

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17080

研究課題名(和文) 圧ガイドワイヤーを用いた拡張型心筋症における微小血管障害の関与の解明

研究課題名(英文) Evaluation of microvascular dysfunction in pig dilated cardiomyopathy model using a pressure guidewire

研究代表者

鈴木 康太 (Suzuki, Kota)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70816850

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)：拡張型心筋症モデルブタに対してiPS細胞由来心筋細胞シート移植を行い、心機能の改善効果およびその機序として冠動脈微小血管障害の改善の関与について評価を行った。心機能はiPS細胞シート移植群で有意な改善を認めたが、微小血管障害に関しては冠動脈の太さと容易に冠攣縮を引き起こすことが問題で正確な評価ができなかった。圧ガイドワイヤーを用いる方法は断念しアンモニアPETを用いて心筋血流能について評価を行い、左前下行枝および回旋枝領域において最大充血時の心筋血流量の有意な改善を示し、iPS細胞由来心筋細胞シートが微小血管障害の改善を介して、低下した心機能を改善させる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

拡張型心筋症は心臓移植を必要とする重症心不全の原因として最も多い疾患である。薬物療法を含む内科的治療抵抗性の重症拡張型心筋症に対する治療は、現状では補助人工心臓および心臓移植しかない。しかし、補助人工心臓と心臓移植はそれぞれ耐久性と移植ドナーの少なさという問題を抱えている。拡張型心筋症モデル動物にiPS細胞由来心筋細胞シート移植治療が有効である可能性が示唆されたことは、今後の重症心不全の治療の選択肢を広げる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We performed iPS cell-derived cardiomyocyte sheet transplantation in a pig model of dilated cardiomyopathy and evaluated the effect of the transplantation on cardiac function and the involvement of improvement of coronary microvascular dysfunction as a mechanism of improvement. Cardiac function was significantly improved in the iPS cell sheet transplantation group, but microvascular dysfunction could not be accurately evaluated because of the size of the coronary arteries and the ease with which coronary spasm can be induced. The method using a pressure guidewire was abandoned and myocardial blood flow capacity was evaluated using ammonia PET, which showed significant improvement in myocardial blood flow during maximal hyperemia in the left anterior descending and circumflex regions, suggesting that iPS cell-derived myocardial cell sheets may improve impaired cardiac function. This suggests that iPS cell-derived cardiomyocyte cell sheets may improve impaired cardiac function.

研究分野：iPS由来心筋細胞

キーワード：拡張型心筋症 iPS細胞 iPS由来心筋細胞シート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症心不全患者に対して、心臓移植や補助人工心臓などが治療法として選択されるが、いずれも未だ解決されない問題点も残されているのが現状である。

近年重症心不全の治療として再生医療が注目されており、中でも iPS 細胞を用いた再生医療は最も注目されている。当科では既にブタ虚血性心疾患モデルにおいてヒト iPS 細胞由来心筋細胞シート移植によりシートから分泌されるサイトカインによる血管新生作用で心機能改善効果を示す結果を得ており (Kawamura et al. Circulation 2012;126:S29-S37)、今後はヒトへの臨床応用を予定している。しかし心臓移植待機患者の中で最も多くを占める疾患は拡張型心筋症であり、拡張型心筋症に対するヒト iPS 細胞由来心筋細胞シート移植の有効性は未だ証明されていない。拡張型心筋症においても病変の進行に微小血管障害の関与が指摘されており、本研究では拡張型心筋症モデル動物において圧ガイドワイヤーを用いて微小血管抵抗を測定し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シート移植による微小血管抵抗の変化を検討する。

2. 研究の目的

拡張型心筋症モデル動物に対するヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの治療有効性を確認すると共に、その機序としての微小血管障害の改善の関与を圧ガイドワイヤーを用いた侵襲的な方法で明らかにするのが本研究の主な目的である。

3. 研究の方法

ブタ拡張型心筋症モデルの作成および微小血管抵抗の測定

全身麻酔下に経静脈的に右室心尖部にペーシングリードを留置し、高頻度ペーシングを行うことで拡張型心筋症モデルを作成する。ペーシング留置部位や心拍数、ペーシングを行う期間などは過去の報告では様々であり、これらについて条件検討を行う。また圧ガイドワイヤーを用いて正常例および拡張型心筋症モデルにおいて微小血管抵抗の測定を行う。微小血管抵抗の指標としては圧ガイドワイヤーを用いて圧および熱希釈法による血流量を求めることでオームの法則から抵抗値 (IMR: Index of Microvascular Resistance) を測定する。また組織において抗 CD31 抗体を用いて微小血管の染色を行い、拡張型心筋症モデルにおける微小血管障害の関与を証明する。

iPS 細胞由来心筋細胞シートの移植実験

全身麻酔下に清潔操作で胸骨正中切開を行い、左室壁に iPS 細胞由来心筋細胞シートの移植手術を行う。異種移植となるためにその後、餌とともに免疫抑制剤の経口投与を行う。移植後 1 ヶ月間に渡って心臓超音波検査・心臓 CT 検査などを用いて心機能の評価を行い、小動物に比べてより実臨床的な項目での心機能の改善効果を評価する。また、組織染色を行い移植された細胞の宿主細胞との接着性や融合性、炎症反応についても評価を行う。

また、移植手術前および犠牲死前に圧ガイドワイヤーを用いて微小血管抵抗の測定を行い iPS 細胞由来心筋細胞シートの血管新生作用による微小血管障害の改善について評価を行う。

4. 研究成果

ブタ拡張型心筋症モデルの作成について

ミニブタを用いてブタ拡張型心筋症モデルの作成を行った。当初、以前に報告されているように開胸にて直接右室前面にペースングリードを縫着して、心拍数 200 程度での高頻度ペースングを行いモデルを作成したが、心表面からのペースングでは閾値が安定せずに安定したモデルが作成できなかった。そのため、経静脈的に内頸静脈から右室心尖部にペースングリードを留置して心拍数 170 で1カ月程度高頻度ペースングを行うことで安定したモデルの作成を行うことができた。拡張型心筋症モデルブタの作成を行い、心機能はペースング開始前 EF $59.3 \pm 4.1\%$ からペースング1か月後 EF $33.9 \pm 4.7\%$ と低下を認め、左室拡張末期容積はペースング開始前 29 ± 6.0 ml から1ヶ月後 46.5 ± 8.5 ml と左室拡大を認めびまん性に心機能の低下した拡張型心筋症モデルブタの作成に成功した。

圧ガイドワイヤーを用いた微小血管抵抗の測定について

上記において作成した拡張型心筋症モデルブタにおいて、全身麻酔・透視化において冠動脈造影を行い、冠動脈に圧ガイドワイヤーを挿入して冠動脈内圧の測定および微小血管抵抗の測定を行った。微小血管抵抗を測定するためには冠動脈内の圧を測定するとともに、生理食塩水を冠動脈内に選択的に注入して圧ガイドワイヤー先端に設置された温度センサーによる温度変化を測定する必要があるが(ヒトの臨床にて報告あり)、ミニブタの冠動脈はヒトに比べて細くまた操作によって容易に冠攣縮を引き起こすために安定した測定ができなかった。ニトログリセリンを選択的に冠動脈内に投与したり、ミニブタの大きさを許容範囲内で大きくしたりと試行錯誤を行ったが、測定値は安定しなかった。このため、この方法での圧ガイドワイヤーを用いた微小血管抵抗の測定は難しいと判断した。

iPS 細胞シート移植の有効性および心筋血流量・心筋血流予備能の測定について

高頻度ペースング開始1ヶ月後の心機能の低下した拡張型心筋症モデルブタに対してヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの移植を実施した。iPS 細胞群として細胞数 3.3×10^7 個から作成したシートの移植を行い、control 群として開胸操作のみの手術を施行した。移植1ヶ月後の評価において iPS 細胞群において心収縮能は有意に改善を認めた。(iPS 細胞群 vs control : $49.0 \pm 6.5\%$ vs. $36.4 \pm 3.3\%$, $p < 0.05$) また、左室圧測定において iPS 細胞群において左室拡張末期圧の低下を認めた。圧ガイドワイヤーを用いた微小血管抵抗の測定が困難であった代わりに、アンモニア PET を用いて心筋血流量および心筋血流予備能の測定を4頭ずつ行ったところ、ATP を投与したストレス(最大冠血管拡張)時において LAD と LCx 領域において心筋血流量の有意な増加を認めたが、心筋血流予備能の上昇は有意差を認めなかった。また、一部の個体において犠牲死時にヒトロポニン T 抗体陽性の移植した心筋細胞シートの残存を認めた。以上より、DCM モデルブタにおける iPS 細胞シート移植はストレス時の心筋血流量の増加を介して、心機能を改善させる可能性が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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kota Suzuki, Shigeru Miyagawa, Emiko Ito, Akima Harada, Takuji Kawamura, Ai Kawamura, Yoshiki Sawa
2. 発表標題 The Development of the New Treatment for Distressed Microvascular Dysfunction in Porcine Dilated Cardiomyopathy Model Using Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocyte Sheet
3. 学会等名 AHA 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------