

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08432

研究課題名（和文）重症心不全に対するヒトiPS由来心筋球を用いた新しい心筋再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new myocardial regeneration therapy using human iPS-derived cardiomyocytes for severe heart failure

研究代表者

金澤 英明（Kanazawa, Hideaki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：40338033

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、カテーテルを用いてヒトiPS由来心筋球を冠動脈内に投与し、新しい心筋再生療法の検討、開発、重症心不全へのiPS細胞を用いた再生医療を具現化することを目的とした。日常臨床で使用しているカテーテル技術を用いて、カニクイザルへのiPS由来心筋細胞の投与が可能であったが、より大きいサイズの心筋球を、高容量に投与した場合、細胞の生着は確認できたものの、同時に左室前壁中隔に広範囲の梗塞巣が認められた。以上の結果から、今回の検討では、心筋球の冠動脈投与による心筋再生医療は、非現実的であ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

iPS由来心筋細胞を用いた心筋再生医療の具現化は、学術的にも社会的にも期待されている領域であり、より現実的で低侵襲な方法が求められている。今回検討した経カテーテル的な細胞投与は、低侵襲かつ実現可能な移植方法として有望であるが、iPS由来心筋細胞の移植方法としての最適化が得られず、引き続き、効果的な移植方法を模索していくことが検討される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted a preclinical trial to evaluate the effectiveness and safety of using catheter-delivered human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs) in the coronary arteries. The aim was to explore and develop new myocardial regeneration therapies and implement iPSC-based regenerative medicine for severe heart failure. Using catheter techniques commonly used in clinical practice, it was possible to administer iPS-derived cardiomyocytes to cynomolgus monkeys. However, when larger-sized myocardial spheres were administered in high doses, although the cell engraftment was confirmed, a large area of infarction was observed in the left ventricular anterior wall and septum. These findings indicate that intracoronary transplantation of iPSC-CMs is an inefficient therapeutic approach.

研究分野：循環器内科

キーワード：心筋再生医療 iPS 心不全

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性心不全は、悪性腫瘍と同様に不良予後の疾患群であり、高齢化社会の到来とともに患者数は激増（心不全パンデミック）することが想定されている<sup>1)</sup>。心臓移植に替わる治療法として、近年、iPS細胞（人工多能性幹細胞）による心筋再生医療が注目され、臨床応用も目の前まで来ているが、克服すべき課題も多い。まず、外科的な細胞移植術は侵襲性が高く、また局所のみ細胞移植となり心室中隔を含めた左心室全体に移植することが困難である。これまで直径10~20µmほどの体性幹細胞を経カテーテル的に冠動脈内に投与する方法は、欧米で行われていた心筋再生医療で用いられていた方法であるが、移植効率が低く、成功していない。一方、iPS由来心筋細胞を冠動脈内に投与した研究は世界的に報告がない。

### 2. 研究の目的

カテーテルを用いてヒト iPS 由来心筋球を冠動脈内に投与し、その効果と安全性を評価する前臨床試験を行い、新しい心筋再生療法の検討、開発、重症心不全への iPS 細胞を用いた再生医療を具現化することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト iPS 由来心筋球の作製

バイオリアクターによる大量培養システムを用いて心筋分化誘導を行い<sup>2)</sup>、さらに高純度の心筋細胞純化精製法を用いてヒト iPS 由来心筋細胞を精製する<sup>3)</sup>。次に、特殊な培養皿を用いて、播種する細胞数を調整し、冠動脈に注入するための心筋球として、50~60µm、80~100µm、100~150µmの3種類の異なるサイズ的心筋球を作製する。

#### (2) 実験動物、細胞移植方法

全身麻酔下にカニクイザルを用いて経カテーテル的に(1)で作製したサイズの異なるそれぞれのヒト iPS 由来心筋球を5M (=単離心筋細胞として $5 \times 10^6$ 個相当)、10M、30Mの3つの細胞数に分けて冠動脈内に投与する。細胞投与4週間後に犠牲死とし、心臓および脳、肺、肝、腎、脾を摘出する。

#### (3) 評価項目

冠動脈血流評価、心電図検査、左室収縮機能評価（心臓超音波検査）、心筋傷害評価（血清CK値、心筋トロポニン値）、有害事象（不整脈、血行動態など）、Hematoxylyn Eosin (HE) 染色、Picrosirius red (PSR) 染色、および human specific Troponin I 免疫染色による病理組織学的検査を行い、心筋細胞の生着程度、心筋梗塞形成の有無、異所性生着の有無、腫瘍形成の有無などを評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト iPS 由来心筋球の作製

特殊培養皿を用いて、直径50~60µm、80~100µm、100~150µmのヒト iPS 由来心筋球 (Spheroid) を作製した。純化精製後の心筋トロポニンT陽性率をフローサイトメトリーを用いて評価したところ、いずれの大きさの心筋球においても97~99%と高い陽性率を確認した。

#### (2) 心機能、および心筋細胞生着評価

単離心筋球 (Single cells) および、直径50~60µm、中容量( $1 \times 10^7$ )の Spheroid の投与では、HE 染色、PSR 染色にて梗塞巣をほとんど認めず、移植細胞の生着は認められなかった。次に直径100~150µm、高容量( $3 \times 10^7$ )の Spheroid 投与では、human specific Troponin I (hsTnI) による免疫染色によって、直径20µmの動脈血管周囲にグラフトの生着が確認できたが、同時に左室前壁中隔に広範囲の梗塞巣が認められた。直径80~100µm、中容量( $1 \times 10^7$ )の Spheroid の投与では、血管周囲にグラフトの生着が確認できたものの、比較的広範囲な梗塞を伴っていた。心機能評価は、細胞投与前後での左室造影、および心臓超音波検査を用いて評価を行ったが、いずれの評価項目も統計学的有意差は認められなかった。なお、いずれの群でも、異所性の心筋細胞生着や、腫瘍形成は認められなかった。

iPS 由来心筋細胞を用いた心筋再生医療の具現化は、学術的にも社会的にも期待されている領域であり、より現実的で低侵襲な方法が求められている。今回検討した経カテーテル的な細胞投与は、臨床で行われている冠動脈カテーテル治療に類似しており、安全、かつ簡便な方法で、これまで欧米で行われていた体性幹細胞を用いた心筋再生医療の臨床治験で多く用いられていた方法である。しかし、この体性幹細胞を用いた方法では、移植効率が低く、心筋梗塞によって失われた心筋細胞を梗塞巣に補充するという真の意味での心筋再生療法の概念を達成できていない。

今回の我々の検討では、十分な細胞生着が得られなかっただけでなく、投与細胞による冠動

脈塞栓、心筋梗塞を生じており、至適な細胞投与条件は得られなかった。理由のひとつとして、カニクイザルの心臓はブタ心臓と比較して小さく、冠動脈末梢の血管床面積も大きく異なると考えられる。したがって、現状の方法では臨床応用は困難と考えられ、効果的な移植方法を模索してゆく必要があると考えられる。

一方、iPS由来心筋細胞を冠動脈内に投与した研究は世界的に報告がなく、また、単離心筋細胞ではなく、心筋球を冠動脈内に投与することがもし可能であれば、細胞生着効率の向上、心機能の改善が有意に得られることが期待され、引き続き検討する意義は十分にあるものと考えられる。

#### <引用文献>

1) Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Aurora P, Christie JD, Kirk R, Dobbels F, Rahmel AO, Hertz MI. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-seventh official adult heart transplant report--2010. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29(10):1089-103.

2) Hemmi N, Tohyama S, Nakajima K, Kanazawa H, Suzuki T, Hattori F, Seki T, Kishino Y, Hirano A, Okada M, Tabei R, Ohno R, Fujita C, Haruna T, Yuasa S, Sano M, Fujita J, Fukuda K. A massive suspension culture system with metabolic purification for human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(12):1473-83.

3) Tohyama S, Fujita J, Hishiki T, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K. Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metab*. 2016;23(4):663-74.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi H, Tohyama S, Kanazawa H, Ichimura H, Chino S, Tanaka Y, Suzuki Y, Zhao J, Shiba N, Kadota S, Narita K, Naito T, Seto T, Kuwahara K, Shiba Y, Fukuda K	4. 巻 174
2. 論文標題 Intracoronary transplantation of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Inefficient procedure for cardiac regeneration.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Mol Cell Cardiol.	6. 最初と最後の頁 77-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yjmcc.2022.11.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
研究分担者	柴 祐司 (Shiba Yuji)  (70613503)	信州大学・学術研究院医学系・教授  (13601)	
研究分担者	遠山 周吾 (Tohyama Shugo)  (90528192)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師  (32612)	

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
---------	---------