

令和元年6月7日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05424

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来間葉系幹細胞を用いた心臓血管外科領域の炎症反応抑制療法の開発

研究課題名(英文) Development of the regulation of inflammation in the field of cardiovascular surgery using human iPS cell-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

山崎 和裕 (Yamazaki, Kazuhiro)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50464227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：冷凍融解法によるヒトiPS細胞由来間葉系幹細胞(MSC)のストック作製プロトコルを確立した。また、ラットの人工心肺モデルに対するMSC投与において全身炎症の抑制・肺組織障害の抑制および肺組織への炎症細胞浸潤抑制を証明した。さらに心臓血管外科手術に関連する全身性炎症反応を抑制するための戦略として、遺伝子組み換えトロンボモジュリンを用いたラット人工心肺モデルへの全身炎症の抑制と肺障害抑制を示した。これらの結果から、ヒトiPS細胞由来MSC投与を含む集学的治療方法による心臓血管外科領域の炎症反応抑制療法確立における基礎研究基盤が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓血管外科手術に関連する全身性炎症反応は致命的な合併症を引き起こしうる。間葉系幹細胞および化合物の併用による免疫寛容を利用した炎症反応制御は、これまででない治療効果を期待しうるものが本研究により示された。これらの成果は、今後増加が予想される心臓病患者に対する、より合併症の少ない外科治療を提供することに対する学術的基盤を提供しうるものであり、医療経済を含む社会的な意義が高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established a protocol to efficiently stock human iPS cell-derived mesenchymal stem cells (MSC) by a freeze-thaw method. Next, we verified an attenuation of systemic inflammation and lung injury mediated by inflammatory cell infiltration by administrating MSCs in a rat cardiopulmonary bypass (CPB) model. Then we showed an increased effect of recombinant thrombomodulin for the attenuation of systemic inflammation and lung injury in a rat CPB model. Here we demonstrated a scientific basis for the establishment of a multidisciplinary therapeutic remedy of inflammation control in the field of cardiovascular surgery based on human iPS cell-derived MSCs.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：心筋疾患外科学 ヒトiPS細胞 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢化および食生活の欧米化に伴い心血管病の罹患数は年々増加しており、死因の2番目を占めるようになった(厚生労働省 H26 年度統計より)。心臓外科手術は術式の確立やデバイスの改善とともに安全かつ一般化される一方で、高齢・糖尿病・慢性腎障害(CKD)・低心機能に伴う全身臓器の予備能低下を合併している症例にも手術が可能となり、周術期の合併症の発生は依然として大きな問題である。特に、人工心肺を用いた手術を行うことにより術後各種臓器障害から多臓器不全に陥る症例や、胸骨への血流量低下や MRSA 感染から重篤な感染症である前縦隔骨髄炎・人工血管感染に陥る症例が少なくない。また急性大動脈解離においては術前よりすでに臓器障害を伴っている場合や、急性肺障害に陥っている率がさらに高く治療に難渋する。

これらの病態の根底には、各種臓器への虚血再灌流障害と、全身性の強い炎症反応が共通する。虚血再灌流障害や全身性炎症反応へと至る過程において、炎症性メディエーターが複雑に関与しており、全身性炎症反応を減弱するために、抗サイトカイン療法など様々な方法が試されてきたが、臨床での効果が証明されているものは皆無である。

このような既存治療抵抗性の全身性炎症反応に対し、間葉系幹細胞 Mesenchymal Stem Cell(MSC)を用いた細胞治療が有用である可能性が高い。近年 MSC の強力な炎症・免疫調節作用が注目され(Chamberlain G et al. Stem Cells.2007)、GVHD(Jones BJ et al.Exp Hematol.2008)やクローン病(Tyndall A, et al. Curr Opin Hematol.2009)など自己免疫疾患に対する臨床試験が行われた。海外では GVHD について承認されており、本邦でも近く承認の見込みである。

当初骨髄から分離された MSC であるが、近年の研究から、脂肪や胎児付属物を含む他の臓器にも存在し、更には ES・iPS 細胞由来 MSC も樹立されている(Takashima et al. Cell 2007, Irina Eberle et al. Adv Biochem Eng Biotechnol 2012)。我々は、胎児付属物由来 MSC を用いた同疾患群に対する研究を先行させて行っており、これまでにラット人工心肺モデルにおいて MSC の投与が、免疫・炎症調整作用により病態軽減し、最終的に急性肺障害を抑制したことを証明した(Taki et al. AHA abstract #15292, 2012)。

現在得られる MSC は自己増殖可能であるものの継代回数に限界があるため、臨床応用の際には定期的に原材料となる MSC を採取する必要がある。これに対し、無限の自己増殖能を有するヒト iPS 細胞より MSC が誘導できれば、この問題をクリアすることができると考えた。すでに、連携研究者の山下[京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)]は、ヒト iPS 細胞から MSC を誘導することに成功している。ヒト iPS 細胞由来 MSC は MSC の表面マーカーを発現しているばかりでなく、骨・軟骨・脂肪への分化も確認でき、既存の細胞を超える有望な細胞として注目している。一方で、ヒト iPS 細胞由来 MSC の報告は散見されるものの、心臓血管外科領域における免疫・炎症調整作用を評価したものはない。

2. 研究の目的

MSC が持つ免疫調節作用を利用した、心血管領域における虚血再灌流障害や全身性炎症反応に対する iPS 細胞を用いた細胞治療開発を目指し、ヒト iPS 細胞由来 MSC 分化誘導法の確立、動物モデル作成による効果検証、さらに MSC の免疫・炎症調整作用のメカニズムの解析を研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞からの MSC 分離および保存方法の確立

- ① 既報によりヒト iPS 細胞から MSC の分化誘導を行い、回収する。
- ② セルバンカー[®]などの細胞保存液を用いて、保存方法(直接凍結・プログラムフリーズ・ガラス化法など)・時間などの条件を割り振る。
- ③ それらの条件における凍結細胞を再度解凍し、再播種する。
- ④ フローサイトメトリーなどにより生細胞率を測定し、最適条件を導き出す。

(2) ラット人工心肺生存モデルにおける MSC あるいは化合物(遺伝子組み換えトロンボモジュリンなど)の全身投与による炎症反応抑制効果の検討

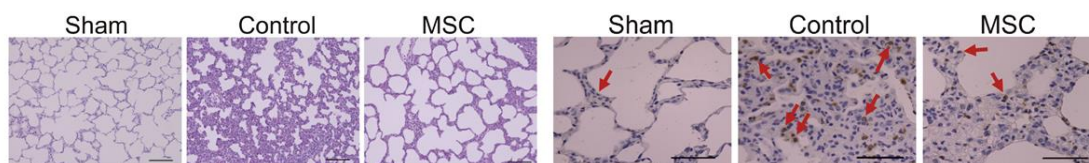
- ① 治療群と非治療群の2群に分類する。
- ② ラットを挿管し人工呼吸器に装着する。1.5%イソフルランで麻酔を維持する。
- ③ 左大腿動脈に24G留置針を留置する。(A-line, 血液ガス検査用)
- ④ 右大腿動静脈より cannulation を行い、体外循環を確立する。
- ⑤ 体外循環開始直前に回路内に MSC(あるいは化合物)、あるいは生理食塩水を投与する。離脱後閉鎖する。
- ⑥ 麻酔覚醒させ人工呼吸器より離脱させる。
- ⑦ 体外循環離脱24時間後まで、経時的に血清 IL-6, TNF α 、血液ガス、平均体血圧、心拍数などを測定する。
- ⑧ 体外循環後24時間後に犠牲死とし、肺の組織障害の程度、浮腫の程度などを測定す

る。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞由来 MSC の細胞治療開発に向けて、MSC のストック作成技術を開発した。MSC の細胞表面マーカーの特徴を有する細胞について、幹細胞用細胞保存液を用い、プログラムフリーズ法で凍結保存した。その後、融解してその viability の評価を行ったところ、81%の生存率を確認することができた。この技術は、分化誘導する MSC を細胞移植用のストックとして活用するために必要となるものである。

続いて、MSC のラットの人工心肺モデルにおける虚血再灌流障害および全身性炎症反応に対する抗炎症効果を検討した。ヒト iPS 細胞由来 MSC 全身投与による炎症反応抑制効果を確立する前段階として、臨床的にも使用されている卵膜由来 MSC を用いての炎症反応抑制効果をラットの人工心肺モデルにおいて検討した。その結果、ラットの人工心肺モデルにおいて、MSC 投与群は、control 群に比べて、明らかに急性肺障害が抑えられ、炎症性サイトカイン産生の低下が確認された。これにより MSC による人工心肺使用下の全身炎症に対する抗炎症効果が確認された。この結果を論文として発表した (図 1) (Taki et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2016)。



(図 1 : ラット人工心肺モデルへの MSC 投与による肺障害および肺炎症抑制効果)

左 : H-E 染色、右 : ペルオキシダーゼ染色。

Sham : 人工心肺非使用、Control : 人工心肺使用・MSC 非投与、MSC : 人工心肺使用・MSC 投与

一方で、MSC 投与のみではその全身炎症抑制効果については不十分であり、さらに治療効果を高める研究開発の必要性が生じた。それを受けて、MSC 投与による免疫寛容に加えて、全身炎症反応において関与する核内 DNA 結合蛋白である High Mobility Group Box 1 (HMGB1) の低減を目的とした、遺伝子組み換えトロンボモジュリンのラット人工心肺モデルにおける投与実験を行い、HMGB1 および TNF- α 、IL-6 など全身炎症性サイトカインの血中濃度の低減および肺障害抑制効果を示した。本研究成果を論文として発表した (Hirao et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2017)。

さらにトロンボモジュリンの有する凝固系への副作用を抑えるため、抗炎症性ドメインのみの投与による肺障害抑制効果を検討した。その結果、フルドメインのトロンボモジュリンの投与において、人工心肺中の活性化凝固時間が過度に延長するのに対し、抗炎症ドメインのみの投与では、その延長が抑えられることが示された。また抗炎症に関しては、フルドメインと抗炎症ドメインの両者において、HMGB1 の産生抑制傾向と肺組織障害抑制が示された。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来 MSC 投与を含む集学的治療方法による心臓血管外科領域の炎症反応抑制療法確立における基礎研究基盤が示された。

さらに重症な心臓血管外科手術に伴う全身炎症に対してヒト iPS 細胞由来 MSC の抗炎症効果を検討するため、弓部大動脈瘤手術などを念頭に置いた、ラット低体温循環停止モデルを確立した。本モデルは臨床における問題点の解決に近い形の基礎実験による検討および評価を可能とするものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Li Z, Masumoto H, Jo JI, Yamazaki K, Ikeda T, Tabata Y, Minatoya K. Sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel improved left ventricular function through the alteration of collagen subtype in a rat chronic myocardial infarction model. Gen Thorac Cardiovasc Surg. 査読有, 66 巻, 2018, 641-647
2. Kumagai M, Minakata K, Masumoto H, Yamamoto M, Yonezawa A, Ikeda T, Uehara K, Yamazaki K, Ikeda T, Matsubara K, Yokode M, Shimizu A, Tabata Y, Sakata R, Minatoya K. A therapeutic angiogenesis of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel sheets in a canine chronic myocardial infarction model. Heart Vessels. 査読有, 33 巻, 2018, 1251-1257
3. Tsumaru S, Masumoto H, Minakata K, Izuhara M, Yamazaki K, Ikeda T, Ono K, Sakata R, Minatoya K. Therapeutic angiogenesis by local sustained release of microRNA-126 using poly lactic-coglycolic acid nanoparticles in murine hindlimb ischemia. J Vasc Surg. 査読有, 68 巻, 2018, 1209-1215
4. Hirao S, Minakata K, Masumoto H, Yamazaki K, Ikeda T, Minatoya K, Sakata R.

Recombinant human soluble thrombomodulin prevents acute lung injury in a rat cardiopulmonary bypass model. J Thorac Cardiovasc Surg. 査読有, 154 巻, 2017, 1973-1983

5. Hirao S, Masumoto H, Itonaga T, Minatoya K. A Recovery Cardiopulmonary Bypass Model Without Transfusion or Inotropic Agents in Rats. J Vis Exp. 査読有, 2018, 133
6. Taki T, Masumoto H, Funamoto M, Minakata K, Yamazaki K, Ikeda T, Sakata R. Fetal mesenchymal stem cells ameliorate acute lung injury in a rat cardiopulmonary bypass model. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 査読有, 153 巻, 2017, 726-734

[学会発表] (計 15 件)

1. 湊谷 謙司, 山崎 和裕, 金光 ひでお, 坂本 和久, 井出 雄二郎, 上田 遼馬, 竹原 真人, 矢次 遥, 植山 浩二, 池田 義. 標準化と成績の向上を目指した自己弁温存大動脈基部置換術式の工夫. 第 118 回日本外科学会定期学術集会. 2018 年. 東京都
2. 升本 英利, 中根 武一郎, 平尾 慎吾, 瀧本 真也, 李 子澎, 金光 ひでお, 植山 浩二, 山崎 和裕, 池田 義, 田畑 泰彦, 山下 潤, 湊谷 謙司. 心臓再生医療用のヒト iPS 細胞由来心血管系細胞多層体の開発. 第 118 回日本外科学会定期学術集会. 2018 年. 東京都
3. 山崎 和裕, 上田 遼馬, 竹原 真人, 坂本 和久, 井出 雄二郎, 金光 ひでお, 南方 謙二, 植山 浩二, 池田 義, 湊谷 謙司. 大動脈弁輪拡張症に対する手術手技の工夫 2 種類のバルサルバグラフトを用いた Reimplantation 法による自己弁温存基部再建術. 第 46 回日本血管外科学会学術総会. 2018 年. 山形市
4. 山崎 和裕, 湊谷 謙司, 竹原 真人, 上田 遼馬, 工藤 雅文, 坂本 和久, 井出 雄二郎, 植山 浩二, 金光 ひでお, 池田 義. BPA 抵抗性の CTEPH に対し PEA を行い良好な結果を得た 1 症例. 第 3 回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会. 2018 年. 豊中市
5. 山崎 和裕, 金光 ひでお, 坂本 和久, 井出 雄二郎, 工藤 雅文, 竹原 真人, 上田 遼馬, 植山 浩二, 池田 義, 湊谷 謙司. 当科における RCA#3 に対する冠動脈バイパス術の成績. 第 23 回日本冠動脈外科学会学術大会. 2018 年. 和歌山市
6. 山崎 和裕, 金光 ひでお, 坂本 和久, 工藤 雅文, 境 次郎, 中村 真, 北方 悠太, 山本 涼, 井出 雄二郎, 池田 義, 湊谷 謙司. 右冠動脈 #3 に対するバイパス手術の成績. 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2018 年. 東京都
7. 西尾 博臣, 升本 英利, 川東 正英, 坂本 和久, 金光 ひでお, 山崎 和裕, 池田 義, 湊谷 謙司. MicroRNA-145 封入ポリ乳酸グリコール酸共重合体ナノ粒子による静脈グラフト内膜肥厚抑制に関するウサギ頸動脈モデルを用いた検討. 第 71 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2018 年. 東京都
8. Nishio H, Masumoto H, Sakamoto K, Kanemitsu H, Ueyama K, Yamazaki K, Ikeda T, Minatoya K. MicroRNA-145-loaded poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles attenuate venous intimal hyperplasia in a rabbit vein graft disease model. 第 5 回国際組織工学・再生医療学会世界会議 (国際学会). 2018 年. 京都市
9. 坂本 和久, 山崎 和裕, 上田 遼馬, 竹原 真人, 矢次 遥, 中津 太郎, 井出 雄二郎, 升本 英利, 金光 ひでお, 植山 浩二, 池田 義, 湊谷 謙司. 慢性 B 型解離に対する超低体温循環停止、SIRC (Straight incision with rib-cross) アプローチによる胸部下行、胸腹部大動脈置換術. 第 70 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2017 年. 札幌市
10. 山下 剛生, 湊谷 謙司, 山崎 和裕, 金光 ひでお, 中津 太郎, 坂本 和久, 井出 雄二郎, 植山 浩二, 池田 義. 胸腹部大動脈瘤人工血管置換術における Critical segmental artery の確実な術中同定法. 第 70 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2017 年. 札幌市
11. 山崎 和裕, 南方 謙二, 中津 太郎, 坂本 和久, 井出 雄二郎, 升本 英利, 金光 ひでお, 植山 浩二, 池田 義, 湊谷 謙司, 坂田 隆造. 高度の心不全症状を有する機能性僧帽弁閉鎖不全症に対する手術成績の検討. 第 70 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2017 年. 札幌市
12. 平尾 慎吾, 南方 謙二, 升本 英利, 船本 成輝, 瀬戸崎 修司, 坂本 和久, 中津 太郎, 上原 京勲, 山崎 和裕, 池田 義, 坂田 隆造. ラット人工心肺モデルにおける遺伝子組換えトロンボモデュリン投与による急性肺障害抑制効果の検討. 第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会. 2016 年. 岡山市
13. Hirao S, Minakata K, Funamoto M, Setozaki S, Yamazaki K, Masumoto H, Ikeda T, Sakata R. Recombinant human soluble thrombomodulin prevents acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass in a rat model. 24th Annual meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery (国際学会). 2016. Taipei, Taiwan
14. Hirao S, Minakata K, Masumoto H, Setozaki S, Yamazaki K, Ikeda T, Sakata R. Recombinant human soluble thrombomodulin prevents acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass in rats. European Society of Cardiology Congress (国際学会). 2016. Rome, Italy
15. Hirao S, Minakata K, Masumoto H, Setozaki S, Yamazaki K, Ikeda T, Sakata R. Recombinant human soluble thrombomodulin prevents acute lung injury in a rat

cardiopulmonary bypass model. AHA Scientific session 2016 (国際学会) . 2016. New Orleans, USA

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

研究分担者氏名：南方 謙二

ローマ字氏名：KENJI MINAKATA

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号 (8桁)：60539675

研究分担者氏名：升本 英利

ローマ字氏名：HIDETOSHI MASUMOTO

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：上級研究員

研究者番号 (8桁)：70645754

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。