って心不全患者の増加が見込まれる一方⁵⁾、ドナー不足が深刻であることから、心移植に代わる代替治療の開発が必要である。

III 心臓への細胞治療

今日までの心臓に対する細胞治療としては、骨髄由来細胞⁶⁻⁸⁾や骨格筋芽細胞⁹⁾、心筋幹細胞¹⁰⁾¹¹⁾などが用いられている。いずれも患者個人から細胞が採取でき、臨床試験で治療後の安全性は示されたものの、治療効果が一定ではない¹²⁾。その主な理由は、それらの細胞が心筋細胞への分化能が乏しく、移植した後に長期間残存できないためである¹³⁾。特に、心筋幹細胞の一つと考えられていたC-kit陽性細胞¹⁰⁾に関しては、心筋細胞への分化能がほとんどなく¹⁴⁾、心機能改善効果は主に血管新生によるものと考えられている¹⁵⁾。ゼブラフィッシュや新生児マウスなどで認められる心筋再生

* 別刷請求先: 門田 真 〒390-8621
松本市旭3-1-1 信州大学医学部再生医科学教室
E-mail: shinkadota@shinshu-u.ac.jp

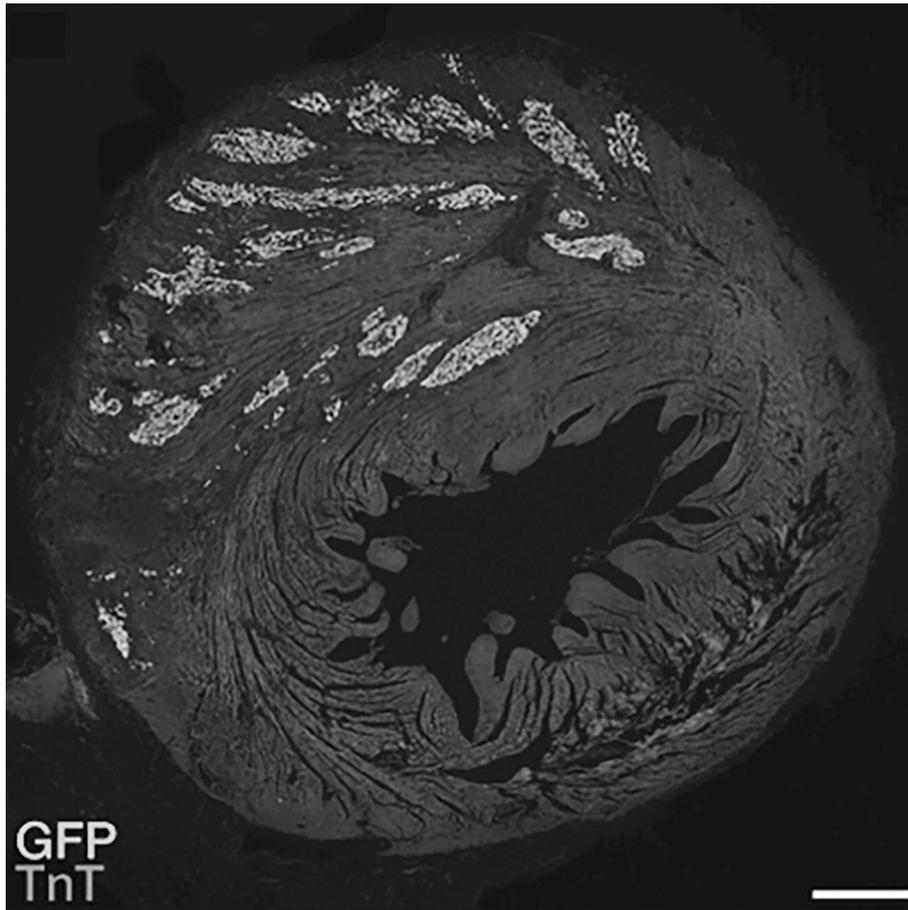


図1 サル心筋梗塞モデルに移植後、生着したiPS細胞由来心筋細胞
MHC型一致同種移植後の長期生着したiPS細胞由来心筋細胞（GFP陽性）。
スケールバー=1mm。（Shiba, et al, Nature 538 : 388-391, 2016より）

が、幹細胞由来ではなく、心筋の分裂と増殖によることが明らかになり¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、そもそも治療応用できるほどの心筋への分化能を持った心筋幹細胞が生体内に存在しているのかも未だ不明である。つまり、これまで利用された細胞治療の効果は、いわゆる“パラクライン効果”と呼ばれる細胞が分泌する液性因子などによるものと考えられる¹⁹⁾。最近では、Cardiosphereと呼ばれる増殖性を持った心臓由来細胞から分泌される“エクソソーム（直径30~100 nmの膜小胞体）”が心筋梗塞後の心機能改善に効果があるとの報告もあり²⁰⁾、パラクライン効果を出す分子を特定して、薬剤開発へ応用しようとする研究が進んでいる。

一方で、多能性幹細胞：ES細胞（胚性幹細胞）とiPS細胞（人工多能性幹細胞）は、文字通り胎盤を除いたほぼ全ての種類の細胞へと分化する能力を持っているため、目的の細胞へと分化誘導することが可能である。また、未分化状態を維持したまま無限に増殖する能力を持つがゆえに、必要な細胞を大量に作製する

ことができる。したがって、多能性幹細胞由来心筋細胞を用いることで、移植後の細胞生着による心筋再生を目指すことが可能である²¹⁾⁻²³⁾。実際に、心筋梗塞後のサルへの細胞移植実験において、 10^8 - 10^9 個といった大量の心筋細胞を移植したところ、3カ月後にも移植細胞が生着し（図1）、心機能を改善することが示された²⁴⁾²⁵⁾。また、多能性幹細胞由来心筋細胞は移植宿主（ホスト）心筋と電気的に結合することにより、同期して収縮することが可能であることも示された（図2）²⁴⁾⁻²⁸⁾。そのため、我々を含めて、世界中で治療応用に向けた研究が進んでいる。

IV 多能性幹細胞由来心筋細胞の特徴

これまでの研究で多能性幹細胞の培養液中に、心臓発生に必要な種々の分子（アクチビンAやBMP4、Wnt系の調整因子など）を加えること²⁹⁾⁻³³⁾、心筋細胞に特異的な代謝系である乳酸を心筋分化後に加えて心筋細胞以外を取り除くことなどにより³⁴⁾³⁵⁾、90%

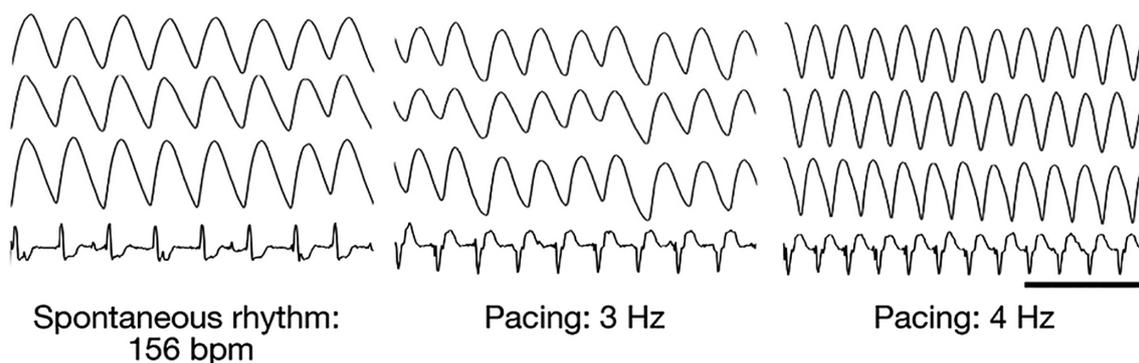


図2 ホスト-グラフト間の電氣的結合

サル心臓に生着したiPS細胞由来心筋細胞からのカルシウム蛍光(上3波形)と心電図(最下波形)が4 Hz(心拍数240回/分)の電気刺激まで同期していることより、ホスト-グラフト間の電氣的結合が確認できる。スケールバー=1秒。(Shiba, et al, Nature 538: 388-391, 2016より)

以上の効率で心筋細胞を作製することが可能となった。また、バイオリクターと呼ばれる3次元的な培養法を用いて、分化心筋細胞の高効率な大量培養も可能となった³⁶⁾³⁷⁾。

しかしながら、分化心筋細胞は成体心筋細胞と比較して未熟である³⁸⁾³⁹⁾。ヒト由来細胞は長期培養⁴⁰⁾⁴¹⁾や電氣的⁴²⁾もしくは機械的⁴³⁾、薬物の添加⁴⁴⁾、培養条件の変更⁴⁵⁾などによってある程度成熟するが、成人心筋細胞とは似て非なるものである。発現遺伝子解析でも、成熟させた分化心筋細胞ですら胎児期の心筋と同様であるとされる⁴⁶⁾。ただし、移植後生着した細胞は培養環境下と異なり生体内の環境因子により成熟化が促進される可能性があり、実際にサルの心臓に移植したヒト由来細胞は3カ月後には成体サル細胞と同様の細胞径となった²⁴⁾。そこで、ラットが成長する間にヒト由来細胞も同様に成熟すると考え、新生児ラットにヒト由来細胞を移植したが、生着ヒト細胞の成熟速度はラット由来細胞よりも遅かった²⁾。ラット由来細胞やマウスiPS細胞由来細胞を用いた場合には成熟度が1-3カ月でほぼホストと同様に成体型になることから²⁾⁴⁷⁾、ヒト細胞がラット生体内で成熟が遅い理由は、種の違いによる細胞の成熟速度の違いが一つの原因だと考えらえる。

V 臨床応用

ヒトES細胞由来細胞を用いた臨床試験は、眼科・脳神経外科・糖尿病の領域で始まっており、心臓領域においてもすでに心筋前駆細胞を用いた臨床研究がフランスで開始されている(ClinicalTrials.gov)。ただし、心筋前駆細胞を用いた治療は 4×10^6 個の細胞か

らなる心筋パッチを冠動脈バイパス術と同時に移植したもので、報告のあった1例では長期経過は良好であるが、移植細胞から得られた治療効果は不明である⁴⁸⁾。一方で、ヒトiPS細胞は患者から自己iPS細胞株の樹立が可能であることから、1例のみ眼科疾患において臨床応用がなされた⁴⁹⁾。2例目は患者から樹立した細胞株に遺伝子変異が認められ、移植後の安全性を担保できないために、他人由来のiPS細胞を用いて臨床試験が行われた。他人の細胞を用いた場合(アロ移植)には免疫拒絶が大きな問題となり、免疫抑制剤をどのように使用するかが課題である。心筋細胞移植においても同様で、サルを用いたアロ移植において、MHC(主要組織適合遺伝子複合体)型を一致させた組み合わせでは、免疫抑制剤であるタクロリムスとプレドニゾロンの使用により移植後の細胞生存は良好であったが、MHC型が一致しない場合には2剤の免疫抑制では移植後の細胞生存は得られなかった²⁵⁾。世界中で様々なMHC型のiPS細胞株が樹立されており、それらをバンク化して移植医療へ応用しようとする研究が進行中である。

VI 解決すべき課題

A 均一な心筋細胞の分化誘導

上述した一般的な分化誘導法では心筋細胞を90%以上の効率で分化誘導できるが、全ての細胞が同じ電気生理学的な特徴を有しているとは言いきれないところがあり、作業心筋と呼ばれる心室筋のみへの純化法の開発が必要である。また、心臓組織のうち心房筋⁵⁰⁾、プルキンエ細胞⁵¹⁾、洞房結節⁵²⁾、心外膜系⁵³⁾への部位特異的な分化誘導法が報告されているが、房室結節の

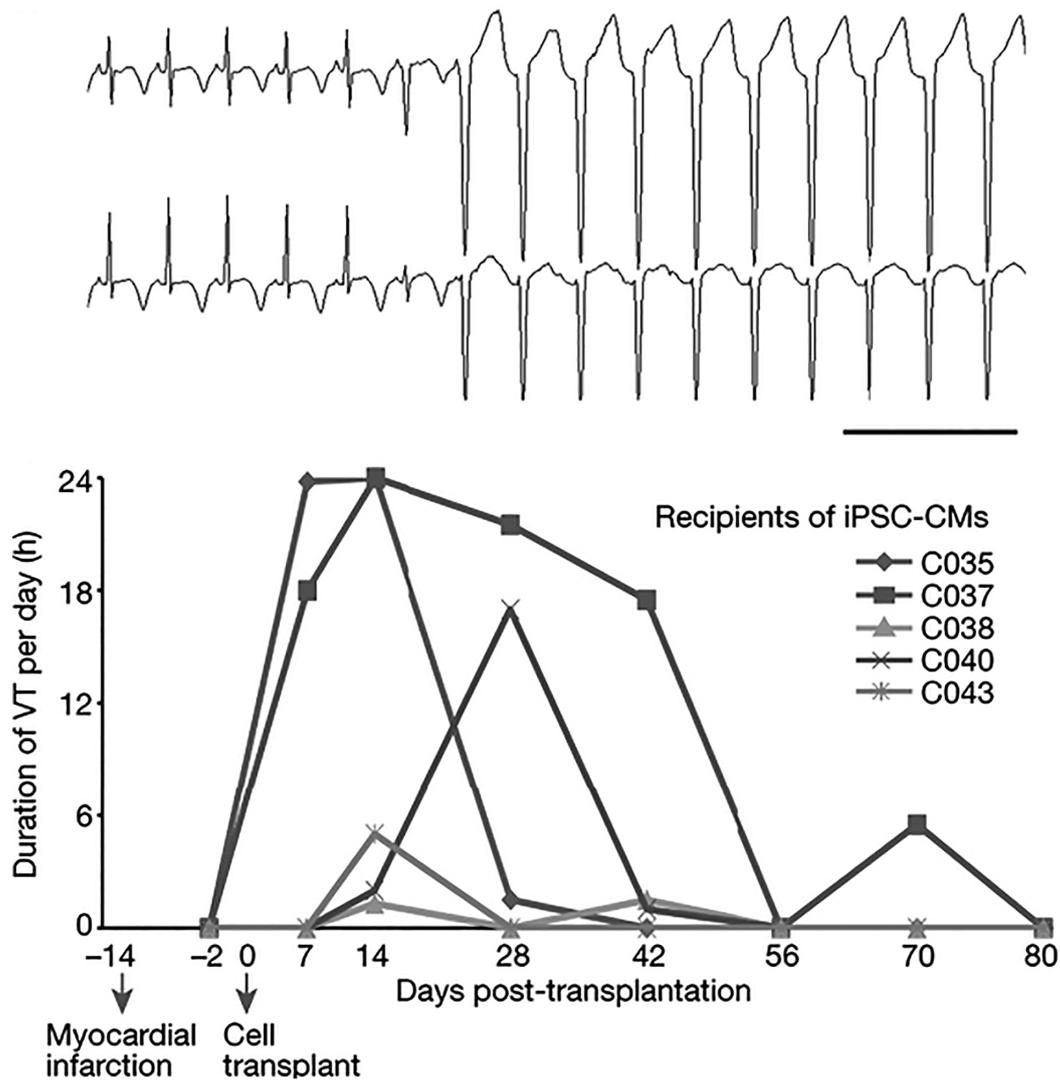


図3 移植後不整脈

サル心臓にiPS細胞由来心筋細胞を移植した後に出現した心室性不整脈の心電図波形(上)と持続性不整脈の出現時間(下)。移植後14~28日後をピークに全例で出現している。スケールバー=1秒。(Shiba, et al, Nature 538: 388-391, 2016より)

分化誘導ではペースメーカー細胞への分化効率が50%程度と低い⁵²⁾。今後効率を上げてペースメーカー細胞を純化できる培養法が開発できれば、徐脈性不整脈に対する機械式ペースメーカーに代わる細胞治療(バイオペースメーカー)が可能となる。

B 移植後不整脈

ヒト由来細胞の小動物(マウス, ラット, モルモット)への移植においては不整脈の出現は認められなかったが, 大動物への移植後には一過性に心室性の不整脈が出現した²⁴⁾。同様に, サル由来細胞をサルに移植しても一過性の不整脈が生じた(図3)²⁵⁾。ヒトでは60-100/分である心拍数が, モルモットは200/分, ラットは400/分, マウスは600/分と大きく異なるため,

小動物への移植ではヒト由来細胞からの活動電位がマスクされてしまう。他方, サルやブタといった大動物では心拍数がヒトに近いので, 不整脈が検出しやすい。サルの同種移植となると, 異種移植よりもさらに不整脈検出が容易となる。不整脈発生の原因としては分化心筋細胞の自動能(ペースメーカー機能)の残存や心筋の未熟性などが考えられ, 我々も不整脈の出現メカニズムを解明する研究を進めている。

C 移植方法

これまで報告されてきた多能性幹細胞由来心筋細胞の移植方法には, 大きく2つの方法がある。注射針などによる注入法と, シート状などにした組織接着法である。注入法は移植する前に細胞をばらす必要があり,

組織化された細胞の特徴を壊してしまうが、実際には移植した細胞は心臓内でホストとの間に電気的結合を作り、かつ細胞が増殖することでグラフトの組織を維持している²⁴⁾²⁵⁾²⁷⁾。また、速度は遅いものの、移植後の細胞がホスト心臓内で成熟化していることが分かっている²⁾²⁴⁾。組織接着法を用いた場合には、熱感受性の細胞外マトリックスなどを用いて、細胞間の結合などが保持されたまま心筋の外膜などに組織を圧着させることができる⁵⁴⁾。この方法では、移植細胞由来の液性因子などによるパラクライン効果で心筋虚血部位での血管新生などが進み、心機能改善効果があると考えられる⁵⁵⁾⁻⁵⁸⁾。前述の自己由来細胞と同様に、パラクライン効果を示す物質の検索も進んでいる⁵⁹⁾。

同じヒト由来細胞をラット心臓に移植して、注入法と組織接着法を比較した研究では、注入法により移植した細胞がホスト-グラフト間に電気的結合を示したのに対して、組織接着法により心外膜に細胞パッチを張り付けたところ、ホスト-グラフト間には電気的な結合を全く認めなかった²⁸⁾。そのため、組織接着法は催不整脈作用を心配する必要がなく、安全であるともいえる。いずれの移植方法が安全で長期的な心機能改善効果をもたらすかは、今後も研究を続ける必要がある。

D 移植後の生着率の向上

注入法で細胞移植した場合に、約90%の細胞が生着せず早期に死滅してしまうことが分かっており⁶⁰⁾、残存した心筋が増殖することでグラフト組織を形成している。移植細胞の分化誘導後の日齢で移植後のグラフト面積を比較した研究では、分化誘導後20日前後の細胞を移植した時にグラフト面積が最も大きく、より未熟な細胞を入れたとしても面積が大きくなるわけではなかった⁶¹⁾⁶²⁾。現在我々は注入法において、細胞を回収する約1日前に43℃で30分～1時間の熱ショックを与え、細胞死を抑制する因子（Pro-survival cocktail）と、細胞外基底膜が主成分のマトリゲルを移植直前に細胞に混ぜて投与することで、移植後の細胞生着率の向上を図っている⁶³⁾。マトリゲルはマウス肉腫由来のラミニン、コラーゲンなどの動物由来成分を含んだ混合物であるため、将来的な移植応用においては成分が分かっている合成化合物などに代替することが望ましいと考えられる。

E 非心筋細胞との混合

培養環境下においては、線維芽細胞、血管内皮細胞や平滑筋細胞などを心筋細胞と混合することで、臓器

により近い心筋組織を作製できることが分かっている⁶⁴⁾。しかしながら、血管を形成するような血管内皮細胞などを混合して移植した場合に、グラフト由来の新たな血管が新生されて、それがホスト由来の血管とうまく結合しているかは不明である⁵⁸⁾⁶⁵⁾。サルにヒト由来細胞を移植した例でも、約70%の心筋純度であったにも関わらず長期残存したグラフト細胞は99%が心筋細胞であった²⁴⁾。線維芽細胞などの非心筋細胞から細胞外マトリックスを形成する成分などが分泌され、それらが移植後の生着率上昇に寄与する可能性もある。移植後の心機能改善のためには、心筋細胞のみを純化して移植したのによいのか、非心筋細胞との混合が望ましいかどうかは今後検討する必要がある。

F 治療の時期

これまでの動物実験では心筋梗塞発症後、急性期の細胞移植においては収縮能が改善するのに対して、慢性期モデルではあまり効果が示されていない。特にラットやモルモットのモデルにおいては、急性心筋梗塞作製1カ月後では心機能の改善が見られなかった⁶⁶⁾⁶⁷⁾。原因としては、ホストとグラフトの間に電気的な結合ができにくく、グラフトがホストから隔離された状態で残るために、収縮能改善への寄与が少なくなることが考えられる。しかしながら、ブタの心筋梗塞モデルでは4週間後の細胞シート移植で心機能改善効果が認められている⁵⁵⁾ことから、大動物と小動物で細胞治療の効果が出るタイミングが違う可能性もある。臨床において急性期に細胞移植を行うことは現実的には難しく、1-2週間後の亜急性期もしくは1カ月後以降の慢性期となることが考えられるため、さらなる大動物を用いた慢性期モデルでの検討が必要である。

Ⅶ おわりに

日本ではiPS細胞を用いた臨床研究について報道されているが、それ以前からアメリカなどではES細胞由来細胞を使った臨床試験が始まっていた。それらの細胞を使いたいいわゆる“再生医療”はいまだ標準的な治療法には達していないが、今後一般的な治療法になる可能性がある。心臓領域においても、上述した種々の課題を解決して、ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞移植が心筋再生治療として応用されることを目指してこれからも研究を続けたいと思う。

文 献

- 1) Kadota S, Minami I, Morone N, Heuser JE, Agladze K, Nakatsuji N : Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *Eur Heart J* 34 : 1147-1156, 2013
- 2) Kadota S, Pabon L, Reinecke H, Murry CE : In Vivo Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Neonatal and Adult Rat Hearts. *Stem Cell Reports* 8 : 278-289, 2017
- 3) Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jimenez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P : Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update : A Report From the American Heart Association. *Circulation* 135 : e146-e603, 2017
- 4) Laflamme MA, Murry CE : Regenerating the heart. *Nat Biotechnol* 23 : 845-856, 2005
- 5) Braunwald E : The war against heart failure : the Lancet lecture. *Lancet* 385 : 812-824, 2015
- 6) Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H : Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction : the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364 : 141-148, 2004
- 7) Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K : Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355 : 1199-1209, 2006
- 8) Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, El Nakadi B, Banovic M, Beleslin B, Vrolix M, Legrand V, Vrints C, Vanoverschelde JL, Crespo-Diaz R, Homsy C, Tendera M, Waldman S, Wijns W, Terzic A : Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure : the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol* 61 : 2329-2338, 2013
- 9) Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA : The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial : first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 117 : 1189-1200, 2008
- 10) Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P : Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO) : initial results of a randomised phase I trial. *Lancet* 378 : 1847-1857, 2011
- 11) Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marban L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marban E : Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS) : a prospective, randomised phase I trial. *Lancet* 379 : 895-904, 2012
- 12) Gyongyosi M, Wojakowski W, Lemarchand P, Lunde K, Tendera M, Bartunek J, Marban E, Assmus B, Henry TD, Traverse JH, Moye LA, Surder D, Corti R, Huikuri H, Miettinen J, Wohrle J, Obradovic S, Roncalli J, Malliaras K, Pokushalov E, Romanov A, Kastrup J, Bergmann MW, Atsma DE, Diederichsen A, Edes I, Benedek I, Benedek T, Pejkov H, Nyolczas N, Pavo N, Bergler-Klein J, Pavo IJ, Sylven C, Berti S, Navarese EP, Maurer G : Meta-Analysis of Cell-based Cardiac stUdiEs (ACCRUE) in patients with acute myocardial infarction based on individual patient data. *Circ Res* 116 : 1346-1360, 2015
- 13) Hu X, Xu Y, Zhong Z, Wu Y, Zhao J, Wang Y, Cheng H, Kong M, Zhang F, Chen Q, Sun J, Li Q, Jin J, Chen L, Wang

- C, Zhan H, Fan Y, Yang Q, Yu L, Wu R, Liang J, Zhu J, Jin Y, Lin Y, Yang F, Jia L, Zhu W, Chen J, Yu H, Zhang J, Wang J : A Large-Scale Investigation of Hypoxia-Preconditioned Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Myocardial Repair in Nonhuman Primates : Paracrine Activity Without Remuscularization. *Circ Res* 118 : 970-983, 2016
- 14) van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SC, Middleton RC, Marban E, Molkentin JD : c-kit+ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature* 509 : 337-341, 2014
 - 15) Cai CL, Molkentin JD : The Elusive Progenitor Cell in Cardiac Regeneration : Slip Slidin' Away. *Circ Res* 120 : 400-406, 2017
 - 16) Poss KD, Wilson LG, Keating MT : Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298 : 2188-2190, 2002
 - 17) Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, Evans T, Macrae CA, Stainier DY, Poss KD : Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* 464 : 601-605, 2010
 - 18) Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA : Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331 : 1078-1080, 2011
 - 19) Hodgkinson CP, Bareja A, Gomez JA, Dzau VJ : Emerging Concepts in Paracrine Mechanisms in Regenerative Cardiovascular Medicine and Biology. *Circ Res* 118 : 95-107, 2016
 - 20) Gallet R, Dawkins J, Valle J, Simsolo E, de Couto G, Middleton R, Tseliou E, Luthringer D, Kreke M, Smith RR, Marban L, Ghaleh B, Marban E : Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur Heart J* 38 : 201-211, 2017
 - 21) Laflamme MA, Murry CE : Heart regeneration. *Nature* 473 : 326-335, 2011
 - 22) Gerbin KA, Murry CE : The winding road to regenerating the human heart. *Cardiovasc Pathol* 24 : 133-140, 2015
 - 23) Zimmermann WH : Translating Myocardial Remuscularization. *Circ Res* 120 : 278-281, 2017
 - 24) Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van Biber B, Cook SM, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE : Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510 : 273-277, 2014
 - 25) Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U : Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538 : 388-391, 2016
 - 26) Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L : Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22 : 1282-1289, 2004
 - 27) Shiba Y, Fernandes S, Zhu WZ, Filice D, Muskheli V, Kim J, Palpant NJ, Gantz J, Moyes KW, Reinecke H, Van Biber B, Dardas T, Mignone JL, Izawa A, Hanna R, Viswanathan M, Gold JD, Kotlikoff MI, Sarvazyan N, Kay MW, Murry CE, Laflamme MA : Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 489 : 322-325, 2012
 - 28) Gerbin KA, Yang X, Murry CE, Coulombe KL : Enhanced Electrical Integration of Engineered Human Myocardium via Intramyocardial versus Epicardial Delivery in Infarcted Rat Hearts. *PLoS One* 10 : e0131446, 2015
 - 29) Murry CE, Keller G : Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations : lessons from embryonic development. *Cell* 132 : 661-680, 2008
 - 30) Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, Raval KK, Zhang J, Kamp TJ, Palecek SP : Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 : E1848-1857, 2012
 - 31) Minami I, Yamada K, Otsuji TG, Yamamoto T, Shen Y, Otsuka S, Kadota S, Morone N, Barve M, Asai Y, Tenkova-Heuser T, Heuser JE, Uesugi M, Aiba K, Nakatsuji N : A small molecule that promotes cardiac differentiation of

- human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions. *Cell Rep* 2: 1448-1460, 2012
- 32) Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP: Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/beta-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* 8: 162-175, 2013
 - 33) Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM, Plews JR, Abilez OJ, Cui B, Gold JD, Wu JC: Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* 11: 855-860, 2014
 - 34) Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K: Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 12: 127-137, 2013
 - 35) 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 Metab* 23: 663-674, 2016
 - 36) Kempf H, Kropp C, Olmer R, Martin U, Zweigerdt R: Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. *Nat Protoc* 10: 1345-1361, 2015
 - 37) Chen VC, Ye J, Shukla P, Hua G, Chen D, Lin Z, Liu JC, Chai J, Gold J, Wu J, Hsu D, Couture LA: Development of a scalable suspension culture for cardiac differentiation from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 15: 365-375, 2015
 - 38) Yang X, Pabon L, Murry CE: Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 114: 511-523, 2014
 - 39) Denning C, Borgdorff V, Crutchley J, Firth KS, George V, Kalra S, Kondrashov A, Hoang MD, Mosqueira D, Patel A, Prodanov L, Rajamohan D, Skarnes WC, Smith JG, Young LE: Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells: - From laboratory curiosity to industrial biomedical platform. *Biochim Biophys Acta* 1863: 1728-1748, 2016
 - 40) Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, Yoshida Y, Wuriyanghai Y, Chen J, Hattori T, Ohno S, Kita T, Horie M, Yamanaka S, Kimura T: Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture. *Circ J* 77: 1307-1314, 2013
 - 41) Lundy SD, Zhu WZ, Regnier M, Laflamme MA: Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 22: 1991-2002, 2013
 - 42) Nunes SS, Miklas JW, Liu J, Aschar-Sobbi R, Xiao Y, Zhang B, Jiang J, Masse S, Gagliardi M, Hsieh A, Thavandiran N, Laflamme MA, Nanthakumar K, Gross GJ, Backx PH, Keller G, Radisic M: Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 10: 781-787, 2013
 - 43) Tulloch NL, Muskheli V, Razumova MV, Korte FS, Regnier M, Hauch KD, Pabon L, Reinecke H, Murry CE: Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture. *Circ Res* 109: 47-59, 2011
 - 44) Yang X, Rodriguez M, Pabon L, Fischer KA, Reinecke H, Regnier M, Sniadecki NJ, Ruohola-Baker H, Murry CE: Tri-iodo-L-thyronine promotes the maturation of human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 72: 296-304, 2014
 - 45) Feaster TK, Cadar AG, Wang L, Williams CH, Chun YW, Hempel JE, Bloodworth N, Merryman WD, Lim CC, Wu JC, Knollmann BC, Hong CC: Matrigel Mattress: A Method for the Generation of Single Contracting Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res* 117: 995-1000, 2015
 - 46) van den Berg CW, Okawa S, Chuva de Sousa Lopes SM, van Iperen L, Passier R, Braam SR, Tertoolen LG, del Sol A, Davis RP, Mummery CL: Transcriptome of human foetal heart compared with cardiomyocytes from pluripotent stem cells. *Development* 142: 3231-3238, 2015
 - 47) Cho GS, Lee DI, Tampakakis E, Murphy S, Andersen P, Uosaki H, Chelko S, Chakir K, Hong I, Seo K, Chen HV,

- Chen X, Basso C, Houser SR, Tomaselli GF, O'Rourke B, Judge DP, Kass DA, Kwon C: Neonatal Transplantation Confers Maturation of PSC-Derived Cardiomyocytes Conducive to Modeling Cardiomyopathy. *Cell Rep* 18 : 571-582, 2017
- 48) Menasche P, Vanneau V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, Parouchev A, Benhamouda N, Tachdjian G, Tosca L, Trouvin JH, Fabreguettes JR, Bellamy V, Guillemain R, Suberbielle Boissel C, Tartour E, Desnos M, Larghero J: Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J* 36 : 2011-2017, 2015
- 49) Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hirami Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata KI, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, Takahashi M: Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 376 : 1038-1046, 2017
- 50) Devalla HD, Schwach V, Ford JW, Milnes JT, El-Haou S, Jackson C, Gkatzis K, Elliott DA, Chuva de Sousa Lopes SM, Mummery CL, Verkerk AO, Passier R: Atrial-like cardiomyocytes from human pluripotent stem cells are a robust preclinical model for assessing atrial-selective pharmacology. *EMBO Mol Med* 7 : 394-410, 2015
- 51) Tsai SY, Maass K, Lu J, Fishman GI, Chen S, Evans T: Efficient Generation of Cardiac Purkinje Cells from ESCs by Activating cAMP Signaling. *Stem Cell Reports* 4 : 1089-1102, 2015
- 52) Protze SI, Liu J, Nussinovitch U, Ohana L, Backx PH, Gepstein L, Keller GM: Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nat Biotechnol* 35 : 56-68, 2017
- 53) Witty AD, Mihic A, Tam RY, Fisher SA, Mikryukov A, Shoichet MS, Li RK, Kattman SJ, Keller G: Generation of the epicardial lineage from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 32 : 1026-1035, 2014
- 54) Shimizu T, Sekine H, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Okano T: Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets. *Tissue Eng* 12 : 499-507, 2006
- 55) Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura T, Kuratani T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y: Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation* 126 : S29-37, 2012
- 56) Masumoto H, Matsuo T, Yamamizu K, Uosaki H, Narazaki G, Katayama S, Marui A, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK: Pluripotent stem cell-engineered cell sheets reassembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte-mediated neovascularization. *Stem Cells* 30 : 1196-1205, 2012
- 57) Kawamura M, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Miki K, Ito E, Sougawa N, Kawamura T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Toda K, Sawa Y: Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart. *Circulation* 128 : S87-94, 2013
- 58) Masumoto H, Ikuno T, Takeda M, Fukushima H, Marui A, Katayama S, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK: Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. *Sci Rep* 4 : 6716, 2014
- 59) Jung JH, Fu X, Yang PC: Exosomes Generated From iPSC-Derivatives: New Direction for Stem Cell Therapy in Human Heart Diseases. *Circ Res* 120 : 407-417, 2017
- 60) Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE: Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 33 : 907-921, 2001
- 61) Funakoshi S, Miki K, Takaki T, Okubo C, Hatani T, Chonabayashi K, Nishikawa M, Takei I, Oishi A, Narita M, Hoshijima M, Kimura T, Yamanaka S, Yoshida Y: Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. *Sci Rep* 6 : 19111, 2016

- 62) Fernandes S, Chong JJ, Paige SL, Iwata M, Torok-Storb B, Keller G, Reinecke H, Murry CE: Comparison of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes, Cardiovascular Progenitors, and Bone Marrow Mononuclear Cells for Cardiac Repair. *Stem Cell Reports* 5: 753-762, 2015
- 63) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE: Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 25: 1015-1024, 2007
- 64) Ogle BM, Bursac N, Domian I, Huang NF, Menasche P, Murry CE, Pruitt B, Radisic M, Wu JC, Wu SM, Zhang J, Zimmermann WH, Vunjak-Novakovic G: Distilling complexity to advance cardiac tissue engineering. *Sci Transl Med* 8: 342ps13, 2016
- 65) Ye L, Chang YH, Xiong Q, Zhang P, Zhang L, Somasundaram P, Lepley M, Swingen C, Su L, Wendel JS, Guo J, Jang A, Rosenbush D, Greder L, Dutton JR, Zhang J, Kamp TJ, Kaufman DS, Ge Y: Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells. *Cell Stem Cell* 15: 750-761, 2014
- 66) Fernandes S, Naumova AV, Zhu WZ, Laflamme MA, Gold J, Murry CE: Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes engraft but do not alter cardiac remodeling after chronic infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 49: 941-949, 2010
- 67) Shiba Y, Filice D, Fernandes S, Minami E, Dupras SK, Biber BV, Trinh P, Hirota Y, Gold JD, Viswanathan M, Laflamme MA: Electrical Integration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Guinea Pig Chronic Infarct Model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 19: 368-381, 2014

(H 29. 4. 10 受稿)