

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20949

研究課題名(和文) intravitalイメージング技術を用いた幹細胞の心筋修復効果の検証

研究課題名(英文) Impact of the effects of stem cells on myocardial repair using intravital imaging techniques

研究代表者

松浦 良平 (Matsuura, Ryohei)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10768922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞モデルマウスを作成し、全身麻酔下にマウス心臓のintravital imagingを撮影するシステムを構築した。今後はシート貼付群とコントロール群に分けて心機能等の評価を行い、その後、心臓を摘出して心筋採取(梗塞領域、境界領域、健常領域の各3箇所)、組織標本を作成し、PCR/ELISA法、及び組織病理学的評価を行う予定である。このシステムを使って、再生医療を始めとした治療の作用機序や効果の評価を行うなど、ドラッグスクリーニング方法となる可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞モデルマウスを作成し、全身麻酔下にマウス心臓のintravital imagingを撮影するシステムを構築した。このシステムを使って、再生医療を始めとした治療の作用機序や効果の評価を行うなど、ドラッグスクリーニング方法となる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We created a mouse model of myocardial infarction and constructed a system for intravital imaging of the mouse heart under general anesthesia. In the near future, we will evaluate cardiac function by dividing the mice into two groups: a sheet-group and a control group. After that, we plan to evaluate cardiac function in the sheet-group and the control group, and then explant the hearts, collect myocardium (3 sections each of infarct-, border-, and non-infarct regions), prepare tissue samples, and perform PCR/ELISA and histopathological evaluations. This system will be used to evaluate the mechanism of action and efficacy of regenerative medicine and other therapies. This system has the potential to be used as a drug screening method, to evaluate the mechanism of action and efficacy of therapies including regenerative medicine.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：intravital imaging

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症心不全に対する心筋再生療法として、心臓に対する様々な幹細胞移植術が行われている。当講座は様々な種類の細胞移植を心表面に行ってきたが、その治療メカニズムについては明らかではなかった。当研究者はドイツに留学中、虚血性心筋症モデル動物に iPS 細胞由来心筋細胞シート(以下 iPS 心筋細胞シート)を移植すると iPS 心筋細胞から TGF β が分泌され左室リモデリングを抑制することを明らかにした。一方で iPS 心筋細胞シートが梗塞領域に M2 マクロファージを誘導することも見出したが、組織修復を担うとされる M2 マクロファージが実際にどのように組織修復に関与するかは未だ不明である。当研究者は、在学中に自ら開発した intravital イメージング技術により、障害を受けた心筋が iPS 心筋細胞シート等の細胞治療によりどのように癒痕治療してゆくか、細胞間でどのようなコミュニケーションを取っているかを観察・評価し、細胞療法の治療メカニズムの一端を明らかにする。

2. 研究の目的

心筋梗塞後の死亡原因として心筋リモデリングによる慢性心不全が問題であり、心臓移植に替わる心不全治療の開発が望まれている。そのような中で重症心不全に対する幹細胞移植術が注目され、大阪大学大学院医学系研究科でも iPS 心筋細胞シート移植を始めとした様々な方法がすでに開発されている。しかし低下した心機能が回復するメカニズムについては不明な点が多い。

幹細胞移植は幹細胞そのものが心筋に分化し心機能をサポートすると期待されているが、実際に分化している細胞がわずかで機能改善を説明するに至っていない。そのような中で、2019年に Nature(Nature 577,405-409(2020))から幹細胞移植による治療効果は細胞移植によって引き起こされる炎症効果にすぎないという論文が発表され、炎症の結果 wound healing process が惹起され、癒痕の硬さが変化するというものであった。同じ現象は細胞の死骸を injection しても起こり、炎症物質の injection も起こるとされ、本論文は欧米で大々的に取り上げられた。

一方、当研究者はドイツ留学中に iPS 心筋細胞シートが TGF β を分泌し、cardiac fibroblast による collagen type I の産生を促し梗塞領域の elasticity を向上させることで左室リモデリングを抑制させることを発見した(論文投稿中)。また iPS 心筋細胞シートは cellularity を増加させ、組織修復に重要な役割を担うとされる M2 マクロファージをグラディエント状に誘引することを本研究では iPS 心筋細胞シート等の細胞治療が心筋梗塞領域に対して各種細胞にどのような作用やコミュニケーションを取るのかを明らかにする。

本研究の独自性は、従来の in vitro の細胞実験や in vivo の動物実験に留まらず、当研究者が自ら心臓に対して確立した二光子顕微鏡を用いた intravital イメージング技術を用いる。intravital イメージングにより生きたまま・リアルタイムで各種細胞の挙動が追跡可能となる。intravital イメージング技術を

用いた再生医療研究は世界初であり、本研究は細胞治療の論拠に寄与し得る点で、学術的独自性・創造性は高いと考える。また最終的には細胞移植だけではなく、mode of action に即した薬剤治療に応用することができる可能性があると考えている。当研究者は、在学中に自ら開発した intravital イメージング技術により、障害を受けた心筋が iPS 心筋細胞シート等の細胞治療によりどのように癒痕治癒してゆくか、細胞間でどのようなコミュニケーションを取っているかを観察・評価し、細胞療法の治療メカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

本研究では iPS 心筋細胞シート等の細胞治療が心筋梗塞領域に対して各種細胞にどのような作用やコミュニケーションを取るのかを明らかにすることを目的とする。本研究の独自性は、従来の in vitro の細胞実験や in vivo の動物実験に留まらず、当研究者が自ら心臓に対して確立した二光子顕微鏡を用いた intravital イメージング技術を用いる。intravital イメージングにより生きたまま・リアルタイムで各種細胞の挙動が追跡可能となる。intravital イメージング技術を用いた再生医療研究は世界初であり、本研究は細胞治療の論拠に寄与し得る点で、学術的独自性・創造性は高いと考える。また最終的には細胞移植だけではなく、mode of action に即した薬剤治療に応用することができる可能性があると考えている。

3 . 研究の方法

ラット心筋梗塞モデルに対する iPS 心筋細胞シートの有効性を評価した先行研究(筆頭著者として論文投稿中)で心機能改善を促進させる機序は確認しているが、本研究ではラット・マウス心筋梗塞モデルに対して iPS 心筋等の細胞シートが M1、M2 マクロファージなどの各種炎症細胞にどのような影響を与えているのか、従来の機能的・組織病理学的手法のみならず、intravital イメージング技術を用いて、生きたまま・リアルタイム・細胞レベルで確認する。

ラット・マウスを使用し、心筋梗塞モデルを作成する。全身麻酔下に、清潔操作で左肋間開胸(第 5-6 肋間)を行い、冠動脈左前下行枝を結紮(7-0prolene を使用)して心筋梗塞を作成し、1 週間後に心エコー・心臓 MRI・心カテテル検査によって心機能を評価して、心筋梗塞モデルを作成する。当科でこれまで用いてきたプロトコルに沿って、細胞シート群は iPS 心筋細胞シートを貼付し、貼付直後、1 週後、4 週後、12 週後時点で心機能の評価として心エコー検査、intravital イメージングを実施する。心機能を評価した後、心臓を摘出して心筋採取(梗塞領域、境界領域、健常領域の各 3 箇所)、組織標本を作成し、PCR/ELISA 法、及び、組織病理学的評価を行う。また、Collagen は SHG、血管や心筋は dextran、TMRE で標識することが可能である。

また、GFP ラットは GFP で標識した各種細胞を移植したラットを用いる。例えば GFP ラットから骨髓球を抽出して M2 マクロファージ誘導し、X 線照射ラットに移植することで M2 マクロファージ特異的 GFP ラットを作成することができる。

4 . 研究成果

心筋梗塞モデルマウスを作成し、全身麻酔下にマウス心臓の intravital imaging を撮影するシステムを構築した。今後はシート貼付群とコントロール群に分けて心機能等の評価を行い、その後、心臓を摘出して心筋採取(梗塞領域, 境界領域, 健常領域の各3箇所)、組織標本を作成し、PCR/ELISA法、及び、組織病理学的評価を行う予定である。このシステムを使って、再生医療を始めとした治療の作用機序や効果の評価を行うなど、ドラッグスクリーニング方法となる可能性が考えられる。

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

〔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
---------	---------