

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18183

研究課題名(和文) 右心不全に対するiPS細胞由来心筋細胞シートの有効性の検討

研究課題名(英文) Therapeutic Efficacy of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Sheets in a Rat Pressure-Overloaded Right Heart Model

研究代表者

渡邊 卓次 (Watanabe, Takuji)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80838582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では右心不全モデルラットを用いてヒトiPS細胞由来心筋細胞(hiPS-CM)シートの右心不全に対する有効性を検討した。hiPS-CMシート移植によって心臓カテーテル検査で右室拡張能の増悪が抑制された。病理組織学的検査も施行したが、hiPS-CMシート移植を行うことで右室心筋内の微小血管密度が上昇し、右室心筋線維化が抑制された。本研究で得られた結果から、hiPS-CMシート移植は微小血管新生を増強することで右室心筋線維化を抑制し、右室拡張障害を抑制あるいは改善させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内科的ならびに外科的治療では改善が見込めないような右心不全に対する治療方法としては補助人工心臓の装着あるいは心臓移植しか選択肢がなかったが、この2つの治療方法は合併症としての脳血管障害やデバイス感染を起こす可能性があること、特に本邦ではドナー提供が限られていること、といったそれぞれの欠点があった。しかし、こうした治療に先行して本研究で検討したhiPS-CMシート移植を行うことで右心機能の増悪を抑制もしくは改善し、補助人工心臓装着までの期間、さらには心臓移植までの期間が延長できる可能性さらにはこれらの治療を回避できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the efficacy of human iPS cell-derived cardiomyocyte (hiPS-CM) sheet for right heart failure. Cardiac catheterization data showed the suppression of right ventricular diastolic function by hiPS-CM sheet transplantation. Histopathological examination showed hiPS-CM sheet transplantation increased the capillary density in right ventricular myocardium and suppressed right ventricular myocardial fibrosis. These results suggested that hiPS-CM sheet transplantation suppressed right ventricular myocardial fibrosis by angiogenesis, and suppressed or ameliorated right ventricular diastolic dysfunction.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：iPS細胞 心筋シート 右心不全

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末期重症心不全を来した虚血性心疾患、拡張型心筋症などの心疾患に対して、心筋再生治療(細胞移植)がその機能を改善することは広く認められるようになった。これまでに当施設では、左心不全を主病態とする虚血性心疾患ならびに拡張型心筋症に対する左室への自家骨格筋由来筋芽細胞シート治療の有効性及び安全性を非臨床試験ならびに臨床試験で明らかにしており、すでに虚血性心筋症に対する自家骨格筋由来筋芽細胞シート治療は世界初の心不全に対する再生医療製品「ハートシート」として保険償還を得ている。しかし、筋芽細胞では超重症心不全患者に対しての効果は認めないという課題があり、現在、人工多能性幹細胞(iPS)細胞を心筋細胞に分化させて人工ヒト心筋組織を作成し、これを心臓に移植する心筋補充療法への期待も大きい。当施設では、iPS細胞よりシート化した人工心筋組織を作成し、重症心不全の左室表面に貼付移植するという治療の開発に成功した。そして左心不全を主病態とする虚血性心筋症に対するiPS細胞由来心筋細胞シートを用いた非臨床研究がなされ、大動物心不全モデルを用いた有効性ならびに安全性の検討もなされている。

一方、複雑心奇形(機能的単心室)を呈する先天性心疾患患者の中には、その最終循環動態として解剖学的右心室を体心室として用いるFontan型手術を選ばなければならない患者が少なからず存在する(右室型単心室)。同患者群に対する病態の理解、Fontan型手術およびそこに至るまでの段階的手術術式の改良により徐々に早期・中期の治療成績は向上しつつあるが、体心室である右室が長期の体血圧に耐えられず、遠隔期に体心室不全を呈する危険性が示唆されている。また、近年では長期生存が高率に得られるようになったファロー四徴症患者においても、特に肺動脈閉鎖合併例では遠隔期に右心室機能不全を呈する症例が存在する。これら最終到達手術に耐術した先天性心疾患患者の増加は、新たな解剖学的右心室の機能不全に対する治療を必要とするようになったが、内科的・外科的によらず既存の治療では救命できないのが現状であり、現在の最終治療法としては、左心不全を主病態とする疾患と同様に心臓移植となる。心臓移植に至っても拒絶反応の問題などがあること、また、本邦では欧米諸国と比して非常に長期にわたる心臓移植待機を余儀なくされ、長期間の補助人工心臓装着が必要であること、かつ様々な論文で右室型単心室を主とする先天性心疾患合併の重症心不全患者に対する補助人工心臓の成績は極めて不良であることが報告されていること、などから新たな治療法が開発が待たれる。それゆえ、右心不全に対する新たな治療法を開発することが急務であるが、当施設では、ラットを用いて肺動脈bandingによる圧負荷心不全モデルを作成し、右心不全モデルにおける自家骨格筋由来筋芽細胞シート治療の有効性を2009年にすでに証明している(*T. Hoashi et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2009;138:460-7*)。しかしながら、超重症心不全に対しては筋芽細胞の有効性が認められていないことから、近年注目されているiPS細胞由来心筋細胞シート移植を用いて右心不全に対するさらなる有効性が得られないかを検討するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、右心不全モデルに対するiPS細胞由来心筋細胞シート移植による心筋再生治療の有効性を検討することである。

3. 研究の方法

(1)ラット右心不全モデルの作成

F344/NJcl-rnu/rnu rat(7-9週齢,雄,180-210g)をイソフルラン吸入による全身麻酔を行い、鎮痛剤の投与を行った後、気管内挿管、人工呼吸器管理下に調節呼吸とする。左第3肋間にて開胸し、肺動脈本幹を露出・剥離。3-0 Ethibond糸を通し、19G注射針と共に完全結紮し、速やかに注射針を引き抜くことで周径1.1mmの内腔を作成する(肺動脈絞扼=PAB)。止血の後、層々に閉創。これにより右室に後負荷(圧負荷)をかける。この負荷はモデルの成長に伴い徐々に強くなり、心不全を惹起する。

(2)ヒトiPS細胞由来心筋細胞(hiPS-CM)シートの作成、移植

hiPS-CMシートを作成し、モデル作成時と同様の手技にて開胸、右室自由壁にシートを移植する。同様に閉創する。

(3)hiPS-CMシート移植の効果判定

①心臓カテーテル検査による評価

経胸壁超音波による右心機能の定量は困難が予想されるため、心臓カテーテル検査による心室機能の評価も行う。モデル作成時と同様の手技にて挿管下とした後、胸骨正中切開にて心嚢に至り、心室より直接圧およびコンダクタンスカテーテルを挿入、PV loopを得る。この測定結果から収縮末期圧(ESP)、拡張末期圧(EDP)、圧下行脚時定数Tau、一回仕事量(Stroke Work)、心拍出量(CO)、収縮末期圧・容積関係(ESPVR)、拡張末期圧・容積関係(EDPVR)、前負荷動員一回仕事量(PRSW)を測定する。

②C-11 Acetate PET/CTによる評価

心筋酸素消費量(Kmono)ならびに心筋血流量(MBF)が算出される。また、Kmonoと心臓カテー

ル検査で計測・算出された心拍数(HR), RVESP, 一回拍出量(SV)を用いた右室心筋仕事効率 Cardiac efficiency (CE) = (RVESP × HR × Stroke volume) / Kmono (Beanlands RS et al. JACC . 1993) も評価する。

③心筋重量の測定

心室への圧負荷に対する代償性右心肥大を評価するために、心カテにより犠牲死させたモデルの心筋重量を右室自由壁、心室中隔および左室心筋に分けて測定し、肥大の定量化 (RV/全心室重量、RV/左心室+心室中隔) の測定を行う。

④病理組織学的検査による評価

血管新生の組織学的評価として Factor VIII 組織染色による capillary density の測定を行い、心筋線維化の組織学的評価として Picrosirius-red 染色による心筋線維化率の測定を行う。

⑤血管新生関連因子の評価

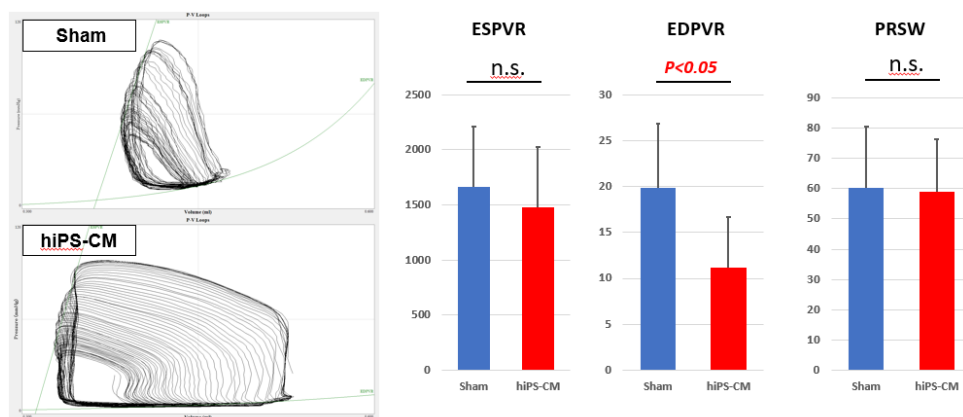
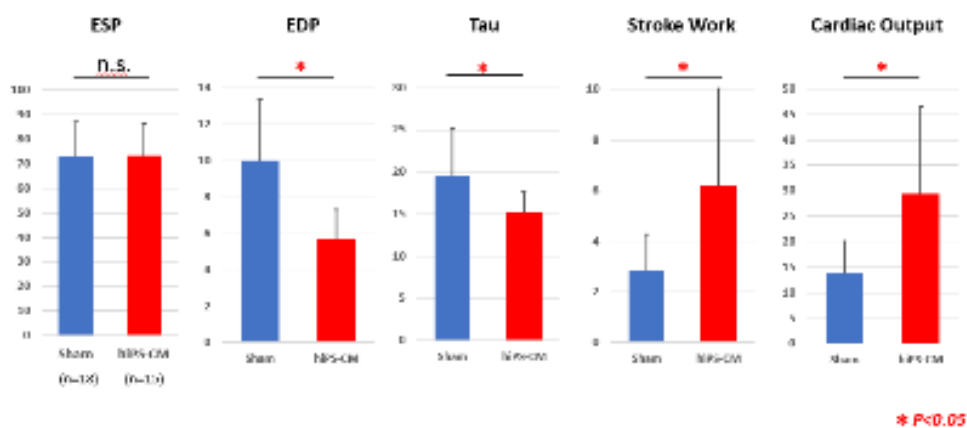
Real time-PCR による血管新生に関与する遺伝子発現の定量評価も併せて行う。

上記の項目を Sham 群 (PAB のみを施行) と hiPS-CM 群 (hiPS-CM シートを移植) とで比較検討する。

4. 研究成果

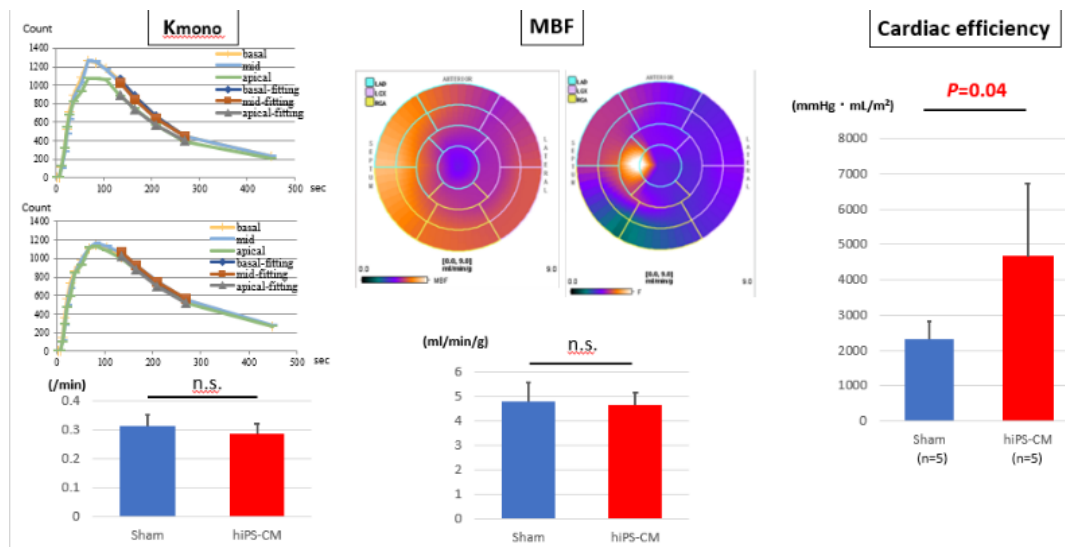
(1)心臓カテーテル検査による右心機能効果判定

拡張能の指標である RVEDP、Tau、RVEDPVR において hiPS-CM 群で有意に改善を認めた (P<0.05)。また、Stroke Work および CO が hiPS-CM 群で有意に増加していた (P<0.05)。



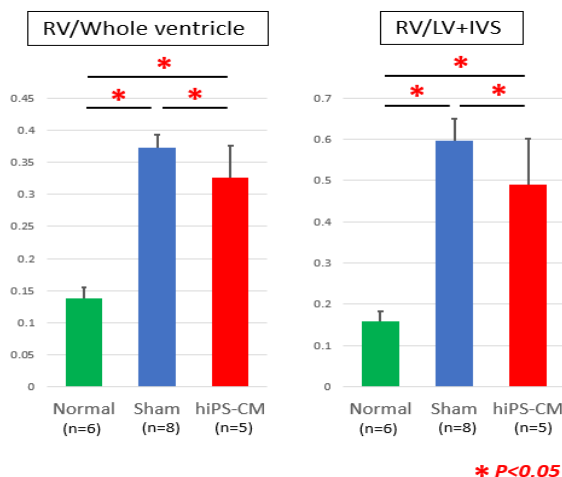
(2) C-11 Acetate PET/CT による評価

Kmono は両群間に有意差は認められなかったが、CE は、hiPS-CM 群で有意に増加していた ($P=0.04$)。



(3) 心筋重量による評価

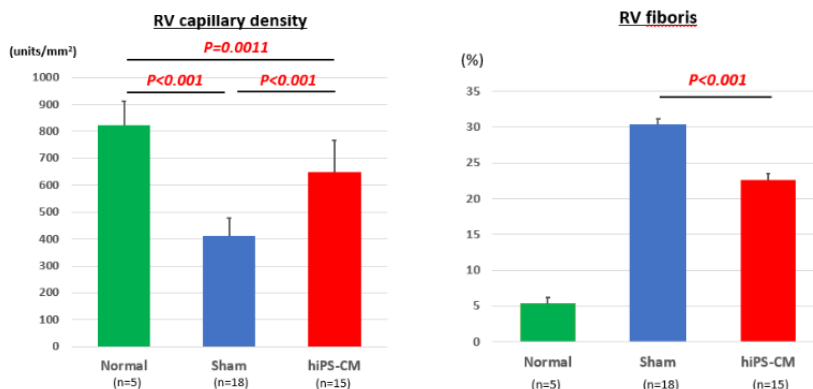
RV/全心室重量、RV/左心室+心室中隔において、正常ラット (Normal 群) に比べ Sham 群ならびに hiPS-CM 群では有意に上昇していたが、Sham 群より hiPS-CM 群で有意に低下していた ($P<0.05$)。



(4) 病理組織学的検査による評価

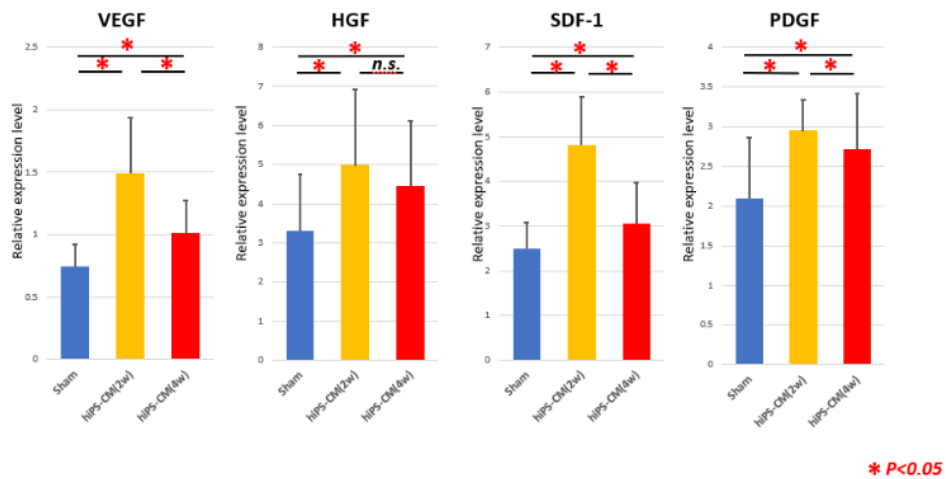
Factor VIII 染色において、Normal 群に比べ Sham 群ならびに hiPS-CM 群では有意に capillary density は低下していたが、hiPS-CM 群では Sham 群に比べ capillary density は有意に上昇していた ($P<0.001$)。

Sirius-red 染色においては、Normal 群に比べ Sham 群ならびに hiPS-CM 群では有意に RV 線維化率は上昇していたが、hiPS-CM 群では Sham 群に比べ有意に RV 線維化率が抑制されていた ($P<0.001$)。



(5) 血管新生関連因子の評価

RT-PCR では血管新生関連因子である VEGF, HGF, SDF-1, PDGF の発現が hiPS-CM 群で有意に増加していた ($P < 0.05$)。



以上より、hiPS-CM シート移植は、右室心筋線維化の抑制ならびに微小血管新生により右室拡張障害を改善させ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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊 卓次
2. 発表標題 右心不全に対するヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの有効性の検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊 卓次
2. 発表標題 ラット右心圧負荷モデルに対するiPS細胞由来心筋細胞シートの右心機能改善効果の検討
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 卓次
2. 発表標題 右心不全モデルに対するヒトiPS細胞由来心筋細胞シートの有効性の検討
3. 学会等名 第51回日本心臓血管外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuji Watanabe
2. 発表標題 Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocyte Sheet Transplantation Ameliorate the Diastolic Function of a Pressure-overloaded Right Heart
3. 学会等名 第85回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuji Watanabe
2. 発表標題 Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocyte Patches Improve Ameliorate Right Ventricular Diastolic Dysfunction in a Rat Pressure-overloaded Right Heart Model
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------