

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16084

研究課題名（和文）ヒトiPS細胞由来心筋細胞の新規移植方法の開発

研究課題名（英文）Development of novel transplantation method for human iPS cell-derived cardiomyocytes

研究代表者

小林 秀樹（Kobayashi, Hideki）

信州大学・医学部附属病院・助教（診療）

研究者番号：90794389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞由来心筋細胞の心臓への移植方法として、冠動脈内投与方法および直接注射法の有効性及び安全性を検証した。冠動脈内投与方法では、ホストの心筋にグラフト生着が確認されたものの、同時に大きな心筋梗塞が形成され、心機能低下を認めたことから、心筋細胞の移植法としては非効率であると考えられた。

直接注射法では、心筋梗塞モデルのカニクイザルに移植実験を行ったが、細胞移植群において、長期的にグラフトの生着が確認され、生理食塩水移植群と比較して、心機能の改善効果が認められた。また従来報告と比較して、移植後に発生する心室性不整脈の副作用が格段に少ないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、iPS細胞由来心筋細胞の移植法として、冠動脈内投与方法は非効率であると考えられたが、直接注射法は有効かつ安全な方法であることが示された。これらの知見は、iPS細胞由来心筋細胞移植の現実的なプロトコルの確立にもつながることが予想され、心筋再生治療のヒトへの臨床応用の実現化を大きく加速するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We investigated the efficacy and safety of intracoronary administration and direct injection methods for transplanting human iPS cell-derived cardiomyocytes into the heart. Although intracoronary administration method confirmed graft survival in the host myocardium, it also caused large myocardial infarction and reduced cardiac function, which suggested that this method is inefficient for transplanting cardiomyocytes.

In a direct injection method, cell transplantation were conducted on cynomolgus monkeys with a myocardial infarction model, and the long-term survival of the grafts was confirmed in the cell transplant group, and an improvement in cardiac function was observed compared to the saline transplant group. In addition, it was revealed that the side effect of ventricular arrhythmia occurring after transplantation was significantly less than in previous reports.

研究分野：循環器内科

キーワード：再生治療 iPS細胞由来心筋細胞 細胞移植 冠動脈内投与 カテーテル

## 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や狭心症などの虚血性心疾患と、その後に併発する心不全は、罹患率・死亡率ともに高い疾患である。心臓は自己再生能が乏しい臓器であるため、一旦傷害された心筋細胞の回復は困難であった。しかし ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞の誕生により、心臓病に対する心筋細胞移植治療が実現されようとしている。

多能性幹細胞由来の心筋細胞を心臓へ移植する代表的な方法としては、細胞をシート状にして心臓表面に張り付けるシート法や、直接心筋内に注射する直接注射法がある。また、カテーテルを用いて冠動脈内に注入する冠動脈内投与法も考えられる。これまでに、研究代表者らの実験室では、心筋梗塞モデルの動物において、主に直接注射法を用いた心筋細胞移植実験を行い、その心機能改善効果を報告してきた。しかし、直接注射法は移植手術の際に開胸が必要であることや心筋に直接注射を行うことなど、手術に伴う侵襲度が大きいことが問題として挙げられる。移植手術による生体への侵襲は、特に重症心不全患者においては回避すべき点であり、より低侵襲な移植方法の開発が必要であると考えられる。

冠動脈内投与法はカテーテルを用いて冠動脈内に細胞を投与する方法であり、生体への侵襲は低いと考えられる。これまでに間葉系幹細胞や心臓前駆細胞を投与する試験は行われてきたものの、多能性幹細胞から分化させた心筋細胞を冠動脈内に投与し、心筋へのグラフト生着が得られたとする報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、多能性幹細胞から作製した心筋細胞を、2 種類の手法を用いて心筋梗塞モデル動物の心臓へと移植する実験を行い、グラフトの生着の程度や心機能改善効果、手技に伴う安全性、移植後の不整脈の発生について、比較・検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

まず、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を作製、凍結保存した。心筋細胞移植日の 2 週間前にカニクイザルを開胸し左前下行枝を一時的に結紮することで、急性心筋梗塞を作製した。2 週間経過した時点で、直接注射法ならびに冠動脈内投与法による細胞移植を行った。直接注射法では、再度開胸し梗塞心筋の心筋内に細胞を注射した。冠動脈内投与法では、大腿動脈からカテーテルを挿入し左前下行枝内に細胞を注入した。それぞれの移植法において、移植時の合併症の有無について確認を行った。

細胞移植前後に血液検査、心エコー図法および心臓マイクロ CT を行い、心機能を経時的に評価した。またホルター心電図検査によって細胞移植後に発生する不整脈の頻度を比較した。移植 12 週後に心臓を摘出し、心筋細胞の生着程度や腫瘍化の有無、他臓器への異所性移植といった事象について病理組織学的検索を行った。

## 4. 研究成果

冠動脈内投与法では、合計 6 頭のカニクイザルに細胞数や細胞塊のサイズなどの条件を変えて細胞移植を行った。1 ヶ月後に心臓を摘出し組織検査を行ったところ、大きいサイズの細胞塊を投与した動物において、ホストの心筋内の細動脈周囲にグラフトの生着を認め

たものの、同時に心筋梗塞の形成も認められた。多くの細胞数を投与した動物では、移植後に大きな心筋梗塞が形成され、心機能低下が認められた。また他の1頭は細胞注入中に死亡した。以上より、iPS細胞由来心筋細胞の移植方法として冠動脈内投与法は非効率的なアプローチであると考えられた。

次に合計10頭のカニクイザルに対して直接注射法による心筋細胞移植実験を行った。移植の2週間前に急性心筋梗塞を作製したカニクイザルに、iPS細胞由来心筋細胞または生理食塩水を移植し、心機能の変化や不整脈の発現を観察し、移植3か月後に組織検査を行った。心筋細胞移植群では、3か月後にもグラフトの生着が確認され、生理食塩水移植群と比較し長期的に心機能の改善効果が認められた。また従来との報告と比較して移植後に発生する心室性不整脈の副作用が格段に少ないことが明らかとなった。

本研究から、iPS細胞由来心筋細胞の移植法として、冠動脈内投与法は非効率的であると考えられたが、直接注射法は有効かつ安全な方法であることが示された。これらの知見は、心筋再生治療のヒトへの臨床応用の実現化を大きく加速するものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kobayashi Hideki, Tohyama Shugo, Kanazawa Hideaki, Ichimura Hajime, Chino Shuji, Tanaka Yuki, Suzuki Yota, Zhao Jian, Shiba Naoko, Kadota Shin, Narita Kazumasa, Naito Takafumi, Seto Tatsuichiro, Kuwahara Koichiro, Shiba Yuji, Fukuda Keiichi	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 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi H, Tohyama S, Ichimura H, Ohashi N, Chino S, Soma Y, Tani H, Tanaka Y, Yang X, Shiba N, Kadota S, Haga K, Moriwaki T, Morita-Umei Y, Umei C. T., Sekine O, Kishino Y, Kanazawa H, Kawagishi H, Yamada M, Narita K, Naito T, Seto T, Kuwahara K, Shiba Y, Fukuda K	4. 巻 -
2. 論文標題 Regeneration of Nonhuman Primate Hearts With Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Spheroids	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.123.064876	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林秀樹、遠山 周吾、金澤 英明、門田 真、柴 祐司、桑原 宏一郎、福田 恵一
2. 発表標題 冠動脈内投与法によるヒト多能性幹細胞由来心筋細胞移植の実現可能性について
3. 学会等名 第262回日本循環器学会関東甲信越地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideki Kobayashi, Shugo Tohyama, Koichiro Kuwahara, Yuji Shiba, Keiichi Fukuda
2. 発表標題 Regeneration Of Primate Heart With Human iPSC-Derived Cardiac Spheroids
3. 学会等名 The 17th annual BCVS 2023 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1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
---------	---------