

令和 2 年 4 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10720

研究課題名(和文)心筋炎における新たな細胞治療

研究課題名(英文) Novel cell therapy for myocarditis

研究代表者

高橋 悟朗 (Takahashi, Goro)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：50526449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではラット心筋炎モデルに対し、ヒト内在性の多能性幹細胞である Multilineage-differentiating stress enduring (Muse) 細胞を静脈投与し、その治療効果および奏功機序を検討した。Muse細胞、Mesenchymal stem cell (MSC)、生理食塩水をそれぞれ心筋炎急性期に経尾静脈投与した。心機能はMuse群で有意な改善を認めた。投与されたMuse細胞の自発的な心筋細胞・血管構成細胞への分化を認めた。また、抗アポトーシス効果、血管新生効果、抗線維化効果も認め、これらの複合的な作用により心機能改善効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋炎は未だ根本的治療法が確立されていない疾患である。本研究では心機能が最も低下するタイミングでの Muse細胞静脈投与により心機能改善効果が認められた。今後想定される臨床応用例として、重症心不全を呈した症例が挙げられる。特に、劇症型心筋炎のように心筋組織が廃絶した症例は、補助循環に依存して心臓移植を待つよりほかにない状態となる。重症心筋炎において急性期に Muse細胞治療を行うことでこのような症例の発生を未然に防ぐことが可能となれば、患者の生命予後の劇的な改善が期待でき、臨床的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：Myocarditis is an inflammatory disease of cardiac tissue caused by different pathogens. Human bone marrow-derived Muse cells, human bone marrow-derived MSCs, and vehicle were intravenously injected 21 days later when myocarditis was most severe. Functional and histologic cardiac assessments at 2 weeks showed the preferential homing of Muse cells to the heart and spontaneous differentiation into cardiomyocytes and vascular cells. The left ventricular ejection fraction in the Muse group was significantly higher than that in vehicle and MSC groups. Muse cells also significantly suppressed myocardium apoptosis and fibrosis. Three-dimensional analysis of tissue-cleared samples demonstrated better vascular system reorganization in cardiac tissue of the Muse group.

Intravenously-injected Muse cells preferentially home to damaged cardiac tissue, replenish cardiomyocytes and vascular cells, and exert an improved by-stander effect compared to MSCs.

研究分野：心臓血管外科学分野

キーワード：心筋炎 Muse細胞 細胞治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋炎とは心筋を主座とした炎症性疾患である。治療法として免疫グロブリン投与や血漿交換などが行われているが、効果は限定的である。現状では自然回復を待つ以外の積極的治療法は確立されておらず、自然回復までの血行動態維持が必要である。特に劇症型では時に低心拍出状態となり、補助循環装置（大動脈バルーンポンピング、経皮的心肺補助装置、補助人工心臓）が用いられるが、そのみでは血行動態が維持されないこともあり、予後不良である。補助循環装置の使用は一定期間、自己心の unloading を図り、その間に心筋内での炎症の消退を待つことを目的としており、炎症の程度や遷延期間をコントロールするものではない。临床上、炎症の鎮静化が得られず極めて劇症化したのちに心筋の機能が高度に廃絶してしまう例も見られる。そのような症例では慢性期の心不全管理や致死性不整脈イベントが問題となり、最重症例では心臓移植や補助人工心臓植込みが唯一の治療手段となる。

そこで我々は、1) 病因である炎症反応を抑制する、2) 失われた心機能を回復すべく心筋細胞を補填するような心筋細胞の再生を促進する、というアプローチがこの病態の本質的な改善策であり、有効な治療効果をもたらすとの仮説に基づき、細胞治療の可能性を模索した。心筋梗塞や虚血性心筋症などでは細胞治療の有用性が証明されつつあるが、心筋炎という高度な炎症が存在する環境下では投与細胞の生着率が著しく低下することが予想され、実際これまでに心筋炎における細胞治療で投与細胞が心筋細胞に分化したとする報告はない。そこで、上記二つの心筋炎治療における作用機序を実現でき、かつ炎症というストレス環境下で心筋組織への生着・分化が期待できる細胞治療の cell source として、Muse 細胞 (Multilineage-differentiating stress enduring cells) を選択することを想起した。

Muse 細胞は、ヒト生体内に内在する新たな間葉系幹細胞として、2010年に発見された。Muse 細胞は自己複製能、三胚葉性の分化能などを有する一方で腫瘍性を持たない細胞である。さらに、組織特異的な細胞への自発分化能やストレス耐性、抗炎症作用も有する。これらのユニークな特性により、Muse 細胞による心筋炎治療が、従来の保存的治療法やその他の間葉系幹細胞移植を超えた新たな積極的治療法として期待できるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ラット心筋炎モデルに Muse 細胞を投与し、その治療効果および奏功機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ブタ由来ミオシンをラットに皮下注射し自己免疫性心筋炎モデルを作製した。ヒト骨髄由来 MSC を用いて、多能性マーカーである stage-specific embryonic antigen-3 により MSC 中の Muse 細胞を標識し、magnetic-activated cell sorting により Muse 細胞を分離した。心筋炎が最も重症化する心筋炎誘導後 3 週目に、Muse 細胞 200,000 細胞、MSC 200,000 細胞、MSC 3,000,000 細胞 (Muse 200,000 細胞と同等の SSEA-3 陽性細胞を含む) または vehicle (生理食塩水) を静脈投与した。心筋炎誘導後 3 週目に加えて 4 週目にも Muse 細胞 200,000 細胞ずつ投与する群も設けた。また、投与された Muse 細胞の生体内分布および分化能を評価する目的で Nano-lantern または green fluorescent protein を導入した Muse 細胞を fluorescent-activated cell sorting により分離し、それぞれ in vivo imaging system (IVIS) または蛍光免疫染色を行った。いずれにおいても免疫抑制剤は使用しなかった。細胞投与後 2 週目および 8 週目に magnetic resonance imaging による心機能評価を行った。組織学的評価は細胞投与 3 日目に TdT-

mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色によるアポトーシスを起こした細胞数, 2 週目に透明化した心筋炎組織内の血管内容積, および 8 週目に Masson-Trichrome 染色による線維化面積を各群間で比較検討した.

4 . 研究成果

細胞投与後 2 週目において, 投与された Muse 細胞は障害組織である心臓へ遊走・生着し, 心筋細胞および血管構成細胞への分化した. また, Muse 細胞は心臓のみに集積し, 他臓器には認めなかった. 左室駆出率は Muse 細胞単回投与群で $73.1 \pm 1.9\%$ であり, MSC 200,000 細胞群 ($66.7 \pm 2.4\%$, $p < 0.001$), MSC 3,000,000 細胞群 ($68.3 \pm 2.3\%$, $p < 0.01$), Vehicle 群 ($60.8 \pm 2.4\%$, $p < 0.001$) に比べて有意に高かった. Muse 細胞単回投与群は Muse 細胞複数回投与群 ($73.2 \pm 2.0\%$) と同等の心機能改善効果を認めた. 3 日目の組織評価では, Muse 細胞単回投与群で TUNEL 陽性細胞の有意な減少を認めた (TUNEL 陽性細胞数, Muse 細胞単回投与群 1.8 ± 0.4 細胞/ mm^2 ; Vehicle 群 7.0 ± 1.6 細胞/ mm^2 , $p < 0.05$; MSC 200,000 細胞群 3.6 ± 0.4 細胞/ mm^2 ; MSC 3,000,000 細胞群 4.4 ± 0.9 細胞/ mm^2). 2 週目の血管新生評価では, Muse 細胞単回投与群で有意な血管容積の増大を認めた (%血管内容積/心臓組織体積, Muse 細胞単回投与群 $7.4 \pm 1.2\%$; Vehicle 群 $3.2 \pm 0.5\%$, $p < 0.05$; MSC 200,000 細胞群 $5.5 \pm 0.3\%$). 8 週目の組織評価では, Muse 細胞単回投与群で線維化面積の有意な減少を認めた (%心臓線維面積/心臓断面積, Muse 単回投与群 $6.0 \pm 2.0\%$; Muse 複数回投与群 $4.8 \pm 3.4\%$; Vehicle 群 $12.1 \pm 4.5\%$, $p < 0.05$; MSC 200,000 細胞群 $8.6 \pm 2.6\%$; MSC 3,000,000 細胞群 $8.5 \pm 4.5\%$). 心筋炎モデルラットに対する Muse 細胞の静脈投与により, Muse 細胞は障害心筋組織へ遊走し, 心筋細胞および血管構成細胞へ自発的に分化した. さらに, Muse 細胞による抗アポトーシス効果, 抗線維化作用, 血管新生の複合的な効果により MSC を上回る心機能改善効果が得られた. Muse 細胞は非障害臓器への遊走・生着も極めて少ないことなど, 安全性の面からも心筋炎に対する細胞治療の細胞源として有望であることが示唆された.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 心筋炎の治療剤	発明者 出澤真理，齋木佳 克，鷹谷紘樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-162264	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	齋木 佳克 (Saiki Yoshikatsu) (50372298)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究 分担者	川本 俊輔 (Kawamoto Shunsuke) (20400244)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究 分担者	秋山 正年 (Akiyama Masatoshi) (80526450)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究 協力者	鷹谷 紘樹 (Takaya Hiroki)	東北大学・医学系研究科・大学院生 (11301)	