



Title	Pleiotropic effects of extracellular vesicles from induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes on ischemic cardiomyopathy: A preclinical study
Author(s)	富永, 佑児
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95953
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	富永 佑児
論文題名 Title	Pleiotropic effects of extracellular vesicles from induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes on ischemic cardiomyopathy: A preclinical study (iPS心筋細胞由来Extracellular vesicleのラット虚血性心筋症モデルに対する有効性とそのメカニズムの検討)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 現在、重症心不全に対して、さまざまなコンセプトの治療法が開発されている。我々は虚血性心筋症に対する、ヒトiPS細胞由来心筋細胞 (iPSCM) シート移植の医師主導型臨床試験を行い、成果を得ている。その治療メカニズムとして、バラクライン効果が考えられている。サイトカイン以外のバラクライン因子として、細胞外小胞 (EVs) が注目されている。50-150nmの脂質二重膜粒子で、内部にmicro RNAやタンパク質などを内包し、抗アポトーシス、血管新生、抗線維化作用、M2マクロファージへの極性化促進などを示すことが報告がされており、心臓においても組織修復に効果的であることが予想される。このEVsが細胞シート治療のmechanismの一つである可能性を検証することは、更なる新規心臓再生療法の開発につながると考え、虚血性心筋症モデルラットに対する、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の分泌する細胞外小胞を投与し心機能/生存率が改善することを検討し、そのメカニズムを解析した。 〔方法(Methods)〕 1. In vitro, ex vivo: iPSCM-EVsの質的評価 臨床グレードの分化誘導システムを用いて人工多能性幹細胞 (QHJI14s04株) 由来心筋細胞 (iPSCM) を作製し、その培地から超遠心法によりEVsを単離した。質的評価として、粒子径評価 (Nano tracking assay)、EVsマーカーの確認 (Exosome marker array) をした。続いて、EVsのmicro RNA sequenceとproteome解析を行った。さらに、EVs投与の有無での培養心筋細胞収縮能 (Cell motion imaging) と遺伝子発現変化 (RNA sequence)、血管内皮細胞の遊走能 (Wound healing assay)、血管新生能 (Aortic ring assay) の評価を行った。 2. In vivo: ラット虚血性心筋症モデルラットにおけるiPSCM-EVsの治療効果の検討とメカニズムの解析 F344 Njcl rnu/rnuラット (6週齢雌) の冠動脈左前下行枝を結紮し、虚血性心筋症モデルラットを樹立し、iPSCM由来のEVを心筋内に投与したEV群とPBSを投与したcontrol群で、心機能評価 (心臓超音波検査) /生存率を評価し、組織学的評価 (血管密度、線維化率、M2マクロファージ数)、遺伝子発現解析 (RT-PCR, RNA sequence) を行い、比較検討した。 〔結果(Results)〕 1-1: EVの粒子径は平均110nmであり、複数種のexosome markerの陽性が確認された。miRNA sequenceやproteome解析では細胞増殖、抗アポトーシス、血管新生、抗線維化、M2マクロファージ極性化促進に関連するmiRNAやタンパク質が含まれていた。 1-2: iPSCM-EVは培養心筋細胞のCell motion imagingで収縮能を有意に増強し、gene ontology解析でEV投与により心機能改善、細胞生存促進への有意な関連を認めた。 1-3: iPSCM-EVは血管内皮細胞の遊走能を有意に増強し、Aortic ringからの血管新生を有意に亢進した。 2-1: EV群では、左室の拡張末期径、収縮末期径は縮小し、LVEFが改善した。また、生存率も改善した。 2-2: EV群の方が微小血管密度、細動脈密度ともに投与後2週間、4週間で有意に高かった。 2-3: EV群で、左室全体、特に梗塞周囲の領域で、有意に線維化の抑制が認められた。 2-4: 心筋梗塞周囲組織のqRT-PCRの時系列結果ですが、EV群でHGF、IGF-1、SDF1は投与3-7日の早期においてEV群で発現亢進をCTGFやCollagen1などの線維化関連因子は投与14日以降で有意に低かった。 2-5: EV群で傍梗塞領域、梗塞領域でCD206陽性のM2マクロファージが有意に増加しており、RNA sequenceにて、M2マクロファージ関連遺伝子の有意な発現亢進が認められた。 〔総括(Conclusion)〕 iPS心筋細胞由来の細胞外小胞は心筋細胞収縮能亢進、血管新生、線維化抑制、M2マクロファージへの分極化を介して、虚血性心筋症モデルラットの心機能、生存率を改善した。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 富永 佑児			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	宮川 繁
	副 査	大阪大学教授	奥山 宏臣
	副 査	大阪大学教授	下村 博一郎

論文審査の結果の要旨

現在、重症心不全に対して、さまざまなコンセプトの治療法が開発されている。申請者達は虚血性心筋症に対する、ヒトiPS細胞由来心筋細胞(iPSCM)シート移植の医師主導型臨床治験を行い、成果を得ている。その治療メカニズムとして、パラクライン効果が考えられているが、サイトカイン以外のパラクライン因子として、細胞外小胞(EVs)が注目されている。このEVsが細胞シート治療のmechanismの一つである可能性を検証することは、更なる新規心臓再生療法の開発につながると考え、EVの質的評価をin vitroで行い、in vivoで虚血性心筋症モデルラットに対する、ヒトiPS細胞由来心筋細胞の分泌する細胞外小胞を投与し心機能/生存率が改善することを検討し、そのメカニズムを解析した。

本研究では、iPSCM由来EVには細胞増殖、抗アポトーシス、血管新生、抗線維化、M2マクロファージ極性化促進に関連するmiRNAやタンパク質が含まれており、培養心筋細胞の収縮能の亢進、血管内皮細胞の遊走能を有意に増強し、Aortic ringからの血管新生を有意に亢進することを示した。また、虚血性心筋症モデルラットに心筋内投与した場合、心機能/生存率の改善を認め、心筋組織中の微小血管密度、細動脈密度の改善、線維化抑制、M2マクロファージが誘導されることを示し、網羅的遺伝子発現解析でも同様の発現変化が認められることを示した。

よって、本研究は、重症心不全に対するiPSCMシート治療の新たなメカニズムの解明や、新規心臓再生療法の可能性を示すとともに、臨床上有効な細胞外小胞治療の確立に寄与するものと考えられ、学位に値するものと認める。