

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08842

研究課題名（和文）iPS細胞を用いたin vitro心筋モデルによる心筋再生治療の評価系の確立

研究課題名（英文）Establishment of an evaluation system for myocardial regeneration therapy using an in vitro myocardial model using hiPS cells

研究代表者

武田 真季（Takeda, Maki）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70717446

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）：本研究では、筋芽細胞シート移植を実施した拡張型心筋症患者から治療前に採取した筋芽細胞を用いてiPS細胞を作製し、治療後に顕著な改善が認められた症例と認められなかった症例を比較することで、筋芽細胞シート治療の治療応答性を評価することを目的とした。各群の患者の筋芽細胞からiPS細胞の樹立に成功し、さらに心筋分化誘導が可能であることを確認した。心筋細胞の特性解析を行ったところ、両群において拡張型心筋症様の病態を示す傾向がみとめられた。また筋芽細胞シート治療を模した筋芽細胞の培養上清を心筋細胞に作用させたところ、両群で異なる傾向を示し、in vitroで治療応答効果を再現できる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拡張型心筋症の発症には遺伝的要因や環境要因が複雑に関与しており、症状・治療応答性についても多岐にわたる。治療前のなんらかの患者背景が治療応答性に影響を及ぼしている可能性が考えられるが、関連性は明らかになっていない。治療応答性を事前に評価することができれば、より早期に最適な治療選択が可能となると考えられ、患者負担の減少、医療経済の抑制にも繋がるため、学術的・社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to evaluate for the therapeutic response of myoblast sheet treatment using in vitro myocardial model.

Among patients with dilated cardiomyopathy who underwent myoblast cell sheet transplantation, we identified cases in which significant improvement (responder) or no improvement (non-responder) was observed after transplantation. We generated human induced pluripotent stem cells using myoblasts from these patients in each group and differentiated into cardiomyocytes. Cardiomyocytes in both groups showed pathological conditions like dilated cardiomyopathy, including cell hypertrophy, sarcomere abnormalities, and contractile abnormalities. When myoblast culture supernatant, which mimics myoblast cell sheet transplantation, was applied to cardiomyocytes in both groups, different trends were observed in both groups, suggesting the possibility of evaluating therapeutic response in vitro.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：心筋再生治療 iPS細胞 in vitroモデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

わが国において死亡原因の上位を占めている心不全は年々増加傾向にある。従来の内科的治療や外科的治療を行った上でも改善の乏しい重症心不全患者に対する治療は、補助人工心臓や心臓移植となるが、重症心不全患者総数からみた相対的ドナー不足は否めず、移植待機期間は年々長くなっている。したがって、重症心不全に対する新規治療法の開発の加速は急務である。本申請者らは、重症心不全患者に対して筋芽細胞シートを心表面に移植する治療法を開発してきた。モデル動物を用いた筋芽細胞シートの治療効果とそのメカニズムの検討により、筋芽細胞シートは、心機能の改善・血管新生・線維化率の縮小ならびに心筋肥大の抑制効果を有しており、さらにそれらの効果は細胞から分泌されるサイトカインを介したパラクライン効果によるものであることを明らかにした(Miyagawa S, Transplantation, 2005. Kainuma S, Mol Ther, 2015.)。これらの結果をうけ、重症虚血性心筋症患者に対する自己骨格筋筋芽細胞シート移植術は、2015年に「再生医療等製品」として条件付き承認を得るに至り、現在まで多数の患者に移植を行い、その成果について報告している(Miyagawa S, J Am Heart Assoc, 2017. Yoshikawa Y, Surg Today, 2018. Miyagawa S, Surg Case Rep, 2018. Yamamoto R, Ann Thorac Surg, 2019.)。さらに、適応拡大のため拡張型心筋症患者に本治療を行った第1相臨床試験において、虚血性心筋症患者で認められた治療効果が必ずしもすべての拡張型心筋症患者では認められないことが明らかになった。つまり、本治療を受けた拡張型心筋症患者の中には顕著な改善が認められた症例(以下、Responder群)と認められなかった症例(以下、Non-responder群)が存在することが明らかとなった(Miyagawa S, J Am Heart Assoc, 2017.)。拡張型心筋症の発症には遺伝的要因や環境要因が複雑に関与しており、治療前のなんらかの患者背景が治療応答性に影響を及ぼしている可能性が示唆されるが、その関係性は明らかになっていない。本治療の治療応答性を事前に予測することができれば、より早期に最適な治療選択が可能となると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、筋芽細胞シート移植を実施した拡張型心筋症患者の治療前に採取した検体からiPS細胞を樹立し、iPS細胞から分化誘導した心筋細胞を用いて治療前の心筋組織の状態を再現し、Responder群とNon-responder群の比較を行うことで、in vitroで筋芽細胞シート治療の治療応答を評価することである。

### 3. 研究の方法

#### 1) 対象患者の選定

筋芽細胞シート治療を行った拡張型心筋症患者の治療効果において、Responder群とNon-responder群に群分けを行う。

#### 2) 筋芽細胞からのiPS細胞の樹立

血液細胞よりもepigeneticな状態が心筋細胞に近く、分化誘導後に心筋細胞の表現型をより正確に反映しうると考えられる筋芽細胞からiPS細胞を樹立する。樹立したiPS細胞において、形態評価とフローサイトメトリーを用いた多能性マーカー(TRA1-60、TRA1-81、SSEA4、oct3/4、Nanog、Sox2)の発現評価を行う。

#### 3) 樹立したiPS細胞からの心筋分化誘導と心筋細胞の機能評価

樹立した各群の iPS 細胞から心筋分化誘導を行い、フローサイトメトリーを用いて心筋マーカー (cardiac troponin T) の発現を評価する。次に免疫蛍光染色による心筋細胞の形態評価、高速度カメラを用いた動きベクトル解析による収縮特性評価を行い、治療前の心筋組織の状態を in vitro で再現可能かを検証する。

#### 4) 治療効果の検証

治療による各群の心筋細胞の状態の変化を評価するため、筋芽細胞シートの培養上清を作用させ、群間比較・治療前後の比較を行い、治療応答性を評価する。

### 4. 研究成果

#### 1) 対象患者の選定

筋芽細胞シート治療を行った拡張型心筋症患者の治療効果において、Responder 群と Non-responder 群に群分けを行った。拡張型心筋症の原因の約 30%が遺伝子変異であることが明らかになっており、変異遺伝子による影響が大きく考えられるため、心筋症関連遺伝子に変異を有する患者に着目した。Responder 群・Non-responder 群の両群に患者が存在する変異遺伝子に絞り込みを行い、細胞を樹立する患者を選定した。

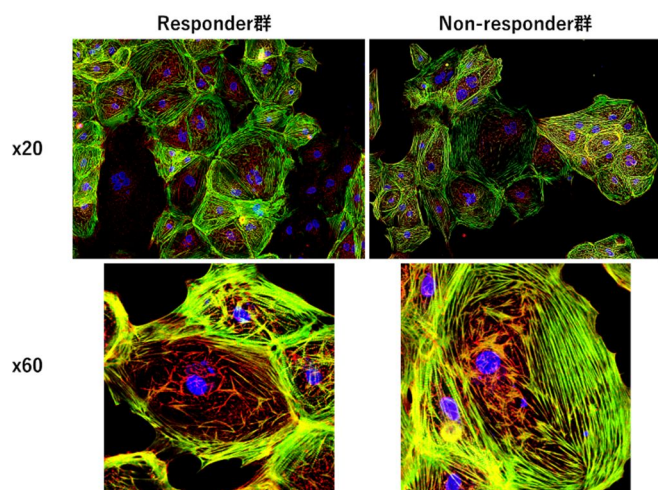
#### 2) 筋芽細胞からの iPS 細胞の樹立

筋芽細胞から iPS 細胞を樹立した報告はないため、健常人由来の筋芽細胞から iPS 細胞を樹立する方法を検討し、また得られた iPS 細胞が心筋分化誘導可能であることを確認した。本手法を用いて、1) で選定した患者の筋芽細胞から iPS 細胞の樹立を行った。樹立した両群の iPS 細胞から、ES 細胞様のコロニー形態を示すクローンを選択し、すべての多能性マーカーにおいて 90%以上の発現を有することを確認した。

#### 3) 樹立した iPS 細胞からの心筋分化誘導と心筋細胞の機能評価

2) で選択した各群の iPS 細胞から心筋分化誘導を行ったところ、cardiac troponin T が 90%以上発現していることを確認した。また心筋細胞マーカーである cardiac troponin T と Sarcomeric actinin の免疫蛍光染色により形態解析を行ったところ、両群の心筋細胞において細胞の肥大と不完全なサルコメア形態が観察された。

さらに、細胞収縮能を評価したところ、両群の心筋細胞において、不整脈様の動態が観察された。



Cardiac TroponinT (緑) /sarcomeric α actinin (赤) /Hoechst 33342 (青)

#### 4) 治療効果の検証

筋芽細胞シート治療効果を検証するため、両群の心筋細胞に筋芽細胞シートの培養上清を作用させ、細胞収縮能の評価を行ったところ、添加後の心筋細胞の収縮動態において、両群で異なる傾向がみとめられた。

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
研究分担者	河村 拓史  (Kawamura Takuji)  (60839398)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教    (14401)	

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