

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17555

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来心筋細胞移植後の不整脈抑制方法の開発

研究課題名（英文）Development of suppression method for arrhythmia after transplantation of human iPS cell-derived cardiomyocytes

研究代表者

小林 秀樹 (Kobayashi, Hideki)

信州大学・医学部附属病院・助教（診療）

研究者番号：90794389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞から心筋細胞への分化過程において、ペースメーカー細胞を排除することにより、純化心室筋細胞を作製した。心筋梗塞モデルのカニクイザルへ、作製した細胞を移植し、細胞移植後に発生する心室性不整脈について検証を行った。純化心室筋細胞の移植を行った5頭の動物のうち1頭においてのみ、移植後早期に心室性不整脈の発現を認めしたが、過去の報告と比較すると、その持続時間や出現頻度は限りなく少ないものであった。このことから、純度の高い心室筋細胞のみを移植することは、移植後に生じる心室性不整脈の抑制につながると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、重症心不全患者へのヒト多能性幹細胞由来心筋細胞移植による再生医療が、広く行われていくと考えられる。一方で、心筋細胞移植に伴う様々な問題点も報告されており、その一つが移植後に誘発される心室性不整脈である。今回の研究では、純度の高い心室筋細胞のみを移植することが、そうした移植後の致死性不整脈を抑制する方法の一つであることが示された。

研究成果の概要（英文）：In the process of differentiation of human iPS cells into cardiomyocytes, pacemaker cells were eliminated and purified ventricular cells were produced. The prepared cells were transplanted into the cynomolgus monkey model of myocardial infarction, and the ventricular arrhythmia that occurred after the cell transplantation was examined. Ventricular arrhythmia was observed in only one of the five animals early after transplantation; however, its duration and frequency of occurrence were extremely low compared to previous reports. From this study, it was considered that transplantation of high-purity ventricular cardiomyocytes leads to suppression of ventricular arrhythmia occurring after transplantation.

研究分野：循環器内科

キーワード：再生医療 iPS細胞由来心筋細胞 細胞移植 不整脈

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や狭心症などの虚血性心疾患に併発する心不全は、罹患率・死亡率ともに高い疾患である。心臓は自己再生能が乏しい臓器であるため、一旦傷害された心筋細胞の回復は現状の治療法では困難である。近年、ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞の誕生により、心不全に対する再生医療の可能性が着目されるようになってきた。多くの動物実験で、多能性幹細胞を由来とする心筋細胞の移植による心筋再生治療の有効性が示されており、今後、ヒトにおける心筋細胞移植が現実の医療として実現されようとしている。

しかし、一方で、心筋細胞移植に伴う様々な問題点も報告されており、その一つが移植後に誘発される心室性不整脈である。移植後に生じる不整脈は、レシピエントの血行動態を悪化させる恐れがあるため、心筋細胞移植において克服すべき問題である。移植後の不整脈発生の原因としては、多能性幹細胞から心筋細胞への分化の過程において、心室筋細胞(作業心筋細胞)のみならず、自動能を有するペースメーカー細胞(特殊心筋細胞)が混在し、異所性興奮の起源(trigger)となる可能性や、近接する心室筋細胞との活動電位時間のばらつきによって不整脈基質(substrate)を形成する可能性などが考えられている。

そこで本研究では、心筋梗塞モデルのカニクイザルの心臓へ、純度の高い心室筋細胞のみを移植する実験を行い、心筋細胞移植後に生じる不整脈を抑制する方法について検証する。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト由来 iPS 細胞から心筋細胞への分化過程で、ペースメーカー細胞を排除し、心室筋細胞のみを含む心筋細胞を作製・移植することが、移植後の心室性不整脈の抑制効果につながるかどうかについて、心筋梗塞モデルのカニクイザルにおいて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、ヒト iPS 細胞を特殊な培地を用いて、心室筋細胞のみの細胞群(A 群; 純化心室筋細胞群)へ分化させた。また、従来通りの培地・分化方法により、心室筋細胞とペースメーカー細胞が混在した細胞群(B 群; 非純化心筋細胞群)を作製した。実験動物としては、ヒトと同じ哺乳類であるカニクイザルを用いた。心筋移植日の2週間前に、カニクイザルを開胸し、左前下行枝を一時的に結紮することで、急性心筋梗塞を作製した。2週間経過した時点で、上記 A 群、B 群およびコントロール群(C 群; 生理食塩水のみを移植)に、カニクイザルを割り付け、梗塞心筋領域にそれぞれの細胞移植を行った。細胞移植前後に、ホルター心電図を施行し、発生する不整脈について観察を行うとともに、細胞移植前後の心機能を血液検査、心エコー図法により評価し、不整脈発生の頻度や心機能の変化を上記 3 群間で比較検討した。移植 12 週間後に心臓を摘出し、心筋細胞の生着程度や腫瘍化の有無といった病理組織学的検索を行った。

4. 研究成果

A 群では 5 頭中 1 頭において、移植後 14 日目に最長 9 分程度持続する心室性不整脈が認められたが、移植後 1 ヶ月以降にはそうした不整脈は認められなかった。その他の個体では、持続性の心室性不整脈は認められなかった。心エコー図検査における左室収縮能は、移植後 1 ヶ月時点で改善が確認され、その効果は移植後 3 か月まで保持された。組織学的には、心筋内にグラフトが確認されており、移植した細胞の長期生着が示された。グラフトは、比較的明瞭なサルコメア構

造を有しており、心筋トロポニンI陽性、MLC2v陽性、MLC2a陰性といった純化した心室筋細胞の特徴を備えていた。

一方、B群、C群では、試験期間を通して心室性不整脈はほとんど認められなかった。しかし、B群においては、慢性期の左室収縮能の改善は認められず、いずれの個体においても、グラフトの生着はほとんど確認されなかった。

以上より、本実験において、純度の高い心室筋細胞の移植を行った結果、1頭においてのみ、移植後早期に心室性不整脈の発現を認めたものの、非純化心筋細胞については、グラフト生着が認められず、純化の有無による不整脈発生を直接比較することは困難であった。しかし、今回の研究で認められた細胞移植後の心室性不整脈は、過去の論文で報告されている幹細胞由来心筋細胞移植後に発生する心室性不整脈と比較すると、その持続時間や出現頻度は限りなく少ないものであった。これは、純度の高い心室筋細胞のみを移植することが、移植後に生じる心室性不整脈の抑制につながることを表している一方で、不整脈の完全な抑制には、移植細胞に対する拒絶反応など、他の不整脈発生の原因への対応が必要ということを示唆していると考えられた。

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1件

1. 著者名 Kobayashi H, Shiba Y, Yoshida Y.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 -
3. 書名 Pluripotent Stem-Cell Derived Cardiomyocytes	

〔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
---------	---------