

令和 3 年 4 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08067

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞由来CD82陽性心筋前駆細胞を用いた先制的心不全治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of the preemptive strategy of transplantation with CD82 positive cardiac fated progenitors

研究代表者

武田 匡史 (Takeda, Masafumi)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40547501

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)：我々はiPS細胞由来CD82陽性心筋特異的前駆細胞を同定した(Cell Reports 2018)。心機能改善効果を検討するためにCD82陽性心筋特異的前駆細胞(2x10⁶, 5x10⁶個)を無胸腺ラットの心筋梗塞心に移植を行い、1か月後、3か月後でsham群に比べて改善効果を示した。組織学的には1か月後では梗塞心内でCD82陽性心筋特異的前駆細胞が心筋に分化しているのを確認したが、3か月後には残存が乏しい傾向にあり、ホストの残存する免疫能により除去された可能性が考えられた。今後、さらに効果的な治療法の確立のために、免疫抑制剤を用いて今後検討していく必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

基本的には心筋梗塞などで障害を受けた心臓は再生することがなく、失われた心臓の機能を取り戻すには根本的治療としては心臓移植しかないのが現状であるが、ドナー不足により十分に治療としての役割を果たせていない。そこで、iPS細胞から分化した心筋細胞を移植する方法が現在試みられているが、分化し増殖する力が失われている心筋細胞ではなく、自身が増殖力を有している心筋前駆細胞を用いることで、移植に大量の数必要とされる心筋細胞ではなく、より少ない量で効果が期待されるCD82陽性心筋特異的前駆細胞を移植することで心機能改善効果を動物モデルで示したことは今後の前駆細胞治療開発にとって有望である。

研究成果の概要(英文)：Recently, we successfully found that human-induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived CD82+ cardiomyocyte (CM)-fated progenitors (CFPs), almost exclusively differentiate into CMs both in vitro and in vivo (Cell Reports 2018). We examined the effect of transplanted 2x10⁶ and 5x10⁶ CD82+CFPs to rat MI model. As a result, we observed the beneficial effect of 2x10⁶ and 5x10⁶ CD82+ CFPs compared with sham group 1 and 3 months after transplantation. The most effective period was observed within 1 month. Histologically, CMs derived from CD82+CFPs was detected within injured heart 1 month after transplantation, however, 3 months after transplantation, the number of CMs derived from CD82+CFPs seemed to be low, maybe due to remaining host immune-capacity. To establish the effective way of CD82+ CFPs transplantation, investigation with immunosuppressant will be required for transplantation with CD82+ CFPs into myocardial infarction model of athymic rat.

研究分野：再生医療

キーワード：心筋再生 心筋前駆細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生後不変であると考えられていた心筋細胞が再生しているという報告(Bergmann O. et al Science, 2009)がされているが、その再生能力は極めて乏しく心筋梗塞や心不全を自然に克服する能力はなく、心臓は再生医療の重要なターゲットである。現在、心筋再生療法としてヒト iPS 細胞や ES 細胞から誘導される心筋細胞を用いた細胞移植が、心臓移植に代わる再生医療として臨床応用が試みようとしてされている。現在、治療対象は基本的に心移植を待つしかない重症心不全患者に対してであるが、今後、治療対象が重症心不全にだけ限られるものではなく、根本的な治療法がない進行する心不全の患者に対しても応用可能となるような治療法を開発することが期待される。そこで、移植細胞源として、前駆細胞に着目し CD82 陽性心筋特異的前駆細胞を同定した。前駆細胞としては、今までに数々の心血管前駆細胞が同定されているが、分化能として心筋細胞や血管・間葉系に分化する能力を有するが、生体内で安定して心筋細胞に分化せずむしろ血管・間葉系に分化する傾向を示すため、心筋再生能は乏しいと考えられる。一方、CD82 陽性心筋特異的前駆細胞は、心筋細胞のみに分化することが運命決定されており、生体内で高率に安定して心筋細胞に分化することができ、また、得られる心筋細胞数は投与した細胞数の約 6 倍にもなり、効果的に心筋を産出できるという特長を有している。そこで、この強力な心筋分化能と心筋産生能を有する CD82 陽性心筋特異的前駆細胞を用いることで、心臓を再生し心機能を回復させる心不全に対する先制的な治療法を開発することができないか？と考えられた。また、今まで、既知の心血管前駆細胞では、生体内で安定して心筋細胞に分化することが困難でどのように心筋に分化していくかを検討することは容易ではなかったが、生体内で極めて高く安定して心筋へ分化する能力を有する CD82 陽性心筋特異的前駆細胞の発見により、移植後生体内でどのようにして再生しうるのかを追究することができる。また、前駆細胞の段階から移植することで移植後の細胞・組織間相互作用を活かして、より生理的な形で広範に心臓組織再構築する利点を有すると考えられ、心筋細胞移植するのとは質的に全く異なる新しい治療戦略となる可能性がある点において学術的意義が高く臨床応用の観点からも必要性が高いと考えられた。また、新しく同定された CD82 陽性心筋特異的前駆細胞の発見により、未分化 iPS 細胞から心筋へと分化する過程の中で、新しい分化段階を得ることができたため、新しい心筋分化メカニズムに関する遺伝子やエピゲノムの変化をより鋭敏かつ詳細にとらえることが可能となり、心筋分化や増殖、さらには心筋リプログラミングなどの分子機構の解明にもつながり、新たな研究・治療ターゲットを生み出すことができると考えられ、科学的・学術的な意義が極めて高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、この CD82 陽性心筋特異的前駆細胞から生体内でどのように心筋へ分化し、心機能が改善されうるかを動物モデルにて検討し、治療法としての礎を築き効果的な移植方法の確立を目指すとともに、*in vitro* においてもどのように心筋細胞へ分化するかを検討し新しい心筋分化メカニズムを追究する。

3. 研究の方法

A. 亜急性期心筋梗塞モデルラットを用いて、心外膜下からの投与による至適 CD82 陽性筋前駆細胞数の検討 (FACS を用いて 200 万個ならびに MACS を用いて 500 万個を純化し) ある細胞外基質を混ぜて専用の注射器を用いて心外膜下から移植投与を行う。

その細胞外基質に関しては、効果を前段階の実験にて確認しており、心機能改善効果を超音波を用いて移植後 1 か月、3 か月にて検討したまた CD82 陽性心筋前駆細胞の効果を検討するにあたり、比較として VCAM1 陽性心筋細胞を 200 万個を FACS にて純化し同様の効果

を検討した。

B.移植後の心臓を組織学的に検討し、前駆細胞から心筋細胞に至る過程を検討した。

C. *in vitro* において未分化細胞、CD82 陽性心筋前駆細胞、VCAM1 陽性心筋細胞を FACS または MACS を用いて純化し、格段階での遺伝子発現を検討するとともに、移植の面から免疫源性に着目して発現を検討する。

4. 研究成果

A. 亜急性期心筋梗塞モデルを用いた CD82 陽性前駆細胞移植の検討においては、 2×10^6 個、 5×10^6 個の前駆細胞を FACS もしくは MACS を用い純化しある細胞外基質に懸濁して移植をおこなった。また効果の比較として VCAM1 陽性心筋細胞を 2×10^6 個 MACS を用いて同様に用意して移植を行った。心機能改善効果に関しては、3 群とも移植を行わない手術のみの Sham 群に比べて 1, 3 か月後心機能改善効果 (左室短縮率 % FS の改善や無収縮領域 Akinetic Length の減少) を示した。心機能改善効果の推移は、移植後 1 か月後改善するもそれ以降の改善はすべての群で横ばいであり、この効果の主な要因は各種細胞からの液性因子 (パラクライン) によるものと推察された。

B. 同時に行った組織学的な検討においては、移植 1 か月後において、CD82 陽性心筋前駆細胞から cardiac troponin T 陽性である心筋分化に分化し残存しているのを確認した。しかし、3 か月後の検討においては CD82 陽性心筋前駆細胞由来の心筋細胞が少ない傾向にあり、また VCAM1 陽性心筋細胞移植群においても 3 か月において同様の傾向を示した。そのため今回の研究においての移植による心機能改善効果は、移植した細胞が存在しより生着している期間に細胞から放出されたパラクライン因子により心機能改善効果を示したと考えられた。その後移植する細胞がなんらかの原因により除去され心筋細胞として心臓に定着し直接心機能改善に寄与することが期待できなかった。

C. B での移植後 1 か月以降に CD82 陽性前駆細胞も VCAM1 陽性心筋細胞も減少傾向にあった理由として、T 細胞が欠如された免疫不全ラットを用いたが、残存する免疫力の影響があるのではと考えられた。*In vitro* の実験としては、CD82 陽性心筋前駆細胞、VCAM1 陽性心筋細胞において免疫原性の発現を検討したところ、両群にてにおいて現在のところ発現の差は明らかには示さなかった。今後、移植において、免疫抑制剤を動物モデルに用いて、比較検討していく必要があるのではと考えられた。また、心筋細胞へ分化するかを検討し新しい心筋分化メカニズムを追究するにあたり、未分化、CD82 陽性心筋前駆細胞、VCAM1 陽性心筋細胞の遺伝子発現の検討を行い、鋭意検討を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masafumi Takeda
2. 発表標題 Identification of CD82-positive human cardiomyocyte-fated progenitors as a promising cell source of cardiac regeneration
3. 学会等名 International Society of Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------