

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19528

研究課題名（和文）iPS細胞由来心筋exosomeを用いた新規cell-free心臓再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel cell-free cardiac regenerative therapy using iPS cell-derived cardiac exosomes

研究代表者

富永 佑児（Tominaga, Yuji）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医師

研究者番号：80838558

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、近年、移植細胞の準備・調整を要さない汎用性の高いcell-freeの心筋再生治療開発の足がかりとして期待されている、幹細胞などから分泌される細胞外小胞(exosome、extracellular vesicles)に関する研究である。iPS心筋細胞大量培養装置から得られた培地より、細胞外小胞を抽出し、心筋梗塞モデルラットに投与し、網羅的遺伝子発現解析を行い、in vitro、in vivoのdataとin silicoのdataとから、メカニズムを同定した。2023年にJournal of Heart and Lung Transplantationからpublishされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年、移植細胞の準備・調整を要さない汎用性の高いcell-freeの心筋再生治療開発の足がかりとして期待されている、幹細胞などから分泌される細胞外小胞(exosome、extracellular vesicles)に関する研究である。我々が保有するiPS心筋細胞大量培養装置から得られた培地より、細胞外小胞を抽出し、その治療効果を検討を行なった。心筋梗塞モデルラットにおいて心機能改善、血管新生、線維化抑制を認めた。網羅的遺伝子発現解析の手法を用いて、そのメカニズムを解明した。今後の細胞外小胞の臨床応用へとつながる研究である。

研究成果の概要（英文）：This study investigates extracellular vesicles (exosomes) secreted from stem cells, which are expected to be a foothold for the development of versatile cell-free myocardial regeneration therapy that does not require preparation and conditioning of transplanted cells. We are extracting extracellular vesicles from the culture medium obtained from our iPS cardiomyocyte large-scale culture system and examining their therapeutic effects. In 2021, we made significant strides by administering extracellular vesicles to rat models of myocardial infarction and analyzed their single-cell gene expression. We have conducted a detailed analysis of the mechanism of action of extracellular vesicles using the analysis results, and identify the mechanism based on in vitro, in vivo, and in silico data.

The results of this study were published in 2023 by the Journal of Heart and Lung Transplantation.

研究分野：心臓血管外科、再生医療

キーワード：iPS cell iPS cardiomyocyte Exosome Extracellular vesicle M2 macrophage arteriogenesis reduced fibrosis

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 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

<重症心不全の現状> 日本における心不全による年間死亡者数は増加傾向であり、2019年では8万人を超える。心不全が重症化すると補助人工心臓や心臓移植が適応となるが、心臓移植ドナー不足は著しく、移植待機期間は延長傾向で3年を超える。それに伴い補助人工心臓における抗凝固療法に伴う出血や感染リスクも高くなり、移植待機中死亡者は2割を超え、更に増加している(松田.移植,2019;54:291-8)。よって、これらを補完・代替する新規治療方法の開発が急務である。

<我々の研究成果と課題> これまでに当研究室では、重症心不全に対する骨格筋筋芽細胞シート、iPS細胞由来心筋細胞(iPS心筋細胞)シート治療などの細胞移植治療の基礎研究・臨床応用を行ってきた。これらの治療効果は主に、サイトカインのパラクライン効果による残存心筋の活性化と血管新生による組織修復による(Sawa, et al. Circ J;2015;79:991-9)。ただ、細胞培養施設が必須であり、潜在的な腫瘍発生リスク、培養・保存コストなどが課題である。

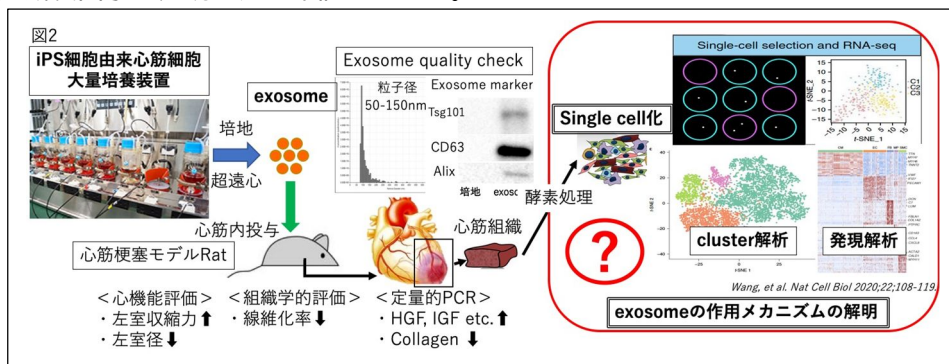
<課題の解決方法> 近年、サイトカイン以外にも移植細胞から分泌される細胞外小胞(Extracellular vesicles, EV)の治療効果を示唆する報告があり、移植細胞の準備・調整を要さない汎用性の高い cell-free の心筋再生治療開発の足がかりとして期待されている。一般的に exosome は、micro RNA やタンパク質を含んでおり、標的細胞への取り込みによる遺伝子発現の調整や、細胞表面からのシグナル伝達により作用を示すと考えられている。

### 2. 研究の目的

しかし、iPS細胞由来心筋細胞 EV の血管内皮細胞や心筋細胞等の各細胞群への取り込み、及び遺伝子発現変化や効果発現のメカニズムに関しては不明な点も多い。更なる有効性と安全性、かつ広汎な普及を可能にする簡便性・経済性を有する治療法として、cell-free の新規心筋再生治療法の開発のため、本研究では、iPS心筋細胞の分泌する EV が取り込まれる細胞群を同定し、各細胞群での発現解析を行い、心機能改善メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

<現状> 我々は、ヒト iPS 細胞の大量培養装置を有し、均質な iPS 細胞や高純度の iPS 心筋の製造と同時に、細胞培養上清からの EV も大量に単離/精製可能である。精製した exosome は、Nanotracking assay によって粒子数・粒子径を、Western blot にて exosome marker を確認し、miRNA sequence と proteome 解析も行い、quality の評価は完了した。また、exosome の in vitro/ in vivo 実験にて、心機能低下抑制、線維化抑制効果を確認し、心筋組織片の定量的 PCR では血管新生関連成長因子の発現上昇を確認している。



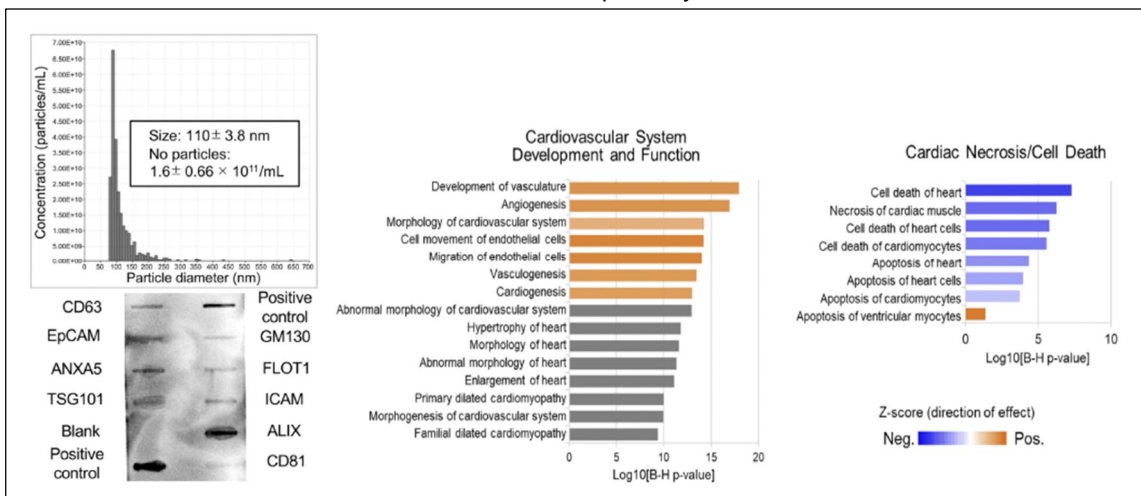
1年目：ランゲンドルフ式摘出心臓循環装置を用いて、生存率の高い single cell 化した細胞群を得る条件調整を行う。蛍光標識をつけた iPS 心筋細胞 exosome を Rat 心筋梗塞モデルの心筋内に投与し、摘出心臓組織の single cell 化処理を行う。投与前、投与3日後、1週間、2週間、4週間にてそれぞれの sample を取得する。フローサイトメトリーにて各細胞群(心筋細胞、血管内皮、壁細胞、マクロファージなどの炎症性細胞)の marker を用いて、EV を取り込んだ細胞群の確認を行う。

2-3年目：iPS心筋細胞 EV の投与群と非投与群とを比較の上で経時的に心臓組織の single cell 遺伝子発現解析を実施する。当該 exosome の miRNA sequence と proteome 解析結果と合わせ、より各細胞群への取り込みと発現変化を詳細に検討する。その結果をもとに in vitro/in vivo にて検証実験を行い、心機能改善のメカニズムを明らかにする。

### 4. 研究成果

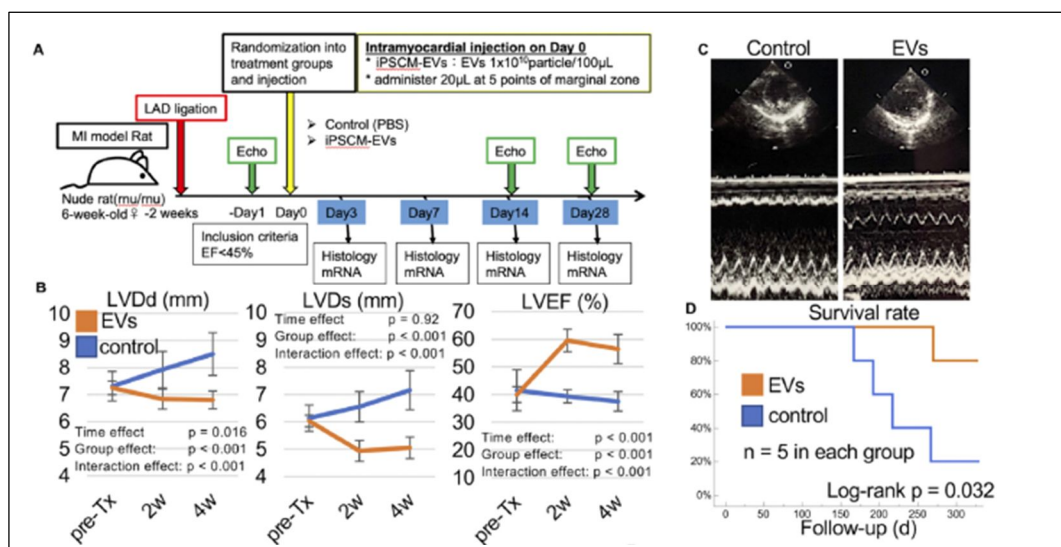
iPS心筋細胞より EV を抽出し、size, marker の確認を行った。EV の miRNA 発現と proteome の

解析の結果、血管新生や心収縮の制御に関与する pathway への強い関連を認めた。



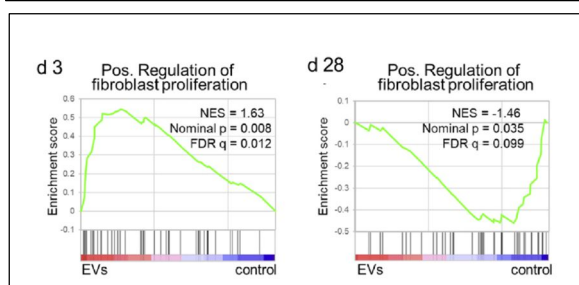
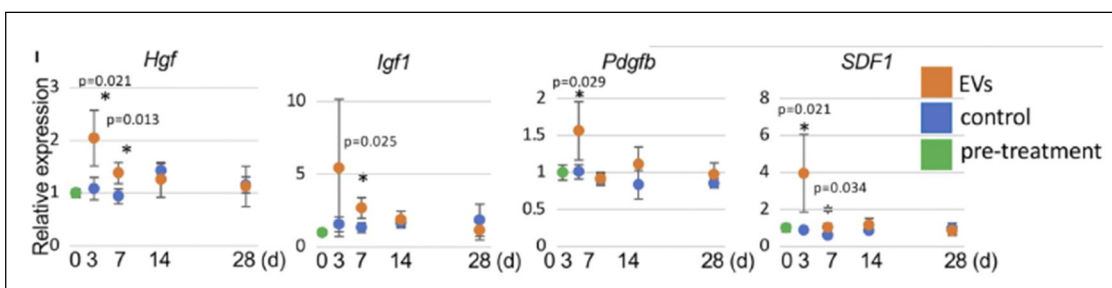
また、EV 投与により *in vitro* にて心筋細胞収縮速度の増加と血管内皮細胞の wound healing の促進、*ex vivo* の aorta ring assay にて血管新生の促進を認めた。

*In vivo* では、EV 群で治療 28 日後の左室拡張末期径が小さく ( $6.8 \pm 0.3$  vs  $8.5 \pm 0.8$  mm,  $p < 0.01$ )、左室収縮率が高かった ( $57 \pm 5$  vs  $38 \pm 4$ %,  $p < 0.01$ )。また生存率の改善を認めた。

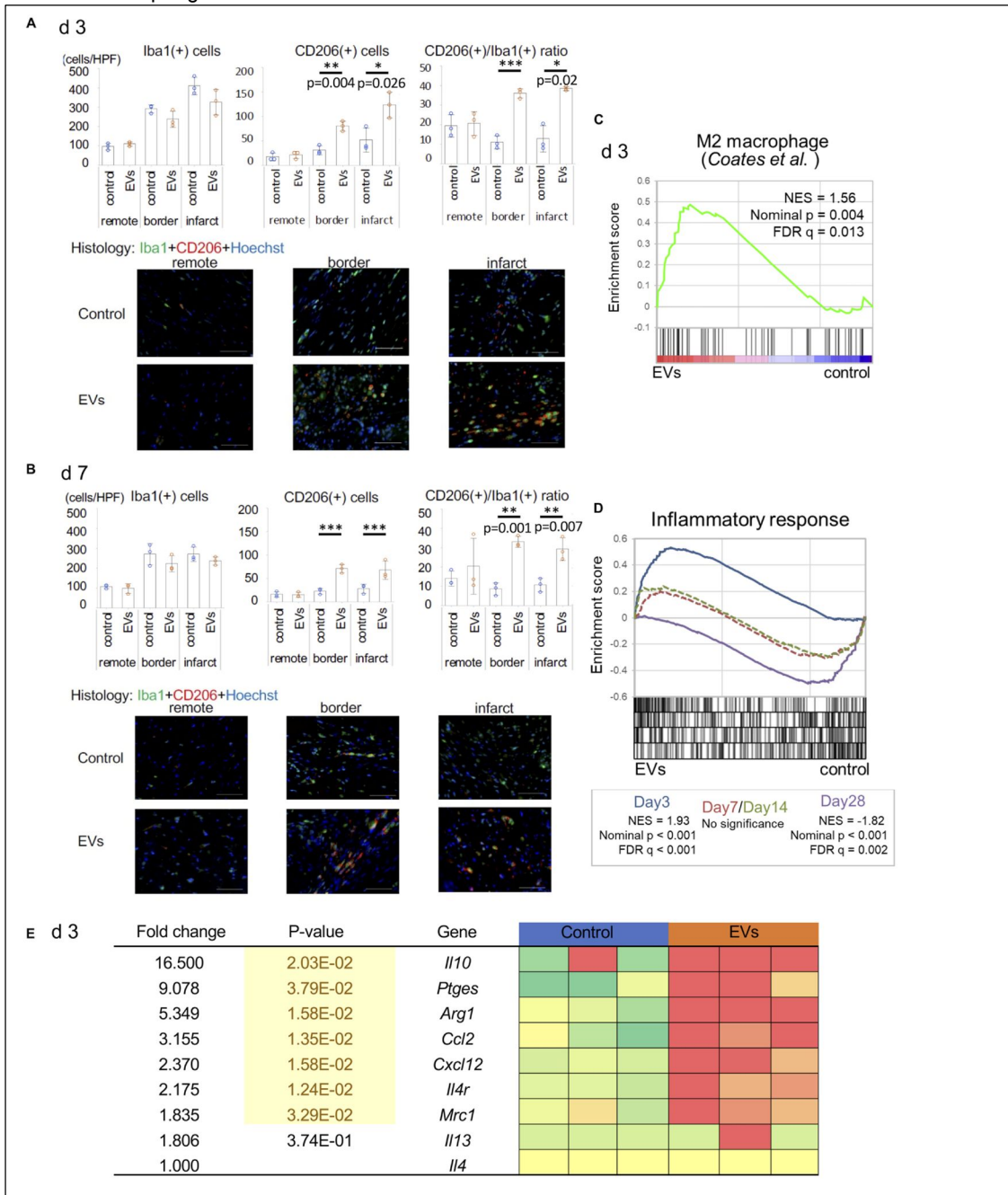


組織学的解析では EV 群の方が線維化面積が小さく ( $12 \pm 5$  vs  $22 \pm 6$ %,  $p < 0.01$ )、微小血管密度 (vWF 陽性: 2.1 倍,  $p < 0.01$ ) や細動脈密度 (vWF  $\cdot$  SMA 陽性: 6.2 倍,  $p < 0.01$ ) が高かった。

qRT-PCR では EV 群で HGF, SDF-1, IGF-1, PDGFb の発現が治療 3, 7 日後で有意に高く、線維化に関する connective tissue growth factor (CTGF) と collagen1 は 14, 28 日後で有意に低かった。



また M2 macrophage 誘導の有意な亢進を認めた。



結論として、臨床グレードに分化した iPSCM の EV による治療は、EV に含まれる miRNA とタンパク質の直接的効果と、M2 マクロファージに対する間接的なパラクリン効果を介して、ラットの心筋梗塞モデルの心機能と生存を改善した。iPSCM-EV は、急性期には組織修復と細胞生存経路を増強し、慢性期には線維化を抑制した。

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 1件）

1. 著者名 富永 佑児, 河村 拓史, 伊東 絵望子, 武田 真季, 原田 明希磨, 平 将生, 吉岡 大輔, 島村 和男, 戸田 宏一, 澤 芳樹, 宮川 繁	4. 巻 51
2. 論文標題 iPS 心筋細胞由来 Extracellular vesicle を用いた新規心臓再生療法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本心臓血管外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 5-i-5-ii
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4326/jjcv.51.5-i	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 -

1. 著者名 Yuji Tominaga, MD Takuji Kawamura, MD, PhD Emiko Ito, PhD Maki Takeda, PhD Akima Harada Kosuke Torigata, PhD Ryoto Sakaniwa, MD, MPH, PhD Yoshiki Sawa, MD, PhD Shigeru Miyagawa, MD, PhD	4. 巻 43
2. 論文標題 Pleiotropic effects of extracellular vesicles from induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes on ischemic cardiomyopathy: A preclinical study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 85-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.healun.2023.08.011	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永佑児
2. 発表標題 iPS心筋細胞由来Extracellular vesiclesのrat心筋梗塞モデルに対する治療効果とメカニズムの解析
3. 学会等名 第12回細胞再生医療研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富永佑児
2. 発表標題 iPS心筋細胞由来Extracellular vesicleを用いた新規心臓再生療法
3. 学会等名 第52回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永佑児
2. 発表標題 iPS心筋細胞由来Extracellularvesiclesを用いたrat心筋梗塞モデルに対する治療効果の検討
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永佑児
2. 発表標題 iPS心筋細胞由来細胞外小胞のrat心筋梗塞モデルに対する治療効果とメカニズム
3. 学会等名 第20回日本心臓血管外科再生治療研究会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------