様　式　Ｆ－１９－２

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　５ 年 １０ 月 ３０ 日現在

機関番号：３２６６６
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間：2017～2022
課題番号：１６ＫＫ０２１０

研究課題名（和文）iPS細胞の冠動脈内注入による低侵襲心筋再生療法（大型動物での検討）（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Minimally invasive cardiac regeneration therapy with intracoronary infusion of iPS cells (large animal model)(Fostering Joint International Research)

研究代表者
時田　祐吉（Tokita, Yukichi）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：２０３８６１８９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　11,500,000円
渡航期間：　　１ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究はマウス心筋梗塞モデルを用い、マウスiPS細胞の冠動脈内注入による心機能改善効果を心筋幹細胞と比較する研究を発展させ、Lousivuille大学Roberto Bolli教授の研究室において大型動物（ブタ）を用い、iPS細胞の冠動脈内注入による心機能改善効果を検証することを目的としたが、コロナ禍の影響により海外渡航が困難で国内で研究を進めることとなり、また研究遂行にも時間を要した。そのため、まだ研究途上の段階であり、研究期間内に検証可能なデータを得るところまで研究を進めることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
現在我が国ではiPS細胞を用いた心筋再生療法として心筋シートなどの方法での応用が中心となって検討されているが、より低侵襲な細胞導入法である冠動脈内注入により心筋再生効果が得られれば、今後臨床応用する際に高齢心不全患者や重症心不全患者にも幅広く適応することができ、心不全治療の有望な治療法として期待される。残念ながら今回研究期間内にその効果を検証可能な結果を得ることができなかったが、引き続き研究を継続し検証を行う方針である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop the primary study (minimally invasive cardiac regeneration therapy with intracoronary infusion of mouse iPS cells) using large animal model (swine model) at Dr. Roberto Bolli's lab (Louisville University, USA). Unfortunately, it was difficult to perform this study in foreign country because of COVID-19 pandemic. We tried to perform this study in our institution, but it took longer time to move forward the study. We could not get enough result to assess the efficacy of this therapy in the study period.

研究分野：Cardiology

キーワード：regeneration therapy　minimally invasive　iPS cell　cardiac progenitor cell

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｆ－１９－２

１．研究開始当初の背景

心不全患者数は増加の一途をたどっており、その原因疾患として最も多いのは虚血性心疾患でありその中でも陳旧性心筋梗塞などに伴う虚血性心筋症が大部分を占めている。薬物療法、カテーテルインターベンションや冠動脈バイパス術による血行再建療法、心臓再同期療法など心不全治療の進歩は著しいが、心不全治療で最も重要な点は原因疾患の治療であるにも関わらず、この虚血性心筋症に伴う心不全の病態の中心であるところの虚血により壊死した心筋の線維化と、それに伴う生存心筋の減少に関しては根本的な治療法がこれまで存在しなかった。細胞治療による心筋再生療法はこの線維化した心筋を生存心筋に再び置き換えるというこれまでの治療法では困難であった虚血性心筋症の根本的な治療となりうる治療法である。心筋再生療法は多くの臨床試験でその有用性が示されているが、用いられている細胞種は骨髄幹細胞や心筋幹細胞など様々でどの細胞種がもっとも優れているのかは明らかでない。本邦においては再生医療として iPS 細胞を中心とした基礎研究、臨床研究が積極的に行われている。一方、心筋幹細胞は米国においてすでに臨床試験が行われ、その心機能改善効果が報告されている。また細胞の導入方法に関しても、冠動脈内注入法、心筋内注入法、心筋細胞シートなどさまざまな方法が行われているが、どの方法が最も有効なのかも明らかとなってはいない。これら導入法のうち、冠動脈内注入法は通常の心臓カテーテル検査手技とほぼ同様の手技で行うことができ、最も低侵襲な導入法の一つである。研究代表者が所属していた米国ルイビル大学循環器科では心筋幹細胞を用いた経カテーテル的冠動脈内注入法による心筋再生療法の臨床試験が行われており、研究代表者らもこの心筋幹細胞を用いた冠動脈内注入法による心筋再生療法の有用性に関する基礎研究の成果を複数発表している。iPS 細胞に関しては心筋細胞まで分化誘導した上で心筋シートを作成し移植する方法が中心に研究されているが、iPS 細胞を直接心筋内に注入する方法の有用性に関しても報告があり、冠動脈内注入法による導入でも効果が期待できるのではないかと考えられた。心不全患者は高齢であったりさまざまな併存疾患を有していたりすることが多く、開胸手術による心筋シート移植などの侵襲的治療は困難な例も多く存在し、この細胞治療を幅広い心不全患者に行っていくためには低侵襲な治療法であることが重大な条件となる。

２．研究の目的

示すことができれば iPS 細胞の臨床応用の幅を大きく広げることにつながることが予想されたため、まず本研究の基課題として基盤研究：『iPS 細胞の冠動脈内注入による低侵襲心筋再生療法』にてまずマウスを用いこの iPS 細胞の冠動脈内注入による心筋再生療法が心筋幹細胞と比較してより優れた心機能改善効果を示すことができるかを検証することを目的とした研究を行った。この iPS 細胞を用いた冠動脈内注入法による心筋再生療法を今後臨床応用するにあたっては基課題である小動物を用いた研究に引き続き、大型動物を用いた研究、最終的には臨床研究を行う必要がある。そこで今回の国際共同研究では米国ケンタッキー州ルイビル大学循環器科の Roberto Bolli 教授と共同研究を行うことにより基課題に引き続き迅速に大型動物（ブタ）を用いた iPS 細胞の冠動脈内注入による心筋再生療法の効果の検討に関する研究を行うことを目的とした。

３．研究の方法

(1) 基課題：『iPS 細胞の冠動脈内注入による低侵襲心筋再生療法』の研究方法

① iPS 細胞の至適導入細胞数の決定

細胞治療を行うにあたってはまず至適細胞導入数を決定することが必要である。具体的には研究代表者らが以前から用いている 90 分虚血再灌流心筋梗塞モデルを作成し、再灌流 4 時間後に 5 つの異なる導入数（30 万、75 万、100 万、150 万、300 万個）のマウス iPS 細胞もしくは PBS を冠動脈内に注入する（図 1）。心臓超音波検査による心機能評価および病理学的検討による梗塞領域サイズの評価から至適導入細胞数を決定する（図 2）。

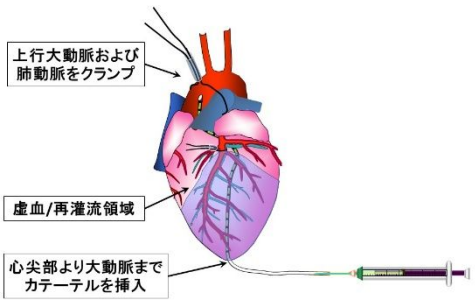

図 1．マウス冠動脈内注入モデル

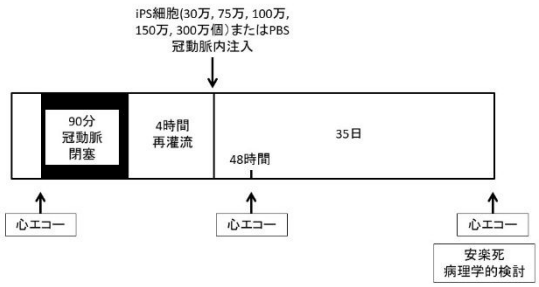

図 2．至適細胞数検討プロトコール

②iPS 細胞と心筋幹細胞の冠動脈内注入による効果、機序に関する病理学的検討
マウス iPS 細胞およびマウス心筋幹細胞、プラセボ（PBS）を用い、マウス心筋梗塞虚血再灌流モデルを用いた冠動脈内注入法による細胞導入による心機能改善効果を心臓超音波検査にて評価、検討する。心筋梗塞巣のサイズや心筋内に生着した細胞数などを病理学的に検討し、iPS 細胞と心筋幹細胞の心筋再生効果の比較や心筋再生に寄与するメカニズムの違いを検証する（図 3)。

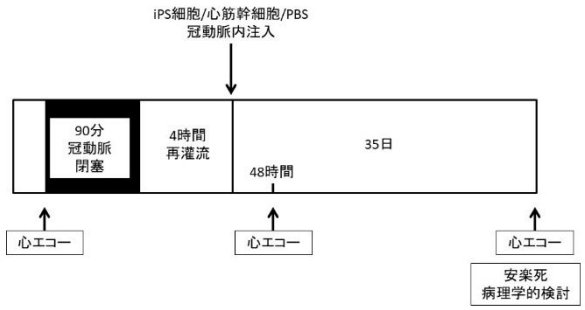

図 3．iPS 細胞・心筋幹細胞比較プロトコール

(2) 本課題の研究方法
本国際共同研究の目的は大型動物（ブタ）を用いた iPS 細胞の冠動脈内注入による心筋再生療法の効果の検討に関する研究を行うことである。研究代表者も以前所属していた Bolli 教授の研究室では心筋幹細胞の冠動脈内注入による心筋再生療法に関してマウスなどの小動物を用いた実験はもちろん、ブタなどの大型動物を用いた実験結果もすでに報告している。
大型動物での冠動脈内注入では臨床試験と同様にカテーテルを用いた注入法を行うなど小動物の場合と方法が異なる点も多いが、Bolli 教授の研究室で共同研究を行うことにより、心筋幹細胞での実験を行った際のノウハウや施設を利用することができ、迅速な研究の実施が可能となると考えられた。また心臓超音波の解析や病理学的検討も同研究室と同様の方法を用いることにより心筋幹細胞でのこれまでの豊富な研究報告との比較も可能となり基課題を実臨床での使用にむかって格段に発展させることができるものと考えられた。
そこで本研究では Bolli 教授と共同研究を行い、約 6 ヶ月程度同教授の研究室において下記内容の研究を行うこととした。
具体的な研究方法としてはまずカテーテルを用いてブタ冠動脈左前下行枝を 90 分間バルーンにより閉塞し虚血再灌流心筋梗塞モデルを作成する。心筋梗塞作成 30 日後にカテーテルを用いてブタ iPS 細胞、ブタ心筋幹細胞、PBS のいずれかを冠動脈内に注入する（図 4)。心臓超音波検査を心筋梗塞作成前、細胞導入前、導入 35 日後に行い心機能改善効果を比較検討、また導入 35 日後にブタを安楽死せしめ病理学的に心筋梗塞巣のサイズや生着した細胞数などを検討する(
図 5)。

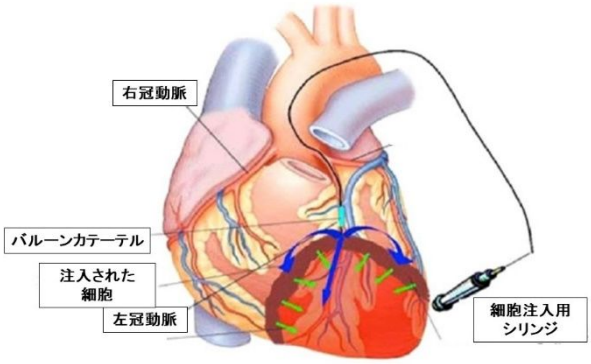

図 4．ブタ冠動脈注入モデル

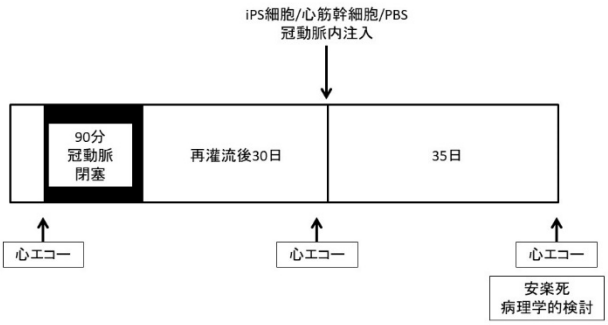

図 5．ブタ冠動脈内注入プロトコール

４．研究成果

コロナ禍の影響により、海外渡航が困難となっただけでなく、基研究である国内での研究も実験環境に大きな制限が加わり、予程通りに研究を進めるのが困難であった。Roberto Bolli 教授の研究室と連絡をとりつつ、基研究、本研究を並行して進める方針とした。

まず基研究であるマウス iPS 細胞を用いた冠動脈内注入による心機能改善効果を検証する研究を進めた。国内ではオス由来の GFP 発現マウス iPS 細胞が使用可能であり、注入した iPS 細胞の生着率を検証するため、メスのマウスを用いて心筋梗塞モデルを作成し、マウス iPS 細胞、マウス心筋幹細胞の冠動脈内注入を行う方針とした。

この研究ではマウス、ヒト iPS 細胞の培養に精通する日本医科大学生理学　本間耕平助教（以前に理化学研究所高橋政代ラボに以前所属、本学所属後慶應義塾大学眼科学へ異動）に研究分担者としてマウス iPS 細胞の培養を担当していただいた。モデル確立のため、まず C57BL/6 由来のマウス ES 細胞を用い、C57BL/6 マウスを使用し心筋梗塞虚血再灌流モデル、冠動脈内注入モデルを確立することとした。マウス ES 細胞の培養は問題なく行うことができ、必要数の細胞を凍結保存することができた。しかしながら、マウス冠動脈内注入モデルの確立に難渋した。出血と細胞注入時の大動脈クランプに伴う後負荷のため術後の死亡率が予想よりも高く、モデルの再検討が必要と考えらえた。

マウスからラットへの動物種の変更を検討したが、国内で使用できるラット iPS 細胞は存在せず、免疫不全ラットを用いて心筋梗塞モデルを作成し、マウス iPS 細胞の冠動脈内注入を行うモデルを検討した。しかし免疫不全モデルでは細胞注入後の生体反応が正常と異なり、これまでの心筋幹細胞を用いた研究で、冠動脈内注入された細胞のうち心筋組織に生着し心筋へ分化する細胞は非常に少なく、心機能改善効果の機序としては生着した細胞から産生されるサイトカインが自己の心筋細胞の分化・増殖を促すパラクラインエフェクトが主体であるとされており、免疫不全ラットでは細胞の生着に伴う炎症反応の違いもありパラクラインエフェクトの効果も異なることが考えられたため、マウスモデルに戻し、手技の工夫によって死亡率を下げることを再検討した。

最終的に、クランプの方法を変更、細胞注入の方法もカテーテルから専用のニードルに変更するなどの工夫を行った結果術後の死亡率を下げることに成功したが、ここまでの実験経過に長期を要したため、残念ながら研究成果となるデータを得るところまで研究が進んでいない。引き続き研究を継続し、心機能改善効果を検証する方針である。

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ボリ　ロベルト (Bolli Roberto)	ルイビル大学・循環器科・教授	

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			
米国	ルイビル大学			