

令和 2 年 9 月 18 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09458

研究課題名(和文) iPS細胞の冠動脈内注入による低侵襲心筋再生療法

研究課題名(英文) Minimally invasive cardiac regeneration therapy with intracoronary infusion of iPS cells

研究代表者

時田 祐吉 (Tokita, Yukichi)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：20386189

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心不全患者数は増加の一途をたどっており、その主な原因である虚血性心疾患に対する根治的治療である心筋再生療法は非常に有望な治療である。本研究は心筋再生療法の中で最も低侵襲な方法の一つであり、海外ですでにその有効性が示されている冠動脈内注入法を用い、我が国の再生医療研究で主に用いられているiPS細胞による心機能改善効果を検証することを目的とした。非常に難しい実験モデルであり、使用できる細胞種の制限などもあり、残念ながら研究期間内に結果を明らかにすることができなかった。引き続き研究を継続する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在我が国ではiPS細胞を用いた心筋再生療法として心筋シートなどの方法での応用が中心となって検討されているが、より低侵襲な細胞導入法である冠動脈内注入により心筋再生効果が得られれば、今後臨床応用する際に高齢心不全患者や重症心不全患者にも幅広く適応することができ、心不全治療の有望な治療法として期待される。残念ながら本研究期間中に結論を得ることができなかったが、引き続き研究を継続し研究成果を報告する予定である。

研究成果の概要(英文)：The number of heart failure patients is getting larger and the main cause of heart failure is ischemic heart disease (IHD). Regeneration therapy is a very promising therapeutic option, because it is an essential treatment of IHD. Cell therapy with intracoronary infusion has already showed regenerative ability in foreign studies, and iPS cells are focused on in the field of regenerative therapy in Japan. The purpose of this study it to investigate the efficacy of intracoronary infusion of iPS cells. This is a very important study, but the experimental model is quite difficult and there were several problems related to the type of cells. It was hard to complete the experimental protocol during planned study period. The study is still ongoing.

研究分野：循環器

キーワード：iPS細胞 冠動脈 心筋再生療法 低侵襲

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

研究種目：基盤研究(C)

研究課題番号：16K09458

研究課題名：iPS 細胞の冠動脈内注入による低侵襲心筋再生療法

1. 研究開始当初の背景

心不全患者数は増加の一途をたどっており、その原因疾患として最も多いのは虚血性心疾患でありその中でも陳旧性心筋梗塞などに伴う虚血性心筋症が大部分を占めている。薬物療法、カテーテルインターベンションや冠動脈バイパス術による血行再建療法、心臓再同期療法など心不全治療の進歩は著しいが、心不全治療で最も重要な点は原因疾患の治療であるにも関わらず、この虚血性心筋症に伴う心不全の病態の中心であるところの虚血により壊死した心筋の線維化と、それに伴う生存心筋の減少に関しては根本的な治療法がこれまで存在しなかった。細胞治療による心筋再生療法はこの線維化した心筋を生存心筋に再び置き換えるというこれまでの治療法では困難であった虚血性心筋症の根本的な治療となりうる治療法であり非常に期待がもたれていた。心筋再生療法はすでに多くの臨床試験でその有用性が示されていたが、用いられている細胞種は骨髄幹細胞や心筋幹細胞など様々でどの細胞種がもっとも優れているのかは明らかでなかった。本邦においては再生医療として iPS 細胞を中心とした基礎研究、臨床研究が積極的に行われていた。一方、心筋幹細胞は米国においてすでに臨床試験が進行しており、その心機能改善効果が報告されていた。また細胞の導入方法に関しても、冠動脈内注入法、心筋内注入法、心筋細胞シートなどさまざまな方法が行われていたが、どの方法が最も有効なのかも明らかとなっていなかった。これら導入法のうち、冠動脈内注入法は通常の心臓カテーテル検査手技とほぼ同様の手技で行うことができ、最も低侵襲な導入法の一つである。研究代表者が所属していた米国ルイビル大学循環器科ではロベルト・ボリ教授のもと心筋幹細胞を用いた経カテーテル的冠動脈内注入法による心筋再生療法の臨床試験が行われており、研究代表者らもこの心筋幹細胞を用いた冠動脈内注入法による心筋再生療法の有用性に関する基礎研究の成果を複数発表していた。iPS 細胞に関しては心筋細胞まで分化誘導した上で心筋シートを作成し移植する方法が中心に研究されていたが、iPS 細胞を直接心筋内に注入する方法の有用性についても報告があり、冠動脈内注入法による導入でも効果が期待できるのではないかと考えられた。以上の背景から、研究代表者は iPS 細胞を用い、最も低侵襲な細胞導入法である冠動脈内注入法による導入により心機能改善効果が認められれば、非常に有用な治療法となると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

iPS 細胞が冠動脈内注入法という低侵襲な導入方法により心筋再生効果を示すことができれば iPS 細胞の臨床応用の幅を大きく広げることが予想される。本研究ではこの iPS 細胞を用いた冠動脈内注入法による心筋再生療法が、すでにその有用性が示されている心筋幹細胞を用いたそれと比較してより高い心機能改善効果をもたらすかどうかを検証することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では iPS 細胞の冠動脈内注入による心機能改善効果を検証するために、下記の 3 段階での実験を予定した。

実験 1. iPS 細胞の至適導入細胞数の決定

細胞療法を行うにあたってはまず至適導入細胞数を決定することが必要である。研究代表者らは心筋幹細胞の冠動脈内注入による心筋再生療法における至適導入細胞数に関する研究を行いその結果を報告している。その結果心筋幹細胞においては心筋再生効果が得られる下限の導入数が存在し、それ以上の細胞数において改善効果は同等であった。マウス iPS 細胞の冠動脈内注入においても同様に至適導入細胞数が存在することが予想されるため、まずこの点を明らかにするための実験を行う。

具体的には、図 1 に示す実験プロトコールに従い、研究者らが以前から用いている 90 分虚血再灌流心筋梗塞モデルを作成(90 分間冠動脈を結紮しその後解除)、再灌流 4 時間後に 5 つの異なる導入数(30 万, 75 万, 100 万, 150 万, 300 万個)のマウス iPS 細胞もしくは PBS を図 2 の方法を用いて冠動脈内に注入する。心臓超音波検査による心機能評価を、梗塞作成前、梗塞後 48 時間、細胞導入 35 日後の時点で行う。また細胞導入 35 日の時点で動物を安楽死せしめ、心臓を摘出し梗塞領域の大きさをマッソントリクローム染色を用い病理学的に検討する。各群の心機能、梗塞領域サイズを比較し至適導入細胞数を決定する。

図1. 実験1 プロトコール

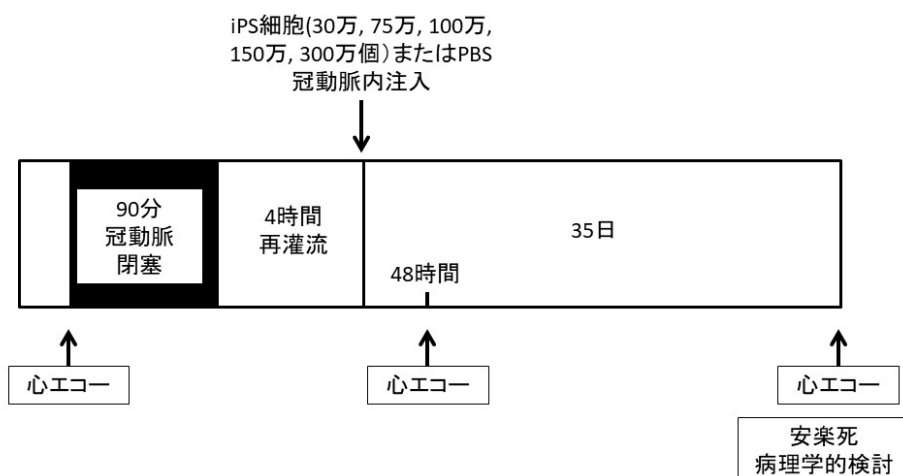
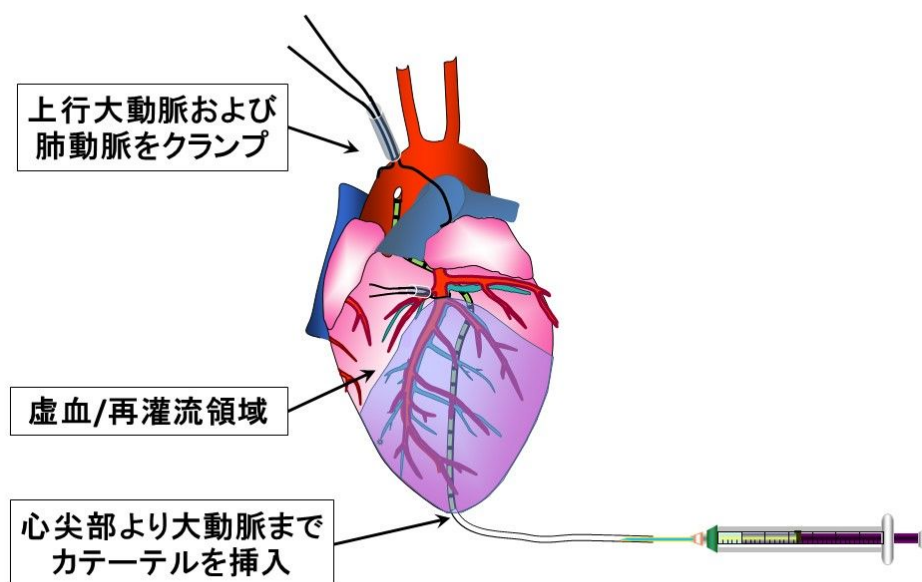


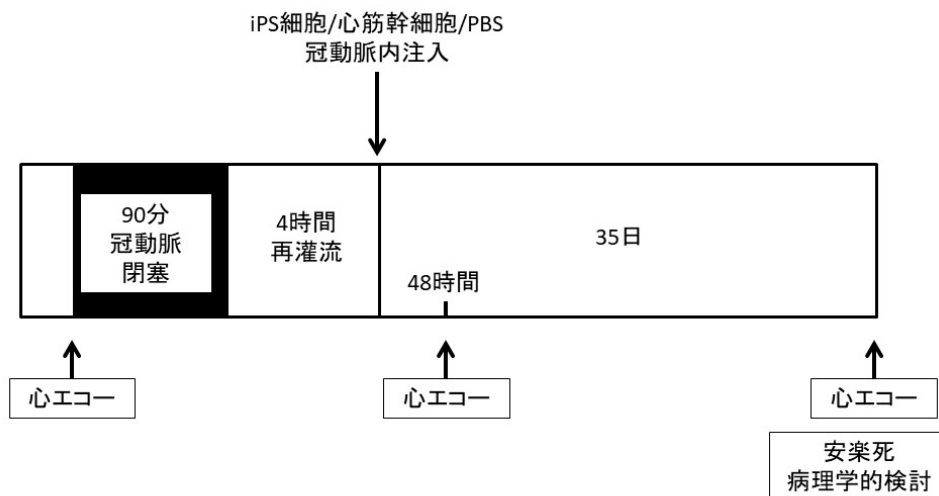
図2. 冠動脈内注入法



実験2. iPS細胞と心筋幹細胞の冠動脈内注入法による心筋再生療法の心機能改善効果の差異に関する検討

マウス iPS 細胞およびマウス心筋幹細胞を用い、実験1.と同様にマウス心筋梗塞虚血再灌流モデルを用いた冠動脈内注入法による細胞導入による心機能改善効果を心臓超音波検査にて評価、検討する。実験プロトコールを図3.に示す。

図 3 . 実験 2 プロトコール



実験 3. iPS 細胞と心筋幹細胞の冠動脈内注入法による心筋再生療法の効果、機序に関する病理学的検討

心筋梗塞巣のサイズや心筋内に生着した細胞数などを病理学的に検討し、iPS 細胞と心筋幹細胞の心筋再生効果の比較や心筋再生に寄与するメカニズムの違いを検証する。

4 . 研究成果

細胞治療による心機能改善効果は多くの動物実験や臨床試験で示されていることは研究の背景で述べた通りであるが、その機序についてはいまだに十分明らかとなっていない。すなわち注入した細胞が生着し、増殖・分化することにより新しい心筋組織に置き換わるのか、もしくは注入した細胞が直接増殖・分化するのではなく、注入した細胞から自己の心筋細胞の増殖・分化を誘導するサイトカインなどが分泌されることにより心筋再生をもたらすいわゆるパラクラインエフェクトによるものかという点である。研究代表者が過去に報告した心筋幹細胞を用いた冠動脈内注入による心機能改善効果に関連した研究では、GFP や mCherry といった蛍光タンパクで標識された心筋幹細胞を用いることにより、この方法による心機能改善効果は注入された細胞が直接増殖・分化するのではなく、パラクラインエフェクトが主な機序であることが明らかとなった。本研究においても、その心機能改善の機序を明らかとすることは非常に重要と考えられた。本研究では、共同研究者である本間耕平慶應義塾大学特任助教が以前研究を行っていた理化学研究所から提供される iPS 細胞を使用することとしていたが、理化学研究所から提供されるマウス iPS 細胞には蛍光標識された細胞種が存在しないため、iPS と同じ多能性幹細胞であり、GFP で標識された細胞種が利用可能なマウス ES 細胞を用いた実験をまず行う方針とした。

研究代表者が動物実験において心筋幹細胞の冠動脈内注入による心機能改善効果に関する研究報告を行っていることは述べたとおりであるが、この際にはラット心筋梗塞モデルを用いたラット心筋幹細胞の冠動脈内注入を行う研究プロトコールであった。そのため当初はラットを用いた実験を検討していたが、現在国内で利用可能なラット iPS 細胞やラット ES 細胞は存在せず、拒絶反応などの観点からマウス iPS 細胞やマウス ES 細胞を用いる場合、注入する動物種についても同じマウス心筋梗塞モデルを使用する必要があると考えられ、今回マウスを用いた実験プロトコールを提案した。しかしながら、マウスはラットと比較して非常に小さく、虚血再灌流による心筋梗塞モデルや冠動脈内注入法を確立するために長期の時間を要した。それでもマウス虚血再灌流モデルを用いた冠動脈内注入法の場合マウスの死亡率が非常に高く、実験プロトコールを完遂することが困難と考えられた。そのためやむを得ず当初の研究プロトコールを変更し、免疫不全ラットを用いて虚血再灌流心筋梗塞モデルを作成し、マウス iPS/ES 細胞の冠動脈内注入を行い心機能改善効果を検証することとした。新たな実験系の準備に時間を要し、かつ新型コロナウイルス感染症の拡大に伴い実験の進捗に大きな後れを生じてしまったため、現在も引き続き研究を継続中である。今後結果が得られ次第報告を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 時田 祐吉	4. 巻 13
2. 論文標題 iPS細胞の冠動脈内注入による低侵襲心筋再生療法	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本医科大学医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1272/manms.13.239	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 時田 祐吉
2. 発表標題 細胞を用いた心筋再生療法の現状
3. 学会等名 第6回日本心血管脳卒中学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	本間 耕平 (Homma Kohei) (80462729)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教 (32612)	